



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

FIXAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE CO₂ UTILIZADAS NO CULTIVO DE
Spirulina

Gabriel Martins da Rosa

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa
Orientador

Prof. Dr^a. Michele R. A. Z. de Souza
Co-orientadora

Rio Grande, RS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**FIXAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE CO₂ UTILIZADAS NO CULTIVO DE
*Spirulina***

Gabriel Martins da Rosa

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Engenharia e Ciência de
Alimentos

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa
Orientador

Prof. Dr^a. Michele R. A. Z. de Souza
Co-orientadora

Rio Grande, RS

2014

Dedico este trabalho à Luiza Moraes e a minha família.

AGRADECIMENTOS

A minha namorada Luiza Moraes,
Pelo amor, companheirismo, incentivo e incansável empenho na ajuda à realização das tarefas laboratoriais e de escrita.

Aos meus pais, Maria Heloísa Martins da Rosa e Paulo Roberto Arrieira da Rosa,
Por me propiciar a chegada até a FURG, pelo amor e por entender os momentos longes de “casa”.

Ao meu orientador, Professor Jorge Alberto Vieira Costa,
Pela “desorientação” desde a iniciação científica e oportunidade de realizar o trabalho de conclusão de curso e a dissertação de Mestrado.

A minha Co-orientadora, Professora Michele da Rosa Andrade Zimmermann de Souza,
Pela amizade, incentivo, correções e contribuições com o trabalho.

A Bruna Barcelos Cardias,
Iniciante científica que aguentou acompanhar duas dissertações ao mesmo tempo e pela troca de experiências no processo ensino/aprendizagem.

Aos integrantes da banca de qualificação, Luiz A. A. Pinto e Célia F. C. da Rosa,
Pelas sugestões e contribuições que até o momento nortearam parte do trabalho.

A professora Eliana Badiale Furlong,
Por sempre estar disponível para ajudar e ensinar de forma única.

Aos amigos Adriano Henrard e Derli Schwinn (“O Branco”),
Por sempre disponibilizar um espaço agradável para discussões sérias em frente a churrasqueira.

Ainda no contexto “churrasquístico”, gostaria de agradecer a Lúcia,
Pela preocupação em ser a motorista da rodada do grupo em 99 % das ocasiões.

Ao amigo Vitor Furlong,
Que mesmo estando longe, sempre faz comentário oportunos... “Grande Fera”.

As amigas Ana Cláudia e Joice Aline
Por sempre se preocuparem com o bem comum e sempre estarem disponíveis à ajudar.

A toda equipe do LEB que de alguma forma contribui para realização deste trabalho.

Aos funcionários da FURG Roque Zílio, Islanda, Anaí e Suzana por sempre estarem a disposição para ajudar.

Aos Laboratórios da Furg, seus co-ordenadores e suas equipes,
Pela disponibilização de equipamentos, vidrarias e do espaço para análises quando necessário.

À FURG, por meio da Pós Graduação de Engenharia e Ciência de Alimentos,
Por conceder um ensino gratuito e de qualidade.

A CAPES,
pela bolsa remunerada de Mestrado.

FIXAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE CO₂ UTILIZADAS NO CULTIVO DE *Spirulina*

RESUMO

O balanço de energia radiativa emitida pelo sol e refletida pela terra está em desequilíbrio nas últimas décadas. Um dos protagonistas deste fato é o aumento das emissões de dióxido de carbono para atmosfera. Com isso, se tem como efeito mais preocupante o aquecimento global que pode causar impactos severos, os quais incluem o derretimento de geleiras polares, morte de corais pelo aquecimento da água, ondas de calor que afetam o setor agrícola e a saúde humana. Na busca por melhores condições ambientais, tem-se destinado pesquisas e projetos em tecnologias de captura e armazenamento de CO₂ que incluem a absorção química, separação por membrana, tecnologia de armazenamento subterrâneo e a biofixação de CO₂ por microalgas. Esta última apresenta como vantagem a atenuação da concentração de CO₂ atmosférico, concomitantemente à produção de metabólitos secundários interessantes, podendo produzir biocombustíveis. O objetivo desta dissertação foi aliar a fixação química e biológica de CO₂ em cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18, avaliando o efeito do absorvente químico e do reciclo de meio na biomassa microalgal produzida. Para isso, a microalga foi submetida à seleção de concentração de absorvente químico de CO₂ e ao cultivo semicontínuo com reciclo dos nutrientes do meio de cultivo. O trabalho foi dividido em duas etapas correspondendo a dois artigos científicos. Na primeira etapa foram selecionadas as concentrações de monoetanolamina (MEA), avaliando a cinética de crescimento e a produção de proteínas, carboidratos e lipídios. A segunda etapa se deu com a realização de cultivos semicontínuos com adição de MEA (0,20 mmol.L⁻¹ por corte) com concentração celular de corte de 0,5 g.L⁻¹ e fração volumétrica de reciclo de meio de 0,5. Os cultivos foram conduzidos com a cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18, meio Zarrouk sem NaHCO₃, modo descontínuo (1ª etapa) e modo semicontínuo (2ª etapa), por 13 d (1ª etapa) e 25 d (2ª etapa), a 30°C, 3,2 klx, fotoperíodo 12 h claro/12 h escuro, 0,36 mL_{CO2}.mL_{meio}⁻¹.d⁻¹. Com a 1ª etapa foram selecionadas as concentrações de 0,10, 0,20 e 0,41 mmol.L⁻¹ de MEA, as quais foram também testadas com hidróxido de sódio (NaOH). Nestas concentrações de absorvente químico, a concentração de carbono inorgânico dissolvido foi superior à obtida no ensaio controle e superior à obtida com NaOH. O teor proteico na biomassa cultivada com MEA foi superior as biomassas produzidas em outras condições deste trabalho, enquanto que a concentração de lipídios obtidos nas biomassas cultivadas com MEA e a NaOH são superiores aos valores encontrados com este gênero de microalga na literatura. Os maiores resultados cinéticos e de biofixação de CO₂ foram obtidos com adição de MEA e em modo semicontínuo, assim como a maior concentração de carboidratos (96,0% superior a biomassa produzida sem absorvente químico). Frente ao apresentado, acredita-se que *Spirulina* pode ser produzida com adição de absorvente químico de CO₂, reciclo de nutrientes e promover a redução das emissões de CO₂ com seu cultivo. Desta forma, vislumbra-se que a microalga *Spirulina* poderá vir a ser empregada não só em seguimentos de enriquecimento proteico, mas também em áreas que requeiram maiores concentrações de carboidratos.

Palavras-chave: Efeito estufa; Fixação de CO₂; MEA; Microalga; Reciclo de nutrientes.

CHEMICAL AND BIOLOGICAL FIXATION OF CO₂ USED IN *Spirulina* CULTIVATION

ABSTRACT

The balance of radioactive energy emitted by the sun and reflected by the earth is unbalanced in recent decades. One of the protagonists of this fact is the increased emissions of carbon dioxide to the atmosphere. Thus, it has the most worrisome effect of global warming that can cause severe impacts, which include the melting of polar glaciers, coral death by water heating, heat waves affecting the agricultural sector and human health. In the quest for better environmental conditions, has been designed research and projects on CO₂ capture and storage technologies including chemical absorption, membrane separation, underground storage technology and CO₂ biofixate by microalgae. This latest has the advantage of mitigating atmospheric CO₂ concentration, concomitantly with the production of interesting secondary metabolites, which may produce biofuels. The aim of this dissertation was to combine chemical and biological CO₂ fixation in cultivations of *Spirulina* sp. LEB 18, evaluating the effect of the chemical absorbent and medium recycle in the microalgal biomass produced. For this, the microalga was subjected to selection of chemical absorbent concentration and semicontinuous cultivation with nutrients recycles from the medium of cultivation. The work was divided into two stages corresponding to two scientific papers. In first step were selected the monoethanolamine (MEA) concentrations, evaluating the growth kinetics and production of proteins, carbohydrates and lipids. In second step was accomplished by adding monoethanolamine (0.20 mmol L⁻¹ for cut) in semicontinuous cultivations with blend concentration of 0.5 g L⁻¹ and volume fraction of medium recycle of 0.5. The cultivations were conducted with the cyanobacterium *Spirulina* sp. LEB 18, Zarrouk medium without NaHCO₃, discontinuous mode (1st step) and semicontinuous mode (2nd step), for 13 d (1st step) and 25 d (2nd step), at 30°C, 3.2 klx, photoperiod of 12 h claro/12 h dark and 0.36 mL_{CO2}.mL_{meio}⁻¹.d⁻¹. In first step have been selected the concentrations of 0.10, 0.20 and 0.41 MEA mmol.L⁻¹, which were also tested with sodium hydroxide (NaOH). At these concentrations of chemical absorbent, the concentration of dissolved inorganic carbon was higher than that obtained in standard assay and greater than obtained with NaOH. The protein concentration in the biomass cultivated with MEA was higher than the biomass produced in other conditions of this work, while the concentration of lipids obtained in the cultivated biomass with MEA and with NaOH are values higher compared with this genus of microalgae in the literature. The highest kinetic and the CO₂ biofixation results were obtained with addition of MEA and semicontinuos mode as well as the higher carbohydrates concentration (96.0% more biomass produced without chemical absorbent). Considering the presented, it is believed that *Spirulina* can be produced with the addition of CO₂ chemical absorbent, recycle nutrients and promote the reduction of CO₂ emissions in your cultivation. In this way, one sees that the *Spirulina* microalgae could well be employed not only in segments of protein enrichment, but also in areas which require higher concentrations of carbohydrates.

Keywords: CO₂ fixation; Greenhouse effect; MEA; Microalga; Recycle nutrients.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 – Potencial comparativo de aquecimento global de alguns gases de efeito estufa (GEE) em base mássica 25

CAPÍTULO III

ARTIGO I - Seleção da concentração de absorvente químico para o cultivo e produção de *Spirulina* sp. LEB 18

Tabela 1 – Resultados experimentais quanto ao crescimento e a realização dos testes com monoetanolamina (MEA) e hidróxido de sódio (NaOH) diante a 0,2, 0,4 e 0,6 g.L⁻¹ de *Spirulina* 43

Tabela 2 – Resultados médios obtidos de concentração celular máxima ($X_{máx}$) e produtividade máxima ($P_{máx}$) com diferentes concentrações celular iniciais de *Spirulina* (X_0) e de diferentes absorventes de CO₂ (NaOH ou MEA) 45

Tabela 3 – Resultados médios de concentração celular máxima ($X_{máx}$), produtividade máxima ($P_{máx}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$), tempo de geração (t_g), taxa de biofixação máxima de CO₂ ($TB_{máx}$) e eficiência de utilização de CO₂ (E) para o cultivo de *Spirulina* com adição de diferentes absorventes de CO₂ 49

Tabela 4 - Resultados médios elementares da concentração de carbono, hidrogênio, e nitrogênio encontrados na biomassa de *Spirulina* cultivada com e sem adição de absorvente de CO₂..... 50

Tabela 5 - Valores médios encontrados para concentração de proteínas, carboidratos e lipídios em base seca na biomassa de *Spirulina* cultivada com e sem adição de absorvente de CO₂ .. 51

ARTIGO II - Cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 com monoetanolamina como absorvente químico de CO₂ e reciclo de nutrientes

Tabela 1 - Resultados médios entre as réplicas de velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$), tempo de geração (t_g), produtividade máxima de biomassa ($P_{máx}$), taxa de biofixação de

CO₂ (TB), eficiência de utilização de CO₂ (E) e biomassa gerada (B_g), obtidos com cultivo semicontínuo de *Spirulina* com adição de MEA e no cultivo controle 65

Tabela 2 - Resultados médios de proteínas, carboidratos e lipídios, obtidos com a biomassa seca ao final do último ciclo de crescimento em cada condição 67

ANEXOS

Tabela A1 - Concentração dos compostos químicos do meio de cultura Zarrouk 90

Tabela A2 - Concentração dos compostos químicos do meio de cultura BG-11 91

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – *Spirulina platensis* UTEX1926 aumentada 400x 28

CAPÍTULO III

ARTIGO I - Seleção da concentração de absorvente químico para o cultivo e produção de *Spirulina* sp. LEB 18

Figura 1 - Desenho esquemático dos ensaios com *Spirulina* sp. LEB 18 em fotobiorreator tipo *Erlenmeyer* (a) e fotobiorreatores tubulares verticais (b): (1) cilindro de CO₂ industrial; (2) válvula de abertura do cilindro; (3) manômetro e medidor de vazão; (4) válvula solenóide; (5) minicompressor de ar; (6) conjunto de rotâmetros; (7) fotobiorreator; (8) amostrador; (9) aspersor de ar ou de CO₂..... 39

Figura 2 – Perfis de concentração celular em função do tempo para os ensaios com MEA e concentração celular inicial de 0,20 (a), 0,40 (b) e 0,60 g.L⁻¹ (c), com NaOH e concentração celular inicial de 0,2 g.L⁻¹ (d)..... 44

Figura 3 - Perfis médios de concentração celular de *Spirulina* nos ensaios sem adição de absorvente de CO₂ (ensaio controle) (□), com adição de 0,10 (●), 0,20 (○), 0,41 (■) mmol.L⁻¹ de MEA (a) e de NaOH (b)..... 46

Figura 4 - Perfis médios de pH dos ensaios sem adição de absorvente de CO₂ (ensaio controle) (□), com adição de 0,10 (●), 0,20 (○), 0,41 (■) mmol.L⁻¹ de MEA (a) e de NaOH (b) 47

Figura 5 - Perfis médios de concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID) sem adição de absorvente de CO₂ (ensaio controle) (□), com adição de 0,10 (●), 0,20 (○), 0,41 (■) mmol.L⁻¹ de MEA (a) e de NaOH (b)..... 48

ARTIGO II - Cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 com monoetanolamina como absorvente químico de CO₂ e reciclo de nutrientes

Figura 1 - Perfis médios de concentração celular obtidos com o ensaios de *Spirulina* sp. LEB 18 em modo semicontínuo com adição de MEA (a) e na condição controle (b)..... 63

Figura 2 - Perfis de pH (●) e concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID) (○) obtidos nos ensaios com <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 adicionado de MEA (a) e na condição controle (b)....	64
Figura 3 - Perfis médios de concentração percentual de carbono e nitrogênio elementar (a) e de proteínas e carboidratos (b) determinados na biomassa de <i>Spirulina</i> com adição de MEA e no cultivo controle	66

APÊNDICE

Figura AP1 - Ensaaios com a microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 na presença dos absorventes de CO ₂ MEA (a) e NaOH (b) com os fotobiorreatores tipo <i>Erlenmeyer</i>	86
Figura AP2 - Ensaaios com a microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 na presença dos absorventes de CO ₂ MEA (a) e NaOH (b) com os fotobiorreatores tubulares verticais	86
Figura AP3 - Duplicata de ensaios com e sem adição de monoetanolamina realizados com a microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18, em modo semicontínuo e reciclo de meio	87
Figura AP4 - Condição final dos ensaios com e sem adição de monoetanolamina realizados com a microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18, em modo semicontínuo e reciclo de meio	87
Figura AP5 - Perfis médios de concentração celular linearizados obtidos com <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 em modo semicontínuo com adição de MEA (a) e na condição controle (b)	88

NOMENCLATURA

% m.m ⁻¹	Concentração percentual em massa
% v.v ⁻¹	Concentração percentual em volume
B _g	Biomassa gerada (g)
C ₂ H ₇ NO	Monoetanolamina (2-aminoetanolamina ou dietanolamina)
CID	Carbono inorgânico dissolvido (g)
CO ₂	dióxido de carbono gás
CO _{2(g)}	dióxido de carbono gás
CO _(aq)	dióxido de carbono gás dissolvido no meio líquido
E	Eficiência de utilização de CO ₂ (percentual em massa)
GE	Gás estufa
GEE	Gás de efeito estufa
HO-CH ₂ CH ₂ -NH ₂	Monoetanolamina (2-etanolamina ou dietanolamina)
HCO ₃ ⁻	bicarbonato
ln	Logaritmo natural
lx	Iluminância (klx)
M _C	Massa molar de carbono (g.mol ⁻¹)
M _{CO2}	Massa molar de dióxido de carbono (g.mol ⁻¹)
MEA	Monoetanolamina (2-aminoetanolamina ou dietanolamina)
ṁ	Taxa mássica de alimentação diária com CO ₂ (mg.d ⁻¹)
-NH(CO)O-	Carbamato
NaOH	Hidróxido de sódio
p	Nível de significância
ppm	Partes por milhão
pH	Potencial hidrogênio iônico (mol.L ⁻¹)
P _{máx}	Máximo valor de produtividade volumétrica de biomassa (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)
P _x	Produtividade volumétrica de biomassa (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)
R ²	Coefficiente de determinação
t	Tempo (d)
t ₀	Tempo inicial (d)
TB	Taxa de biofixação de dióxido de carbono (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)
TB _{máx}	Máximo taxa de biofixação de dióxido de carbono (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)

t_g	Tempo de geração ou tempo de duplicação celular (d)
v_{vm}	volume de ar por volume de meio por minuto ($v.v^{-1}.m^{-1}$)
V_{C1}	Volume de cultivo removido no primeiro corte (L)
V_{C2}	Volume de cultivo removido no segundo corte (L)
V_{C3}	Volume de cultivo removido no terceiro corte (L)
V_{Cn}	Volume de cultivo removido no corte último corte (L)
$V_{\text{útil}}$	Volume útil do fotobiorreator (L)
X	Concentração celular ($g.L^{-1}$)
X_0	Concentração celular inicial ($g.L^{-1}$)
X_{fi}	Concentração de biomassa ao final de cada ciclo de crescimento ($g.L^{-1}$)
X_{ii}	Concentração de biomassa no início de cada ciclo de crescimento ($g.L^{-1}$)
x_{cbm}	Fração mássica de carbono elementar determinado na biomassa
X_{f1}	Concentração celular no final do primeiro ciclo de crescimento
X_{f2}	Concentração celular no final do segundo ciclo de crescimento
X_{f3}	Concentração celular no final do terceiro ciclo de crescimento
X_{fn}	Concentração celular no final do último ciclo de crescimento
X_{i1}	Concentração celular no início do primeiro ciclo de crescimento
X_{i2}	Concentração celular no início do segundo ciclo de crescimento
X_{i3}	Concentração celular no início do terceiro ciclo de crescimento
X_{in}	Concentração celular no início do último ciclo de crescimento
$\mu_{\text{máx}}$	Velocidade específica máxima de crescimento (d^{-1})

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	17
1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 Geral.....	20
2.2 Específicos	20
3 JUSTIFICATIVA.....	21
3.1 HISTÓRICO DO LABORATÓRIO	22
CAPÍTULO II	24
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
4.1 Efeito estufa e aquecimento global	25
4.2 Microalgas e biotecnologia microalgal	26
4.2.1 <i>Spirulina</i>	27
4.2.2 Produção de <i>Spirulina</i>	28
4.3 Fotossíntese.....	29
4.4 Fixação de CO ₂	30
4.4.1 Fixação química de CO ₂	30
4.4.2 Biofixação de CO ₂ por microalgas.....	31
CAPÍTULO III.....	33
5 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.....	34
ARTIGO I - SELEÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ABSORVENTE QUÍMICO PARA O CULTIVO E PRODUÇÃO DE <i>Spirulina</i> sp. LEB 18	35
RESUMO	36
ABSTRACT	36
1 INTRODUÇÃO	37
2 MATERIAL E MÉTODOS	38
2.1 Micro-organismo e meio de cultivo	38
2.2 Manutenção do inóculo.....	38
2.3 Absorventes, concentrações celulares iniciais e fotobiorreatores.....	38
2.4 Condições de cultivo.....	39
2.5 Determinações analíticas.....	40
2.5.1 Concentração de biomassa	40
2.5.2 Alcalinidade, pH e concentração de carbono inorgânico dissolvido	40

2.6 Respostas avaliadas do cultivo	40
2.6.1 Produtividade volumétrica de biomassa	41
2.6.2 Velocidade específica máxima de crescimento	41
2.6.3 Tempo de geração.....	41
2.6.4 Taxa de biofixação de dióxido de carbono (TB)	41
2.6.5 Eficiência de utilização de dióxido de carbono	41
2.7 Recuperação e caracterização da biomassa	42
2.7.1 Concentração de proteínas e carboidratos	42
2.7.1.1 Preparo da amostra	42
2.7.1.2 Concentração de proteínas.....	42
2.7.1.3 Concentração de carboidratos.....	42
2.7.2 Concentração de lipídios	42
2.7.3 Análise elementar	43
2.7.4 Teor de umidade	43
2.8 Análise estatística	43
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1 Seleção da concentração de biomassa de <i>Spirulina</i> e da concentração de monoetanolamina	43
3.2 Cultivo e caracterização de <i>Spirulina</i> em fotobiorreatores tubulares verticais	46
4 CONCLUSÃO.....	51
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ARTIGO II - CULTIVO DE <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 COM MONOETANOLAMINA COMO ABSORVENTE QUÍMICO DE CO ₂ E RECICLO DE NUTRIENTES	55
RESUMO	56
ABSTRACT	56
1 INTRODUÇÃO.....	57
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	58
2.1 Micro-organismo e meio de cultivo.....	58
2.2 Manutenção do inóculo	58
2.3 Condições de cultivo	58
2.4 Determinações analíticas	59
2.4.1 Concentração de biomassa.....	59
2.4.2 Alcalinidade, pH e concentração de carbono inorgânico dissolvido.....	59
2.5 Respostas avaliadas do cultivo	60

2.5.1 Produtividade volumétrica de biomassa	60
2.5.2 Velocidade específica máxima de crescimento e tempo de geração	60
2.5.3 Taxa de biofixação de dióxido de carbono (TB).....	60
2.5.4 Eficiência de utilização de dióxido de carbono	61
2.5.5 Biomassa gerada (B_g).....	61
2.6 Recuperação e caracterização da biomassa.....	61
2.6.1 Concentração de proteínas e carboidratos.....	61
2.6.1.1 Preparo da amostra.....	61
2.6.1.2 Concentração de proteínas	61
2.6.1.3 Concentração de carboidratos	62
2.6.2 Análise elementar.....	62
2.6.3 Concentração de lipídios.....	62
2.7 Análise estatística.....	62
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4 CONCLUSÃO	68
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
CAPÍTULO IV.....	72
6 CONCLUSÃO GERAL	73
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
APÊNDICE.....	84
ANEXO.....	89

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

O aumento das emissões de dióxido de carbono para atmosfera acentua a cada dia o efeito estufa (ZHANG; CHENG, 2009). Segundo o NOAA/ESRL (*National Oceanic and Atmospheric Administration/Earth System Research Laboratory*), a concentração média de CO₂ na atmosfera terrestre aumentou 53,3 ppm entre 1982 e 2012, atingindo 396 ppm em 2013 (DLUGOKENCKY; TANS, 2013). No setor industrial, pesquisas apontam que os investidores poderão requerer informações sobre uma empresa, antes de investir, nas quais sejam demonstrados dados sobre remoção de carbono e do esforço realizado para reduzir as emissões de CO₂ (ALCOCK, 2008).

A estabilização das concentrações de gases de efeito estufa (GEE) na atmosfera pode ser obtida utilizando recursos de energia renovável, como energia solar e eólica. No entanto, os altos custos associados com a produção de energias renováveis frente à abundância e disponibilidade de combustíveis fósseis deve dificultar a introdução de formas energéticas ambientais limpas (PIRES et al., 2011).

As tecnologias mais utilizadas para reduzir e estabilizar as concentrações de CO₂ na atmosfera abrangem processos biológicos, como a utilização da fotossíntese das árvores ou microalgas para capturar CO₂ (SKJÅNES et al., 2007; BILANOVIC et al., 2009). No entanto, é comum associar as metodologias de sequestro e mitigação de CO₂ biológicos com processos não biológicos de captura de CO₂ a partir da combustão fóssil (PIRES et al., 2011).

A absorção química usando soluções de alcanolaminas é uma das técnicas utilizadas para mitigação de CO₂ de gases de combustão. A monoetanolamina (MEA) é o absorvente mais empregado para este processo. Geralmente, uma solução de 30-40 % m.v⁻¹ de MEA é usada para purificação do gás de combustão por via úmida. No entanto, uma das principais desvantagens do processo de absorção com MEA é o consumo de energia elevado para regenerar o absorvente e separar o CO₂ após a absorção (MELDON; MORALES-CABRERA, 2011).

Embora a taxa de remoção de CO₂ em sistemas biológicos seja menor que em sistemas químicos (BILANOVIC et al., 2012), a biofixação de CO₂ utilizando microalgas é uma tecnologia muito estudada, pois converte CO₂ em biomassa por processo fotossintético. O interesse em empregar microalgas para remover CO₂ aumenta quando são reduzidos os custos do processo com o uso de águas residuais (DEVI; MOHAN, 2012), ou quando este bioprocessos é realizado em condições ambientais. Além disso, nestes bioprocessos também é possível obter

energia da biomassa microalgal convertendo lipídios a biodiesel (DELRUE et al., 2012; OLGUÍN, 2012) e carboidratos a bioetanol (FERREIRA et al., 2012), ou, por anaerobiose, obtendo-se hidrogênio e metano (LAKANIEMI et al., 2011).

A presente dissertação teve o intuito de pesquisar, estudar e abordar fatores que envolvem a fixação química e biológica de dióxido de carbono, bem como o reciclo dos nutrientes do meio de cultivo, a fim de serem obtidas maiores bioconversões de CO₂ em biomassa microalgal.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o efeito da adição de absorvente de CO₂ nos parâmetros de crescimento e na produção de biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18.

2.2 Específicos

Selecionar a concentração de absorvente químico de CO₂ adequado para o cultivo de *Spirulina*.

Produzir biomassa de *Spirulina* em modo descontínuo com adição de absorvente de CO₂.

Produzir biomassa de *Spirulina* em modo semicontínuo com adição de absorvente químico de CO₂ e reciclo de nutrientes.

Avaliar o efeito da adição de absorvente químico de CO₂ na cinética de crescimento de *Spirulina* e na concentração de proteínas, carboidratos e lipídios da biomassa da produzida da microalga em modo descontínuo e semicontínuo.

3 JUSTIFICATIVA

As taxas globais de consumo de energia não são sustentáveis considerando o aumento da população mundial. Isso porque o consumo e a dependência de energia das reservas não renováveis são contínuos. Pesquisadores de todo mundo procuram substituições renováveis e rentáveis para o petróleo, gás natural e carvão. Motivação adicional para a adoção de níveis sustentáveis de consumo de energia e combustíveis renováveis é fornecida pela ligação entre o uso de energia e produção de gases de efeito estufa (GEE), a mudança climática e a segurança energética (SUBHADRA, 2011).

O aquecimento global é causado, principalmente, devido às emissões antropogênicas dos GEE. Segundo as previsões mais otimistas apresentadas pelo IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change*), a concentração de CO₂ na atmosfera estabilizará entre 445 e 490 ppm em 2015 (IPCC, 2007). Estima-se que a temperatura média global aumentará em 2,4 °C, resultando em um aumento médio do nível do mar de 1,4 m (IPCC, 2007). Estas alterações podem causar inundações de cidades inteiras e extinção de espécies polares, entre outras catástrofes. Para que isso não ocorra, deve-se reduzir a concentração deste GEE na atmosfera até 350-370 ppm (BILANOVIC; HOLLAND; ARMON, 2012). Neste cenário é necessário aprimorar e implantar tecnologias para reduzir as emissões de CO₂ para atmosfera.

Dentre as principais estratégias para reduzir as concentrações de CO₂ na atmosfera estão incluídas as metodologias de captura e armazenamento de carbono. Estas metodologias são realizadas em três etapas: captura, transporte e armazenamento do CO₂ (*Carbon Capture and Storage* - CCS). A captura é geralmente realizada em grandes fontes de CO₂, como plantas de geração de energia e instalações de fabricação de cimento. Vários métodos podem ser aplicados com este objetivo: absorção, adsorção; separação de gás por membranas e destilação criogênica (THIRUVENKATACHARI et al., 2009), além do cultivo de microalgas.

O Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) no ano de 2005 firmou projeto com a Eletrobrás e a Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica (CGTEE). Desta parceria, surgiu a Planta Piloto de Biofixação de CO₂ por microalgas, que consiste em um sistema modular composto por dois containers-laboratório de 12 m cada, ocupando área de 6.000 m² na Usina Termelétrica Presidente Médici (UTPM), na cidade de Candiota - RS. Parte desta área construída é ocupada por um laboratório de 70 m², três biorreatores do tipo *Raceway*, sendo dois destes com volume de 18 m³ e um com volume de 1 m³, para crescimento e manutenção de inóculo, respectivamente. Este projeto,

possibilitou ao LEB dar início às pesquisas sobre a biofixação de CO₂ oriundo da combustão do carvão mineral. Em 2011 esta parceria foi renovada por 18 meses com o intuito de reativar a Planta Piloto de Biofixação de CO₂ por microalgas e dar continuidade as pesquisas.

Com o convênio renovado entre a FURG e a ELETROBRÁS (CGTEE), além do objetivo principal de diminuir as taxas de emissão de CO₂ para a atmosfera, contribuindo com a diminuição do aquecimento global, o LEB tem outras metas que englobam a condução do processo de biofixação de CO₂ (descontínuo, semicontínuo e contínuo), recuperação da biomassa, diversificação da utilização do carvão mineral da Usina e fornecer subsídios para a obtenção de energia a partir de biomassa microalgal. Além disso, esta parceria tem papel fundamental na formação de profissionais com visão integrada na área de biofixação de CO₂ por microalgas e aumentar o conhecimento científico da equipe do LEB e de outros pesquisadores neste tema, por meio de publicações de artigos em periódicos nacionais e internacionais. Neste contexto de biofixação de CO₂ está inserida esta dissertação de mestrado, a qual irá contribuir com o projeto e o estudo de meios para redução do efeito estufa.

3.1 HISTÓRICO DO LABORATÓRIO

O Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) pesquisa o cultivo de microalgas desde 1996. Nestes anos foram estudados diversos aspectos envolvendo condições de cultivo, utilização de diversas cepas de microalgas, condução e configuração de biorreatores, utilização de biocompostos da biomassa, entre outros (Andrade, 2009).

O LEB está vinculado à Escola de Química e Alimentos da Universidade e é composto por aproximadamente 50 pessoas. Dentre esses, professores, pós-graduandos em Engenharia e Ciência de Alimentos e estudantes de graduação dos cursos de Engenharia de Alimentos e Engenharia Bioquímica. Já foram defendidas 33 dissertações de mestrado, 8 teses de doutorado, realizados 5 pós-doutoramentos e atualmente se encontram em desenvolvimento quatro pós-doutoramentos, 10 dissertações e 9 teses.

Dentre as linhas de pesquisas desenvolvidas no laboratório, a biofixação de CO₂ por microalgas teve início no ano de 2005 por meio do convênio entre a Universidade Federal do Rio Grande, por meio do Laboratório de Engenharia Bioquímica, com a Eletrobrás e a CGTEE. A partir deste convênio foram desenvolvidos diversos estudos relacionados à biofixação de CO₂ por microalgas, dentre eles 6 dissertações de mestrado (MORAES, 2014; VAZ, 2014; MOREIRA, 2014; CAMERINI, 2008; RADMANN, 2007; MORAIS, 2006), 1 tese

de doutorado (MORAIS, 2008), 4 projetos de graduação e artigos científicos relacionados ao assunto (MORAIS e COSTA, 2007a; MORAIS e COSTA, 2007b; MORAIS e COSTA 2007c; MORAIS e COSTA, 2008a; MORAIS e COSTA, 2008b; RADMANN e COSTA, 2008; ROSA et al., 2011; MORAIS, RADMANN e COSTA, 2011; RADMANN et al., 2011).

CAPÍTULO II

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Efeito estufa e aquecimento global

A atmosfera terrestre é composta por partículas, gases em concentrações majoritárias (oxigênio e nitrogênio) ou traço (vapor de água, dióxido de carbono, metano e óxidos de nitrogênio). Alguns destes gases são conhecidos como gases de efeito estufa (GEE) ou simplesmente gases estufa (GE). O efeito estufa é um fenômeno natural que ocorre na terra há milhões de anos e consiste no mecanismo de aquecimento do globo por meio da retenção de parte da radiação solar incidente na terra e a refração de outra parte para o espaço (VIOLA; PAIVA; SAVI, 2010). Com este balanço os GEE regulam a temperatura média do planeta em 15,0°C.

A presença excessiva de GEE tende a romper o equilíbrio entre energia radiativa recebida e enviada do sol para terra, uma vez que estes gases são transparentes para a radiação solar de onda curta, mas absorvem parte da radiação infravermelha emitida pela terra de volta ao espaço (VIOLA; PAIVA; SAVI, 2010). Cada gás de efeito estufa apresenta determinado potencial de aquecimento global devido a sua capacidade de reter a radiação solar. A Tabela 1 apresenta alguns gases de efeito estufa (GEE), seu tempo de permanência na atmosfera e seu potencial de aquecimento global em 20, 100 e 500 anos.

Tabela 1 – Potencial comparativo de aquecimento global de alguns gases de efeito estufa (GEE) em base mássica

GEE	Tempo de vida (anos)	Potencial de aquecimento global (anos)		
		20	100	500
CO ₂	Variável	1	1	1
CH ₄	12	56	21	6,5
N ₂ O	120	280	310	170
*CHF ₃	264	9100	11700	9800
**SF ₆	3200	16300	23900	34900

*Trifluorometano; **Hexafluoreto de enxofre

Fonte: adaptado de HOUGHTON et al. (1996)

A Tabela 1 mostra que o dióxido de carbono é o GEE que apresenta o menor potencial de aquecimento global. Porém, por ser produto da combustão de toda matéria orgânica, o CO₂ é produzido em maior quantidade que os outros gases, o que causa preocupação a respeito do aumento de suas emissões para atmosfera.

O aquecimento global pelo aumento da concentração de CO₂ na atmosfera é o principal desafio deste século. Os impactos do aquecimento global têm causado danos severos para ecossistema, como o derretimento do gelo Ártico e o aumento do nível do mar. Isso traz como consequência direta a inundação de ilhas baixas, morte de corais pelo aquecimento da água, ondas de calor que afetam o setor agrícola e a saúde humana em decorrência das frequentes secas e desertificações (LAM; LEE; MOHAMED, 2012).

A busca por melhores condições de segurança do meio ambiente tem atraído a atenção mundial para tecnologias de captura e armazenamento de CO₂ (CCS) (PENG; ZHAO; LI, 2012). Estas tecnologias incluem a absorção química (PENG; ZHAO; LI, 2012), separação por membrana (AL-MARZOUQI et al., 2008), combustão com “looping” químico (CLC) (MATTISSON; LYNKFELT; CHO, 2001), tecnologia de armazenamento subterrâneo (HENDRIKS; BLOK, 1995), fixação por vegetação terrestre (GILL et al., 2002) e biofixação por microalgas (MORAIS; RADMANN; COSTA, 2011).

4.2 Microalgas e biotecnologia microalgal

Microalgas são micro-organismos (1-10 µm) fotossintéticos eucarióticos, que são seres vivos com núcleo celular individualizado. Logo, nesta definição as cianobactérias (organismos procarióticos) não seriam incluídas como microalgas. No entanto, as cianobactérias, deram origem aos cloroplastos das algas eucarióticas (e plantas terrestres) e compartilham muitas características, tais como a capacidade de conduzir a fotólise da água fotossinteticamente e, assim, contribuir para a produção de O₂ atmosférico e carbono orgânico reduzido (LARKUM et al., 2012). As algas (macroalgas) mais conhecidas são as multicelulares verdes, marrons e vermelhas, no entanto, a maioria das algas é unicelular. Estimativas indicam que existam 30.000 espécies de algas (macroalgas), não incluindo o fitoplâncton, no qual as microalgas se incluem. Estima-se que o número real de espécies de algas (incluindo cianobactérias) é muito maior do que 300.000 (BRODIE; ZUCCARELLO, 2007).

Microalgas, e as demais algas como um todo, se adaptaram a uma ampla gama de condições que incluem água doce, água salina, ambientes terrestres, nascentes quentes e frias, variedade de composições de minerais, condições de luz muito alta e muito baixa, entre outros fatores ambientais. Por estes motivos, microalgas são seres com enorme recurso de variação genética e diversidade química em sua composição (LARKUM et al., 2012).

A biotecnologia é uma área inter e multidisciplinar da ciência dependente da colaboração de profissionais de diferentes áreas de conhecimento como a bioquímica, fisiologia, genética, microbiologia, ecologia e engenharia. A biotecnologia é o conjunto de

conhecimentos, técnicas e métodos, com base científica ou prática, que permite a utilização de micro-organismos como parte integrante e ativa da produção industrial de bens e serviços. Produtos de biotecnologia variam de modificações em alimentos e bebidas, para produtos industriais tais como solventes, ácidos orgânicos, ésteres, aminoácidos, polissacarídeos, enzimas, vitaminas, antibióticos, hormônios e biocombustíveis. A utilização de micro-organismos e seus produtos metabólicos é um dos mais importantes campos da atividade da biotecnologia (COSTA; MORAIS, 2011).

As vantagens da biotecnologia de microalgas incluem a possibilidade de aumento da eficiência fotossintética em local de terra não arável (25 % da superfície da Terra) e o uso de fontes de águas salinas e residuais. Uma questão crucial para o cultivo de microalgas, no entanto, é torná-lo economicamente viável (LARKUM et al., 2012). Nos últimos 30 anos a biotecnologia de microalgas desenvolveu e diversificou significativamente. O cultivo de microalgas se aplicada na obtenção de produtos farmacêuticos, bioquímicos, fertilizantes, alimentos para animais e humanos, e como fonte de biocombustíveis. Microalgas podem ser combinadas para produzir metano (biogás), etanol, hidrogênio e, pela transesterificação dos ácidos graxos extraídos da biomassa, originar biodiesel (LAKANIEMI et al., 2011; FERREIRA et al., 2012; DELRUE et al., 2012).

Spirulina é uma das cianobactérias mais importantes para biotecnologia de microalgas. Isso porque com a biomassa produzida deste gênero de microalgas é possível se obter elevada concentração de proteínas e produtos de interesse comercial como a clorofila *a*, ficocianina, carotenoides e ácidos graxos, como o ácido γ -linolênico (PULZ; GROSS, 2004).

4.2.1 *Spirulina*

Dentro do gênero *Spirulina* há variabilidade na morfologia, principalmente devido a fatores ambientais físico-químicos (como luz e temperatura). Em geral, o gênero *Spirulina* é filamentosos, formado por arranjos de tricomas helicoidais (segmentos espiralados formados de células cilíndricas, curtas e largas, revestidas por uma membrana fina). Esses possuem tamanhos e grau de enrolamento variável, morfologia enrolada, desenrolada ou reta. O diâmetro dos filamentos varia entre 6 e 12 μm , o comprimento entre 100 e 200 μm . As células são individualizadas e se reproduzem por divisão binária. Sua organização celular é a de um procarionte típico e possui falta de organelas ligadas à membrana (TOMASELLI, 1997).

Spirulina, comercialmente, refere-se à biomassa seca (produto íntegro de origem biológica) da cianobactéria *Arthrospira platensis*. A primeira estirpe isolada e cultivada desta microalga (*Spirulina platensis* UTEX1926) foi obtida pela Universidade do Texas, em Austin

nos E.U.A. (Figura 1). O táxon *Spirulina* é utilizado para descrever, principalmente, as espécies *A. platensis* e *A. maxima* do gênero *Arthrospira*, as quais são geralmente utilizadas como alimento e suplemento alimentar (BELAY, 2008).

Figura 1 – *Spirulina platensis* UTEX1926 aumentada 400x



Fonte: <http://web.biosci.utexas.edu/utex/algaeDetail.aspx?algaeID=4383>

A concentração das principais macromoléculas de *Spirulina* pode variar de acordo com a espécie, modo de cultivo e condição nutricional. Em cultivos *outdoor*, cobertos por estufa de filme transparente de polietileno, biorreator aberto *Raceway* e meio Zarrouk, *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou concentrações médias, em m/m, de 62,0 %, 4,90 %, 22,0 % e 11,0 %, para proteínas, lipídios, carboidratos e cinzas, respectivamente (BORGES et al., 2013). Em torno de 47 % m/m das proteínas da biomassa de *Spirulina* é composta por aminoácidos essenciais. Dos lipídios, 50 % m/m são ácidos graxos, predominantemente ácidos palmítico, linolênico, γ -linolênico e oléico (COHEN, 1997).

A biomassa de *Spirulina* pode ser utilizada como suplemento alimentar humano e animal (principalmente, para aves e peixes) (SOUNDARAPANDIAN; VASANTHI, 2008), por possuir certificado GRAS (*Generally Recognized as Safe*) do FDA (*Food and Drug Administration*). No Brasil, a biomassa de *Spirulina* é reconhecida como alimento pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

4.2.2 Produção de *Spirulina*

A primeira geração de unidades de produção de microalgas têm se concentrado na produção comercial de produtos de alto valor, tais como β -caroteno (*Dunaliella* spp.), suplementos alimentares (*Spirulina*), nutracêuticos e ração para peixes (STEPHENS et. al, 2010; RICHMOND, 2004).

Os sistemas utilizados para maiores produções de *Spirulina*, mesmo esses não levando à concentrações elevadas de biomassa, são reatores abertos tipo *Raceway* (AJAYAN;

SELVARAJU; THIRUGNANAMOORTHY, 2012). O cultivo em biorreatores *Raceway* é realizado em Israel, Estados Unidos e China. Tanques circulares são usados no Japão, Taiwan e Indonésia. Na China, a produção anual de 200 t de biomassa por uma empresa, corresponde a 25 % da produção nacional e 10 % da produção mundial. A maior planta mundial de cultivo de microalgas (*Earthrise*) está localizada em Calipatria (CA, EUA), com área de 440.000 m² (SPOLAORE et al., 2006; BELAY, 2008). No entanto, há apenas informações limitadas a partir de instalações comerciais de grande escala que produzem *Spirulina* em grandes tanques ao ar livre. A produção em pequena escala realizada em tanques experimentais é limitada, uma vez que não se possui o conhecimento dos efeitos de colheita e reciclagem de nutrientes no rendimento e qualidade do produto, numa base contínua de produção (BELAY, 2008).

4.3 Fotossíntese

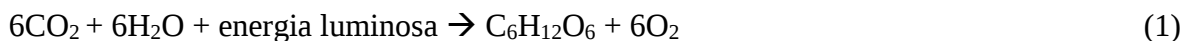
A luz tem papel fundamental nos organismos procariotos e eucariotos, pois a energia luminosa absorvida pelas clorofilas supre a energia necessária para as reações intracelulares. Em cianobactérias, como *Spirulina*, o pigmento fotossintético clorofila *a* é o principal composto ativo fotoquimicamente. Esta clorofila funciona como receptor de luz para condução da fotossíntese (MACINTYRE et al., 2002).

Dentro do sistema de pigmentos do fotossistema, presente em organismos fotossintetizantes, à luz pode sobrecarregar e interromper a alteração da síntese dos mesmos em relação a captação de luz e degradação celular. Como resultado disso, se tem a produção de espécies reativas de oxigênio que causam fotoinibição e/ou morte celular por foto-oxidação (TORZILLO et al., 2003).

A disponibilidade de luz, à medida que aumenta a profundidade do cultivo de microalgas, é fortemente reduzida devido à absorção e dispersão da energia radiativa. Atenuação da intensidade da luz é dependente do seu comprimento de onda, concentração das células, a distância de penetração da luz e a geometria do biorreator. No ponto de vista da engenharia, a geometria do reator pode reduzir a atenuação da luz no cultivo de microalgas (KUMAR et al., 2011).

O processo da fotossíntese é composto por duas fases distintas (clara e escura). Na etapa clara geram-se moléculas energéticas, a partir da excitação de seus elétrons pelos fótons da luz (como a clorofila), ATP e também NADPH que é o agente redutor para fase escura; enquanto que na etapa escura (puramente enzimática), a qual se dá sem a necessidade da luz, mas utiliza a energia provinda dos fótons (armazenada nos ATPs e NADPHs) para transformar

o CO₂ até carboidrato e liberar O₂ para atmosfera por meio da remoção de elétrons da água (MOHANTY; SRIVASTAVA; KRISHNA, 1997; NELSON; COX, 2010; CAMPBELL; FARRELL, 2006). A Equação 1 mostra o processo global da fotossíntese, na qual dióxido de carbono, água e energia luminosa são convertidos a glicose e oxigênio.



O local para as reações envolvidas no transporte de elétrons (fase clara) são as membranas tilacóides dispersas na célula. Já a etapa sem a necessidade de luz ocorre no estroma do cloroplasto (em plantas superiores) e no citoplasma de cianobactérias. Ao contrário de plantas superiores, as membranas tilacóides das cianobactérias não estão organizadas em regiões empilhadas (grana) e desempilhadas (estroma) (MOHANTY; SRIVASTAVA; KRISHNA, 1997).

4.4 Fixação de CO₂

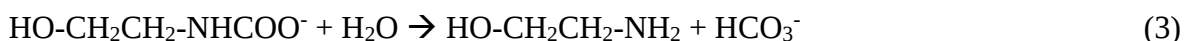
Existem diversos estudos e técnicas utilizadas para diminuir, capturar e fixar o CO₂ da atmosfera. Do ponto de vista energético, diminuir as emissões de CO₂ para atmosfera é mais difícil, pois requer mudança na matriz energética baseada, atualmente, em combustíveis fósseis. Por outro lado, para capturar e fixar CO₂ já existe tecnologia tais como a absorção química (PENG; ZHAO; LI, 2012), separação por membrana (AL-MARZOUQI et al., 2008), armazenamento subterrâneo (HENDRIKS; BLOK, 1995), e biofixação por microalgas (MORAIS; RADMANN; COSTA, 2011).

4.4.1 Fixação química de CO₂

A fixação química é um dos métodos mais utilizados de remoção do CO₂ de gases de combustão oriundo de processo industrial. Este método tem sido largamente utilizado devido às suas vantagens de operação, elevada eficiência de absorção elevada e tecnologia consolidada. Para reduzir custos de projeto e aumentar a eficiência de absorção química de CO₂, um dos aspectos imprescindíveis é selecionar o absorvente químico adequado (PENG; ZHAO; LI, 2012). Geralmente, a capacidade de um absorvente químico é relatada como a capacidade de carregamento de CO₂ ou H₂S (gases ácidos). Existe um número considerável de processos comerciais disponíveis para a absorção de CO₂ baseada em um reagente químico (metildietanolamina ou carbonato de potássio, por exemplo) ou em um sistema composto por mais de um (aminoetoxietanol e monoetanolamina; metildietanolamina e acelerador; K₂CO₃ e aditivo orgânico) (RUFFORD et al., 2012).

Processos químicos de absorção com soluções de amina são as tecnologias mais utilizadas de remoção de gás ácido na indústria de gás natural (GPSA, 2004). Os processos de absorção química dependem de reações do CO₂ com o sorvente para formar compostos intermediários fracamente ligados. Desta forma as reações podem ser invertidas mediante a aplicação de calor para libertar o CO₂ e regenerar o absorvente (OLAJIRE, 2010).

A reação que envolve monoetanolamina (MEA) e CO₂ em meio líquido normalmente eleva a concentração de carbono inorgânico no meio, pois forma bicarbonato, como mostram as Equações 2 e 3 (BLAUWHOFF et al., 1984; MELDON; MORALES-CABRERA, 2011).



4.4.2 Biofixação de CO₂ por microalgas

O uso de algas para sequestro de CO₂ apresenta como vantagem a atenuação da concentração de CO₂ atmosférico, bem como potencialidade de produção de biocombustíveis e outros metabólitos secundários de interesse comercial. Estima-se que 1 kg de biomassa algal utiliza cerca de 1,80 kg de CO₂ para ser produzida. Anualmente, entre 54,9-67,7 t de CO₂ pode ser sequestrado em reatores abertos tipo *Raceway*, o que corresponde a uma produtividade de biomassa entre 30-37 t.ha⁻¹.a⁻¹. O principal problema associado à biofixação de CO₂ de gases de combustão por microalgas são as elevadas temperaturas do gás de saída, a presença de NO_x, SO_x, bem como outras impurezas do combustível fóssil utilizado (BRENNAN; OWENDE, 2010).

O cultivo de microalgas para o sequestro de CO₂ é realizado em reatores abertos e fechados (KUMAR et al., 2011). O sistema aberto, normalmente, tem a desvantagem de não ter controlados parâmetros tais como a disponibilidade de luz, agitação, temperatura, pH e teor de nutrientes, mas dispensa o gasto com iluminação artificial. No entanto, ocorrem flutuações na temperatura e disponibilidade de luz devido a ciclos diurnos e variações sazonais são problemas para esta configuração de reator aberto (BRENNAN; OWENDE, 2010). Cultivos de microalgas em sistemas abertos com único objetivo de biofixação de CO₂ não estão sendo muito utilizados, pois o tempo de residência do gás é baixo. Em configuração de reator fechado (fotobiorreatores), o grau de controle sobre os parâmetros fundamentais que influenciam a cultura é elevado (CARVALHO et al., 2006). Além disso, biorreatores tubulares, normalmente, oferecem maiores colunas de cultivo para transferência do CO₂ da fase gasosa à fase líquida. No entanto, com sistemas fechados a biotecnologia microalgal é mais dispendiosa que com

biorreatores abertos. A biofixação de CO₂ por microalgas em fotobiorreatores é o foco de estudos em escala de bancada (HO et al., 2010).

CAPÍTULO III

5 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

A presente dissertação está dividida em duas etapas, correspondentes a um artigo científico cada.

Artigo 1: Seleção da concentração de absorvente químico para o cultivo e produção de *Spirulina* sp. LEB 18.

Artigo 2: Cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 com monoetanolamina como absorvente químico de CO₂ e reciclo de nutrientes.

**ARTIGO I - SELEÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ABSORVENTE QUÍMICO PARA
O CULTIVO E PRODUÇÃO DE *Spirulina* sp. LEB 18**

RESUMO

O aumento das emissões de CO₂ para atmosfera é oriundo, principalmente, da produção e utilização de combustíveis fósseis. Neste cenário se faz necessário o desenvolvimento de tecnologias capazes de maximizar a biofixação de carbono em uma sociedade que é dependente desta fonte energética. O objetivo deste trabalho foi selecionar a concentração de absorvente químico de CO₂ adicionado ao cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18, avaliando seu efeito no crescimento e na composição da biomassa. Para isso, foram testadas três concentrações celulares iniciais (X₀), oito concentrações de monoetanolamina (MEA) e três concentrações de NaOH. Os ensaios foram realizados em modo descontínuo, meio de cultivo Zarrouk sem NaHCO₃, a 30°C, 3,2 klx, fotoperíodo de 12 h claro/12 h escuro. A seleção das concentrações dos absorventes foi realizada em Erlenmeyer de 0,250 L, por 5 d, enquanto que a batelada com as concentrações selecionadas foi realizada em fotobiorreatores tubulares verticais de 2,0 L, por 13 d e com adição de 0,36 mL_{CO2}.mL_{meio}⁻¹.d⁻¹. As concentrações selecionadas de MEA não inibiram o crescimento de *Spirulina* e dobraram as concentrações de carbono inorgânico dissolvido no meio em relação ao ensaio com NaOH. A concentração de proteínas na biomassa cultivada como MEA foi em média 13 % superior à obtida com NaOH. O teor de lipídios encontrados nas biomassas é três a quatro vezes maiores que os valores encontrados para este gênero de microalga. Assim, ficou constatado que as concentrações dos absorventes selecionadas não diminuem a produtividade de *Spirulina* sp. LEB 18 e podem aumentar a concentração de alguma das três macromoléculas avaliadas.

Palavras-chave: Absorvente de CO₂, MEA, Microalga, Produtividade de biomassa.

ABSTRACT

The increase of CO₂ emissions to the atmosphere is derived mainly from the production and use of fossil fuels. In this scenario it is necessary develop technologies that maximize carbon biofixation in a society that is dependent on this energy source. The aim of this work was to select the concentration of CO₂ chemical absorbent added to the *Spirulina* sp. LEB 18 cultivation, assessing the effect on growth and biomass composition. For this, three initial cell concentrations, eight concentrations of monoethanolamine (MEA) and three concentrations of NaOH were tested. The assays were performed in a batch mode, Zarrouk cultivation medium without NaHCO₃, at 30°C, 3.2 klx, photoperiod of 12 h light/12 h dark. The selection of the absorbent concentrations was performed in Erlenmeyer of 0.250 L, for 5 d, whereas that the batch with the selected concentration was carried out in vertical tubular photobioreactors of 2.0 L, per 13 d, with the addition of 0.36 mL_{CO2} mL_{meio}⁻¹ d⁻¹. The selected MEA concentrations did not inhibit the *Spirulina* growth and doubled the concentrations of dissolved inorganic carbon in the medium in relative to the test with NaOH. The protein concentration in the biomass grown as MEA was on average 13 % higher than that obtained with NaOH. The lipid content found in biomass is three to four times higher than values found for this genus of microalgae. Thus, was evidenced that absorbents concentrations selected not decreases the *Spirulina* sp. LEB 18 productivity and can increase the concentration of any of the three available macromolecules.

Keywords: CO₂ absorbing, MEA, microalga, biomass productivity.

1 INTRODUÇÃO

O aquecimento global devido ao aumento da concentração de CO₂ na atmosfera tem sido identificado como um dos principais desafios deste século. Nos últimos anos, os impactos do aquecimento global têm causado danos severos ao ecossistema, incluindo o derretimento do gelo ártico, o aumento do nível do mar, resultando em inundação de ilhas baixas, a água mais quente causando morte maciça de corais, ondas de calor extremas continuam dificultando o setor agrícola e afetando a saúde humana e a ocorrência de frequentes secas e desertificação (LAM; LEE; MOHAMED, 2012).

A produção de biocombustíveis de microalgas está sendo muito estudado nas últimas décadas, pois pode apresentar alta eficiência de produção de biomassa a partir da biofixação de CO₂ utilizando grandes áreas de cultivo (STEPHENS et al., 2013) inapropriadas para agricultura, por exemplo. A biomassa produzida pode ser utilizada na conversão termoquímica (BILLER; ROSS, 2012), ou derivação bioquímica, para produzir combustíveis líquidos (FRANK et al., 2011). A exemplo disso cita-se o bioetanol (FERREIRA et al., 2012), biogás (RAMOS-SUÁREZ; CARRERAS, 2014) e o biohidrogênio (ONWUDILI et al., 2013). Outro fim para os compostos carbonáceos da biomassa é a geração de fertilizantes nitrogenados (STEPHENS et al., 2013).

A cianobactéria *Spirulina* é filamentosa e fotossintetizante que cresce em corpos d'água com pH em torno de 10. Uma característica marcante deste gênero é o arranjo de tricomas cilíndricos multicelulares (VONSHAK, 1997). Devido ao alto valor nutricional e a presença de biocompostos de interesse comercial, *Spirulina* é uma das microalgas mais estudadas. (BELAY, 2008). Além disso, em cultivos de *Spirulina* já foi comprovada a produção de biomassa utilizando CO₂ como fonte de carbono (ROSA et al., 2011). Contudo, existem lacunas de estudos a respeito do cultivo desta microalga que maximizem a produção de biomassa e a biofixação de CO₂. Isso é comprovado, pois a produção de biomassa em grande escala é realizada em biorreatores abertos onde o tempo de residência do CO_{2(g)} é insuficiente para que o mesmo seja retido no meio líquido e participe do equilíbrio químico ($\text{CO}_{2(g)} \leftrightarrow \text{CO}_{2(aq)} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-}$), o qual possibilita a microalga converter o carbono em biomassa.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi selecionar a concentração de absorvente químico de CO₂ adicionado ao cultivo de *Spirulina* e avaliar o seu efeito no crescimento e na concentração das principais macromoléculas produzidas da microalga.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo e meio de cultivo

A microalga utilizada para os cultivos foi *Spirulina* sp. LEB 18 (MORAIS et al., 2008), fornecida pela Coleção de Culturas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG. Esta cianobactéria foi mantida em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) sem a fonte de carbono do meio (NaHCO_3) e com adição de $\text{CO}_{2(g)}$.

2.2 Manutenção do inóculo

A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi mantida com $\text{CO}_{2(g)}$ industrial (pureza mínima de 99,5 %) como fonte de carbono em substituição à fonte de carbono do meio Zarrouk (NaHCO_3). Para isso, a microalga foi concentrada por decantação ao passo que o sobrenadante, contendo em torno de 90 % v.v⁻¹ do inóculo, foi removido e o decantado recuperado (cerca de 10 % v.v⁻¹ do inóculo). Este agregado de células foi ressuspensionado em meio Zarrouk modificado (sem carbono) e submetido à vazão específica diária de 0,12 mL CO_2 .mL meio^{-1} .d⁻¹, 1 min, a cada 1 h, durante o período claro.

2.3 Absorventes, concentrações celulares iniciais e fotobiorreatores

O absorvente químico (Monoetanolamina P.S., teor mínimo de 99,0%), assim como o absorvente de CO_2 (Hidróxido de sódio micropérolas P.A.-PCS, teor mínimo 99,0%), foram adquiridos junto à Vetec Química Fina Ltda.

A fim de avaliar a tolerância de *Spirulina* ao MEA, primeiramente foram testadas maiores concentrações deste absorvente. Contudo, como a tolerância da microalga está ligada diretamente a quantidade de células existentes do micro-organismo, foi também testada diferentes concentrações celulares iniciais (X_0). Para tanto, foram realizados testes em duplicatas, em fotobiorreatores tipo *Erlenmeyer* com volume total de 0,25 L e volume útil de 0,20 L.

As concentrações de MEA testadas foram 4,92, 3,28, 1,64, 1,23, 0,82, 0,41, 0,20, 0,10 mmol.L⁻¹. Estes teores de absorvente químico foram baseados no único trabalho envolvendo absorvente químico e cultivo de microalgas realizado por Choi, Kim e Lee (2012), com a microalga *Scenedesmus* sp. As concentrações celulares iniciais testadas foram 0,2, 0,4 e 0,6 g.L⁻¹, ou seja, dois valores acima do utilizado normalmente com *Spirulina* (Colla et al., 2007; Rosa et al., 2011; Borges et al., 2013). Estes ensaios foram realizados em ordem crescente de concentração celular inicial e decrescente da concentração de MEA até ser encontrada uma relação de concentração de microalga e de absorvente em que não existisse morte celular.

O hidróxido de sódio (NaOH) foi também testado como absorvente de CO₂ junto ao meio de cultivo, para efeito de comparação com a monoetanolamina. As concentrações de NaOH testadas foram 4,92, 3,28, 1,64 mmol.L⁻¹.

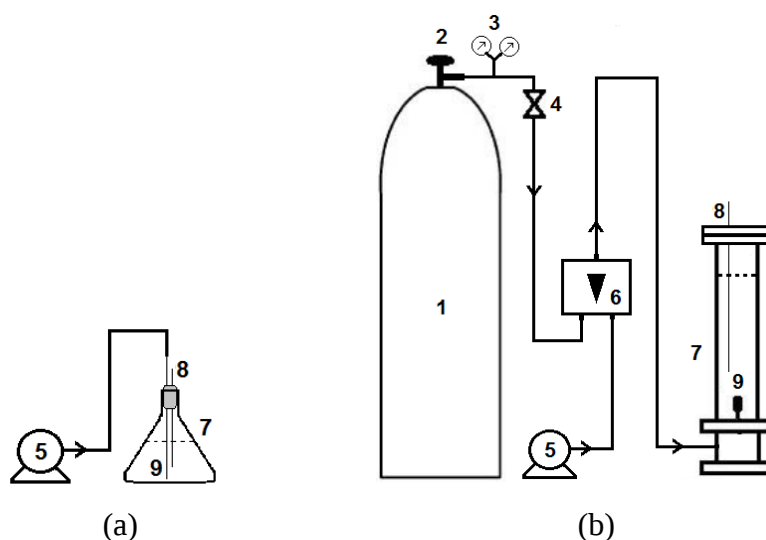
A cada batelada de testes, com MEA e NaOH, foi conduzido um ensaio controle, o qual não possuía adição de nenhum dos absorvente de CO₂.

A partir das concentrações dos absorventes selecionadas foi testada uma configuração mais adequada de reator para biofixação de CO₂. Nesse, chamado de fotobiorreator tubular vertical (FBRT), com 2,0 L de volume total e 1,8 L de volume útil (MORAIS; COSTA, 2007), foi conduzido duplicatas de ensaios com concentrações de absorventes e celular inicial selecionadas e também duplicata de ensaios controles, os quais não tiveram adição de nenhum absorvente de CO₂.

2.4 Condições de cultivo

A Figura 1 mostra o desenho esquemático dos cultivos realizados nos fotobiorreatores tipo *Erlenmeyer* e dos tubulares verticais. O aparato experimental deste trabalho é mostrado nas Figuras AP1 e AP2 do Apêndice.

Figura 1 - Desenho esquemático dos ensaios com *Spirulina* sp. LEB 18 em fotobiorreator tipo *Erlenmeyer* (a) e fotobiorreatores tubulares verticais (b): (1) cilindro de CO₂ industrial; (2) válvula de abertura do cilindro; (3) manômetro e medidor de vazão; (4) válvula solenóide; (5) minicompressor de ar; (6) conjunto de rotâmetros; (7) fotobiorreator; (8) amostrador; (9) aspersor de ar ou de CO₂



Os ensaios, em *Erlenmeyer* e FBRT, foram mantidos à 30°C, fotoperíodo 12 h claro/12 h escuro, 3,2 klx (RADMANN; COSTA, 2008) e agitação promovida pela injeção de

ar comprimido. O tempo de duração dos ensaios foi 5 d e 13 d, com fotobiorreatores tipo *Erlenmeyer* e FBRT, respectivamente.

A seleção das concentrações de MEA foi conduzida em modo descontínuo e os ensaios realizados nos FBRT foram conduzidos em modo descontínuo alimentado com CO₂ industrial (pureza mínima de 99,5 %). A alimentação com CO₂, na vazão específica diária de 0,36 mL_{CO₂}.mL_{meio}⁻¹.d⁻¹ (0,05 vvm, 28 mL.min⁻¹), foi realizada por 2 min, a cada 1h, durante o período claro. Com intuito de aumentar o tempo de residência da fonte de carbono no meio líquido, a aeração dos ensaios foi interrompida 1 min antes e 1 min depois da adição de CO₂ aos cultivos.

2.5 Determinações analíticas

Todos os foram acompanhados diariamente pela determinação da concentração de biomassa e medida de pH. Nos ensaios realizados nos FBRT foi determinada também a concentração de carbono inorgânico dissolvido (DIC) a cada 3 d.

2.5.1 Concentração de biomassa

A concentração de biomassa em todos os ensaios foi obtida por espectrofotometria, com curva padrão determinada previamente com o inóculo mantido com CO₂. Esta curva foi obtida com a densidade óptica do inóculo em espectrofotômetro (QUIMIS Q798DRM, Diadema - SP - Brasil), com comprimento de onda de 670 nm, relacionando densidade ótica e massa seca de biomassa, como realizado por Costa et al., 2002.

2.5.2 Alcalinidade, pH e concentração de carbono inorgânico dissolvido

A concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID) foi calculada a partir das frações de ionização do carbono no meio, por meio da medida de alcalinidade total (APHA, 1998) e pH (APHA, 1998) dos ensaios, de acordo com Carmouze (CARMOUZE, 1994).

2.6 Respostas avaliadas do cultivo

Os perfis de crescimento celular de *Spirulina* sp. LEB 18 forneceram subsídio para obter a concentração celular máxima ($X_{\text{máx}}$, g.L⁻¹) e avaliar a produtividade volumétrica de biomassa (P_x , g.L⁻¹.d⁻¹), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, d⁻¹) e tempo de geração (t_g , d) para os ensaios em fotobiorreatores tipo *Erlenmeyer* e tubulares (FBRT). Com os cultivos em FBRT foram também calculadas a taxa de biofixação de CO₂ (TB, mg.L⁻¹.d⁻¹) e a eficiência de utilização de CO₂ (E, % m.m⁻¹).

2.6.1 Produtividade volumétrica de biomassa

A produtividade volumétrica de biomassa foi obtida segundo a Equação I-1 (BAILEY; OLLIS, 1986), onde X é a concentração de biomassa (g.L^{-1}) no tempo t (d) e X_0 é a concentração de biomassa (g.L^{-1}) no tempo t_0 (d). A produtividade volumétrica máxima de biomassa ($P_{\text{máx}}$, $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) foi o máximo valor de produtividade obtida por cada ensaio em cada batelada.

$$P_X = \left(\frac{X - X_0}{t - t_0} \right) \quad (\text{I-1})$$

2.6.2 Velocidade específica máxima de crescimento

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, d^{-1}) foi calculada por regressão linear aplicada à fase logarítmica de crescimento em um perfil $\ln X$ (g.L^{-1}) vs t (d). Nesta curva, o coeficiente angular é a $\mu_{\text{máx}}$ (SCHMIDELL et al., 2001).

2.6.3 Tempo de geração

O tempo de geração, ou duplicação celular, foi determinado na fase exponencial de crescimento da microalga, de acordo com a Equação I-2 (BAILEY; OLLIS, 1986).

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{máx}}} \quad (\text{I-2})$$

2.6.4 Taxa de biofixação de dióxido de carbono (TB)

A taxa biofixação de CO_2 (TB, $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) pela microalga foi calculada segundo a Equação I-3, em que $P_{\text{máx}}$ ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) foi o máximo resultado de produtividade volumétrica determinado em cada ensaio, X_{cbm} foi a fração mássica de carbono determinada pela análise elementar da biomassa, M_{CO_2} é a massa molar de dióxido de carbono e M_C é a massa molar do carbono. A taxa de biofixação de CO_2 máxima ($TB_{\text{máx}}$, $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) foi o máximo valor de biofixação de dióxido de carbono obtido por cada ensaio em cada batelada.

$$TB = P_{\text{máx}} * X_{\text{cbm}} * \frac{M_{\text{CO}_2}}{M_C} \quad (\text{I-3})$$

2.6.5 Eficiência de utilização de dióxido de carbono

A eficiência de utilização de CO_2 (E , % m.m^{-1}) foi calculada segundo a Equação I-4, em que TB foi a taxa de biofixação de CO_2 diária ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), $V_{\text{útil}}$ foi o volume útil de trabalho do fotobiorreator (L) e $\dot{m}$ foi taxa mássica de alimentação diária com CO_2 (mg.d^{-1}).

$$E = \frac{(TB \cdot V_{\text{útil}})}{\dot{m}} * 100 \quad (\text{I-4})$$

2.7 Recuperação e caracterização da biomassa

Ao final dos experimentos nos fotobiorreatores tubulares verticais a biomassa foi centrifugada (HITACHI himac CR-GIII, Tóquio - Japão) à 15200g, por 15 min à 20°C, ressuspendida em água destilada e novamente centrifugada nas mesmas condições. Para maior eficiência na remoção dos sais do meio de cultivo, este procedimento foi repetido uma vez. Posteriormente, a biomassa foi concentrada a 50 mL em recipiente estéril, congelada à -80°C, liofilizada e armazenada à -20°C até sua caracterização.

2.7.1 Concentração de proteínas e carboidratos

2.7.1.1 Preparo da amostra

A análise de proteínas e carboidratos foi realizada a partir de extratos preparados com 5 mg de biomassa da microalga e 10 mL de água destilada, sonicados em sonda ultrassônica (COLE PARMER CPX 130 – Illinois – USA), com 10 ciclos de funcionamento, sendo 1 min ligado e 1 min desligado. Este procedimento foi utilizado para liberar o material intracelular de *Spirulina* no meio líquido.

2.7.1.2 Concentração de proteínas

A concentração de proteínas na biomassa de *Spirulina* foi determinada a cada corte e ao final dos ensaios, a partir do método colorimétrico de Lowry, utilizando curva padrão de albumina de soro bovino (LOWRY et al., 1951).

2.7.1.3 Concentração de carboidratos

A concentração de carboidratos presente na biomassa da microalga foi determinada pelo método fenol-sulfúrico de Dubois, utilizando curva padrão de glicose (DUBOIS et al., 1956).

2.7.2 Concentração de lipídios

A concentração de lipídios foi determinada pelo método de Folch (FOLCH; LEES; STANLEY, 1957) adaptado por Colla (2002) para biomassa de *Spirulina*. Este método baseia-se na extração dos lipídios apolares pela mistura de solventes clorofórmio:metanol (2:1) e dos lipídios polares pela mistura de solventes metanol:água (2:1), não degradando o conteúdo da macromolécula por ser realizado a frio.

2.7.3 Análise elementar

As concentrações elementares de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN) foram determinados na biomassa liofilizada de *Spirulina* em Analisador Elementar CHNS/O Serie 2400 da Perkin Elmer, utilizando acetanilida como padrão, no Laboratório de Hidroquímica da Universidade Federal do Rio Grande. Esta determinação baseia-se no método de Pregal e Dunas, no qual as amostras sofrem combustão em ambiente com oxigênio puro e os gases resultantes do processo são separados por cromatografia frontal e medidos por detector de condutividade térmica (CULMO, 1988; BAUMGARTEN; WALLNER-KERSANACH; NIENCHESKI, 2010).

2.7.4 Teor de umidade

O teor de umidade da biomassa foi determinado por metodologia oficial da AOAC (2000).

2.8 Análise estatística

As respostas obtidas foram avaliadas por meio de análise de variância, seguida por teste de Tukey, com nível de 95 % de confiança.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção da concentração de biomassa de *Spirulina* e da concentração de monoetanolamina

A Tabela 1 apresenta um resumo dos resultados dos testes de tolerância de diferentes concentrações celulares de *Spirulina* sp. LEB 18 frente às concentrações de MEA e NaOH testadas.

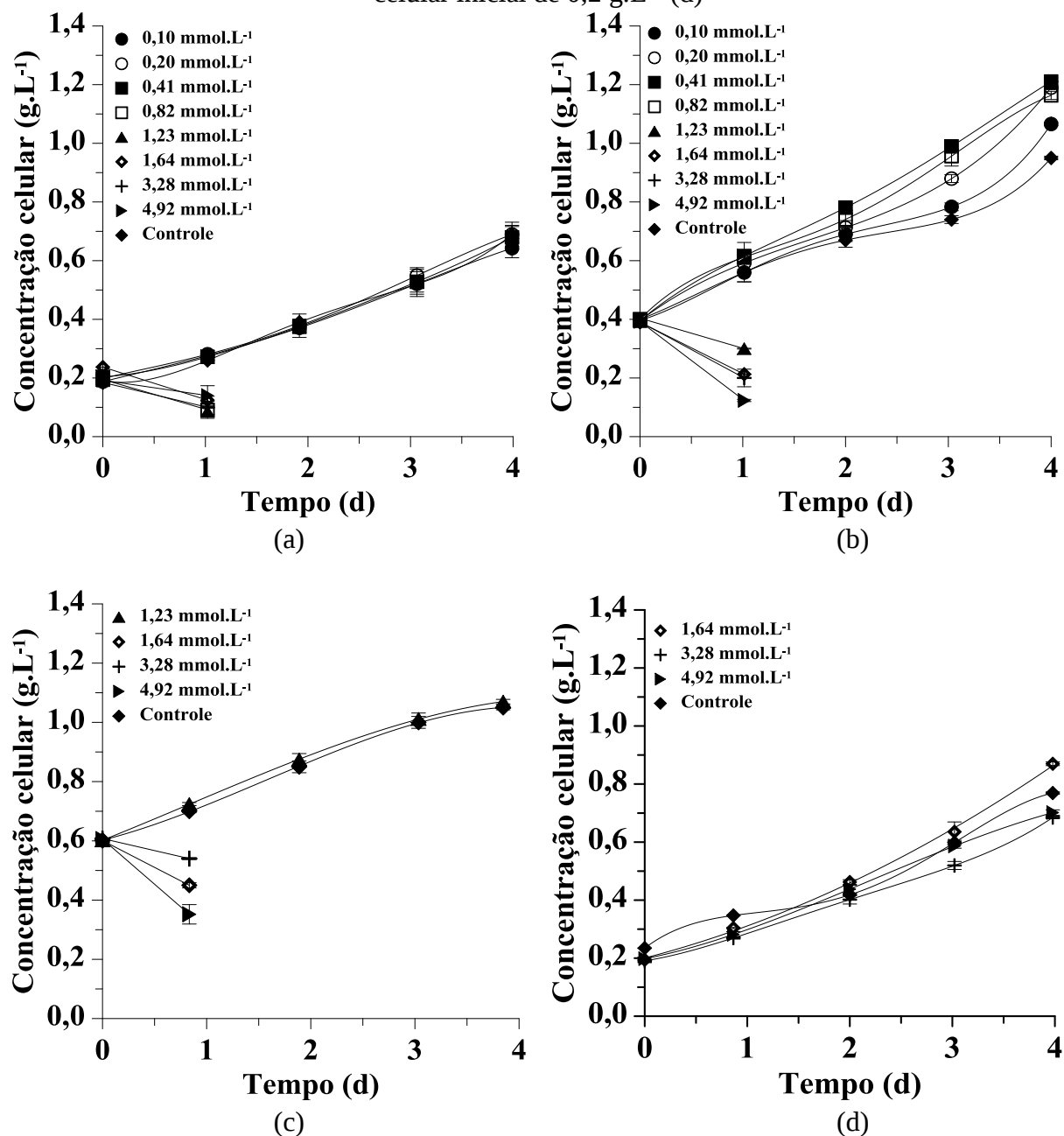
Tabela 1 – Resultados experimentais quanto ao crescimento e a realização dos testes com monoetanolamina (MEA) e hidróxido de sódio (NaOH) diante a 0,2, 0,4 e 0,6 g.L⁻¹ de *Spirulina*

X ₀ (g.L ⁻¹)	MEA (mmol.L ⁻¹)							
	4,92	3,28	1,64	1,23	0,82	0,41	0,20	0,10
0,2	-	-	-	-	-	+	+	+
0,4	-	-	-	-	+	+	+	+
0,6	-	-	-	+	d.r.	d.r.	d.r.	d.r.
X ₀ (g.L ⁻¹)	NaOH (mmol.L ⁻¹)							
	4,92	3,28	1,64	1,23	0,82	0,41	0,20	0,10
0,2	+	+	+	d.r.	d.r.	d.r.	d.r.	d.r.

“+”: Cresceu, “-”: Não cresceu, “d.r.”: desnecessário realizar

A Figura 2 mostra os ensaios com as três concentrações celulares testadas (X_0) (0,2, 0,4 e 0,6 g.L⁻¹) frente às diferentes concentrações de MEA (Figura 2a, 2b e 2c), bem como mostra os testes com $X_0 = 0,2$ g.L⁻¹ e 1,64, 3,28 e 4,92 mmol.L⁻¹ de hidróxido de sódio (Figura 2d).

Figura 2 – Perfis de concentração celular em função do tempo para os ensaios com MEA e concentração celular inicial de 0,20 (a), 0,40 (b) e 0,60 g.L⁻¹ (c), com NaOH e concentração celular inicial de 0,2 g.L⁻¹ (d)



O crescimento dos ensaios com 0,2 g.L⁻¹ de concentração celular inicial (X_0) (Figura 2a) foi inibido com adição de 0,82, 1,23, 1,64, 3,28 e 4,92 mmol.L⁻¹ de MEA no segundo dia de experimento. Quando $X_0 = 0,4$ g.L⁻¹ (Figura 2b), o crescimento de biomassa foi inibido

com as quatro maiores concentrações de MEA testadas, enquanto que com $0,6 \text{ g.L}^{-1}$ de X_0 (Figura 2c) a inibição da multiplicação celular se deu nas três maiores concentrações testadas. A morte celular de *Spirulina* foi constatada devido à coloração amarela do cultivo e ausência de células *Spirulina*, confirmada ao microscópio eletrônico.

A Tabela 2 apresenta os parâmetros de crescimento avaliados para os cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18: com as concentrações de MEA toleradas pela microalga e três diferentes concentrações celular inicial (X_0 , 0,2, 0,4 e $0,6 \text{ g.L}^{-1}$); e cultivos com $X_0 = 0,2 \text{ g.L}^{-1}$ e adição de três diferentes concentrações de NaOH.

Tabela 2 – Resultados médios obtidos de concentração celular máxima ($X_{\text{máx}}$) e produtividade máxima ($P_{\text{máx}}$) com diferentes concentrações celular iniciais de *Spirulina* (X_0) e de diferentes absorventes de CO_2 (NaOH ou MEA)

X_0 (g.L^{-1})	NaOH (mmol.L^{-1})	MEA (mmol.L^{-1})	$X_{\text{máx}}$ (g.L^{-1})	$P_{\text{máx}}$ ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)
0,2	1,64	-	$0,87 \pm 0,01^a$	$169,8 \pm 0,9^a$
	3,28		$0,68 \pm 0,01^b$	$124,2 \pm 0,2^b$
	4,92		$0,70 \pm 0,01^b$	$129,5 \pm 3,0^b$
0,2	-	0,10	$0,64 \pm 0,02^c$	$114,0 \pm 12,4^c$
		0,20	$0,69 \pm 0,02^c$	$122,9 \pm 6,1^c$
		0,41	$0,68 \pm 0,02^c$	$119,2 \pm 8,5^c$
0,4	-	0,10	$1,07 \pm 0,01^d$	$167,8 \pm 10,3^d$
		0,20	$1,19 \pm 0,00^e$	$199,1 \pm 16,2^d$
		0,41	$1,21 \pm 0,01^e$	$216,0 \pm 20,6^d$
		0,82	$1,16 \pm 0,02^e$	$207,0 \pm 2,2^d$
0,6	-	1,23	$1,07 \pm 0,01$	$154,3 \pm 13,3$

Letras sobrescritas iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferem estatisticamente ao nível de 95% de confiança ($p > 0,05$).

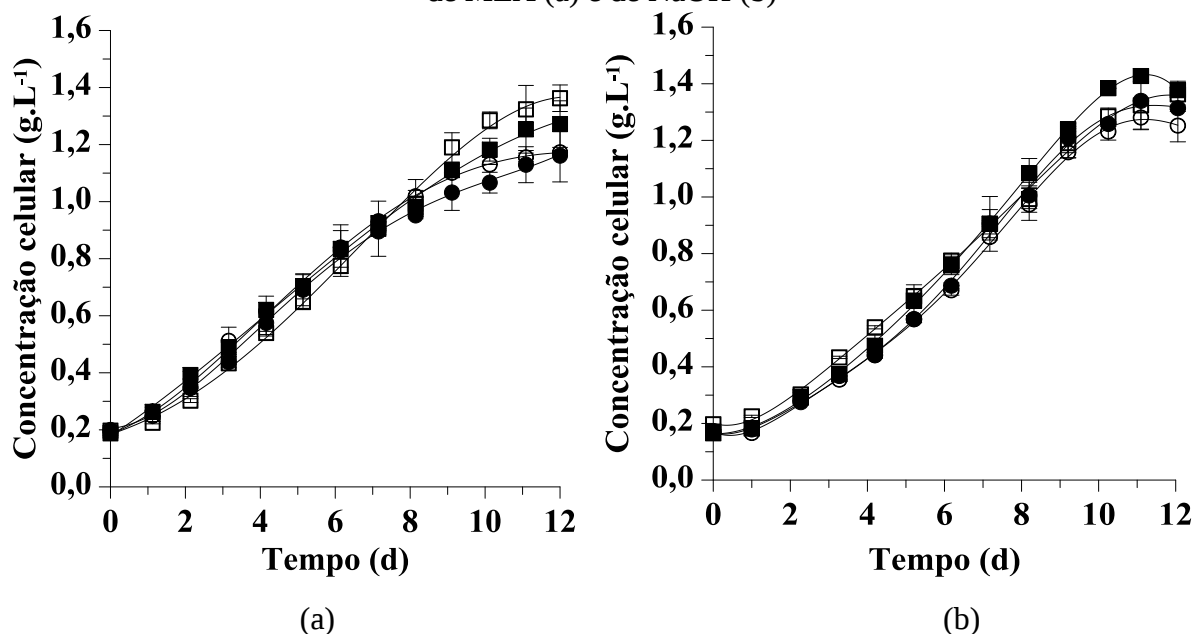
Os parâmetros de crescimento avaliados para o cultivo de *Spirulina* com $X_0 = 0,2 \text{ g.L}^{-1}$, na presença de 0,10, 0,20 e $0,41 \text{ mmol.L}^{-1}$ de MEA, não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$). Logo, as concentrações inferiores de MEA adicionadas ao cultivo com a mínima concentração celular inicial, além de toleráveis à microalga, não alteram seu crescimento e produção de biomassa. Com o aumento do X_0 houve aumento na tolerância da microalga ao MEA, como esperado. Quando X_0 foi $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ os parâmetros $X_{\text{máx}}$ e $P_{\text{máx}}$ de *Spirulina* foram superiores com as três maiores adições de MEA (sem diferença significativa, $p > 0,05$), mas a concentração celular máxima foi inferior na presença de $0,10 \text{ mmol.L}^{-1}$.

3.2 Cultivo e caracterização de *Spirulina* em fotobiorreatores tubulares verticais

A primeira etapa de cultivos realizados em *Erlenmeyer* selecionou as concentrações de MEA toleradas pela microalga (0,10, 0,20 e 0,41 mmol.L⁻¹) e a concentração celular inicial (0,2 g.L⁻¹). A morfologia da microalga, em certas concentrações de biomassa, tende a causar sombreamento prejudicial à passagem de luz ao cultivo (CHEN et al., 2013). Com *Spirulina* sp. LEB 18 isso pode ocorrer em torno de 1,0 g.L⁻¹, dependendo da geometria do biorreator utilizado.

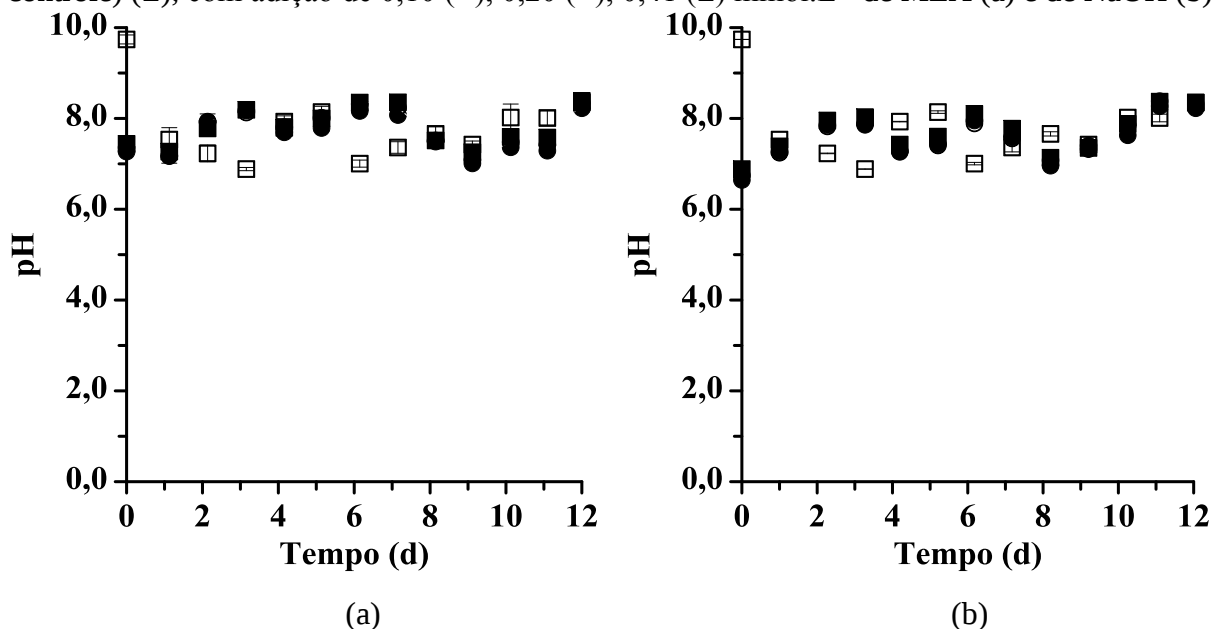
Os ensaios adicionados de MEA não apresentaram fase de adaptação (Figura 3a). Sendo assim, a fase log de crescimento ocorreu entre o 1º e o 6º dia de cultivo nos ensaios adicionados de MEA (Figura 3a). Nos ensaios com NaOH, houve fase de adaptação e a fase log ocorreu entre o 3º e o 8º dia de ensaio (Figura 3b). A partir do 10º-11º dia de experimento todos os cultivos apresentaram tendência a entrarem na fase estacionária de cultivo. Este fato pode ocorrer em cultivos de microalgas em reatores fechados, pois a intensidade de luz tende a diminuir rapidamente devido aos efeitos de blindagem resultantes ao aumento da concentração de biomassa (CHEN et al., 2013), ocasionando a fotolimitação da cultura e estagnação de crescimento e biomassa. Não obstante, quando se utiliza CO₂ como fonte de carbono, o tempo de residência do gás no meio líquido deve ser maximizado a fim de que se obtenha a barreira física gás/líquido ultrapassada.

Figura 3 - Perfis médios de concentração celular de *Spirulina* nos ensaios sem adição de absorvente de CO₂ (ensaio controle) (□), com adição de 0,10 (●), 0,20 (○), 0,41 (■) mmol.L⁻¹ de MEA (a) e de NaOH (b)



O cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18, durante os 13 d de ensaio, quando adicionado de MEA apresentou pH mínimo de 7,0 e pH máximo 8,4 (Figura 4a), enquanto que quando houve a adição de NaOH nos experimentos, o parâmetro variou entre o mínimo de 6,6 e o máximo de 8,4 (Figura 4b). Estes intervalos de pH não contemplam aquele propício (9,0-10,0) para produção de biomassa de espécies de *Spirulina* (FERRAZ; AQUARONE; KRAUTER, 1985). Todavia, quando não é utilizado o meio padrão, a utilização de CO₂ como fonte de carbono proporciona o comportamento esperado, visto que quando este gás se dissolve no meio líquido, forma ácido carbônico e anula o aumento do pH durante o crescimento da microalga (ZENG et al., 2012).

Figura 4 - Perfis médios de pH dos ensaios sem adição de absorvente de CO₂ (ensaio controle) (□), com adição de 0,10 (●), 0,20 (○), 0,41 (■) mmol.L⁻¹ de MEA (a) e de NaOH (b)

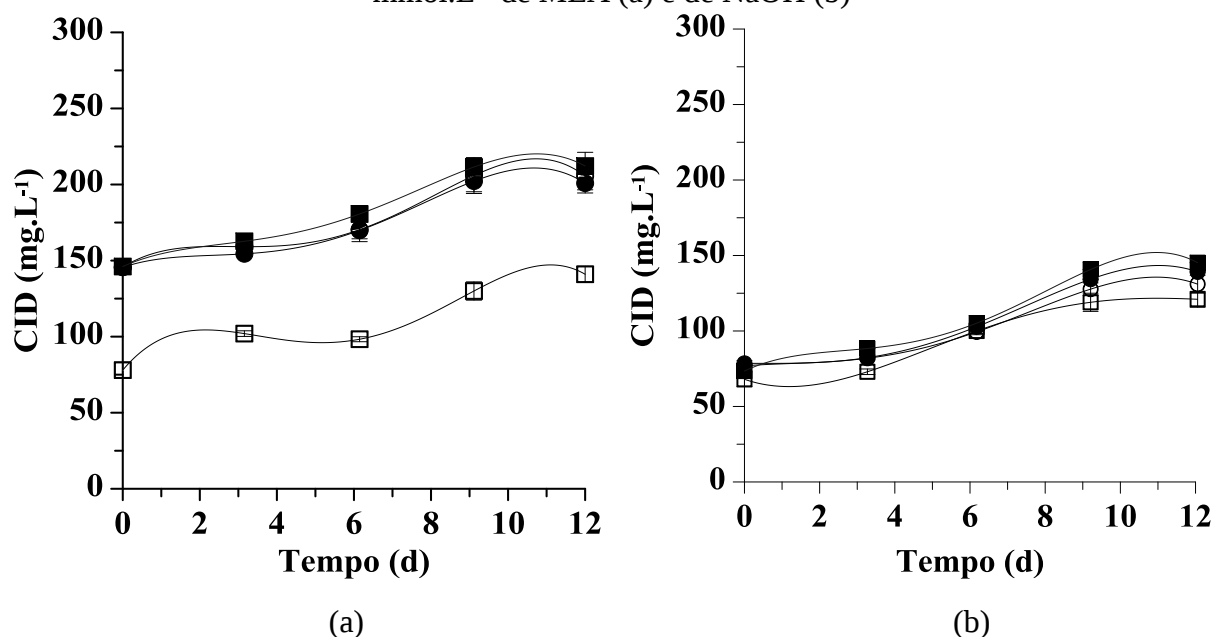


As concentrações celulares médias ao longo dos 13 d de ensaio, obtidos com os cultivos de *Spirulina* adicionados de diferentes concentrações de MEA e NaOH, demonstraram que a microalga apresentou crescimento muito semelhante em todas as condições. Os perfis médios de concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID) (Figura 5), contudo, mostram que a fixação de carbono no meio foi mais elevada nos cultivos adicionados de MEA.

O perfil da concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID) se manteve praticamente constante durante todo o tempo de experimento com os dois absorventes de CO₂. Mas, o perfil de CID nos ensaios com MEA, em relação aos ensaios com NaOH, foi praticamente duas vezes maior (Figura 5). Isto ocorreu, possivelmente, porque o MEA se liga instantaneamente ao CO₂, formando HCO₃⁻ (BLAUWHOFF et al., 1984; MELDON;

MORALES-CABRERA, 2011) e, conseqüentemente, aumentando a concentração de carbono inorgânico dissolvido no meio. Logo, os resultados deste trabalho confirmam que o teor de carbono disponível para microalga aumenta com a quantidade de MEA adicionado ao meio, quando se adiciona CO₂ continuamente.

Figura 5 - Perfis médios de concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID) sem adição de absorvente de CO₂ (ensaio controle) (□), com adição de 0,10 (●), 0,20 (○), 0,41 (■) mmol.L⁻¹ de MEA (a) e de NaOH (b)



Os ensaios de Choi, Kim e Lee (2012), com *Scenedesmus* sp. em meio BG-11, mostraram aumento 300 mg.L⁻¹ de CID promovido pela adição de 4,92 mmol.L⁻¹ de MEA. Embora as concentrações de MEA utilizadas no presente estudo, 0,10, 0,20 e 0,41 mmol.L⁻¹, são 49,2, 24,6 e 12 vezes inferiores a concentração de 4,92 mmol.L⁻¹ de MEA utilizados nos cultivos de Choi, Kim e Lee (2012), foi atingido 200 mg.L⁻¹ de CID nos cultivos com *Spirulina* sp. LEB 18 (Figura 5a) até na menor concentração de absorvente testada.

Os valores médios de P_{máx} não apresentaram diferença estatística ao nível de 95 % de confiança, mesmo no ensaio com maior quantidade de MEA (Tabela 3). Para os cultivos com NaOH, foi obtido valor superior de P_{máx}, com diferença significativa (p<0,05), quando se utilizou 0,41 mmol.L⁻¹ do absorvente (Tabela 3). Colla et al. (2007) em cultivos com *Spirulina platensis* LEB-52 obtiveram produtividade máxima de biomassa (30,2 ± 0,7 mg.L⁻¹.d⁻¹) inferiores a todas as condições testadas no presente estudo. Demonstrando assim, que a cinética de crescimento da microalga utilizada no presente estudo foi beneficiada pelo tipo e concentração de absorvente utilizados.

Tabela 3 – Resultados médios de concentração celular máxima ($X_{\text{máx}}$), produtividade máxima ($P_{\text{máx}}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), tempo de geração (t_g), taxa de biofixação máxima de CO_2 ($\text{TB}_{\text{máx}}$) e eficiência de utilização de CO_2 (E) para o cultivo de *Spirulina* com adição de diferentes absorventes de CO_2

Parâmetro	Controle	MEA (mmol.L ⁻¹)		
		0,10	0,20	0,41
$X_{\text{máx}}$ (g.L ⁻¹)	1,40 ± 0,05 ^{a,A}	1,28 ± 0,05 ^{b,A}	1,25 ± 0,05 ^{b,A}	1,30 ± 0,07 ^{b,A}
$P_{\text{máx}}$ (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	110,2 ± 4,0 ^{a,A}	108,1 ± 7,9 ^{a,A}	108,2 ± 1,2 ^{a,A}	110,2 ± 4,2 ^{a,A}
$\mu_{\text{máx}}$ (d ⁻¹)	0,25 ± 0,00 ^{a,A}	0,25 ± 0,02 ^{a,A}	0,27 ± 0,01 ^{b,A}	0,29 ± 0,01 ^{c,A}
t_g (d)	2,80 ± 0,04 ^{a,A}	2,77 ± 0,17 ^{a,A}	2,56 ± 0,05 ^{b,A}	2,39 ± 0,08 ^{c,A}
Δt (d)*	0-4	0-4	0-4	0-4
R^{2**}	0,985±0,002	0,999±0,001	0,993±0,007	0,994±0,004
$\text{TB}_{\text{máx}}$ (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	190,7 ± 6,9 ^{a,A}	197,7 ± 14,0 ^{a,A}	197,0 ± 1,6 ^{a,A}	197,3 ± 6,1 ^{a,A}
$E_{\text{máx}}$ (% m.m ⁻¹)	28,9 ± 1,1 ^{a,A}	29,9 ± 2,1 ^{a,A}	29,8 ± 0,2 ^{a,A}	29,8 ± 0,9 ^{a,A}
Parâmetro	Controle	NaOH (mmol.L ⁻¹)		
		0,10	0,20	0,41
$X_{\text{máx}}$ (g.L ⁻¹)	1,40 ± 0,04 ^{a,A}	1,37 ± 0,02 ^{a,b,B}	1,34 ± 0,05 ^{b,B}	1,46 ± 0,02 ^{c,B}
$P_{\text{máx}}$ (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	113,2 ± 7,5 ^{a,b,A}	114,7 ± 4,5 ^{a,b,A}	109,9 ± 10,7 ^{a,A}	121,3 ± 0,5 ^{b,B}
$\mu_{\text{máx}}$ (d ⁻¹)	0,18 ± 0,01 ^{a,B}	0,21 ± 0,01 ^{b,B}	0,20 ± 0,01 ^{b,B}	0,21 ± 0,02 ^{b,B}
t_g (d)	3,84 ± 0,25 ^{a,B}	3,28 ± 0,08 ^{b,B}	3,41 ± 0,25 ^{b,B}	3,31 ± 0,04 ^{b,B}
Δt (d)*	2-7	2-7	2-7	2-7
R^{2**}	0,989±0,003	0,992±0,003	0,992±0,005	0,988±0,008
$\text{TB}_{\text{máx}}$ (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	195,4 ± 12,6 ^{a,b,A}	198,2 ± 7,6 ^{a,b,A}	182,7 ± 12,3 ^{a,A}	209,7 ± 0,9 ^{b,B}
$E_{\text{máx}}$ (% m.m ⁻¹)	29,6 ± 1,9 ^{a,b,A}	30,0 ± 1,1 ^{a,b,A}	27,6 ± 1,9 ^{a,A}	31,7 ± 0,1 ^{a,B}

Letras minúsculas sobrescritas iguais na mesma linha, e letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna para o mesmo parâmetro, indicam que as médias não diferem estatisticamente ao nível de 95 % de confiança ($p > 0,05$). * Δt : início-fim da fase exponencial de crescimento; **Coeficiente de determinação da regressão linear aplicada à fase logarítmica de crescimento.

As respostas $X_{\text{máx}}$ e $P_{\text{máx}}$ frente as diferentes concentrações de MEA adicionadas nos cultivos nos fotobiorreatores tubulares verticais foram estatisticamente iguais ($p > 0,05$) (Tabela 3). Este fato não ocorreu no ensaio com adição de NaOH, pois como o aumento da concentração deste absorvente de CO_2 no meio, maior foi o parâmetro $X_{\text{máx}}$ e $P_{\text{máx}}$ (Tabela 3). Nos ensaios com adição de MEA, este comportamento diretamente proporcional entre o aumento da concentração do absorvente e da resposta também ocorreu com o $\mu_{\text{máx}}$ e, consequentemente, comportamento inversamente proporcional com o t_g . Logo, o aumento das concentrações de MEA testadas favoreceu o aumento da velocidade de crescimento e da duplicação celular de *Spirulina* sp. LEB 18, mas a biofixação de CO_2 e a eficiência de utilização de CO_2 não aumentaram significativamente ($p < 0,05$). Os resultados dos parâmetros $X_{\text{máx}}$, $P_{\text{máx}}$

e $TB_{\text{máx}}$ (Tabela 3) estão de acordo com os encontrados no cultivo de *Spirulina platensis* em fotobiorreatores tipo frascos convencionais (CHEN et al., 2013).

Os resultados de $\mu_{\text{máx}}$ e t_g , obtidos neste trabalho, foram semelhantes aos encontrados por Morais e Costa (2007) quando cultivaram *Spirulina* sp. com $9,72 \text{ mL}_{\text{CO}_2} \cdot \text{mL}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (6,23 vezes maior que o utilizado nos cultivos deste trabalho) em FBRT. A biomassa de *Spirulina* possui cerca de $50 \% \text{ m.m}^{-1}$ de carbono na sua composição (BORGES et al., 2013). Este fato foi observado em todos os ensaios com os FBRT, pois a fração mássica de carbono elementar determinado na biomassa (Tabela 4) foi próxima 0,5, não diferindo significativamente entre os ensaios com MEA e com NaOH ($p > 0,05$).

Tabela 4 - Resultados médios elementares da concentração de carbono, hidrogênio, e nitrogênio encontrados na biomassa de *Spirulina* cultivada com e sem adição de absorvente de CO_2

Componente elementar (% m.m ⁻¹)	Controle	MEA (mmol.L ⁻¹)		
		0,10	0,20	0,41
Carbono	47,2±0,0 ^{a,A}	49,9±0,1 ^{b,A}	49,7±0,3 ^{b,A}	48,8±0,5 ^{b,A}
Hidrogênio	6,4±0,2 ^{a,A}	8,1±0,1 ^{b,A}	8,0±0,0 ^{b,A}	7,4±0,6 ^{a,b,A}
Nitrogênio	11,7±0,0 ^{a,A}	12,4±0,1 ^{b,A}	12,3±0,1 ^{b,A}	12,0±0,2 ^{a,b,A}
Componente elementar (% m.m ⁻¹)	Controle	NaOH (mmol.L ⁻¹)		
		0,10	0,20	0,41
Carbono	47,1±0,1 ^{a,A}	47,1±0,1 ^{a,B}	45,4±1,7 ^{a,A}	47,2±0,1 ^{a,A}
Hidrogênio	6,3±0,0 ^{a,A}	6,4±0,2 ^{a,B}	6,2±0,3 ^{a,B}	6,5±0,1 ^{a,A}
Nitrogênio	11,6±0,0 ^{a,A}	11,5±0,1 ^{a,B}	10,5±0,7 ^{a,A}	11,5±0,3 ^{a,A}

Letras sobrescritas iguais na mesma linha e letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna, para o mesmo parâmetro, indicam que as médias não diferem estatisticamente ao nível de 95 % de confiança ($p > 0,05$).

A adição de MEA nos cultivos de *Spirulina* incrementou a concentração de proteínas e diminuiu a concentração de carboidratos presentes na biomassa em relação à biomassa microalgal obtida quando os cultivos foram adicionados de NaOH (Tabela 5). A concentração média de proteínas presente na biomassa de *Spirulina*, no entanto, não apresentou grande variabilidade para os ensaios com MEA (entre $74,6 \% \text{ m.m}^{-1}$ e $76,5 \% \text{ m.m}^{-1}$) e com NaOH (entre $62,3 \% \text{ m.m}^{-1}$ e $67,0 \% \text{ m.m}^{-1}$). Estes valores encontrados situam-se entre os encontrados por Colla et al. (2007) ($57,6 \pm 1,16 \% \text{ m.m}^{-1}$) e Morais et al. (2009) ($86 \% \text{ m.m}^{-1}$) com o mesmo gênero de microalga.

Os maiores teores de carboidratos, determinados na biomassa de *Spirulina*, foram encontrados com adição de NaOH em relação ao MEA. Entre as adições de hidróxido de sódio,

com $0,20$ ($15,1 \pm 5,3 \text{ m.m}^{-1}$) e $0,41 \text{ mmol.L}^{-1}$ ($11,0 \pm 0,7 \text{ \% m.m}^{-1}$) foram encontrados os maiores teores da macromolécula, sem diferença significativa ($p>0,05$).

Tabela 5 - Valores médios encontrados para concentração de proteínas, carboidratos e lipídios em base seca na biomassa de *Spirulina* cultivada com e sem adição de absorvente de CO_2

Macromolécula (% m/m)	Controle	MEA (mmol.L^{-1})		
		0,10	0,20	0,41
Proteínas	$78,4 \pm 3,5^a$	$74,6 \pm 1,2^{a,A}$	$74,7 \pm 4,4^{a,A}$	$76,5 \pm 1,4^{a,A}$
Carboidratos	$9,5 \pm 1,1^a$	$7,4 \pm 0,3^{b,A}$	$8,6 \pm 0,3^{a,c,A}$	$8,5 \pm 0,2^{c,A}$
Lipídios	$12,3 \pm 1,0^a$	$11,0 \pm 0,2^{a,b,A}$	$8,7 \pm 1,1^{c,A}$	$9,4 \pm 0,0^{b,c,A}$
Macromolécula (% m/m)	Controle	NaOH (mmol.L^{-1})		
		0,10	0,20	0,41
Proteínas	$75,7 \pm 2,4^{a,A}$	$62,3 \pm 1,4^{b,B}$	$63,4 \pm 1,5^{b,c,B}$	$67,0 \pm 2,4^{c,B}$
Carboidratos	$7,9 \pm 1,9^{a,A}$	$8,7 \pm 0,6^{a,B}$	$15,1 \pm 5,3^{b,B}$	$11,0 \pm 1,1^{a,b,B}$
Lipídios	$12,4 \pm 1,2^{a,A}$	$10,9 \pm 0,4^{a,b,A}$	$9,6 \pm 0,9^{b,A}$	$11,3 \pm 1,5^{b,A}$

Letras minúsculas sobrescritas iguais na mesma linha, assim como letras maiúsculas sobrescritas iguais na mesma coluna, para a mesma macromolécula, indica que as médias não diferem estatisticamente ao nível de 95 % de confiança ($p>0,05$).

Para a concentração de lipídios, determinados na biomassa de *Spirulina*, não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os absorventes de CO_2 testados. Contudo, as concentrações encontradas desta macromolécula, mesmo sem a adição de absorvente de CO_2 , são elevadas para biomassa de *Spirulina*, a qual apresenta em média de 3,3 (MORAIS et al., 2009) a 4,3 % m.m^{-1} (BELAY, 2008) de lipídios em sua composição.

4 CONCLUSÃO

As concentrações de monoetanolamina selecionadas com *Spirulina* sp. LEB 18 foram 0,10, 0,20 e 0,41 mmol.L^{-1} . Com estas concentrações de MEA e NaOH não houve inibição da cinética de crescimento da microalga. Foi possível perceber que com o aumento das concentrações de MEA, houve aumento na velocidade de crescimento e na duplicação celular. A concentração de proteínas na biomassa cultivada com MEA foi 17 % maior que na biomassa cultivada com NaOH. O teor de lipídios, apresentados pelas biomassas cultivadas como MEA e a NaOH são de três a quatro vezes maiores aos valores encontrados na literatura com este gênero de microalga.

Assim, foi possível determinar que os absorventes estudados não diminuem a produtividade de *Spirulina*. O emprego de absorventes químicos pode ir ao encontro da substituição da fonte de carbono convencional utilizada com *Spirulina* (NaHCO_3) por CO_2 , principalmente aquele oriundo de processo de geração de energia. Desta maneira é possível

reduzir custos de produção de biomassa, agregar valor ao processo energético e reduzir as emissões deste gás estufa.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA) - **Standard Methods**. For The Examination of Water and Wastewater. 20 Ed. American Public Health Association. Washington, 1998.

AOAC - **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 17th HORWITZ, W.; ed. Maryland: Association of Official Analytical Chemists, 2000.

BAILEY, J. E., OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2ª ed., Singapore: McGraw-Hill, p.397-398, 1986.

BAUMGARTEN, M. G. Z.; WALLNER-KERSANACH, M.; NIENCHESKI, L. F. H. **Manual de Análises em Oceanografia Química**. Rio Grande: Editora da Furg, 2010.

BELAY, A. *Spirulina platensis* (Arthrospira): production and quality assurance. In: GERSHWIN, M. E.; BELAY, A. **Spirulina in human nutrition and health**. Portland: Taylor & Francis, 2008. Cap. 1, p. 2-23.

BILLER, P.; ROSS, A. B. Hydrothermal processing of algal biomass for the production of biofuels and chemicals. **Biofuels**, v. 3, nº 5, p. 603-623, 2012.

BLAUWHOFF, B. R.; VERSTEEG, G. F.; VAN SWAAIJ, P. M. A study of the reaction between CO₂ and alkanolamines in aqueous solutions. **Chemical Engineering Science**, v. 39, p. 207–225, 1984.

BORGES, J. A.; ROSA, G. M.; MEZA, L. H. R.; HENRARD, A. A.; SOUZA, M. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* sp. LEB-18 culture using effluent from the anaerobic digestion. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, No. 2, p. 277-287, 2013.

CARMOUZE, J. P. **O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas**. São Paulo: Editora Edgard Blucher: FAPESP, 253p., 1994.

CHEN, C-Y.; KAO, P-C.; TSAI, C-J.; LEE, D-J.; CHANG, J.-S. Engineering strategies for simultaneous enhancement of C-phycocyanin production and CO₂ fixation with *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 307–312, 2013.

CHOI, W.; KIM, G.; LEE, K. Influence of the CO₂ absorbent monoethanolamine on growth and carbon fixation by the green alga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 295–299, 2012.

COLLA, L. M. **Influência das Condições de Crescimento sobre o Potencial Antioxidante da microalga *Spirulina platensis* e seu Potencial na Redução da Hipercolesterolemia**. 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2002.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1489-1493, 2007.

COSTA, J. A. V., COLLA, L. M., DUARTE FILHO, P., KABKE, K., WEBER, A. Modeling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.18, p. 603-607, 2002.

CULMO, R. F. Principle of operation – the Perkin-Elmer PE2400 CHN Elemental Analyser. **Elemental Analysis Newsletter**. Perkin Elmer Publication EAN-2, 4 p, 1988.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analitical Chemistry**, v. 28, n.3, p. 350-356, 1956.

FERRAZ, C. A. M.; AQUARONE, E.; KRAUTER, M. Efeito da luz e do pH no crescimento de *Spirulina maxima*. **Revista de Microbiologia**, v. 16, n° 2, p. 132-137, 1985.

FERREIRA, L. S.; RODRIGUES, M. S.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation in tubular photobioreactor: Use of no-cost CO₂ from ethanol fermentation. **Applied Energy**, v. 92, p. 379-385, 2012.

FOLCH J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v.226, p.497-509, 1957.

FRANK, E; WANG, M.; HAN, J.; ELGOWAINY, A.; PALOU-RIVERA, I. **Life-Cycle Analysis of Algal-Based Fuels with the GREET Model**. Energy Systems Division, Argonne Laboratory, San Francisco, USA, 2011. Disponível em: <http://www.egnret.ewg.apec.org/workshops/AlgalBiofuels/Michael%20Wang.pdf>, acesso: 25 de setembro de 2013.

LAM, M. K.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Current status and challenges on microalgae-based carbon capture. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 10, p. 456-469, 2012.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-276, 1951.

MELDON, J. H.; MORALES-CABRERA, M. A. Analysis of carbon dioxide absorption in and stripping from aqueous monoethanolamine. **Chemical Engineering Journal**, v. 171, p. 753–759, 2011.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 1349–1352, 2007.

MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R.; TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, p. 60–64, 2009.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.63, p. 144-150, 2008.

PENG, Y.; ZHAO, B.; LI, L. Advance in post-combustion CO₂ capture with alkaline solution: a brief review. **Energy Procedia**, v. 14, p. 1515-1522, 2012.

RADMANN, E. M; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Química Nova**, v. 31, nº 7, p. 1609-1612, 2008.

RAMOS-SUÁREZ, J. L.; CARRERAS, N. Use of microalgae residues for biogas production. **Chemical Engineering Journal**, v. 242, p. 86–95, 2014.

ROSA, A. P. C.; CARVALHO, L. F.; GOLDBECK, L.; COSTA, J. A. V. Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 3071-3073, 2011.

STEPHENS, E.; NYS, R.; ROSS, I. L.; HANKAMER, B. Algae fuels as an alternative to petroleum. **Journal Petroleum Environmental Biotechnology**, v. 4, p. 1-7, 2013.

ONWUDILI, J. A.; LEA-LANGTON, A. R.; ROSS, A. B.; WILLIAMS, P. T. Catalytic hydrothermal gasification of algae for hydrogen production: composition of reaction products and potential for nutrient recycling. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 72-80, 2013.

VONSHAK, A. *Spirulina*: Growth, Physiology and Biochemistry. In: VONSHAK, A. ***Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology***. London: Taylor & Francis, 1997. Cap. 3 , p. 43-66.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'unecyanophycée. Influence de diversfacteurs physiques et chimiquessur la croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* Geitler**. Ph.D. Thesis, University of Paris, 1966.

ZENG, X.; DANQUAH, M. K.; ZHANG, S.; ZHANG, X.; WU, M.; CHEN, X. D.; NG, I-S. JING, K.; LU, Y. Autotrophic cultivation of *Spirulina platensis* for CO₂ fixation and phycocyanin production. **Chemical Engineering Journal**, v. 183, p. 192-197, 2012.

**ARTIGO II - CULTIVO DE *Spirulina* sp. LEB 18 COM MONOETANOLAMINA
COMO ABSORVENTE QUÍMICO DE CO₂ E RECICLO DE NUTRIENTES**

RESUMO

A absorção química de CO₂ utilizando soluções de monoetanolamina (MEA) é uma técnica utilizada para mitigação deste gás de efeito estufa presente em gases de combustão. Este processo de absorção, no entanto, consome elevada energia para regenerar o absorvente e separar o CO₂. Embora a taxa de remoção de CO₂ em sistemas biológicos seja menor que em sistemas químicos, a biofixação de dióxido de carbono por microalgas é uma tecnologia muito estudada, pois converte CO₂ em biomassa por processo fotossintético. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo investigar o cultivo semicontínuo de *Spirulina* sp. LEB 18 e produção de sua biomassa com adição de MEA. Para isso, foram conduzidos cultivos em modo semicontínuo, diariamente alimentados com CO₂ (0,36 mL_{CO2} mL_{meio}⁻¹ d⁻¹) e a cada ciclo de crescimento com 0,20 mmol.L⁻¹ de MEA. Os ensaios foram realizados com concentração celular inicial de 0,20 g.L⁻¹, em fotobiorreatores tubulares de 2,0 L, mantidos a 30°C, fotoperíodo de 12 h claro/12 h escuro, 3,2 klx, com tempo de duração de 25 d. A concentração celular de corte foi 0,5 g.L⁻¹ e a fração volumétrica de reciclo de meio 0,5. Para efeito de comparação foi conduzida, nas mesmas condições experimentais, duplicata de ensaios sem adição de MEA (ensaio controle). A partir dos perfis de crescimento celular da microalga foi avaliada a cinética de crescimento, a concentração de proteínas, carboidratos e lipídios. Os ensaios com adição de MEA proporcionaram os melhores resultados de tempo de geração (2,14 d), produtividade de biomassa (62,1 mg.L⁻¹.d⁻¹), biomassa gerada (3,35 g), taxa de biofixação de CO₂ (104,0 mg.L⁻¹.d⁻¹) e eficiência de utilização de CO₂ (15,8 %). A concentração de proteínas no ensaio com adição de MEA foi em torno de 37,0 % inferior ao ensaio controle, todavia a concentração de carboidratos obtidos foi quase 96,0 % superior. Frente ao apresentado, foi demonstrado que *Spirulina* pode ser produzida com reciclo de nutrientes e adição de monoetanolamina, promovendo assim a redução das emissões de CO₂ e alcançando áreas que requeiram maiores concentrações de carboidratos, tal como a produção de bioetanol.

Palavras-chave: Biofixação de CO₂, MEA, Microalga, Reaproveitamento de nutrientes, semicontínuo.

ABSTRACT

The CO₂ chemical absorption using solutions of monoethanolamine (MEA) is a technique used for the mitigation this greenhouse gas present in the combustion gases. This absorption process, however, consumes higher energy and to regenerate the adsorbent and separating the CO₂. Although the rate of CO₂ removal in biological systems is less than in chemical systems, the carbon dioxide biofixation by microalgae is a technology much studied, for converting biomass into CO₂ by photosynthetic process. In this context, this work aimed to investigate the semicontinuous cultivation of *Spirulina* sp. LEB 18 and its biomass production with the addition of MEA. For this purpose, cultivations were conducted in semicontinuous mode, CO₂ fed daily (0.36 mL_{CO2} mL_{meio}⁻¹ d⁻¹) and each growth cycle with 0.20 mmol L⁻¹ of MEA. The assays were carried out with initial cell concentration of 0.20 g L⁻¹, in tubular photobioreactor of 2.0 L, maintained at 30°C, photoperiod of 12 h claro/12 h dark, 3.2 klx, with duration of 25 d. The blend concentration was 0.5 g L⁻¹ and the volume fraction of medium recycle was 0.5. For comparison effect was conducted under the same experimental conditions, duplicate assays with no adding of MEA (control assay). From the cell growth outline of microalga was evaluated the growth kinetics and the concentration of proteins, carbohydrates and lipids. The tests with the addition of MEA provided the best results of generation time (2.14 d), biomass

productivity ($62.1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), biomass generated (3.35 g), CO_2 biofixation rate ($104.0 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) and CO_2 utilization efficiency (15.8 %). The protein concentration in the assay with addition of MEA was around 37.0 % less than the control test, nevertheless the concentration of carbohydrates obtained was almost 96.0 % higher. To the presented, it was demonstrated that *Spirulina* can be produced with recycled nutrients and addition of monoethanolamine, thereby promoting the reduction of CO_2 emissions and reaching areas that require higher carbohydrates concentrations, such as the bioethanol production.

Keywords: CO_2 biofixation, MEA, microalga, nutrients reuse, semi-batch.

1 INTRODUÇÃO

O aumento na demanda por combustíveis fósseis nos últimos anos, aliado ao crescimento da população mundial, desperta o interesse crescente em fontes renováveis de energia baseadas na transformação de biomassa (ELLIOTT et al., 2013; COLLET et al. 2011). Entre estas, a biomassa de microalgas tem potencial para fornecer energia renovável, oriunda do biodiesel, bioetanol, biohidrogênio e biogás, por meio da produção de diferentes vetores energéticos. Além disso, estes micro-organismos têm a capacidade de sintetizar moléculas bioativas, tais como carotenoides, ácidos graxos, antioxidantes, anti-inflamatórios e outros compostos orgânicos valiosos, os quais podem ser utilizados na alimentação, em produtos farmacêuticos e cosméticos, bem como compor biomateriais e nanoestruturas (FERREIRA et al., 2013).

O cultivo semicontínuo é um sistema em que uma porção do meio de cultivo é removido periodicamente e o restante é utilizado como o ponto de partida para a continuação da cultura. A quantidade relativa de meio novo adicionado é chamada de “taxa de renovação” e a concentração de biomassa no momento da adição deste meio novo é chamada "concentração de corte" (REICHERT; REINEHR; COSTA, 2006). Este modo de cultivo favorece para que não ocorra baixa taxa de divisão celular no início do processo, bem como diminui as limitações no que se refere aos nutrientes e à penetração da luz na fase posterior (HO; LU; CHANG, 2012). Contudo, a adição de meio de cultivo novo a cada corte traz como consequência o aumento da pressão osmótica do meio, o que, segundo Sudhir et al. (2005), prejudica o aparato fotossintético de microalgas como *Spirulina*.

O aumento da pressão osmótica no meio também diminui a solubilidade do CO_2 (GREEN; PERRY, 2008), a qual é governada pelo equilíbrio termodinâmico da dissociação do ácido carbônico. Logo, considera-se que a biofixação de CO_2 por microalgas seria melhorada se a quantidade do gás dissolvido no líquido fosse aumentada além do limite de equilíbrio

natural da cultura de algas (KIM et al., 2013). Ao encontro disso, a utilização de absorventes químicos, como a monoetanolamina (MEA) podem aumentar a mitigação de CO₂ para o meio líquido (PUXTY; ROWLAND; ATTALLA, 2010). Neste contexto, cultivar microalgas em modo semicontínuo com reciclo de nutrientes e adição de absorvente químico pode ser uma saída para reduzir os custos com nutrientes e maximizar a biofixação de CO₂.

Diante disso, o corrente trabalho teve por objetivo avaliar a influência da adição de monoetanolamina na cinética de crescimento e na produção de biomassa de *Spirulina* em modo semicontínuo com reciclo de nutrientes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo e meio de cultivo

O micro-organismo utilizado para os cultivos foi a cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 (MORAIS et al., 2008), pertencente a Coleção de Culturas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG. O meio de cultivo utilizado nos ensaios foi o meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) modificado sem a fonte de carbono (NaHCO₃).

2.2 Manutenção do inóculo

A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi mantida com CO_{2(g)} industrial (pureza mínima de 99,0 %) como fonte de carbono, em substituição ao bicarbonato de sódio do meio Zarrouk. Isso foi alcançado por decantação do inóculo de *Spirulina*, removendo-se cerca de 90 % v.v⁻¹ do sobrenadante e recuperando-se cerca de 10 % v.v⁻¹ do decantado. Este agregado de células colhido foi ressuspensionado em meio Zarrouk sem carbono e submetido à nova fonte de carbono (CO₂) com vazão específica diária de 0,12 mL_{CO2}.mL_{meio}⁻¹.d⁻¹, 1 min, a cada 1 h, durante o período claro.

2.3 Condições de cultivo

Os ensaios foram realizados em duplicatas nos fotobiorreatores tubulares verticais (FBRT) de 2,0 L, com 1,8 L de volume útil (MORAIS; COSTA, 2007), em modo semicontínuo alimentado com CO₂ industrial (pureza mínima de 99,0 %). O absorvente químico empregado foi a monoetanolamina P. S. (MEA, C₂H₇NO) da marca Vetec, com pureza mínima de 99,0 %. Logo, foram realizados ensaios com adição de MEA e sem adição de MEA (ensaio controle).

A concentração celular inicial dos ensaios foi 0,20 g.L⁻¹, mantidos a 30°C, fotoperíodo 12 h claro/12 h escuro, 3,2 klx, agitação promovida pela injeção de ar comprimido (RADMANN; COSTA, 2008), realizado por 25 d.

A fonte de carbono (CO_2) foi adicionada em vazão específica de 0,36 $\text{mL}_{\text{CO}_2}.\text{mL}_{\text{meio}}^{-1}.\text{d}^{-1}$ (0,05 vvm, 28 $\text{mL}.\text{min}^{-1}$), por 2 min, a cada 1h, durante o período claro. A alimentação com dióxido de carbono foi realizada quando a agitação dos ensaios era interrompida 1 min antes e 1 min depois da adição do gás, com intuito de aumentar o tempo de residência da fonte de carbono no meio líquido.

A concentração celular de corte foi 0,5 g L^{-1} (REICHERT; REINEHR; COSTA, 2006) e a fração volumétrica de reciclo de meio foi 0,5. Assim, a cada variação entre as concentrações celulares de 0,25 g.L^{-1} se obteve um ciclo de crescimento (N) para o cultivo de *Spirulina*. A cada reciclo de meio foi adicionado a concentração de 0,20 mmol.L^{-1} de MEA, a qual foi selecionada em estudos anteriores (artigo 1) como àquela que proporcionou maiores teores de carbono inorgânico dissolvido no meio.

O aparato experimental desta etapa está mostrado na Figura AP3 do apêndice.

2.4 Determinações analíticas

Os ensaios foram acompanhados diariamente pela determinação da concentração de biomassa, medida de pH e alcalinidade. Nos dias em que a concentração de biomassa atingia a concentração de corte foram retiradas amostras também após a realização do corte para determinação das mesmas três análises.

2.4.1 Concentração de biomassa

A concentração de biomassa nos ensaios foi determinada por espectrofotometria a partir de curva padrão predeterminada com o inóculo de *Spirulina* sp. LEB 18 mantido com CO_2 . Esta curva foi obtida com a densidade óptica do inóculo em espectrofotômetro (QUIMIS Q798DRM, Diadema - SP - Brasil), com comprimento de onda de 670 nm, relacionando densidade óptica e massa seca de biomassa, como realizado por Costa et al., 2002.

2.4.2 Alcalinidade, pH e concentração de carbono inorgânico dissolvido

A alcalinidade foi determinada por titulação potenciométrica e o pH por medição direta da amostra com pHmetro digital (PH-221, LUTRON - Taiwan) segundo metodologia oficial (APHA, 1998). A concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID) foi calculada a partir das frações de ionização do carbono no meio, a partir da medida de alcalinidade total e pH dos ensaios de acordo com Carmouze (CARMOUZE, 1994).

2.5 Respostas avaliadas do cultivo

A partir dos perfis de crescimento celular de *Spirulina* sp. LEB 18 foram obtidos a produtividade volumétrica de biomassa (P_x , mg.L⁻¹.d⁻¹), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, d⁻¹), tempo de geração (t_g , d), taxa de biofixação de CO₂ (TB_{CO2}, mg.L⁻¹.d⁻¹) e a eficiência de utilização de CO₂ (E, % m.m⁻¹). Estes parâmetros foram calculados em cada ciclo de crescimento. A partir dos máximos valores obtidos neste intervalo de experimento foi calculada a média e o desvio padrão de cada parâmetro em cada condição (adição de MEA e ensaio controle).

2.5.1 Produtividade volumétrica de biomassa

A produtividade volumétrica de biomassa foi obtida segundo a Equação II-1 (BAILEY; OLLIS, 1986), onde X é a concentração de biomassa (g.L⁻¹) no tempo t (d) e X₀ é a concentração de biomassa (g.L⁻¹) no tempo t₀ (d).

$$P_x = \left(\frac{X - X_0}{t - t_0} \right) \quad (\text{II-1})$$

2.5.2 Velocidade específica máxima de crescimento e tempo de geração

A velocidade específica máxima de crescimento foi calculada por regressão linear aplicada à fase logarítmica de crescimento de cada corte, obtendo-se um perfil Ln X (g.L⁻¹) vs t (d) no qual o coeficiente angular obtido foi $\mu_{\text{máx}}$ (BAILEY; OLLIS, 1986). A partir deste perfil obtido foi também calculado o tempo de geração (t_g) ou duplicação celular de acordo com a Equação II-2 (BAILEY; OLLIS, 1986).

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{máx}}} \quad (\text{II-2})$$

2.5.3 Taxa de biofixação de dióxido de carbono (TB)

A taxa biofixação de CO₂ (TB, mg.L⁻¹.d⁻¹) foi calculada segundo a Equação II-3, a partir de $P_{\text{máx}}$ (mg.L⁻¹.d⁻¹), x_{cbm} (fração mássica de carbono na biomassa, determinada por análise elementar) e das massas molares de dióxido de carbono e carbono (M_{CO2} e M_C, respectivamente).

$$TB = P_x * x_{\text{cbm}} * \frac{M_{\text{CO}_2}}{M_C} \quad (\text{II-3})$$

2.5.4 Eficiência de utilização de dióxido de carbono

A eficiência de utilização de CO₂ (E, % m.m⁻¹) foi calculada segundo a Equação II-4, em que TB foi a taxa de biofixação de CO₂ diária (mg.L⁻¹.d⁻¹), V_{útil} foi o volume útil de trabalho do fotobiorreator (L) e $\dot{m}$ foi taxa mássica de alimentação diária com CO₂ (mg.d⁻¹).

$$E = \frac{(TB \cdot V_{\text{útil}})}{\dot{m}} * 100 \quad (\text{II-4})$$

2.5.5 Biomassa gerada (B_g)

A biomassa gerada ao final dos ensaios (B_g, g) (Equação II-5) foi calculada com a concentração de biomassa obtida ao final de cada ciclo de crescimento (X_{fi}, g.L⁻¹), a concentração de biomassa no início de cada ciclo de crescimento (X_{ii}, g.L⁻¹) e o volume de cultivo retirado em cada corte (V_{ci}, L).

$$B_g = \sum [(X_{f1} - X_{i1})V_{C1} + (X_{f2} - X_{i2})V_{C2} + \dots + (X_{fn} - X_{in})V_{Cn}] \quad (\text{II-5})$$

2.6 Recuperação e caracterização da biomassa

A biomassa obtida a cada corte e ao final dos experimentos foi separada por centrifugação (HITACHI himac CR-GIII, Tóquio - Japão) à 15200 g, 15 min e 20 °C, ressuspendida em água destilada e novamente centrifugada nas mesmas condições. Com intuito de aumentar remoção dos nutrientes do meio de cultivo, esta etapa foi repetida. Posteriormente, a biomassa foi concentrada a 50 mL em recipiente estéril, congelada a -80°C, liofilizada e armazenada a -20°C até sua caracterização descrita a seguir.

2.6.1 Concentração de proteínas e carboidratos

2.6.1.1 Preparo da amostra

A análise de proteínas e carboidratos foi realizada a partir de extratos preparados com 5 mg de biomassa da microalga e 10 mL de água destilada, sonicados em sonda ultrassônica (COLE PARMER CPX 130 – Illinois – USA), com 10 (dez) ciclos de funcionamento, sendo 1 min ligado e 1 min desligado. Este procedimento foi utilizado para liberar o material intracelular de *Spirulina* no meio líquido.

2.6.1.2 Concentração de proteínas

A concentração de proteínas da biomassa de *Spirulina* foi determinada a cada corte e ao final dos ensaios, a partir do método colorimétrico de Lowry, utilizando curva padrão de albumina de soro bovino (LOWRY et al., 1951).

2.6.1.3 Concentração de carboidratos

A concentração de carboidratos presente na biomassa da microalga foi determinada pelo método fenol-sulfúrico de Dubois, utilizando curva padrão de glicose (DUBOIS et al., 1956).

2.6.2 Análise elementar

A biomassa liofilizada, obtida a cada corte e ao final dos ensaios, foi utilizada para determinar, em Analisador Elementar CHNS/O Serie 2400 da Perkin Elmer, as concentrações elementares de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN), utilizando acetanilida como padrão. A determinação elementar CHN realizada neste trabalho baseia-se no método de Pregal e Dunas na qual as amostras sofrem combustão em ambiente com oxigênio puro e os gases resultantes do processo são separados por cromatografia frontal e medidos por detector de condutividade térmica (CULMO, 1988; BAUMGARTEN; WALLNER-KERSANACH; NIENCHESKI, 2010).

2.6.3 Concentração de lipídios

A concentração de lipídios foi determinada pelo método de Folch (FOLCH; LEES; STANLEY, 1957) adaptado por Colla (2002) para biomassa de *Spirulina*. O método de Folch baseia-se na extração, a temperatura ambiente, dos lipídios apolares pela mistura de solventes clorofórmio:metanol (2:1) e dos lipídios polares pela mistura de solventes metanol:água (2:1).

2.7 Análise estatística

As respostas obtidas foram avaliadas por meio de análise de variância, seguida por teste de Tukey, com nível de 95 % de confiança.

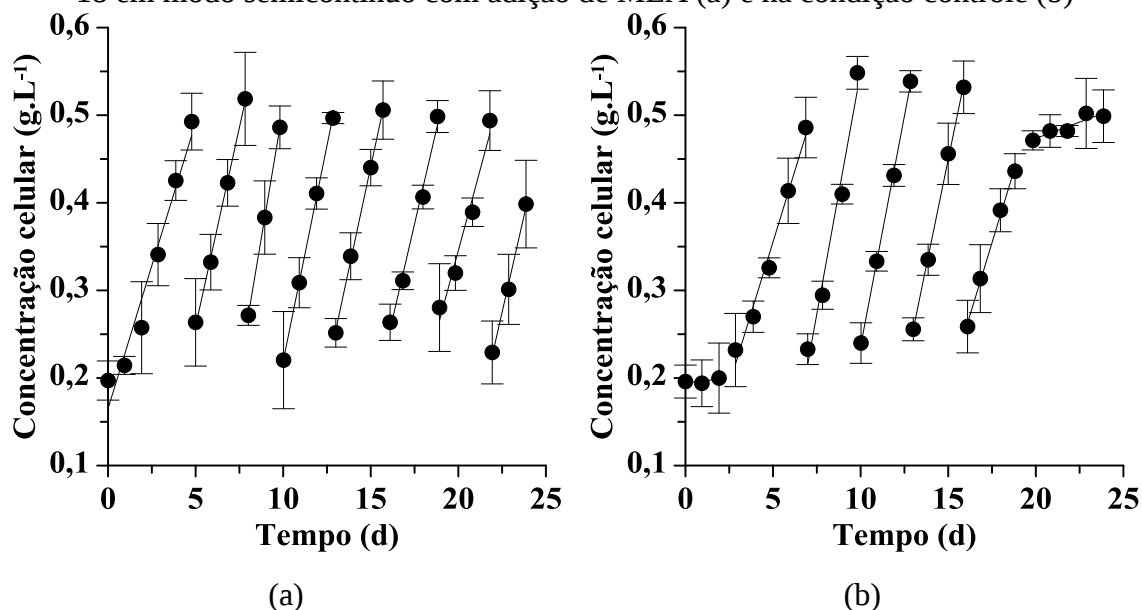
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os perfis de concentração celular e concentração celular linearizada pelo tempo de experimento são mostrados na Figura 1 e na Figura AP5 do Apêndice, respectivamente. Nessas, cada ciclo de crescimento foi caracterizado pela média e o desvio padrão amostral entre as réplicas do ensaio com MEA e do ensaio controle.

O experimento com adição de MEA apresentou pequena fase de adaptação de crescimento de 1 d e 8 ciclos de crescimento (Figura 1a). Estes intervalos de crescimento foram considerados em fase exponencial de crescimento, todos com coeficiente de determinação (R^2) médio $> 0,94$ (Tabela AP1 do apêndice). O ensaio controle apresentou 5 ciclos de crescimento (Figura 1b). O primeiro, caracterizado pela presença de fase lag nos três primeiros dias e fase

log nos quatro dias seguintes. No segundo, terceiro e quarto ciclo de crescimento foi obtida fase de multiplicação máxima celular, com $R^2 > 0,98$ (Tabela AP1 do apêndice). No último ciclo de crescimento (5°) foi obtido fase log nos quatro primeiros dias e fase de compensação de biomassa a partir do 20° d (Figura 1b).

Figura 1 - Perfis médios de concentração celular obtidos com o ensaios de *Spirulina* sp. LEB 18 em modo semicontínuo com adição de MEA (a) e na condição controle (b)

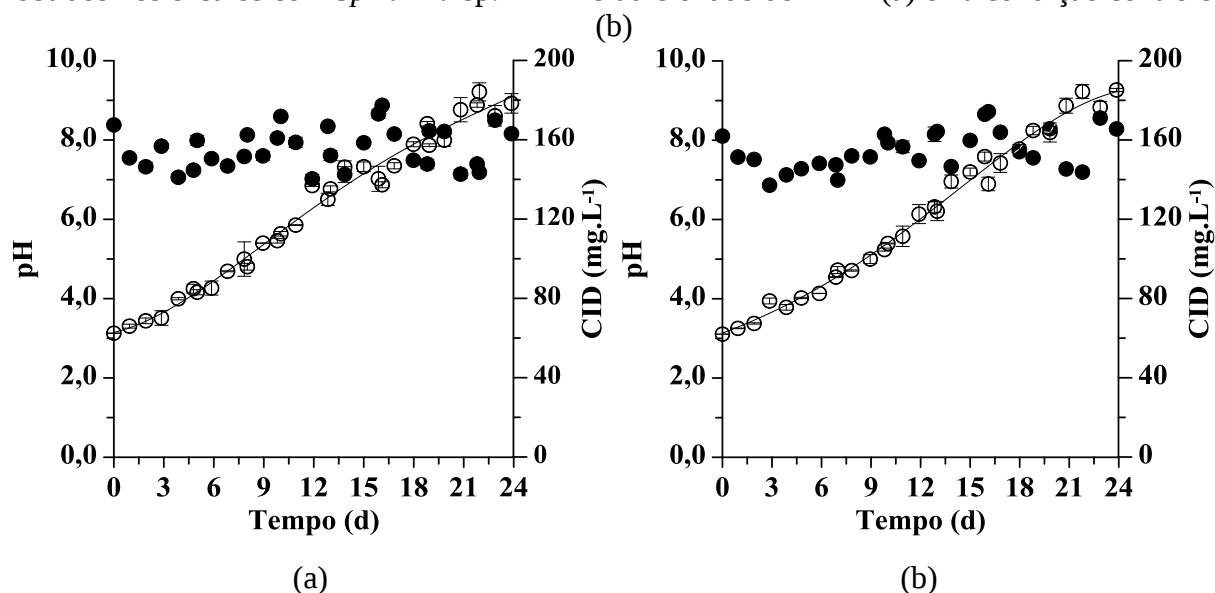


O retardo do crescimento pode ocorrer devido ao período de adaptação fisiológica provocado por mudanças nas condições de nutrientes (LEE; SHEN, 2004), como por exemplo, o reciclo de meio. A existência de fase log em todos os ciclos de crescimento no ensaio com MEA mostrou que a adição de 0,2 mmol.L⁻¹ do absorvente químico a cada corte, combinado com o reciclo de nutrientes, pode ser benéfico a multiplicação celular da cepa de *Spirulina* estudada. Contudo, em ambas as condições testadas neste trabalho, como ou sem adição de absorvente químico, houve uma deposição demasiada de matéria orgânica na superfície lateral interna dos biorreatores (Figura AP4 do Apêndice). Este fato pode ter inibido a disponibilidade de luz para o crescimento da microalga, em ambas as condições proporcionadas, devido à blindagem (CHEN et al. 2013) deste material orgânico presente e propiciado o desenvolvimento de organismos oportunistas.

O meio de cultivo BG-11 (RIPPKA et al., 1979) (ANEXO, Tabela A2) sem carbono e adicionado de MEA converte maior concentração de CO_{2(g)} em carbono inorgânico dissolvido (CID) em relação ao meio BG-11 (CHOI; KIM; LEE, 2012; KIM et al., 2013). As condições empregadas para o cultivo de *Spirulina* com o meio Zarrouk, no presente estudo, no entanto,

não mostraram diferença evidente entre a adição de MEA (Figura 2a) e o cultivo controle (Figura 2b) no que diz respeito à concentração de CID, já que os valores iniciais e finais foram muito semelhantes ($62,4 \pm 0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ e $62,0 \pm 0,03 \text{ mg.L}^{-1}$, $178,4 \pm 4,9 \text{ mg.L}^{-1}$ e $185,2 \pm 0,8 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente).

Figura 2 - Perfis de pH (●) e concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID) (○) obtidos nos ensaios com *Spirulina* sp. LEB 18 adicionado de MEA (a) e na condição controle



A solubilidade do dióxido de carbono no meio líquido diminui com o aumento da temperatura e da concentração salina (GREEN; PERRY, 2008). O meio Zarrouk (ANEXO, Tabela A1) é composto por uma concentração mais elevada de sais inorgânicos que o meio BG-11. Desta forma, o primeiro meio oferece uma pressão osmótica superior ao segundo meio, limitando a dissolução de gases mesmo na presença de absorvente químico de CO₂. Além disso, a concentração de MEA empregada em ensaios com o meio BG-11 (CHOI; KIM; LEE, 2012; KIM et al., 2013) foram superiores a empregada neste estudo com o meio Zarrouk devido à baixa tolerância apresentada por *Spirulina* sp. LEB 18 frente a maiores concentrações do absorvente químico empregado (Artigo 1). O pH do ensaio com adição de MEA e do ensaio controle apresentaram comportamento semelhante ao longo do cultivo semicontínuo de *Spirulina* (Figuras 2a e 2b). Este parâmetro variou entre $7,1 \pm 0,1$ e $8,9 \pm 0,0$ para o ensaio com absorvente químico e entre $6,9 \pm 0,0$ e $8,8 \pm 0,1$ para o ensaio controle.

O crescimento celular não aumentou proporcionalmente com o aumento das concentrações de CID, mesmo com a adição de MEA a cada ciclo de crescimento. Constatou-se, então, que a disponibilidade de carbono para a absorção da microalga foi suficiente e, assim,

a dissolução de CO₂ não foi limitante à biofixação de carbono por *Spirulina*. Logo, o aumento médio de 31,4 % de biomassa gerada pelo ensaio com MEA (3,35 ± 0,25 g), em relação ao ensaio controle (2,55 ± 0,11 g), foi proporcionado pelo maior número de ciclos de crescimento apresentado. Os valores médios dos parâmetros de crescimento avaliados ($\mu_{\text{máx}}$ e t_g), assim como os parâmetros de biofixação de CO₂ (TB e E), com e sem adição de MEA, não diferiram estatisticamente ao nível de 95,0 % de confiança (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados médios entre as réplicas de velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), tempo de geração (t_g), produtividade máxima de biomassa ($P_{\text{máx}}$), taxa de biofixação de CO₂ (TB), eficiência de utilização de CO₂ (E) e biomassa gerada (B_g), obtidos com cultivo semicontínuo de *Spirulina* com adição de MEA e no cultivo controle

Condição	Ciclo	$\mu_{\text{máx}}$ (d ⁻¹)	t_g (d)	$P_{\text{máx}}$ (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	TB (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	E (% m.m ⁻¹)
Com MEA	1	0,206 ± 0,004	3,37 ± 0,07	62,1±2,6	104,0±5,0	15,8±0,8
	2	0,240 ± 0,001	2,89 ± 0,01	41,2±3,3	69,0±4,7	10,4±0,7
	3	0,324 ± 0,008	2,14 ± 0,05	29,5±1,4	49,6±1,9	7,5±0,3
	4	0,291 ± 0,016	2,39 ± 0,13	23,3±0,4	39,3±0,7	5,9±0,1
	5	0,256 ± 0,004	2,71 ± 0,05	19,5±1,0	33,7±1,4	5,1±0,2
	6	0,250 ± 0,005	2,77 ± 0,06	16,3±0,6	27,1±1,1	4,1±0,2
	7	0,182 ± 0,008	3,80 ± 0,16	13,6±0,8	22,5±1,7	3,4±0,3
	8	0,190 ± 0,020	3,68 ± 0,40	5,6±0,9	9,4±1,4	1,4±0,2
	Máximo	0,324	3,80	62,1	104,0	15,8
	Mínimo	0,182	2,14	5,6	9,4	1,4
	Média	0,242 ^a	2,97 ^a	26,3 ^a	44,3 ^a	6,7 ^a
	d.p.*	0,049	0,60	0,9	1,4	0,2
Condição	Ciclo	$\mu_{\text{máx}}$ (d ⁻¹)	t_g (d)	$P_{\text{máx}}$ (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	TB (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	E (% m.m ⁻¹)
Controle	1	0,191 ± 0,002	3,63 ± 0,03	44,0±2,5	73,6±4,0	11,1±0,6
	2	0,297 ± 0,009	2,34 ± 0,07	37,2±0,8	62,6±2,9	9,5±0,4
	3	0,285 ± 0,001	2,44 ± 0,01	27,8±0,4	46,9±0,5	7,1±0,1
	4	0,248 ± 0,027	2,82 ± 0,30	21,5±2,0	36,3±3,5	5,5±0,5
	5	0,192 ± 0,025	3,62 ± 0,48	14,8±0,3	24,8±0,7	3,7±0,1
	Máximo	0,297	3,64	44,0	73,6	11,1
	Mínimo	0,191	2,43	14,8	24,8	3,7
	Média	0,242 ^a	2,97 ^a	29,1 ^b	48,8 ^a	7,4 ^a
	d.p.*	0,050	0,63	1,0	1,9	0,3

Letras sobrescritas iguais na mesma coluna, para as mesmas respostas, indicam que as médias não diferiram estatisticamente ao nível de 95 % de confiança (p>0,05); *d.p.: desvio padrão amostral

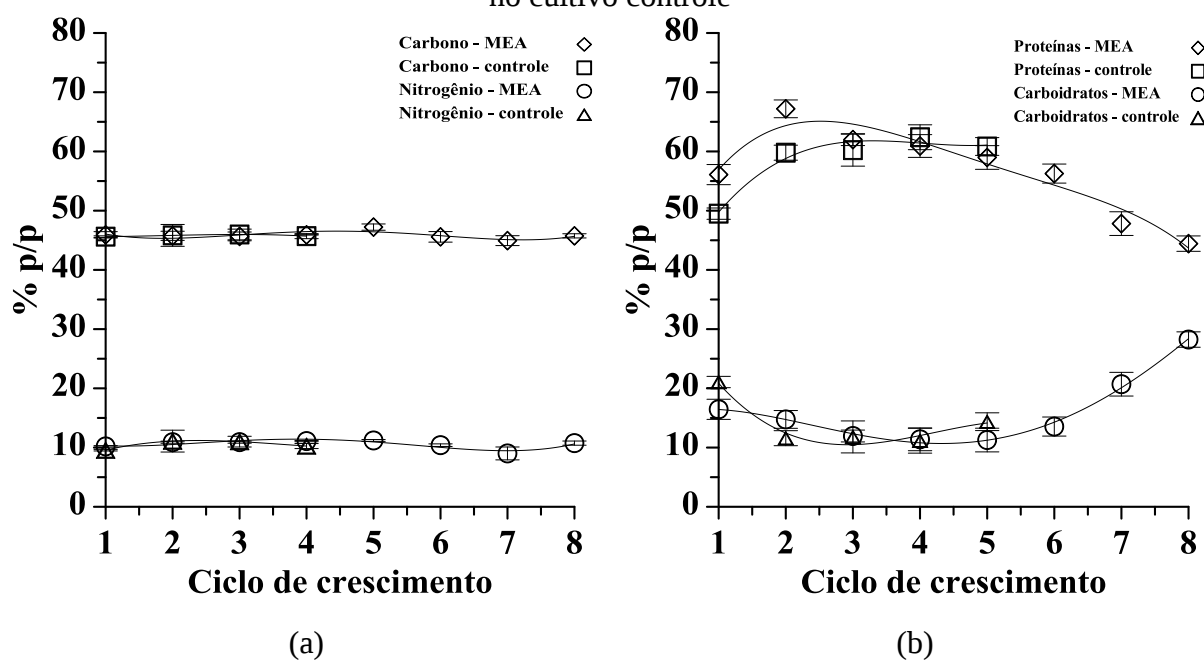
A produtividade de biomassa de *Spirulina* apresentou comportamento decrescente ao decorrer dos ciclos de crescimento, semelhante nas duas condições testadas (Tabela 1), sendo que o valor médio entre os ciclos de crescimento foi superior significativamente no ensaio

controle ($p < 0,001$). Porém, o máximo valor de $\mu_{\max}$ e o mínimo valor de t_g foram encontrados no ensaio com adição de MEA, sendo estes 13,3 % maior e 11,9 % menor que os parâmetros encontrados no ensaio sem adição do absorvente de CO_2 .

Reichert, Reinehr e Costa (2006), em cultivo semicontínuo com *Spirulina* sp. cepa Paracas, com renovação de meio a cada corte, obtiveram velocidade específica máxima de crescimento ($0,101 \pm 0,011 \text{ d}^{-1}$) e produtividade máxima ($37,0 \pm 4,6 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) inferiores ao do corrente trabalho. Isso ressalta que o uso de meio novo não promove maiores taxas de crescimento e de produtividade de biomassa, já que a taxa de absorção de nutrientes por microalgas é limitada por sua demanda bioquímica celular.

A concentração de proteínas aumentou na biomassa produzida com MEA e no cultivo controle até o segundo ciclo de crescimento. A partir do 3º ciclo de crescimento, o teor proteico da biomassa produzida no ensaio controle aumentou até estabilizar no último ciclo obtido por esta condição (Figura 3b). Com a biomassa produzida com MEA, do terceiro ciclo até o oitavo, houve redução na concentração de proteínas (Figura 3b). O teor médio final de proteínas ($44,4 \pm 6,9 \text{ \% m.m}^{-1}$), encontrado na biomassa cultivada com MEA (Tabela 2), está abaixo do que normalmente se encontra em biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 ($60\text{-}70\% \text{ m.m}^{-1}$) segundo ensaios de Borges et al (2013), mas o ensaio controle ($60,8 \pm 4,0\% \text{ m.m}^{-1}$) se manteve dentro deste intervalo de concentração proteica.

Figura 3 - Perfis médios de concentração percentual de carbono e nitrogênio elementar (a) e de proteínas e carboidratos (b) determinados na biomassa de *Spirulina* com adição de MEA e no cultivo controle



As microalgas em condições de estresse de nutrientes tendem a acumular compostos como lipídios e carboidratos (TANZI; VIAN; CHEMAT, 2013). O perfil da concentração de carboidratos ao longo dos ciclos de crescimento (Figura 3b) nos ensaios com MEA indicam que o reciclo de nutrientes, proposto neste trabalho, pode ter privado *Spirulina* da fonte de nitrogênio do meio, priorizando sua rota metabólica à formação de compostos de reserva. Este fato foi ratificado pela concentração final de carboidratos, na biomassa cultivada com MEA (8º ciclo) ter sido superior àquela da biomassa cultivada sem MEA (5º ciclo) (Tabela 2). Seguindo esta ideia, Klok et al (2013) perceberam que a depleção de nitrogênio no cultivo de microalgas causa desperdício de luz pela célula por dissipação de energia na forma de calor e luz na forma de fluorescência. Sendo assim, a microalga perderia eficiência no processo fotossintético, causando diminuição da produção média biomassa (Tabela 1) e compostos nitrogenados como proteínas (Figura 3b e Tabela 2).

Tabela 2 - Resultados médios de proteínas, carboidratos e lipídios, obtidos com a biomassa seca ao final do último ciclo de crescimento em cada condição

Condição	Proteínas (% m.m ⁻¹)	Carboidratos (% m.m ⁻¹)	Lipídios (% m.m ⁻¹)
Com MEA	44,4 ± 6,9 ^a	28,2 ± 3,7 ^a	8,3 ± 1,4 ^a
Controle	60,8 ± 4,0 ^b	14,4 ± 1,4 ^b	10,0 ± 1,2 ^a

Letras sobrescritas iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferiram estatisticamente ao nível de 95% de confiança (p>0,05)

A concentração de lipídios na biomassa do corrente trabalho, cultivada com MEA (8,3 ± 1,4 % m.m⁻¹) e sem MEA (10,0 ± 1,2% m.m⁻¹), foi superior ao encontrado por Borges et al (2013) (5,0% m.m⁻¹) e Moraes et al (2009) (3,3% m.m⁻¹) com esta cepa de microalga. Estes autores cultivaram *Spirulina* em reatores abertos, o que implicaria segundo Chisti (2007) em menor produtividade de biomassa, mas não justificaria os baixos teores de lipídios em relação ao encontrados nos presentes experimentos. Desta forma, assim como ocorreu com a concentração de carboidratos, *Spirulina* pode ter aumentado a concentração de lipídios, nas duas condições testadas, por escassez ou perda de algum nutriente devido ao reciclo de meio.

Os resultados obtidos para as três macromoléculas analisadas na biomassa de *Spirulina* indicam que a adição de MEA a cada ciclo de crescimento não exerceu influência significativa sobre a concentração de lipídios (p=0,1140), mas aumentou significativamente o teor de carboidratos (p=0,00007) e diminuiu significativamente a concentração de proteínas (p=0,00007). Uma possível explicação para este fato é que o efeito da deficiência de fósforo é

semelhante à de nitrogênio nas células eucarióticas e procarióticas, isto é, nestas condições são obtidas baixas concentrações de clorofila *a* e aumento do conteúdo de carboidratos (HU, 2004). Complementando esta ideia, entende-se que a redução de clorofila está ligada a parte da redução de proteínas, pois segundo Masojídek; Koblízek e Torzillo (2004) estes pigmentos verdes são compostos lipofílicos associados em complexos proteicos.

4 CONCLUSÃO

A adição de monoetanolamina (MEA) e o reciclo de meio de cultivo proporcionaram a obtenção de 8 ciclos de crescimento em fase logarítmica no cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18. Nesta condição foi alcançado o menor tempo de geração (2,14 d), maiores resultados de produtividade de biomassa ($62,1 \pm 2,6 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), biomassa gerada ($3,35 \pm 0,25 \text{ g}$), taxa de biofixação de CO_2 ($104,0 \pm 5,0 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) e eficiência de utilização de CO_2 ($15,8 \pm 0,8 \text{ \% m.m}^{-1}$). A concentração de lipídios de *Spirulina* cultivada com MEA foi de $8,3 \pm 1,4 \text{ \% m.m}^{-1}$, a concentração de proteínas ($44,4 \pm 6,9 \text{ \% m.m}^{-1}$) foi cerca de 37,0 % inferior ao ensaio controle ($60,8 \pm 4,0 \text{ \% m.m}^{-1}$), mas a concentração de carboidratos obtidos foi quase 96,0 % superior no ensaio com absorvente químico.

O cultivo da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 em modo semicontínuo, com adição de MEA e com reciclo de nutrientes do meio de cultura pode ser uma alternativa para maximizar a produção de biomassa microalgal enriquecida com carboidratos. Neste contexto, a produção de biomassa de *Spirulina* pode ser obtida com menores custos com nutrientes, atingindo um espaço em bioprocessos que requeira maiores concentrações desta macromolécula como, por exemplo, a produção de bioetanol combustível.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA) - **Standard Methods**. For The Examination of Water and Wastewater. 20 Ed. American Public Health Association. Washington, 1998.

BAILEY, J. E., OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2ª ed., Singapore: McGraw-Hill, p.397-398, 1986.

BAUMGARTEN, M. G. Z.; WALLNER-KERSANACH, M.; NIENCHESKI, L. F. H. **Manual de Análises em oceanografia Química**. Rio Grande: Editora da Furg, 2010.

BORGES, J. A.; ROSA, G. M.; MEZA, L. H. R.; HENRARD, A. A.; SOUZA, M. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* sp. LEB-18 culture using effluent from the anaerobic digestion. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, No. 2, p. 277-287, 2013.

CARMOUZE, J. P. **O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas**. São Paulo: Editora Edgard Blucher: FAPESP, 253p., 1994.

CHOI, W.; KIM, G.; LEE, K. Influence of the CO₂ absorbent monoethanolamine on growth and carbon fixation by the green alga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 295–299, 2012.

CHEN, C-Y.; KAO, P-C.; TSAI, C-J.; LEE, D-J.; CHANG, J.-S. Engineering strategies for simultaneous enhancement of C-phycoerythrin production and CO₂ fixation with *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 307–312, 2013.

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

COLLA, L. M. **Influência das Condições de Crescimento sobre o Potencial Antioxidante da microalga *Spirulina platensis* e seu Potencial na Redução da Hipercolesterolemia**. 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2002.

COLLET, P.; HÉLIAS, A.; LARDON, L.; RAS, M.; GOY, R-A.; STEYER, J-P. Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 207-214, 2011.

COSTA, J. A. V., COLLA, L. M., DUARTE FILHO, P., KABKE, K., WEBER, A. Modeling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.18, p. 603-607, 2002.

CULMO, R. F. Principle of operation – the Perkin-Elmer PE2400 CHN Elemental Analyser. **Elemental Analysis Newsletter**. Perkin Elmer Publication EAN-2, 4 p, 1988.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n.3, p. 350-356, 1956.

ELLIOTT, D. C.; HART, T. R.; SCHMIDT, A. J.; NEUENSCHWANDER, G. G.; ROTNESS, L. J.; OLARTE, M. V.; ZACHER, A. H.; ALBRECHT, K. O.; HALLEN, R. T.; HOLLADAY, J. E. Process development for hydrothermal liquefaction of algae feedstocks in a continuous-flow reactor. **Algal Research**, v. 2, p. 445-454, 2013.

FERREIRA, A. F.; RIBEIRO, L. A.; BATISTA, A. P.; MARQUES, P. A. S. S.; NOBRE, B. P.; PALAVRA, A. M. F.; SILVA, P. P.; GOUVEIA, L.; SILVA, C. A. Biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga – Energy and CO₂ emission and economic analyses. **Bioresource Technology**, v. 138, p. 235-244, 2013.

FOLCH J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v.226, p.497-509, 1957.

GREEN, D. W.; PERRY, R. H. **Perry's Chemical Engineers' Handbook**, McGraw-Hill, 3735 p., 2008.

HO, S-H.; LU, W-B.; CHANG, J-S. Photobioreactor strategies for improving the CO₂ fixation efficiency of indigenous *Scenedesmus obliquus* CNW-N: Statistical optimization of CO₂

feeding, illumination, and operation mode. **Bioresource Technology**, v. 105, p. 106-113, 2012.

HU, Q. Environmental Effects on Cell Composition. In: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**, Blackwell Science, 566 p., 2004. Cap. 5, p. 83-93.

KIM, G.; CHOI, W.; LEE, C-H.; LEE, K. Enhancement of dissolved inorganic carbon and carbon fixation by green alga *Scenedesmus* sp. in the presence of alkanolamine CO₂ absorbents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 18- 23, 2013.

KLOK, A. J.; MARTENS, D. E.; WIJFFELS, R. H.; LAMERS, P. P. Simultaneous growth and neutral lipid accumulation in microalgae. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 233-243, 2013.

LEE, Y-K.; SHEN, H. Basic Culturing Techniques. In: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**, Blackwell Science, 566 p., 2004. Cap. 3, p. 40-56.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-276, 1951.

MASOJÍDEK, J.; KOBLÍZEK, M.; TORZILLO, G. Photosynthesis in Microalgae. In: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**, Blackwell Science, 566 p., 2004. Cap. 2, p. 20-39.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 1349–1352, 2007.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.63, p. 144-150, 2008.

PUXTY, G.; ROWLAND, R.; ATTALLA, M. Comparison of the rate of CO₂ absorption into aqueous ammonia and monoethanolamine. **Chemical Engineering Science**, v. 65, p. 915-922, 2010.

RADMANN, E. M; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Química Nova**, v. 31, nº 7, p. 1609-1612, 2008.

REICHERT, C. C.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, No. 01, p. 23-28, 2006

RIPPKA, R. DERULLES, J.; WATERBURT, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1–61, 1979.

SUDHIR, P-R.; POGORYELOV, D.; KOVÁCS, L.; GARAB, G.; MURTHY, S. D. S. The Effects of Salt Stress on Photosynthetic Electron Transport and Thylakoid Membrane Proteins in the Cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, No. 4, p. 481-485, 2005.

TANZI, C D.; VIAN, M. A.; CHEMAT, F. New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: A green clean and scalable process. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 271–275, 2013.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'unecyanophycée. Influence de diversfacteurs physiques et chimiquessur la croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* Geitler.** Ph.D. Thesis, University of Paris, 1966.

CAPÍTULO IV

6 CONCLUSÃO GERAL

Os ensaios desta dissertação selecionaram as concentrações de monoetanolamina (MEA) (0,10, 0,20 e 0,41 mmol.L⁻¹) que não afetam a cinética de crescimento de *Spirulina* sp. LEB 18. A adição de MEA aumentou a concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID) no meio de cultivo, em relação ao meio com hidróxido de sódio (NaOH), em cerca de 100 %. O cultivo semicontínuo de *Spirulina* sp. LEB 18 com adição de MEA proporcionou maior número de ciclos de crescimento (N=8), menor tempo de geração (2,14 d), maiores resultados de produtividade de biomassa ($62,1 \pm 2,6$ mg.L⁻¹.d⁻¹), biomassa gerada ($3,35 \pm 0,25$ g), taxa de biofixação de CO₂ ($104,0 \pm 5,0$ mg.L⁻¹.d⁻¹) e eficiência de utilização de CO₂ ($15,8 \pm 0,8$ % m.m⁻¹).

O teor de lipídios nas biomassas produzidas em modo descontínuo e modo semicontínuo não diferiram significativamente ($p > 0,05$) entre si, dentro de cada batelada de experimentos, sendo em média 100 a 200 % maiores que os valores encontrados na literatura para o mesmo gênero de microalga devido, provavelmente, a adição de MEA. A concentração de proteínas obtida na presença de MEA foi similar ao ensaio adicionado de NaOH (condução descontínua) e inferior ao ensaio controle (condução semicontínua). Contudo, a concentração de carboidratos obtidos em *Spirulina* em modo semicontínuo com adição de MEA foi $28,2 \pm 3,7$ % m.m⁻¹, cerca de 96,0 % superior em relação ao experimento controle ($14,4 \pm 1,4$ % m.m⁻¹).

Frente ao apresentado foi possível comprovar que os absorventes de CO₂ estudados (MEA e NaOH) não diminuem a produtividade de *Spirulina* e podem aumentar a concentração de proteínas ou carboidratos. Foi demonstrado também que o cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 em modo semicontínuo, adicionado de MEA, CO₂ e com reciclo de nutrientes do meio de cultura, pode ser uma alternativa para maximizar a produção de biomassa microalgal enriquecida com carboidratos. Neste contexto, a biomassa de *Spirulina* pode ser obtida com menores custos com nutrientes e promover a redução das emissões do CO₂ com seu cultivo. Desta forma, demonstrou-se que *Spirulina* tem potencial para bioprocessos que requeiram maiores concentrações de carboidratos como a produção de biocombustíveis, não ficando restrita somente ao enriquecimento proteico alimentício.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Testar outras microalgas frente à tolerância de diferentes concentrações de absorventes de CO₂.

Estudar o consumo de absorventes químicos como fonte de carbono para microalgas.

Desenvolver um biorreator que permita e facilite a assepsia durante um cultivo semicontínuo com reciclo de meio.

Desenvolver uma configuração de biorreator que aumente o tempo de retenção do CO₂ no cultivo e do tempo de reação com o absorvente químico.

Implementar o sistema de fixação química e biológica de CO₂ em escala industrial.

Desenvolver um sistema integrado pela utilização de carbono, o qual una os processos de fixação química e biológica de CO₂ por microalgas.

Desenvolver método capaz de quantificar compostos como a monoetanolamina.

Desenvolver sistema automatizado que detecte a demanda de nutrientes, como o dióxido de carbono, a serem alimentados ao cultivo de microalgas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJAYAN, K. V.; SELVARAJU, M.; THIRUGNANAMOORTHY, K. Enrichment of chlorophyll and phycobiliproteins in *Spirulina platensis* by the use of reflector light and nitrogen sources: An in-vitro study. **Biomass and Bioenergy**, 2012.
- ALCOCK, N. Businesses must face the realities of a low carbon economy: A stronger response is needed if firms are to meet Government emission targets and take advantage of the opportunities presented by a lower carbon footprint. **Strategic Direction**, v. 24, n° 6, p. 13-15, 2008.
- AL-MARZOUQI, M. H.; EL-NAAS, M. H.; MARZOUK, S. A. M.; AL-ZAROONI, M. A.; ABDULLATIF, N.; FAIZ, R. Modeling of CO₂ absorption in membrane contactors. **Separation and Purification Technology**, v. 59, p. 286-293, 2008.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA) - **Standard Methods**. For The Examination of Water and Wastewater. 20 Ed. American Public Health Association. Washington, 1998.
- AOAC - **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 17th HORWITZ, W.; ed. Maryland: Association of Official Analytical Chemists, 2000.
- ANDRADE, M R. **Biosistema para produção de biomassa microalgal e biometano**. 2009. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.
- BAILEY, J. E., OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2ª ed., McGraw-Hill, Singapore, p.397-398, 1986.
- BAUMGARTEN, M. G. Z.; WALLNER-KERSANACH, M.; NIENCHESKI, L. F. H. **Manual de Análises em oceanografia Química**. Rio Grande: Editora da Furg, 2010.
- BELAY, A. *Spirulina platensis* (Arthrospira): production and quality assurance. In: GERSHWIN, M. E.; BELAY, A. **Spirulina in human nutrition and health**. Portland: Taylor & Francis, 2008. Cap. 1, p. 2-23.
- BILANOVIC, D.; HOLLAND, M.; ARMON, R. Microalgal CO₂ sequestering – Modeling microalgae production costs. **Energy Conversion and Management**, v. 58, p. 104–109, 2012.
- BILANOVIC, D.; ANDARGATCHEW, A.; KROEGER, T.; SHELEF, G. Freshwater and marine microalgae sequestering of CO₂ at different C and N concentrations – response surface methodology analysis. **Energy Conversion and Management**, v. 50, p. 262-267, 2009.
- BILLER, P.; ROSS, A. B. Hydrothermal processing of algal biomass for the production of biofuels and chemicals. **Biofuels**, v. 3, n° 5, p. 603-623, 2012.
- BORGES, J. A.; ROSA, G. M.; MEZA, L. H. R.; HENRARD, A. A.; SOUZA, M. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* sp. LEB-18 culture using effluent from the anaerobic digestion. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, No. 2, p. 277-287, 2013.

BLAUWHOFF, B. R.; VERSTEEG, G. F.; VAN SWAAIJ, P. M. A study of the reaction between CO₂ and alkanolamines in aqueous solutions. **Chemical Engineering Science**, v. 39, p. 207–225, 1984.

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

BRODIE, J.; ZUCCARELLO, G. C. **Systematics of the Species-rich Algae: Red Algal Classification, Phylogeny and Speciation**. CRC Press-Taylor & Francis, London, 2007.

CAMERINI, F. V. **Fixação biológica de Dióxido de Carbono por *Spirulina (Arthrospira) platensis***, 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008.

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica**. Thomson Learning Edições Ltda, 2006.

CARMOUZE, J. P. **O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas**. São Paulo: Editora Edgard Blucher: FAPESP, 253p., 1994.

CARVALHO, A. P.; MEIRELES, L. A.; MALCATA, F. X. Microalgal Reactors: a review of enclosed system designs and performances. **Biotechnology Progress**, v. 22, p. 1490–1506, 2006.

CHEN, C-Y.; KAO, P-C.; TSAI, C-J.; LEE, D-J.; CHANG, J.-S. Engineering strategies for simultaneous enhancement of C-phycocyanin production and CO₂ fixation with *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 307–312, 2013.

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

CHOI, W.; KIM, G.; LEE, K. Influence of the CO₂ absorbent monoethanolamine on growth and carbon fixation by the green alga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 295–299, 2012.

COHEN, Z. The Chemicals of *Spirulina*. In: VONSHAK, A. ***Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology***. London: Taylor & Francis, 1997. Cap. 10, p. 175-204.

COLLA, L. M. **Influência das Condições de Crescimento sobre o Potencial Antioxidante da microalga *Spirulina platensis* e seu Potencial na Redução da Hipercolesterolemia**. 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2002.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1489-1493, 2007.

COLLET, P.; HÉLIAS, A.; LARDON, L.; RAS, M.; GOY, R-A.; STEYER, J-P. Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 207-214, 2011.

COSTA, J. A. V.; MORAIS, M G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2–9, 2011.

COSTA, J. A. V., COLLA, L. M., DUARTE FILHO, P., KABKE, K., WEBER, A. Modeling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.18, p. 603-607, 2002.

CULMO, R. F. Principle of operation – the Perkin-Elmer PE2400 CHN Elemental Analyser. **Elemental Analysis Newsletter**. Perkin Elmer Publication EAN-2, 4 p, 1988.

DELRUE, F.; SETIER, P. A.; SAHUT, C.; COURNAC, L.; ROUBAUD, A.; PELTIER, G.; FROMENT, A-K. An economic, sustainability, and energetic model of biodiesel production from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 191–200, 2012.

DEVI, M. P.; MOHAN, S. V. CO₂ supplementation to domestic wastewater enhances microalgae lipid accumulation under mixotrophic microenvironment: Effect of sparging period and interval. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 116-123, 2012.

DLUGOKENCKY, E.; TANS, P. NOAA/ESRL. Disponível em: www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/, acessado em agosto de 2013.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n.3, p. 350-356, 1956.

ELLIOTT, D. C.; HART, T. R.; SCHMIDT, A. J.; NEUENSCHWANDER, G. G.; ROTNESS, L. J.; OLARTE, M. V.; ZACHER, A. H.; ALBRECHT, K. O.; HALLEN, R. T.; HOLLADAY, J. E. Process development for hydrothermal liquefaction of algae feedstocks in a continuous-flow reactor. **Algal Research**, v. 2, p. 445-454, 2013.

FERRAZ, C. A. M.; AQUARONE, E.; KRAUTER, M. Efeito da luz e do pH no crescimento de *Spirulina maxima*. **Revista de Microbiologia**, v. 16, n° 2, p. 132-137, 1985.

FERREIRA, A. F.; RIBEIRO, L. A.; BATISTA, A. P.; MARQUES, P. A. S. S.; NOBRE, B. P.; PALAVRA, A. M. F.; SILVA, P. P.; GOUVEIA, L.; SILVA, C. A Biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga – Energy and CO₂ emission and economic analyses. **Bioresource Technology**, v. 138, p. 235-244, 2013.

FERREIRA, L. S.; RODRIGUES, M. S.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation in tubular photobioreactor: Use of no-cost CO₂ from ethanol fermentation. **Applied Energy**, v. 92, p. 379-385, 2012.

FOLCH J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v.226, p.497-509, 1957.

FRANK, E; WANG, M.; HAN, J.; ELGOWAINY, A.; PALOU-RIVERA, I. **Life-Cycle Analysis of Algal-Based Fuels with the GREET Model**. Energy Systems Division, Argonne Laboratory, San Francisco, USA, 2011. Disponível em: <http://www.egnret.ewg.apec.org/workshops/AlgalBiofuels/Michael%20Wang.pdf>, acesso: 25 de setembro de 2013.

GILL, R. A.; POLLEY, H. W.; JOHNSON, H. B.; ANDERSON, L. J.; MAHERALI, H.; JACKSON, R. B. Nonlinear grassland responses to past and future atmospheric CO₂. **Nature**, v. 417, p. 279-282, 2002.

GREEN, D. W.; PERRY, R. H. **Perry's Chemical Engineers' Handbook**, McGraw-Hill, 3735 p., 2008.

GPSA - Engineering Data Book. Gas Processors Suppliers Association, Tulsa, OK, 2004.

HENDRIKS, C. A.; BLOK, K. Underground storage of carbon dioxide. **Energy Converse. Management**, v. 36, p. 539-542, 1995.

HO, S-H.; CHENA, C-Y.; YEHA, K-L.; CHENC, W-M.; LIND, C-Y.; CHANG, J-S. Characterization of photosynthetic carbon dioxide fixation ability of indigenous *Scenedesmus obliquus* isolates. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 57–62, 2010.

HO, S-H.; LU, W-B.; CHANG, J-S. Photobioreactor strategies for improving the CO₂ fixation efficiency of indigenous *Scenedesmus obliquus* CNW-N: Statistical optimization of CO₂ feeding, illumination, and operation mode. **Bioresource Technology**, v. 105, p. 106-113, 2012.

HOUGHTON, J. T.; FILHO, L. G. M.; CALLANDER, B. A.; HARRIS, N.; KATTENBERG, A.; MASKELL, K. **The Climate Change 1995 - The Science of Climate Change**, p. 22, Cambridge: University Press, 1996.

HU, Q. Environmental Effects on Cell Composition. In: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**, Blackwell Science, 566 p., 2004. Cap. 5, p. 83-93.

INTERNATIONAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (IPCC). Relatório do IPCC/ONU – Novos Cenários Climáticos – Versão em português: iniciativa da Ecolatina 1, 2007. Disponível em <http://www.ecolatina.com.br/pdf/IPCC-COMPLETO.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2013.

KIM, G.; CHOI, W.; LEE, C-H.; LEE, K. Enhancement of dissolved inorganic carbon and carbon fixation by green alga *Scenedesmus* sp. in the presence of alkanolamine CO₂ absorbents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 18- 23, 2013.

KLOK, A. J.; MARTENS, D. E.; WIJFFELS, R. H.; LAMERS, P. P. Simultaneous growth and neutral lipid accumulation in microalgae. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 233-243, 2013.

KUMAR, K.; DASGUPTA, C. N.; NAYAK, B.; LINDBLAD, P.; DAS, D. Development of suitable photobioreactors for CO₂ sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4945-4953, 2011.

LAKANIEMI, A-M.; HULATT, C. J.; THOMAS, D. N.; TUOVINEN, O. H.; PUHAKKA, J. A. Biogenic hydrogen and methane production from *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, nº 34, p. 1-12, 2011.

LAM, M. K.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Current status and challenges on microalgae-based carbon capture. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 10, p. 456-469, 2012.

LARKUM, A. W. D.; ROSS, I. L.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 30, No. 4, p. 198-205, 2012.

LEE, Y-K.; SHEN, H. Basic Culturing Techniques. In: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**, Blackwell Science, 566 p., 2004. Cap. 3, p. 40-56.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-276, 1951.

MACINTYRE, H. L.; KANA, T. M.; ANNING, T.; GEIDER, R. J. Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. **Journal of Phycology**, v. 38, p. 17-38, 2002.

MASOJÍDEK, J.; KOBLÍZEK, M.; TORZILLO, G. Photosynthesis in Microalgae. In: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**, Blackwell Science, 566 p., 2004. Cap. 2, p. 20-39.

MATTISSON, T.; LYNGBELT, A.; CHO, P. The use of iron oxide as an oxygen carrier in chemical-looping combustion of methane with inherent separation of CO₂. **Fuel**, v. 80, p. 1953-1962, 2001.

MELDON, J. H.; MORALES-CABRERA, M. A. Analysis of carbon dioxide absorption in and stripping from aqueous monoethanolamine. **Chemical Engineering Journal**, v. 171, p. 753-759, 2011.

MORAIS, M. G. **Fixação de dióxido de carbono e produção de ácidos graxos por microalgas**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2006.

MORAIS, M. G. **Bioengenharia microalgal na utilização de gás de combustão e extração de biopolímeros para desenvolvimento de nanofibras**, 2008. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.63, p. 144-150, 2008.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, v.129, p. 439-445, 2007a.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. **Energy Conversion and Management**, v. 48, p. 2169-2173, 2007b.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 1349–1352, 2007c.

MORAIS, M. G., COSTA, J.A.V. Bioprocessos para remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por microalgas visando a utilização de gases gerados durante a combustão do carvão. **Química nova**, v. 31, nº 5, p. 1038-1042, 2008a.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 1245-1251, 2008b.

MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R.; TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, p. 60–64, 2009.

MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Biofixation of CO₂ from Synthetic Combustion Gas Using Cultivated Microalgae in Three-Stage Serial Tubular Photobioreactors. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 66, p. 313-318, 2011.

MORAES, L. **Aumento da eficiência de biofixação de CO₂ por microalgas**. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

MOREIRA, J. B. **Engenharia de microalgas para concepção de uma biorrefinaria utilizando CO₂ como fonte de carbono**. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

MOHANTY, P.; SRIVASTAVA, M.; KRISHNA, K. B. The Photosynthetic Apparatus of *Spirulina*: Electron Transport and Energy Transfer. In: VONSHAK, A. ***Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology***. London: Taylor & Francis, 1997, Cap. 2, p. 17-42.

NELSON, D.L.; COX, M. M. **Lehninger - Princípios de Bioquímica**. 5^a ed, Artmed, 2010.

OLAJIRE, A. A. CO₂ capture and sequestration technologies for end-of-pipe applications. **Energy**, v. 35, p. 2610-2628, 2010.

OLGUÍN, E. J. Dual purpose microalgae–bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1031-1046, 2012.

ONWUDILI, J. A.; LEA-LANGTON, A. R.; ROSS, A. B.; WILLIAMS, P. T. Catalytic hydrothermal gasification of algae for hydrogen production: composition of reaction products and potential for nutrient recycling. **Bioresource Technology**, v. 127, p. 72-80, 2013.

PENG, Y.; ZHAO, B.; LI, L. Advance in post-combustion CO₂ capture with alkaline solution: a brief review. **Energy Procedia**, v. 14, p. 1515-1522, 2012.

PIRES, J. C. M.; MARTINS, F. G.; ALVIM-FERRAZ, M. C. M.; SIMÕES, M. Recent developments on carbon capture and storage: An overview. **Chemical Engineering Research and Design**, v.89, p. 1446–1460, 2011.

PULZ O, GROSS W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 65, p. 635-648, 2004.

RADMANN, E. M. **Cultivo de microalgas com gases de combustão formados da geração termelétrica**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2007.

RADMANN, E. M; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Química Nova**, v. 31, nº 7, p. 1609-1612, 2008.

RADMANN, E. M.; REINEHR, C.O.; COSTA, J.A.V. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. **Aquaculture**, v.265, p. 118-126, 2007.

RADMANN, E. M.; CAMERINI, F. V.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. Isolation and application of SOX and NOX resistant microalgae in Biofixation of CO₂ from thermoelectricity plants. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 3132-3136, 2011.

RAMOS-SUÁREZ, J. L.; CARRERAS, N. Use of microalgae residues for biogas production. **Chemical Engineering Journal**, v. 242, p. 86–95, 2014.

REICHERT, C. C.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, No. 01, p. 23-28, 2006

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**, Blackwell Science, 566 p., 2004.

RIPPKA, R. DERULLES, J.; WATERBURT, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1–61, 1979.

ROSA, A. P. C.; CARVALHO, L. F.; GOLDBECK, L.; COSTA, J. A. V. Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 3071-3073, 2011.

RUFFORD, T. E.; SMART, S.; WATSON, G. C. Y.; GRAHAM, B. F.; BOXALL, J.; COSTA, J. C. D.; MAYA, E. F. The removal of CO₂ and N₂ from natural gas: A review of conventional and emerging process technologies. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 94-95, p. 123–154, 2012.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U., AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. v.2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

SKJÅNES, K.; LINDBLAD, P.; MULLER, J. BioCO₂ – a multidisciplinary, biological approach using solar energy to capture CO₂ while producing H₂ and high value products. **Biomolecular Engineering**, v. 24, p. 405-413, 2007.

SOUNDARAPANDIAN, P.; VASANTHI, B. Effect of chemical parameters on *Spirulina platensis* biomass production: optimized method for phycocyanin extraction. **International Journal of Zoological Research**, v. 4, nº 1, p. 1-11, 2008.

STEPHENS, E.; NYS, R.; ROSS, I. L.; HANKAMER, B. Algae fuels as an alternative to petroleum. **Journal Petroleum Environmental Biotechnology**, v. 4, p. 1-7, 2013.

STEPHENS, E.; ROSS, I. L.; MUSSGUG, J. H.; WAGNER, L. D.; BOROWITZKA, M. A.; POSTEN, C.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Future prospects of microalgal biofuel production systems. **Trends in Plant Science**, v. 15, n° 10, p. 554-564, 2010.

SUBHADRA, B.G. Water management policies for the algal biofuel sector in the Southwestern United States. **Applied Energy**, v. 88, p. 3492–3498, 2011.

SUDHIR, P-R.; POGORYELOV, D.; KOVÁCS, L.; GARAB, G.; MURTHY, S. D. S. The Effects of Salt Stress on Photosynthetic Electron Transport and Thylakoid Membrane Proteins in the Cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, No. 4, p. 481-485, 2005.

TANZI, C D.; VIAN, M. A.; CHEMAT, F. New procedure for extraction of algal lipids from wet biomass: A green clean and scalable process. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 271–275, 2013.

TORZILLO, G.; PUSHPARAJ, B.; MASOJIDEK, J.; VONSHAK, A. Biological constraints in algal biotechnology. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 8, p. 338-348, 2003.

THIRUVENKATACHARI, R.; SU, S.; AN, H.; YU, X. X. Post combustion CO₂ capture by carbon fibre monolithic adsorbents. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 35, p. 438–55, 2009.

TOMASELLI, L. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*). In: VONSHAK, A. ***Spirulina platensis* (*Arthrospira*) Physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997. Cap. 1, p. 2-16.

United Nations Framework Convention on Climate Change (UNFCCC). Global Warming potentials. Disponível em http://unfccc.int/ghg_data/items/3825.php, acessado em 11 de outubro de 2012.

VAZ B. S. **Cultivo de microalgas com efluentes gasosos e resíduos sólidos de origem termelétrica**. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

VIOLA, F. M.; PAIVA, S. L. D.; SAVI, M. A. Analysis of the global warming dynamics from temperature time series. **Ecological Modelling**, v. 221, p.1964-1978, 2010.

VONSHAK, A. *Spirulina*: Growth, Physiology and Biochemistry. In: VONSHAK, A. ***Spirulina platensis* (*Arthrospira*) Physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997. Cap. 3 , p. 43-66.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'unecyanophycée. Influence de diversfacteurs physiques et chimiquessur la croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* Geitler**. Ph.D. Thesis, University of Paris, 1966.

ZENG, X.; DANQUAH, M. K.; ZHANG, S.; ZHANG, X.; WU, M.; CHEN, X. D.; NG, I-S. JING, K.; LU, Y. Autotrophic cultivation of *Spirulina platensis* for CO₂ fixation and phycocyanin production. **Chemical Engineering Journal**, v. 183, p. 192-197, 2012.

ZHANG, X. P.; CHENG, X. M. Energy consumption, carbon emission and economic growth in China. **Ecological Economics**, v. 68, p. 2706-2712, 2009.

APÊNDICE

Tabela AP1 – Coeficientes de determinação (R^2) dos modelos de primeira ordem ajustado a cada réplica dos ciclos de crescimentos linearizados dos cultivos semicontínuos de *Spirulina* sp. LEB 18

Ensaio	Ciclo de crescimento	*n	R_1^2	R_2^2	$R_{\text{médio}}^2$	**d.p.
Com MEA	1	5	0,9854	0,9927	0,989	0,005
	2	4	0,9889	0,9998	0,994	0,008
	3	3	0,9985	0,9849	0,992	0,010
	4	4	0,9807	0,9637	0,972	0,012
	5	4	0,9548	0,9631	0,959	0,006
	6	4	0,9707	0,9660	0,968	0,003
	7	4	0,9473	0,9376	0,942	0,007
	8	3	0,9807	0,9097	0,945	0,050
Controle	1	5	0,9946	0,9966	0,996	0,001
	2	4	0,9988	0,9985	0,999	0,000
	3	4	0,9899	0,9840	0,987	0,004
	4	4	0,9898	0,9759	0,983	0,010
	5	4	0,9613	0,9975	0,979	0,026

*número de pontos utilizado em cada intervalo; **desvio padrão amostral

Figura AP1 - Ensaios com a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 na presença dos absorventes de CO₂ MEA (a) e NaOH (b) com os fotobiorreatores tipo *Erlenmeyer*

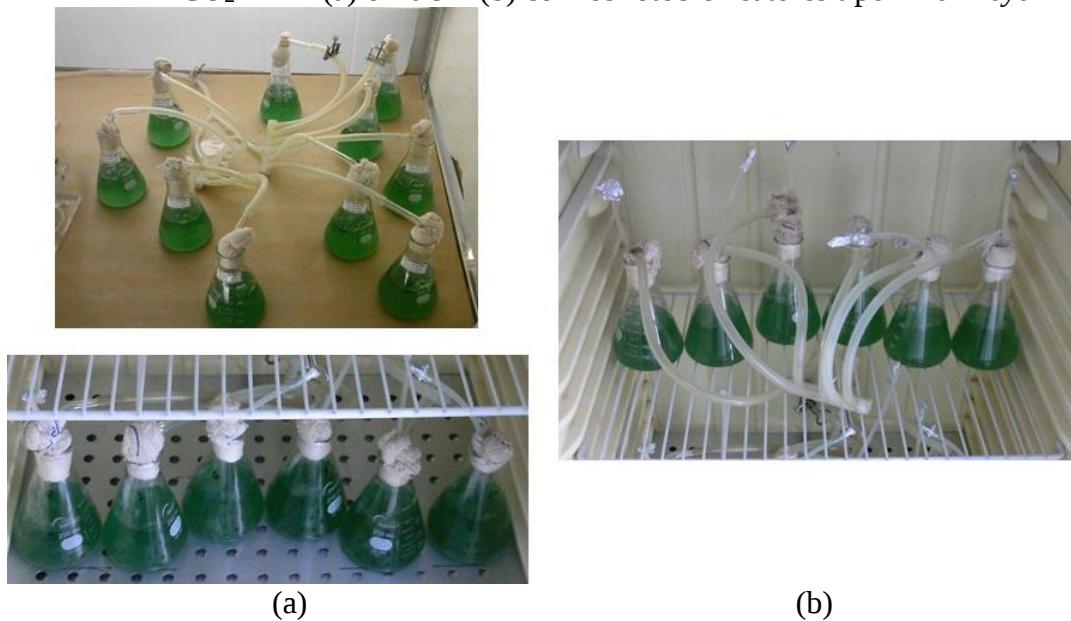


Figura AP2 - Ensaios com a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 na presença dos absorventes de CO₂ MEA (a) e NaOH (b) com os fotobiorreatores tubulares verticais

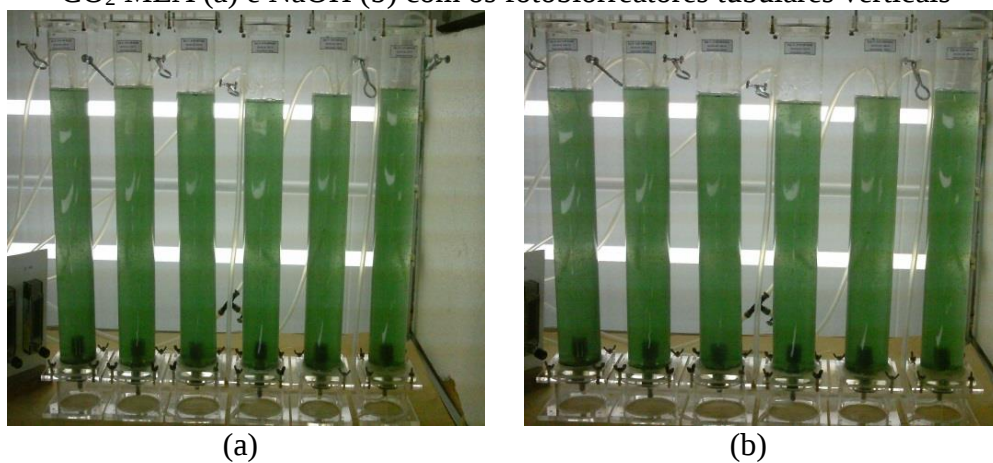


Figura AP3 - Duplicata de ensaios com e sem adição de monoetanolamina realizados com a microalga *Spirulina* sp. LEB 18, em modo semicontínuo e reciclo de meio



Figura AP4 - Condição final dos ensaios com e sem adição de monoetanolamina realizados com a microalga *Spirulina* sp. LEB 18, em modo semicontínuo e reciclo de meio

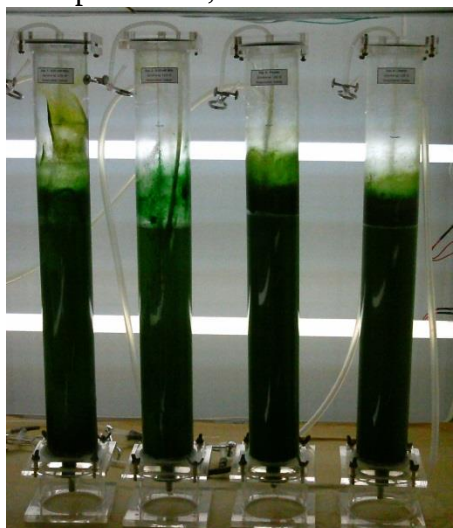
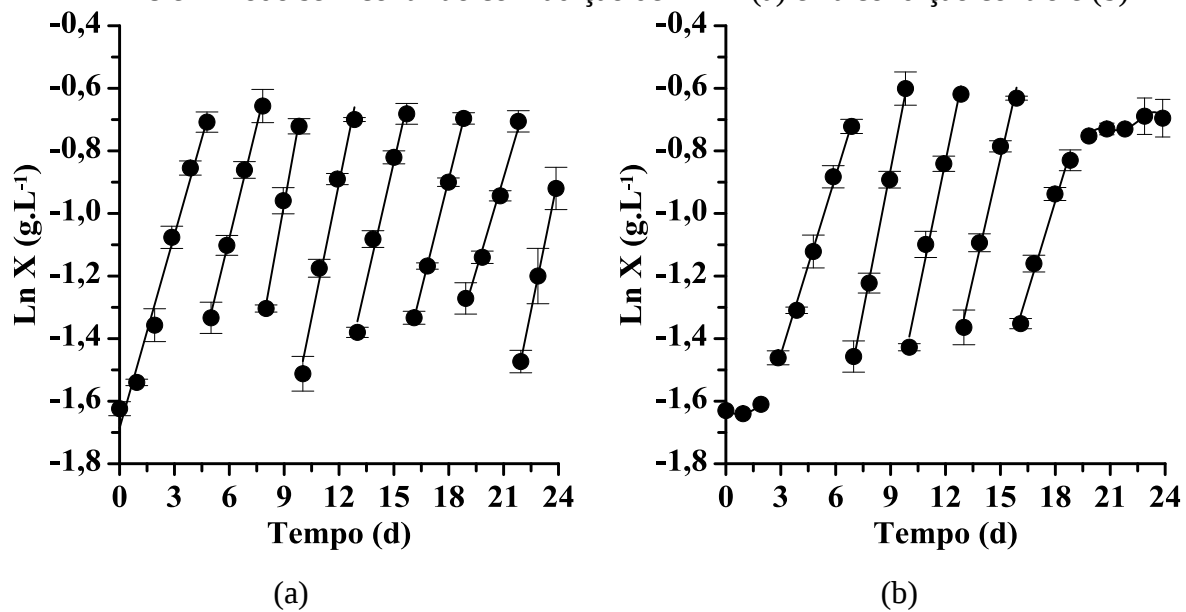


Figura AP5 - Perfis médios de concentração celular linearizados obtidos com *Spirulina* sp. LEB 18 em modo semicontínuo com adição de MEA (a) e na condição controle (b)



* $\ln(0,25) = -1,39$; $\ln(0,50) = -0,69$

ANEXO

Tabela A1 - Concentração dos compostos químicos do meio de cultura Zarrouk

Número	Nomenclatura	Fórmula química	Concentração
1	Bicarbonato de sódio	NaHCO_3	$16,8 \text{ g.L}^{-1}$
2	Fosfato de potássio dibásico	K_2HPO_4	$0,5 \text{ g.L}^{-1}$
3	Nitrato de sódio	NaNO_3	$2,5 \text{ g.L}^{-1}$
4	Sulfato de potássio	K_2SO_4	$1,0 \text{ g.L}^{-1}$
5	Cloreto de sódio	NaCl	$1,0 \text{ g.L}^{-1}$
6	Sulfato de magnésio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$0,2 \text{ g.L}^{-1}$
7	Cloreto de cálcio	CaCl_2	$0,04 \text{ g.L}^{-1}$
8	Sulfato ferroso heptahidratado	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$0,01 \text{ g.L}^{-1}$
9	EDTA dissódico	EDTA	$0,08 \text{ g.L}^{-1}$
A5	Solução de micronutrientes	*	$1,0 \text{ mL.L}^{-1}$
B6	Solução de metais	**	$1,0 \text{ mL.L}^{-1}$

Fonte: Zarrouk (1966)

*Solução A5 (g.L^{-1}): H_3BO_3 (2,86), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,81), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,222), NaMoO_4 (0,015), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,079). **Solução B6 (mg.L^{-1}): NH_4VO_3 (23,0), $\text{K}_2\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_4 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ (96,0), $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (48,0), $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (18,0), $\text{TiOSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (61,1), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (44,0).

Tabela A2 - Concentração dos compostos químicos do meio de cultura BG-11

Número	Nomenclatura	Fórmula Química	Concentração
1	Nitrato de sódio	NaNO_3	$1,5 \text{ g.L}^{-1}$
2	Fosfato de potássio dibásico trihidratado	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	$0,040 \text{ g.L}^{-1}$
3	Sulfato de magnésio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$0,075 \text{ g.L}^{-1}$
4	Cloreto de cálcio bihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$0,036 \text{ g.L}^{-1}$
5	Citrato férrico amoniacal	$\text{C}_6\text{H}_{11}\text{FeNO}_7$	$0,006 \text{ g.L}^{-1}$
6	EDTA dissódico	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$0,001 \text{ g.L}^{-1}$
7	Carbonato de sódio	Na_2CO_3	$0,020 \text{ g.L}^{-1}$
8	Ácido cítrico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	$0,006 \text{ g.L}^{-1}$
A5+Co	Solução traço+cobalto	*	1 mL.L^{-1}

Fonte: RIPPKA et al. (1979)

*Solução A5+Co (g.L^{-1}): H_3BO_3 (2,86), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,81), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,222), NaMoO_4 (0,015), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,079), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,0494).