

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

AUMENTO DA EFICIÊNCIA DE BIOFIXAÇÃO DE CO2 POR MICROALGAS

Luiza Moraes

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa Orientador

Prof^a Dr^a. Lucielen Oliveira dos Santos 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

AUMENTO DA EFICIÊNCIA DE BIOFIXAÇÃO DE CO2 POR MICROALGAS

Luiza Moraes

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

> Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa Orientador

Prof^a Dr^a. Lucielen Oliveira dos Santos Co-orientadora

Este trabalho é dedicado ao Gabriel Martins da Rosa e a minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao meu namorado Gabriel Martins da Rosa por todo o amor, carinho, paciência, companheirismo e colaboração na realização desta dissertação.

Aos meus pais Marcelino Moraes e Rose M. Benoit Moraes e minha irmã Laura Moraes pelo amor, carinho e dedicação para comigo.

Ao meu orientador Professor Jorge Alberto Vieira Costa, Pelos ensinamentos, confiança, incentivo e oportunidade de realizar este trabalho.

À minha co-orientadora Professora Lucielen Oliveira dos Santos, Pelas correções e contribuições com o trabalho, pela disponibilidade e incentivo.

Aos professores da banca Marco Di Luccio, Michele G. de Morais e Luiz A. Almeida Pinto, pelas contribuições para o enriquecimento deste trabalho.

À professora Eliana Badiale Furlong,

Pela paciência, atenção e disponibilidade nos ensinamentos com o método de extração de lipídios e como uso do cromatógrafo a gás.

À professora Mônica Wallner, pela disponibilidade na realização das análises de CHN.

À querida iniciante científica e amiga Bruna Barcelos Cardias pelo empenho, dedicação e ajuda na realização deste trabalho e também por ter aceitado uma missão quase impossível de trabalhar em duas dissertações simultaneamente.

À querida amiga Ana Cláudia de Freitas Margarites pela amizade, por sempre estar disposta em ajudar, pelas conversas, cafés, pelas palavras de incentivo, por ser minha parceira nas madrugadas de fermentações e extração de lipídios.

À querida amiga Thaisa Santos por ter me concedido a oportunidade de ser sua parceira na padronização das metodologias.

Aos amigos Ana Priscila Centeno da Rosa, Elisângela Radmann, Pâmela Guder Goularte, Vitor Badiale Furlong, Roberta Guimarães Martins, Joice Aline Borges, Michele A. Z. de Souza, Adriano Henrard, Lucia Riveiro Meza, Cristiane R. Lisboa, Bárbara C. B. de Freitas e Gustavo Porciuncula

Pela amizade, incentivo e por sempre tornarem o ambiente de trabalho muito agradável.

A toda equipe LEB que de alguma forma contribuíram para realização desta dissertação.

Aos funcionários Roque, Islanda, Anaí e Suzana por sempre estarem à disposição em me ajudar.

À CAPES,

pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal do Rio Grande, por disponibilizar ensino gratuito e de qualidade.

A vida não é um corredor reto e tranquilo que nós percorremos livres e sem empecilhos, mas um labirinto de passagens, pelas quais nós devemos procurar nosso caminho, perdidos e confusos, de vez em quando presos em um beco sem saída. Porém, se tivermos fé, uma porta sempre será aberta para nós, não talvez aquela sobre a qual nós mesmos nunca pensamos, mas aquela que definitivamente se revelará boa para nós.

RESUMO

O dióxido de carbono (CO₂) é considerado como um dos mais importantes gases de efeito estufa (GEE). As emissões de CO₂ provenientes de combustíveis fósseis, especialmente a partir da combustão de carvão mineral contribuem para o aquecimento global tornando-se uma questão importante nos campos da ciência, meio ambiente, economia e política nos últimos anos. Neste contexto, as microalgas podem capturar o CO2, contribuindo com a redução do efeito estufa e gerando biomassa com diversas aplicações. O objetivo deste trabalho foi promover o aumento da eficiência de biofixação de CO₂ por Spirulina sp. LEB 18. Para tal, o trabalho foi dividido em duas etapas, na primeira foi avaliado o desempenho de quatro configurações de difusores (pedra sinterizada, cortina porosa, madeira porosa e anel perfurado) e vazões específicas de alimentação da corrente gasosa (0,05 e 0,3 vvm) na transferência de CO₂ para o meio líquido, biofixação de CO₂ e na composição da biomassa produzida de Spirulina. Em uma segunda etapa, foi desenvolvido um sistema composto por membranas de fibra oca (MFO) para alimentação de CO₂ no cultivo de Spirulina sob dois modos de agitação. O sistema foi avaliado quanto à biofixação de CO₂, cinética de crescimento e composição da biomassa produzida. Este foi comparado a ensaios com pedra sinterizada (ensaio controle, CT). As máximas eficiência de transferência do CO₂ (E) (26,0 %) e produtividade de biomassa ($P_{máx}$) (125,9 ± 5,3 mg.L⁻¹.d⁻¹) foram observadas no ensaio com a menor vazão específica (0,05 vvm) e o difusor cortina porosa. Os maiores resultados de taxa de biofixação de CO₂ (T_{CO2máx}) e eficiência de utilização de CO₂ (E_{CO2máx}) foram observados na vazão de 0,05 vvm para difusores porosos (pedra sinterizada, cortina porosa e madeira porosa). A máxima concentração de proteínas (78,6 \pm 0,1 % m.m⁻¹) na biomassa foi verificada no ensaio com a madeira porosa e vazão de 0,05 vvm. Os teores de carboidratos e lipídios apresentaram incremento de 26 % e redução de 21 %, respectivamente, com aumento da vazão (0,3 vvm) no ensaio com a cortina porosa. O sistema de MFO com agitação por borbulhamento de ar na vazão de 0,05 vvm promoveu maior acúmulo de carbono inorgânico dissolvido (CID) no meio (127,4 ± 6,1 mg.L⁻¹) e também maiores resultados de $P_{máx}$ (131,8 ± 1,9 mg.L⁻¹.d⁻¹), $T_{CO2máx}$ (231,6 ± 2,1 mg.L⁻¹.d⁻¹) e $E_{CO2máx}$ (86,2 ± 0,8 % m.m⁻¹) quando comparados ao CT na mesma vazão. O ensaio CT na vazão de ar de 0,3 vvm apresentou maior concentração de lipídios $(11.9 \pm 0.6 \% \text{ m.m}^{-1})$. A aplicação de menor vazão de ar no ensaio com MFO proporcionou aumento de 58 % no teor de lipídios da biomassa de Spirulina. Com os resultados obtidos foi possível verificar que a aplicação de difusores porosos e sistema de MFO concomitantemente com a menor vazão no cultivo de Spirulina podem resultar em maiores produtividades de biomassa e taxas de biofixação de CO₂, contribuindo com redução de custos de processo para a produção de biomassa, bem como para a atenuação das emissões deste gás de efeito estufa para atmosfera.

Palavras-chave: difusores, dióxido de carbono, Spirulina, transferência de massa, vazão.

CO2 BIOFIXATION EFFICIENCY INCREASE BY MICROALGAE

ABSTRACT

Carbon dioxide (CO₂) is regarded as one of the most important greenhouse gases (GHG). CO₂ emissions from fossil fuels, especially from the combustion of coal contributes to global warming becoming a major political issue in the fields of science, environment, and economy in current years. In this context, microalgae can capture the CO₂, contributing to the reduction of greenhouse gases and generating biomass for various applications. The aim of this study was to promote CO₂ biofixation efficiency increase by Spirulina sp. LEB 18. To this end, the work was divided into two stage, the first performance was evaluated four settings diffusers (sintered stone, porous curtain, perforated ring and porous wood) and specific flow rates of feed gas stream (0.05 and 0.3 vvm) the CO₂ transfer to the liquid medium, CO₂ biofixation and the composition of the Spirulina produced biomass. In a second stage, a system composed of hollow fiber membranes (HFM) to CO₂ feed in the Spirulina cultivation under two modes of stirring was developed. The system was evaluated for CO₂ biofixation, growth kinetics and composition of the biomass produced. This was compared to assays with sintered stone (control assay, CA). The CO₂ transfer efficiency (E) (26.0 %) maximum and biomass productivity maximum (P_{max}) (125.9 ± 5.3 mg L⁻¹ d⁻¹) were observed in the assay with the lowest specific flow rate (0.05 vvm) and the porous diffuser curtain. The highest rate results CO_2 biofixation (T_{CO2máx}) and CO₂ use efficiency (E_{CO2máx}) were observed at a flow rate of 0.05 vvm for porous diffusers (sintered stone, porous curtain and porous wood). The maximum protein concentration (78.6 \pm 0.1% w $w^{\text{-1}}$) in biomass was observed in the assay with the porous wood and flow of 0.05 vvm. The carbohydrate and lipids showed an increase of 26 % and 21 % reduction, respectively, with flow rate increasing (0.3 vvm) on assay the porous curtain. The HFM system stirred by bubbling air at a flow rate of 0.05 vvm provided the concentration of dissolved inorganic carbon (DIC) in the medium $(127.4 \pm 6.1 \text{ mg L}^{-1})$ and also higher results P_{max} (131.8 ± 1.9 mg L⁻¹ d⁻¹), T_{CO2max} (231.6 ± 2.1 mg L⁻¹ d⁻¹) and E_{CO2max} $(86.2 \pm 0.8 \% \text{ w s}^{-1})$ compared to CA in the same flow. The CA the air flow rate of 0.3 vvm showed higher lipid content (11.9 \pm 0.6 % w w⁻¹). The application of lower air flow in the assay with HFM provided 58% increase in lipid content of the Spirulina biomass. It was possible with the obtained results to check that application of porous diffusers and HFM system concurrently with the lowest flow in the Spirulina cultivation may result in highest biomass productivity and CO_2 biofixation rates, contributing to cost reduction process for producing biomass, as well as to mitigate emissions of this greenhouse gas to the atmosphere.

Keywords: carbon dioxide, diffusers, flow rate, mass transference, Spirulina.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 - Concentração de proteínas, carboidratos e lipídios para diferentes cepas d
microalgas3
Tabela 2 – Diferentes aplicações da biomassa de microalgas 3
Tabela 3 - Comparação entre estudos com microalgas em relação à concentração de CO
período de injeção, vazão específica de alimentação e a taxa máxima de biofixação de CO_2 . 3
Tabela 4 – Descrição genérica da transferência de massa em biorreatores4
Tabela 5 – Comparação entre sistemas de cultivo abertos e fechados

CAPÍTULO III

ARTIGO I - AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE DIFERENTES DE DIFUSORES PARA ALIMENTAÇÃO DE CO₂ NO CULTIVO DE Spirulina

$\label{eq:tabela1} \textbf{Tabela1} - \textbf{M}\acute{e}dia \pm desvio \ padrão \ da \ concentração \ celular \ máxima \ (X_{máx}) \ e \ de \ produtividade$
volumétrica máxima (P _{máx}) para os cultivos <i>Spirulina</i> sp. LEB 1871
Tabela 2 – Média \pm desvio padrão da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) e
tempo de geração (tg) para os cultivos de Spirulina sp. LEB 1873
Tabela 3 - Média ± desvio padrão das concentrações de carbono (C), nitrogênio (N) e
hidrogênio (H) presentes na biomassa de Spirulina sp. LEB 1874
Tabela 4 - Média \pm desvio padrão das T _{CO2máx} e E _{CO2máx} por Spirulina sp. LEB 18
Tabela 5 - Média \pm desvio padrão das concentrações de proteínas e carboidratos em base seca
da biomassa de <i>Spirulina</i> sp. LEB 1877
Tabela 6 - Média ± desvio padrão das concentrações de cinzas e lipídios em base seca da
biomassa de Spirulina sp. LEB 1880

ARTIGO II - DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE MEMBRANAS DE FIBRA OCA PARA O AUMENTO DA BIOFIXAÇÃO DE CO_2 POR MICROALGA

Tabela 1 – Especificações das membranas de fibra oca de microfiltração91
Tabela 2 - Média ± desvio padrão dos parâmetros de crescimento para os cultivos de
Spirulina sp. LEB 18 obtidos nos ensaios com membranas de fibra oca (MFO) e ensaios
controle (CT)102
Tabela 3 - Média ± desvio padrão das concentrações de carbono (C) na biomassa, taxa de
biofixação de CO ₂ e eficiência de utilização de CO ₂ por Spirulina sp. LEB 18 nos ensaios
com membrana de fibra oca (MFO) e ensaio controle (CT)103
Tabela 4 - Média ± desvio padrão das concentrações de proteínas, carboidratos, lipídios e
cinzas em base seca da biomassa de Spirulina sp. LEB 18106

ANEXO

Tabela A1 - Concentração dos compostos químicos do meio de cultura Zarrouk......130

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Emissões antrópicas anuais totais de gases de efeito estufa (GtCO2eq.a⁻¹) por um grupo de gases entre 1970 - 2010: CO₂ proveniente da queima de combustíveis fósseis (CF) e processos industriais (PI); CO₂ proveniente de florestas e outras utilizações da terra (FOTU); metano (CH₄); óxido nitroso (N₂O); gases fluorados cobertos pelo Protocolo de Kyoto (F-Figura 2 - Representação esquemática da conversão fotossintética por microalgas e suas Figura 4 - Resistências à transferência de massa da fase gasosa ao sítio de reação no interior Figura 5 – Fotobiorreator tubular vertical com difusor tipo pedra sinterizada (a) biorreator mecanicamente agitado com difusor anel perfurado (b) biorreator mecanicamente agitado com contactor de membranas de fibra oca (c) Fotobiorreator tipo placa plana com tubulação perfurada......46 Figura 6 – Diagrama esquemático do sistema de membranas de fibra oca acopladas ao Figura 8 – Configurações de biorreatores empregados no cultivo de microalgas: (a) Raceway (Seambiotic), (b) biorreator de fluxo de ar, (c) coluna de bolhas e (d) tubular horizontal......51

CAPÍTULO III

ARTIGO I - AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE DIFERENTES DE DIFUSORES PARA ALIMENTAÇÃO DE CO₂ NO CULTIVO DE Spirulina

Figura 1 - Micrografia da microalga Spirulina sp. LEB 18 (aumento de 400X)58

Figura 2 – Diagrama esquemático dos cultivos realizados em fotobiorreatores tubulares verticais com as configurações de difusores utilizados no trabalho: (1) cilindro de CO₂ comercial (23 kg e 99,0 % de pureza mínima), (2) válvula do cilindro, (3) manômetro e medidor de vazão, (4) válvula solenoide, (5) compressor de ar, (6) rotâmetros, (7) fotobiorreatores tubulares verticais de 2 L, (8) amostrador, (9) difusor pedra sinterizada, (10) Figura 3 – Configurações de difusores utilizados no trabalho: (a) pedra sinterizada, (b) cortina porosa, (c) anel perfurado e (d) madeira porosa60 Figura 4 – Coeficiente volumétrico de transferência de massa do CO_2 (k₁a_{CO2}) (a) e perfil eficiência de transferência física do CO_2 (ϵ) para o meio líquido (b) para as vazões específicas de alimentação da corrente gasosa nas diferentes configurações de difusores, pedra sinterizada Figura 5 – Perfis de crescimento celular para as vazões específicas de alimentação da corrente gasosa de 0,05 vvm (a) e 0,3 vvm (b) para as diferentes configurações de difusores, pedra Figura 6 - Perfis da concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID) para as vazões de 0.05 vvm (a) e 0.3 vvm (b) para as diferentes configurações de difusores da corrente gasosa, pedra sinterizada (●), cortina porosa (○), anel perfurado (■) e madeira porosa (□)......68 Figura 7 – Perfis de pH para as vazões específicas de 0,05 vvm (a) e 0,3 vvm (b) para as diferentes configurações de difusores da corrente gasosa, pedra sinterizada (•), cortina porosa69 (○), anel perfurado (■) e madeira porosa (□)......69

ARTIGO II - DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE MEMBRANAS DE FIBRA OCA PARA O AUMENTO DA BIOFIXAÇÃO DE CO₂ POR MICROALGA

Figura 4 - Perfis de crescimento celular (a) e produtividade volumétrica de biomassa (b) dos
ensaios: membranas de fibra oca (MFO) nas vazões de ar de 0,05 (\circ) e 0,3 vvm (Δ); controle
(CT) nas vazões de ar de 0,05 (•) e 0,3 vvm (\blacktriangle); agitação mecânica com injeção de CO ₂
pelas MFO (•)
Figura 5 – Experimentos com agitação mecânica e injeção de CO ₂ por MFO (a); membranas
de fibra oca (MFO) e controle (CT) 0,05 vvm (b) e incrustações nas MFO no ensaio com
agitação mecânica (c)99
Figura 6 - Perfis de pH e acúmulo de carbono inorgânico dissolvido (CID) no meio dos
ensaios: membranas de fibra oca nas vazões de ar de 0,05 vvm (\circ) e 0,3 vvm (Δ); controle nas
vazões de ar de 0,05 vvm (\bullet) e 0,3 vvm (\blacktriangle) e agitação mecânica com injeção de CO ₂ por
membranas de fibra oca (•)101
Figura 7 – Perfis de E_{CO2} dos ensaios: MFO nas vazões específicas de ar de 0,05 (\circ) e 0,3
vvm (Δ) e CT nas vazões específicas de ar de 0,05 (\bullet) e 0,3 vvm (\blacktriangle)

APÊNDICE

NOMENCLATURA

ANOVA	Análise de variância
$\% \text{ m.m}^{-1}$	Concentração percentual em massa
% v.v ⁻¹	Concentração percentual em volume
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
С	Carbono elementar (percentual em massa)
C_{CO2}^{SAT}	Concentração de saturação para o dióxido de carbono no meio
líquido (g.L ⁻¹)	
CF	Dióxido de carbono proveniente da queima de combustíveis
fósseis	
CGTEE	Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica
$C_{6}H_{12}O_{6}$	Glicose
CH ₄	Metano
CID	Carbono inorgânico dissolvido (g.L ⁻¹)
ССМ	Mecanismo de concentração de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
CO _{2(g)}	Dióxido de carbono gás
CO _{2(aq)}	Dióxido de carbono gás dissolvido no meio líquido
CO ₃ ²⁻	Íon carbonato
СТ	Ensaio controle
d _{orifício}	Diâmetro do orifício
D _{CO2}	Difusividades do dióxido de carbono em água (fase líquida)
$(m^2.s^{-1})$	
D _{O2}	Difusividades do oxigênio em água (fase líquida) (m ² .s ⁻¹)
E _{CO2}	Eficiência de utilização de dióxido de carbono (percentual em
massa)	
E _{CO2máx}	Eficiência máxima de utilização de dióxido de carbono
(percentual em massa)	
Eletrobrás	Centrais Elétricas Brasileiras S.A.
3	Eficiência de transferência física do dióxido de carbono para o
meio líquido (percentual)	
FBRT _V	Fotobiorreator tubular vertical

F-Gases	Gases fluorados cobertos pelo Protocolo de Kyoto							
FOTU	Dióxido de carbono proveniente de florestas e outras utilizações							
da terra								
GEE	Gás de efeito estufa							
Н	Hidrogênio elementar (percentual em massa)							
H ₂ O	Água							
HCO ₃	Íon bicarbonato							
H_2CO_3	Ácido carbônico							
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change (Painel							
intergovernamental sobre as	mudanças climáticas)							
k _L a _{CO2}	Coeficiente volumétrico de transferência de massa do dióxido de							
carbono (h ⁻¹)								
k _L a _{O2}	Coeficiente volumétrico de transferência de massa do oxigênio							
(h^{-1})								
LEB	Laboratório de Engenharia Bioquímica							
LED	Diodo emissor de luz							
ln	Logaritmo natural							
M _C	Massa molar de carbono (g.mol ⁻¹)							
M _{CO2}	Massa molar de dióxido de carbono (g.mol ⁻¹)							
ḿ _{CO2}	Taxa mássica de alimentação diária com CO ₂ (mg.d ⁻¹)							
MFO	Ensaio com sistema de membranas de fibra oca							
Ν	Nitrogênio elementar (percentual em massa)							
N _{2(g)}	Nitrogênio gás							
NADP	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina							
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio							
Na ₂ CO ₂	Carbonato de sódio							
NO	Monóxido de nitrogênio							
NO _X	Óxido de nitrogênio							
NO ₂	Óxido nítrico							
N_2O	Óxido nitroso							
O ₂	Oxigênio							
OD	Oxigênio dissolvido							
р	Nível de significância							

ppm	Partes por milhão
рН	Potencial hidrogênio iônico (mol.L ⁻¹)
PI	Processos industriais
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)
Q	Vazão de injeção da corrente gasosa (L.h ⁻¹)
\mathbf{R}^2	Coeficiente de determinação
SO _X	Óxido de enxofre
SO_2	Dióxido de enxofre
t	Tempo (d)
t ₀	Tempo inicial (d)
T _{CO2}	Taxa de biofixação de dióxido de carbono (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)
T _{CO2máx}	Máximo valor da taxa de biofixação de dióxido de carbono
$(mg.L^{-1}.d^{-1})$	
t _g	Tempo de geração ou tempo de duplicação celular (d)
UTPM	Usina Termelétrica Presidente Médici
V _{útil}	Volume útil do fotobiorreator (L)
vvm	volume da corrente gasosa por volume de meio por minuto
Х	Concentração celular (g.L ⁻¹)
X _{máx}	Máxima concentração celular (g.L ⁻¹)
X_0	Concentração celular inicial (g.L ⁻¹)
X _t	Concentração celular no tempo t (g.L ⁻¹)
X _{cbm}	Fração mássica de carbono elementar determinado na biomassa
Y _{CO2}	Fração mássica de dióxido de carbono na corrente gasosa
$\mu_{máx}$	Velocidade específica máxima de crescimento (d ⁻¹)
μ	Velocidade específica de crescimento (d ⁻¹)

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	22
1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 Geral	25
2.2 Específicos	25
3 JUSTIFICATIVA	26
3.1 Histórico do Laboratório	27
CAPÍTULO II	29
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
4.1 Emissões de Gases de Efeito Estufa e o Aquecimento global	
4.2 Microalgas e suas aplicações	31
4.3 Biofixação de CO ₂ por microalgas	35
4.3.1 Conversão do CO2 em biomassa por microalgas via processo fotossintético	
4.4 Fatores que influenciam a biofixação de CO ₂ por microalgas	
4.4.1 Fonte de carbono e o pH	40
4.4.2 Temperatura e Luminosidade	41
4.4.3 Transferência de gases no cultivo de microalgas	42
4.4.3.1 Transferência de CO ₂ em cultivos microalgais	42
4.4.4 Difusores empregados no cultivo de microalgas	45
4.4.5 Biorreatores	49
CAPÍTULO III	
5 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	53
ARTIGO I - AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE DIFERENTES DE D	IFUSORES
PARA ALIMENTAÇÃO DE CO ₂ NO CULTIVO DE Spirulina.	54
1 INTRODUÇÃO	57
2 MATERIAL E MÉTODOS	58
2.1 Micro-organismo e meio de cultivo	58
2.2 Adaptação do inóculo	58
2.3 Condições experimentais	59
2.4 Determinações analíticas	60
2.4.1 Concentração celular	60

2.4.2 Alcalinidade total, pH e concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID)	. 60
2.4.3 Coeficiente volumétrico de transferência de massa (k _L a)	. 60
2.5 Recuperação da biomassa	. 61
2.6 Análise elementar e proximal da biomassa	. 61
2.7 Eficiência de transferência física de CO ₂	. 62
2.8 Avaliação dos parâmetros de crescimento	. 62
2.9 Taxa de biofixação de CO ₂	. 63
2.10 Eficiência de utilização do CO ₂	. 63
2.11 Análise estatística	. 64
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	. 65
3.1 Transferência de CO ₂ para o sistema	. 65
3.2 Perfis de crescimento celular, carbono inorgânico dissolvido e pH	. 66
3.3 Composição elementar, taxa de biofixação de CO ₂ e eficiência de utilização de CO ₂	. 74
3.4 Composição proximal da biomassa	. 77
4. CONCLUSÃO	. 81
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	. 82
ARTIGO II – DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE MEMBRANAS DE FIBRA O	CA
PARA O AUMENTO DA BIOFIXAÇÃO DE CO2 POR MICROALGA	87
1 INTRODUÇÃO	. 90
2 MATERIAL E MÉTODOS	. 91
2.1 Micro-organismo, meio de cultivo e manutenção do inóculo	. 91
2.2 Características das Membranas de Fibra Oca	. 91
2.3 Desenvolvimento do sistema com membranas de fibra oca para injeção do CO2	. 92
2.4 Condições experimentais	. 93
2.4.1 Ensaios com as membranas de fibra oca (MFO) e a agitação por borbulhamento de ar	93
2.4.2 Ensaio controle (CT)	. 93
2.4.3 Ensaios com membranas de fibra oca (MFO) e agitação mecânica	. 93
2.4.4 Diagrama esquemático dos ensaios	. 94
2.5 Determinações analíticas	. 94
2.5.1 Concentração celular	. 94
2.5.2 pH e a concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID)	. 95
2.6 Recuperação da biomassa do meio líquido	. 95
2.7 Análise elementar da biomassa	. 95
2.8 Análise proximal da biomassa	. 95

2.8.1 Quantificação de proteínas	95
2.8.2 Quantificação de lipídios	95
2.8.3 Quantificação de carboidratos	96
2.8.4 Quantificação de umidade e cinzas	96
2.9 Avaliação dos parâmetros de crescimento	96
2.10 Taxa de biofixação de CO ₂	96
2.11 Eficiência de utilização do CO ₂	97
2.12 Análise estatística	97
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
3.1 Perfil de crescimento e produtividade de biomassa de Spirulina sp. LEB 18	
3.2 Perfis de pH e de acúmulo de carbono inorgânico dissolvido (CID) no meio	de cultivo 100
3.3 Cinética de crescimento da microalga Spirulina sp. LEB 18	101
3.4 Biofixação de CO ₂ por Spirulina sp. LEB 18	103
3.5 Composição proximal da biomassa	105
4. CONCLUSÃO	107
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
CAPÍTULO IV	111
6 CONCLUSÃO GERAL	112
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	113
CAPÍTULO V	114
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
APÊNDICE	126
ANEXO	

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

O aquecimento global, induzido pela alta concentração de gases do efeito estufa na atmosfera, tem sido tema de grande preocupação mundial. A utilização contínua de combustíveis fósseis (petróleo, gás natural e carvão) e a sua combustão tem sido fonte de emissão de gases de efeito estufa (GEE), tais como o dióxido de carbono (CO₂), óxidos de nitrogênio (NO_X), metano (CH₄), dióxido de enxofre (SO₂) e compostos orgânicos voláteis (CAROLINO, 2011; VERMA et al., 2010). As emissões de CO₂ dos processos de combustão e industriais contribuíram com cerca de 78 % das emissões totais dos GEE entre 1970 e 2010, sendo esta contribuição semelhante ao espero para o período de 2000 a 2100 (IPCC, 2014).

Com o aumento do desmatamento das florestas, o meio ambiente apresentou limitação na capacidade em absorver a carga extra de CO_2 liberada para a atmosfera (TOLEDO-CERVANTES et al., 2013). Consequentemente, ocorreram graves alterações climáticas e efeitos nocivos à saúde humana que tornaram necessário a captura e armazenamento do carbono emitido na atmosfera pelos sistemas globais de energia (CAROLINO, 2011).

Durante as duas últimas décadas, várias estratégias de mitigação de CO_2 que foram investigadas por pesquisas tinham incluídas abordagens em relação a reações químicas, processos biológicos, o emprego de fontes de energia renováveis e injeção direta do CO_2 em grandes profundidades, como oceanos e formações geológicas (SINGH; AHLUWALIA, 2012; ZHENG et al., 2011).

No período contemporâneo, diversos estudos sugerem o emprego de microalgas como uma estratégia sustentável para a redução do excesso de CO_2 presente na atmosfera. Isto devido a suas elevadas taxas de crescimento, o que lhes conferem capacidade de fixar CO_2 em relação às plantas terrestres (LI et al., 2008; ZHENG et al., 2011).

Além de contribuírem com a redução do efeito estufa, a biofixação de CO_2 por microalgas é acompanhada pela produção de biomassa. Esta biomassa pode apresentar aplicabilidade na produção de biocombustíveis (BRENNAN; OWENDE, 2009; COSTA; MORAIS, 2011), produção de biopolímeros (MORAIS, 2008d), cosméticos (LOURENÇO, 2006) e produtos para alimentação humana (CARVALHO, 2010) e animal (SPOLAORE et al. 2006). Assim, o emprego de microalgas pode agregar benefícios adicionais ao processo de biofixação de CO_2 (COSTA; MORAIS, 2011).

Diversos parâmetros físico-químicos, hidrodinâmicos e biológicos podem afetar o desempenho do processo de biofixação de CO₂ por microalgas. Estes incluem espécie do

micro-organismo, temperatura, composição do meio, pH, intensidade luminosa, vazão de alimentação da corrente gasosa, concentração de CO_2 , transferência de massa do CO_2 para o meio líquido (HO et al., 2011; ZHAO; SU, 2014) e configuração do fotobiorreator (KUMAR et al., 2011).

A transferência do $CO_{2(g)}$ para o meio líquido em cultivos microalgais é uma das principais limitações encontradas (OSWALD, 1988; TAPIE; BERNARD, 1988) quando se utilizam gases de combustão ou CO₂ proveniente de outras fontes. A configuração de difusores, a vazão de alimentação da corrente gasosa (TALBOT; LENCKI; LA NOUIE, 1990) e a profundidade do biorreator (CAMERINI, 2008) estão entre os principais fatores que podem influenciar o coeficiente de transferência de massa do CO₂ e a eficiência de biofixação de CO₂ no cultivo de microalgas.

A aplicação de difusores de mistura gasosa, como por exemplo, membranas de fibra oca e materiais porosos (CHAI; ZHAO, 2012; TALBOT; LENCKI; LA NOUIE, 1990) combinados com diferentes vazões de alimentação da corrente gasosa podem promover o aumento das taxas de transferência para o meio de cultivo e eficiência de biofixação de CO₂ pelas microalgas.

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo promover o aumento da eficiência de biofixação de CO₂ por *Spirulina* sp. LEB 18 utilizando diferentes configurações de difusores e vazões específicas de alimentação da corrente gasosa.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Este trabalho teve por objetivo promover o aumento da eficiência de biofixação de CO₂ por *Spirulina* sp. LEB 18 utilizando diferentes configurações de difusores e vazões específicas de alimentação da corrente gasosa.

2.2 Específicos

Especificamente os objetivos podem ser assim delineados:

 Avaliação das variáveis de processo, configurações de difusores e vazões específicas de alimentação da corrente gasosa na transferência de CO₂ para o meio líquido (sistema CO₂-H₂O);

 Estudo da bioconversão do CO₂ fixado pela microalga *Spirulina* sp. por meio da cinética de crescimento, caracterização da biomassa produzida e eficiência de biofixação de CO₂ quando cultivada com diferentes configurações de difusores e vazões específicas da corrente gasosa;

• Desenvolvimento de sistema composto por membranas de fibra oca de poli(éter imida) para a alimentação de CO₂ ao cultivo de *Spirulina* sp.;

 Estudo da agitação empregada nos cultivos de *Spirulina* sp. utilizando sistema de membranas de fibra oca para a alimentação de CO₂;

 Avaliação do desempenho do sistema de membranas de fibra oca por meio da eficiência de biofixação de CO₂, cinética de crescimento, composição proximal e elementar da biomassa de *Spirulina* sp.

3 JUSTIFICATIVA

No período de 2011, o consumo primário mundial de energia utilizado por vários setores foi estimado em mais de 12 milhões de toneladas equivalentes de petróleo. Com isto, 87 % da energia consumida no mundo foram provenientes dos combustíveis fósseis, enquanto que apenas 2 % foram oriundas de energias renováveis. O óleo combustível e o carvão representaram nesta parcela de combustíveis fósseis, 33,1 % e 30,3 % do consumo global de energia, respectivamente (BP, 2012).

A queima de combustíveis fósseis e processos industriais são os maiores contribuintes para a formação dos gases de efeito estufa (GEE), uma vez que representaram 65 % das emissões de CO₂ em 2010 (IPCC, 2014). Os gases de combustão de processos industriais contêm até 15 % de CO₂, podendo assim proporcionar uma fonte de carbono abundante para o cultivo de microalgas (KUMAR et al., 2010).

A biofixação de CO_2 por microalgas tem se mostrado como uma solução promissora para atenuar as emissões deste gás em excesso na atmosfera. A bioconversão do CO_2 por microalgas por meio da fotossíntese pode resultar na produção de diversos compostos orgânicos, como lipídios, carboidratos e proteínas com aplicabilidade nas indústrias de alimentos e na produção de biocombustíveis (HSUEH et al., 2009; JIANG et al., 2011).

No entanto, a biofixação de CO_2 por microalgas é prejudicada devido à baixa taxa de transferência de CO_2 para o meio líquido. Isto resulta em grande perda de CO_2 , podendo causar limitação da fonte de carbono para o cultivo (BABCOCK; MALDA; RADWAY, 2002). Estima-se que em torno de 80 a 90 % do CO_2 fornecido aos cultivos microalgais é perdido para a atmosfera (BECKER, 1994; PUTT et al., 2011).

Para garantir eficiência do processo de biofixação de CO_2 , parâmetros como vazão de alimentação da corrente gasosa e o emprego de difusores para a injeção de gases que promovam maior transferência do $CO_{2(g)}$ para o meio de cultivo devem ser investigados.

Neste contexto, em 2004 foi firmada uma parceria entre Eletrobrás, Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica (CGTEE) e o Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) para implantação de uma planta piloto de Biofixação de CO_2 por microalgas na usina termelétrica Presidente Médici (UTPM), operada pela CGTEE, a qual compõe o maior complexo termelétrico à base de carvão mineral do Rio Grande do Sul. Desde então o LEB vêm desenvolvendo pesquisas sobre a biofixação de CO_2 dos gases de combustão do carvão mineral.

No ano de 2012, foi renovada a parceria com a intenção de reativar esta Planta Piloto e dar continuidade as pesquisas do processo. Sendo assim, esta dissertação não só contribuirá para o desenvolvimento de tecnologias para o processo de biofixação de CO_2 por microalgas como também para o aumento da produtividade de biomassa e atenuação das emissões deste gás de efeito estufa para a atmosfera.

3.1 Histórico do Laboratório

O Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) foi criado em 1996 pelo professor Dr. Jorge Alberto Vieira Costa, sendo este vinculado à Escola de Química e Alimentos da Universidade.

O LEB vem desenvolvendo pesquisas com cultivos de microalgas desde 1996. Desde então já foram estudadas configurações de fotobiorreatores e modos de cultivo (REICHERT; REINEHR; COSTA, 2006), taxa de renovação de meio e concentração de corte (HENRARD, 2009; REICHERT; REINEHR; COSTA, 2006), iluminância, temperatura, composição dos nutrientes e utilização de substratos alternativos na suplementação do meio de cultivo (ANDRADE; COSTA, 2007). Além disso, foi desenvolvido estudo com modelagem matemática do crescimento da microalga *Spirulina* (COSTA et al., 2002).

A biomassa produzida com o cultivo de microalgas foi avaliada quanto à produção de ácidos graxos (MORAIS; COSTA, 2008b), biossurfatantes (RADMANN, 2011), bioetanol (MARGARITES, 2010; MARGARITES, 2014), biogás (ANDRADE, 2009; HENRARD, 2013; GOULARTE, 2014), nanofibras (MORAIS, 2008d), lipídeos e desenvolvimento de nanoemulsão (FERREIRA, 2013) e nanopartículas contendo peptídeos bioativos (LISBOA, 2013). Com o consumo de microalgas foi verificado potencial antitumoral, hipocolesterolêmico (COLLA, 2002) e nutricosmético (MORO, 2013). Neste contexto, foram realizados estudos quanto ao desenvolvimento de alimentos para praticantes de atividades físicas adicionados de *Spirulina* (CARVALHO, 2010).

Entre os projetos desenvolvidos, a biofixação de CO_2 por microalgas teve início no ano de 2004 com o convênio entre a Universidade, por meio do Laboratório de Engenharia Bioquímica com a Eletrobrás e a CGTEE. Com o desenvolvimento das pesquisas foi projetada e construída uma Planta Piloto de Biofixação de CO_2 por Microalgas na Usina Presidente Médici na cidade de Candiota (RS). Esta com área de 6.000 m², 70 m² de laboratórios, possuindo três biorreatores do tipo *Raceway*, dois com volumes de 18 m³ cada e um com volume de 1 m³, para crescimento e manutenção de inóculo. A partir do convênio firmado foram desenvolvidos diversos estudos relacionados à biofixação de CO₂ por microalgas, entre esses podem ser citados: 5 (cinco) dissertações de mestrado (MORAIS, 2006; RADMANN, 2007; CAMERINI, 2008; ROSA, 2014; VAZ, 2014), 1 (uma) tese de doutorado (MORAIS, 2008d), 4 (quatro) projetos de graduação, além de diversos artigos relacionados ao assunto (MORAIS; COSTA, 2007a; MORAIS; COSTA, 2007b; MORAIS; COSTA 2007c; MORAIS; COSTA, 2008a; RADMANN; COSTA, 2008; ROSA et al., 2011; MORAIS; RADMANN; COSTA, 2011; RADMANN et al., 2011). CAPÍTULO II

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Emissões de Gases de Efeito Estufa e o Aquecimento global

As emissões antrópicas dos gases de efeito estufa (GEE) para atmosfera apresentaram aumento contínuo entre o período de 1970 a 2010, sendo estas intensificadas no final da última década chegando a 49 GtCO_{2eq}.a⁻¹. Apesar do crescimento de uma série de políticas de atenuação das mudanças climáticas, as emissões anuais de GEE cresceram em média 1,0 GtCO_{2eq} (2,2 %) entre os anos de 2000 a 2010, em comparação a 0,4 GtCO_{2eq} (1,3 %) entre 1970 e 2000 (Figura 1) (IPCC, 2014).

Figura 1 - Emissões antrópicas anuais totais de gases de efeito estufa (GtCO2eq.a⁻¹) por um grupo de gases entre 1970 - 2010: CO₂ proveniente da queima de combustíveis fósseis (CF) e processos industriais (PI); CO₂ proveniente de florestas e outras utilizações da terra (FOTU); metano (CH₄); óxido nitroso (N₂O); gases fluorados cobertos pelo Protocolo de Kyoto (F-



Gases)

O aumento das emissões antrópicas de GEE em 10 $GtCO_{2eq}$ entre o período de 2000 e 2010 ocorreu principalmente pelo fornecimento de energia (47 %), indústria (30 %), transporte (11 %) e setores da construção civil (3 %). Desde 2000, as emissões de GEE apresentaram aumento em todos os setores, com exceção das emissões de provenientes de florestas e outras utilizações da terra (FOTU). Dos 49 $GtCO_{2eq}$ emitidos em 2010, 35 % (17 $GtCO_{2eq}$) das emissões de GEE foram provenientes do setor de produção de energia, 24 % (12

GtCO_{2eq}) de FOTU, 21 % (10 GtCO_{2eq}) da indústria, 14 % (7,0 GtCO_{2eq}) do transporte e 6,4 % (3,2 GtCO_{2eq}) da construção civil (IPCC, 2014).

O aquecimento global é o aumento da temperatura média terrestre, este induzido por processos naturais ou por atividades humanas. A causa primária deste fenômeno é intensificação do efeito estufa na atmosfera por meio da liberação de GEE, devido à queima de combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás) e pelo desmatamento em larga escala (HOUGHTON, 2005).

Os prováveis efeitos nocivos com o aumento da temperatura da superfície terrestre incluem: mudança na distribuição e quantidade de precipitações; impacto na produção de alimentos; derretimento acelerado das calotas polares; aumento do nível dos oceanos; e extinção acelerada de espécies (BILANOVIC et. al., 2009).

Como relatado, o CO_2 é um dos principais gases intensificadores do efeito estufa, sendo este considerado o principal causador do aquecimento global (TOLEDO-CERVANTES et al., 2013). O CO_2 é resultante do processo de decomposição da matéria orgânica e de todo e qualquer processo de queima ou combustão (respiração) (OHSE et al., 2007).

A redução do acúmulo do CO_2 na atmosfera pode ser realizada utilizando três métodos diferentes, os quais englobam a (1) redução do uso de combustíveis fósseis; (2) a remoção do CO_2 da atmosfera e (3) a captura e sequestro ou a utilização do CO_2 emitido pela combustão de combustíveis fósseis, antes da sua entrada na atmosfera (BENEMANN, 1997).

4.2 Microalgas e suas aplicações

As microalgas pertencem a um grande e diversificado grupo de micro-organismos fotossintéticos, os quais podem ser classificados como unicelulares e multicelulares. Compreendem nesta definição os procarióticos (cianobactérias) e os eucarióticos (LI et al., 2008).

As microalgas podem ser encontradas em ambientes marinhos, de água doce (BECKER, 1994) ou em ambientes terrestres, sendo mais de 40.000 espécies já catalogadas. Entre os maiores grupos de microalgas, *Cyanophyceae* (algas azuis), *Chlorophyceae* (algas verdes), *Bacillariophyceae* (diatomáceas) e *Chrysophyceae* (algas douradas) são frequentemente citadas quando se refere às características desejáveis para uma combinação eficiente e econômica de fixação de CO₂, tratamento de águas residuais e síntese de lipídios para a produção de biocombustíveis (KUMAR et al., 2010).

A composição bioquímica das microalgas pode variar entre as diferentes espécies e até mesmo entre a mesma espécie, devido à alteração das condições de cultivo aplicadas à cultura (BROWN et al., 1997). Há diversos fatores que afetam o crescimento e a composição bioquímica das microalgas, como por exemplo, a concentração e composição dos nutrientes do meio de cultivo, intensidade luminosa, concentração de CO₂, salinidade, temperatura, pH, concentração do oxigênio dissolvido, entre outros (KUMAR et al., 2010).

Entre os componentes de maior predominância na biomassa, destacam-se as proteínas, carboidratos e lipídios (SINGH; GU, 2010). Na Tabela 1, pode-se observar a composição de diferentes microalgas quanto à concentração de proteínas, carboidratos e lipídios em base seca.

Tabela 1 - Concentraç	ăo de	proteínas,	carboidratos	e	lipídios	para	diferentes	cepas	de
microalgas									

Miencolaca	Proteínas	Carboidratos	Lipídios
Microalgas	(% m.m ⁻¹)	(% m.m ⁻¹)	(% m.m ⁻¹)
Anabaena cylindrica	43 - 56	25 - 30	4 – 7
Chlamydomonas rheinhardii	48	17	21
Chlorella vulgaris	51 - 58	12 - 17	14 - 22
Dunaliella salina	57	32	6
Porphyridium cruentum	28 - 39	40 - 57	9 - 14
Scenedesmus obliquus	50 - 56	10 - 17	12 - 14
Spirulina máxima	60 - 71	13 – 16	6-7
Synechococcus sp.	63	15	11

Fonte: Adaptado de Becker (1994)

O elevado teor de proteínas presente na biomassa de várias espécies de microalgas é uma das principais razões para considerá-las uma fonte suplementar proteica (SPOLAORE et al., 2006) na dieta humana e animal. As proteínas presentes na biomassa microalgal mostram-se superiores quanto à qualidade, comparado a fontes vegetais, como por exemplo, trigo, arroz e leguminosas. Entretanto, mostram-se inferiores em relação às proteínas obtidas de fontes animais, como leite e carne (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Entre as microalgas com elevados teores de proteínas em sua composição, destaca-se a *Spirulina*, com seu teor proteico entre 55 e 70 % da massa seca total. Neste caso

a biomassa de *Spirulina* vem sendo muito empregada na suplementação de dieta animal como fonte proteica (LUM; KIM; LEI, 2013).

Os carboidratos são os principais derivados da fotossíntese a partir do metabolismo de fixação de carbono pelas microalgas (ciclo de calvin) (HO et al., 2011). Estes podem ser acumulados como materiais de reserva (amido), ou tornarem-se componentes principais das paredes celulares (celulose, pectina e polissacarídeos sulfatados) (CHEN et al., 2013; RANGEL-YAGUI et al., 2004; RISMANI-YAZDI et al., 2011). Os polissacarídeos, tanto da parede celular como o material de reserva, podem ser convertidos em açúcares fermentescíveis para a produção de bioetanol via fermentação microbiana (WANG; WANG; LIU, 2011).

O conteúdo e a composição de lipídios presentes nas microalgas podem variar de acordo com a espécie, com as fases de crescimento e com as condições de cultivo. Condições para o aumento da produção de lipídios incluem a deficiência de nitrogênio, excesso de luminosidade e alta salinidade. Entre estes, a limitação de nitrogênio é o fator amplamente estudado para estimular a síntese de ácidos graxos em microalgas (COSTA; MORAIS, 2011).

A concentração média de lipídios em microalgas pode variar entre 1 e 40 %. Em condições de stress dos cultivos, o teor de lipídios na biomassa pode atingir valores de até 85 % da massa seca. Na biomassa microalgal, os lipídios são tipicamente compostos por glicerol, glicídios ou bases esterificadas. Os ácidos graxos possuem de 12 a 22 átomos de carbono em sua cadeia. Em particular, alguns ácidos graxos sintetizados por microalgas, tais como o ômega 3 e 6 (ω -3 e ω -6), têm um alto valor econômico nas indústrias alimentícia e farmacêutica, pois são os principais precursores de hormônios como prostaglandinas, prostaciclinas, leucotrienos e tromboxanos, em diferentes classes de animais marinhos e terrestres, fundamentais para o desenvolvimento e reguladores fisiológicos (PYLE; GARCIA, WEN, 2008; GUSCHINA; HARWOOD, 2006; PEREIRA et al., 2012). As principais aplicações dos ácidos graxos de microalgas são no enriquecimento de rações para peixes, possibilidade de uso para produção de biodiesel e fonte de ácidos graxos essenciais na dieta humana (MORAIS; COSTA, 2008b).

A Figura 2 apresenta a representação esquemática da conversão fotossintética de energia solar, CO_2 e demais nutrientes em biomassa microalgal e suas diversas aplicações.



Figura 2 - Representação esquemática da conversão fotossintética por microalgas e suas aplicações

Fonte: Adaptado de Ho et al. (2011)

A biotecnologia microalgal também demonstrou aplicabilidade no tratamento de efluentes, como na biorremediação de nitrogênio e fósforo (CHANG et al., 2013) e na biofixação de CO_2 proveniente de gás de combustão (MORAIS; COSTA, 2007a).

No entanto, apenas algumas espécies de microalgas têm sido utilizadas com sucesso para aplicações comerciais, e algumas destas são apresentadas na Tabela 2, incluindo *Chlorella, Dunaliella salina, Botryococcus braunii, Spirulina platensis, Nannochloropsis, Arthrospira e Haematococcus pluvialis* (HO et al., 2011).

Microalgas	Aplicações da biomassa	Referências	
	1. Precursores de vitaminas	Gouveia et al. (1996)	
	2. Aditivos alimentares	Borowitzka (1999)	
Chlorella	3. Nutrição animal	Spolaore et al. (2006)	
	4. Cosméticos	Wang et al. (2010)	
	5. Biocombustíveis	Chen et al. (2010)	
	1. β-caroteno	Metting (1996)	
Dunaliella salina	2. Suplementos alimentares	Spoleoro et al. (2006)	
	3. Cosméticos	Spoiaore et al. (2000)	

Tabela 2 – Diferentes aplicações da biomassa de microalgas

Botryococcus braunii	1 Piediacal	Chisti (2007)
	1. Diodiesei	Chen et al. (2010)
Spirulina platensis	1. Produtos farmacêuticos	Raja et al. (2008)
	2. Ficobiliproteínas	Spolaore et al. (2006)
	3. Nutrição humana	Belay et al. (1993)
Haematococcus pluvialis	1. Astaxantina	Spolaore et al. (2006)
	2. Aditivos alimentares	
	3. Produtos farmacêuticos	
Nannochloropsis	1. Ácido graxo eicosapentaenoico	Chisti (2007)
	2. Biodiesel	Chen et al. (2010)

Fonte: Adaptado de Ho et al. (2011)

4.3 Biofixação de CO₂ por microalgas

A biofixação de CO_2 por microalgas tem despertado muita atenção nos últimos anos. Sendo que, ao se valer delas tem se observado uma tecnologia que possa vir a contribuir com a redução do aumento das concentrações dos gases de efeito estufa na atmosfera. Neste contexto, pesquisas estão sendo desenvolvidas na área de sequestro de carbono, a fim de identificar espécies de microalgas tolerantes a altas concentrações de CO_2 e a definição de parâmetros do processo que maximizem as taxas de crescimento e de bioconversão de carbono pelas microalgas (RADMANN et al., 2011; SINGH; AHLUWALIA, 2012).

De acordo com Brennan e Owende (2009) a seleção de cepas adequadas ao processo de biofixação de CO₂ tem efeito significativo sobre a competitividade de custos e eficácia do processo. Os autores relataram características desejáveis das microalgas para que se atinjam altas taxas de biofixação de CO₂, as quais incluem o seguinte: altas taxas de crescimento e de consumo de CO₂; alta tolerância a constituintes traços dos gases de combustão, tais como SOx e NOx; capacidade de produzir bioprodutos; facilidade de colheita, associadas a características espontâneas de sedimentação ou floculação; tolerância a elevadas temperaturas do meio líquido, a fim de minimizar custos de resfriamentos de gases de combustão; e capacidade de serem cultivadas com águas residuais de tratamentos.

A Tabela 3 apresenta comparação entre estudos com diferentes cepas de microalgas cultivadas e suas respectivas condições, quanto à concentração de CO_2 injetado, período de injeção, vazão específica de alimentação da corrente gasosa e o resultado obtido quanto à taxa máxima de biofixação de CO_2 ($T_{CO2máx}$).

periodo de injeção, vazao especifica de annientação e a taxa maxima de biorixação de CO_2						
Microalgas	(%)	injeção	v azao (vvm)	$\frac{1 \operatorname{CO2máx}}{(\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1})}$	Referências	
Nannochloris sp.	15	n.f	n.f	601 ^a	Negoro et al. (1991)	
Chlorella sp.	20	n.f	n.f	1316	Sekai et al. (1995)	
Chlorella vulgaris	1,0	n.f	0,3	6240	Cheng et al. (2006)	
Chlorella kessleri	6	15 min/2 h	0,3	164 ^a	Morais; Costa (2007c)	
Scenedesmus obliquus	6	15 min/2 h	0,3	160 ^a	Morais; Costa (2007c)	
Spirulina sp.	6	15 min/2 h	0,3	376 ^a	Morais; Costa (2007a)	
Scenedesmus obliquus	12	15 min/2 h	0,3	263 ^a	Morais; Costa (2007a)	
Spirulina sp.	6	15 min/2 h	0,3	394 ^a	Morais; Costa (2007b)	
Scenedesmus obliquus		15 min/2 h	0,3	198 ^a	Morais; Costa (2007b)	
Chlorella vulgaris	0,09	n.f	n.f	3450	Fan et al. (2008)	
Chlorella sp.	5	n.f	0,2	700,2	Ryu; Oh; Kim, (2009)	
Scenedesmus sp.	10	n.f	0,3	408,9	Yoo et al. (2010)	
Scenedesmus obliquus	10	Contínuo	0,003	549,9	Ho et al. (2010)	
Scenedesmus obliquus	5	Contínuo	0,25	286	Tang et al. (2011)	
Scenedesmus obliquus	10	Contínuo	0,25	288	Tang et al. (2011)	
Chlorella pyrenoidosa	5	Contínuo	0,25	244	Tang et al. (2011)	
Chlorella pyrenoidosa	10	Contínuo	0,25	260	Tang et al. (2011)	
Spirulina sp.	12	período claro	0,3	150,0	Radmann et al. (2011)	
Chlorella vulgaris	12	período claro	0,3	138,0	Radmann et al. (2011)	
S. obliquus CNW-N	0,03	Contínuo	0,05	72,3	Ho; Lu e Chang, (2012)	
S. obliquus CNW-N	0,03	Contínuo	0,8	301,6	Ho; Lu e Chang, (2012)	
S. obliquus CNW-N	5	Contínuo	0,05	527,6	Ho; Lu e Chang, (2012)	
S. obliquus CNW-N	5	Contínuo	0,8	402,2	Ho; Lu e Chang, (2012)	
S. obliquus CNW-N	2,5	Contínuo	0,4	560,1	Ho; Lu e Chang, (2012)	
S. obtusiusculus	10	n.f	0,4	970	Toledo-Cervantes et al. 2013	

Tabela 3 - Comparação entre estudos com microalgas em relação à concentração de CO₂, período de injeção, vazão específica de alimentação e a taxa máxima de biofixação de CO₂

a - Calculados a partir da produtividade de biomassa (Px, mg.L⁻¹.d⁻¹), de acordo com a equação: TCO₂ = 1,88 × Px, que é derivado da fórmula molecular da biomassa de microalgas, $CO_{0.48}H_{1.83}N_{0.11}P_{0.01}$ (CHISTI, 2007). n.f – informação não fornecida.

Fonte: Adaptado de Ho et al. (2011)
Cheng et al. (2006), em cultivos com a microalga *Chlorella vulgaris* encontraram taxa máxima de biofixação de CO_2 de 6240 mg.L⁻¹.d⁻¹ (Tabela 3). Fan et al. (2008), também utilizando a cepa *Chlorella vulgaris* observaram máxima biofixação de 3450 mg.L⁻¹.d⁻¹ de CO_2 . Tanto no estudo de Cheng et al. (2006) quanto no estudo de Fan et al. (2008), as concentrações fornecidas foram de 1,0 % e 0,09 %, respectivamente.

Morais e Costa (2007b) isolaram cepas de *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella kessleri* em lagoas de sedimentação próximas à Usina Termelétrica Presidente Médici – UTPM em Candiota - RS e em cultivos com 18 % (v.v⁻¹) de CO₂ verificaram que o crescimento não foi inibido. Radmann et al. (2011), neste mesmo local, isolaram cepas de *Synechococcus nidulans* e *Chlorella vulgaris*. Segundo Ono e Cuello (2007) a utilização de espécies que possam tolerar altas concentrações de CO₂, contaminantes dos gases de combustão e altas temperaturas, podem minimizar custos de pré-tratamento dos gases.

Nos estudos realizados por Morais e Costa (2007c) (Tabela 3), as concentrações de CO₂ injetadas variaram de 6 a 12 % para vazão específica de alimentação da corrente gasosa de 0,3 vvm nos cultivos da microalga *Scenedesmus obliquus* e as $T_{CO2máx}$ obtidas foram de 160 a 263 mg.L⁻¹.d⁻¹, respectivamente. Para a microalga *Spirulina* sp. utilizando as mesmas concentrações de CO₂ e vazão específica, as T_{CO2} máximas foram de 376 e 394 mg.L⁻¹.d⁻¹, demonstrando que ambas as cepas apresentaram capacidade de fixar CO₂.

Ao investigarem o efeito da injeção de diferentes concentrações de CO_2 (ar, 2, 5, 10 e 15 %; 0,25 vvm; injeção contínua) no crescimento da microalga *Nannochloropsis oculata*, Chiu et al. (2009) relataram concentração celular máxima de 1,28 g.L⁻¹ com injeção de 2 % (v.v⁻¹) de CO₂. Nos ensaios com injeção de ar, 5, 10 e 15 % de CO₂ o crescimento da microalga foi completamente inibido. Este comportamento também foi relatado por Hu e Gao (2003) em ensaios com a *Nannochloropsis* sp., a qual apresentou crescimento elevado quando a aeração era enriquecida com CO₂, comparada aos ensaios com apenas injeção de ar.

Em cultivos da microalga *Chlorella* sp. MTF-7, as máximas concentrações de biomassa atingidas foram 1,67; 1,50; 1,32 e 2,4 g.L⁻¹ quando era utilizado como fonte carbono 2, 10 e 25 % de CO₂ comercial e de gás de combustão, respectivamente (CHIU et al., 2011). Radmann et al. (2011) verificaram que a injeção de gás de combustão sintético (12 % v.v⁻¹ de CO₂, 60 ppm de SO₂ e 100 ppm de NO) nos cultivos de *Spirulina* sp., *Chlorella vulgaris e Scenedesmus obliquus* não causou inibição do crescimento das microalgas, atingindo produtividades máximas de biomassa de 80, 90 e 60 mg.L⁻¹.d⁻¹, respectivamente.

4.3.1 Conversão do CO₂ em biomassa por microalgas via processo fotossintético

A fotossíntese é um processo físico-químico que converte dióxido de carbono e energia luminosa em compostos orgânicos e libera oxigênio molecular (SMITH, 1997; ZHAO; SU, 2014) a nível celular. Normalmente, a fotossíntese ocorre em dois principais estágios: reações dependentes e independentes da luz (Figura 3).

As reações dependentes da luz consistem em duas principais etapas, realizadas por dois fotossistemas diferentes, mas relacionados. Uma delas é a redução do NADP⁺ a NADPH, executado pelo fotossistema I. A segunda etapa consiste na reação em que ocorre a oxidação da água para produção de oxigênio, executada pela fotossistema II. Os dois fotossistemas realizam as reações redox (transporte de elétrons) e interagem entre si indiretamente por meio de uma cadeia transportadora de elétrons que liga os dois sistemas. A produção de ATP é vinculada ao transporte de elétrons em um processo semelhante à produção de ATP pelo transporte mitocondrial de elétrons. Nas reações de escuro, o ATP e o NADPH produzidos nas reações de luz fornecem energia e o potencial redutor para fixação de CO₂ (CAMPBELL; FARRELL, 2006).



Figura 3 – Processo de fotossíntese: reações dependentes e independentes da luz

Fonte: Adaptado de Iverson (2006) e Zhao e Su (2014)

A fixação de CO_2 ocorre no estroma do cloroplasto em plantas superiores e no citoplasma nas cianobactérias. A equação para essa reação geral (Equação 1), assim como todas as equações para os processos fotossintéticos é enganosamente simples.

Enzimas

 $6 \text{ CO}_2 + 12 \text{ NADPH} + 18 \text{ ATP} \longrightarrow C_6 \text{H}_{12}\text{O}_6 + 12 \text{ NADP}^+ + 18 \text{ ADP} + 18 \text{ Pi}$ (1)

A reação líquida de seis moléculas de dióxido de carbono para produzir uma molécula de glicose requer a carboxilação de seis moléculas de um intermediário principal com cinco carbonos, a ribulose-1,5-*bis*fosfato, para formar seis moléculas de um intermediário instável com seis carbonos, que, então, rompe-se para fornecer 12 moléculas de 3-fosfatoglicerato. Dessas, duas moléculas de 3-fosfoglicerato reagem entrei si, finalmente produzindo glicose. As dez moléculas restantes de 3-fosfoglicerato são utilizadas para regenerar as seis moléculas de ribulose-1,5-*bis*fosfato. A via completa da reação é cíclica e chamada de ciclo de Calvin (Figura 3), Nobel de Química em 1961 (CAMPBELL; FARRELL, 2006).

A primeira reação do ciclo de Calvin é a condensação da ribulose-1,5-*bis*fosfato com o CO₂ para formar um intermediário de seis carbonos, o 2-carboxi-3-cetorribitol-1,5*bis*fosfato, que rapidamente se hidrolisa para fornecer duas moléculas de 3-fosfoglicerato. A reação é catalisada pela enzima ribulose-1,5-bis*fosfato carboxilase/oxigenase* (**rubisco**), ausente em tecidos animais e, está localizada na face da membrana tilacoíde virada para o estroma e é provavelmente uma das proteínas mais abundantes na natureza, pois é responsável por 15 % do total de proteína nos cloroplastos (CAMPBELL; FARRELL, 2006).

4.4 Fatores que influenciam a biofixação de CO₂ por microalgas

A bioconversão de CO_2 pelas microalgas pode ser influenciada por diversos fatores que partem desde a transferência do CO_2 da fase gasosa até a fase líquida (meio de cultivo), até parâmetros de processo e biológicos. Neste contexto, destacam-se a temperatura, nutrientes do meio de cultivo, intensidade luminosa, pH, configurações dos biorreatores (HO et al., 2011) e difusores, vazão de alimentação da corrente gasosa (CO₂) (TALBOT; LENCKI; LA NOUIE, 1990), entre outros.

Os tópicos descritos a seguir abordaram os principais aspectos que influenciam a biofixação por microalgas, estes relacionados com o tema central desta dissertação.

4.4.1 Fonte de carbono e o pH

O carbono é um dos elementos principais e necessário em maiores concentrações no cultivo de microalgas (CHAE; HWANG; SHIN, 2006; LOURENÇO, 2006). Este pode ser fornecido aos cultivos por diversas fontes, como o CO_2 atmosférico, a partir de gases industriais (gás de combustão) e CO_2 quimicamente fixado sob a forma de carbonatos solúveis (NaHCO₃ e Na₂CO₃) (BECKER, 1994). No entanto, a concentração de CO_2 atmosférico (0,039 % v.v⁻¹) não é considerada suficiente para promover elevadas taxas crescimento e produtividade de biomassa.

De acordo com Doucha e Lívanský (2006), o carbono constitui entre 45 e 50 % m.m⁻¹ da massa seca das microalgas, sendo assim necessário em torno de 1,65 a 1,83 g de CO_2 para a produção de 1,0 g de biomassa.

A elevada demanda por carbono decorre do fato de que este é incorporado por meio da fotossíntese, tornando-se constituinte muito importante de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células, como proteínas, carboidratos, ácidos nucléicos, vitaminas e lipídios (LOURENÇO, 2006).

O fornecimento de CO_2 comprimido pode representar até 41,3 % do total dos custos para a produção de biomassa de microalgas (MOLINA GRIMA et al., 2003). Neste contexto, o emprego de gases residuais de processos de combustão, contendo entre 5 a 15 % (v.v⁻¹) de CO₂, podem fornecer quantidades de CO₂ suficientes para a produção de microalgas em larga escala (KUMAR et al., 2010).

A maioria das microalgas tem seu crescimento favorecido em pH neutro, enquanto algumas requerem pH mais elevado, como *Spirulina platensis* (pH em torno de 9) (VONSHAK, 1997), ou inferior, como *Chlorococcum littorale* (pH em torno de 4) (KODAMA, et al., 1993).

Em cultivos de microalgas ocorre uma relação complexa entre o pH e a concentração de CO₂, devido ao equilíbrio químico entre as espécies ($CO_{2(aq)} \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow HCO_3^- \leftrightarrow CO_3^{-2}$). O aumento da concentração de CO₂ na corrente gasosa injetada nos cultivos pode causar redução do pH, resultando em efeito adverso sobre a fisiologia microalgal, refletindo nas taxas de crescimento e na composição da biomassa (RICHMOND, 1986).

A injeção de gases de combustão em cultivos microalgais pode influenciar fortemente o pH do cultivo, devido à dissolução do CO_2 e do SO_x contidos nestes gases. Em elevadas concentrações de CO_2 (20 %) e com adição de SOx, o pH pode atingir 2,6 (WESTERHOFF et al., 2010). Considerando-se que a variação do pH decorrida da dissolução

destes gases poderá causar influência na cinética de crescimento, o tamponamento do meio de cultivo poderá evitar estas flutuações (MAEDA et al., 1995).

4.4.2 Temperatura e Luminosidade

O efeito da temperatura sobre as reações bioquímicas a torna um dos fatores ambientais mais importantes que influenciam a composição bioquímica de algas (GROBBELAAR, 2004). A temperatura ótima varia entre as espécies de microalgas (ONO; CUELLO, 2003). No entanto, estas também podem ser influenciadas por outros parâmetros ambientais, tais como a intensidade luminosa. Temperaturas de crescimento ideais entre 15 e 26 °C são relatadas para algumas espécies, atingindo altas taxas de crescimento em 23 °C (TAMIYA, 1957). Em cultivos de *Spirulina* a temperatura ideal varia entre 35 e 38 °C (VONSHAK, 1997).

Considerando-se que os gases de combustão de usinas termelétricas podem atingir elevadas temperaturas (120 °C), a aplicação de microalgas termofílicas torna-se interessante (BAYLESS et al., 2001). Além de serem utilizadas para o sequestro de CO₂, as microalgas podem contribuir na redução de custos de resfriamento dos gases de exaustão e gerar biomassa rica em metabólitos secundários (SINGH; AHLUWALIA, 2012).

Hsueh et al. (2009) isolaram a microalga *Thermosynechococcus* sp. TCL-1. Nos estudos com esta microalga, na temperatura de 50 °C e injeção de 10 % de CO₂, os autores verificaram velocidade específica de crescimento (μ) de 2,7 d⁻¹ e biomassa com elevada concentração de carboidratos (60,6 %). Devido à característica termofílica, a TCL-1 demostrou ter potencial para ser aplicada em cultivos com o uso de gases de combustão.

A intensidade e a eficiência de utilização da luz são de importância crucial no desenvolvimento de biorreatores para os cultivos microalgais. Tanto a luz solar, quanto a luz artificial são utilizadas pelas microalgas pela incidência na região externa da superfície dos biorreatores, bem como no interior do volume, pela instalação de dispositivos de iluminação (LED ou fibras óticas) no interior do biorreator (SUH; LEE, 2003).

Ho; Lu e Chang, (2012) verificaram as maiores velocidades específicas de crescimento (1,3 d⁻¹) e de biofixação de CO₂ (853,7 mg.L⁻¹.d⁻¹) para a microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N, quando esta foi exposta a uma intensidade luminosa de 180 μ mol_{fótons}.m⁻².s⁻¹, 2,5 % de CO₂ e vazão de 0,4 vvm.

4.4.3 Transferência de gases no cultivo de microalgas

Os gases introduzidos em cultivos microalgais apresentam diversos propósitos, dentre eles, (i) fornecimento de CO_2 , como fonte de carbono (ii) sistema de agitação de biorreatores, evitando gradientes de concentração de nutrientes, (iii) exposição igualitária de luminosidade (especialmente em culturas de alta densidade celular), minimizando fenômenos de sombreamento, (iv) controle de pH, assegurando a dissolução do CO_2 e (V) remoção do oxigênio dissolvido (OD) acumulado no interior do biorreator, reduzindo assim a sua toxicidade para as microalgas (KUMAR et al., 2010; MOLINA GRIMA et al., 1999).

4.4.3.1 Transferência de CO₂ em cultivos microalgais

A concentração de CO_2 fornecida aos cultivos de microalgas não reflete necessariamente a quantidade de CO_2 dissolvido no meio de cultivo. O processo de transferência tem papel importante na dissolução deste gás para o meio líquido até etapa final no sítio ativo de reação da microalga.

A transferência de CO_2 para o meio líquido e condições de mistura são parâmetros críticos em fotobiorreatores empregados no processo de remoção de CO_2 por microalgas (CHAI; ZHAO, 2012). Estima-se que em torno de 80 a 90 % do CO_2 fornecido aos cultivos microalgais é perdido para a atmosfera (BECKER, 1994; PUTT et al., 2011).

O processo de transferência visa além de transferir o gás para o meio líquido, também garantir que o gás dissolvido chegue até as células. Durante este processo várias resistências estão associadas, as quais se destacam oito, descritas a seguir (Adaptado de MOO-YOUNG; BLANCH, 1981; CHISTI, 1989).

1. na difusão do gás no interior da bolha;

- 2. na interface gás-líquido da fase gasosa;
- 3. na película líquida estagnada ao redor da bolha de gás;
- 4. na difusão do gás até as células;
- 5. na película líquida em torno da célula;
- 6. na resistência imposta pela membrana celular;
- 7. na resistência devido a difusão do gás no citoplasma;
- 8. n resistência associada à velocidade da reação de consumo final.

A Figura 4 apresenta o diagrama esquemático das resistências associadas à transferência de massa da fase gasosa (CO₂) ao sítio de reação no interior da célula.



Figura 4 – Resistências à transferência de massa da fase gasosa ao sítio de reação no interior da célula

Fonte: SUGAI (2012)

Entre as resistências apresentadas, nem todas são consideradas significativas (CHISTI, 1989). Muitos estudos ratificam que a resistência do lado gasoso pode ser desprezada, em virtude da intensa movimentação das moléculas de gás. Portanto, considera-se que a resistência dominante refere-se aquela associada à película líquida, resistência esta que é em função da difusividade do gás no líquido e a espessura da bolha. No lado do consumo as resistências 5, 6 e 7 também são consideradas desprezíveis, devido à relação do tamanho das células a área exposta ao meio líquido, da difusão facilitada do gás pela membrana celular e devido à área exposta pela célula ao meio ambiente. Desta forma, do lado do consumo, a resistência mais significativa ficaria por conta das reações bioquímicas que ocorrem no interior do sítio ativo das células (CHISTI, 1989; SCHMIDELL et al., 2001).

Conforme Talbot et al. (1991) durante a produção de microalgas em um sistema gás-líquido, se o modo de operação com respeito ao meio de cultura é ignorado, a cinética de fornecimento de CO_2 (na zona de aeração) pode ser considerada como em um reator bem agitado a uma vazão contínua. Em tal sistema, uma fase descontínua de gás sob a forma de bolhas se move através de uma fase líquida contínua; com isto o sistema de cultura de algas gaseificadas pode, portanto, ser considerado como uma coluna de bolhas. A aeração/agitação de uma coluna de bolhas pode ser descrito a partir de dois pontos de vista: o de transferência de um gás dissolvido a partir das bolhas de gás para o meio de cultura e o biológico com a

utilização desse gás pelos micro-organismos. Processos físicos e fisiológicos estão inseridos na demanda de gás pelos micro-organismos, enquanto que a transferência das bolhas de gás é apenas um processo químico ou físico, dependendo da situação. A transferência da fase gasosa para a fase líquida pode ser representada por uma série de resistências conforme mostrado na Figura 4. Conforme a teoria da penetração e da camada limite, essas resistências à transferência estão localizados nas finas camadas adjacentes, à interface entre as duas fases.

Dentre as teorias do equacionamento da transferência de gases a de maior utilidade é a que considera a existência de duas películas estagnadas, sendo a transferência de massa gás-líquido controlada apenas pela resistência ao fluxo promovida pelos filmes de líquido e de gás ao redor da bolha de ar (CHISTI, 1989; SUGAI, 2012). O sistema pode ser novamente simplificado, pois a resistência na fase líquida é significativamente superior à resistência na fase gasosa (SUGAI, 2012).

Para gases com baixa solubilidade, como O_2 e CO_2 , a constante de Henry (H), é grande; por conseguinte, a transferência é controlada principalmente pela resistência lado do líquido. Assim, o coeficiente global volumétrico de transferência de massa (k_La) pode ser considerado igual ao coeficiente volumétrico de transferência de massa da fase líquida (TALBOT et al., 1991).

O coeficiente global de transferência de massa (k_La) é o parâmetro comumente utilizado para avaliar o desempenho de fotobiorreatores. O coeficiente de transferência de massa volumétrica de fotobiorreatores é dependente de vários fatores tais como taxa de agitação, tipo de difusor, agentes surfactantes/antiespumantes e temperatura (UGWU; AOYAGI; UCHIYAMA, 2008).

O parâmetro k_La caracteriza a capacidade de transferência de massa de CO₂ no reator, e assim determina se um certo reator será capaz de sustentar uma determinada taxa de crescimento celular. No que diz respeito à transferência de CO₂, este parâmetro é de extrema importância nas etapas de projeto, no aumento de escala e na operação de um sistema de cultura para a produção de biomassa (TALBOT et al., 1991).

Apesar do coeficiente de transferência de massa ser específico para cada par gáslíquido, é possível relacionar um valor conhecido de um par (por exemplo, O_2 em água) a qualquer outra mistura gás-líquido (por exemplo, CO_2 em água) para o mesmo sistema se forem conhecidas as difusividades de cada par gás-líquido (CHISTI, 1989; SUGAI, 2012).

A partir da relação entre as difusividades dos gases (D_{CO2} , $m^2.s^{-1}$) em fase líquida (água) em uma dada temperatura, Talbot; Lencki e La Nouie (1990) propuseram a determinação do k_La do CO_2 a partir do k_La do O_2 , conforme apresentado na Equação 2.

$$k_{L}a_{co_{2}} = k_{L}a_{o_{2}} * \sqrt{\frac{D_{co_{2}}}{D_{o_{2}}}}$$
(2)

De acordo com Talbot et al. (1991) para as condições físico-químicas do meio de cultura usado no cultivo de microalgas, a reação do CO_2 com OH^- , H_2O e NH_3 na fase líquida desempenha um papel insignificante no mecanismo de absorção de carbono. Assim, ao caracterizar a absorção de CO_2 em um cultivo microalgal, é possível relacionar o k_La do CO_2 com o k_La do O_2 por um fator de correção que envolve as difusividades dos dois gases. Consequentemente, os métodos desenvolvidos para a determinação do coeficiente de transferência de massa do O_2 em reatores para um sistema gás-líquido pode ser utilizado para a determinação do k_La do CO_2 .

De acordo com Talbot; Lencki e La Nouie (1990) apesar do grande número de estudos com microalgas, poucos relatam, ainda de forma fragmentada, a caracterização dos sistemas de culturas gaseificadas, quanto à transferência de massa do CO_2 . Os autores também consideram essencial a estimativa da taxa de absorção e da capacidade de transferência do CO_2 para o meio líquido quando são projetados e operados sistemas aerados de cultivos de microalgas. A avaliação do k_La do CO_2 em diferentes condições de biorreatores permitirá a caracterização do potencial e dos limites do sistema utilizado para uma determinada espécie.

4.4.4 Difusores empregados no cultivo de microalgas

Diversas configurações de difusores são utilizadas para promover a transferência de gases para o interior de biorreatores em cultivo de microalgas. Neste contexto, destacam-se tubulações perfuradas, discos, pedras sinterizadas, tubulações porosas e módulos de membranas de fibra oca integrados aos biorreatores (Tabela 4 e Figura 5). Entre as várias alternativas, os difusores para o borbulhamento de ar enriquecido com CO_2 pela parte inferior do biorreator tem sido a abordagem mais empregada, apresentando eficiências de transferência entre 13 e 20 % (CARVALHO; MEIRELES; MALCATA, 2006).

Entretanto, desvantagens estão associadas a este sistema, como a perda de CO_2 para a atmosfera, incrustações biológicas dos difusores e baixas taxas de transferência de massa, devido à menor área interfacial de troca. Melhores eficiências globais são esperadas para biorreatores com membranas de fibras ocas, sendo verificados baixos coeficientes de transferência de massa a partir um padrão hidrodinâmico menos turbulento que são compensados pela área maior por unidade de volume disponível para transferência de massa. Além disso, a área de transferência de massa é definida e a pressão no lado do gás pode ser controlada de modo a fornecer apenas a quantidade necessária de CO₂, permitindo assim um controle mais preciso da taxa de transferência e redução na quantidade de CO₂ perdido para a atmosfera (MALCATA; CARVALHO, 2001).

Figura 5 – Fotobiorreator tubular vertical com difusor tipo pedra sinterizada (a) biorreator mecanicamente agitado com difusor anel perfurado (b) biorreator mecanicamente agitado com contactor de membranas de fibra oca (c) Fotobiorreator tipo placa plana com tubulação



Fonte: (a) Morais e Costa (2007a); (b) (c) (d) Carvalho; Meireles; Malcata (2006)

Biorreator	Transferência gasosa	Mistura	Estresse hidrodinâmico	Aumento de escala
Lagoas rasas não agitadas	Pobre	Pobre	Baixo	Difícil
Membranas de fibra oca	Excelente	Uniforme	Médio	Moderada
Air-lift	Alta	Uniforme	Baixo	Moderada
Coluna de bolhas	Moderada	Moderada	Baixo	Moderada
Tanque agitado	Baixa/alta	Uniforme	Alta	Difícil
Placa plana	Alta	Uniforme	Baixa/alta	Difícil
Tubular	Moderada/ Alta	Uniforme	Baixa/alta	Difícil
Tubular com		Boa		
receptor solar	Boa	(por	Médio	Difícil
		bombeamento)		

Tabela 4 – Descrição genérica da transferência de massa em biorreatores

Fonte: Adaptado de Carvalho; Meireles e Malcata (2006)

Talbot, Lencki e La Nouie (1990) testaram diferentes difusores (porosos e perfurados) e vazões específicas (0,1, 0,3 e 0,5 vvm) em relação à capacidade de transferência de CO_2 para o meio líquido em reator triangular. Os autores verificaram que os difusores porosos permitem maior taxa de transferência de CO_2 , quando comparados aos difusores perfurados. Relataram também a existência da dependência linear do difusor e da vazão específica empregada. O maior k_La de CO_2 (30,9 h⁻¹) foi verificado para difusor poroso a uma vazão específica de 0,5 vvm.

Zhang; Kurano e Miyachi (2002) relataram o efeito da vazão específica (0,025 e 1 vvm) quando injetado ar enriquecido com 5 e 10 % (v.v⁻¹) de CO₂ em fotobiorreator tipo placa plana. Estes autores encontraram k_La para o CO₂ de 177,3 h⁻¹ na vazão específica de 1 vvm. No entanto, o valor de k_La ótimo para o crescimento, também definido como k_La crítico, manteve-se em torno de 10 h⁻¹ para a concentração de 10 % de CO₂. Os autores também ratificaram que em concentrações mais baixas de CO₂ na corrente gasosa seria necessário manter um elevado valor de k_La crítico, a fim de reunir exigências para o crescimento das microalgas.

Fatores como concentração de CO_2 , vazão específica de alimentação da corrente gasosa, tamanho das bolhas e utilização de defletores para aumentar o tempo de residência do gás na fase líquida já foram estudados por Ryu, Oh e Kim (2009) frente à produtividade de biomassa e eficiência de utilização do CO_2 por cultivos de *Chlorella* sp. Neste estudo verificou-se que a vazão específica de 0,2 vvm promoveu maior produtividade de biomassa (432 mg.L⁻¹.d⁻¹) e maior eficiência de utilização do CO_2 (0,2 %).

Fan et al. (2008) desenvolveram um sistema utilizando membranas de fibra oca (Figura 6) para aumentar a transferência de CO_2 para o meio em cultivos da microalga *Chlorella vulgaris*. O k_La de CO_2 utilizando as membranas foi na ordem de 464,0 h⁻¹ e a taxa máxima de biofixação de CO_2 pela *Chlorella vulgaris* foi de 3600 mg.L⁻¹.d⁻¹.



Figura 6 – Diagrama esquemático do sistema de membranas de fibra oca acopladas ao fotobiorreator tubular helicoidal

Fonte: FAN et al. (2008)

Chai e Zhao (2012) utilizaram agitador tipo tanque de bolhas (Figura 7) com o propósito de aumentar a eficiência de remoção de CO_2 e melhorar as condições de mistura do fotobiorreator no cultivo de *Chlorococcum* sp. Os autores verificaram que o emprego deste sistema promoveu remoção de 94 % de CO_2 da corrente gasosa enriquecida com 10 % de CO_2 a uma vazão de injeção de 0,003 vvm.



Figura 7 – Diagrama esquemático do sistema utilizando tanque de bolhas

Fonte: CHAI e ZHAO (2012)

Chai, Zhao e Baoying (2012) em estudos utilizando sistema de membranas de politetrafluoroetileno relataram elevadas concentrações de CO_2 dissolvido no meio líquido, resultando em altas taxas de transferência de CO_2 no cultivo da microalga *Chlorococcum* sp. Com elevadas concentrações de carbono dissolvido e maior tempo de retenção deste no meio, maiores taxas de biofixação e menores perdas do CO_2 por exaustão são alcançadas. Este trabalho também ratificou a relação entre o k_La do CO_2 com a vazão específica de alimentação da corrente gasosa. Altas vazões podem contribuir para um aumento do k_La, todavia, essas podem acarretar em baixas eficiências de remoção do CO_2 . Os ensaios realizados obtiveram k_La do CO_2 de 0,52 h⁻¹, o qual pode suprir a demanda de carbono requerida pela cultura.

4.4.5 Biorreatores

Os biorreatores podem ser divididos em sistemas fechados ou abertos, sendo que na Tabela 5 estão apresentadas características para a comparação entre as configurações (HO et al., 2011).

As principais vantagens dos sistemas abertos são a facilidade de construção e operação quando comparados à maioria dos sistemas fechados. No entanto, grandes limitações em tanques abertos incluem a má utilização da luz pelas células, perdas por evaporação, flutuação de temperatura no meio de cultivo, difusão de CO₂ para a atmosfera,

contaminações por outros micro-organismos e da exigência de grandes áreas de terra. Além disso, devido aos mecanismos de agitação ineficientes em sistemas abertos de cultivo, as suas taxas de transferência de massa são muito pobres resultando em baixas produtividades de biomassa (UGWU; AOYAGI; UCHIYAMA, 2008).

Parâmetros avaliados	Sistemas abertos	Sistemas fechados	
Capacidade de biofixação de CO ₂	Baixa	Alta	
Produtividade de biomassa	Baixa	Alta	
Taxa de crescimento específico	Baixa	Alta	
Risco de contaminação	Extremamente alta	Baixa	
Perdas por evaporação	Alta	Baixa	
Eficiência fotossintética	Baixa	Alta	
Área superficial	Baixa	Extremamente alta	
Controle do processo	Difícil	Fácil	
Custo de operação	Baixo	Alto	
Aumento de escala	Fácil	Difícil	

Tabela 5 – Comparação entre sistemas de cultivo abertos e fechados

Fonte: Ho et al. (2011)

Os sistemas fechados apresentam vantagens no que diz respeito a altas taxas de biofixação de CO₂, produtividade de biomassa, controle do processo e alta eficiência fotossintética, bem como no que diz respeito à obtenção de biomassa não contaminada para extração de biomoléculas (SKJANES; LINDBLAD; MULLER, 2007).

Os fotobiorreatores apresentam-se em diferentes configurações, como fotobiorreatores de colunas verticais (colunas de bolhas ou *airlift*), tubulares e de placa plana.

Os tubulares são os mais apropriados para cultivos *outdoor*, devido à grande superfície de iluminação criada pela disposição dos tubos. Eles podem apresentar configurações em planos verticais, horizontais ou inclinados. Estas configurações de fotobiorreatores promovem maior tempo de contato entre as fases gasosa e líquida, aumentando a transferência de massa de CO₂ (STEWART; HESSAMI, 2005). No entanto, esta disposição apresenta a desvantagem de acarretar elevados custos com o bombeamento de ar para os cultivos.

De acordo com Posten (2009), a produção de microalgas é até agora limitada em alguns milhares de toneladas por ano, que na sua maioria são produzidas em tanques abertos. Apenas algumas centenas de toneladas são produzidas em fotobiorreatores fechados.

Embora as microalgas apresentem capacidade de fixar CO_2 e produzir biocombustíveis, os cultivos em larga escala estão limitados atualmente. Isso porque os custos de produção ainda são muito elevados, especialmente pela construção dos fotobiorreatores (HO et al., 2011).

Na Figura 8 têm-se diferentes configurações de biorreatores, abertos e fechados empregados no cultivo de microalgas.

Figura 8 – Configurações de biorreatores empregados no cultivo de microalgas: (a) *Raceway* (Seambiotic), (b) biorreator de fluxo de ar, (c) coluna de bolhas e (d) tubular horizontal



Fonte: Pires et al. (2012)

CAPÍTULO III

5 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Este trabalho foi realizado em duas etapas, sendo que cada uma dessas correspondeu a um artigo científico, no qual será distribuído do seguinte modo:

Artigo I - Avaliação do desempenho de diferentes de difusores para alimentação de CO₂ no cultivo de S*pirulina*.

Artigo II – Desenvolvimento de sistema de membranas de fibra oca para o aumento da biofixação de CO_2 por microalga.

ARTIGO I – AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE DIFERENTES DE DIFUSORES PARA ALIMENTAÇÃO DE CO₂ NO CULTIVO DE *Spirulina*.

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE DIFERENTES DE DIFUSORES PARA ALIMENTAÇÃO DE CO₂ NO CULTIVO DE Spirulina

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar o desempenho de configurações de difusores e vazões específicas da corrente gasosa sobre a transferência de CO₂ para o meio líquido em sistema CO₂-H₂O e na alimentação de CO₂ no cultivo de Spirulina sp. LEB 18. Para isso, foram utilizados nos cultivos fotobiorreatores tubulares verticais e avaliadas quatro configurações de difusores (pedra sinterizada, cortina porosa, madeira porosa e anel perfurado) e duas vazões específicas (0,05 e 0,3 vvm). A máxima eficiência de transferência do CO₂ (26,0 %) em sistema CO₂-H₂O para o meio líquido foi observada na menor vazão (0,05 vvm) para o ensaio com a cortina porosa. A máxima produtividade volumétrica de biomassa $(125,9 \pm 5,3 \text{ mg.L}^-)$ ¹.d⁻¹) também foi verificada no ensaio com a cortina porosa na vazão de 0,05 vvm, sendo esta resposta 40,4 % superior ao ensaio com a mesma configuração de difusor na vazão de 0,3 vvm. Os maiores resultados de taxa de biofixação (T_{CO2máx}) e eficiência de utilização de CO₂ (E_{CO2máx}) demonstraram que a utilização de uma menor vazão, juntamente com o emprego de difusores porosos (pedra sinterizada, cortina porosa e madeira porosa) pode promover o aumento da eficiência de biofixação de CO₂ pela microalga. A máxima concentração de proteínas (78,6 \pm 0,1 % m.m⁻¹) na biomassa de *Spirulina* foi obtida no experimento com a madeira porosa e vazão específica de 0,05 vvm. O aumento da vazão para o ensaio com a cortina porosa resultou no acréscimo de 26 % no teor de carboidratos e redução de 21 % na concentração de lipídios na biomassa. Logo, os resultados obtidos no presente estudo mostraram que a aplicação de difusores porosos e menores vazões de alimentação da corrente gasosa podem propiciar condições para maiores produtividades de biomassa e maiores taxas de biofixação de CO₂, contribuindo assim para redução das emissões de CO₂ para atmosfera e também de custos com a fonte de carbono e condução do processo para a produção de biomassa de Spirulina.

Palavras-chave: biofixação, dióxido de carbono, microalga, transferência de massa, vazão.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the performance of diffusers configurations and specific flow rate of the gas stream on the CO₂ transfer into the liquid medium in CO₂-H₂O system and the CO₂ feed in the *Spirulina* sp. LEB 18 cultivation. This way, they were used in the cultivations vertical tubular photobioreactors and evaluated four diffusers configurations (sintered stone, porous curtain, perforated ring and porous wood) and two specific flow rates (0.05 and 0.3 vvm). The CO₂ transfer efficiency maximum (26.0 %) CO₂-H₂O system to the liquid medium was observed at the lowest flow (0.05 vvm) for assay with the porous curtain. The biomass volumetric productivity maximum (125.9 ± 5.3 mg L⁻¹ d⁻¹) was also observed in the assay with the same configuration of the diffuser flow of 0.3 vvm. The highest results biofixation rate (T_{CO2máx}) and CO₂ use efficiency (E_{CO2máx}) demonstrated that the use of a smaller flow rate with the use of porous diffusers (sintered stone, porous curtain and porous).

wood) may promote CO_2 biofixation efficiency increase by microalgae. The maximum protein concentration (78.6 ± 0.1 % w w⁻¹) in the biomass of *Spirulina* was obtained in the experiment with the porous wood and specific flow rate of 0.05 vvm. The flow rate increase to the assay with porous curtain resulted in 26 % increase in carbohydrate content and 21 % reduction in the lipids concentration in biomass. So, the results obtained in this study showed that application of porous diffusers and lower flows feeding the gas stream may provide conditions for higher biomass productivities and higher CO_2 biofixation rates, thus contributing to reduce CO_2 emissions to the atmosphere and also the cost of the carbon source and the process conducting for the *Spirulina* biomass production.

Keywords: biofixation, carbon dioxide, flow rate, mass transference, microalgae.

1 INTRODUÇÃO

O aumento dos preços de energia combinado com desastres ambientais causados pela alta concentração de gases de efeito estufa (GEE) na atmosfera (YANG et al., 2012), tem preocupado a sociedade e conduzido a um processo de conscientização pela busca de energias limpas e por tecnologias de captura e fixação de CO_2 em excesso na atmosfera.

Neste contexto, as microalgas ganham destaque devido a sua capacidade de capturar CO_2 e convertê-lo em oxigênio e biomassa por meio da fotossíntese. Esta biomassa pode ser rica em biocompostos, os quais podem ser extraídos e aplicados na produção de cosméticos, alimentação humana e animal, bem como na produção de biocombustíveis (COSTA; MORAIS 2011; HO et al., 2011; TOLEDO-CERVANTES et al., 2013).

A fixação de CO_2 por microalgas e a produção de biomassa são fortemente dependentes das condições de cultivo. Além das espécies das microalgas, outros fatores podem influenciar a fixação de CO_2 por microalgas, os quais incluem parâmetros físicoquímicos (como por exemplo, concentração de CO_2 , compostos tóxicos presentes no gás de combustão, concentração inicial do inóculo, temperatura, luminosidade e pH) e parâmetros hidrodinâmicos (como por exemplo, vazão, taxa de mistura e transferência de massa) (ZHAO; SU, 2014).

Embora a fixação de CO_2 por microalgas e a conversão em biomassa estão se tornando focos de pesquisas, a maioria delas particularmente tem se preocupado com estratégias de fixação de carbono, design do fotobiorreator, tecnologias de conversão de biomassa de microalgas em bioenergia (SPOLAORE et al., 2006; SUALI; SARBATLY, 2012).

No entanto, poucos trabalhos relacionam os parâmetros hidrodinâmicos, como vazão e transferência de massa do CO_2 com a configuração de difusores para injeção de CO_2 na biofixação do CO_2 por microalgas. Diante disso, a definição destes parâmetros pode modificar a conversão do carbono em biomassa pela microalga, apresentando influência significativa sobre a cinética de crescimento e composição da biomassa, inibindo ou estimulando a síntese de biomoléculas.

A microalga *Spirulina* é uma das mais importantes do grupo taxonômico das cianobactérias e tem sido estudada durante as últimas décadas, principalmente em função do valor nutricional de sua biomassa. A composição desta cianobactéria apresenta ampla variedade de nutrientes essenciais, como vitaminas, minerais, ácidos graxos e proteínas (COLLA et al., 2007). De acordo Radmann e Costa (2008) a microalga *Spirulina* apresentou

potencial em biofixar CO_2 e produzir biomassa rica em ácidos graxos, podendo esta ser utilizada tanto para a alimentação, quanto para produção de biocombustíveis.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho de diferentes configurações de difusores e vazões específicas da corrente gasosa sobre a transferência de CO_2 para o meio líquido em sistema CO_2 -H₂O e a bioconversão do CO_2 fixado pela microalga *Spirulina* sp. por meio da cinética de crescimento, caracterização da biomassa produzida e eficiência de biofixação de CO_2 .

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo e meio de cultivo

A microalga utilizada neste estudo foi *Spirulina* sp. LEB 18 (MORAIS et al., 2008c) mantida em meio Zarrouk (ANEXO I, Tabela A1) (ZARROUK, 1966). A cepa pertence à Coleção de Culturas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (Figura 1).

Figura 1 - Micrografia da microalga Spirulina sp. LEB 18 (aumento de 400X)



Fonte: Laboratório de Engenharia Bioquímica - LEB - FURG

2.2 Adaptação do inóculo

O inóculo de *Spirulina* sp. LEB 18 utilizado nos cultivos foi previamente adaptado ao CO_2 como fonte de carbono. A adaptação consistiu na inoculação das células em meio de cultivo Zarrouk sem NaHCO₃ e, em seguida o CO_2 comercial (pureza mínima 99,0%) foi injetado a uma vazão específica de alimentação de 0,12 mL_{CO2}.mL_{meio}⁻¹.d⁻¹ (1 min, a

cada 2 h na fase clara) controlada por medidores de vazão (COLE PARMER - Illinois - USA).

2.3 Condições experimentais

Os ensaios foram realizados em duplicatas e conduzidos em modo descontínuo em fotobiorreatores tubulares verticais (FBRTv) de 2 L (0,075 m de diâmetro e 0,60 m de altura) (MORAIS; COSTA, 2007a) (Figura 2), com volume de trabalho de 1,7 L, mantidos a 30 °C, fotoperíodo 12 h claro/escuro, iluminância de 41,6 µmol_{fótons}. m⁻².s⁻¹, durante 15 d.

No período claro, o ar comprimido responsável pela agitação dos cultivos foi enriquecido com CO_2 comercial. A taxa específica de alimentação com CO_2 para todos os ensaios foi mantida em 0,14 m L_{CO2} .m L_{meio}^{-1} .d⁻¹, sendo injetado nos cultivos por 2 min, a cada 1 h, durante o período claro.

Figura 2 – Diagrama esquemático dos cultivos realizados em fotobiorreatores tubulares verticais com as configurações de difusores utilizados no trabalho: (1) cilindro de CO₂ comercial (23 kg e 99,0 % de pureza mínima), (2) válvula do cilindro, (3) manômetro e medidor de vazão, (4) válvula solenoide, (5) compressor de ar, (6) rotâmetros, (7) fotobiorreatores tubulares verticais de 2 L, (8) amostrador, (9) difusor pedra sinterizada, (10) difusor madeira porosa, (11) difusor cortina porosa e (12) difusor anel perfurado



Nesse estudo avaliou-se 2 (duas) vazões específicas de injeção da corrente gasosa (0,05 e 0,3 vvm (volume da corrente gasosa. volume de meio⁻¹. min⁻¹)) aplicadas a 4 (quatro) configurações de difusores. Os difusores utilizados foram pedra sinterizada (difusor padrão para o fotobiorreator tubular vertical) (área = 4,72. 10^{-3} m²), cortina porosa (área = 7,1. 10^{-3}

m²), anel perfurado (27 orifícios, $d_{orifício} = 1. 10^{-3}$ m e área = 2,12. 10^{-5} m²) e madeira porosa (área = 5,88. 10^{-4} m²) (Figura 3). As pressões de trabalho para a injeção da corrente gasosa nos ensaios foram de 1,5 bar para a vazão de 0,05 vvm e 2 bar para a vazão 0,3 vvm.

Figura 3 – Configurações de difusores utilizados no trabalho: (a) pedra sinterizada, (b) cortina porosa, (c) anel perfurado e (d) madeira porosa



2.4 Determinações analíticas

2.4.1 Concentração celular

A concentração celular foi determinada pela densidade óptica a 670 nm em espectrofotômetro digital a cada 24 h (QUIMIS Q798DRM, Diadema - SP - Brasil), a partir de uma curva de calibração que relaciona densidade óptica com peso seco de biomassa (COSTA et al., 2002).

2.4.2 Alcalinidade total, pH e concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID)

A alcalinidade total dos cultivos foi determinada por titulação potenciométrica a cada 72 h e o pH a cada 24 h por medição direta da amostra com pHmetro digital (PH-221, LUTRON - Taiwan) segundo metodologia oficial (APHA, 1998).

A concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID) no meio foi calculada a cada 72 h, a partir das frações de ionização, com os valores de pH e alcalinidade total determinados experimentalmente como proposto por Carmouze (1994).

2.4.3 Coeficiente volumétrico de transferência de massa (k_La)

O coeficiente volumétrico de transferência de massa do CO_2 ($k_{L}a_{CO2}$) (h^{-1}) foi determinado em sistema CO_2 e água destilada (ausente de células) a 30 °C nos mesmos fotobiorreatores utilizados nos cultivos, para cada configuração de difusor e vazões

específicas de alimentação da corrente gasosa (0,05; 0,1 e 0,3 vvm). A concentração de CO_2 injetada foi a mesma utilizada nos ensaios com células. O k_La do CO_2 foi determinado segundo metodologia proposta por Talbot, Lencki e La Nouie (1990) por meio de fator de conversão envolvendo as difusividades do dióxido de carbono (D_{CO2} , $m^2.s^{-1}$) e do oxigênio (D_{O2} , $m^2.s^{-1}$) em água para a respectiva temperatura, sendo possível determinar o k_La do CO_2 por meio de determinações experimentais do k_La do O_2 (Equação 1).

$$k_{L}a_{co_{2}} = k_{L}a_{o_{2}} * \sqrt{\frac{D_{co_{2}}}{D_{o_{2}}}}$$
(1)

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LaO2}) foi determinado por método dinâmico (SCHMIDELL et al., 2007) que consistiu primeiramente no borbulhamento de nitrogênio gasoso ($N_{2(g)}$) para a expulsão do O_2 do meio líquido e em seguida no borbulhamento com ar nas condições experimentais adotadas até que se atingisse a concentração de saturação do O_2 . Os ensaios foram realizados em triplicata e consistiram na determinação da concentração do O_2 dissolvido no meio líquido (água destilada) utilizando sonda (HANNA INSTRUMENTS HI9146, São Paulo - SP – Brasil), sendo as leituras realizadas a 30 °C.

2.5 Recuperação da biomassa

Ao atingir o final dos experimentos a biomassa foi recuperada do meio líquido por centrifugação (HITACHI himac CR-GIII, Tóquio - Japão) (15200 g, 20 °C, 15 min), ressuspendida em água destilada e novamente centrifugada nas mesmas condições, para remoção dos sais do meio de cultivo. A biomassa concentrada foi congelada a -80 °C por 48 h, liofilizada e posteriormente armazenada a -20 °C.

2.6 Análise elementar e proximal da biomassa

As concentrações de carbono (C), nitrogênio (N) e hidrogênio (H) na biomassa foram determinadas em analisador elementar (PERKIN ELMER 2400, USA) utilizando-se como material de referência certificado a acetanilida (BAUMGARTEN; WALLNER-KERSANACH; NIENCHESKI, 2010). A biomassa foi caracterizada quanto ao teor de proteínas, lipídios, carboidratos, umidade e cinzas. O teor de proteínas foi determinado pelo método colorimétrico proposto por Lowry et al. (1951). Os lipídios presentes na biomassa foram extraídos utilizando combinação dos solventes clorofórmio e metanol como proposto por Folch; Lees e Stanley, (1957), adaptado por Colla (2002) para a biomassa de *Spirulina*. O teor de carboidratos na biomassa foi quantificado pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). A umidade e o teor de cinzas foram determinados por metodologia oficial (AOAC, 2000).

2.7 Eficiência de transferência física de CO₂

A eficiência de transferência física de CO₂ (ϵ , %) no sistema CO₂-H₂O foi determinada pela razão entre o CO₂ transferido para o meio líquido e o CO₂ fornecido ao sistema (Equação 2), conforme descrito por Ramalho (1983), em que o k_La_{CO2} é coeficiente volumétrico de transferência de massa do CO₂ (h⁻¹), C_{CO2}^{SAT} é a concentração de saturação do CO₂ no meio líquido (g.L⁻¹), V_{útil} é o volume útil do fotobiorreator (L), Q é vazão de injeção da mistura gasosa (L.h⁻¹), Y_{CO2} é fração de CO₂ presente na corrente gasosa e M_{CO2} é massa molar do CO₂ (g.mol⁻¹).

$$\varepsilon = \frac{{}^{k} {}_{L}{}^{a} CO_{2} {}^{*} C_{CO_{2}}^{sat} {}^{*} V_{\acute{u}til}}{{}_{Q}{}^{*} {}^{Y}_{CO_{2}} {}^{*} \frac{1}{22,4} {}^{*} {}^{M}_{CO_{2}}} {}^{*} 100$$
(2)

2.8 Avaliação dos parâmetros de crescimento

A partir dos perfis de crescimento celular da microalga foram obtidas as concentrações celulares máximas ($X_{máx}$, g.L⁻¹) e avaliados os parâmetros cinéticos. A produtividade volumétrica de biomassa (P_x , mg.L⁻¹.d⁻¹) foi calculada segundo a Equação 3, em que X_t (mg.L⁻¹) é a concentração celular no tempo t (d) e X_0 (mg.L⁻¹) é a concentração celular no tempo t (d) e X_0 (mg.L⁻¹) é a concentração celular no tempo t (d) e X_0 (mg.L⁻¹) foi o máximo valor de produtividade volumétrica máxima de biomassa ($P_{máx}$, mg.L⁻¹.d⁻¹) foi o máximo valor de produtividade obtida por cada ensaio em cada batelada. A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$, d⁻¹) foi obtida pela regressão exponencial da fase logarítmica de crescimento da microalga. O tempo de geração (t_g , d) de células foi calculado conforme a Equação 4.

$$P_{X} = \frac{X_{t} - X_{0}}{t - t_{0}}$$
(3)

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{máx}}$$
(4)

2.9 Taxa de biofixação de CO₂

A taxa de biofixação de CO₂ (T_{CO2} , mg.L⁻¹.d⁻¹) foi calculada segundo a Equação 5, em que P_x (mg.L⁻¹.d⁻¹) é a produtividade volumétrica de biomassa determinada em cada ensaio, X_{cbm} é a fração mássica de carbono determinada por análise elementar na biomassa, M_{CO2} (g.mol⁻¹) e M_C (g.mol⁻¹) são as massas molares de CO₂ e do carbono, respectivamente. A máxima taxa de biofixação de CO₂ ($T_{CO2máx}$, mg.L⁻¹.d⁻¹) foi o máximo valor de biofixação obtido por cada ensaio em cada batelada.

$$T_{CO2} = P_X * X_{cbm} * \frac{M_{CO_2}}{M_C}$$
(5)

2.10 Eficiência de utilização do CO2

A eficiência de utilização do CO_2 (E_{CO2} , % m.m⁻¹) foi calculada segundo a Equação 6, em que T_{CO2} é a taxa de biofixação de CO_2 diária (mg.L⁻¹.d⁻¹), V_{útil} é o volume útil do fotobiorreator e m_{CO2} é taxa mássica de alimentação diária de CO_2 (mg.d⁻¹). A máxima eficiência de utilização de CO_2 ($E_{CO2máx}$, % m.m⁻¹) foi o máximo valor de eficiência obtido por cada ensaio em cada batelada.

$$E_{CO2} = \frac{(T_{CO2} * V_{\text{útil}})}{\dot{m}_{CO2}} * 100$$
(6)

2.11 Análise estatística

As respostas obtidas nos ensaios foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey para comparação entre médias com nível de 95 % de confiança.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Transferência de CO₂ para o sistema

A transferência de CO₂ para o sistema foi avaliada por meio coeficiente volumétrico de transferência de massa do CO₂ (k_{LaCO2}), determinado em quatro configurações de difusores e três vazões específicas (0,05; 0,1 e 0,3 vvm). O maior valor de k_{LaCO2} foi verificado para o difusor cortina porosa (123,2 h⁻¹) na vazão específica de 0,3 vvm.

De acordo com Schmidell et al. (2001) este aumento do k_La ocorre devido ao maior acúmulo de bolhas da corrente gasosa no meio líquido, este promovido pela maior vazão, favorecendo o aumento da área de transferência de massa. Zhang; Kurano e Miyachi (2002) também observaram acréscimo do k_La com o aumento da vazão específica (0,025 a 1 vvm), sendo verificado k_La_{CO2} de 177,3 h⁻¹ na vazão de 1 vvm com o difusor perfurado tipo tubulação de polietileno.

De acordo com Fan et al. (2007), o $k_{L}a_{CO2}$ é intensificado com o aumento da vazão de alimentação do gás. Além disso, a agitação turbulenta do líquido contribui para a movimentação das células na região adjacente à parede do fotobiorreator, promovendo assim uma utilização mais eficiente da luz pelas microalgas.

Figura 4 – Coeficiente volumétrico de transferência de massa do CO₂ (k_La_{CO2}) (a) e perfil eficiência de transferência física do CO₂ (ε) para o meio líquido (b) para as vazões específicas de alimentação da corrente gasosa nas diferentes configurações de difusores, pedra sinterizada (●), cortina porosa (○), anel perfurado (■) e madeira porosa (□).



O menor $k_{L}a_{CO2}$ foi verificado para o difusor anel perfurado na vazão específica de alimentação da corrente gasosa de 0,05 vvm. Talbot, Lencki e La Nouie (1990) verificaram que menores vazões específicas aplicadas a difusores perfurados resultam em menores valores para o $k_{L}a_{CO2}$. Isto se deve ao menor acúmulo de bolhas no meio líquido, ocasionado pelo menor número de bolhas com maiores diâmetros e também a menores vazões aplicadas ao sistema, diminuindo assim a área interfacial de troca.

As máximas eficiências físicas de transferência (Figura 4b) foram verificadas para os difusores pedra sinterizada (23,5 %) e cortina porosa (26,0 %) na menor vazão específica (0,05 vvm). Os resultados encontrados no presente trabalho são corroborados por Talbot, Lencki e La Nouie (1990), os quais afirmaram que altas vazões específicas resultam em uma redução dos valores de ε para o meio líquido.

Camerini (2008) em estudos da avaliação da transferência do CO_2 verificou a dependência linear do k_La com a vazão específica de injeção de CO_2 empregada. Segundo o autor em ensaios com sistema CO_2 -H₂O em biorreatores tipo *Raceway*, observou-se que quanto maior é a vazão específica mais alto é o k_La obtido, partindo de 3,7 h⁻¹ (0,05 vvm) até 14,3 h⁻¹ (0,2 vvm) demonstrando que a transferência de CO_2 tem relação com a vazão empregada. No entanto, este observou que do CO_2 injetado no meio, em média, 89,5 % era transferido para o meio líquido quando utilizada a vazão específica mais baixa (0,05 vvm).

A máxima eficiência de transferência física de CO_2 obtida no presente estudo é corroborada por Camerini (2008) para a vazão de 0,05 vvm. Conforme com Fan et al. (2007) em menores vazões é verificado maior tempo de residência do gás na fase líquida e bolhas de menor diâmetro, fatos que contribuem para o aumento da transferência de massa do CO_2 para o meio de cultivo.

3.2 Perfis de crescimento celular, carbono inorgânico dissolvido e pH

As Figuras 5, 6 e 7 mostram os perfis de crescimento celular, concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID) e pH, respectivamente, para os ensaios com *Spirulina* sp. LEB 18 nas vazões específicas de alimentação da corrente gasosa de 0,05 e 0,3 vvm para as diferentes configurações de difusores.

A microalga *Spirulina* apresentou crescimento celular para todas as condições experimentais adotadas no presente estudo (Figura 5a e 5b). Os ensaios não apresentaram fase *lag* de crescimento, devido à prévia adaptação do inóculo com o CO_2 como fonte de carbono. Para a vazão de 0,05 vvm os ensaios com os difusores pedra sinterizada e cortina porosa

apresentaram fase exponencial de crescimento entre o 1° e o 4° d de cultivo e para os difusores madeira porosa e anel perfurado entre o 1° e o 5° d (APÊNDICE, Figura AP1). Também foi verificada desaceleração do crescimento no 14° d, demonstrando tendência à fase estacionária (Figura 5a).

Na vazão de 0,3 vvm, todos os ensaios apresentaram fase exponencial entre o 1°e o 4° d de crescimento (APÊNDICE, Figura AP2), sendo que os ensaios com os difusores pedra sinterizada e madeira porosa não apresentaram desaceleração do crescimento e fase estacionária. Contudo, os ensaios com a cortina porosa e o anel perfurado atingiram a fase estacionária a partir do 13° e 14° d de ensaio, respectivamente (Figura 5b).

Figura 5 – Perfis de crescimento celular para as vazões específicas de alimentação da corrente gasosa de 0,05 vvm (a) e 0,3 vvm (b) para as diferentes configurações de difusores, pedra sinterizada (●), cortina porosa (○), anel perfurado (■) e madeira porosa (□)



A respeito do CID no meio de cultivo, este é composto de CO_2 , HCO_3^- e CO_3^{-2-} (TRIMBORN et al., 2008) e representa a fonte de carbono para o crescimento das microalgas (TANG et al., 2011). Para a vazão de 0,05 vvm os perfis de CID (Figura 6a) apresentaram variabilidade entre as configurações de difusores empregadas. Para os ensaios utilizando a pedra sinterizada e madeira porosa, foi verificado aumento ao longo dos 12 d de cultivo e decréscimo no 15° d. Contudo, o crescimento da microalga *Spirulina* não foi influenciado nos tempos finais pela variabilidade da concentração de carbono inorgânico no meio de cultivo. No ensaio utilizando o anel perfurado a concentração de CID no meio permaneceu na faixa de 49,6 a 77,3 mg.L⁻¹, representando a menor faixa entre os demais ensaios. A menor disponibilidade de carbono por esta configuração de difusor apresentou influência sobre o perfil de crescimento da microalga, sendo o menor em relação aos demais perfis de crescimento obtidos. No entanto, em 15 d de cultivo o ensaio com a cortina porosa apresentou acréscimo de 82,2 mg.L⁻¹ na concentração de CID, sendo o maior aumento verificado entre as configurações de difusores empregadas no cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 para a vazão de 0,05 vvm.

Figura 6 – Perfis da concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID) para as vazões de 0,05 vvm (a) e 0,3 vvm (b) para as diferentes configurações de difusores da corrente gasosa, pedra sinterizada (●), cortina porosa (○), anel perfurado (■) e madeira porosa (□)



Por meio da Figura 6b, nota-se que a concentração de CID no meio para a vazão de 0,3 vvm aumentou durante os 15 d de cultivo de forma semelhante para os ensaios com a pedra sinterizada, cortina porosa e madeira porosa. A máxima concentração de CID no meio foi verificada no ensaio com a cortina porosa (159,8 \pm 1,2 mg.L⁻¹) no último dia de experimento, demonstrando que o emprego desse difusor na injeção de CO₂ em cultivos de *Spirulina* pode proporcionar maiores concentrações de CID no meio de cultivo. Todavia, para o ensaio com a cortina porosa foi verificado os menores valores de concentração celular, demonstrando que nem todo o carbono dissolvido no meio de cultivo é absorvido pela microalga.

De acordo com Chiu et al. (2011), podem ocorrer flutuações na concentração de CID ao longo dos intervalos das injeções. No presente estudo este comportamento é verificado, pois no momento da alimentação dos cultivos com CO_2 ocorre redução do pH e aumento da concentração de CID no meio, devido à absorção da fonte de carbono pelo microorganismo. Passados 30 min após a injeção, o pH do sistema é reestabelecido apenas pela injeção de ar e a concentração de CID se torna reduzida.

De acordo com os perfis da concentração de CID no meio nas condições avaliadas, foi possível observar que tanto a configuração do difusor utilizado para injeção da corrente gasosa quanto à vazão de alimentação da corrente gasosa empregada podem causar influência na disponibilidade da fonte de carbono para o micro-organismo.

Os valores de pH dos ensaios pedra sinterizada, cortina porosa e madeira porosa mantiveram-se no intervalo entre 8,0 e 10,0 para a vazão específica de 0,05 vvm. Para os ensaios com anel perfurado nas vazões de 0,05 e 0,3 vvm, a faixa de pH manteve-se entre 8,0-10,5 e 9,0 e 10,0, respectivamente, sendo superior aos demais ensaios (Figura 7 a).

Figura 7 – Perfis de pH para as vazões específicas de 0,05 vvm (a) e 0,3 vvm (b) para as diferentes configurações de difusores da corrente gasosa, pedra sinterizada (●), cortina porosa (○), anel perfurado (■) e madeira porosa (□)



O perfil do pH verificado neste ensaio pode estar relacionado à configuração deste difusor, que devido ao maior diâmetro dos poros, pode gerar bolhas com maior diâmetro com

baixa área interfacial de troca, contribuindo assim para a baixa transferência do CO_2 para o meio líquido.

Na vazão de 0,3 vvm (Figura 7b) foi verificado comportamento semelhante entre os perfis de pH, mantendo-se no intervalo entre 8,0 e 9,5 ao longo dos 15 d de cultivo para os difusores pedra sinterizada, cortina porosa e madeira porosa.

A injeção de CO_2 em cultivos microalgais pode causar a redução do pH do meio de cultivo, inibindo o crescimento celular. Tang et al. (2011) relataram a redução do pH de 8,7 para 5,2 com o aumento da concentração de CO_2 (0,03 para 50 % v.v⁻¹) injetado nos cultivos de *Chlorella pyrenoidosa* SJTU-2. Elevadas concentrações de CO_2 fornecidas aos cultivos podem causar a redução do pH do meio de cultura e com isso provocar o decréscimo da atividade da enzima extracelular anidrase carbônica presente nas microalgas, a qual é responsável pelo mecanismo de concentração do carbono.

Entretanto, esta redução do pH não foi verificada no presente estudo, isto devido às injeções serem conduzidas de forma intermitente.

A faixa de pH verificada nos ensaios foi a mesma indicada por Hu; Yair e Amos (1998) como favorável para a produção de biomassa de espécies de *Spirulina*, devido ao seu caráter alcalifílico esta cianobactéria tem sua taxa fotossintética aumentada em pH acima de 9,0.

De acordo com Clark e Flynn (2000), a forma predominante de CID em pH próximos a 11,0 é CO_3^{2-} , o qual não está disponível para as microalgas para ser utilizado na fotossíntese, podendo promover redução no crescimento do micro-organismo. Entretanto, mais de 98 % de CID está sob a forma de HCO_3^{-} em pH 8,0, enquanto que em pH 5,6 a principal forma é o CO_2 e o H_2CO_3 .

De acordo com a Tabela 1, os maiores resultados para a $X_{máx}$ de *Spirulina* sp. LEB 18 foram verificados para pedra sinterizada e cortina porosa na vazão de alimentação da mistura gasosa de 0,05 vvm, apresentando diferença significativa (p<0,05) entre os difusores madeira porosa e o anel perfurado.

	Vazão específica de alimentação (vvm)					
	0,05		0,3			
Difusor	X _{máx} ^(d) (g.L ⁻¹)	P _{máx} (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	X _{máx} ^(d) (g.L ⁻¹)	P _{máx} (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)		
Pedra sinterizada	$1{,}72\pm0{,}06^{(15^{\circ}d)a,A}$	$115,7 \pm 2,7^{a,A}$	$1,82\pm0,02^{(15^{\circ}d)a,B}$	$110,1 \pm 1,9^{a,B}$		
Cortina porosa	$1{,}73\pm0{,}05^{(14^{\circ}d)a,A}$	$125,9 \pm 5,3^{b,A}$	$1,\!29\pm0,\!01^{(13^{\circ}d)b,B}$	$89,7\pm0,7^{b,B}$		
Anel perfurado	$1,\!40\pm0,\!02^{(15^{\circ}d)b,A}$	$91,9\pm4,1^{c,A}$	$1,\!49\pm0,\!02^{(15^{\circ}d)c,B}$	$100,6 \pm 2,5^{c,B}$		
Madeira porosa	$1,\!62\pm0,\!03^{(14^{\circ}d)b,A}$	$113,8\pm4,0^{a,A}$	$1{,}55\pm0{,}03^{(15^{\circ}d)d,B}$	$97,0\pm2,3^{d,B}$		

Tabela 1 – Média \pm desvio padrão da concentração celular máxima (X_{máx}) e de produtividade volumétrica máxima (P_{máx}) para os cultivos *Spirulina* sp. LEB 18

(d) – tempo em que foi obtida a máxima concentração celular

Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna e letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha para a mesma resposta correspondem à diferença significativa (p<0,05) pelo Teste de Tukey.

O maior valor para $P_{máx}$ foi observado no ensaio com a cortina porosa, apresentando diferença significativa entre os demais difusores empregados (p<0,05), sendo este valor 40,4 % superior ao obtido no experimento utilizando a mesma configuração de difusor e vazão de 0,3 vvm.

Para as respostas $X_{máx}$ e $P_{máx}$ na vazão de 0,3 vvm os maiores valores foram verificados para o ensaio com a pedra sinterizada, apresentando diferença significativa (p<0,05) entre as configurações de difusores.

Ao verificar-se a influência da vazão para a mesma configuração de difusor, foi possível observar que para a resposta $X_{máx}$, o aumento da vazão de 0,05 para 0,3 vvm proporcionou acréscimo de 5,8 e 6,4 % para os cultivos com pedra sinterizada e anel perfurado, respectivamente. Entretanto, para os ensaios com a cortina porosa e madeira porosa o aumento da vazão resultou no decréscimo de 25,4 e 4,3 % da $X_{máx}$, respectivamente.

Para a $P_{máx}$, foi verificada redução de 4,8, 28,8 e 12,6 % desta resposta para os difusores pedra sinterizada, cortina porosa e madeira porosa, respectivamente com o aumento da vazão de alimentação. No entanto, para o cultivo com o difusor anel perfurado, o aumento da vazão específica de alimentação proporcionou aumento de 9,5 % na produtividade de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18.

O emprego de diferentes difusores, fornecendo a mesma taxa de alimentação de CO_2 a todos os ensaios, demonstrou que estes podem influenciar a cinética de crescimento da

microalga. Ryu, Oh e Kim, (2009) utilizaram difusores com diferentes diâmetros de poros (100-120 μ m, 40-50 μ m, 20-30 μ m e 5-10 μ m) para injeção de CO₂ nos cultivos da microalga *Chlorella* sp. Os autores observaram que o ensaio utilizando o difusor de maior diâmetro de poros apresentou baixas concentrações de biomassa, enquanto que para o difusor de menor diâmetro de poros (5-10 μ m) a máxima concentração celular foi verificada (2,58 g.L⁻¹). De acordo com Fan et al. (2008) para aumentar a transferência de CO₂ para o cultivo de microalgas é necessário ampliar a área de contato entre gás-líquido, reduzindo o tamanho das bolhas da corrente gasosa aspergida no interior do fotobiorreator.

Ao investigarem o efeito da injeção de diferentes concentrações de CO_2 (ar, 2, 5, 10 e 15 %; 0,25 vvm) no crescimento microalga *Nannochloropsis oculata*, Chiu et al. (2009) relataram $X_{máx}$ de 1,28 g.L⁻¹ com injeção de 2 % (v.v⁻¹) de CO₂, semelhante ao ensaio com a cortina porosa e inferior aos demais ensaios do presente estudo.

Os resultados de $X_{máx}$ e $P_{máx}$ verificados no corrente estudo são superiores aos relatados por Radmann et al. (2011). Estes autores verificaram $X_{máx}$ de 1,59 g.L⁻¹ e $P_{máx}$ de 0,08 g.L⁻¹.d⁻¹ em ensaios com *Spirulina* sp. em fotobiorreatores tubulares verticais em série, com vazão específica de 0,3 vvm e difusor pedra sinterizada para injeção de corrente gasosa (12 % v.v⁻¹ de CO₂, 60 ppm de SO₂ e 100 ppm de NO).

O maior valor de $P_{máx}$ foi verificado no ensaio utilizando a cortina porosa. Isso pode ter ocorrido devido à configuração porosa do difusor, apresentando menor diâmetro de poros e maior área superficial em relação aos demais difusores testados, com isso gerando bolhas menores e em maior número. Segundo Lam, Lee e Mohamed (2012), as bolhas de pequeno diâmetro facilitam a transferência do CO₂ para o cultivo devido a maior área de contato gás-líquido e maiores taxas de dissolução do gás no líquido. Além disso, as bolhas menores permanecem por mais tempo no meio de cultivo, visto que a velocidade de ascensão no líquido é menor que das bolhas maiores, minimizando as perdas do gás para atmosfera e melhorando a utilização do CO₂ pelo micro-organismo, resultando em maior produtividade da biomassa.

Além do fornecimento de CO_2 como fonte de carbono, a transferência de gases para o meio de cultivo pode influenciar no sistema de agitação dos biorreatores, evitando gradientes de concentração de nutrientes, exposição igualitária de luminosidade, controle de pH, assegurando a dissolução do CO_2 e remoção do O_2 acumulado no interior do biorreator (KUMAR et al., 2010; MOLINA GRIMA et al., 1999).
As máximas $\mu_{máx}$ e os menores t_g (Tabela 2) foram verificados para os cultivos com a pedra sinterizada em ambas as vazões empregadas, apresentando diferença significativa entre os demais ensaios (p<0,05).

Na vazão de 0,3 vvm, o emprego do anel perfurado para a alimentação da mistura gasosa dos cultivos, não só resultou na menor $\mu_{máx}$, como também no maior t_g diferindo estatisticamente (p<0,05) das demais configurações de difusores testadas. Com o aumento da vazão de 0,05 para 0,3 vvm foi verificado acréscimo significativo (p<0,05) no valor de $\mu_{máx}$ e redução no t_g de células nos cultivos com a pedra sinterizada, cortina porosa e madeira porosa.

Radmann et al. (2011) verificaram $\mu_{máx}$ e t_g em ensaio com *Spirulina* sp. LEB 18 na ordem de 0,22 d⁻¹ e 3,1 d, respectivamente. Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores tubulares verticais em série, com pedra sinterizada como difusor e vazão específica de 0,3 vvm e taxa de alimentação de CO₂ de 3,24 d⁻¹. No corrente estudo, utilizando as mesmas condições, como vazão e configurações de fotobiorreator e difusor, porém com taxa de alimentação de CO₂ (0,15 d⁻¹) 22 vezes menor que a empregada por Radmann et al. (2011), foram obtidos resultados superiores para $\mu_{máx}$ e menores t_g de células. Neste caso, fica evidenciado que o emprego de maiores taxas de alimentação de CO₂ não proporciona maiores velocidades de crescimento, pois podem ocorrer perdas de carbono para a atmosfera.

		alimentação (vvm)			
	0	,05	0,3		
Difusor	$\mu_{máx}$ (d ⁻¹)	t _g (d)	μ _{máx} (d ⁻¹)	t _g (d)	
Pedra sinterizada	$0,27 \pm 0,01^{a,A}$	$2,61 \pm 0,07^{a,A}$	$0,\!30\pm0,\!00^{a,B}$	$2{,}34\pm0{,}02^{a,B}$	
Cortina porosa	$0,24 \pm 0,03^{b,A}$	$2{,}97\pm0{,}40^{b,A}$	$0,\!28\pm0,\!00^{\mathrm{b},\mathrm{B}}$	$2,51 \pm 0,04^{b,B}$	
Anel perfurado	$0,23 \pm 0,01^{b,A}$	$3,\!00\pm0,\!09^{b,A}$	$0,\!24 \pm 0,\!01^{\mathrm{c,A}}$	$2,87 \pm 0,11^{c,A}$	
Madeira porosa	$0{,}24\pm0{,}01^{b,A}$	$2,91 \pm 0,12^{a,b,A}$	$0,\!27\pm0,\!01^{\text{b},B}$	$2{,}58\pm0{,}08^{\mathrm{b},\mathrm{B}}$	

Tabela 2 – Média \pm desvio padrão da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) e tempo de geração (t_g) para os cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18

Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna e letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha para a mesma resposta correspondem à diferença significativa (p<0,05) pelo Teste de Tukey.

3.3 Composição elementar, taxa de biofixação de CO2 e eficiência de utilização de CO2

Os resultados da composição elementar (CHN) da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 nas vazões de 0,05 e 0,3 vvm para as diferentes configurações de difusores estão apresentados na Tabela 3.

Em se tratando da composição elementar da biomassa, as maiores concentrações de C na vazão específica de alimentação da corrente gasosa de 0,05 vvm foram verificadas para os ensaios com a pedra sinterizada e a madeira porosa. Na vazão de 0,3 vvm, para os ensaios com a cortina porosa e anel perfurado foram observadas as menores concentrações de N na biomassa, apresentando diferença significativa (p<0,05) em relação às demais configurações de difusores testadas.

Vazão específica de alimentação (vvm)						
	0,05 0,3					
Difusor	C	N	H	C	N	H
	(% m.m)	(% m.m)	(% m.m)	(% m.m)	(% m.m)	(% m.m)
Pedra	$47,7 \pm 0,4^{a,b,A}$	$11,5 \pm 0,1^{a,A}$	$6,4 \pm 0,3^{a,A}$	$49,9 \pm 0,9^{a,A}$	$12,3 \pm 0,2^{a,B}$	$8,0 \pm 0,5^{a,A}$
Cortina	$45,\!4\pm1,\!0^{\mathrm{a},\mathrm{A}}$	$10,8\pm0,1^{\mathrm{a,A}}$	$6{,}0\pm0{,}2^{a,A}$	$47,5\pm0,\!4^{a,A}$	$11,5 \pm 0,1^{b,B}$	$7{,}6\pm0{,}1^{a,B}$
Anel	$45,6\pm1,0^{a,A}$	$10,8 \pm 0,6^{a,A}$	$6{,}3\pm0{,}1^{a,A}$	$46,5\pm0,9^{a,A}$	$11,2 \pm 0,3^{b,A}$	$6,6 \pm 0,7^{a,A}$
Madeira	$48,9\pm0,\!4^{b,A}$	$11,\!8\pm0,\!1^{a,A}$	$\textbf{6,6} \pm \textbf{0,1}^{a,A}$	$49{,}8\pm0{,}0^{a,A}$	$12,3 \pm 0,1^{a,B}$.	$\textbf{7,9} \pm \textbf{0,1}^{a,B}$

Tabela 3 - Média \pm desvio padrão das concentrações de carbono (C), nitrogênio (N) e hidrogênio (H) presentes na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18

Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna e letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha para a mesma resposta correspondem à diferença significativa (p<0,05) pelo Teste de Tukey.

O nitrogênio é um componente fundamental das três classes de substâncias estruturais das células, entre elas as proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintetizantes (clorofilas e ficobilinas). Sendo assim, este apresenta importância acentuada no cultivo de microalgas, por ser constituinte de diversas substâncias do metabolismo primário, podendo ser encontrado no interior das células em formas inorgânicas não assimiladas (nitrato, nitrito e amônio), cujas concentrações são altamente variáveis (LAVÍN; LOURENÇO, 2005).

Conforme Doucha e Lívanský (2006), a fonte de C é a principal entre as necessidades nutricionais para o crescimento de microalgas como a *Spirulina*, em vista de sua biomassa apresentar em torno de 45 a 50 % (m.m⁻¹) deste elemento em sua composição.

Correlações entre a produção de biomassa e a demanda da fonte de C demonstram que são necessários em torno de 1,65-1,8 g de CO_2 para a produção 1,0 g de biomassa.

Ao se observar a influência da vazão com respeito à configuração do difusor, pode-se verificar (Tabela 3) que o aumento desta variável de 0,05 para 0,3 vvm proporcionou aumento significativo (p<0,05) nas concentrações de N e H presentes na biomassa. Foram verificados aumentos de 7,0, 6,5 e 4,1 % na concentração de N para os ensaios com a pedra sinterizada, cortina porosa e madeira porosa, respectivamente. Para a concentração de H houve acréscimo de 26,6, e 19,7 % para os ensaios com a cortina porosa e madeira porosa, respectivamente.

Resultados superiores foram verificados no presente estudo em relação à composição elementar da biomassa quando comparados aos obtidos por Radmann et al. (2011) (C - 40,2 %; N - 7,3 % e H - 4,5 %). Este perfil da concentração elementar na biomassa demonstra que independentemente das condições utilizadas no presente trabalho, estas proporcionaram maior conversão dos nutrientes do meio de cultivo em biomassa microalgal.

De acordo com a Tabela 4, a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 obteve maiores resultados de T_{CO2} e E_{CO2} nos experimentos utilizando a pedra sinterizada, cortina porosa e madeira porosa como difusores na vazão específica de 0,05 vvm. Os ensaios utilizando estas configurações apresentaram diferença significativa (p<0,05) para T_{CO2} e E_{CO2} apenas em relação ao anel perfurado, que apresentou os menores resultados para estas respostas.

Na vazão de 0,3 vvm, as máximas respostas para T_{CO2} e E_{CO2} foram verificadas para o ensaio com a pedra sinterizada, apresentando diferença significativa (p<0,05) entre as demais configurações testadas. Apesar da vazão de 0,3 vvm ser 6 vezes maior e apresentar resultado semelhante aos difusores porosos na vazão de 0,05 vvm, deve-se levar em consideração que a aplicação de altas vazões nos cultivos de microalgas pode ser inviável economicamente, devido ao elevado gasto energético demandado pelo sistema.

	Vazão específica de alimentação (vvm)			
	0,05		0,3	
Difusor	T _{CO2máx} (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	E _{CO2máx} (% m.m ⁻¹)	$T_{CO2máx}$ (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	E _{CO2máx} (% m.m ⁻¹)
Pedra sinterizada	$202,3\pm5,8^{a,A}$	$79,3\pm2,3^{a,A}$	$203,3\pm1,9^{a,A}$	$79,8\pm0,7^{a,A}$
Cortina porosa	$209,6 \pm 7,5^{a,A}$	$82,2\pm3,0^{a,A}$	$157,7 \pm 3,7^{b,B}$	$61,\!2\pm0,\!4^{b,B}$
Anel perfurado	$153,8\pm9,6^{\mathrm{b,A}}$	$60,3\pm3,8^{b,A}$	$172,7 \pm 4,6^{c,B}$	$67,1\pm0,7^{c,B}$
Madeira porosa	$204,3\pm8,3^{a,A}$	$80,1\pm3,3^{a,A}$	$177,4 \pm 4,2^{c,B}$	$69,5 \pm 1,7^{c,B}$

Tabela 4 - Média \pm desvio padrão das T_{CO2máx} e E_{CO2máx} por *Spirulina* sp. LEB 18

Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna e letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha para a mesma resposta correspondem à diferença significativa (p<0,05) pelo Teste de Tukey.

Os ensaios com a cortina porosa e madeira porosa apresentaram redução significativa (p<0,05) de 24,8 e 13,2 % para $T_{CO2máx}$ e 25,5 e 13,2 % para $E_{CO2máx}$, respectivamente, quando a vazão sofreu incremento de 0,05 para 0,3 vvm. Verifica-se que esta redução pode estar associada ao tamanho e ao número de bolhas geradas por estes difusores, que em virtude do aumento da vazão produziram maior número de bolhas com maiores diâmetros, reduzindo o tempo de residência do gás no meio líquido e a área de transferência de massa.

Radmann et al. (2011) injetando 12 % (v.v⁻¹) de CO₂ com vazão específica de 0,3 vvm (3,24 d⁻¹) em cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18, *Chlorella vulgaris* LEB-106 e *Synechococcus nidulans* LEB-25 utilizando pedra sinterizada como difusor verificaram máximas taxas de biofixação de CO₂ de 150,0, 138 e 88,0 mg.L⁻¹.d⁻¹, respectivamente. Mesmo com menor taxa de alimentação de CO₂ no presente estudo, os maiores valores de T_{CO2} encontrados para todos os ensaios, independentemente da configuração de difusor empregada, foram superiores aos apresentados por estes autores.

A concentração de CO_2 de entrada no fotobiorreator é um dos fatores importantes na determinação da alimentação fonte de carbono aos cultivos microalgais. Grande parte do CO_2 injetado nos cultivos é perdida para a atmosfera quando a concentração no influente é acima de 2 % (CHIU et al., 2008). Neste contexto, Chai e Zhao (2012) verificaram eficiência de remoção de 94% da corrente gasosa utilizando como sistema de aeração o tanque de bolhas, quando esta era enriquecida com 5 % (v.v⁻¹) de CO_2 . Foi verificado também, que a eficiência de remoção de CO_2 caiu de 87 % para 68 %, quando a concentração de CO_2 aumentou de 10 % para 15 %, respectivamente. Cheng et al. (2006) cultivando *Chlorella vulgaris* em fotobiorreator e empregando sistema de membranas microporosas de fibra oca para a transferência do CO_2 , relataram remoção de 55 % de CO_2 em corrente gasosa enriquecida com 0,15 %.

A partir disso, observa-se que as configurações de difusores empregadas promoveram elevadas eficiências de utilização do CO_2 pela microalga *Spirulina* sp. LEB 18 comparadas às obtidas por Chiu et al., (2008), Chai e Zhao (2012) e Cheng et al., (2006).

3.4 Composição proximal da biomassa

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos na quantificação de proteínas e carboidratos na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 para as duas vazões específicas de alimentação da corrente gasosa, bem como para as quatro configurações de difusores testadas. De acordo com a Tabela 5, para a vazão de 0,05 vvm, a máxima concentração de proteínas foi verificada para o ensaio com a madeira porosa, apresentando diferença significativa em relação às demais configurações de difusores (p<0,05).

	Vazão específica de alimentação (vvm)			
	0	,05	0,3	
Difusor	Proteínas (% m.m ⁻¹)	Carboidratos (% m.m ⁻¹)	Proteínas (% m.m ⁻¹)	Carboidratos (% m.m ⁻¹)
Pedra sinterizada	$72,1 \pm 2,6^{a,A}$	$10,9\pm0,5^{a,A}$	$69,6 \pm 6,8^{a,A}$	$8,3\pm0,8^{a,A}$
Cortina porosa	$61,2 \pm 1,1^{b,A}$	$8,8\pm0,3^{a,A}$	$60,9\pm1,4^{a,A}$	$11,1 \pm 0,4^{b,B}$
Anel perfurado	$66,2\pm0,2^{\mathrm{b},\mathrm{A}}$	$10,1 \pm 1,8^{a,A}$	$68,6\pm4,7^{a,A}$	$11,9\pm0,8^{b,A}$
Madeira porosa	$78,6\pm0,1^{c,A}$	$8,7\pm0,7^{a,A}$	$75,1\pm0,\!4^{a,B}$	$8,0\pm0,5^{\mathrm{a,A}}$

Tabela 5 - Média \pm desvio padrão das concentrações de proteínas e carboidratos em base seca da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18

Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna e letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha para a mesma resposta correspondem à diferença significativa (p<0,05) pelo Teste de Tukey.

A concentração de proteínas é um fator importante na determinação do valor nutricional de microalgas. O cultivo da microalga *Spirulina* pode ser uma alternativa para a produção de proteínas para consumo humano e animal (SPOLAORE et al., 2006). Em meio de cultivo Zarrouk, em escala de bancada e piloto, a concentração de proteínas presente na biomassa de *Spirulina* pode atingir valores entre 62,0 % m.m⁻¹ (BORGES et al., 2013) e 86,0 % m.m⁻¹ (MORAIS et al., 2009), respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos foi possível observar que os difusores utilizados tem influência sobre produção de proteínas na biomassa, resultando em aumento de 9,0 % do conteúdo proteico para a vazão de 0,05 vvm e 7,9 % para a vazão de 0,03 vvm utilizando madeira porosa e comparando ao difusor padrão (pedra sinterizada) utilizado nos fotobiorreatores.

Com relação à concentração de carboidratos na biomassa com vazão de 0,05 vvm, não houve diferença significativa (p>0,05) em relação às configurações de difusores testadas. Resultados semelhantes para a concentração de carboidratos foram verificados para a biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 (11,7 \pm 1,9 %) por Margarites (2010) em estudos para a seleção de microalgas para a produção de bioetanol.

Quando empregada a maior vazão (0,3 vvm) as máximas concentrações de carboidratos foram verificadas para o anel perfurado e cortina porosa, apresentando diferença significativa (p<0,05) entre as demais configurações de difusores. O aumento do teor de carboidratos para os dois ensaios pode estar relacionado à fase de crescimento dos cultivos, que a partir do 13° e 14° d apresentaram tendência à fase estacionária. Segundo Lourenço (2006), quando ensaios em batelada são realizados, a tendência é aumentar as concentrações de carboidratos e reduzir as concentrações de proteínas ao longo do período de cultivo. Esse padrão está relacionado ao consumo de nitrogênio do meio de cultura na fase exponencial de crescimento, que em abundância estimula a produção de proteínas. No entanto, em menor disponibilidade na fase estacionária de crescimento, diminui a síntese de proteínas e estimula a produção de carboidratos.

Os carboidratos são derivados da fotossíntese a partir do metabolismo de fixação de carbono pelas microalgas (HO et al., 2011) e podem ser acumulados como materiais de reserva ou serem transformados em componentes das paredes celulares (CHEN et al., 2013; RANGEL-YAGUI et al., 2004; RISMANI-YAZDI et al., 2011). Estes polissacarídeos podem ser convertidos em açúcares fermentescíveis para a produção de bioetanol por meio de processo fermentativo (WANG; WANG; LIU, 2011). Neste contexto, Margarites (2010) obteve por processo fermentativo de carboidratos da microalga *Chlorella minutíssima* 5,4 g.L⁻¹ de bioetanol, tendo este processo eficiência 52,8 %. Este estudo demonstrou que o uso da biomassa microalgal pode representar um substrato promissor para a produção deste biocombustível, contribuindo assim com a matriz energética atual.

No ensaio com a madeira porosa, o aumento da vazão promoveu redução de 4,5 % no teor de proteínas da biomassa, apresentando diferença significativa (p<0,05) entre as vazões estudadas. Para o teor de carboidratos, os resultados demonstraram que a o aumento da vazão promoveu o incremento significativo (p<0,05) de 26 % deste componente na biomassa da microalga para o experimento com a cortina porosa.

Segundo Chen et al. (2013), a suplementação adequada de CO_2 aos cultivos de microalgas é um dos principais fatores que influenciam o acúmulo de carboidratos na biomassa. Neste contexto, Xia e Gao (2005) verificaram que a produção de carboidratos de *Chlorella pyrenoidosa* (9,30-21,0 % m.m⁻¹) e *Chlorella reinhardtii* (3,19-6,41 % m.m⁻¹) foi intensificada com o aumento da concentração de CO_2 na corrente gasosa (3-186 µmol.L⁻¹).

No entanto, muitos pesquisadores afirmam que o aumento da concentração de CO_2 , não só fornece uma maior quantidade da fonte de C para promover o crescimento das microalgas, mas também induz a síntese de proteínas, o que pode influenciar a fisiologia celular. De acordo com Brown et al. (1997) com algumas espécies de microalgas, o aumento da concentração de CO_2 resulta no aumento no teor de proteínas, podendo causar uma diminuição ou nenhuma alteração evidente no conteúdo de carboidratos da biomassa.

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos na quantificação de lipídios e cinzas na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 para as vazões específicas e configurações de difusores testadas.

De acordo com a Tabela 6, não houve diferença significativa (p>0,05) para o teor de cinzas presente na biomassa. A máxima concentração de lipídios na biomassa foi verificada para o ensaio utilizando a madeira porosa na vazão de 0,05 vvm, apresentando diferença significativa (p<0,05) em relação à pedra sinterizada e o anel perfurado.

O aumento da vazão promoveu redução significativa (p<0,05) de 21 % no teor de lipídios presentes na biomassa para o ensaio cortina porosa. Conforme com Lima e Sato (2001) a concentração média de minerais e lipídios presentes na biomassa de *Spirulina máxima* é de 8 e 6 % m.m⁻¹, respectivamente.

Vazão específica de alimentação (vvm)					
	0,	05	0,3		
Difusor	Cinzas (% m.m ⁻¹)	Lipídios (% m.m ⁻¹)	Cinzas (% m.m ⁻¹)	Lipídios (% m.m ⁻¹)	
Pedra sinterizada	$\textbf{5,2} \pm \textbf{0,7}^{a,A}$	$8,6\pm0,7^{a,A}$	$4,6\pm0,2^{a,A}$	$8,\!4\pm2,\!1^{a,A}$	
Cortina porosa	$13,3\pm5,2^{a,A}$	$9{,}7\pm0{,}0^{a,b,A}$	$6,7\pm0,8^{a,A}$	$7{,}7\pm0{,}5^{a,B}$	
Anel perfurado	$7,\!4\pm0,\!1^{a,A}$	$8,5\pm0,0^{a,A}$	$6,0\pm0,5^{\mathrm{a},\mathrm{A}}$	$9{,}3\pm1{,}0^{a,A}$	
Madeira porosa	$4,1\pm0,7^{a,A}$	$10,7\pm0,2^{b,A}$	$5{,}2\pm0{,}5^{a,A}$	$9{,}6\pm0{,}6^{a,A}$	

Tabela 6 - Média \pm desvio padrão das concentrações de cinzas e lipídios em base seca da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18

Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna e letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha para a mesma resposta correspondem à diferença significativa (p<0,05) pelo Teste de Tukey.

Depois das proteínas, a fração celular que ganha destaque na composição das microalgas são os lipídios, isto devido sua vasta aplicabilidade na produção de biocombustíveis como o biodiesel. Para intensificar a produção de lipídios na biomassa microalgal, o metabolismo biossintético pode ser desviado para a lipossíntese mediante modificações das condições de cultivo, como escassez da fonte de nitrogênio, temperatura, iluminância, fonte de carbono, entre outras (LIMA; SATO, 2001).

No período contemporâneo, os estudos estão focados no cultivo de microalgas que apresentem elevados teores de lipídios em sua composição, a fim de viabilizar a produção de biodiesel. Embora a microalga *Spirulina* não apresente elevadas concentrações de lipídios, isto pode ser compensado por sua alta taxa de crescimento celular e a facilidade de recuperação do meio líquido devido à estrutura filamentosa das células (RODRIGUES et al., 2010).

De acordo com Sydney et al. (2010), a injeção de 5 % (v.v⁻¹) de CO₂ utilizando como difusor o anel perfurado promoveu acúmulo de 42,3 % de proteínas, 11 % de carboidratos, 11 % de lipídios e 7,1 % de cinzas na biomassa da microalga *Spirulina platensis* LEB-52. No entanto, Anjos et al. (2013) estudando o efeito de vazão (0,1; 0,4; 0,7 vvm) e da concentração de CO₂ (2; 6; 10 %) no crescimento e produção de biocompostos pela microalga *Chlorella vulgaris*, verificaram que as condições empregadas não afetaram a composição bioquímica da microalga. Os autores ratificam que para haver acúmulo de biocompostos como lipídios e carboidratos na biomassa, seriam necessárias manipulações nas condições de cultivo que promovam uma situação de stress para as células.

4. CONCLUSÃO

Com este trabalho foi possível verificar que o emprego da cortina porosa como difusor e vazão de 0,05 vvm promoveu a máxima eficiência de transferência de CO_2 em sistema CO_2 -H₂O. No ensaio com *Spirulina* nas mesmas condições, a produtividade volumétrica de biomassa foi máxima e apresentou aumento de 40,4% em relação ao ensaio com a mesma configuração de difusor e vazão de 0,3 vvm.

O máximo teor de proteínas foi verificado no ensaio com o difusor madeira porosa na vazão específica de 0,05 vvm. O aumento da vazão de injeção da mistura gasosa de 0,05 para 0,3 vvm no ensaio com a cortina porosa contribui para o incremento do teor de carboidratos e na redução no conteúdo de lipídios na biomassa da microalga.

Quanto à biofixação de CO_2 foi possível observar que a aplicação de uma menor vazão (0,05 vvm) juntamente com o emprego de difusores porosos para alimentação da fonte de carbono no cultivo de *Spirulina* (pedra sinterizada, cortina porosa e madeira porosa) pode promover o aumento da eficiência de biofixação de CO_2 pela microalga.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANJOS, M.; FERNANDES, B. D.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; DRAGONE, G. Optimization of CO₂ bio-mitigation by *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 149–154, 2013.

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

BAUMGARTEN, M. G. Z.; WALLNER-KERSANACH, M.; NIENCHESKI, L. F. H. **Manual de Análises em Oceanografia Química**. 2^a ed, ed. FURG, 172p (145-150), Rio Grande, 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, n. 2, p. 277-287, 2013.

BROWN, M. R.; JEFFREY, S. W.; VOLKMAN, J. K.; DUNSTAN, G. A. Nutritional properties of microalgae for maricultura. **Aquaculture**, v. 151, p. 315–331, 1997.

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-RS, 2008.

CLARK, D. R.; FLYNN, K. J. The relationship between the dissolved inorganic carbon concentration and growth rate in marine phytoplankton. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 267, p. 953-959, 2000.

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

CHAI, X.; ZHAO, X. Enhanced removal of carbon dioxide and alleviation of dissolved oxygen accumulation in photobioreactor with bubble tank. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 360–365, 2012.

CHENG, L. H., ZHANG, L., CHEN, H. L.; GAO, C. J. Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. **Separation and Purification Technology**, v. 50, p. 324–329, 2006.

CHEN, C-Y.; ZHAO, X-Q.; YENC, H-W.; HOD, S-H.; CHENG, C-L.; LEE, D-J.; BAI, F-W.; CHANG, J-S. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 1-10, 2013.

CHIU, S. Y., KAO, C. Y., CHEN, C. H., KUAN, T. C., ONG, S. C.; LIN, C. S. Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3389–3396, 2008.

CHIU, S-Y.; KAO, C-Y.; TSAI, M-T.; ONG, S-C.; CHEN, C-H.; LIN, C-S. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 833-838, 2009.

CHIU, S-Y.; KAO, C-Y.; HUANG, T-T.; LIN C-J.; ONG, S-C.; CHEN, C-D.; CHANG, J-S.; LIN C-S. Microalgal biomass production and on-site bioremediation of carbon dioxide, nitrogen oxide and sulfur dioxide from flue gas using *Chlorella* sp. cultures. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9135–9142, 2011.

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 de Mestrado (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande-RS, 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, n. 7, 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 and Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, 2002.

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.

DOUCHA, J.; LIVANSK'Y, K; Productivity, CO₂/O₂ exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella* sp.) photobioreactors operated in a Middle and Southern European climate. **Journal of Applied Phycology**, v. 18, p. 811-826, 2006.

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.

FAN, L.; ZHANG, Y.; CHENG, L.; ZHANG, L.; TANG, D.; CHEN, H. Optimization of carbon dioxide fixation by *Chlorella vulgaris* cultivated in a membrane-photobioreactor. **Chemical Engineering & Technology**, v. 30, n. 8, p. 1094–1099, 2007.

FAN, L. H.; ZHANG, Y. T.; ZHANG, L.; CHEN, H. L. Evaluation of a membrane-sparged helical tubular photobioreactor for carbon dioxide biofixation by *Chlorella vulgaris*. Journal of Membrane Science, v. 325, p. 336–345, 2008.

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.

HO, S-H.; CHEN, C-Y.; LEE D-J.; CHANG J-S. Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems - A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 189-198, 2011.

HU, Q.; YAIR, Z.; AMOS, R. Combined effects of light intensity, light path and culture density on output rate of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). **European Journal of Phycology**, v. 33, p. 165-171, 1998.

KUMAR, A., ERGAS, S., YUAN, X., SAHU, A., ZHANG, Q., DEWULF, J., MALCATA, F. X.; LANGENHOVE, H. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. **Trends in Biotechnology**, v. 28, p. 371-380, 2010.

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

LAVÍN, P. L.; LOURENÇO, S. O. An evaluation of the accumulation of intracellular inorganic nitrogen pools by marine microalgae in cultures. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 53, n. 1/2, p. 55-68, 2005.

LIMA, U. A.; SATO, S. *In*: SCHMIDELL, W. LIMA, U. A. AQUARONE, E. BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**, **Biotecnologia na produção de alimentos**, v. 4, Editora Edgard Blücher LTDA, São Paulo-SP, 2001, 541 p.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos, ed. RiMa, 2006, 606 p.

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.

MARGARITES, A. C. F. **Seleção e Cultivo de Microalgas para a Produção de Bioetanol**, 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande-RS, 2010.

MOLINA GRIMA, E.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G., GARCÍA CAMACHO, F.; CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scale up. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 231–247, 1999.

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.; 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, 2008a.

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.

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, n. 7, p. 1609-1612, 2008.

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.

RAMALHO, R. S. Introduction to Wastewater Treatment Processes. Academic Press, New-York, 1983, 580 p.

RANGEL-YAGUI, C. D.; DANESI, E. D. G.; DE CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 133–141, 2004.

RISMANI-YAZDI, H.; HAZNEDAROGLU, B. Z.; BIBBY, K.; PECCIA, J. Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels. **BMC Genomics**, v. 12, p. 148, 2011.

RODRIGUES, M. S.; FERREIRA, L. S.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. Fed-batch cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*: potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. **Bioresource Technology**, v. 101, 4491–4498, 2010.

RYU, H. J., OH, K. K.; KIM, Y. S. Optimization of the influential factors for the improvement of CO₂ utilization efficiency and CO₂ mass transfer rate. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 15, p. 471-475, 2009.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial, Engenharia Bioquímica.** v. 2, Editora Edgard Blücher LTDA, São Paulo-SP, 2001, 541 p.

SCHMIDELL, W.; SOARES, H. M.; ETCHEBEHERE, C.; MENES, R. J.; BERTOLA, N. C.; CONTRERAS, E. M. (Ed.). **Tratamento biológico de águas residuárias**, Tribo da Ilha, Florianópolis-SC, 2007.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, n. 101, p. 87-96, 2006.

SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 4316-4342, 2012.

SYDNEY, E. B.; STURM, W.; CARVALHO, J. C.; SOCCOL, V. T.; LARROCHE, C.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5892-5896, 2010.

TALBOT, P.; LENCKI, R. W.; LA NOUIE, J. Carbon dioxide absorption characterization of a bioreactor for biomass production of *Phormidium bohneri*: comparative study of three types of diffuser. **Journal of Applied Phycology**, v. 2, p. 341-350, 1990.

TANG, D., HAN, W.; LI, P.; MIAO, X.; ZHONG, J. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3071–3076, 2011.

TOLEDO-CERVANTES, A.; MORALES, M.; NOVELO, E.; REVAH, S. Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 652–658, 2013.

86

TRIMBORN, S.; LUNDHOLM, N.; THOMS, S.; RICHTER, K-U.; KROCK, B.; HANSEN, P. J.; ROST, B. Inorganic carbon acquisition in potentially toxic and Bernd non-toxic diatoms: the effect of pH-induced changes in seawater carbonate chemistry. **Physiologia Plantarum**, v. 133, p. 92–105, 2008.

XIA, J. R.; GAO, K. S Impacts of elevated CO₂ concentration on biochemical compo-sition, carbonic anhydrase, and nitrate reductase activity of freshwater green algae. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 47, p. 668–675, 2005.

YANG, C.-Y.; FANG, Z.; LI, B.; LONG, Y.-F. Review and prospects of *Jatropha* biodiesel industry in China. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 2178–2190, 2012.

WANG, G. Y.; WANG, X.; LIU, X. H. Two-stage hydrolysis of invasive algal feedstock for ethanol fermentation. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 53, p. 246–252, 2011.

ZHANG, K.; KURANO, N.; MIYACHI, S. Optimized aeration by carbon dioxide gas for microalgal production and mass transfer characterization in a vertical flat-plate photobioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 25, p. 97-101, 2002.

ZHAO, B.; SU, Y. Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 31, p. 121–132, 2014.

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.

ARTIGO II – DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE MEMBRANAS DE FIBRA OCA PARA O AUMENTO DA BIOFIXAÇÃO DE CO $_2$ POR MICROALGA

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE MEMBRANAS DE FIBRA OCA PARA O AUMENTO DA BIOFIXAÇÃO DE CO₂ POR MICROALGA

RESUMO

Diante da preocupação de todos com aquecimento global, associado às elevadas emissões de CO_2 , o processo de fixação de CO_2 por microalgas vem contribuir entre as tecnologias presentes para a redução de CO₂ em excesso na atmosfera. O presente trabalho teve por objetivo desenvolver um sistema composto por membranas de fibra oca (MFO) para alimentação de CO₂ ao cultivo de Spirulina sob dois modos de agitação e avaliar o seu desempenho por meio da eficiência de biofixação de CO₂, cinética de crescimento e composição da biomassa produzida. Para isso, a microalga foi cultivada em fotobiorreatores tubulares verticais de 2 L, com alimentação de CO₂ pelo sistema MFO na vazão de 0,025 vvm em dois modos de agitação (borbulhamento de ar e mecânica). Ensaios controle (CT) foram realizados com a pedra sinterizada como difusor para posterior comparação com os ensaios com membranas. A agitação dos cultivos por borbulhamento de ar foi promovida pela injeção de ar comprimido por difusor pedra sinterizada nas vazões específicas de 0,05 e 0,3 vvm. Com este estudo foi possível desenvolver e aplicar o sistema de MFO para alimentação de CO₂ no cultivo de Spirulina. O ensaio com borbulhamento de ar na vazão de 0,05 vvm e sistema de MFO promoveu maior acúmulo de carbono inorgânico dissolvido no meio de cultivo (127,4 \pm 6,1 mg.L⁻¹), os maiores resultados de produtividade de biomassa (131,8 \pm 1,9 mg.L⁻¹.d⁻¹), taxa de biofixação (231,6 \pm 2,1 mg.L⁻¹.d⁻¹) e eficiência de utilização de CO₂ por Spirulina (86,2 \pm 0,8 % m.m⁻¹). A máxima concentração de lipídios (11,9 \pm 0,6 % m.m⁻¹) na biomassa foi obtida no ensaio CT com vazão específica de ar de 0,3 vvm, representando um aumento de 65,3 % na fração lipídica em relação ao ensaio com MFO. A aplicação de menor vazão de ar para agitação (0,05 vvm) nos cultivos com MFO proporcionou aumento no teor de lipídios (58,3 %) na biomassa. Os resultados alcançados com o presente estudo demonstraram o potencial de aplicação das membranas de fibra oca no processo de remoção biológica de CO₂ por microalgas.

Palavras-chave: aquecimento global, dióxido de carbono, fotobiorreatores, membranas, microalgas.

ABSTRACT

Given the concern of everyone with global warming, associated with high CO₂ emissions, the process of CO₂ fixation by microalgae contributes among current technologies for the reduction CO₂ excess in the atmosphere. This study aimed to develop a system composed of hollow fiber membranes (HFM) for CO₂ feed to cultivation of *Spirulina* under two modes of stirring and evaluate its performance through CO₂ efficiency biofixation, growth kinetics and biomass composition produced. This way, microalga was cultured in vertical tubular photobioreactors with 2 L of CO₂ feed by the HFM system at a flow rate of 0.025 vvm stirring in two modes (air bubbling and mechanical). Control assay (CA) were conducted with diffuser sintered stone for further comparison of tests with membranes. Stirring of the cultures by aeration was promoted by injection of compressed air through diffuser stone sintered in specific flow of 0.05 and 0.3 vvm. This study made it possible to develop and apply the HFM system to CO₂ feed in the *Spirulina* cultivation. The assay with agitation for aeration at 0.05 vvm flow HFM system and increased the concentration of dissolved inorganic carbon in the

medium (127.4 \pm 6.1 mg L⁻¹), the major results of biomass productivity (131.8 \pm 1.9 mg L⁻¹ d⁻¹), rate biofixation (231.6 \pm 2.1 mg L⁻¹ d⁻¹) and CO₂ utilization efficiency by *Spirulina* (86.2 \pm 0.8 % w w⁻¹). The maximum lipids concentration (11.9 \pm 0.6 % w w⁻¹) in biomass was obtained at assay CA with specific air flow rate of 0.3 vvm, an increase of 65.3 % in the lipid fraction compared to HFM assay. The application of lower air flow for agitation (0.05 vvm) in cultures with HFM provided an increase in lipid content (58.3 %) in the biomass. The results achieved at the current study demonstrated the potential application of hollow fiber membranes in the biological removal of CO₂ by microalgae process.

Keywords: carbon dioxide, global warming, membranes, microalgae, photobioreactors.

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são micro-organismos fotossintéticos que não só podem ser empregados na captura de CO_2 por meio da fotossíntese, com também produzir biomassa, e por sua vez contribuir com a redução do efeito estufa na atmosfera. A biomassa produzida pode apresentar elevadas concentrações de compostos como lipídios, carboidratos, proteínas e pigmentos (ANJOS et al., 2013), tendo esta emprego direto, ou do composto extraído, na indústria de alimentos, cosméticos e na produção de biocombustíveis, gerando, assim, um bioprocesso cíclico em relação ao uso do carbono.

A fonte de carbono necessária para o cultivo de microalgas representa em torno de 60 % dos custos com os nutrientes do meio de cultivo (ALAVA; MELLO; WAGENER, 1997). O uso de fontes alternativas de carbono como o CO_2 emitido da queima de carvão em termelétricas, pode reduzir os custos com este nutriente. Assim é possível minimizar os problemas ambientais causados pelas emissões deste gás de efeito estufa na atmosfera, como o aquecimento global (COSTA; MORAIS, 2011; HUGHES; BENEMANN, 1997).

A alimentação de CO_2 ao cultivo de microalgas em biorreatores abertos ou fechados é realizada por sistemas convencionais de forma dispersiva como difusores porosos e perfurados localizados na parte inferior do biorreator (CARVALHO; MEIRELES; MALCATA, 2006; KUMAR et al., 2010). Por outro lado, a alimentação de CO_2 por estes sistemas está associada aos inconvenientes como perdas do gás por exaustão para a atmosfera e baixas eficiências de transferência de massa, devido às menores áreas interfaciais de troca e menores tempos de residência do gás no cultivo (CHAI; ZHAO; BAOYING, 2012; CHENG et al., 2006; KUMAR et al., 2010).

O aumento da eficiência de transferência do CO_2 para o cultivo de microalgas pode ser contemplado mediante a aplicação de tecnologias que promovam maior tempo de residência da fase gasosa na fase líquida e maior área de transferência de massa.

A utilização de membranas de fibra oca, em sistema dispersivo, pode atuar no sistema como aspersor para injeção de CO_2 , gerando microbolhas, as quais facilitariam a transferência deste gás para o meio líquido, mediante o aumento da área de contato gáslíquido e com isto reduzindo perdas do CO_2 para atmosfera. Assim, o emprego deste sistema pode contribuir para o aumento das taxas de fixação de CO_2 e produtividade de biomassa.

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver sistema composto por membranas de fibra oca para alimentação de CO₂ no cultivo de *Spirulina* sob dois modos de agitação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo, meio de cultivo e manutenção do inóculo

O micro-organismo utilizado foi a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 (MORAIS et al., 2008c), pertencente à Coleção de Culturas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), mantida em meio de cultivo Zarrouk (ANEXO I, Tabela A1) (ZARROUK, 1966).

O inóculo de *Spirulina* sp. LEB 18 utilizado nos cultivos foi mantido em meio de cultivo Zarrouk, sem bicarbonato de sódio (NaHCO₃) (fonte de carbono original do meio) e, com alimentação de CO₂ comercial (pureza mínima 99,0 %) a uma vazão específica de 0,12 mL_{CO2}.mL_{meio}⁻¹.d⁻¹ (1 min, a cada 1 h na fase clara), controlada por medidores de vazão (COLE PARMER – Illinois - USA).

2.2 Características das Membranas de Fibra Oca

Para a alimentação dos cultivos com CO₂ foi desenvolvido sistema utilizando membranas de fibra oca de microfiltração de poli(éter imida), geometria cilíndrica e camada externa seletiva (PAM, Rio de Janeiro RJ). As especificações das membranas comerciais utilizadas para a construção do sistema (Figura 1) estão apresentadas na Tabela 1.

Especificações	Valores
Tamanho médio de poro	0,4 μm
Diâmetro externo	0,9-1,0 mm
Comprimento	0,5 m

Tabela 1 – Especificações das membranas de fibra oca de microfiltração

Fonte: Pam Membranas Seletivas



Figura 1 - Micrografias da morfologia das fibras ocas: seção transversal (a) e superfície (b)

Fonte: Pam Membranas Seletivas

2.3 Desenvolvimento do sistema com membranas de fibra oca para injeção do CO2

Para a construção do sistema para injeção de CO_2 nos cultivos de *Spirulina*, as membranas foram agrupadas em um feixe vertical de 10 fibras, com comprimento médio de 0,5 m (Figura 2a), sendo a extremidade inferior obstruída com 2,5 cm mangueira de poliuretano e cola epóxi. A outra extremidade foi acondicionada em 15 cm mangueira de poliuretano preenchida com cola epóxi. Depois de transcorrido o período de 24 h para a secagem da cola, a extremidade superior das membranas foi desobstruída e o sistema foi conectado ao topo do reator por meio de uma conexão para a realização da alimentação do CO_2 pelas fibras (Figura 2b). Ao final do processo de construção, o comprimento médio exposto das fibras foi de 0,3 m, representando área lateral média de 9,42. 10^{-3} m².

Figura 2 – Sistema de Membranas de Fibra Oca (MFO) (a) e topo do reator para conexão da mangueira de alimentação do CO₂



2.4 Condições experimentais

2.4.1 Ensaios com as membranas de fibra oca (MFO) e a agitação por borbulhamento de ar

Os experimentos foram realizados em duplicatas a 30 °C, fotoperíodo 12 h claro/escuro, iluminância de 41,6 μ mol_{fótons}. m⁻².s⁻¹ em fotobiorreatores tubulares verticais (FBRTv) (0,075 m de diâmetro e 0,60 m de altura) de 2 L (MORAIS; COSTA, 2007a), com volume útil de 1,7 L, durante 15 d. Os ensaios foram conduzidos em regime de batelada alimentada com a fonte de carbono (CO₂ comercial). A agitação dos cultivos foi promovida por borbulhamento de ar, injetado através do difusor pedra sinterizada em duas vazões específicas de 0,05 e 0,3 vvm (volume de ar. volume de meio⁻¹. min⁻¹).

No período claro, a injeção de ar comprimido foi interrompida para que ocorresse a alimentação dos cultivos com CO₂ por borbulhamento através das membranas de fibra oca. O CO₂ foi alimentado aos cultivos na forma de pulsos (0,15 mL_{CO2}.mL_{meio}⁻¹.d⁻¹) (1 min, a cada 2 h, durante o período claro), a uma vazão específica de 0,025 vvm controlada por medidores de vazão (rotâmetros) (COLE PARMER – Illinois - USA) e pressão de 3 bar. A fim de aumentar o tempo de residência da fonte de carbono no meio líquido, a agitação dos ensaios foi interrompida 1 min antes e 1 min depois da adição de CO₂ aos cultivos, após o borbulhamento de ar foi reestabelecido.

2.4.2 Ensaio controle (CT)

Os ensaios controle (CT) com CO_2 foram realizados nas mesmas condições de cultivo dos ensaios com as membranas de fibra oca do item 2.4.1. Porém na fase clara, o ar comprimido responsável pela agitação dos cultivos por borbulhamento foi enriquecido com CO_2 comercial e injetado nos ensaios utilizando difusor pedra sinterizada na mesma taxa específica de alimentação diária de CO_2 (0,15 mL_{CO2}.mL_{meio}⁻¹.d⁻¹).

2.4.3 Ensaios com membranas de fibra oca (MFO) e agitação mecânica

Os ensaios com membranas de fibra oca (MFO) utilizando agitação mecânica foram realizados modo descontínuo em duplicatas em fotobiorreatores tubulares verticais de 2 L nas mesmas condições de cultivo do item 2.4.1. Porém, a agitação dos cultivos foi promovida por agitador magnético e barra magnética de teflon com rotação de 50 rpm, localizado na extremidade inferior do fotobiorreator. No período claro, o CO₂ foi alimentado aos cultivos por borbulhamento através das membranas de fibra oca na forma de pulsos (1 min, a cada 2 h, durante o período claro), a uma vazão específica de 0,025 vvm (volume de CO_2 .volume de meio⁻¹. min⁻¹) controlada por medidores de vazão (rotâmetros) (COLE PARMER – Illinois - USA) e pressão de 3 bar. A taxa específica de alimentação diária de CO_2 empregada foi a mesma dos itens 2.4.1 e 2.4.2 (0,15 mL_{CO2}.mL_{meio}⁻¹.d⁻¹).

2.4.4 Diagrama esquemático dos ensaios

A Figura 3 apresenta o diagrama esquemático dos ensaios com sistema de membranas de fibra e agitação por borbulhamento de ar por pedra sinterizada, controle com pedra sinterizada e sistema de membranas de fibra oca e agitação mecânica.

Figura 3 – Diagrama esquemático do fotobiorreator tubular vertical com sistema de membranas de fibra oca: (1) cilindro de CO₂ comercial (23 kg; 99,0 % de pureza mínima) (2) válvula do cilindro, (3) manômetro e medidor de vazão, (4) válvula solenoide, (5) compressor de ar, (6) e (7) medidores de vazão (rotâmetros), (8) fotobiorreatores tubulares verticais de 2 L, (9) amostrador, (10) difusor pedra sinterizada, (11) sistema de membranas de fibra oca, (12) barra magnética de teflon e (13) agitador magnético



2.5 Determinações analíticas

2.5.1 Concentração celular

A concentração celular foi determinada pela densidade óptica a 670 nm em espectrofotômetro digital (QUIMIS Q798DRM, Diadema - SP - Brasil), a partir de uma curva de calibração que relaciona densidade óptica com peso seco de biomassa (COSTA et al., 2002).

2.5.2 pH e a concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID)

O pH dos cultivos foi monitorado diariamente por medida direta com pHmetro digital (QUIMIS Q400AS, Diadema - SP - Brasil). A concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID) foi calculada a partir das frações de ionização, com os valores de pH e alcalinidade determinados experimentalmente, como proposto por Carmouze (1994). A alcalinidade foi determinada no meio a cada 72 h por medida potenciométrica (APHA, 1998).

2.6 Recuperação da biomassa do meio líquido

Ao final dos ensaios a biomassa foi recuperada do meio líquido por centrifugação (HITACHI himac CR-GIII, Tóquio - Japão) (15200 g, 20°C, 15 min), ressuspendida em água destilada e novamente centrifugada nas mesmas condições, para remoção dos sais do meio de cultivo. A biomassa concentrada foi congelada a -80°C por 48 h, liofilizada e posteriormente armazenada a -20°C.

2.7 Análise elementar da biomassa

A concentração de carbono (C, % m.m⁻¹) na biomassa foi determinada em analisador elementar CHNS/O (PERKIN ELMER 2400 - Série II - USA), utilizando-se como material de referência certificado a acetanilida (BAUMGARTEN; WALLNER-KERSANACH; NIENCHESKI, 2010).

2.8 Análise proximal da biomassa

2.8.1 Quantificação de proteínas

O teor de proteínas na biomassa foi determinado pelo método colorimétrico utilizando curva padrão de albumina de soro bovino (LOWRY et al., 1951).

2.8.2 Quantificação de lipídios

Os lipídios presentes na biomassa seca da microalga foram extraídos utilizando combinação dos solventes clorofórmio e metanol como proposto por Folch; Lees e Stanley, (1957), adaptado por Colla (2002) para biomassa de *Spirulina*.

2.8.3 Quantificação de carboidratos

O teor de carboidratos na biomassa foi determinado pelo método fenol-sulfúrico utilizando curva padrão de glicose (DUBOIS et al., 1956).

2.8.4 Quantificação de umidade e cinzas

Os teores de umidade e cinzas presentes na biomassa seca foram determinados por metodologia oficial (AOAC, 2000).

2.9 Avaliação dos parâmetros de crescimento

A partir dos perfis de crescimento celular da microalga foram obtidas as concentrações celulares máximas ($X_{máx}$, g.L⁻¹) e avaliados os parâmetros cinéticos. A produtividade volumétrica de biomassa (P_x , mg.L⁻¹.d⁻¹) foi calculada segundo a Equação 1, em que X_t (mg.L⁻¹) é a concentração celular no tempo t (d) e X_0 (mg.L⁻¹) é a concentração celular no tempo t (d) e X_0 (mg.L⁻¹) é a concentração celular no tempo t (d) e X_0 (mg.L⁻¹) foi o máximo valor de produtividade volumétrica máxima de biomassa ($P_{máx}$, mg.L⁻¹.d⁻¹) foi o máximo valor de produtividade obtida por cada ensaio em cada batelada. A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$, d⁻¹) foi obtida pela regressão exponencial da fase logarítmica de crescimento da microalga. O tempo de geração (t_g , d) de células foi calculado conforme a Equação 2.

$$P_{X} = \frac{X_{t} - X_{0}}{t - t_{0}} \tag{1}$$

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{máx}}$$
(2)

2.10 Taxa de biofixação de CO₂

A taxa de biofixação de CO₂ (T_{CO2} , mg.L⁻¹.d⁻¹) foi calculada segundo a Equação 3, em que P_x (mg.L⁻¹.d⁻¹) é a produtividade volumétrica de biomassa determinada em cada ensaio, X_{cbm} é a fração mássica de carbono determinada por análise elementar na biomassa, M_{CO2} (g.mol⁻¹) e M_C (g.mol⁻¹) são as massas molares de CO₂ e do carbono, respectivamente. A máxima taxa de biofixação de CO₂ ($T_{CO2máx}$, mg.L⁻¹.d⁻¹) foi o máximo valor de biofixação obtido por cada ensaio em cada batelada.

$$T_{CO2} = P_X * X_{cbm} * \frac{M_{CO_2}}{M_C}$$
 (3)

2.11 Eficiência de utilização do CO₂

A eficiência de utilização do CO_2 (E_{CO2} , % m.m⁻¹) foi calculada segundo a Equação 4, em que T_{CO2} é a taxa de biofixação de CO_2 diária (mg.L⁻¹.d⁻¹), V_{útil} é o volume útil do fotobiorreator (L) e m_{CO2} é taxa mássica de alimentação diária de CO_2 (mg.d⁻¹). A máxima eficiência de utilização de CO_2 ($E_{CO2máx}$, % m.m⁻¹) foi o máximo valor de eficiência obtido por cada ensaio em cada batelada.

$$E_{CO2} = \frac{(T_{CO2} * V_{\text{útil}})}{\dot{m}_{CO2}} * 100$$
(4)

2.12 Análise estatística

As respostas obtidas nos ensaios foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), com nível de 95% de confiança.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Perfil de crescimento e produtividade de biomassa de Spirulina sp. LEB 18

O perfil de crescimento celular mostrou que os ensaios, com exceção do ensaio com agitação mecânica, apresentaram crescimento durante os 15 d de cultivo (Figura 4a).

No ensaio com agitação mecânica e injeção de CO_2 pelas MFO foi possível observar que no sexto dia de cultivo ocorreu a morte celular. A ocorrência deste comportamento pode ter se dado pelo acúmulo da biomassa em torno das fibras (Figura 5c) provocando obstrução dos poros, dificultando a alimentação de CO_2 aos cultivos. O acúmulo da biomassa em torno das fibras pode estar associado à formação de vórtice no interior do fotobiorreator, ocasionado pela ausência de chicanas. De acordo com Schmidell et al. (2007) a fim de se evitar a formação de vórtice, usa-se sistemas de 4 chicanas, diametralmente opostas, apresentando cada uma largura de 1/10 ou 1/12 do diâmetro do biorreator.

Figura 4 – Perfis de crescimento celular (a) e produtividade volumétrica de biomassa (b) dos ensaios: membranas de fibra oca (MFO) nas vazões de ar de 0,05 ($^{\circ}$) e 0,3 vvm ($^{\circ}$); controle





pelas MFO (�)

De acordo com Chai, Zhao e Baoying (2012), os sistemas compostos por membranas de fibra oca podem apresentar algumas desvantagens, incluindo acúmulo de biomassa nos poros das membranas, padrão hidrodinâmico menos turbulento e taxa de mistura reduzida, podendo isto resultar na sedimentação da biomassa.

Figura 5 – Experimentos com agitação mecânica e injeção de CO₂ por MFO (a); membranas de fibra oca (MFO) e controle (CT) 0,05 vvm (b) e incrustações nas MFO no ensaio com agitação mecânica (c)



Para todos os cultivos, não foi verificada fase de latência (*lag*) de crescimento, devido à prévia adaptação do inóculo com CO₂ como fonte de carbono. A fase exponencial de crescimento (*log*) para todos os ensaios foi verificada entre o 1° e o 4° d de ensaios (APÊNDICE Figura AP3). Os ensaios CT, em ambas as vazões, apresentaram desaceleração do crescimento, demonstrando tendência à fase estacionária a partir do 13° d de cultivo (Figura 4a).

De acordo com Morais e Costa (2007a), o período de adaptação do inóculo de *Spirulina* sp. com 1 % (v.v⁻¹) de CO₂ a 0,3 vvm por 7 d contribuiu para a ausência da fase de latência nos ensaios, quando a microalga foi cultivada com concentrações maiores de CO₂ na corrente gasosa (6 e 12 % v.v⁻¹ de CO₂ a 0,3 vvm). Yun et al. (1997) relataram que culturas da microalga *Chlorella vulgaris* previamente adaptadas com 5 % de CO₂ a 0,4 mL.min⁻¹, apresentaram maior crescimento celular na presença de CO₂ a 15 % em comparação com culturas sem prévia adaptação.

O emprego de sistema com MFO para alimentação dos cultivos de microalgas com CO₂ mostrou-se promissor quanto aos resultados de crescimento celular e produtividade de biomassa conforme relatado por Fan et al. (2008), que verificaram em estudos com *Chlorella vulgaris* $X_{máx}$ de 0,9 g.L⁻¹ em 6,25 d de cultivo. Os resultados observados por estes autores foram semelhantes aos verificados no presente trabalho como os ensaios com MFO e CT na vazão de 0,05 vvm, que em 6 d atingiram concentrações em torno de 0,9 g.L⁻¹.

Os perfis de produtividade de biomassa (Figura 4b) a partir do 5° d de cultivo permaneceram constantes até o 15° d, encontrando-se na faixa de 0,10 a 0,13 g.L⁻¹.d⁻¹. Entretanto, o ensaio com agitação mecânica, devido à desaceleração do crescimento e morte celular apresentou redução da produtividade de biomassa a partir do 2° d de cultivo. Os resultados obtidos com as MFO e agitação por borbulhamento de ar demonstraram que este sistema pode ser utilizado para injeção de CO₂ no cultivo de microalgas sem perdas de produtividade de biomassa, quando comparados aos ensaios CT nas mesmas vazões de ar.

3.2 Perfis de pH e de acúmulo de carbono inorgânico dissolvido (CID) no meio de cultivo

Os valores de pH do ensaio com membrana de fibra oca (MFO) na vazão de ar de 0,05 vvm mantiveram-se no intervalo entre 8,0 e 8,5, sendo estes inferiores ao ensaio controle (CT) que permaneceu no intervalo entre 9,0 e 9,5 (Figura 6a). Para os ensaios na vazão de 0,3 vvm, tanto com as MFO quanto o CT o pH médio foi em torno de 9,0. O maior acúmulo de carbono inorgânico dissolvido (CID) no meio de cultivo (Figura 6b) também foi verificado no ensaio com o sistema de MFO na vazão de ar de 0,05 vvm (127,4 ± 6,1 mg.L⁻¹) seguido pelo ensaio CT com CO₂ para a mesma vazão (114,1 ± 9,6 mg.L⁻¹). O ensaio com MFO e menor vazão promoveu redução do pH e aumento do acúmulo de CID no meio. Assim, nesta condição empregada foi promovida maior dissolução de CO₂ no meio de cultivo.

No ensaio com MFO e agitação mecânica houve variação do pH, atingindo valores próximos a 11,8 e com isso não ocorreu acúmulo de carbono no meio de cultivo. Este comportamento pode ser justificado pela obstrução das fibras com biomassa e com isso impedindo o borbulhamento do CO_2 nos cultivos, resultando na morte celular.

De acordo com o mecanismo de concentração de carbono (CCM) nas microalgas, as formas CID mais importantes são o CO_2 e HCO_3^- , e estas estão intimamente relacionados com os valores de pH do meio de cultivo, devido a equilíbrios químicos reversíveis (ZHAO; SU, 2014).

Fan et al. (2007) relataram decréscimo do pH nos cultivos de *Chlorella vulgaris* em fotobiorreator com membranas (7,5) quando comparado aos biorreatores de coluna de bolhas (8,0) e *airlift* (8,0). Além disso, os autores também ratificam que em menores vazões

são verificados maiores tempos de residência do gás no meio líquido, com isso promovendo maior dissolução do CO_2 no meio de cultivo. No entanto, uma vez que o tempo de retenção diminuiu com o aumento da vazão do gás, maior parte do gás é perdida para atmosfera não sendo utilizado de forma eficiente pelas microalgas.

Figura 6 – Perfis de pH e acúmulo de carbono inorgânico dissolvido (CID) no meio dos ensaios: membranas de fibra oca nas vazões de ar de 0,05 vvm (○) e 0,3 vvm (△); controle nas vazões de ar de 0,05 vvm (●) e 0,3 vvm (▲) e agitação mecânica com injeção de CO₂ por membranas de fibra oca (♦)



Devido à morte celular dos ensaios com MFO e agitação mecânica, estes não foram avaliados quanto aos demais parâmetros descritos a seguir.

3.3 Cinética de crescimento da microalga Spirulina sp. LEB 18

A Tabela 2 apresenta os resultados de concentração celular máxima ($X_{máx}$), produtividade volumétrica máxima de biomassa ($P_{máx}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) e tempo de geração (t_g). Os maiores valores de $X_{máx}$ e $P_{máx}$ para *Spirulina* sp. LEB 18 foram verificados para o ensaio com MFO na vazão de 0,05 vvm, apresentando diferença significativa (p<0,05) em relação ao ensaio CT com a pedra sinterizada. A resposta $X_{máx}$ para a vazão de 0,3 vvm também apresentou diferença significativa (p<0,05) entre os ensaios, sendo verificado que o emprego das membranas promoveu aumento da concentração celular independente da vazão de ar empregada para a agitação dos cultivos de *Spirulina*.

Vazão de ar (vvm)	0,05		0,3		
Ensaio	MFO	СТ	MFO	СТ	
$X_{máx}^{(d)}(g.L^{-1})$	1,98±0,02 ^{(15°d)a,A}	1,79±0,03 ^{(15°d)b,A}	2,00±0,02 ^{(15°d)a,A}	$1,89\pm0,04^{(15^{\circ}d)b,B}$	
$P_{máx}(mg.L^{-1}.d^{-1})$	$131,8\pm1,9^{a,A}$	$120,\!4\pm2,\!4^{b,A}$	$127,9\pm4,3^{a,A}$	$132,2\pm1,0^{a,B}$	
$\mu_{m\acute{a}x} \left(d^{-1} \right)$	$0,\!31\pm0,\!02^{a,A}$	$0,\!30\pm0,\!01^{a,A}$	$0,\!28\pm0,\!01^{\mathrm{a},\mathrm{B}}$	$0,31 \pm 0,01^{b,A}$	
$t_{g}\left(d ight)$	$2{,}24\pm0{,}12^{a,A}$	$2,\!34\pm0,\!11^{a,A}$	$2{,}48\pm0{,}05^{a,B}$	$2,\!21\pm0,\!10^{\text{b},\text{A}}$	

Tabela 2 – Média \pm desvio padrão dos parâmetros de crescimento para os cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 obtidos nos ensaios com membranas de fibra oca (MFO) e ensaios controle (CT)

(d) - tempo em que foi obtida a máxima concentração celular

Letras minúsculas diferentes, em uma mesma linha, para cada vazão e letras maiúsculas diferentes entre as vazões correspondem à diferença significativa (p<0,05).

O aumento da vazão específica de ar de 0,05 para 0,3 vvm nos ensaios CT promoveu acréscimo de 9,8 % no valor de $P_{máx}$. Radmann et al. (2011) observaram $P_{máx}$ de 80 mg.L⁻¹.d⁻¹ para *Spirulina* sp. em ensaios conduzidos em fotobiorreatores tubulares em série e injeção de 12 % v.v⁻¹ de CO₂ pelo difusor pedra sinterizada. Pode-se observar que a aplicação do sistema de MFO e menor vazão de ar no presente estudo foi aproximadamente 39 % superior ao resultado obtido por Radmann et al. (2011). Isto evidencia que a aplicação do sistema de MFO pode contribuir para maior conversão do carbono fixado em biomassa microalgal.

O sistema composto por MFO contribui para a geração de microbolhas, aumentando a área de contato gás-líquido favorecendo assim a transferência de massa do CO_2 e O_2 (FAN et al., 2007). As microbolhas apresentam vantagens em relação às macrobolhas, devido a sua menor velocidade de ascensão, maior tempo de retenção do gás e também maior taxa de dissolução do gás na fase líquida (TERASAKA et al., 2011).

A máxima μ e o menor t_g de células (Tabela 2) foram observados no ensaio CT na vazão de 0,3 vvm, apresentando diferença significativa (p<0,05) entre o ensaio com MFO. No entanto, ao compararmos estes resultados aos obtidos com a vazão de 0,05 vvm não foi verificado diferença significativa entre estes parâmetros (p<0,05). Para a determinação do $\mu_{máx}$, a fase exponencial de crescimento foi delimitada entre o 1° e o 4° d de cultivo.

Morais e Costa (2007b) obtiveram t_g de 2,7 d para o cultivo de *Scenedesmus obliquus*, quando submetida à injeção de 6 % de CO₂ (1,6 d⁻¹) em fotobiorreatores tipo *Erlenmeyer*. Os resultados de t_g obtidos em todos os ensaios do presente estudo foram

inferiores aos relatados por Morais e Costa (2007b), indicando que as condições de cultivo aplicadas contribuíram para a redução do t_g , o que torna cultivo de microalgas economicamente promissor quanto à produção de biomassa.

O aumento da vazão específica de ar de 0,05 para 0,3 vvm para os ensaios com MFO resultou na redução da $\mu_{máx}$ e no aumento do t_g de células. Entretanto, no ensaio CT o aumento da vazão promoveu acréscimo de 5,6 e 9,8 % nos valores de X_{máx} e P_{máx}, respectivamente.

Sydney et al. (2010) relataram que o uso de anel perfurado como aspersor de CO₂ (5 % v.v⁻¹) em fermentador BIOFLO para o cultivo de *Spirulina* sp. LEB 52 resultou em $\mu_{máx}$ e t_g na ordem de 0,22 d⁻¹ e 3,12 d, respectivamente, sendo estes inferiores para $\mu_{máx}$ e superiores para t_g aos encontrados no presente trabalho.

3.4 Biofixação de CO₂ por Spirulina sp. LEB 18

As concentrações de carbono (C) presentes na biomassa e as taxas de biofixação e eficiência de utilização de CO_2 pela de microalga *Spirulina* sp. LEB 18 para os ensaios com o sistema de MFO e CT nas vazões específicas de ar de 0,05 e 0,3 vvm estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Média \pm desvio padrão das concentrações de carbono (C) na biomassa, taxa de biofixação de CO₂ e eficiência de utilização de CO₂ por *Spirulina* sp. LEB 18 nos ensaios com membrana de fibra oca (MFO) e ensaio controle (CT)

Vazão de ar (vvm)	0,05		0,3	
Ensaio	MFO	СТ	MFO	СТ
C (% m.m ⁻¹)	$47,9\pm0,\!4^{a,A}$	$46,2\pm0,2^{b,A}$	$46,2\pm0,0^{a,B}$	$47,3\pm0,9^{a,A}$
$T_{CO2m\acute{a}x} \left(\textbf{mg.L}^{\textbf{-1}}\textbf{.d}^{\textbf{-1}} \right)$	$231,6 \pm 2,1^{a,A}$	$203,7\pm3,6^{b,A}$	$216,7\pm7,4^{a,B}$	$229,3\pm4,7^{b,B}$
E _{CO2máx} (% m.m ⁻¹)	$86,2\pm0,8^{a,A}$	$75,8\pm1,3^{b,A}$	$80,7\pm2,7^{a,B}$	$85,3\pm1,8^{b,B}$

Letras minúsculas diferentes, em uma mesma linha, para cada vazão e letras maiúsculas diferentes entre as vazões correspondem à diferença significativa (p<0,05).

A concentração de carbono elementar (C) na biomassa de *Spirulina* manteve-se entre 46,2 e 47,9 %, apresentando diferença significativa (p<0,05) entre os ensaios MFO e CT para vazão de borbulhamento de ar de 0,05 vvm (Tabela 3). Em comparação entre as vazões de ar foi verificada diferença significativa (p<0,05) entre os ensaios com MFO. Conforme

relatado por Amaro, Guedes e Malcata (2011) e Borges et al. (2013) a biomassa microalgal pode apresentar em torno de 50 % m.m⁻¹ deste elemento em sua composição.

Quanto à máxima taxa de biofixação de CO_2 e a eficiência de utilização de CO_2 pela microalga *Spirulina* sp. LEB 18 (Tabela 3) os maiores resultados foram observadas no cultivo com vazão de ar de 0,05 vvm no sistema de MFO e 0,3 vvm no ensaio CT, apresentando diferença significativa em relação ao ensaio controle e com membranas, respectivamente, para a mesma vazão (p<0,05). Ao realizar a comparação entre vazões para a mesma configuração de difusor, foi observado aumento significativo de 12,6 e 12,5 % das respostas $T_{CO2máx}$ e $E_{CO2máx}$, respectivamente para o CT, quando a vazão utilizada passou de 0,05 para 0,3 vvm. Todavia, para o ensaio com MFO, o aumento da vazão de ar promoveu a redução significativa (p<0,05) de 6,5 e 6,4 % das respostas $T_{CO2máx}$ e $E_{CO2máx}$, respectivamente, quando a vazão utilizada passou de 0,05 para 0,3 vvm.

Apesar de serem verificadas elevadas taxas de biofixação e eficiência de utilização de CO_2 por *Spirulina* com o aumento da vazão no ensaio CT, diversos fatores devem ser consideradas a fim de se definir os parâmetros mais adequados ao processo. De acordo com Zhang; Kurano e Miyachi (2002) a aplicação de altas vazões de aeração aos cultivos de microalgas pode ser inviável do ponto de vista econômico, principalmente quando almeja-se o aumento de escala.

Além da vazão e a configuração dos difusores, a configuração do reator também pode influenciar a transferência de massa do CO_2 para o meio líquido e consequentemente afetar a absorção de carbono pela microalga e a produtividade de biomassa. Os fotobiorreatores tubulares verticais utilizados neste trabalho, além de apresentarem elevada área de superfície lateral, também apresentam maior altura de líquido quando comparados a reatores abertos. Este fato pode contribuir com o aumento da taxa fotossintética dos microorganismos e também para o aumento do tempo de residência no gás no cultivo.

Fan et al. (2007) utilizando sistema de membranas de fibra oca (MFO) a fim de substituir o difusor convencional (anel perfurado) no cultivo de *Chlorella vulgaris*, verificaram T_{CO2} de 6600 mg.L⁻¹.d⁻¹ pela microalga com sistema de MFO, sendo este valor 53 % superior ao ensaio que empregou o anel perfurado.

O emprego de MFO como sistema para injeção de CO_2 resultou em $E_{CO2máx}$ de aproximadamente 87 % no cultivo de *Spirulina* com vazão de ar de 0,05 vvm (Figura 7), tendo esta resposta relação com o perfil de crescimento da microalga (Figura 4a). Na Figura 7 é possível observar que durante a fase logarítmica de crescimento, esta delimitada entre o 1° e o 4° d de cultivo, a E_{CO2} aumentou continuamente atingindo eficiências entre 69 e 79 %.

Os apontamentos relatados no presente estudo são corroborados por Chai e Zhao (2012) em estudos com a microalga *Chlorococcum* sp., os quais verificaram comportamento semelhante entre o perfil de crescimento celular e a E_{CO2} pela microalga. Os autores observaram que a E_{CO2} aumentou continuamente com o tempo de cultivo, partindo de 75 % para o valor máximo de 88 %, este observado na fase logarítmica de crescimento.

Figura 7 – Perfis de E_{CO2} dos ensaios: MFO nas vazões específicas de ar de 0,05 ($^{\circ}$) e 0,3 vvm (Δ) e CT nas vazões específicas de ar de 0,05 ($^{\bullet}$) e 0,3 vvm (\blacktriangle)



3.5 Composição proximal da biomassa

As concentrações médias de proteínas e carboidratos na biomassa de *Spirulina* nos ensaios com MFO e CT para as duas vazões de ar mantiveram-se na faixa entre 65 e 72 % e 9,2 e 11,5 %, respectivamente, não sendo verificada diferença significativa entre os difusores e as vazões empregadas (p>0,05) (Tabela 4). Entretanto, os teores de proteínas presentes na biomassa estão de acordo com valores encontrados por Chang et al. (2013) que obtiveram 68 % no ensaio com meio Zarrouk e superiores a Ferreira et al. (2012) ao cultivarem *Spirulina platensis* com CO₂ proveniente de fermentação alcoólica (25,8 %) e CO₂ sintético (26,2 %). Isto mostra, que para todos os ensaios do presente estudo, não houve redução da concentração de proteínas na biomassa, mantendo-se semelhante aos teores encontrados quando *Spirulina* é cultivada em meio de cultivo padrão (Zarrouk).

Para os carboidratos, o máximo valor foi verificado para o ensaio CT na vazão de 0,05 vvm (11,5 %). Este comportamento pode ser justificado pelo perfil de crescimento celular (Figura 4a), que neste ensaio apresentou início da fase estacionária. Os resultados para o teor de carboidratos na biomassa estão de acordo com os encontrados por Margarites (2010) (11,5 %) e Sydney et al. (2010) (11 %) para a cepa de *Spirulina platensis* LEB-52.

Vazão de ar (vvm)	0,05		0,3		
Ensaio	MFO	СТ	MFO	СТ	
Proteínas (% m.m ⁻¹)	$64,9\pm5,7^{a,A}$	$69,5 \pm 1,4^{a,A}$	$72,2 \pm 3,1^{a,A}$	$70,7 \pm 2,9^{a,A}$	
Carboidratos (% m.m ⁻¹)	$9{,}2\pm0{,}0^{a,A}$	$11,5\pm0,8^{a,A}$	$9,2\pm0,2^{a,A}$	$9,7\pm0,1^{a,A}$	
Lipídios (% m.m ⁻¹)	$11,4\pm0,1^{a,A}$	$10,2 \pm 1,4^{a,A}$	$7,2\pm0,3^{a,B}$	$11,9\pm0,6^{b,A}$	
Cinzas (% m.m ⁻¹)	$10,8\pm4,0^{\mathrm{a},\mathrm{A}}$	$7{,}5\pm0{,}5^{a,A}$	$6,4 \pm 0,1^{a,A}$	$7,2\pm0,1^{b,A}$	

Tabela 4 - Média \pm desvio padrão das concentrações de proteínas, carboidratos, lipídios e cinzas em base seca da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18

Letras minúsculas diferentes, em uma mesma linha, para cada vazão e letras maiúsculas diferentes entre as vazões correspondem à diferença significativa (p<0,05).

De acordo com Cohen (1997), a fração lipídica corresponde entre 6 a 13 % (m.m⁻¹) para biomassa de *Spirulina*. No presente trabalho o teor de lipídios variou de 7,2 a 11,9 % na biomassa de *Spirulina*, indicando que a síntese desta macromolécula é influenciada pelas condições experimentais adotadas. Os resultados obtidos para os ensaios com membranas e controle na vazão de ar de 0,05 vvm e controle na vazão de 0,3 vvm foram superiores aos verificadas por Borges et al. (2013) (4,9 % m.m⁻¹) e Ferreira et al. (2012) (8,75 % m.m⁻¹) em cultivos com *Spirulina* sp. LEB 18 em meio Zarrouk e *Spirulina platensis* com injeção de CO₂, respectivamente.

As concentrações de lipídios (Tabela 4) nos ensaios CT e MFO na vazão de 0,3 vvm diferiram estatisticamente (p<0,05), sendo que o ensaio CT apresentou aumento de 65,3 % na fração lipídica da biomassa em relação ao ensaio MFO. Quanto à avaliação entre as vazões específicas de ar, foi verificado aumento de 58,3 %, quando a vazão foi reduzida de 0,3 para 0,05 vvm no ensaio com MFO.

A principal aplicação da biotecnologia microalgal consiste na produção de suplementos alimentares. No entanto, as microalgas estão também sendo investigadas quanto à produção de biocombustíveis (BRENNAN; OWENDE, 2009). Neste contexto, os resultados

do presente estudo mostram que a fração lipídica juntamente com a elevada produtividade de biomassa de *Spirulina*, são características que podem representar potencial para a produção de biocombustíveis, como o biodiesel.

A concentração de cinzas na biomassa (Tabela 4) apresentou diferença significativa (p<0,05) para os experimentos MFO e controle na vazão de ar de 0,3 vvm. Os resultados de teor de cinzas, estão de acordo com os encontrados por Sydney et al. (2010) (7,1 %) e Morais et al. (2009) (6,7 %) para a biomassa de *Spirulina platensis* LEB-52 cultivada em escala de bancada e 5 % de CO₂ e *Spirulina* sp. LEB 18 com meio de cultivo Zarrouk em escala piloto, respectivamente.

4. CONCLUSÃO

Com este estudo foi possível desenvolver e empregar o sistema de membranas de fibra oca (MFO) para alimentação de CO₂ no cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18. O sistema de membranas de fibra oca com vazão de ar de 0,05 vvm promoveu maior acúmulo de CID no meio de cultivo $(127,4 \pm 6,1 \text{ mg.L}^{-1})$ e os maiores resultados de produtividade de biomassa $(131,8 \pm 1,9 \text{ mg.L}^{-1}.d^{-1})$, taxa de biofixação de CO₂ $(231,6 \pm 2,1 \text{ mg.L}^{-1}.d^{-1})$ e eficiência de utilização de CO₂ por *Spirulina* (86,2 ± 0,8 % m.m⁻¹) quando comparadas ao ensaio controle (CT) para a mesma vazão. Em relação à composição proximal da biomassa, o ensaio CT na vazão específica de 0,3 vvm apresentou acréscimo de 65,3 % na fração lipídica da biomassa. Entre as vazões de ar, a fração lipídica aumentou 58,3 % quando esta foi reduzida de 0,3 para 0,05 vvm para o ensaio com MFO.

Os resultados obtidos demonstraram que a aplicação do sistema de MFO e menores vazões de aeração proporcionaram aumento das taxas de biofixação e eficiência de utilização de CO₂ por *Spirulina* sp. LEB 18, tendo influenciado a cinética de crescimento da microalga e composição da biomassa produzida.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAVA, D.; MELLO, P. C.; WAGENER, K. The relevance of the CO₂ partial pressure of sodium bicarbonate solutions for the mass cultivation of the microalga *Spirulina*. Journal of the Brazilian Chemical Society, v.8, p. 447-450, 1997.

AMARO, H. M.; GUEDES, A.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3402–10, 2011.

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

ANJOS, M.; FERNANDES, B. D.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; DRAGONE, G. Optimization of CO₂ bio-mitigation by *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 149–154, 2013.

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

BAUMGARTEN, M. G. Z.; WALLNER-KERSANACH, M.; NIENCHESKI, L. F. H. **Manual de Análises em Oceanografia Química**. 2^a ed, ed. FURG, p.145-150, Rio Grande, 2010, 172 p.

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, n. 2, p. 277-287, 2013.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 557-577, 2009.

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

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

CHAI, X.; ZHAO, X. Enhanced removal of carbon dioxide and alleviation of dissolved oxygen accumulation in photobioreactor with bubble tank. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 360–365, 2012.

CHAI, X.; ZHAO, Z.; BAOYING, W. Biofixation of carbon dioxide by *Chlorococcum* sp. in a photobioreactor with polytetrafluoroethene membrane sparger. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 7445-7453, 2012.

CHANG, Y. A.; WU, Z.; BIAN, L.; FENG, D.; LEUNG, D. Y. C. Cultivation of *Spirulina platensis* for biomass production and nutrient removal from synthetic human urine, **Applied Energy**, v. 102, p. 427–431, 2013.
CHENG, L. H.; ZHANG, L.; CHEN, H. L.; GAO, C. J. Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. **Separation and Purification Technology**, v. 50, p. 324–329, 2006.

COHEN, Z. The Chemicals of *Spirulina In*: VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira)* **Physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997, 252 p.

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-RS, 2002.

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 and Biotechnology**, v. 18, p. 603-607, 2002.

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.

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.

FAN, L.; ZHANG, Y.; CHENG, L.; ZHANG, L.; TANG, D.; CHEN, H. Optimization of Carbon Dioxide Fixation by *Chlorella vulgaris* Cultivated in a Membrane-Photobioreactor. **Chemical Engineering & Technology**, v. 30, n. 8, p. 1094–1099, 2007.

FAN, L. H.; ZHANG, Y. T.; ZHANG, L.; CHEN, H. L. Evaluation of a membrane-sparged helical tubular photobioreactor for carbon dioxide biofixation by *Chlorella vulgaris*. Journal of Membrane Science, v. 325, p. 336–345, 2008.

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.

HUGHES, E.; BENEMANN, J. Biological fossil CO₂ mitigation. **Energy Conversion and Management**, v. 38, p. 467–473, 1997.

KUMAR, A.; ERGAS, S.; YUAN, X.; SAHU, A.; ZHANG, Q.; DEWULF, J.; MALCATA, F. X.; LANGENHOVE, H. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. **Trends in Biotechnology**, v. 28, p. 371-380, 2010.

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.

MARGARITES, A. C. F. **Seleção e Cultivo de Microalgas para a Produção de Bioetanol**, 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande-RS, 2010.

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.; 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, 2008c.

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.

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.

SCHMIDELL, W.; SOARES, H. M.; ETCHEBEHERE, C.; MENES, R. J.; BERTOLA, N. C.; CONTRERAS, E. M. (Ed.). **Tratamento biológico de águas residuárias**, Tribo da Ilha, Florianópolis-SC, 2007.

SYDNEY, E. B.; STURM, W.; CARVALHO, J. C.; SOCCOL, V. T.; LARROCHE, C.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5892-5896, 2010.

TERASAKA, K.; HIRABAYASHI, A.; NISHINO, T.; FUJIOKA, S.; KOBAYASHI, D.; Development of microbubble aerator for waste water treatment using aerobic activated sludge. **Chemical Engineering Science**, v. 66, p. 3172–3179, 2011.

YUN, Y-S.; LEE, S.B.; PARK, J.M.; LEE, C-II.; YANG, J-W. Carbon Dioxide Fixation by Algal Cultivation Using Wastewater Nutrients. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 69, p. 451-455, 1997.

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.

ZHANG, K.; KURANO, N.; MIYACHI, S. Optimized aeration by carbon dioxide gas for microalgal production and mass transfer characterization in a vertical flat-plate photobioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 25, p. 97-101, 2002.

ZHAO, B.; SU, Y. Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 31, p. 121–132, 2014.

CAPÍTULO IV

6 CONCLUSÃO GERAL

A máxima eficiência de transferência de CO_2 para o meio líquido em sistema CO_2 -H₂O foi obtida na menor vazão específica e difusor cortina porosa, atingindo, em média 26,0 %. No ensaio com *Spirulina* nas mesmas condições, a produtividade volumétrica de biomassa foi máxima e apresentou aumento de 40,4% em relação ao ensaio com a mesma configuração de difusor e vazão de 0,3 vvm.

Quanto à biofixação de CO_2 foi possível observar que a aplicação de uma menor vazão (0,05 vvm) juntamente com o emprego de difusores porosos para alimentação da fonte de carbono no cultivo de *Spirulina* (pedra sinterizada, cortina porosa e madeira porosa) pode promover o aumento da eficiência de biofixação de CO_2 pela microalga.

Com relação à biomassa produzida, esta teve sua composição alternada pela aplicação de diferentes vazões e difusores.

Com o sistema de membranas de fibra oca desenvolvido para injeção de CO_2 nos cultivos de *Spirulina* aliando a agitação por borbulhamento com vazão especifica de ar de 0,05 vvm foi possível verificar maior acúmulo de carbono inorgânico dissolvido no meio de cultivo. Também nesta condição foram obtidos para os maiores resultados de produtividade de biomassa, taxa de biofixação de CO_2 e eficiência de utilização de CO_2 por *Spirulina*, quando comparados ao ensaio controle para a mesma vazão de ar.

A agitação mecânica aliada ao sistema de membranas de fibra oca não se mostrou adequada para o cultivo de *Spirulina* em fotobiorreatores tubulares verticais.

Tanto o sistema de MFO quanto o difusor convencional pedra sinterizada utilizados para injeção de CO_2 nos cultivos, nas vazões de ar de 0,05 e 0,3 vvm, respectivamente, contribuíram para o aumento na concentração de lipídios presentes na biomassa de *Spirulina*.

Diante do exposto, foi evidenciado que a aplicação de diferentes vazões tanto de alimentação da corrente gasosa quanto de aeração, juntamente com difusores porosos e sistema de MFO promoveram aumento de fixação de CO₂ pela microalga *Spirulina*. A partir disso, também foi verificada produção de biomassa enriquecida com compostos de interesse comercial, que pode vir a ser aplicada na produção de alimentos e de biocombustíveis.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar parâmetros de confecção e operação dos sistemas com membranas de fibra ocas hidrofílicas e hidrofóbicas;

- Aplicar os sistemas de membranas de fibra oca desenvolvidos no cultivo de microalgas em fotobiorreatores tubulares verticais e horizontais;

 Estudar a geração de microbolhas da corrente gasosa no processo de biofixação de CO₂ por microalgas;

- Estudar a aplicação de membranas de fibra oca em outros processos biotecnológicos;

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAVA, D.; MELLO, P. C.; WAGENER, K. The relevance of the CO₂ partial pressure of sodium bicarbonate solutions for the mass cultivation of the microalga *Spirulina*. Journal of the Brazilian Chemical Society, v.8, p. 447-450, 1997.

AMARO, H. M.; GUEDES, A.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3402–10, 2011.

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

ANDRADE, M. R., COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of Microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture** (Amsterdam), v. 264, p. 130-134, 2007.

ANDRADE, M. R. **Biossistema para produção de biomassa microalgal e biometano,** 2009. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande-RS, 2009.

ANJOS, M.; FERNANDES, B. D.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; DRAGONE, G. Optimization of CO₂ bio-mitigation by *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 149–154, 2013.

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

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

BAUMGARTEN, M. G. Z.; WALLNER-KERSANACH, M.; NIENCHESKI, L. F. H. **Manual de Análises em Oceanografia Química**. 2^a ed, ed. FURG, p 145-150, Rio Grande, 2010, 172p

BAYLESS, D. J.; KREMER, G. G.; PRUDICH, M. E.; STUART, B. J.; VIS-CHIASSON, M. L.; COOKSEY, K.; MUHS, J. Enhanced practical photosynthetic CO₂ mitigation. **Proceedings of the first national conference on carbon sequestration**, 5A4, p. 1-14, 2001.

BECKER, W. Microalgae Biotechnology and Microbiology, Cambridge University Press, 1994.

BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. *In* Richmond, A. (ed.), **Handbook** of microalgal culture. Blackwell, Oxford, p. 312–351, 2004.

BENEMANN, J. R. CO₂ mitigation with microalgae systems. **Energy Conversion Management**, v. 38, p. 475-479, 1997.

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.

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, n. 2 p. 277-287, 2013.

BP. **BP statistical review of world energy,** 2011. Acessado em novembro de 2012.

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, 2009.

BROWN, M. R.; JEFFREY, S. W.; VOLKMAN, J. K.; DUNSTAN, G. A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. Aquaculture, v. 151, p. 315-331, 1997.

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-RS, 2008.

CAMPBELL, M. K.; FARRELLL, S. O. **Bioquímica** - Tradução da 5ª ed. Norte-americana, v. 3, p. 717-741, ed. Thomson Learning Edições Ltda, 2006.

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

CAROLINO, L. R. V. **Cultivo de microalgas unicelulares para determinação da produção lipídica e sequestro de carbono**, 2011. Dissertação (Mestrado de Biologia celular e Biotecnologia) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2011.

CARVALHO, A. P.; MALCATA, F. X. Transfer of carbon dioxide within cultures of microalgae: plain bubbling versus hollow-fiber modules. **Biotechnology Progress**, v. 17, p. 265–271, 2001.

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

CARVALHO, L. F. **Desenvolvimento de novos alimentos para praticantes de atividade física adicionados ou não de** *Spirulina*, 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande-RS, 2010.

CHAE, S. R.; HWANG, E. J.; SHIN, H. S. Single cell protein production of *Euglena gracilis* and carbon dioxide fixation in an innovative photo-bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 322–329, 2006.

CHAI, X.; ZHAO, X. Enhanced removal of carbon dioxide and alleviation of dissolved oxygen accumulation in photobioreactor with bubble tank. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 360–365, 2012.

CHAI, X.; ZHAO, Z.; BAOYING, W. Biofixation of carbon dioxide by *Chlorococcum* sp. in a photobioreactor with polytetrafluoroethene membrane sparger. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 7445-7453, 2012.

CHANG, Y. A.; WU, Z.; BIAN, L.; FENG, D.; LEUNG, D. Y. C. Cultivation of *Spirulina platensis* for biomass production and nutrient removal from synthetic human urine, **Applied Energy**, v. 102, p. 427–431, 2013.

CHEN, C-Y.; ZHAO, X-Q.; YENC, H-W.; HOD, S-H.; CHENG, C-L.; LEE, D-J.; BAI, F-W.; CHANG, J-S. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 1-10, 2013.

CHENG, L. H.; ZHANG, L.; CHEN, H. L.; GAO, C. J. Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. **Separation and Purification Technology**, v. 50, p. 324–329, 2006.

CHISTI, M. Y. Airlift Bioreactors. Londres: Elsevier, 1989.

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

CHIU, S. Y., KAO, C. Y., CHEN, C. H., KUAN, T. C., ONG, S. C.; LIN, C. S. Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3389–3396, 2008.

CHIU, S. Y.; TSAI, M. T.; KAO, C. Y.; ONG, S. C.; LIN, C. S. The air-lift photobioreactors with flow patterning for high-density cultures of microalgae and carbon dioxide removal. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, p. 254-260, 2009.

CHIU, S-Y.; KAO, C-Y.; HUANG, T-T.; LIN C-J.; ONG, S-C.; CHEN, C-D.; CHANG, J-S.; LIN C-S. Microalgal biomass production and on-site bioremediation of carbon dioxide, nitrogen oxide and sulfur dioxide from flue gas using *Chlorella* sp. cultures. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9135–9142, 2011.

CLARK, D. R.; FLYNN, K. J. The relationship between the dissolved inorganic carbon concentration and growth rate in marine phytoplankton. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences,** v. 267, p. 953-959, 2000.

COHEN, Z. The Chemicals of *Spirulina. In:* VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) **Physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997, 252 p.

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-RS, 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, n. 7, 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.

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.

DOUCHA, J.; LIVANSK'Y, K; Productivity, CO₂/O₂ exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella* sp.) photobioreactors operated in a Middle and Southern European climate. **Journal of Applied Phycology**, v. 18, p. 811-826, 2006.

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.

FAN, L.; ZHANG, Y.; CHENG, L.; ZHANG, L.; TANG, D.; CHEN, H. Optimization of Carbon Dioxide Fixation by *Chlorella vulgaris* Cultivated in a Membrane-Photobioreactor. **Chemical Engineering & Technology**, v. 30, n. 8, p. 1094–1099, 2007.

FAN, L. H.; ZHANG, Y. T.; ZHANG, L.; CHEN, H. L. Evaluation of a membrane-sparged helical tubular photobioreactor for carbon dioxide biofixation by *Chlorella vulgaris*. Journal of Membrane Science, v. 325, p. 336–345, 2008.

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.

FERREIRA, S. P. **Produção de lipídeos pela microalga** *Chlorella* **e obtenção de nanoemulsão de origem microalgal**, 2013. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande-RS, 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.

GOULARTE, P. G. **Produção de biogás a partir da co-digestão de resíduos da geração de energia**, 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande-RS, 2014.

GROBBELAAR, J. U. Algal Nutrition: Mineral Nutrition. *In:* RICHMOND, A. **Handbook** of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing company, 2004, 577 p.

GUSCHINA, I. A.; HARWOOD, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress in Lipid Research**, v. 45, p. 160–186, 2006.

HENRARD, A. S. A. **Cultivo semicontínuo das microalgas** *Cyanobium* **sp. e** *Chlorella* **sp.**, 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande-RS, 2009.

HENRARD, A. S. A. **Produção e purificação de biogás utilizando microalga** *Spirulina* **sp. LEB-18**, 2013. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande-RS, 2013.

HO, S-H.; CHEN, C-Y.; LEE D-J.; CHANG J-S. Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems - A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 189–198, 2011.

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. **Global warming, Reports on Progress in Physics**, v. 68, p. 1343–1403, 2005.

HSUEH, H. T.; LI, W. J.; CHEN, H. H.; CHU, H. Carbon bio-fixation by photosynthesis of *Thermosynechococcus* sp. CL-1 and *Nannochloropsis oculta*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 95, p. 33-39, 2009.

HU, Q.; YAIR, Z.; AMOS, R. Combined effects of light intensity, light path and culture density on output rate of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). **European Journal of Phycology**, v. 33, p. 165–171, 1998.

HU, H., GAO, K. Optimization of growth and fatty acid composition of unicellular marine picoplankton, *Nannochloropsis* sp., with enriched carbon sources. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 421–425, 2003.

HUGHES, E.; BENEMANN, J. Biological fossil CO₂ mitigation. **Energy Conversion and Management**, v. 38, p. 467–473, 1997.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE – IPCC (2014) Mitigation of Climate Change, Summary for Policymakers, 2014.

IVERSON, T. M. Evolution and unique bioenergetics mechanisms in oxygenic photosynthesis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, p. 91–100, 2006.

JIANG, L.; LUO, S.; FAN, X.; YANG, Z.; GUO, R. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO₂. **Applied Energy**, v. 88, p. 3336-3341, 2011.

KODAMA, M. A new species of highly CO2-tolerant fast growing marine microalga suitable for high-density culture. **Journal Marine Biotechnology**, v. 1, p. 21-25, 1993.

KUMAR, A.; ERGAS, S.; YUAN, X.; SAHU, A.; ZHANG, Q.; DEWULF, J.; MALCATA, F. X.; LANGENHOVE, H. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. **Trends in Biotechnology**, v. 28, p. 371-380, 2010.

KUMAR, K.; DASGUPTA, C. N.; 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.

LAM M. K.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Current status and challenges on microalgaebased carbon capture. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 10, p. 456-469, 2012. LAVÍN, P. L.; LOUREMÇO, S. O. An evaluation of the accumulation of intracellular inorganic mitrogen pools by marine microalgae in cultures. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 53, n.1/2, p. 55-68, 2005.

LI, Y.; HOSMAN, M.; WU, N.; LAN, C.Q.; DUBOIS-CALERO, N. Biofuels from Microalgae. **Biotechnology Progress**, v. 24, n. 4, p. 815-820, 2008.

LIMA, U. A.; SATO, S. *In*: SCHMIDELL, W. LIMA, U. A. AQUARONE, E. BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**, **Biotecnologia na produção de alimentos**, v. 4, Editora Edgard Blücher LTDA, São Paulo-SP, 2001, 541 p.

LISBOA, C. R. **Produção de Nanopartículas contendo peptídeos bioativos de microalgas**, 2013. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande-RS, 2013.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006, 606 p.

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.

LUM, K. K.; KIM, J.; LEI, X. G. Dual potential of microalgae as a sustainable biofuel feedstock and animal feed. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, 4:53, 2013.

MAEDA, K.; OWADA, M.; KIMURA, N.; OMATA, K.; KARUBE, I. CO2 fixation from flue gas on coal fired thermal power plant by microalgae. **Energy Conversion and Management**, v. 36, n. 6–9, p. 717-720, 1995.

MARGARITES, A. C. F. **Seleção e cultivo de microalgas para a produção de bioetanol**, 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande-RS, 2010.

MARGARITES, A. C. F. **Síntese de carboidratos por microalgas e produção de bioetanol**, 2014. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande-RS, 2014.

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

MOLINA GRIMA, E.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; GARCÍA CAMACHO, F.; YUSUF CHISTI. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 231–247, 1999.

MOLINA GRIMA, E.; BELARBI, E. -H; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; ROBLES MEDINA, A.; YUSUF CHISTI. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 491–515, 2003.

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-RS, 2006. 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, n. 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.; 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, 2008c.

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

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.

MORO, G. M. B. **Potencial nutricosmético da microalga** *Spirulina* **em ensaios biológicos** *in vitro* **e** *in vivo*, 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande-RS, 2013.

OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZERIO, R. A.; CUNHA, P. C. R.; LAMARCA, C. P.; SANTOS, M. E.; MENDES, L. B. B. Revisão: Sequestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas. **Insula**, Florianópolis, n. 36, p. 39-74, 2007.

ONO, E.; CUELLO, J. L. Selection of optimal microalgae species for CO₂ sequestration **Proceedings of Second Annual Conference on Carbon Sequestration**. Alexandria, VA, 2003.

ONO E.; CUELLO, J. L. Carbon dioxide mitigation using thermophilic cyanobacteria. **Biosystems Engineering**, v. 96, p. 129–34, 2007.

OSWALD, W. J. Large-scale Algal Culture Systems (Engineering Aspects). *In*: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. (eds). **Micro-algal Biotechnology., Cambridge University Press**, Cambridge, p. 357-394, 1988.

PEREIRA, C. M. P.; HOBUSS, C. B.; MACIEL, J. V.; FERREIRA, L. R.; DEL PINO, F. B.; MESKO, M. F. Biodiesel Renovável Derivado De Microalgas: Avanços e Perspectivas Tecnológicas. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2013-2018, 2012.

PIRES, J. C. M.; ALVIM-FERRAZ, M. C. M.; MARTINS, F.G.; SIMÕES, M. Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 3043–3053, 2012.

POSTEN, C. Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, p. 165–77, 2009.

PUTT, R.; SINGH, M.; CHINNASAMY, S.; DAS, K. C. An efficient system for carbonation of high-rate algae pond water to enhance CO₂ mass transfer. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3240–3245, 2011.

PYLE, D. J; GARCIA, R. A.; WEN, Z. Producing docosahexaenoic acid (DHA)-rich algae from biodiesel-derived crude glycerol: effects of impurities on DHA production and algal biomass composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 3933–3939, 2008.

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-RS, 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, n. 7, p. 1609-1612, 2008.

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.

RADMANN, E. M. **Cultivo de microalgas para produção de biossurfactantes**, 2011. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande-RS, 2011.

RAMALHO, R. S. Introduction to Wastewater Treatment Processes. Academic Press, New-York, 1983, 580 p.

RANGEL-YAGUI, C. D.; DANESI, E. D. G.; DE CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 133–141, 2004.

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, n. 01, p. 23-28, 2006.

RICHMOND, A. *In*: Handbook of Algal Mass Culture; Richmond, A., ed.; CRC Press: USA, 1986.

RISMANI-YAZDI, H.; HAZNEDAROGLU, B. Z.; BIBBY, K.; PECCIA, J. Transcriptome sequencing and annotation of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*: pathway description and gene discovery for production of next-generation biofuels. **BMC Genomics**, v. 12, p. 148, 2011.

RODRIGUES, M. S.; FERREIRA, L. S.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. Fed-batch cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*: potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. **Bioresource Technology**, v. 101, 4491–4498, 2010.

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.

ROSA, G. M. **Fixação química e biológica de CO₂ utilizadas no cultivo de S***pirulina*, 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande-RS, 2014.

RYU, H. J.; OH, K. K.; KIM, Y. S. Optimization of the influential factors for the improvement of CO₂ utilization efficiency and CO₂ mass transfer rate. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 15, p. 471-475, 2009.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**, **Engenharia Bioquímica**, v. 2, Editora Edgard Blücher LTDA, São Paulo-SP, 2001, 541 p.

SCHMIDELL, W.; SOARES, H. M.; ETCHEBEHERE, C.; MENES, R. J.; BERTOLA, N. C.; CONTRERAS, E. M. (Ed.). **Tratamento biológico de águas residuárias**, Tribo da Ilha, Florianópolis, 2007.

SINGH, J.; GU, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 2596–2610, 2010.

SINGH, U. B.; AHLUWALIA, A. S. Microalgae: a promising tool for carbon sequestration. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 18, p. 73-95, 2012.

SKJANES, K.; LINDBLAD, P.; MULLER, J. $BiOCO_2$ - a multidisciplinary, biological approach using solar energy to capture CO_2 while producing H_2 and high value products. **Biomolecular Engineering**, v. 24, p. 405-413, 2007.

SMITH A. D. **Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology**. Oxford- New York, Oxford University Press, 1997.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, n. 101, p. 87-96, 2006.

STEWART, C.; HESSAMI, M. A. A study of methods of carbon dioxide capture and sequestration – the sustainability of a photosynthetic bioreactor approach. **Energy Conversion Management**, v. 46, p. 403–20, 2005.

SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 4316-4342, 2012.

SUGAI, M. H. **Modelagem matemática de coluna de gaseificação de fotobiorreatores tubulares para cultivo de microalgas**, 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

SUH, I. S.; LEE, S. B. A light distribution model for an internally radiating photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, p. 180–189, 2003.

SYDNEY, E. B.; STURM, W.; CARVALHO, J. C.; SOCCOL, V. T.; LARROCHE, C.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5892-5896, 2010.

TALBOT, P.; LENCKI, R. W.; LA NOUIE, J. Carbon dioxide absorption characterization of a bioreactor for biomass production of *Phormidium bohneri*: comparative study of three types of diffuser. **Journal of Applied Phycology**, v. 2, p. 341-350, 1990.

TALBOT, P.; GORTARES, M. P.; LENCKI, R. W. LA NOUIE, J. Absorption of CO₂ in Algal Mass Culture Systems: A Different Characterization Approach. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 37, p. 834-842, 1991.

TAMIYA, H. Mass culture of algae. **Annual Review of Plant Biology**, v. 8, p. 309–334, 1957.

TANG, D.; HAN, W.; LI, P.; MIAO, X.; ZHONG, J. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3071-3076, 2011.

TAPIE, P.; BERNARD, A. Microalgae production technical and economic evaluations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, p. 873-885, 1988.

TERASAKA, K.; HIRABAYASHI, A.; NISHINO, T.; FUJIOKA, S.; KOBAYASHI, D.; Development of microbubble aerator for waste water treatment using aerobic activated sludge. **Chemical Engineering Science**, v. 66, p. 3172–3179, 2011.

TOLEDO-CERVANTES, A.; MORALES, M.; NOVELO, E.; REVAH, S. Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 652–658, 2013.

TRIMBORN, S.; LUNDHOLM, N.; THOMS, S.; RICHTER, K-U.; KROCK, B.; HANSEN, P. J.; ROST, B. Inorganic carbon acquisition in potentially toxic and Bernd non-toxic diatoms: the effect of pH-induced changes in seawater carbonate chemistry. **Physiologia Plantarum**, v. 133, p. 92–105, 2008.

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

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-RS, 2014.

VERMA, N. M.; SHAKTI, M.; SHUKLA, A.; MISHRA, B. N. Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 10, p. 1402-1411, 2010.

VONSHAK, A. Outdoor mass production of *Spirulina*. *In*: VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997.

WANG, G. Y.; WANG, X.; LIU, X. H. Two-stage hydrolysis of invasive algal feedstock for ethanol fermentation. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 53, p. 246–252, 2011.

WESTERHOFF, P.; HU, Q.; ESPARZA-SOTO, M.; VERMAAS, W. Growth parameters of microalgae tolerant to high levels of carbon dioxide in batch and continuous - flow photobioreactors. **Environmental Technology**, v. 31, n. 5, p. 523–532, 2010.

YANG, C.-Y.; FANG, Z.; LI, B.; LONG, Y.-F. Review and prospects of *Jatropha* biodiesel industry in China. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 2178–2190, 2012.

YUN, Y-S.; LEE, S.B.; PARK, J.M.; LEE, C-II.; YANG, J-W. Carbon Dioxide Fixation by Algal Cultivation Using Wastewater Nutrients. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 69, p. 451-455, 1997.

XIA, J. R.; GAO, K. S Impacts of elevated CO₂ concentration on biochemical compo-sition, carbonic anhydrase, and nitrate reductase activity of freshwater greenalgae. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 47, p. 668–675, 2005.

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.

ZHAO, B.; SU, Y. Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 31, p. 121–132, 2014.

ZHANG, K.; KURANO, N.; MIYACHI, S. Optimized aeration by carbon dioxide gas for microalgal production and mass transfer characterization in a vertical flat-plate photobioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 25, p. 97-101, 2002.

ZHENG, Y.; CHEN, Z.; LU, H.; ZHANG, W. Optimization of carbon dioxide fixation and starch accumulation by *Tetraselmis subcordiformis* in a rectangular airlift photobioreactor. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 1888-1901, 2011.

APÊNDICE

Figura AP1 - Perfil de crescimento celular logaritmizado da fase exponencial de crescimento dos ensaios de *Spirulina* na vazão específica de alimentação da corrente gasosa de 0,05 vvm para as diferentes configurações de difusores, pedra sinterizada (●), cortina porosa (○) (0-4 d), anel perfurado (■) e madeira porosa (□) (0-5 d)



Figura AP2 - Perfil de crescimento celular logaritmizado da fase exponencial de crescimento (0-4 d) dos ensaios com *Spirulina* na vazão específica de alimentação da corrente gasosa de 0,3 vvm para as diferentes configurações de difusores, pedra sinterizada (●), cortina porosa (○), anel perfurado (■) e madeira porosa (□)



Figura AP3 - Perfil de crescimento celular logaritmizado da fase exponencial de crescimento (0-4 d) obtidos nos ensaios com *Spirulina*: membranas de fibra oca (MFO) nas vazões de 0,05 (○) e 0,3 vvm (△); controle (CT) nas vazões de 0,05 (●) e 0,3 vvm (▲);



ANEXO

Número	Nomenclatura	Fórmula química	Concentração
1	Bicarbonato de sódio	NaHCO ₃	16,8 g.L ⁻¹
2	Fosfato de potássio Dibásico	K ₂ HPO ₄	$0,5 \text{ g.L}^{-1}$
3	Nitrato de sódio	NaNO ₃	2,5 g.L ⁻¹
4	Sulfato de potássio	K_2SO4	$1,0 \text{ g.L}^{-1}$
5	Cloreto de sódio	NaCl	$1,0 \text{ g.L}^{-1}$
6	Sulfato de magnésio heptahidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	$0,2 \text{ g.L}^{-1}$
7	Cloreto de cálcio	CaCl ₂	$0,04 \text{ g.L}^{-1}$
8	Sulfato ferroso heptahidratado	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g.L ⁻¹
9	EDTA dissódico	EDTA	$0,08 \text{ g.L}^{-1}$
A5	Solução de micronutrientes	*	1,0 mL.L ⁻¹
B6	Solução de metais	**	1,0 mL.L ⁻¹

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

Fonte: Zarrouk (1966)

*Solução A5 (g,L⁻¹): H_3BO_3 (2,86), $MnCl_2.4H_2O$ (1,81), $ZnSO_4.7H_2O$ (0,222), $NaMoO_4$ (0,015), $CuSO_4$. $5H_2O$ (0,079). **Solução B6 (mg,L⁻¹): NH_4VO_3 (23,0), $K_2Cr_2(SO_4)_4.24H_2O$ (96,0), $NiSO_4.7H_2O$ (48,0), $Na_2WO_4.2H_2O$ (18,0), $TiOSO_4.H_2SO_4.8H_2O$ (61,1), $Co(NO_3)_2.6H_2O$ (44,0).