

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

BIOTECNOLOGIA DE MICROALGAS E ABSORÇÃO QUÍMICA APLICADAS NA FIXAÇÃO DE CARBONO

Gabriel Martins da Rosa

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa Orientador Prof. Dr^a. Michele Greque de Morais Coorientadora Prof. Dr. Francisco Gabriel Acién Fernandéz Coorientador Universidad de Almería

Rio Grande, RS 2018

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

BIOTECNOLOGIA DE MICROALGAS E ABSORÇÃO QUÍMICA APLICADAS NA FIXAÇÃO DE CARBONO

Gabriel Martins da Rosa

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos.

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa Orientador Prof. Dr^a. Michele Greque de Morais Coorientadora Prof. Dr. Francisco Gabriel Acién Fernandéz Coorientador Universidad de Almería

Rio Grande, RS 2018 Ficha catalográfica

R788b Rosa, Gabriel Martins da. Biotecnologia de microalgas e absorção química aplicadas na fixação de carbono / Gabriel Martins da Rosa. - 2018. 185 p. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande - FURG, de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Programa Grande/RS, 2018. Orientador: Dr. Jorge Alberto Vieira Costa. Coorientadora: Dr^a. Michele Greque de Morais. Coorientador: Dr. Francisco Gabriel Acién Fernandéz. 1. Biomassa 2. Chlorella 3. Dióxido de carbono 4. Fixação de CO₂ 5. Efeito estufa 6. Spirulina I. Costa, Jorge Alberto Vieira II. Morais, Michele Greque de III. Acién Fernandéz, Francisco Gabriel IV. Título. CDU 662.6

Catalogação na Fonte: Bibliotecário Me. João Paulo Borges da Silveira CRB 10/2130

APROVAÇÃO

Tese defendida por Gabriel Martins da Rosa aprovada em 06 de fevereiro de 2018, pela comissão examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa - FURG

Kelen The cher

Profa. Dra. Helen Treichel - UFFS

Dra. Ana Cláudia Margarites UPF

Ana Burela CROR Profa. Dra. Ana Priscila Centeno da Rosa - FURG

Dra. Cristiane Reinaldo Lisbôa - FURG

Dedico este trabalho para meus pais, irmãos e à minha companheira de todas as horas, Luiza Moraes.

AGRADECIMENTOS

À Luiza, pelo amor, parceria, incentivo e empenho na realização de todas as tarefas!

Aos meus pais, pelo carinho e educação, fornecendo a base de tudo o que me tornei hoje.

Ao Professor Jorge, que me "desorientou" desde a graduação até o Doutorado, mas principalmente pela confiança e possibilidades de aprendizados múltiplos que nunca se limitaram ao meu trabalho.

À Professora Michele Morais, pelas correções e contribuições com o trabalho.

Ao Professor Francisco Gabriel Acién Fernandéz, por me receber, orientar e integrar junto a sua equipe em Almería, na Espanha.

As iniciantes científicas Isabela e Gabi, que foram fundamentais no trabalho experimental, especialmente na volta ao Brasil.

Aos integrantes do exame de qualificação e defesa final da Tese, Luiz A. A. Pinto, Ana P. C. da Rosa, Ana Cláudia, Helen Treichel e Cristiane Lisboa, pelas sugestões e contribuições, mas sobretudo pela disposição de participar destas defesas!

Aos Professores Eliana e Pinto, por sempre estarem disponíveis para ajudar e ensinar de forma única.

Ao Técnico responsável do LEB, Roque, por sempre ajudar na compra e conserto de equipamento e vidrarias.

Aos amigos Vitor Furlong, Adriano e Vicka, pela amizade e confraternizações!

À Thaisa, que é uma amiga especial e que ajudou a mim e a Luiza muito, principalmente quando aceitou cuidar da nossa Modri na "casa dela".

Aos amigos do LEB e MiBi, que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho e palas diversas confraternizações.

A todos os amigos de Almería, em especial, Martina, Mati, Victor, Cíntia, Marta, Ainoa e Ismael, pela ajuda, ensinamentos e, sobretudo, pela paciência com o idioma.

A todos os Laboratórios da FURG, seus coordenadores e suas equipes, pela disponibilização de equipamentos, vidrarias e espaço para análises.

A FURG, por meio da Pós-Graduação de Engenharia e Ciência de Alimentos, por conceder um ensino gratuito e de muita qualidade.

A CAPES, pela concessão da bolsa de Doutorado.

RESUMO

A demanda de energia primária mundial é composta por combustíveis fósseis, como gás natural, petróleo e carvão mineral, os quais são utilizados na produção de energia e setor industrial. Estes setores são emissores massivos de gases de efeitos estufa (GEE), como metano, óxido nitroso e dióxido de carbono (CO2). Neste contexto, o CO2 é o principal causador do aquecimento global, pois ele é produzido em maiores quantidades que os demais GEE. As tecnologias de fixação de CO₂ são centradas em processos físicos, químicos e biológicos. Os métodos químicos se destacam devido à elevada eficiência de fixação de CO₂, ao passo que a aplicação de bioprocessos com microalgas são atrativos, pois não geram passivos ambientais e podem produzir biomassa com aplicação em alimentos e biocombustíveis. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi utilizar a biotecnologia de microalgas, agregado a tecnologia de absorção química, para aumentar a fixação de carbono e produção de biomassa. Para isso, o trabalho foi dividido em quatro etapas. A primeira, teve por objetivo encontrar cepa de Chlorella resistente a maior concentração de monoetanolamina (MEA) e avaliá-la quanto à fixação de CO₂, produção de biomassa e macromoléculas com adição do absorvente químico monoetanolamina (MEA). A segunda etapa foi realizada em batelada alimentada, com C. fusca LEB 111, avaliando a adição intermitente de MEA na fixação de CO₂, crescimento e concentração de macromoléculas. A terceira etapa envolveu as variáveis operacionais do cultivo semicontínuo de C. fusca LEB 111, com adição de MEA, sobre o efeito da captura de carbono, parâmetros cinéticos e produção de biomassa. A quarta etapa teve como objetivo avaliar o balanço de carbono, parâmetros de crescimento e atividade fotossintética em condição ex situ de Spirulina platensis com MEA, cultivada em condições outdoor, escala piloto e meio nutriente composto com fertilizantes agrícolas. As respostas obtidas mostraram que C. fusca LEB 111 tolera até 200 mg L⁻¹ de MEA, enquanto que a condição *ex situ* de *S. platensis* com MEA foi benéfica com adição de 25 mg L⁻¹ do absorvente. O cultivo de *S. platensis* apresentou equilíbrio entre as espécies químicas carbono, que manteve o pH elevado e evitou perdas do nutriente para atmosfera. O meio BG-11, de C. fusca LEB 111, apresentou maior concentração de carbono com 150 mg L⁻¹ de MEA. A eficiência de uso de CO₂ por C. fusca LEB 111 foi superior no modo de batelada alimentada (43,8 % m m⁻¹) e semicontínuo (41,5 % m m⁻¹). O maior uso de carbono e produtividade de biomassa de S. platensis foi 94,1 % m m⁻¹ e 27,2 g m⁻¹ ² d⁻¹, respectivamente. A maior concentração de lipídios por *Chlorella* foi obtida no modo semicontínuo (41,4 % m m⁻¹). Portanto, foi possível constatar que ambos os gêneros de microalgas estudados são resistentes a monoetanolamina e, dessa forma, se apresentam como promissores métodos para reduzir o aumento do efeito estufa. Além disso, a biomassa de C. fusca LEB 111 obtida tem potencial destacado para aplicação em biocombustíveis.

Palavras-chave: Biomassa. *Chlorella*. Dióxido de carbono. Fixação de CO₂. Efeito estufa. *Spirulina*.

MICROALGAE BIOTECHNOLOGY AND CHEMICAL ABSORPTION APPLIED IN CARBON FIXATION

ABSTRACT

Demand for global primary energy is made up of fossil fuels, such as natural gas, oil and coal, which are used in energy production and industrial sectors. These sectors are higher emitters of greenhouse gases (GHG) such as methane, nitrous oxide and carbon dioxide (CO₂). In this context, CO₂ is the main cause of global warming, because it is produced in larger concentrations than other GHGs. CO₂ fixation technologies are focused on physical, chemical and biological processes. The chemical methods stand out due to the high efficiency of CO₂ fixation, while the application of bioprocesses with microalgae are attractive because they do not generate environmental liabilities and can produce biomass with application in food and biofuels. In this sense, the aim of this work was to assessed chemical absorption technology, added to the microalgae biotechnology, to increase carbon fixation and biomass production. For this, the work was split in to four stages. The first stage was find the Chlorella strain resistant to higher concentration of monoethanolamine (MEA) and evaluate it for the CO₂ fixation, biomass production and macromolecules with addition of chemical absorbent monoethanolamine (MEA). The second stage was performed in batch fed, with C. fusca LEB 111, evaluating the intermittent addition of MEA in the CO₂ fixation, growing and macromolecules concentration. The third stage involved the operational variables of semicontinuous cultivation of C. fusca LEB 111, with addition of MEA, on the effect of carbon capture, kinetic parameters and biomass production. The fourth stage had the aim of assess the carbon balance, growth parameters and photosynthetic activity in ex situ condition of Spirulina platensis with MEA, cultivated in outdoor conditions, pilot scale and nutrient medium composed of agricultural fertilizers. The answers obtained showed that C. fusca LEB 111 tolerates up to 200 mg L⁻¹ of MEA, whereas the *ex situ* condition of *S. platensis* with MEA was beneficial with addition of 25 mg L⁻¹ of the absorbent. S. platensis cultivation presented a balance between the chemical species of carbon, which maintained the high pH and avoided losses of the nutrient to atmosphere. The BG-11 medium of C. fusca LEB 111 presented higher carbon concentration with 150 mg L^{-1} of MEA. The efficiency of CO₂ use by C. fusca LEB 111 was higher in the batch mode fed (43.8 % w w⁻¹) and semicontinuous (41.5 % w w⁻¹). The highest use of carbon and S. platensis biomass yield was 94.1 % w w⁻¹ and 27.2 g m⁻² d⁻¹, respectively. The highest concentration of lipids by Chlorella was obtained in the semicontinuous mode (41.4 % w w⁻¹). Thus, it was possible to verify that both studied microalgae genus are resistances to monoethanolamine and, therefore, are presented as promising methods to reduce the increase of the greenhouse effect. In addition, the C. fusca LEB 111 biomass has outstanding potential for application in biofuels.

Keywords: Biomass. Carbon dioxide. Chlorella. CO2 fixation. Greenhouse effect. Spirulina.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

ARTIGO 1 - CULTIVO DE MICROALGA VERDE COM MONOETANOLAMINA: AVALIAÇÃO DA FIXAÇÃO DE CO₂ E PRODUÇÃO DE MACROMOLÉCULAS

Tabela 1 - Resultados médios obtidos para a concentração máxima de biomassa $(X_{máx})$ eprodutividade máxima $(P_{máx})$ de *Chlorella fusca* LEB 111 com diferentes concentrações deMEA.71**Tabela 2** - Resultados médios de concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID, mg L⁻¹) e acumulado (CID_{AC}, mg L⁻¹) no cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111 em presença dediferentes concentrações de MEA.73**Tabela 3** - Resultados médios de acompanhamento do cultivo (X_{máx}, P_{máx}, $\mu_{máx}$, t_g), biofixaçãode CO2 (TB_{máx}, E_{máx}), concentração de proteínas e de cinzas na biomassa de *Chlorella fusca*LEB 111 cultivada com adição de diferentes concentrações de MEA.

ARTIGO 2 - CULTIVO DE *Chlorella* EM BATELADA ALIMENTADA COM CO₂ e MONOETANOLAMINA: EFEITOS NO CRESCIMENTO, FIXAÇÃO DE CARBONO E PRODUÇÃO DE MACROMOLÉCULAS

ARTIGO 3 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA E FIXAÇÃO DE CO₂ EM CULTIVO SEMICONTÍNUO DE *Chlorella* COM ADIÇÃO DE MONOETANOLAMINA E RECICLO DE MEIO Tabela 1 – Níveis codificados e reais do delineamento composto central (DCC) 2², com tréplica no ponto central, utilizado para verificar a influência da monoetanolamina (MEA) a cada corte e das variáveis independentes taxa de reutilização de meio (X₁) e concentração de corte (X₂).
Tabela 2 – Resultados do número de ciclo de crescimento (N), concentração de CID acumulado (CID_{AC}), produtividade máxima de biomassa (P_{máx}), biomassa gerada (B_g), taxa de biofixação de CO₂ máxima (TB_{máx}) e eficiência de uso de CO₂ máxima (E_{máx}) obtidos nos cultivos semicontínuos com MEA segundo DCC 2² com triplicada no ponto central.
Tabela 3 – Resultados de concentração de proteínas, carboidratos e lipídios presente na biomassa de *Chlorella fusca* LEB 111 no final dos ensaios semicontínuos com MEA, segundo DCC 2² com triplicada no ponto central.

ARTIGO 4 - PRODUÇÃO DE *Spirulina platensis* EM ESCALA PILOTO: BALANÇO DE CARBONO E EFEITO DA MONOETANOLAMINA NA TAXA FOTOSSINTÉTICA DA MICROALGA EM CONDIÇÃO *EX SITU*

Tabela 1 – Eficiência de fluorescência (Fv/Fm), produtividade média de biomassa (Px),
demanda de carbono (D _C), taxa mássica de carbono (m _C), eficiência de uso de carbono (E _C) e
conversão de carbono em biomassa ($Y_{X/C}$) obtidos no cultivo de <i>Spirulina platensis</i> entre 69° e
100°d de ensaio
Tabela 2 - Resumo dos resultados de radiação solar, pH, temperatura do cultivo e oxigênio
dissolvido (O.D.) obtidos durante as últimas semanas (S1, S2, S3 e S4) do cultivo de Spirulina
platensis em condições outdoor141
Tabela 3 – Taxas fotossintéticas (TF) e de respiração (TR) da microalga Spirulina platensis
com diferentes concentrações de monoetanolamina143

ANEXOS

Tabela A1 - Concentração dos componentes do meio de cultura BG-11.	183
Tabela A2 - Meio de cultivo utilizado no Artigo 4, a partir de fertilizantes agrícolas	185

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO III

ARTIGO 1 - CULTIVO DE MICROALGA VERDE COM MONOETANOLAMINA: AVALIAÇÃO DA FIXAÇÃO DE CO₂ E PRODUÇÃO DE MACROMOLÉCULAS

ARTIGO 2 - CULTIVO DE *Chlorella* EM BATELADA ALIMENTADA COM CO₂ e MONOETANOLAMINA: EFEITOS NO CRESCIMENTO, FIXAÇÃO DE CARBONO E PRODUÇÃO DE MACROMOLÉCULAS

ARTIGO 3 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA E FIXAÇÃO DE CO₂ EM CULTIVO SEMICONTÍNUO DE *Chlorella* COM ADIÇÃO DE MONOETANOLAMINA E RECICLO DE MEIO

ARTIGO 4 - PRODUÇÃO DE *Spirulina platensis* EM ESCALA PILOTO: BALANÇO DE CARBONO E EFEITO DA MONOETANOLAMINA NA TAXA FOTOSSINTÉTICA DA MICROALGA EM CONDIÇÃO *EX SITU*

Figura 1 – Vista superior e lateral do desenho esquemático do reator Raceway utilizado ... 131

ANEXOS

Figura A1 – Algas verdes Chlorella fusca LEB 111 (a) e Chlorella sp. observadas ao
microscópio, com aumento de 400x 171
Figura A2 - Cultivos com Chlorella fusca LEB 111 (a) e Chlorella sp. para seleção das
concentrações de MEA
Figura A3 – Cultivos descontínuos em duplicata de Chlorella fusca LEB 111 com adição de
50, 100 e 150 mg L ⁻¹ de MEA, em fotobiorreatores tubulares verticais de 1,8 L 175
Figura A4 – Cultivos abióticos descontínuos (a) e com Chlorella fusca LEB 111 em batelada
alimentada (CO ₂ + MEA), controle negativo e controle com CO ₂ (b), em fotobiorreatores
tubulares verticais de 1,8 L
Figura A5 – Cultivos semicontínuo de <i>C. fusca</i> LEB 111
Figura A6 – Cianobactéria Spirulina platensis observada ao microscópio com aumento de 100x

NOMENCLATURA

Bg	Biomassa gerada (g)
C-CO ₂	Carbono calculado como dióxido de carbono gás (% m m ⁻¹)
C-HCO ₃ -	Carbono calculado como bicarbonato (% m m ⁻¹)
CID	Concentração de carbono inorgânico dissolvido (g L-1)
CO _(aq)	Dióxido de carbono gás dissolvido no meio líquido
CO ₂	Dióxido de carbono gás
CO _{2(g)}	Dióxido de carbono gás
D	Taxa de diluição (d ⁻¹)
E	Eficiência de uso de CO ₂ (% m m ⁻¹)
Ec	Eficiência de uso de carbono (% m m ⁻¹)
GE	Gás estufa
GEE	Gás de efeito estufa
M _C	Massa molar de carbono (g mol ⁻¹)
M _{CO2}	Massa molar de dióxido de carbono (g mol ⁻¹)
MEA	Monoetanolamina (2-aminoetanolamina ou dietanolamina)
m _i	Taxa mássica diária de componente genérico "i" (mg d-1)
P _{máx}	Máximo valor de produtividade volumétrica de biomassa (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
P _{média}	Produtividade volumétrica média de biomassa (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
P _x	Produtividade volumétrica de biomassa (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
R ²	Coeficiente de determinação
V _{Ci}	Volume reutilizado de cada ciclo de crescimento
$\mu_{máx}$	Velocidade específica máxima de crescimento (d ⁻¹)
TB	Taxa de biofixação de dióxido de carbono (mg L ⁻¹ d ⁻¹)

$TB_{m\acute{a}x}$	Máxima taxa de biofixação de dióxido de carbono (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
tg	Tempo de geração ou tempo de duplicação celular (d)
TF	Taxa de fotossíntese (mgO ₂ mg _{biomassa} ⁻¹ min ⁻¹)
TR	Taxa de respiração (mgO ₂ mg _{biomassa} ⁻¹ min ⁻¹)
V _{Cn}	Volume de cultivo removido último corte (L)
V _{útil}	Volume útil do fotobiorreator (L)
Х	Concentração de biomassa (g L ⁻¹)
X_0	Concentração de biomassa inicial (g L ⁻¹)
X_{fi}	Concentração de biomassa ao final de cada ciclo de crescimento (g L-1)
X _{ii}	Concentração de biomassa no início de cada ciclo de crescimento (g L ⁻¹)
X _{cbm}	Fração mássica de carbono elementar determinado na biomassa
C- CO ₃ -2	Carbono calculado como carbonato (% m m ⁻¹)
CO3 ⁻²	Carbonato (% m m ⁻¹)

CAPÍTULO I	29
1 INTRODUÇÃO	31
2 OBJETIVOS	33
2.1 GERAL	33
2.2 ESPECÍFICOS	33
CAPÍTULO II	35
3 REVISÃO DA LITERATURA	37
3.1 IMPLICAÇÕES DO EFEITO ESTUFA E AQUECIMENTO GLOBAL	37
3.2 BIOTECNOLOGIA DE MICROALGAS	39
3.2.1 Microalgas	39
3.2.1.1 Chlorella	40
3.2.1.2 Spirulina	41
3.2.2 Reatores para produção de microalgas	42
3.2.3 Nutrientes essenciais ao cultivo de microalgas	45
3.2.3.1 Carbono	45
3.2.3.2 Nitrogênio	46
3.2.3.3 Fósforo	46
3.3 FIXAÇÃO QUÍMICA DE CO ₂	47
3.4 BIOFIXAÇÃO DE CO ₂	48
3.5 FIXAÇÃO QUÍMICA E BIOFIXAÇÃO DE CO2 COMBINADAS	49
3.6 HISTÓRICO DA LINHA DE PESQUISA EM QUE A TESE ESTÁ INSERIDA	50
CAPÍTULO III	53
4 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	55
ARTIGO 1	57
1 INTRODUÇÃO	61
2 MATERIAL E MÉTODOS	62
2.1 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO	62
2.2 ABSORVENTE QUÍMICO	62
2.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO	63

SUMÁRIO

2.3.1 Demanda de carbono	64
2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	64
2.4.1 Concentração de biomassa	64
2.4.2 Alcalinidade, pH e concentração de carbono inorgânico dissolvido	64
2.5 RESPOSTAS AVALIADAS	65
2.5.1 Produtividade volumétrica de biomassa	65
2.5.2 Velocidade específica máxima de crescimento e tempo de geração	65
2.5.3 Concentração de carbono inorgânico dissolvido acumulado	65
2.5.4 Taxa de biofixação de CO ₂	65
2.5.5 Eficiência de uso de CO ₂	66
2.6 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA	
2.7 COMPOSIÇÃO PROXIMAL	66
2.7.1 Preparo de amostra para análise de proteínas e carboidratos	66
2.7.2 Proteínas	67
2.7.3 Carboidratos	67
2.7.4 Lipídios	67
2.7.5 Umidade e cinzas	68
2.8 PRODUTIVIDADE DE CARBOIDRATOS E LIPÍDIOS	
2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	69
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
3.1 SELEÇÃO DE CEPA MICROALGAL E CONCENTRAÇÕES DE MEA	69
3.2 EFEITO DO MEA NO CULTIVO DE <i>CHLORELLA FUSCA</i> EM FOTOBIORR TUBULARES	EATORES 71
4 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ARTIGO 2	
1 INTRODUÇÃO	
2 MATERIAL E MÉTODOS	
2.1 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO	
2.2 ABSORVENTE QUÍMICO E BIORREATOR EMPREGADO	
2.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO	

2.3.1 Alimentação com CO ₂	87
2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	88
2.4.1 Concentração de biomassa	88
2.4.2 Alcalinidade, pH e concentração de carbono inorgânico dissolvido	88
2.5 RESPOSTAS AVALIADAS	88
2.5.1 Produtividade volumétrica de biomassa	88
2.5.2 Velocidade específica máxima de crescimento e tempo de geração	89
2.5.3 Concentração de carbono inorgânico dissolvido acumulado	89
2.5.4 Parâmetros de biofixação de CO ₂ avaliados	89
2.6 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA	89
2.7 DETERMINAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS E UMIDADE	90
2.8 PRODUTIVIDADE DE MACROMOLÉCULA	90
2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	90
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
3.1 EFEITO DA MONOETANOLAMINA EM CULTIVO ABIÓTICO	90
3.2 EFEITO DA BATELADA ALIMENTADA COM MEA E CO ₂ NO CULTIVO <i>CHLORELLA FUSCA</i>	DE 93
4 CONCLUSÃO	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
ARTIGO 3	103
1 INTRODUÇÃO	107
2 MATERIAL E MÉTODOS	108
2.1 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO	108
2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO	108
2.2.1 Delineamento composto central (DCC)	108
2.2.2 Absorvente químico	109
2.2.3 Condições físico-químicas e de operação dos cultivos	109
2.2.4 Dióxido de carbono como fonte de carbono	109
2.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	110
2.4 RESPOSTAS AVALIADAS NO CULTIVO	110
2.4.1 Concentração de carbono inorgânico dissolvido acumulado	110

2.4.2 Biomassa gerada	
2.4.3 Produtividade volumétrica de biomassa	
2.4.4 Avalição da biofixação de CO ₂ pela microalga	
2.5 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA PRODUZIDA	
2.6 DETERMINAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS E UMIDADE	
2.6.1 Análise de proteínas e carboidratos	
2.6.2 Lipídios	112
2.6.3 Umidade	
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	
3.1 CRESCIMENTO E BIOFIXAÇÃO DE CO2 POR CHLORELLA FUSCA LEB 1	11113
3.2 MACROMOLÉCULAS PRODUZIDAS POR CHLORELLA FUSCA LEB 111	
3.3 ESTIMATIVA DOS EFEITOS DE T _R E C _{CORTE} NAS RESPOSTAS OBT CULTIVO DE <i>CHLORELLA FUSCA</i> LEB 111	IDAS DO 118
4 CONCLUSÃO	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
ARTIGO 4	
1 INTRODUÇÃO	
2 MATERIAL E MÉTODOS	
2.1 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO	
2.2 BIORREATOR UTILIZADO	
2.2.1 Propagação do inóculo	
2.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO	
2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	
2.5 RESPOSTAS AVALIADAS NO CULTIVO	
2.5.1 Concentração de carbono inorgânico total	
2.5.2 Produtividade volumétrica de biomassa	
2.5.3 Demanda de carbono pela microalga	
2.5.4 Eficiência de uso de carbono	
2.5.5 Conversão de carbono em biomassa	134

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	136
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	136
3.1 AVALIAÇÃO GLOBAL DO CULTIVO DE <i>SPIRULINA PLATENSIS</i> EM CONDIÇÔ <i>OUTDOOR</i>	ĎES 136
3.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E UTILIZAÇÃO DE CARBONO CO TAXA DE DILUIÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE CARBONO CONSTANTES	OM 139
3.3 EFEITO DA MONOETANOLAMINA NA TAXA DE FOTOSSÍNTESE MICROALGA	DA 143
4 CONCLUSÃO	144
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145
CAPÍTULO IV	149
5 CONCLUSÃO GERAL	151
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	153
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	155
ANEXOS	169

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

O número de pessoas no mundo afetadas pela privação crônica de alimentos (PCA) aumentou 38 milhões entre 2015 e 2016 (815 milhões no total). A África (20,0 %) e a Ásia (11,7 %) são os continentes mais afetados pela PCA (FAO et al., 2017). Entre as causas desta problemática está o crescimento populacional, que somado ao crescimento econômico, formam a força motriz das emissões antropogênicas de gases de efeito estufa (GEE), desde o período pré-industrial. Este cenário, elevou as concentrações atmosféricas de dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) e óxido nitroso (N₂O) sem precedentes, em pelo menos 800 mil anos. A produção desmedida destes GEE foi detectada como a principal causa do aquecimento global, observado desde meados do século XX (IPCC, 2014).

A matriz energética primária mundial é composta em mais de 81,0 % por combustíveis fósseis, como o petróleo, gás natural e carvão mineral. Entre os 19,0 % restantes, menos de 11% são de biocombustíveis (IEA, 2017). As plantas de produção de energia a carvão mineral estão entre as principais fontes emissoras de CO₂ (HEDIN; CHEN; LAAKSONEN, 2010). O setor agroindustrial (TUBIELLO et al., 2015) e industrial, em especial o setor siderúrgico e de produção de cimento (NAPP et al., 2014), também são apontados como grandes emissores deste GEE. Frente a esta massiva produção, após o vapor de água, o CO₂ é considerado o maior contribuinte para o efeito estufa (LI et al., 2014). Os dados apresentados pela Divisão de Monitoramento Global dos E.U.A (NOAA/ESRL), mostram que a concentração média de CO₂ na atmosfera terrestre dobrou entre 1959 e 2016. Atualmente, a concentração do gás está em 404 ppm (DLUGOKENCKY; TANS, 2018).

As tecnologias utilizadas para reduzir as concentrações de CO₂ na atmosfera abrangem processos biológicos e não biológicos. Os primeiros, utilizam a fotossíntese de árvores ou microalgas, enquanto que os segundos, podem utilizar absorventes químicos, como monoetanolamina (MEA) (CHO et al., 2014) e apresentar eficiência de fixação de CO₂ próxima a 100% (LEUNG; CARAMANNA; MAROTO-VALER, 2014). Entretanto, estes processos apresentam elevado gasto energético com a recuperação do absorvente, corrosão de equipamentos, geração de passivos ambientais sem solução (MELDON; MORALES-CABRERA, 2011) e podem formar produtos cancerígenos na degradação de MEA. Além disso, o citado absorvente químico tem consideráveis perdas, sendo necessário adicioná-lo frequentemente ao processo químico de mitigação de CO₂ (ZHANG et al., 2014; ZHENG et al., 2017). A fixação de CO₂ por meio da biotecnologia microalgal é menor que a alcançada em sistemas com absorventes químicos (BILANOVIC, HOLLAND E ARMON, 2012). Por outro lado, o bioprocesso microalgal se torna mais atrativo que os demais processos, porque também é possível obter energia da biomassa obtida convertendo lipídios em biodiesel (EBRAHIMIAN; KARIMINIA; VOSOUGHI, 2014), carboidratos em bioetanol (FERREIRA et al., 2012), biogás por conversão anaeróbia da própria biomassa (HERNÁNDEZ et al., 2014), além da sua utilização em alimentos (SANTOS et al., 2016; LUCAS et al., 2018).

Os gêneros de microalgas *Spirulina* e *Chlorella* apresentam a maior produção de biomassa mundial, com 30,0 % e 20,0 % em massa seca, respectivamente (PULZ; GROSS, 2004). A China é a maior produtora comercial de biomassa de *Spirulina*, com 3.000 t ano⁻¹. A produção de *Chlorella* é cerca de 750 t ano⁻¹, com o preço comercial significativamente maior que o da cianobactéria mencionada (CHEN et al., 2016). As microalgas citadas são empregadas para produção de biomassa e pigmentos, os quais tem aplicação como alimentos e cosméticos, principalmente (POSTEN; WALTER, 2012). Além disso, a biorremediação de efluentes é atrelada a estas microalgas, assim como demonstrado por Duarte et al. (2017), com a cepa *Chlorella fusca* LEB 111, utilizando gás de combustão como fonte de carbono. Esta mesma cepa, em cultivo semicontínuo e a adição de 10% v v⁻¹ de CO₂, promoveu maiores resultados de concentração de proteínas, carboidratos e lipídios na biomassa (MOREIRA et al., 2016).

Diante do apresentado, devido a eficiência do processo de absorção química com MEA, combinar esta tecnologia com outra menos invasiva, pode ser promissora à mitigação de CO₂. Neste sentido, trabalhos combinaram com sucesso, a absorção química com MEA agregada a tecnologia de membranas de fibra oca (MEMARDOOST; HASHEMI AMREI; MOLAEI DEHKORDI, 2014), a biofixação de CO₂ com o gênero *Scenedesmus* (CHOI; KIM; LEE, 2012; KIM et al., 2013) e *Spirulina* (ROSA et al., 2015, 2016). Todavia, há lacunas de estudos neste aspecto com espécies de *Chlorella*, assim como há carência de estudos envolvendo o sistema composto por absorvente químico e microalgas em maior escala e condições *outdoor*.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

O objetivo desta Tese foi aumentar a fixação de carbono da biotecnologia de microalgas agregando o processo de fixação química com monoetanolamina.

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a fixação de CO₂, produção de biomassa e macromoléculas de *Chlorella fusca*, com as concentrações de MEA toleradas pela microalga, em fotobiorreatores tubulares verticais;
- b) Verificar a influência da adição periódica de MEA no meio de cultivo, crescimento, fixação de CO₂ e na produção de macromoléculas de *Chlorella fusca*;
- c) Analisar as respostas de fixação de CO₂, crescimento e concentração de macromoléculas de *Chlorella fusca* frente ao efeito de diferentes parâmetros operacionais de cultivo semicontínuo e adição de MEA;
- d) Avaliar a produção de biomassa e fixação de carbono de *Spirulina platensis*, em condições *outdoor* e escala piloto, assim como verificar a taxa fotossintética em condição *ex situ* da microalga em presença do absorvente monoetanolamina

CAPÍTULO II
3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 IMPLICAÇÕES DO EFEITO ESTUFA E AQUECIMENTO GLOBAL

O efeito estufa (EE) é um fenômeno benéfico e indispensável a vida na terra, o qual ocorre naturalmente há milhões de anos. O EE consiste em manter a temperatura do globo terrestre em níveis habitáveis (em média, 15,0 °C), por meio da absorção de parte da radiação solar, por gases de efeito estufa (GEE). Esses, foram acumulados espontaneamente e formam barreira entre a superfície terrestre e o sol. A preocupação existente a respeito desta temática surgiu no momento que a concentração destes GEE começou a exceder as concentrações normais em que a fenomenologia correta acontece. Neste contexto surgiu o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (em inglês, IPCC) (IPCC, 2007).

Os GEE que mais se destacam são àqueles considerados gerados por meio da atividade humana, os antropogênicos. Entre eles, o dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), o óxido nitroso (N₂O) (IPCC, 2014) e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (RINANTI, 2016) são os principais. As concentrações de CO₂, CH₄, e N₂O mostraram consideráveis aumentos de 40%, 150% e 20%, respectivamente, desde 1750 (Figura 1). O aumento das concentrações de CO₂ está mais acelerado (2,0 \pm 0,1 ppm ano⁻¹, calculado entre 2002-2011), que os demais (IPCC, 2014). De acordo com a Divisão de Monitoramento Global, da Administração Nacional Oceânica e Atmosférica (NOAA/ESRL), nos últimos cinco anos, a concentrações de CO₂ na atmosfera aumentou cerca de 3,5 ppm ano⁻¹ (DLUGOKENCKY; TANS, 2018).

A estimativa realizada pela Administração de informações de energia dos E.U.A (EIA) mostrou que o consumo de energia mundial aumentará 15,3 % até 2030 e 28,0 % até 2040, em relação ao ano de 2015 (575 10^{15} Btu). Este acréscimo é atribuído, especialmente, ao crescimento populacional e econômico, assim como ao acesso ampliado a recursos domésticos, de países como a China e a Índia (EIA, 2017). A situação é alarmante, pois a matriz energética primária mundial ainda é baseada em combustíveis fósseis, como o petróleo (31,7 %), carvão mineral (28,1 %) e gás natural (21,6 %), como mostra os dados de 2015 da Agência de Energia Internacional (IEA, 2017).

A agricultura mundial emite 24% do total de gases de GEE antropogênicos (TUBIELLO et al., 2015). Deste segmento são emitidos, principalmente, o N₂O e CH₄, no processo de aragem do solo, fabricação de fertilizantes e criação de animais (WOLLENBERG et al., 2016). Entretanto, o CO_2 é considerado o GEE com impacto mais significativo no aquecimento global. Isso decorre da massiva emissão do gás durante a combustão, para geração

de energia, que ocorre em atividades industrial, residencial e na utilização veicular (BENEMANN, 1993; SKJÅNES; LINDBLAD; MULLER, 2007). O setor industrial é responsável por emitir elevadas concentração diretas de CO₂ para atmosfera. Tais emissões se dividem entre os setores de ferro e aço (20 a 30 %), indústria de cimento (14-33 %) e refinarias de hidrogênio (15-20%) (NAPP et al., 2014).





O cenário de crescente aumento dos GEE, sobretudo das concentrações de CO₂, denotam aquecimento global inequívoco, com o aumento da temperatura global média de cerca de 2,0 °C (IPCC, 2014). Em consequência disso, ocorreria a ampliação do derretimento de gelo polar da Groenlândia e Antártida, o aumento médio do nível do mar e, consequente, inundação de cidades litorâneas da terra (TAVONI; SOCOLOW, 2013). Ademais, a acidificação dos oceanos, devido a dissolução de 30% das emissões de CO₂ emitido (GONÇALVES; SIMÕES; PIRES, 2014), agregado com o aumento de temperatura, pode causar a morte de corais. Outros impactos importantes do aquecimento global, são destacados no setor agrícola e a saúde dos seres vivos, sobretudo em decorrência das frequentes secas e desertificações (LAM; LEE; MOHAMED, 2012).

O 5º relatório do IPCC, em 2013, destacou que tecnologias que não utilizem combustíveis fósseis (negativas de carbono) são necessárias para que seja obtida redução a 2,0 °C no aumento na temperatura global antes do fim do Século XXI. Entre as abordagens mais

promissoras de captura de CO₂, se destacam a geoengenharia (ou engenharia climática), a aplicação da Captura e Sequestro de Carbono (CCS) a combustíveis renováveis, também conhecidos como Bio-CCS ou Bioenergia com CCS (BECCS) (LI et al., 2017). Neste contexto, a absorção química com monoetanolamina, tecnologia de membranas, adsorção com dessecantes, injeções em grandes profundidades (oceanos e a recuperação avançada de petróleo, por exemplo) (STEWART; HESSAMI, 2005) e a biofixação por microalgas (TEBBANI et al., 2014; VAZ; COSTA; MORAIS, 2016b) são amplamente testadas e utilizados com este GEE.

3.2 BIOTECNOLOGIA DE MICROALGAS

3.2.1 Microalgas

A palavra "alga" era usada para descrever organismos contendo clorofila *a* e um talo não dividido em raízes, caule e folhas (LEE, 1989). Atualmente, macroalgas (plantas marinhas, algas marinhas e kelps), assim como, os organismos fototróficos microscópicos (as microalgas) foram definidos pelo termo alga. A maioria das microalgas, como as algas verdes, vermelhas, marrons e diatomáceas, são eucarióticas, ao passo que, as algas azul-verde (cianobactérias) são procarióticas. Logo, alga descreve a forma de vida, não o grupo biológico (POSTEN; WALTER, 2012). As microalgas têm grande variedade morfológica, até mesmo em um mesmo gênero e entre diferentes estágios de crescimento, para mesma espécie. As formas mais comuns são definidas com adjetivos como ameboide, palmeloide (ou capsoide), cocoide, filamentosa e flagelada. Há centenas de milhares de espécies de microalgas e nem sempre se encaixam perfeitamente em categorias convenientes (ANDERSEN, 2013).

O sistema padrão de classificação clássica de micro-organismos é utilizado para microalgas, o qual está indicado com o sufixo entre aspas: Filo, "fita"; Classe, "ficea"; Ordem, "ales"; Família, "aceae"; gênero; espécie. As microalgas são divididas em 4 Grupos. O Grupo 1, Filo Cianofita (cianobactérias), são procarióticos (mais rudimentar, sem divisão nuclear), enquanto que os Grupos 2, 3 e 4, são eucarióticos (presença de mais organelas e com divisão nuclear). A diferenciação destes três últimos Grupos ocorre pelo arranjo dos cloroplastos com membranas. O Grupo 2 é composto pelo Filo Glaucofita, Rodofita (algas vermelhas) e o Filo Clorófita (algas verdes). O Grupo 3 tem os Filos Eulgenofitas (euglenoides) e Dinofita (dinoflagelados). No Grupo 4 estão os demais Filos, entre eles, Criptofita e Heterokontophyta (algas marrom-douradas) (LEE, 2008).

3.2.1.1 Chlorella

A "microalga *Chlorella*" se refere as espécies de micro-organismos pertencentes ao gênero *Chlorella*, o qual fazem parte do Filo das Clorófitas, também chamadas de algas verdes. Essas, têm clorofilas do tipo a e b, formam amido como produto de reserva energética, dentro do cloroplasto, geralmente em associação com pirenóides (LEE, 2008; ANDERSEN, 2013). De acordo com Tebbani et al. (2014), nas algas verdes, os pirenóides são as estruturas celulares considerados os centros de produção de amido (Figura 2).

Figura 2 –Estrutura esquemática da morfologia de Clorófitas (a) e micrografia eletrônica da seção longitudinal de células de *Chlorella vulgaris* (b), mostrando a membrana plasmática (I), cloroplasto (II), amido (III), mitocôndria (IV); núcleo (V), tilacóide (VI), membrana nuclear (VII) e o pirenóide (VIII)



Fonte: Tebbani et al. (2014)

As Clorófitas se diferem, das outras algas verdes eucarióticas, no local de formação do produto de armazenamento, que é encontrado no cloroplasto e não no citoplasma (Figura 2). As células de *Chlorella* são esféricas com um cloroplasto. O único método de reprodução é o assexuado por bipartição celular. Quando estão em habitat aquático, as microalgas do gênero *Chlorella*, geralmente, formam simbioses com invertebrados aquáticos e protozoários do gênero *Paramecium* (LEE, 2008), mas também pode ser encontrada em ambientes terrestres.

As potencialidades bioquímicas das microalgas do gênero *Chlorella*, incluem elevada concentração de proteínas (até 70% m m⁻¹) e de lipídios neutros (até mais que 50% m m⁻¹), em especial os triacilgliceróis (TAGs) sob deficiência de luz ou nitrogênio, por exemplo (LIU; HU, 2013). A concentração de carboidratos destas microalgas verdes, podem variar entre 16,0 % m m⁻¹ em condições ideais de nutrientes luz e reator (BAUER et al., 2017), até 70 % quando o aporte de nitrogênio e fósforo são reduzidos (MARGARITES; COSTA, 2014).

Agregado a valores elevados de macromoléculas, a presença de carotenoides (como a luteína), minerais (principalmente potássio, cálcio e magnésio) e vitaminas (como A, C e todo complexo B) fazem que a biomassa do gênero *Chlorella* seja substituto nutricional ideal para humanos e animais, como ocorre na Alemanha, Japão China e países asiáticos. Ademais, a produção de proteínas recombinantes, biocombustíveis, biorremediação de águas residuais e a captura de carbono fóssil utilizados em usinas de energia, são potencialidade destacadas para microalgas do gênero *Chlorella* (LIU; HU, 2013).

3.2.1.2 Spirulina

O gênero *Spirulina* pertence ao grupo das cianobactérias, do Filo das Cianofitas, também chamadas de alga azul-verde, que formam o único grupo de microalgas procarióticas. A clorofila a é o principal pigmento fotossintetizante, mas *Spirulina* possui também ficobiliproteínas, em especial a C-ficocianina (LEE, 2008). Em algumas espécies de *Spirulina*, nada obstante, a concentração de ficocianina (17,2 % m m⁻¹) é muito superior a concentração de clorofila (1,2 % m m⁻¹) (BELAY, 2008).

As células destas cianobactérias são filamentosas, formadas por arranjos de tricomas helicoidais, os quais podem ser curtos ou largos, revestidas por uma membrana fina. A morfologia das espécies de *Spirulina* pode variar muito de acordo com as condições de cultivo (WANG; ZHAO, 2005). Assim, as formas mais comuns deste gênero são: reta (Figura 3a) e espiralada (Figura 3b) (WANG e ZHAO, 2005), com diâmetro dos filamentos variando entre 6 e 12 µm e o comprimento entre 100 e 200 µm. O gênero em questão não é formador de colônia e sua reprodução ocorre por divisão binária (VONSHAK, 1997).

Figura 3 – Observações microscópicas das morfologias reta (a) e espiralada (b) da cianobactéria *Spirulina* (aumento de 100x)





Fonte: http://algae-lab.com

A biomassa de *Spirulina* possuí certificado GRAS (*Generally Recognized as Safe*) do FDA (*Food and Drug Administration*), conferidos para duas empresas nos E.U.A. (Cyanotech Corporation e a Earthrise Nutritionals LLC) (BELAY, 2008). Assim, a biomassa do gênero de *Spirulina* pode ser utilizada como suplemento alimentar humano e animal (principalmente, para aves e peixes) (SOUNDARAPANDIAN; VASANTHI, 2010). No Brasil, a biomassa de *Spirulina* é reconhecida como alimento pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dessa forma, ela pode ser adicionada como ingrediente em alimentos ou ingeridas na forma de cápsulas, comprimidos ou tabletes, não excedendo a ingestão de 1,6 g d⁻¹(ANVISA, 2018).

As principais espécies utilizadas do gênero *Spirulina* são *S. platensis* e S. *máxima* e tem composição bioquímica muito semelhante dependendo das condições de cultivo (BELAY, 2008). Neste sentido, a concentração de proteínas, carboidratos, lipídios (principais macromoléculas) de *Spirulina* pode variar em torno dos valores encontrados por Rosa et al. (2015) (61,0, 14,0 e 10 % m m⁻¹, respectivamente) e Moraes et al. (2016) (70,0, 8,3 e 8,4 % m m⁻¹, respectivamente). Do montante proteico de *Spirulina*, em torno da metade é composta por aminoácidos essenciais, principalmente por leucina, valina e isoleucina. Em relação aos lipídios, em torno de 46 % m m⁻¹ do total é composto por ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs). Desses, 56 % m m⁻¹ é ácido γ -linolênico (GLA ou ômega 6) (BELAY, 2008). Neste contexto, o elevado valor biológico, concentração de proteínas, agregada a presença de vitaminas e ácidos graxos essenciais, há na literatura considerável número de estudos com *Spirulina* adicionada em alimentos (LUCAS et al., 2017; LUCAS et al., 2018; SANTOS et al., 2016a).

3.2.2 Reatores para produção de microalgas

As configurações de sistema de cultivos para microalgas são diversas, mas nenhuma delas é considerada totalmente superior a outra em todos os aspectos. Os sistemas de cultivo para estes micro-organismos são relativamente novos e tendem a evoluir continuamente para tecnologias mais eficientes econômicamente. No entanto, a maioria das tecnologias atuais de sistema de cultivo pode ser categorizada em reatores abertos (Raceway) e fechados (verticais aerados e tubulares) (ZEMKE, 2016).

Os reatores *Raceway*, na sua maioria, consistem em canais, de mesmo comprimento e largura, dispostos paralelamente entre si, conectados por curvas em 180°. A agitação destes do cultivo nestes sistemas é realizado por pás rotativas (*paddle wheel*) fixadas em motor elétrico (SANTOS et al., 2016b). O comprimento dos canais é proporcional à largura, sendo a relação de 10 a 20 vezes geralmente aceita. Preferencialmente, se utiliza esta relação menor possível, assim como menor número de curvas, para reduzir as perdas de carga adicionais. A profundidade dos canais não devem superar 0,2-0,4 m, para favorecer a penetração de luz às microalgas. A relação superfície/volume total nesses sistemas é baixa (em torno de 5-10 m⁻¹) (PAWLOWSKI et al., 2017).

A construção dos *Raceway*, pode ser é realizada de concreto depositado no solo, ou simplesmente escavados na terra e forrado com um revestimento polimérico, como as ligas plásticas, para impedir o solo de absorver o cultivo. (DEMIRBAS, 2010). Recentemente, se emprega a fibra de vidro, com espessura menor que 0,5 mm, para construção de reatores nesta configuração, como os reatores mostrados na Figura 4 (COSTA et al., 2017b; PAWLOWSKI et al., 2017). A exemplo desta construção, a configuração de reatores *Raceway*, construídos com fibra de vidro, foram utilizados para biofixação de CO₂ de gases de combustão industriais, pelos gêneros *Spirulina* (Figura 4a) e *Scenedesmus* (Figura 4b). A planta piloto, que utiliza a microalga *Spirulina*, possui 6.000 m² de área construída, dois biorreatores *Raceway* de 18 m³, um biorreator de 1 m³ (não mostrado) e foi construída no complexo Termelétrico de Candiota-RS, Brasil (COSTA et al., 2017). O cultivo de *Scenedesmus*, conta com 2 reator *Raceway* de 15 m³ cada e faz parte da Estación Experimental de Cajamar "Las Palmerillas", na cidade Almería, na Espanha (ACIÉN et al., 2017).





Fonte: Costa et al. (2017) (a) e Pawlowski et al. (2017) (b)

As microalgas podem também serem produzidas em sistemas fechados, os chamados fotobiorreatores. Estes reatores são formados por tubos transparentes de polímeros (como acrílico e plástico) ou de vidro, que serve de filtro de luz incidente no cultivo de microalgas (ZITTELLI et al., 2013). O diâmetro dos tubos é no máximo 0,1 m, para garantir um ótimo regime de luz (SLEGERS et al., 2013). Devido a isso, nos fotobioreatores são alcaçadas maiores concentrações de biomassa (2,0 - 5,0 g.L⁻¹), menor tempo de recuperação (2-4 semanas) e maior proporção superfície-volume (25-125 m⁻¹) em comparação a configuração *Raceway* (LEE, 2001; WANG et al., 2008). Eles podem ser dispostos verticalmente, horizontalmente, inclinados, helicoidais, ou possuírem um design de painel fino horizontal (WIJFFELS, 2008). Quando os fotobiorreatores tubulares formam uma serpentina, eles recebem este nome serpentina e podem ter arranjo horizontal, vertical, inclinado ou cônico (ZITTELLI et al., 2013).

Os fotobiorretores oferecem ambiente de cultura relativamente seguro da contaminação por outros micro-organismos e controle de parâmetros, como a concentração de CO₂ e O₂ dissolvido, chaves para a produção de biomassa. Esta tecnologia, porém, é relativamente onerosa em comparação com os tanques abertos por causa dos custos com a infraestrutura e, principalmente, àquele associado ao mecanismo de mistura (WIJFFELS, 2008). Considerando uma planta de 100 ha, estima-se que os custos para implementar o cultivo de microalgas em sistemas aberto é de uma a quatro vezes menos oneroso que em fotobiorreatores tubulares (NORSKER et al., 2011; CHISTI, 2013). No entanto, a produtividade obtida por reatores abertos pode ser afetada pela contaminação com outros micro-organismos que se alimentam de algas ou concorrem com os nutrientes do meio (DEMIRBAS, 2010).

A Figura 5a mostra uma planta industrial produtora de biomassa das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Nannochloropsis*, em Portugal. Nesta instalação são utilizados fotobiorreatores tubulares horizontais múltiplos, com comprimento total em tubo de 330 km, volume de 1300 m³, ocupando 1 ha. A Figura 5b mostra a configuração de fotobiorreatores tubulares verticais tipo serpentina (30 m³ de volume), instalada na *Estación Experimental* de Cajamar "Las Palmerillas" (ACIÉN et al., 2017).

A maior produção comercial de biomassa de microalgas é encontrada com os gêneros *Spirulina*, *Dunaliella* e *Chlorella* (PULZ; BRONESKE; WALDECK, 2013). Na configuração de *Raceway*, com cerca de 40 ha, foi encontrada produção em torno de 300 t.ano⁻¹ para *S. maxima*. Em reatores inclinados com 0,5 ha, na Austrália, foi alcançanda produtividade média de 25,0 g m⁻² d⁻¹ com *Chlorella*, durante um ano inteiro (BOROWITZKA, 1999). A China produz cerca de 800 t ano⁻¹ de biomassa da microalga *Spirulina*. A *Earthrise* é a maior planta mundial de cultivo de microalgas, localizada na Califórnia, com área de 440.000 m² (BELAY, 2008).

Figura 5 – Cultivo de microalgas em fotobiorreatores tubulares horizontais múltiplos (a) e fotobiorreatores tubulares horizontais serpentinos (b)



Fonte: Acién et al. (2017)

3.2.3 Nutrientes essenciais ao cultivo de microalgas

Os nutrientes considerados indispensáveis às microalgas são carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, fósforo, magnésio, cobre, zinco e molibdênio. O carbono, nitrogênio e fósforo são indicados como os mais importantes, contudo, devido a elevada concentração de clorofilas de várias espécies de microalgas, o magnésio também tem destaque. Outros nutrientes que apresentam importância variável, dependendo da microalga, são enxofre, potássio, sódio, ferro, cálcio, tais como os oligoelementos como boro, cobre, manganês, zinco, molibdênio, cobalto, vanádio e selênio (GROBBELAAR, 2013). Estes nutrientes podem ser adicionados em meios de cultivo quimicamente definidos (normalmente caros) ou a partir de resíduos ou coprodutos de outros processos (MARKOU, 2015), assim como fertilizantes agrícolas (CAMACHO-RODRÍGUEZ et al., 2013).

3.2.3.1 Carbono

O carbono é o principal nutriente utilizado nos cultivos de microalgas, pois ele totaliza cerca de 50,0 % m m⁻¹ da biomassa seca (CHANG; TSAI; LI, 2015; ROSA et al., 2015). A fonte de carbono utilizada, seja como dióxido de carbono (CO₂), bicarbonato (HCO₃⁻) ou carbonato (CO₃⁻²), participa do equilíbrio químico $CO_{2(g)} \leftrightarrow CO_{2(aq)} \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow HCO_3^- \leftrightarrow CO_3^{2-}$ (Equações 1, 2 e 3) dependente do pH. Este balanço de carbono pode ser perturbado quando, por exemplo, o CO₂ é adicionado à cultura, removido na fotossíntese ou perdido por difusão para a atmosfera. Nesta situação, a concentração de H+ aumenta após a produção de H₂CO₃ e o pH diminui. Em contrapartida, quando o CO₂ é removido, na fotossíntese, ou perdido para o ambiente, as reações se deslocam para diminuir a concentração de H⁺. Entretanto, a

concentração de CO_2 -³ aumenta ligeiramente e evita o aumento do pH (ANDRADE et al., 2016b).

O equilíbrio químico é regido pelas equações de dissociação da água e a mistura carbonato-bicarbonato, como apresentado nas Equações 1, 2 e 3, a 25 ° C.

 $H_2O \leftrightarrow H^+ + OH^ pK_w = 14,0$ (1)

 $CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$ $pK_w = 6,38$ (2)

$$HCO_3^- \leftrightarrow CO_3^{-2} + H^+ \qquad pK_w = 10,4 \qquad (3)$$

As diferentes formas de carbono, no equilíbrio químico acima, somadas são iguais a concentração de carbono inorgânico total (CIT) (Equação 4). A concentração de H₂CO₃ é negligenciada no equilíbrio, pois sua concentração é mais de 1000 vezes menor que a menor concentração das outras espécies (TEBBANI et al., 2014).

$$[CIT] = [CO_2] + [HCO_3^-] + [CO_3^{-2}]$$
(4)

As microalgas podem demonstrar preferência por alguma espécie de carbono em função do mecanismo biológico de concentração de carbono. Geralmente, as microalgas utilizam o CO_2 , mas o HCO_3^- também é utilizado como fonte de carbono inorgânico (CARVALHO et al., 2006). O CO_2 permeia a membrana celular microalgal por difusão, enquanto que o HCO_3^- é disponibilizado intracelularmente por transporte ativo ou protonação externa (McCONNAUGHEY, 1998).

3.2.3.2 Nitrogênio

O nitrogênio é nutriente essencial para o crescimento de microalgas, sendo que sua concentração representa cerca de 7,0 % m m⁻¹ da biomassa seca. A fonte de nitrogênio da cultura pode ser orgânica (ureia) ou sais inorgânicos que contenha nitratos (NO₃⁻) ou amônios (NH₄⁺) (GROBBELAAR, 2013). O nitrogênio está envolvido nas principais vias metabólicas das microalgas. Portanto, o aumento da concentração de nitrogênio, até certo valor, conduz a maior produtividade de biomassa, proteínas e síntese de clorofila mais significativa. Por outro lado, a deficiência deste elemento, ao passo que induz o acúmulo significativo de componentes de reserva, como lipídios (CHEN et al., 2011), também pode limitar atividades fotossintéticas e celulares (GROBBELAAR, 2013).

3.2.3.3 Fósforo

O fósforo está envolvido em várias vias metabólicas e reguladoras celulares (DROOP, 1973; CHEN et al., 2011). A concentração deste elemento químico na composição das microalgas em base seca é cerca 1,0 % m m⁻¹. As microalgas são capazes de usar formas orgânicas e inorgânicas de fósforo por meio de hidrólise auxiliada por enzimas da família das

fosfatases (NELSON; COX, 2014). A deficiência deste nutriente pode causar redução da atividade fotossintética, especialmente, da enzima Rubisco e acúmulo de compostos de reservas lipídicas (WANG et al., 2008) e perda da produtividade de biomassa. O fósforo deve ser fornecido sempre em excesso, pois ele pode formar precipitados com íons metálicos e, dessa forma, ficar indisponível para absorção das microalgas (TEBBANI et al., 2014).

3.3 FIXAÇÃO QUÍMICA DE CO₂

A fixação química de CO₂ com alcanolaminas tem grande importância industrial, pois, essencialmente, o CO₂ é removido do produto desejado, seja ele gás com valor comercial, como a amônia ou gás natural, ou na adequação legislativa quanto a limites de descarga. As principais alcanolaminas de importância industrial são: monoetanolamina (MEA), diglicolamina (DGA), dietanolamina (DEA), diisopropanolamina (DIPA), metildietanolamina (MDEA) e trietanolamina (TEA) (VAIDYA; KENIG, 2007). Há considerável número de processos comerciais disponíveis para a absorção de CO₂ baseada em único reagente ou em sistema composto com mais de um solvente químico (aminoetoxietanol e MEA, por exemplo). Ainda assim, as soluções contendo MEA são amplamente utilizados na captura de CO₂, devido à sua taxa de reação mais rápida (RUFFORD et al., 2012).

O supracitado processo, entre CO_2 e absorvente químico, é realizado em circuito fechado, composto por colunas de absorção e dessorção, a partir de solventes aquosos contendo alcaloaminas, normalmente. A corrente contendo o CO_2 é "adoçada" na unidade de absorção (remoção de CO_2 ou gases ácidos), enquanto o solvente carregado (contendo o soluto) é regenerado na unidade de dessorção (fixação do CO_2). O solvente sem o CO_2 é reutilizado para absorção, ao passo que o CO_2 é comprimido e transportado para uso ou armazenamento posterior (ZHENG et al., 2017).

A reação entre MEA e CO₂ em meio aquoso forma quatro compostos diferentes: CO₂ dissolvido ou ácido carbônico (H₂CO₃), bicarbonato (HCO₃⁻), carbonato (CO₃⁻²) e intermediário carbamato (HO-(CH₂)₂-NHCOO⁻). O equilíbrio químico, bem como as concentrações destes componentes, depende da concentração total de carbono inorgânico (CIT) e pH da fase líquida (DONG; CHEN; GAO, 2010).

A principal vantagem de utilização e operação da fixação química é a elevada eficiência de absorção. Para reduzir custos de projeto e aumentar a eficiência de absorção química de CO₂, um dos aspectos imprescindíveis é selecionar o absorvente químico adequado (PENG; ZHAO; LI, 2012). Geralmente, a capacidade de um absorvente químico é relatada como a capacidade de carregamento de CO₂ ou gases ácidos, como sulfeto de hidrogênio (H₂S).

Contudo, a fixação química com MEA é corrosiva a equipamentos e o absorvente pode ser degradado por reações irreversíveis com oxigênio (O_2) e óxidos (NO_X e SO_X) presentes em gases de combustão. Por conseguinte, produtos cancerígenos, como as nitrosaminas, são formados na degradação de MEA. Além disso, o solvente pode ser perdido por evaporação, levando a necessidade de reposição de cerca de 1,6 kg MEA por t CO₂ capturado (ZHANG et al., 2014; ZHENG et al., 2017).

3.4 BIOFIXAÇÃO DE CO₂

A utilização de microalgas para captura de CO₂ (a biofixação de CO₂) apresenta como vantagem a atenuação da concentração de CO₂ atmosférico, bem como potencialidade de produção de biocombustíveis e outros metabólitos secundários de interesse comercial. Neste sentido, de acordo com Chisti (2007), a produção de 1 kg de biomassa microalgal utiliza cerca de 1,8 kg de CO₂. A partir deste dado, considerando a produção anual industrial (6.200 t) dos três principais gêneros de microalgas (*Spirulina, Chlorella* e *Dunaliella*) (PULZ; GROSS, 2004), aproximadamente 11.350 t de CO₂ pode ser sequestrado.

O cultivo de microalgas para o sequestro de CO_2 pode ser realizado em reatores abertos ou em fotobiorreatores (TEBBANI et al., 2014). O sistema aberto, normalmente, não tem controlados parâmetros como a luminosidade, agitação, temperatura e pH, mas dispensa o gasto com iluminação artificial. As flutuações de temperatura e disponibilidade de luz, em tais reatores, ocorre devido variações sazonais climáticas normais. Assim, cultivos de microalgas em design aberto, com o único objetivo de biofixação de CO_2 , não é muito utilizado, pois o tempo de residência do gás é baixo (BRENNAN; OWENDE, 2010). Como solução, algumas construções de reatores *Raceway* tem adicionado um canal ("fosso") com maior profundidade de cerca de 1,0, localizado após as pás, no qual se adiciona o CO_2 ou, então, é possível injetar ar para dessorção de O_2 (PAWLOWSKI et al., 2017).

Em fotobiorreatores, o grau de controle sobre os parâmetros fundamentais que influenciam a cultura é superior a configuração aberta (CARVALHO et al., 2006). Além disso, estes fotobiorreatores, normalmente, apresentam maiores colunas de cultivo para transferência do CO₂ da fase gasosa à fase líquida e maiores produtividades de biomassa. No entanto, com sistemas fechados, a condução microalgal é mais dispendiosa que os biorreatores abertos (ACIÉN et al., 2012). Em vista disso, a biofixação de CO₂ por microalgas em fotobiorreatores é realizada sob demanda de produção de biomassa, por meio da manutenção do pH ideal da cepa (ANDRADE et al., 2016a).

A biofixação de CO₂ é opção interessante para empresas que necessitem adequar o nível do gás de exaustão da geração de energia. Neste aspecto, Costa et al. (2015) constataram que o gás de combustão, da Usina a carvão mineral, quando adicionado no cultivo da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18, aumenta a produção de biomassa (em 35%) e reduz cerca de 24% o CO₂ do gás de combustão. Todavia, o principal problema associado à biofixação de CO₂ de gases de combustão, por microalgas são as elevadas temperaturas do gás de saída, presença de NOx, SOx, bem como outras impurezas, de acordo com combustível fóssil utilizado (BRENNAN; OWENDE, 2010). A redução de custos, para biofixação de CO₂ por microalgas em fotobiorreatores, pode ser alcançada, por meio da redução de custos com nutrientes, utilizando águas residuais (CHINNASAMY et al., 2009) e resíduos do processo de geração de energia, como minerais (VAZ; COSTA; MORAIS, 2016a; DUARTE; COSTA, 2017).

A cepa *Chlorella fusca* LEB 111, isolada da Usina Termelétrica a carvão Presidente Médici (Candiota-RS), tem apresentado resultados promissores quanto a fixação de CO₂ e a modificações em seu meio de cultivo (DEAMICI et al., 2016; DUARTE; FANKA; COSTA, 2016; VAZ; COSTA; MORAIS, 2016a, 2016b; DUARTE et al., 2017). Não obstante, a cepa de *Spirulina* sp. LEB 18, nativa da Lagoa Mangueira (MORAIS et al., 2008).

3.5 FIXAÇÃO QUÍMICA E BIOFIXAÇÃO DE CO₂ COMBINADAS

O emprego da tecnologia de absorção química combinada a biofixação de CO₂ por microalgas foi abordada com os cultivos de *Scenedesmus* sp. (CHOI et al., 2012; KIM et al., 2013), *Scenedesmus dimorphus* (SUN et al., 2015), *Spirulina* sp. LEB 18 (ROSA et al, 2015; ROSA et al., 2016), *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp. e *Pseudochlorococcum* sp. (AL-ZUHAIR; ALKETBI; AL-MARZOUQI, 2016).

Choi et al. (2012) verificaram que a adição de 300 mg L⁻¹ de MEA (4,91 mmol L⁻¹) aumentou a concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID) e a fixação de CO₂ em relação ao ensaio sem adição de MEA (63 % de aumento). Neste estudo, foi destacado que a concentração de clorofila e o consumo de nitrato aumentaram de forma correspondente. Este trabalho também definiu que a concentração de MEA superior a 400 mg L⁻¹ (6,55 mmol L⁻¹) inibiram a produtividade de biomassa devido a formação, provável, de intermediário carbamato.

Kim et al. (2013) ratificaram aumento de CID com a adição dos absorventes químicos testados (MEA, 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP), dietanolamina, trietanolamina - TEA) em relação ao ensaio sem os compostos. Estes autores obtiveram aumento de 30,5 % de fixação de CO₂ com a adição de 5 mmol L⁻¹ (750 mg L⁻¹) de TEA em relação ao ensaio controle.

No estudo em questão, a adição repetida de TEA aumentou a fixação de CO₂ em 39,3 % e 18,5 % em relação ao ensaio sem adição e com adição única, respectivamente.

Sun et al. (2015), além de comprovarem o aumento de CID proporcional a adição de MEA (50, 100, 150 e 200 mg L⁻¹) em experimentos abióticos, destacaram que a absortividade de CO₂ permaneceu maior que 60% para uma faixa de pH entre 6,5 e 10,0. No mencionado trabalho, a produtividade de biomassa e de lipídios de *S. dimorphus* foram aumentadas com MEA, assim como com adição de 100 mg L⁻¹ (1,64 mmol L⁻¹) do absorvente, a eficiência de utilização de CO₂ atingiu 76,1 %. Esta microalga teve seu crescimento inibido com concentração de MEA superior a 150 mg L⁻¹ (2,46 mmol L⁻¹).

O estudo de Rosa et al (2015) verificou que a adição de 12,2 mg L⁻¹ (0,20 mmol L⁻¹) de MEA a cada corte, combinado com a reutilização de meio de cultivo, em ensaio semicontínuo, aumentou 60 % o número de ciclos de crescimento, 40 % a fixação de CO₂ e 50 % a concentração de carboidratos de *Spirulina* sp. LEB 18, em relação ao ensaio isento de absorvente. Rosa et al (2016) selecionaram a tolerância da supracitada cepa em 0,13 g_{MEA} g_{biomassa}⁻¹ e que a concentração de proteínas desta cianobactéria aumenta em média 17,0 % m m⁻¹ quando cultivada com adição de 12,2 mg L⁻¹ de MEA.

As microalgas *Chlamydomonas* sp., *Chlorella* sp. e *Pseudochlorococcum* sp. apresentaram elevado crescimento (0,365 d⁻¹, 0,352 d⁻¹ e 0,669 d⁻¹, respectivamente) e capacidade de remoção de CO_2 do meio com taxa de 120, 135 e 12,3 mmol mL⁻¹ d⁻¹, respectivamente, em presença de solução de 10 % de DEA (AL-ZUHAIR; ALKETBI; AL-MARZOUQI, 2016).

3.6 HISTÓRICO DA LINHA DE PESQUISA EM QUE A TESE ESTÁ INSERIDA

A pesquisa com o cultivo de microalgas pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG iniciou em 1996. Nestes anos foram estudados diversos aspectos envolvendo condições de cultivo, utilização de diversas cepas de microalgas, condução e configuração de biorreatores, utilização de biocompostos da biomassa, entre outros. Em 2005, O LEB, em parceria com a Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica (Eletrobrás-CGTEE), implementou a Planta Piloto de Biofixação de CO₂ por microalgas. Este complexo, de 6.000 m², foi instalado nas dependências da Usina Termelétrica Presidente Médici (UTPM), na cidade de Candiota-RS. A área construída da Planta conta com laboratórios, três biorreatores *Raceway* (dois com 18 m³ e um com 1 m³) e *Skid* contendo equipamentos para filtrar, comprimir e armazenar o gás de combustão do processo de queima do carvão mineral da Usina. A parceria LEB/Eletrobrás-CGTEE deu início as pesquisas sobre a biofixação de CO₂ por microalgas no laboratório. Do supracitado projeto, o LEB atingiu metas que englobaram o isolamento e cultivo de cepas nativas do complexo da Termelétrica (MORAIS; COSTA, 2007b; DUARTE et al., 2017), a biofixação de CO₂ com gás de combustão sintético (MORAIS; COSTA, 2007a, 2007c; RADMANN; COSTA, 2008; MORAIS; RADMANN; COSTA, 2011; RADMANN et al., 2011; ROSA et al., 2011; DUARTE; FANKA; COSTA, 2016) e real (COSTA et al., 2015; VAZ; COSTA; MORAIS, 2016b; DUARTE et al., 2017), bem como, simulou condição real de cultivo (adição de gás e cinzas oriundos do processo de combustão) e constatou biomassa livre de metais pesados (VAZ; COSTA; MORAIS, 2016a).

Ainda a respeito da biofixação de carbono por microalgas, publicações internacionais importantes foram obtidas. Entre essas, se destacam trabalhos envolvendo a biofixação de CO₂ por microalgas e absorventes químicos (ROSA et al., 2015, 2016), estudo de parâmetros hidrodinâmicos para melhoramento da absorção de CO₂ (MORAES et al., 2016) e modos de condução semicontínuos com adição de CO₂ (MOREIRA et al., 2016; MOREIRA; COSTA; MORAIS, 2016). Recentemente, os resultados obtidos acerca do citado tema, também resultaram em dois capítulos de livros internacionais no tema de utilização de gás de combustão por microalgas (COSTA et al., 2017b) e sobre os aspectos de uma biorrefinaria de microalgas para produção de biocombustíveis (COSTA et al., 2017a). Tais publicações científicas foram possíveis, pois foram defendidas inúmeros Trabalhos de conclusão de curso, Dissertações e Teses sobre a biofixação de CO₂.

Diante disso, o trabalho de tese buscou envolver toda a experiência e tecnologias desenvolvidas pelo grupo do LEB, para dar continuidade a aplicação da biotecnologia de microalgas. Neste sentido, o presente trabalho utilizou diferentes modos de condução de cultivo, microalgas isoladas de condições adversas (água de produção de petróleo e de Usina Termelétrica), bem como aplicou o processo de absorção química agregado ao bioprocesso de biofixação de CO₂. No corrente trabalho foram utilizados os principais gêneros de microalgas da literatura, *Chlorella* e *Spirulina*, almejando maximizar a mitigação de CO₂ e a produção de biomassa.

CAPÍTULO III

4 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

A presente Tese de Doutorado foi dividida em quatro etapas, cada uma correspondente a um artigo científico, listados abaixo. As três primeiras etapas do trabalho foram realizadas no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da FURG, enquanto que a quarta etapa foi realizada em Almería, na Espanha, no período de Doutorado Sanduíche.

Os trabalhos desenvolvidos no LEB foram centrados na fixação de CO_2 por microalgas, agregados ao processo de fixação química de CO_2 com absorvente químico monoetanolamina (MEA). Assim, no Artigo 1, foram testadas duas cepas de *Chlorella* com diferentes concentrações de MEA, avaliando a fixação de CO_2 e produção de macromoléculas com a microalga e as concentrações de MEA selecionadas. A partir da tolerância de *Chlorella* ao MEA foi realizada adição do absorvente químico ao longo do período de cultivo, em sistema de batelada alimentada, avaliando o crescimento e fixação de carbono (Artigo 2). O modo semicontínuo de cultivo de microalgas é usualmente empregado em escala industrial. Ao encontro disso, a cepa *C. fusca* LEB 111, diante de diferentes parâmetros operacionais de cultivo semicontínuo, adição de MEA e CO_2 , foi avaliada (Artigo 3).

O trabalho no exterior foi desenvolvido junto ao grupo de Biotecnologia de Microalgas Marinhas, da Universidade de Almería, na Espanha. Entre as linhas de pesquisa do grupo, se destacam o controle, operação e o aumento de escala de processos para a produção de biomassa de microalgas. Para isso, a Equipe conta com estrutura na Universidade e planta piloto que possuí, além de laboratórios, 10 fotobiorreatores tubulares de 3 m³ cada, 1 fotobiorreator tubular vertical de 3 m³, reatores *Raceway* de 0,5 m³ (3) e de 14 m³ (2). Desta forma, o Artigo 4, contou com as tecnologias e experiência do mencionado grupo, para avaliar o equilíbrio de carbono no cultivo de *Spirulina platensis* em condições *outdoor* e escala piloto, bem como avaliar em condição *ex situ* a taxa fotossintética desta microalga frente a MEA.

Artigo 1 - Cultivo de microalga verde com monoetanolamina: avaliação da fixação de CO₂ e produção de macromoléculas;

Artigo 2 - Cultivo de *Chlorella* em batelada alimentada com CO₂ e monoetanolamina: efeitos no crescimento, fixação de carbono e produção de macromoléculas;

Artigo 3 - Produção de biomassa e fixação de CO₂ em cultivo semicontínuo de *Chlorella* com adição de monoetanolamina e reciclo de meio;

Artigo 4 - Produção de *Spirulina platensis* em escala piloto: balanço de carbono e efeito da monoetanolamina na taxa fotossintética da microalga em condição *ex situ*.

ARTIGO 1

CULTIVO DE MICROALGA VERDE COM MONOETANOLAMINA: AVALIAÇÃO DA FIXAÇÃO DE CO₂ E PRODUÇÃO DE MACROMOLÉCULAS

CULTIVO DE MICROALGA VERDE COM MONOETANOLAMINA: AVALIAÇÃO DA FIXAÇÃO DE CO₂ E PRODUÇÃO DE MACROMOLÉCULAS

RESUMO

A fixação química de dióxido de carbono (CO₂) apresenta elevado eficiência de captura desse gás, mas pode causar dano ao meio ambiente, ao contrário da biofixação de CO₂ por microalgas, que não é poluente e apresenta boa eficiência de mitigação de carbono. Assim, o objetivo deste estudo foi selecionar uma cepa de *Chlorella* frente a diferentes concentrações de monoetanolamina (MEA), avaliando o efeito deste composto sobre a fixação de CO₂ e a produção de macromoléculas. Para isso, foram testadas *Chlorella* sp. e *Chlorella fusca* LEB 111 frente a cinco concentrações de MEA e avaliado o cultivado e produção de macromoléculas da microalga mais resistente ao absorvente. A microalga *C. fusca* LEB 111 apresentou maior resistência a MEA, bem como foram obtidos os maiores acúmulos de carbono inorgânico dissolvido e eficiências de uso de CO₂ (em torno de 37% m m⁻¹) com adição de 100 e 150 mg L⁻¹ de MEA. Além disso, a maior produtividade de carboidratos e de lipídios foi obtida com adição de 50 e 100 mg L⁻¹ de MEA, respectivamente. Assim, constatou-se que o absorvente aumenta a concentração de carbono no meio, assim como o cultivo pode ser utilizado para produzir maior concentração de macromoléculas por *Chlorella*.

Palavras-chave: Biofixação de CO₂, Chlorella fusca, Chlorella sp., MEA.

1 INTRODUÇÃO

As emissões de dióxido de carbono (CO₂), oriunda de atividades industriais, uso de eletricidade e emprego de combustíveis em transporte, foram identificadas como os principais causadores do aumento do efeito estufa (EIA, 2016). A exemplo disso, a projeção realizada pelo *U.S. Energy Information Administration* (U.S. EIA) apontou que o consumo total de energia mundial aumentará 28% entre 2015 e 2040, causado principalmente pelo crescimento econômico de países como China e Índia (EIA, 2017). Neste contexto, a concentração média de CO₂ na atmosfera terrestre poderá superar a concentração alcançada no ano de 2017, que é 404 ppm segundo Dlugokencky e Tans (2018).

Entre as abordagens de sequestro de CO₂, destacam-se os processos físicos (sequestro geológico, oceânico ou armazenamento de *biochar*), químicos (carbonização mineral e depuração química com solventes) e biológicos (reflorestamento, agricultura e microorganismos fotossintéticos) (KOYTSOUMPA; BERGINS; KAKARAS, 2017; HAGEMANN et al., 2018). A captura de CO₂, em escala industrial, é majoritariamente realizada por via química em circuito fechado a partir de solventes aquosos, como as alcaloaminas, em coluna de absorção e dessorção. Estes amino-álcoois tem como principal vantagem a capacidade elevada de carga de CO₂ frente aos demais solventes. Mas, a desvantagem do emprego de monoetanolamina (MEA) no citado processo, por exemplo, se refere ao elevado consumo de energia para o passo de dessorção (HÜSER; SCHMITZ; KENIG, 2017). A exemplo disso, o preço do carbono, segundo o Sistema de Comércio de Emissão da União Europeia é cerca de $8,0 \in t^{-1}$ de CO₂ (HÜSER; SCHMITZ; KENIG, 2017), enquanto que, segundo Ho, Allinson e Wiley (2009), os custos para remover o CO₂ por processo químico é de mais de 85 $\in t^{-1}$ de CO₂.

A biofíxação de CO_2 por microalgas figura entre as abordagens mais promissoras de fixar este gás de efeito estufa (CHEAH et al., 2015), principalmente porque estes microorganismos possuem alta taxa de crescimento em comparação com plantas terrestres (CHEN et al., 2013). Além disso, a biomassa produzida, a partir do cultivo, contém componentes de valor agregado, tais como lipídios, proteínas e carboidratos, que a potencializam para o uso em alimentos (BABUSKIN et al., 2014; SANTOS et al., 2016), bem como pode ser convertida em bioprodutos, como biocombustíveis (DONG et al., 2016) e fármacos (LIU; POHNERT; WEI, 2016). Neste aspecto, o melhor desempenho de crescimento e o enriquecimento da biomassa microalgal com os compostos citados, está diretamente ligado ao estabelecimento das melhores condições de diversos parâmetros, entre eles, pH, temperatura, luminosidade e concentração de CO_2 (JEREZ et al., 2016). Diante das informações supracitadas, promissora ideia envolvendo o processo químico e o bioprocesso de captura de CO₂ por microalgas, foi encontrada nos trabalhos com as microalgas do gênero *Scenedesmus* (CHOI; KIM; LEE, 2012; KIM et al., 2013) e *Spirulina* (ROSA et al., 2015, 2016) com absorventes químicos. Todavia, há lacunas de estudos neste aspecto com *Chlorella*, este que é, segundo Liu e Hu (2013), um dos gêneros de microalgas mais estudado e cultivado no mundo. No presente estudo, foi proposto testar cepas de *Chlorella*, isoladas de ambientes adversos, frente a diferentes concentrações de MEA e cultivar a microalga selecionada com o mencionado absorvente químico, em fotobiorreatores apropriados à fixação de CO₂, visando aumentar a utilização de carbono, produção de biomassa e macromoléculas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido por meio da seleção de cepa de *Chlorella* tolerante às concentrações de MEA (Etapa 1) e pela avaliação da microalga escolhida frente a interação do absorvente químico e o CO_2 (Etapa 2).

2.1 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO

Os micro-organismos utilizados na Etapa 1 foram *Chlorella fusca* LEB 111 (DUARTE; FANKA; COSTA, 2016) e *Chlorella* sp. (HENRARD et al., 2014) (Figura A1, em ANEXO), enquanto que, para Etapa 2 foi utilizada a primeira microalga verde citada. As microalgas são pertencentes a Coleção de Culturas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). *Chlorella* sp. foi isolada de reservatórios de água de produção de petróleo do Rio Grande do Norte, a partir de projeto envolvendo a FURG e a Petrobras. *Chlorella* fusca LEB 111 foi isolada da lagoa de estabilização de cinzas da Usina Termelétrica Presidente Médici (Operada pela Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica - Eletrobrás CGTEE), localizada na cidade de Candiota-RS. O meio de cultivo utilizado nos cultivos com MEA foi o BG-11 (RIPPKA et al., 1979) isento de Na₂CO₃, enquanto que os ensaios controles foram realizados com meio BG-11 completo.

2.2 ABSORVENTE QUÍMICO

O absorvente químico empregado em todos ensaios foi a monoetanolamina (MEA, C_2H_7NO) P.S. Vetec, com pureza mínima de 99,0% m m⁻¹. A Etapa 1 foi realizada com cinco concentrações de MEA (50, 75, 100, 200 e 300 mg L⁻¹), baseadas nos estudos de Choi, Kim e

Lee (2012) e Rosa et al. (2016). Na Etapa experimental 2, as concentrações de MEA utilizadas, 50, 100 e 150 mg L⁻¹, foram escolhidas a partir da Etapa 1, na qual foi selecionada uma concentração de toxicidade máxima (morte celular) e outra de toxicidade de redução de crescimento.

2.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os ensaios controles (isento de MEA e com MEA) foram realizados em duplicata. Na Etapa 1, os ensaios foram realizados em fotobiorreatores com volume total de 0,5 L e volume de trabalho de 0,4 L. Na Etapa 2 os ensaios foram realizados em reatores adequados para biofíxação de CO₂, os fotobiorreatores tubulares verticais (FBRTv), como os utilizados por Rosa et al. (2015), com a seguinte configuração: altura de 0,55 m, diâmetro de 0,062 m e volume de 1,8 L (1,5 L útil) (Figura 1).





Fonte: Adaptado de Morais e Costa (2007)

Os ensaios foram mantidos em câmara de cultivo a 30°C, fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h escuro, iluminância de 44,8 µmol_{fotons} m⁻² s⁻¹ (promovido por lâmpadas florescentes de 40 W) e agitação diária por injeção de ar comprimido (0,45 L min⁻¹) (MORAIS; COSTA,

2007). O tempo de duração dos ensaios da Etapa 1 foi 5 d e da Etapa 2 foi 15 d (Rosa et al., 2016). A Etapa 1 foi realizada em batelada, enquanto que a Etapa 2 foi conduzida em batelada alimentada com CO₂. A Figura A2 e a Figura A3 (em ANEXO) mostram os cultivos na Etapa 1 e Etapa 2, respectivamente.

2.3.1 Demanda de carbono

A Etapa 2 foi realizada com $CO_{2(g)}$ como fonte de carbono. O volume de CO_2 , adicionado diariamente, mensurado em medidores de vazão (Cole-Parmer, EUA), foi calculado a partir de considerações de produtividade teórica de 200 mg L⁻¹ d⁻¹, concentração de carbono na biomassa de 50% m m⁻¹ e perda de CO₂ não dissolvido de 70% v v⁻¹. Assim, o $CO_{2(g)}$ foi injetado 1 min h⁻¹, durante o período de luz (12 h), totalizou uma vazão diária específica de CO₂ de 0,36 mL_{CO2} mL_{medium}⁻¹ d⁻¹ (ROSA et al., 2016). Para aumentar o tempo de residência da fonte de carbono no meio líquido a aeração foi interrompida, 1 min antes e 1 min após a adição do CO₂ por (ROSA et al., 2015).

2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

Os ensaios de todas as Etapas foram monitorados diariamente quanto a concentração de biomassa e pH. A cada 3 d a concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID) foi determinada na Etapa 2.

2.4.1 Concentração de biomassa

A concentração de biomassa foi determinada indiretamente por espectrofotometria (espectrofotômetro Shimadzu UV/VIS UVmini-1240, Japão). Esta medida consistiu em relacionar amostras de cada ensaio, lidas a 670 nm, com curva padrão previamente realizada. Esta curva, realizada previamente aos ensaios, relacionou absorbâncias no comprimento de onda citado com a massa seca de sucessivas diluições de cada inóculo de microalga (COSTA et al., 2002)

2.4.2 Alcalinidade, pH e concentração de carbono inorgânico dissolvido

A alcalinidade das amostras foi determinada por titulação potenciométrica e o pH, por medida direta utilizando pHmetro digital portátil (Mettler Toledo FiveGoTM, Suíça) (APHA, 1998). A partir destas determinações foi calculada a concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID), seguindo as equações de equilíbrio (BRUNE; NOVAK, 1981; RUBIO et al., 1999), como demonstrado por Rosa et al. (2015).

2.5 RESPOSTAS AVALIADAS

A partir dos perfis de concentração de biomassa foi obtida a máxima concentração de biomassa ($X_{máx}$, g L⁻¹), produtividade volumétrica (P_X , mg L⁻¹ d⁻¹), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$, d⁻¹) e tempo de geração (t_g , d). Os ensaios da Etapa 2 também foram acompanhados quanto a concentração de CID acumulado (CID_{AC}, mg L⁻¹), taxa de biofixação de CO₂ (TB, mg L⁻¹ d⁻¹) e eficiência de uso de CO₂ (E, % m m⁻¹). Os máximos valores obtidos, para produtividade volumétrica de biomassa ($P_{máx}$), taxa de biofixação de CO₂ (TB_{máx}) e eficiência de uso de CO₂ ($E_{máx}$), foram os maiores valores para cada parâmetro, obtido em cada batelada experimental.

2.5.1 Produtividade volumétrica de biomassa

A produtividade volumétrica de biomassa foi determinada de acordo com a Equação I-1, na qual X_t é a concentração de biomassa (mg L⁻¹) no tempo t (d) e X_0 é a concentração de biomassa (mg L⁻¹) no tempo t₀ (d).

$$P_{x} = \left(\frac{X_{t} - X_{0}}{t - t_{0}}\right)$$
(I-1)

2.5.2 Velocidade específica máxima de crescimento e tempo de geração

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$, d⁻¹) foi calculada por meio da regressão linear da fase logarítmica de crescimento, a partir de um perfil de concentração de biomassa linearizado (Ln X) *versus* tempo (d). A inclinação desta reta foi considerada, então, a $\mu_{máx}$. O tempo de geração (t_g), ou o tempo de duplicação celular, foi determinado também na fase de crescimento exponencial, de acordo com a Equação (I-2) (BAILEY; OLLIS, 1986).

$$t_{g} = \frac{\ln 2}{\mu_{máx}}$$
(I-2)

2.5.3 Concentração de carbono inorgânico dissolvido acumulado

A concentração de carbono inorgânico dissolvido acumulado (CID_{AC}, mg L⁻¹) foi calculado segundo a Equação $CID_{AC} = CID_{tf} - CID_{t0}$, na qual CID_{tf} é a concentração de CID ao final do ensaio e CID_{t0} é a concentração de CID no início do ensaio.

2.5.4 Taxa de biofixação de CO₂

A taxa de biofixação de CO₂ (TB, mg L⁻¹ d⁻¹) (TOLEDO-CERVANTES et al., 2013) foi calculada de acordo com a Equação I-3, a partir de P_X (mg L⁻¹ d⁻¹), fração mássica de carbono na biomassa microalgal (x_{cbm}), massa molar de CO₂ (MM_{CO2}, g mol⁻¹) e da massa molar

de carbono (MM_C, g mol⁻¹). A x_{cbm} na biomassa foi considerada 0,50 (50 % m m⁻¹) (CHANG; TSAI; LI, 2015)

$$TB = P_X * x_{cbm} * \frac{MM_{CO2}}{MM_C}$$
(I-3)

2.5.5 Eficiência de uso de CO₂

A eficiência de uso de CO₂ (E, % m m⁻¹) (ZHANG; KURANO; MIYACHI, 2002) foi calculada de acordo com a Equação I-4, utilizando a taxa de biofixação de CO₂ diária (TB, mg L⁻¹ d⁻¹), volume útil dos fotobiorreatores (V_{útil}, L) e a taxa mássica de CO₂ alimentada (m, mg d⁻¹).

$$E = \frac{(TB^*V_{\underline{u}\underline{t}\underline{i}\underline{l}})}{\dot{m}} *100$$
(I-4)

2.6 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA

Ao final dos ensaios a biomassa produzida foi recuperada por centrifugação (Hitachi Himac CR-GIII, Tóquio - Japão) a 15200 g, 20°C por 10 min, ressuspendida em água destilada e centrifugada novamente nas mesmas condições. Para aumentar a eficiência de remoção dos sais do meio de cultivo, este passo foi repetido uma vez. Ao final da centrifugação, a biomassa recuperada foi congelada a -80°C, liofilizada por 48 h e armazenada a -20°C até sua caracterização (ROSA et al., 2015).

2.7 COMPOSIÇÃO PROXIMAL

A concentração das principais macromoléculas, proteínas (LOWRY et al., 1951), carboidratos (DUBOIS et al., 1956) e lipídios (MARSH; WEINSTEIN, 1966), foram determinadas por métodos espectrofotométricos, enquanto que a umidade foi determinada por método gravimétrico da AOAC (2000).

2.7.1 Preparo de amostra para análise de proteínas e carboidratos

A biomassa utilizada para análise de proteínas e carboidratos foi submetida a prétratamento para rompimento celular. Este procedimento consistiu no preparo de extrato, contendo 10 mg de biomassa e 20 mL de água destilada, o qual foi sonicado em sonda ultrassônica (COLE PARMER CPX 130 – Illinois – USA) com 10 ciclos de funcionamento (59 s ligada e 59 s desligada).

2.7.2 Proteínas

O método colorimétrico de Lowry et al. (1951) determina proteínas solúveis. Logo, a determinação da concentração de proteínas total, presente na biomassa de *Chlorella*, foi obtida pela solubilização de todas as proteínas presentes na biomassa. Este procedimento consistiu em retirar, em triplicata, 0,5 mL do extrato preparado (item 2.7.1), adicionar 0,5 mL de NaOH (1 mol L⁻¹) e aquecê-los a 100°C, por 5 min. Posteriormente, o extrato foi resfriado em banho de água fria por 10 min. Nesse, foram adicionados 2,5 mL de catalisador (Na₂CO₃ 5 % m v⁻¹, tartarato de sódio e potássio 1,0 % m v⁻¹ e CuSO₄.5H₂O, 0,5 % m v⁻¹) e 0,5 mL de Follin-Ciocalteau (1 mol L⁻¹). Os extratos, com os reativos, foram colocados no escuro por 30 min e, posteriormente, foram quantificadas quanto a suas transmitâncias a 750 nm em espectrofotômetro (Shimadzu UV/VIS UVmini-1240, Japão). Por fim, a concentração de proteínas foi obtida de curva padrão, que relacionou diferentes concentrações de albumina de soro bovino e suas respectivas transmitâncias no citado comprimento de onda.

2.7.3 Carboidratos

O teor de carboidratos foi determinado por método fenol-sulfúrico de Dubois et al. (1956), utilizando curva padrão de glicose, previamente realizada a partir de diferentes concentrações do carboidrato com suas respectivas transmitâncias a 488 nm. A determinação da concentração de carboidratos consistiu em tomar três alíquotas de 1,0 mL do extrato produzido (item 2.7.1) em tubos de ensaios com tampa. Nestes tubos foram adicionados 1,0 mL de fenol (5,0 % m v⁻¹), levados à agitação leve em vortex, seguido pela a adição de 5 mL de H₂SO₄ P.A. e moderada agitação por inversão. Este extrato foi repousado em temperatura ambiente por 10 min e depois foram resfriados em banho de água fria por 20 min para cessar a reação. Decorrido o tempo, as transmitâncias de cada réplica foi lida em espectrofotômetro (Shimadzu UV/VIS UVmini-1240, Japão) em comprimento de onda de 488 nm. Por fim, as leituras obtidas foram correlacionadas com a curva padrão de glicose supradita e a concentração de carboidrato a carboidrato de glicose supradita e a concentração de carboidrato foi obtida.

2.7.4 Lipídios

O teor de lipídios foi determinado de acordo com Marsh e Weinstein (1966), a partir de curva padrão de tripalmitina (HOLLAND; GABBOTT, 1971). O método teve início adicionando 10 mg de biomassa, uma gota de água destilada, 10 esferas de vidro e 5 gotas clorofórmio: metanol (1:2) em tubo de centrífuga de 15 mL. Posteriormente, os tubos foram agitados em vortex por 3 min, seguido pela adição de 1 mL da mistura de solventes citados e

aquecidos à 60°C, por 3 min. Transcorrido o tempo, o extrato obtido foi transferido a outro tubo de centrífuga, sendo as esferas de vidro lavadas com 3,5 mL da mistura extratora. O tubo com o novo extrato foi centrifugado (3000 rpm por 10 min) e o seu sobrenadante (solventes e lipídios) foi transferido para tubo de centrífuga de 50 mL. Este processo foi repetido até que a biomassa e o sobrenadante não apresentassem mais coloração. Ao tubo de centrífuga de 50 mL foi adicionado 1,5 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água destilada por cada extração realizada. Em seguida, o extrato foi agitado em vortex e centrifugado (3000 rpm por 10 min), separando a fase inferior (apolar) para balão de fundo chato, após filtração em papel filtro com Na₂SO₄. O balão foi levado a evaporador rotativo, sob vácuo, em banho à 50°C. Os analitos secos foram ressuspendidos com 3 mL de clorofórmio, dos quais são divididos em três alíquotas de 0,2 mL cada (triplicata da análise), adicionados em tubo de vidro com tampa. Esses, tiveram o solvente seco em banho seco (60°C à vácuo), adicionados de 2 mL de H₂SO₄ P.A., agitados em vortex e levados a banho seco (200°C, por 15 min). Passado o tempo, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente, seguidos por banho de água a ± 4°C. Finalmente, aos tubos foram adicionados 3 mL de água destilada, resfriados em água \pm 4°C e a temperatura ambiente, com leitura de transmitâncias a 375 nm em espectrofotômetro (Shimadzu UV/VIS UVmini-1240, Japão).

2.7.5 Umidade e cinzas

A umidade das biomassas foi determinada por metodologia oficial da AOAC (2000). Esta análise foi realizada por método gravimétrico, em triplicatas de amostras de cada condição, a 105°C em estufa, até massa constante. Então, com a concentração das macromoléculas e de umidade, por diferença de massa se calculou a porcentagem de cinzas presente em cada biomassa.

2.8 PRODUTIVIDADE DE CARBOIDRATOS E LIPÍDIOS

A produtividade de macromolécula ($P_{macromolécula}$, mg L⁻¹ d⁻¹) foi determinada de acordo com a Equação I-6, na qual P_f (mg L⁻¹ d⁻¹) é a produtividade volumétrica no final dos ensaios e $f_{macromolécula}$ (mg_{macromolécula} mg_{biomassa}⁻¹) expressa a massa da macromolécula de interesse por grama de biomassa (SUN et al., 2015).

$$P_{\text{macromolécula}} = P_{\text{f}} f_{\text{macromolécula}} \tag{I-6}$$

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As respostas foram comparadas por análise de variância (ANOVA), seguida por teste de Tukey, com nível de confiança de 95%, em Software *Statistica* 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SELEÇÃO DE CEPA MICROALGAL E CONCENTRAÇÕES DE MEA

Os ensaios com *Chlorella* fusca LEB 111, em praticamente todas as concentrações de monoetanolamina (MEA), não apresentaram fase de adaptação (Figura 2a). Este fato ocorreu, provavelmente, porque o MEA interage rapidamente com o meio (HÜSER; SCHMITZ; KENIG, 2017) e apresenta maior toxicidade nos instantes iniciais de cultivo. Entretanto, o crescimento de *Chlorella* sp. foi inibido por todas as concentrações de MEA testadas, visto que os perfis de concentração de biomassa foram inferiores ao obtido no experimento isento do absorvente químico (Figura 2b).





A adição de MEA no cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111 não influenciou o crescimento de biomassa nas concentrações de 50 e 75 mg L⁻¹, sendo os perfis nestas condições semelhantes ao ensaio controle (Figura 2a). A concentração de biomassa com adição de 100 e 200 mg L⁻¹ foi influenciada negativamente, mas ainda houve aumento do parâmetro. Porém, o ensaio com adição de 300 mg L⁻¹ de MEA apresentou declínio da concentração de biomassa a

partir do primeiro dia de cultivo e foi encerrado ao segundo dia devido a coloração amarela da cultura e ausência de células viáveis, confirmadas por microscópio óptico.

A cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou tolerância inicial de 125 mg_{MEA} g_{biomassa}-1 (ROSA et al., 2016). Frente a isso, o crescimento de *C. fusca* LEB 111 (Figura 1a) não foi reduzido, mesmo quando a adição de MEA foi 4,5 vezes maior que a citada (563 mg_{MEA} g_{biomassa}-1, ensaio com adição de 75 mg L⁻¹ de MEA). *Chlorella* é um gênero de alga verde que possuí núcleo individualizado (eucariótica) e a presença de estrutura de multicamadas como parede externa (flagelo, microtúbulos, estrutura em várias camadas e raiz microtubular). As cianobactérias, por outro lado, são eubactérias mais rudimentares estruturalmente, sem núcleo individualizado e com parede celular muito similar a bactérias Gram negativas (LEE, 2008). Sendo assim, a microalga testada no corrente trabalho foi mais tolerante que a cianobactéria citada devido, provavelmente, a presença da mencionada parede celular melhor desenvolvida.

O pH médio dos ensaios foi relativamente estável, variando entre todas as adições de MEA (mínimo e máximo) de 9,14 \pm 0,01 e 9,97 \pm 0,25, 8,86 \pm 0,22 e 10,23 \pm 0,25 para os ensaios com *Chlorella. fusca* LEB 111 e *Chlorella* sp., respectivamente. No entanto, os cultivos com *C. fusca* LEB 111 apresentaram, em média, a menor variação (0,83) em comparação aos ensaios com *C. sp.* (1,37). Isto é um indicativo que a adição destas concentrações de MEA pode não afetar a distribuição iônica dos componentes do meio de cultivo BG-11, o qual é indicado como ideal para o gênero de microalga estudado.

A partir dos perfis de concentrações de biomassa (Figura 1) e dos valores estáveis de pH obtidos nos ensaios, *C. fusca* LEB 111 foi a cepa escolhida entre as duas microalgas avaliadas. Sendo assim, foram considerados os resultados médios de crescimento e análise de macromolécula somente da biomassa de *C. fusca* LEB 111 (Tabela 1).

Os valores máximos das respostas avaliadas $X_{máx}$ e $P_{máx}$, para o cultivo de *C. fusca* LEB 111, apresentaram o mesmo comportamento: foram iguais estatisticamente (p > 0,05) ao ensaio controle até a concentração 75 mg L⁻¹ de MEA (Tabela 1). Os ensaios com adição de 100 e 200 mg L⁻¹ de MEA, apresentaram $X_{máx}$ e $P_{máx}$ iguais estatisticamente (p > 0,05), mas inferiores (p < 0,05) ao ensaio controle e aos experimentos com as duas menores concentrações de MEA testadas (Tabela 1). Em relação a concentração de proteínas, o absorvente químico reduziu significativamente o parâmetro quando foi testado 200 mg L⁻¹ de MEA. A concentração de carboidratos, por outro lado, não foi influenciada significativamente (p > 0,05) por nenhuma das concentrações testadas do absorvente químico, sendo os valores médios encontrados entre 16 e 18% m m⁻¹. Isto ocorreu, provavelmente, devido ao curto tempo de cultivo, utilizado para

selecionar concentrações de MEA, que não permitiu a identificação de aumento de concentração de carboidratos.

MEA.				
MEA	X _{máx}	P _{máx}	Proteínas	Carboidratos
(mg L ⁻¹)	(g L ⁻¹)	$(mg L^{-1} d^{-1})$	(%m m ⁻¹)	(% m m ⁻¹)
Controle	$0,77{\pm}0,06^{a}$	145,0±4,3ª	54,0±1,0 ^a	16,1±0,3ª
50	0,62±0,03 ^a	131,6±1,5 ^a	56,1±2,7 ^a	17,6±0,3ª
75	0,64±0,06 ^a	146,0±14,1 ^a	55,0±1,0 ^a	18,0±0,3ª
100	0,42±0,02 ^b	73,0±5,2 ^b	55,8±0,8 ^a	16,9±0,6ª
200	0,36±0,06 ^b	57,4±8,1 ^b	$48,4\pm1,2^{b}$	17,8±1,4 ^a
300	0,20±<0,01°	n.d.	n.d.	n.d.

Tabela 1 - Resultados médios obtidos para a concentração máxima de biomassa $(X_{máx})$ e produtividade máxima $(P_{máx})$ de *Chlorella fusca* LEB 111 com diferentes concentrações de

Letras iguais sobrescritas na mesma coluna indicam que as médias não foram diferentes significativamente com nível de confiança de 95% (p > 0.05); n.d.: não determinado.

Os ensaios da Etapa 1 indicaram, não só a cepa de microalga, mas também delimitaram que até a concentração de MEA de 75 mg L⁻¹ não houve redução de crescimento e que 300 mg L⁻¹ é impeditivo a reprodução celular da cepa *C. fusca* LEB 111. Neste sentido, as três concentrações do absorvente utilizadas nos ensaios em FBRTv tiveram a mesma diferença entre si a partir da concentração de 50 mg L⁻¹.

3.2 EFEITO DO MEA NO CULTIVO DE *Chlorella fusca* EM FOTOBIORREATORES TUBULARES

A produção em larga escala de microalgas, com poucas exceções, é limitada a biorreatores abertos, os quais possuem menor custo de produção (RICHMOND, 1992), mas que também limitam a produtividade de biomassa microalgal, em relação à os fotobiorreatores (biorreatores fechados). Esses, por sua vez, apesar de terem a sua aplicação concentrada em menor escala, fornecem ambiente que garante o cultivo de estirpe específica, com contaminação muito reduzida, permitem o controle mais preciso dos parâmetros de cultura (como pH, temperatura, O₂ dissolvido, por exemplo) (ZITTELLI et al., 2013), além de aumentar a produtividade de biomassa. Logo, a escolha dos fotobiorreatores tubulares verticais para o cultivo de microalga com MEA-CO₂ foi pautada, não só nas características supraditas, mas

também no fato de que esta configuração de reator proporciona maior tempo de interação $CO_{2(g)}$ com o meio de cultivo.

O perfil de concentração de biomassa (Figura 3a) mostra que todos os ensaios com adição de MEA apresentaram fase de adaptação de 3 d. O crescimento exponencial de *C. fusca* LEB 111, com adição crescente de MEA, teve duração de 4, 5 e 4 d, para os ensaios com adição de 50, 100 e 150 mg L⁻¹ do absorvente, respectivamente. Embora os ensaios com MEA tenham apresentado fase de adaptação, esses não atingiram tendência de fase estacionária em 15 d. Além disso, os ensaios com as menores concentrações de MEA alcançaram comportamento muito similar ao ensaio controle a partir do 8° dia de ensaio, enquanto que o ensaio com 150 mg L⁻¹ MEA a partir do 5° dia apresentou menores valores (p < 0,05) de concentração de biomassa em relação a todas outras condições.



Os perfis de pH (Figura 3b), obtidos com adição de MEA foram similares ao ensaio controle, sendo os valores médio de 9,5, 9,7, 9,4 e 9,2, para os ensaios controle, com adição de 50, 100 e 150 mg L⁻¹ de MEA, respectivamente. O intervalo de pH para a maioria das microalgas situa-se entre 7,0 e 9,0, com intervalo ideal entre 8,2 e 8,7, embora existam espécies que habitam ambientes mais ácidos ou básicos, as quais podem atingir valores superior a pH 9,5 durante o crescimento (BARSANTI; GUALTIERI, 2006). Os valores de pH elevados verificados no presente estudo são benéficos para o cultivo de *C. fusca* LEB 111, uma vez que esta microalga foi isolada a partir de tanques de estabilização de cinzas de Usina Termelétrica, o qual possui pH acima de 9,0.
Os resultados médios de concentração de CID (Tabela 2) mostraram que a adição da maior concentração de MEA (150 mg L⁻¹) proporcionou a maior concentração de carbono inorgânico dissolvido no meio de cultivo até o 12° dia de ensaios em relação as outras concentrações testadas e ao ensaio controle (p < 0,05). No último dia de ensaio, a concentração de CID foi maior, e igual entre si (p < 0,05), nas maiores concentrações de MEA testadas, enquanto que o ensaio com 50 mg L⁻¹ apresentou resultado igual (p > 0,05) ao ensaio controle. A concentração de CID_{AC} (Tabela 2) confirmou que a adição de MEA no meio promoveu o aumento de carbono dissolvido, tendo em vista que, nas maiores concentrações de MEA foram obtidos os maiores acúmulos de carbono, os quais diferiram 4% entre si apenas. O ensaio com adição de 100 mg L⁻¹ de MEA, proporcionou aumento de quase 24,0 % em relação ao ensaio controle.

unerentes concentrações de miliri.				
Tempo (d) _	Concentração de MEA (mg L ⁻¹)			
	Controle	50	100	150
0	$19,6 \pm 0,8^{e,C}$	$21,0 \pm 0,6^{f,C}$	$25,1 \pm 0,5^{f,B}$	$29,3 \pm 0,6^{f,A}$
3	$40,2 \pm 1,1^{d,C}$	$58,2 \pm 1,0^{e,B}$	$59,1 \pm 0,5^{e,B}$	$62,7 \pm 0,4^{e,A}$
6	$62,0\pm0,3^{c,C}$	$69,8\pm1,0^{d,B}$	$69,3\pm0,2^{d,B}$	$74,6 \pm 2,4^{d,A}$
9	$71,2\pm0,7^{b,D}$	$75,4 \pm 1,6^{c,C}$	$81,1 \pm 0,9^{c,B}$	$85,8 \pm 2,7^{c,A}$
12	$82,3\pm0,5^{\text{a,C}}$	$83,3 \pm 4,9^{b,C}$	$96,1\pm3,4^{b,B}$	$105,8\pm0,5^{b,A}$
15	$90,1\pm0,1^{a,B}$	$93,6 \pm 2,1^{a,B}$	$112,4 \pm 1,5^{a,A}$	$113,4 \pm 4,4^{a,A}$
$CID_{AC} (mg L^{-1})$	$70,5 \pm 0,7^{\rm C}$	$72,6\pm 0,8^{\rm C}$	$87,3 \pm 1,4^{A}$	$84,1 \pm 1,8^{B}$

Tabela 2 – Resultados médios de concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID, mg L⁻¹) e acumulado (CID_{AC}, mg L⁻¹) no cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111 em presença de diferentes concentrações de MEA

Letras maiúsculas sobrescritas iguais na mesma linha para o mesmo tempo, ou letras minúsculas sobrescritas iguais na mesma coluna para o mesmo tratamento, indicam que as médias não diferem estatisticamente ao nível de 95% de confiança (p > 0.05).

A concentração de CID é obtida a partir do cálculo da concentração das espécies químicas (CO_2 , HCO_3^- e CO_3^{-2}) em equilíbrio (ROSA et al., 2015). Considerando o acúmulo de dióxido de carbono, do bicarbonato e do carbonato no meio líquido, os resultados obtidos no corrente trabalho mostraram que a espécie predominante foi o bicarbonato, o qual foi predominante 82,5, 85,0, 97,0 e 100 % em relação as demais espécies, quando se adicionou 0, 50, 100 e 150 mg L⁻¹ de MEA, respectivamente. Este fato mostra que, qualitativamente e quantitativamente, a fonte de carbono no meio foi melhorada com o aumento de MEA, posto

que, de acordo com Grobbelaar (2013), o bicarbonato é uma das formas preferencias de absorção do nutriente pelas células de microalgas.

Sun et al. (2015), testaram MEA em ensaios abióticos e constataram que a concentração de CID no meio de cultivo aumentou proporcionalmente com o aumento do referido absorvente químico nos primeiros 20 min de experimento. Este fato foi ratificado no corrente estudo, pois no início dos ensaios o aumento da concentração de MEA proporcionou aumento proporcional da concentração de CID. Contudo, o presente trabalho determinou a concentração de CID no meio em presença do metabolismo microalgal, o qual libera OH⁻ normalmente no processo fotossintético, como relatado por Grobbelaar (2013).

Os cultivos com adição de 50 e 100 mg L⁻¹ de MEA apresentaram X_{max} igual (p > 0,05) ao ensaio controle, enquanto que no ensaio com 150 mg L⁻¹ foi obtido o menor valor de X_{max} (p < 0,05). A P_{max} foi significativamente superior (p < 0,05) no ensaio controle em relação as outras condições, enquanto que os ensaios com as menores concentrações de MEA adicionados foram iguais estatisticamente entre si (p > 0,05) neste resultado. Os resultados de X_{max} , P_{max} e μ_{max} do presente trabalho (Tabela 3) são superiores a todos resultados encontrados por Vaz, Costa e Morais (2016), em cultivos também com *C. fusca* LEB 111 em meio BG-11 (0,70 g L⁻¹, 40 mg L⁻¹ d⁻¹, 0,08 d⁻¹), CO₂ sintético (0,84 g L⁻¹, 80 mg L⁻¹ d⁻¹, 0,12 d⁻¹), gás de combustão de carvão mineral (0,55 g L⁻¹, 60 mg L⁻¹ d⁻¹, 0,08 d⁻¹). Neste contexto, seria possível considerar cultivar *C. fusca* LEB 111, com a adição de MEA, em condições reais de mitigação de CO₂ de uma termelétrica, por exemplo, obtendo bons resultados de crescimento.

A TB_{máx} foi superior (p < 0,05) nos ensaios com as menores concentrações de MEA adicionados, assim como a resposta de E_{máx} foi superior (p < 0,05) nestes ensaios (Tabela 3). Este fato pode indicar que o absorvente químico, ao passo que captura mais CO₂ no meio líquido, como informado por Hüser; Schmitz; Kenig (2017), também pode prejudicar o crescimento e assimilação do gás quando presente na concentração de 150 mg L⁻¹. O estudo de Vaz, Costa e Morais (2016), com a mesma cepa que o corrente trabalho e CO₂ sintético, utilizou taxa mássica de CO₂ (42,5 mg d⁻¹) menor que o presente trabalho (956 mg d⁻¹). Este fato, acarretou em maior fixação diária (42,8 %) em relação ao presente trabalho. Contudo, o fornecimento de CO₂ utilizado no presente trabalho parece não ter sido limitante ao crescimento, pois a produtividade teórica estipulada foi de 200 mg L⁻¹ d⁻¹, a qual não foi alcançada por nenhuma condição proposta, nem mesmo no ensaio controle.

Parâmetro	Controle	MEA (mg L ⁻¹)		
T at ametro	Controle	50	100	150
X _{máx} (g L ⁻¹)	$1,91 \pm 0,04^{a}$	$1,99 \pm 0,03^{a}$	$1,94 \pm 0,02^{a}$	$1,71 \pm 0,01^{b}$
P _{máx} (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	$128,7 \pm 0,8^{a}$	$124,2 \pm 1,7^{b}$	$122,3 \pm 3,4^{b}$	$96,3 \pm 1,6^{\circ}$
$\mu_{m\acute{a}x}(d^{-1})$	$0,271 \pm 0,002^{a}$	$0,178 \pm 0,013^{b}$	$0,153 \pm 0,006^{b,c}$	$0,131 \pm 0,014^{\circ}$
t _g (d)	2,6 ± <0,1 ^a	$3,9 \pm 0,3^{b}$	$4,5 \pm 0,2^{b,c}$	$5,3 \pm 0,6^{\circ}$
$\Delta t (d)^*$	0-3	5-8	7-11	7-10
R ^{2**}	$0,964 \pm 0,002$	$0,991 \pm 0,006$	$0,996 \pm < 0,001$	$0,985 \pm 0,011$
TB _{máx} (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	-	$227,3 \pm 10,8^{a}$	$224,2 \pm 6,2^{a}$	$182,7 \pm 0,7^{b}$
E _{máx} (% m m ⁻¹)	-	$35,7 \pm 1,7^{a}$	$35,2 \pm 1,0^{a}$	$28,7 \pm 0,1^{b}$
Proteínas (% m m ⁻¹)	$38,1 \pm 4,5^{a}$	$32,0\pm2,3^{b}$	$32,2 \pm 1,8^{b}$	$33,5 \pm 2,2^{b}$
Cinzas (% m m ⁻¹)	5,6 ±0,9	$8,4 \pm 0,1$	$8,1 \pm 1,4$	$12,9 \pm 1,2$

Tabela 3 – Resultados médios de acompanhamento do cultivo ($X_{máx}$, $P_{máx}$, $\mu_{máx}$, t_g ,), biofixação de CO₂ ($TB_{máx}$, $E_{máx}$), concentração de proteínas e de cinzas na biomassa de *Chlorella fusca* LEB 111 cultivada com adição de diferentes concentrações de MEA.

Letras minúsculas sobrescritas iguais na mesma linha, para o mesmo parâmetro, indicam que as médias não diferem estatisticamente ao nível de 95% de confiança (p > 0.05); * Δt : início-fim da fase exponencial de crescimento; **Coeficiente de determinação da regressão linear aplicada à fase logarítmica de crescimento no perfil Ln X versus t.

A concentração de proteínas obtida na biomassa de *C. fusca* LEB 111 foi influenciada significativamente nos tratamentos com MEA, em relação ao ensaio controle, no qual se obteve maior (p < 0,05) resultado da macromolécula (38,1% m m⁻¹). Esse, no entanto, pode ser considerado baixo para a cepa, pois encontra-se relatado por outros trabalhos (DEAMICI et al., 2016; DUARTE; FANKA; COSTA, 2016) em torno de 50-60% m m⁻¹, quando a cepa foi cultivada em meio BG-11 e condições operacionais muito similares ao do presente estudo. Entre os ensaios com adição do absorvente químico não houve diferença significativa na concentração de proteínas (p > 0,05). Logo, apesar do valor médio reduzido apresentado, as diferentes concentrações de MEA não causaram redução no conteúdo total de proteínas, quando comparadas entre si.

A concentração e produtividade de carboidratos $(31,2 \pm 0,7 \% \text{ m m}^{-1} \text{ e } 38,7 \pm 3,3 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1})$ (Figura 4a) obtidos de *C. fusca* LEB 111 no ensaio com adição de 50 mg L⁻¹ de MEA foi superior (p < 0,05) aos demais tratamentos, mesmo com P_{máx} inferior (p < 0,05) ao ensaio controle (Tabela 3). A adição de 100 e 150 mg L⁻¹ de MEA, no entanto, promoveu redução significativa (p < 0,05), tanto da concentração, como da produtividade da macromolécula, à medida que foi aumentada a concentração de MEA. Este fato vai ao encontro

ao relatado por Rosa et al. (2016) com *Spirulina* sp. LEB-18, que observaram que duplicando a concentração de MEA (6,1 para 12,2 mg L^{-1}), houve aumento significativo na concentração de carboidratos em mais de 16,0% m m⁻¹.

A concentração de lipídios foi maior (p < 0,05) quando foi adicionado 100 mg L⁻¹ de MEA (28,0 ± 0,7% m m⁻¹) (Figura 4b), enquanto que as outras médias do parâmetro (em torno de 25% m m⁻¹) foram iguais (p > 0,05). Não obstante, levando em consideração P_{máx}, a produtividade de lipídios dos ensaios controle, com adição de 50 e 100 mg L⁻¹ do absorvente de CO₂, foram iguais estatisticamente e apenas o ensaio com 150 mg L⁻¹ de MEA apresentou redução significativa do parâmetro. Os ensaios de Sun et al. (2015) mostraram que a concentração total de lipídios de *Scenedesmus dimorphus*, com cinco concentrações distintas de MEA (50 a 200 mg L⁻¹) não foi diferente estatisticamente ao ensaio controle, sendo 20,0 % m m⁻¹ o valor médio encontrado em todos os tratamentos testados.



Na maioria das microalgas, o acúmulo de compostos de armazenamento, como lipídios e carboidratos, pode ser aprimorado através da limitação ou inanição de nutrientes específicos, mas às custas da produtividade de biomassa (JEREZ et al., 2016). Fatores extrínsecos, como a adição do absorvente químico, podem ser causadores de estresse, causando redução da produtividade de biomassa, mas promovendo o aumento da concentração de compostos de reserva. Neste sentido, a análise quantitativa mais realista de lipídios e carboidratos é obtida quando é considerada a concentração da macromolécula de interesse e a produtividade de biomassa. Os resultados de lipídios, por exemplo, quando foi adicionado 150

mg L⁻¹ de MEA, ratificaram a necessidade de avaliar a produtividade de macromoléculas, uma vez que a concentração percentual da macromolécula não apresentou diferença estatística (p > 0,05) a os outros tratamentos, mas a produtividade do composto foi inferior (p < 0,05).

4 CONCLUSÃO

Diante do apresentado, foi constatado que, entre as microalgas verdes estudadas, *Chlorella fusca* LEB 111 possui maior tolerância à monoetanolamina (200 mg L⁻¹). Neste contexto, além dos maiores acúmulos de CID no meio, a $E_{máx}$ (em torno de 36% m m⁻¹) foi superior nos ensaios com adição de 50 e 100 mg L⁻¹ de MEA. Além disso, em presença de 50 e 100 mg L⁻¹ de MEA, a produtividade de carboidratos e lipídios, respectivamente, foi incrementada. Assim, o uso de MEA em cultivo de *Chlorella fusca* se mostrou promissor método para aumentar a fixação de CO₂ e a produtividade de macromoléculas com potencial aplicação em biocombustíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 17° ed., 2000.

APHA. American Public Health Association (APHA). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. Washington DC., 1998.

BABUSKIN, S.; KRISHNAN, K. R.; BABU, P. A. S.; SIVARAJAN, M.; SUKUMAR, M. Functional foods enriched with marine microalga *Nannochloropsis oculata* as a source of w-3 fatty acids. **Food Technology and Biotechnology**, v. 52, n. 3, p. 292–299, 2014.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. Michigan: McGraw-Hill, 1986.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. Boca Raton: CRC Press - Taylor & Francis Group, 2006.

BRUNE, D. E.; NOVAK, J. T. The use of carbonate equilibrium chemistry in quantifying algal carbon uptake kinetics. **European Journal of Applied Microbiology Biotechnology**, v. 13, p. 71–76, 1981.

CHANG, Y.-M.; TSAI, W.-T.; LI, M.-H. Characterization of activated carbon prepared from *Chlorella*-based algal residue. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 344–348, maio 2015.

CHEAH, W. Y.; SHOW, P. L.; CHANG, J.-S.; LING, T. C.; JUAN, J. C. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 190–201, 2015.

CHEN, C.-Y. Y.; KAO, P.-C. C.; TSAI, C.-J. J.; LEE, D.-J. J.; CHANG, J.-S. S. Engineering

strategies for simultaneous enhancement of C-phycocyanin production and CO₂ fixation with *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 307–312, 2013.

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

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; FILHO, P. D.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 603–607, 2002.

DEAMICI, K. M.; CARDIAS, B. B.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, L. O. Static magnetic fields in culture of *Chlorella fusca*: Bioeffects on growth and biomass composition. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 7, p. 912–916, 2016.

DONG, T.; KNOSHAUG, E. P.; DAVIS, R.; LAURENS, L. M. L.; VAN WYCHEN, S.; PIENKOS, P. T.; NAGLE, N. Combined algal processing: A novel integrated biorefinery process to produce algal biofuels and bioproducts. **Algal Research**, v. 19, p. 316–323, 2016.

DUARTE, J. H.; FANKA, L. S.; COSTA, J. A. V. Utilization of simulated flue gas containing CO₂, SO₂, NO and ash for *Chlorella fusca* cultivation. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 159–165, 2016.

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

EIA, 2016. International Energy Outlook 2016. U.S. Energy Information Administration. Disponível em: www.eia.gov/outlooks/aeo/pdf/0383(2016).pdf. Acessado em: 18 de novembro de 2017.

EIA, 2017. International Energy Outlook 2017. Disponível em: www.eia.gov/outlooks/ieo/pdf/0484(2017).pdf. Acessado em: 18 novembro de 2017.

GROBBELAAR, J. U. Inorganic Algal Nutrition. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). Handbook of Microalgal Culture. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 123–133.

HAGEMANN, N.; SUBDIAGA, E.; ORSETTI, S.; DE LA ROSA, J. M.; KNICKER, H.; SCHMIDT, H. P.; KAPPLER, A.; BEHRENS, S. Effect of biochar amendment on compost organic matter composition following aerobic compositing of manure. **Science of the Total Environment**, v. 613–614, p. 20–29, 2018.

HENRARD, A. A.; ROSA, G. M.; MORAES, L.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Effect of the Carbon Concentration, Blend Concentration, and Renewal Rate in the Growth Kinetic of *Chlorella* sp. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

HO, M. T.; ALLINSON, G. W.; WILEY, D. E. Factors affecting the cost of capture for Australian lignite coal fired power plants. **Energy Procedia**, v. 1, n. 1, p. 763–770, 2009.

HOLLAND, D. L.; GABBOTT, P. a. A Micro-Analytical Scheme for the Determination of Protein, Carbohydrate, Lipid and RNA Levels in Marine Invertebrate Larvae. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, v. 51, n. 3, p. 659, 1971.

HÜSER, N.; SCHMITZ, O.; KENIG, E. Y. A comparative study of different amine-based solvents for CO₂-capture using the rate-based approach. **Chemical Engineering Science**, v. 157, p. 221–231, 2017.

JEREZ, C. G.; MALAPASCUA, J. R.; SERGEJEVOVÁ, M.; FIGUEROA, F. L.; MASOJÍDEK, J. Effect of Nutrient Starvation under High Irradiance on Lipid and Starch Accumulation in *Chlorella fusca* (Chlorophyta). **Marine Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 24–36, 2016.

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

KOYTSOUMPA, E. I.; BERGINS, C.; KAKARAS, E. The CO₂ economy: Review of CO₂ capture and reuse technologies. **Journal of Supercritical Fluids**, 2017.

LEE, R. E. Basic characteristics of the algae. In: **Phycology**. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. p. 3–30.

LIU, J.; HU, Q. Chlorella : Industrial Production of Cell Mass and Chemicals. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 327–338.

LIU, L.; POHNERT, G.; WEI, D. Extracellular Metabolites from Industrial Microalgae and Their Biotechnological Potential. **Marine Drugs**, v. 14, p. 191, 2016.

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, n. 1, p. 265–275, 1951.

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, n. 9, p. 1349–1352, 2007.

MARSH, J. B.; WEINSTEIN, D. B. Simple charring method for determination of lipids. **Journal of lipid research**, v. 7, n. 4, p. 574–576, 1966.

RICHMOND, A. Open systems for the mass production of photoautotrophic microalgae outdoors: physiological principles. **Journal of Applied Phycology**, v. 4, p. 281–286, 1992.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1–61, 1979.

ROSA, G. M.; MORAES, L.; CARDIAS, B. B.; SOUZA, M. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. Chemical absorption and CO₂ biofixation via the cultivation of *Spirulina* in semicontinuous mode with nutrient recycle. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 321–327, 2015.

ROSA, G. M.; MORAES, L.; SOUZA, M. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* cultivation with a CO₂ absorbent: Influence on growth parameters and macromolecule production. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 528–534, 2016.

RUBIO, F. C.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; SÁNCHEZ PÉREZ, J.; GARCÍA CAMACHO, F.; MOLINA GRIMA, E. Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, n. 1, p. 71–86, 1999.

SANTOS, T. D.; FREITAS, B. C. B.; MOREIRA, J. B.; ZANFONATO, K.; COSTA, J. A. V. Development of powdered food with the addition of *Spirulina* for food supplementation of the elderly population. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 37, p. 216–220, 2016.

SUN, Z.; ZHANG, D.; YAN, C.; CONG, W.; LU, Y. Promotion of microalgal biomass production and efficient use of CO₂ from flue gas by monoethanolamine. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 90, n. 4, p. 730–738, 2015.

TANS, P.; KEELING, R. **Recent Monthly Average Mauna Loa CO₂**. Disponível em: <www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>. Acesso em: 20 nov. 2017.

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.

VAZ, B. S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. CO₂ Biofixation by the Cyanobacterium *Spirulina* sp. LEB 18 and the Green Alga *Chlorella fusca* LEB 111 Grown Using Gas Effluents and Solid Residues of Thermoelectric Origin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 2, p. 418–429, 2016.

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, n. 2, p. 97–101, 2002.

ZITTELLI, G. C.; BIONDI, N.; RODOLFI, L.; TREDICI, M. R. Photobioreactors for Mass Production of Microalgae. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 225–266.

ARTIGO 2

CULTIVO DE *Chlorella* EM BATELADA ALIMENTADA COM CO₂ e MONOETANOLAMINA: EFEITOS NO CRESCIMENTO, FIXAÇÃO DE CARBONO E PRODUÇÃO DE MACROMOLÉCULAS

CULTIVO DE *Chlorella* EM BATELADA ALIMENTADA COM CO₂ e MONOETANOLAMINA: EFEITOS NO CRESCIMENTO, FIXAÇÃO DE CARBONO E PRODUÇÃO DE MACROMOLÉCULAS

RESUMO

As tecnologias químicas e biológicas são utilizadas para reduzir os níveis de dióxido de carbono (CO_2) e para valorar processos com este fim. Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar a interação da monoetanolamina (MEA) entre o meio de cultivo e a microalga Chlorella fusca LEB 111, em batelada alimentada (BA) com adição de CO₂. Para isso, foi realizada batelada de ensaios abióticos com adição de 50, 100 e 150 mg L⁻¹ de MEA e experimentos em BA com MEA (50 mg L⁻¹ a cada 3 d). Todos os ensaios foram realizados com injeção de CO₂, em fotobiorreatores tubulares verticais de 1,8 L, à 30 °C, 44,8 µmol_{fótons} m⁻² s⁻¹, fotoperíodo 12 h claro e 12 h escuro, por 15 d cada. Diante disso, foi determinado que o meio de cultivo BG-11 tem maior capacidade de absorção de CO₂ com adição de MEA e que o carbono na forma de HCO₃⁻ foi a espécie química predominante em todos os tratamentos abióticos. A adição de MEA em BA não apresentou redução da cinética de crescimento e da produção de biomassa, assim como nesta condução de cultivo foi obtido o maior acúmulo de CID no meio (81,4 mg L-¹), concentração de proteínas (44,0 % m m⁻¹) e lipídios (30,8 % m m⁻¹) na biomassa de Chlorella fusca LEB 111. Portanto, foi possível comprovar que a adição de CO₂ e MEA em batelada alimentada aumentam a fixação de CO₂ por C. fusca LEB 111, além de elevar a síntese de lipídios.

Palavras-chave: Dióxido de carbono, Lipídios, MEA, Produtividade, Proteínas

1 INTRODUÇÃO

A demanda energética primária mundial, aliada a dependência tecnológica por combustíveis fosseis, como o carvão mineral e petróleo, são motivos de constante preocupações devido ao contínuo aumento das emissões de dióxido de carbono (CO₂) (CHEAH et al., 2016). Países que lideram a economia mundial, entre eles os E.U.A. e a China, destacam-se como os maiores emissores de CO₂, representando 43,5% das emissões mundiais do gás (ALSHEHRY; BELLOUMI, 2015). Neste cenário, a concentração de CO₂ na atmosfera aumentou cerca de 32% desde a Revolução Industrial, ultrapassando os 405 ppm em 2017 (TANS; KEELING, 2017).

Entre as tecnologias de captura de CO₂, a absorção química, com soluções de monoetanolamina (MEA), é apontada como método mais promissor para captura do gás, atingindo eficiência de mitigação superior a 90% (LEUNG; CARAMANNA; MAROTO-VALER, 2014). No entanto, como desvantagem do processo químico são destacadas a degradação do solvente, corrosão de equipamentos e a geração de compostos voláteis (ROCHELLE, 2012), como as nitrosaminas e nitraminas, que podem ser prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente (FREDRIKSEN; JENS, 2013).

A biofixação de CO_2 por microalgas é muito estudada por se tratar de processo natural de captura de carbono, por meio da fotossíntese. Além disso, com a biofixação de CO_2 por estes micro-organismos, não são gerados passivos tóxicos e a biomassa produzida tem aplicabilidade em outros bioprocessos, como os biocombustíveis citados por Dickinson et al. (2017), por exemplo. Notavelmente, as microalgas, por serem sistemas biológicos, apresentam moderada taxa de captura de CO_2 frente aos processos químicos. Contudo, segundo Cheah et al., (2015), cepas do gênero *Chlorella* podem atingir elevadas taxas de crescimento utilizando injeção de 50% v v⁻¹ de CO_2 . Agregado a isso, o cultivo de *Chlorella* com adição periódica de CO_2 , ou outro nutriente (batelada alimentada), apresenta melhor capacidade para remoção de contaminante de água residual, produção de biomassa (MARKOU, 2015) e biofixação de CO_2 (VAZ; COSTA; MORAIS, 2016).

Diante do apresentado, uma promissora ideia seria potencializar o cultivo de microalgas, por meio do aumento da fixação de CO₂ e produção de compostos de interesse, agregando o processo químico, o qual possui maior taxa de mitigação do gás. Neste contexto, em cultivos com adição de MEA, realizados por Rosa et al. (2015) com *Spirulina* e Sun et al. (2015) com *Scenedesmus*, alcançaram aumento da produção de carboidratos e lipídios, respectivamente, agregado a superior absorção de CO₂. Entretanto, ensaios com outras cepas

de microalgas e modos de cultivos ainda podem serem explorados para maximizar a integração do processo biológico e químico. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar a interação da MEA com meio de cultivo microalgal, bem como determinar o efeito da adição periódica do absorvente químico no crescimento, fixação de CO₂ e na produção de macromoléculas de *Chlorella*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi dividido em duas Etapas: 1) Avaliação da interação do absorvente químico em cultivo abiótico e 2) Cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111 com adição de MEA e CO₂ conduzido em batelada alimentada (BA). A Etapa 1 foi realizada com três diferentes concentrações de MEA, tendo como principal objetivo selecionar um teor de absorvente para o cultivo em BA na Etapa 2. Para efeito de comparação, na Etapa 1 foi conduzido também ensaio controle negativo abiótico com meio de cultivo padrão (CN-A), ao passo que, na Etapa 2 foram realizados experimentos controles com *C. fusca* LEB 111, denominados controle negativo (CN - com BG-11 padrão) e controle com CO₂ (CCO₂ - com meio BG-11 sem Na₂CO₃).

Etapa	Denominação	MEA (mg L ⁻¹)	Meio de cultivo
1	Cultivo abiótico	50	
	Cultivo abiótico	100	BG-11 sem carbono
	Cultivo abiótico	150	
	Controle negativo abiótico (CN-A)	-	BG-11 padrão
2	Batelada alimentada com CO ₂ e MEA (BA)	50 / 3d	BG-11 sem carbono
	Controle negativo (CN)	-	BG-11 padrão
	Controle com CO ₂ (CCO ₂)	-	BG-11 sem carbono

Tabela 1 - Organização experimental dos ensaios realizados na Etapa 1 e 2

2.1 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO

A Etapa 1 foi realizada isenta de micro-organismos. A Etapa 2 foi realizada com a alga verde eucariótica *Chlorella fusca* LEB 111 (DUARTE; FANKA; COSTA, 2016), a qual é pertencente a Coleção de Culturas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). A cepa citada foi escolhida para o trabalho porque apresentou melhores respostas que *Chlorella* sp. (Artigo 1) e por ser uma microalga

tolerante a ambiente adverso (com pH elevado e presença de muitos particulados, por exemplo) como é a Usina Termelétrica Presidente Médici, a qual a mesma foi isolada. O meio de cultivo BG-11 (RIPPKA et al., 1979) foi utilizado nos ensaios CN-A e CN, enquanto que o citado meio, mas isento de Na₂CO₃, foi empregado nos experimentos com MEA e CCO₂. A Figura A4 (em ANEXO) mostra os cultivos realizados nas duas Etapas deste trabalho.

2.2 ABSORVENTE QUÍMICO E BIORREATOR EMPREGADO

O absorvente químico empregado foi a monoetanolamina (MEA, C₂H₇NO) P.S. Vetec, com pureza mínima de 99,0% m m⁻¹. A Etapa 1 foi realizada com 50, 100 e 150 mg L⁻¹ de MEA (que correspondem a quantidade de moléculas de 0,82, 1,64 e 2,46 mmol L⁻¹), a partir da seleção de concentrações do absorvente (realizada no Artigo 1), a qual foi baseada nos estudos com *Scenedesmus* (CHOI; KIM; LEE, 2012) e *Spirulina* (ROSA et al., 2016). A Etapa 2, no cultivo em BA com CO₂ e MEA, foi realizada com adição de 50 mg L⁻¹ de MEA a cada 3 d. Este teor e intervalo de adição de MEA foram escolhidos a partir dos ensaios da Etapa 1 e do Artigo 1. Para todos os cultivos foram empregados fotobiorreatores tubulares verticais, com altura de 0,55 m, diâmetro de 0,06 m e volume de 1,8 L (1,5 L útil), mostrado no Artigo 1.

2.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os ensaios foram realizados em duplicata, em câmara de cultivo a 30° C, fotoperíodo contínuo sequencial de 12 h de luz e 12 h escuro, iluminância de 44,8 µmol_{fótons} m⁻² s⁻¹ (promovido por lâmpadas florescentes de 40 W), agitação diária por injeção de ar comprimido à 0,3 vvm (v_{ar} v_{útil}⁻¹ min⁻¹) e tempo de duração de 15 d (ROSA et al., 2016). Os cultivos CN-A e CN foram conduzidos em batelada, à medida que os ensaios com MEA, em ambas etapas, foram realizados em batelada alimentada com CO₂.

2.3.1 Alimentação com CO₂

A adição de CO₂ aos cultivos foi calculada a partir de considerações de produtividade teórica de biomassa de 200 mg L⁻¹ d⁻¹, concentração de carbono na biomassa de 50 % m m⁻¹ e perda de CO₂ por desprendimento do meio líquido de 70 % v v⁻¹. Logo, o CO_{2(g)} foi adicionado 1 min h⁻¹, durante o período claro (12 h), totalizando vazão específica de CO₂ de 0,36 mL_{CO2} mL_{meio}⁻¹ d⁻¹ (10 % v v⁻¹ da vazão de agitação) (ROSA et al., 2016). Essa vazão foi mensurada em medidores de vazão de área variável, a qual foi controlada por flutuador em aço inox (Cole-Parmer, EUA). Para aumentar o tempo de residência do carbono no meio líquido, o CO₂ foi injetado após 1 min de estagnação do sistema, devido a interrupção da aeração, bem

como 1 min após a adição do CO₂ ocorreu a mesma interrupção da agitação dos ensaios (ROSA et al., 2015).

2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

Os ensaios da Etapa 1 foram monitorados diariamente quanto a alcalinidade e pH. Na Etapa 2 foi mensurado diariamente a concentração de biomassa e pH, enquanto que a cada 3 d foi monitorado também a alcalinidade dos cultivos.

2.4.1 Concentração de biomassa

A concentração de biomassa foi determinada por espectrofotometria (em espectrofotômetro Shimadzu UV/VIS UVmini-1240, Japão), como realizado por Costa et al. (2002). Tal procedimento consistiu em relacionar as amostras lidas a 670 nm com curva padrão previamente realizada, a qual relacionou as absorbâncias com a biomassa seca de diluições sucessivas do inóculo de *Chlorella fusca* LEB 111.

2.4.2 Alcalinidade, pH e concentração de carbono inorgânico dissolvido

A alcalinidade das amostras foi determinada por titulação potenciométrica e o pH por medida direta com pHmetro digital portátil (Mettler Toledo FiveGoTM, Suíça) (APHA, 1998). A partir destas determinações foi calculada a concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID), seguindo as equações de equilíbrio demonstradas por Rosa et al. (2015).

2.5 RESPOSTAS AVALIADAS

Os cultivos realizados na Etapa 2 foram analisados quanto a máxima concentração de biomassa ($X_{máx}$, g L⁻¹), produtividade volumétrica de biomassa (P_x , mg L⁻¹ d⁻¹), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$, d⁻¹) e tempo de geração (t_g , d). Os ensaios em batelada alimentada (BA) e controle com CO₂ (CCO₂) também foram analisados quanto a concentração de CID acumulado (CID_{AC}, mg L), taxa de biofixação de CO₂ (TB, mg L⁻¹ d⁻¹) e eficiência de uso de CO₂ (E, % m m⁻¹). Os máximos valores obtidos para Px ($P_{máx}$), TB (TB_{máx}) e E ($E_{máx}$) foram os maiores valores para cada parâmetro, obtido em cada batelada.

2.5.1 Produtividade volumétrica de biomassa

A produtividade volumétrica de biomassa foi determinada de acordo com a Equação II-1, na qual X_t é a concentração de biomassa (mg L⁻¹) no tempo t (d) e X_0 é a concentração de biomassa (mg L⁻¹) no tempo t₀ (d).

$$P_{X} = \left(\frac{X_{t} - X_{0}}{t - t_{0}}\right)$$
(II-1)

2.5.2 Velocidade específica máxima de crescimento e tempo de geração

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$, d⁻¹) foi calculada na fase logarítmica de crescimento, a partir do perfil de concentração de biomassa linearizado (Ln X) pelo tempo (d). O coeficiente angular da reta obtida foi considerado como a $\mu_{máx}$. O tempo de geração (t_g), ou o tempo de duplicação celular, foi determinado de acordo com a Equação tg = ln (2) $\mu_{máx}$ ⁻¹ (BAILEY; OLLIS, 1986).

2.5.3 Concentração de carbono inorgânico dissolvido acumulado

Para avaliar a transferência de carbono inorgânico para o meio de cultivo, foi calculada a concentração de carbono inorgânico dissolvido acumulado (CID_{AC}, mg L⁻¹), subtraindo o valor final calculado pelo valor inicial de CID.

2.5.4 Parâmetros de biofixação de CO2 avaliados

A partir de P_X (mg L⁻¹ d⁻¹), fração mássica de carbono na biomassa (x_{cbm}), massa molar de CO₂ (MM_{CO2}, g mol⁻¹) e da massa molar de carbono (MM_C, g mol⁻¹), foi calculada a taxa de biofixação de CO₂ (TB, mg L⁻¹ d⁻¹) de acordo com a Equação II-2 (TOLEDO-CERVANTES et al., 2013). A x_{cbm} na biomassa foi considerada 0,50 (50 % m m⁻¹) (CHANG; TSAI; LI, 2015)

$$TB = P_X *_{xcbm} * \frac{MM_{CO2}}{MM_C}$$
(II-2)

Com TB (mg L⁻¹ d⁻¹) calculado, o volume útil dos fotobiorreatores (V_{útil}, L) e a taxa mássica de CO₂ alimentada (m, mg d⁻¹), foi calculada a eficiência de uso de CO₂ (E, % m m⁻¹) (ZHANG; KURANO; MIYACHI, 2002) conforme a Equação II-3.

$$E = \frac{(TB^*V_{\underline{\acute{util}}})}{\dot{m}} *100 \tag{II-3}$$

2.6 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA

Ao final dos ensaios a biomassa produzida foi recuperada por centrifugação (Hitachi Himac CR-GIII, Tóquio - Japão) a 15200 g, 20°C por 10 min, ressuspendida em água destilada (para remoção dos sais do meio de cultivo) e centrifugada novamente nas mesmas condições. Ao final da centrifugação, a biomassa recuperada foi congelada a -80°C, liofilizada por 48 h e armazenada a -20°C até sua caracterização.

2.7 DETERMINAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS E UMIDADE

A concentração de proteínas foi determinada utilizando método descrito por Lowry et al. (1951), com pré-tratamento térmico e alcalino nas biomassas produzidas para solubilizar proteínas insolúveis. A concentração de carboidratos na biomassa microalgal foi determinada por método fenol-sulfúrico de Dubois (DUBOIS et al., 1956) a partir de curva padrão de glicose. A concentração de lipídios foi determinada por método colorimétrico (MARSH; WEINSTEIN, 1966). A umidade da biomassa foi determinada por metodologia oficial da AOAC (AOAC, 2000). Portanto, todos os resultados de macromoléculas são apresentados em base seca. A determinação de cinzas foi obtida por diferença. Todas estas determinações estão detalhadas no Artigo 1.

2.8 PRODUTIVIDADE DE MACROMOLÉCULA

A produtividade de macromolécula ($P_{macromolécula}$, mg L⁻¹ d⁻¹) (SUN et al., 2015) foi determinada a partir do produto entre a produtividade volumétrica no final dos ensaios (P_{f} , mg L⁻¹ d⁻¹) e da fração mássica da macromolécula de interesse ($f_{macromolécula}$, mg_{macromolécula} mg_{biomassa}⁻¹).

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As respostas obtidas, apresentadas em Tabelas ou Figuras, foram comparadas por análise de variância (ANOVA), seguida por teste de Tukey, com nível de confiança de 95%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EFEITO DA MONOETANOLAMINA EM CULTIVO ABIÓTICO

A adição de componente extrínseco ao meio de cultivo é uma estratégia utilizada para promover melhorias, seja na taxa de crescimento ou no enriquecimento de metabólito produzidos. Contudo, é importante estudar a interação do meio de cultura com o fator externo ao cultivo. Sendo assim, os cultivos abióticos são alternativa interessante utilizada para detectar o efeito das adições de absorventes químicos causam no meio de cultivo sem as microalgas (KIM et al., 2013).

O pH do meio de cultivo BG-11 estéril é 7,40 (RIPPKA et al., 1979), valor muito similar ao resultado médio do parâmetro no início do ensaio CN-A (7,50), mas inferior aos ensaios com adição de 50, 100 e 150 mg L⁻¹ de monoetanolamina (MEA) (7,09, 7,67 e 7,82), respectivamente (Figura 1). O mencionado aumento inicial de pH, com a adição do absorvente químico de CO₂, corrobora o comportamento encontrado por Sun et al. (2015) em ensaios

abióticos com meio BG-11 e MEA. Este fato pode ser explicado devido as reações instantâneas de formação dos ânions hidroxila (OH⁻) e bicarbonato (HCO₃⁻) que ocorre da reação entre MEA e H₂O e CO₂ e OH⁻ (VAIDYA; KENIG, 2007). A partir do segundo dia, os perfís de pH (Figura 1a) atingiram valores relativamente constantes, os quais diferiram entre si de acordo com a concentração adicionada de MEA. Neste contexto, os resultados médios encontrados de pH foram 7,50, 9,06, 9,45 e 9,68, para os ensaios CN-A, com adição de 50, 100 e 150 mg L⁻¹ de MEA, respectivamente.

A concentração de CID (Figura 1b) apresentou comportamento semelhante aos perfis de pH obtidos, pois à medida que foi aumentada a concentração do absorvente químico, mais elevado foi o resultado de CID. Da mesma forma, Choi, Kim e Lee (2012) e Sun et al. (2015), também em culturas isentas de células, obtiveram perfis crescentes de CID ao passo que foi aumentado os valores de MEA entre 50 e 300 mg L⁻¹ e 50 e 200 mg L⁻¹, respectivamente. Contudo, os autores citados acima, também verificaram aumento mais expressivo de CID em suas primeiras determinações, seguido por relativa estabilidade dos perfis do parâmetro. Este fenômeno pode ser explicado por meio das rápidas ligações do absorvente e do CO₂, mencionadas acima, que se somam a injeção de CO₂ e pH constantes, os quais mostram a necessidade de aumentar a absorção de carbono do meio de cultivo, a qual poderia ser alcançada com adições mais frequentes de MEA, por exemplo.





A distribuição das parcelas de CID, obtida nos ensaios abióticos com MEA, mostram que, além de não apresentar concentração relevante de carbono como H₂CO₃ (valores obtidos menores que 0,001 mg L⁻¹), a concentração predominante é de carbono como bicarbonato HCO_3^- (C- HCO_3^-) também em relação ao carbono como carbonato (C- CO_3^{-2}) (Figura 2). Este fato é confirmado porque, a reação entre MEA e CO_2 em H₂O forma rapidamente o íon bicarbonato, na relação 1:2, respectivamente (HÜSER; SCHMITZ; KENIG, 2017).



A composição quantitativa percentual do CID mostra que o ensaio controle (Figura 2a), além de possuir a maior porcentagem de carbono como CO_3^{-2} (C- CO_3^{-2}) (em torno de 14,0% m m⁻¹), apresenta também os maiores teores de carbono como CO_2 dissolvido (C-

 $CO_{2(aq)}$) (8,0-9,0 % m m⁻¹), durante os 15 d de ensaio. A presença de maior percentual de C-CO₃⁻² era esperada, uma vez que o meio BG-11 possui em sua composição 20 mg L⁻¹ de Na₂CO₃ (16 mg L⁻¹ de CO₃⁻²). Nos ensaios com MEA, a presença inicial do cátion mencionado ocorre, principalmente, por causa do pH mais elevado no início dos ensaios, o que, segundo Andrade et al. (2016), é explicável, pois em pH acima de 9,5, apesar da predominância do carbono como HCO₃⁻ (C-HCO₃⁻), a espécie química de C-CO₃⁻² totaliza cerca de 20% do total.

Nos ensaios com adição de 50 (Figura 2b), 100 (Figura 2c) e 150 mg L⁻¹ de MEA (Figura 2d), à medida que foi aumentada a concentração de MEA, menores foram os percentuais de C-CO_{2(aq)} (3,6, 1,9 e 1,1% m m⁻¹) e quase inexistiu o C-CO₃⁻² (0,3, 0,5 e 0,9% m m⁻¹). Esta tendência é benéfica as microalgas, uma vez que, segundo Grobbelaar (2013), o carbono na forma de HCO₃⁻ e CO₂ são as espécies preferências de carbono absorvidos por meio do metabolismo das microalgas.

A adição de 50 mg L⁻¹ de MEA favoreceu a transferência de carbono para o meio líquido, da mesma forma que beneficiou o crescimento do cultivo descontínuo de *C. fusca* LEB 111 (Artigo 1) e promoveu boa distribuição de carbono no ensaio abiótico (Figura 2b). Diante disso, a concentração de absorvente químico, mencionada acima, foi escolhida para batelada alimentada com CO_2 com objetivo de maximizar a conversão de carbono para o meio e a produção de biomassa microalgal.

3.2 EFEITO DA BATELADA ALIMENTADA COM MEA E CO₂ NO CULTIVO DE *Chlorella fusca*

Os perfís de concentração de biomassa (Figura 3a) mostram que o ensaio em batelada alimentada com CO₂ e MEA (BA) apresentou apenas 1 d de adaptação, ao contrário dos ensaios controles com CO₂ (CCO₂) e controle negativo (CN), que apresentaram 2 e 3 d, respectivamente. Por conseguinte, os ensaios em BA foram considerados em fase exponencial até o 8° dia, enquanto que os ensaios CCO₂ e CN apresentaram fase logarítmica mais tardia, com duração até o 6° e 9° dia de ensaio, respectivamente. Isso demonstra que a MEA, apesar de apresentar efeito tóxico relatado (LUIS, 2016), não reduziu o crescimento da microalga, tendo em vista que mesmo o ensaio CN (meio BG-11 padrão) apresentou o período de latência maior. A partir do 12°-13° d, todos os ensaios apresentaram tendência a fase estacionária de cultivo, sendo o comportamento mais acentuado o apresentado pelo ensaio CCO₂.

Figura 3 - Perfis de concentração de biomassa de *Chlorella fusca* LEB 111 (a), pH e CID (b) em função do tempo para os ensaios batelada alimentada (BA), controle com CO₂ (CCO₂) e controle negativo (CN)



O cultivo CN apresentou perfil de pH (Figura 3b) superior durante quase todo período de ensaio em comparação aos demais tratamentos. No ensaio em BA, o pH se manteve relativamente mais estável em comparação aos ensaios CCO_2 e CN, sendo os valores de pH mínimo e máximo de 8,99 e 9,79, 8,94 e 9,96 e 9,24 e 10,30, respectivamente. Além disso, no ensaio conduzido em BA, é possível perceber que no 3°, 6° e 9° d, a adição de MEA elevou o pH do cultivo. A partir do 12° d, a redução da concentração de biomassa, causada, possivelmente, por efeito de blindagem (CHEN et al., 2013), presença de metabólitos e componentes do meio de cultivo, podem ter exercido efeito tamponante, o qual impede a visualização do efeito do MEA adicionado. Outro aspecto, já mencionado no ensaio abiótico com MEA, corrobora o fato de que devido a ligação rápida do absorvente químico com CO_2 , maior quantidade do composto deveria estar presente no meio para aumentar a transferência de dióxido de carbono para o cultivo.

Ao comparar os ensaios abióticos (Figura 1a) e os bióticos (Figura 3b), é possível perceber que os valores de pH iniciais são similares, mas à medida que a produtividade de biomassa aumenta, o pH também é elevado. Este fato pode ser explicado, tendo em conta que, segundo Masojídek, Torzillo e Koblížek (2013), a medida que o processo fotossintético aumenta, maior a concentração de hidroxilas é liberada no meio extracelular.

O perfil de concentração de CID (Figura 3b) obtido no ensaio *C. fusca* LEB 111 em BA, foi similar aos ensaios controles. Todavia, o ensaio em BA apresentou maiores (p < 0,05) valores de concentração de CID em quase todos os dias, com exceção do 9° e 12° dia, quando os resultados na proposta condição foram iguais (p > 0,05) ao ensaio CN. Os valores de CID do ensaio CN e pH, relativamente elevados, foram esperados, visto que esta condição foi conduzida com carbonato de sódio (BG-11 completo), o qual é ionizado durante o cultivo formando CO_3^{-2} e pode formar íons HCO_3^{-} . Este comportamento apresentado vai ao encontro de outros estudos (CHOI; KIM; LEE, 2012; KIM et al., 2013), os quais comprovaram que o meio de cultivo BG-11 sem carbono e adicionado de MEA converte maior concentração de CO_2 em CID em relação ao meio BG-11 padrão. Além disso, a concentração de CID_{AC} obtidas na condução em BA foi superior (p < 0,05) 8,4 e 22,6 % m m⁻¹ em relação ao CN e CCO₂, respectivamente.

A concentração máxima de biomassa ($X_{máx}$) e a produtividade de biomassa ($P_{máx}$) (Tabela 2) obtidas em BA foram estatisticamente iguais (p > 0,05) aos ensaios controles (Tabela 1). Contudo, estes resultados (2,01 g L⁻¹ e 152,4 mg L⁻¹ d⁻¹) foram superiores ao $X_{máx}$ (1,00, 1,16, 1,24, 1,29, 1,32, 1,52 g L⁻¹) e $P_{máx}$ (100, 100, 110 e 130 e 140 mg L⁻¹ d⁻¹) verificadas por Duarte, Fanka e Costa (2016), cultivando a mesma cepa de microalga, em fotobiorreator tubular vertical, condições de cultivo muito similares e gás de combustão simulado (10% de CO₂, variada concentração de cinzas, NO e SO₂).

Tabela 2 – Resultados médios da concentração de biomassa máxima ($X_{máx}$), produtividade máxima ($P_{máx}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$), tempo de geração (t_g), concentração de carbono inorgânico dissolvido acumulado (CID_{AC}), taxa de biofixação de CO₂ máxima (TB_{máx}) e eficiência máxima de uso de CO₂ ($E_{máx}$), obtidos nos ensaios de *Chlorella fusca* LEB 111.

Parâmetro	Batelada alimentada	Controle com CO ₂	Controle negativo
X _{máx} (g L ⁻¹)	$2,01 \pm 0,07^{a}$	$1,95 \pm 0,02^{a}$	$2,04 \pm 0,01^{a}$
$P_{máx} (mg L^{-1} d^{-1})$	$152,4 \pm 2,9^{a}$	$150,4 \pm 1,3^{a}$	$150,5 \pm 2,6^{a}$
$\mu_{máx} (d^{-1})$	$0,23 \pm < 0,01^{a}$	$0,\!20\pm0,\!02^{\mathrm{b}}$	$0,14\pm0,02^{\rm c}$
$t_{g}(d)$	$3,0 \pm 0,1^{\circ}$	$3,5 \pm 0,1^{b}$	$4,9\pm0,2^{a}$
$\Delta t (d)^*$	1-8	2-6	3-9
R ^{2**}	$0,991 \pm 0,002$	$0,992 \pm 0,001$	$0,992 \pm 0,001$
CID _{AC} (mg L ⁻¹)	$81,4 \pm 0,8^{a}$	$66,5 \pm 1,6^{c}$	$75,2 \pm 1,0^{b}$
TB _{máx} (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	$279,4 \pm 5,2^{a}$	$275,8 \pm 2,0^{a}$	-
E _{máx} (% m m ⁻¹)	$43,8 \pm 0,8^{a}$	$43,3\pm0,4^{a}$	-

Letras minúsculas sobrescritas iguais, na mesma linha, indicam que as médias não diferem estatisticamente ao nível de 95% de confiança (p > 0.05); * Δt : início-fim da fase exponencial de crescimento; **Coeficiente de determinação da regressão linear aplicada à fase logarítmica de crescimento no perfil Ln X versus t.

O aumento da biofixação de CO₂ está relacionado ao aumento da concentração de biomassa de microalgas. O período de maior de produção de biomassa é a fase exponencial, na qual, segundo Ling et al. (2015), são acumulados produtos de alto valor como, por exemplo, os ácidos graxos tipo ϖ -3 e pigmentos como a astaxantina. Assim, é de suma importância determinar, não só a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) e tempo de geração (t_g), mas também o início e fim (Δt) desta fase de crescimento, a qual auxilia encontrar a máxima taxa de biofixação de CO₂ (TB_{máx}) e orientar o tempo de recuperação da biomassa e bioprodutos. A condição proposta de BA, apresentou maior intervalo de fase exponencial (7 d) e melhores resultados, com diferença estatística (p < 0,05), de $\mu_{máx}$ (0,23 d⁻¹) e t_g (3,0 d).

Embora foram obtidos melhores resultados de $\mu_{máx}$ e t_g no cultivo em BA, como não houve diferença significativa na P_{máx}, a máxima taxa de biofíxação de CO₂ (TB_{máx}) e Eficiência de uso de CO₂ (E_{máx}) também não diferiram significativamente (p > 0,05) (Tabela 2). No entanto, P_{máx} e a TB_{máx}, obtidas por *C. fusca* LEB 111 em BA, foi 90% e 4% superior, respectivamente, ao encontrado por Duarte et al. (2017) (80 mg L⁻¹ d⁻¹ e 146,7 mg L⁻¹ d⁻¹), em cultivos com a mesma cepa, fotobiorreatores tubulares de 2,0 L e injeção de 10% de CO₂ comercial. A disponibilidade de luz e o fotobiorreator adequado permitem que, segundo a estequiometria da fotossíntese, 1,0 g de biomassa produzido utilize 1,8 g de CO₂ e produza 1,3 g de O₂ (ACIÉN; SEVILLA; GRIMA, 2013). A E_{máx} obtida em BA (43,8 % m m⁻¹ ou 0,438 g_{biomassa} g_{CO2}⁻¹, que é igual a 2,3 g_{CO2} g_{biomassa}⁻¹) indica que o metabolismo da microalga estava 28 % m m⁻¹ mais acentuado que o informado pelos autores supracitados.

Da mesma forma como ocorreu com os parâmetros cinéticos de *C. fusca* LEB 111, a condução em BA foi benéfica à produção de duas importantes macromoléculas presentes em microalgas (proteínas e lipídios) em comparação aos cultivos controles (Tabela 3). A BA com MEA parece não ter influenciado o crescimento de *C. fusca* LEB 111, já que nesta condição foi obtido aumento significativo (p < 0,05) na concentração e produtividade de proteínas (Tabela 3). As concentrações de proteínas, verificadas em todos os tratamentos deste trabalho (39,1, 41,0 e 44,0 % m m⁻¹), estão de acordo com o apontado (30-60 % m m⁻¹) por Andersen (2013) para algas verdes do gênero *Chlorella*. Entretanto, para a cepa *C. fusca* LEB 111, os resultados para concentração de proteínas oscilam entre 50 % (DUARTE; FANKA; COSTA, 2016) e 60 % m m⁻¹ (DEAMICI et al., 2016).

Os resultados de carboidratos e lipídios, obtidos em todos os tratamentos, mostram que a microalga parece ter desviado sua rota metabólica para formação de maior concentração destas macromoléculas. Os carboidratos são acumulados inicialmente como reserva energética, seguidos pelos lipídios (SIAUT et al., 2011). A concentração e a produtividade de carboidratos da microalga não foram acrescidas no ensaio em BA, sendo o maior resultado encontrado no experimento CN (29,4% m m⁻¹ e 44,2 mg L⁻¹ d⁻¹). Por outro lado, os resultados obtidos no cultivo em BA com CO₂ e MEA, vão ao encontro da teoria supracitada, uma vez que foi observada relação entre o aumento da produtividade de lipídios com a redução da produtividade de carboidratos.

Tabela 3 – Resultados médios de concentração percentual de macromoléculas e produtividade de proteínas ($P_{\text{proteínas}}$), carboidratos ($P_{\text{Carboidratos}}$) e lipídios ($P_{\text{Lipídios}}$) obtidos de *Chlorella fusca* LEB 111 cultivada em batelada alimentada, controle com CO₂ e controle negativo.

Parâmetro	Batelada alimentada	Controle com CO ₂	Controle negativo
Proteínas (% m m ⁻¹)	$44,0 \pm 1,4^{a}$	$39,1 \pm 0,7^{c}$	$41,0 \pm 1,6^{b}$
Carboidratos (% m m ⁻¹)	$20,6 \pm 0,9^{c}$	$26,4 \pm 0,5^{b}$	$29,4 \pm 1,1^{a}$
Lipídios (% m m ⁻¹)	$30,8 \pm 0,3^{a}$	$26,2 \pm 0,4^{b}$	$20,7\pm0,3^{\rm c}$
Pproteínas (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	$67,1 \pm 1,5^{a}$	$58,8\pm1,5^{\mathrm{b}}$	$61,7 \pm 0,9^{b}$
P _{Carboidratos} (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	$31,3 \pm 1,1^{c}$	$39,7\pm0,4^{\rm b}$	$44,2\pm4,9^{a}$
P _{Lipídios} (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	$46,9 \pm 0,8^{a}$	$39,3 \pm 0,4^{b}$	$31,1 \pm 4,4^{c}$

Letras minúsculas sobrescritas iguais, na mesma linha, indicam que as médias não diferem estatisticamente ao nível de 95% de confiança (p > 0.05).

A conversão de carbono e a produção de biomassa de microalgas é diretamente dependente condições de cultivos, tais como concentração de CO₂, compostos tóxicos, temperatura, luminosidade e pH (ZHAO; SU, 2014; MORAES et al., 2016). O aumento da concentração lipídica, por exemplo, pode ser obtido às custas de condições estressantes, como o decréscimo (ou ausência) de nutrientes específicos ou causadas por estresse ambiental (SIAUT et al., 2011). A concentração (30,8 % m m⁻¹) e a produtividade de lipídios (46,9 mg L⁻¹ d⁻¹), nos ensaios em BA, foram superiores significativamente (p < 0,05) aos ensaios controles (Tabela 3). Este fato mostra que, mesmo que o teor e produtividade de proteínas não foi reduzido, a MEA pode ter influenciado o metabolismo da microalga a produzir mais compostos de reserva. Porém, os resultados de Nascimento et al. (2015) mostraram que *Chlorella vulgaris* não foi estressada com o aumento de injeção de 2,5, 5,0, 10 e 20% de CO₂, ao passo que a concentração de lipídios foi praticamente inalterada (21,2, 19,1, 19,5 e 21,4 % m m⁻¹).

Embora a maioria de estudos com cultivos de microalgas demandem atenção à produção de biomassa (SYDNEY et al., 2010), a produtividade de macromoléculas, como a de carboidratos e lipídios, é uma variável importante a ser considerada quando os microorganismos são cultivados para a produção específica de biocombustíveis, por exemplo. O cultivo com BA e MEA promoveu aumento significativo conjunto da produtividade de proteínas e lipídios. O fato poderia ser explicado devido ao aumento da concentração de glicoproteínas, as quais, segundo Andersen (2013) formam as paredes celulares de algas verdes, majoritariamente com celulose e hemicelulose.

4 CONCLUSÃO

Diante do apresentado, foi constatado que o meio de cultivo BG-11 tem aumentada a sua capacidade de absorção de CO₂ com o aumento das concentrações de MEA. O carbono na forma de íon HCO₃⁻ foi a espécie química predominante em todos os tratamentos. Quando a MEA foi adicionada em batelada alimentada com CO₂, os resultados de acúmulo de CID no meio (81,4 mg L⁻¹), crescimento ($X_{máx} = 2,01$ g L⁻¹, $P_{máx} = 152,4$ mg L⁻¹ d⁻¹ e t_g = 3,0 d) e a eficiência de uso de CO₂ (43,8% m m⁻¹) por *Chlorella fusca* LEB 111 foram melhores. Além disso, no cultivo em BA, foi obtida a maior produtividade de proteínas (67,1 mg L⁻¹ d⁻¹) e lipídios (46,9 mg L⁻¹ d⁻¹) pela microalga. Portanto, foi possível comprovar que a adição periódica de MEA ressaltou a potencialidade de *Chlorella fusca* LEB 111 como bioprocesso de produção de biomassa e mitigação de CO₂, da mesma forma que destacou o potencial desta alga verde para produção de lipídios e proteínas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIÉN, F. G. F.; SEVILLA, J. M. F.; GRIMA, E. M. Photobioreactors for the production of microalgae. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 12, n. 2, p. 131–151, 2013.

ALSHEHRY, A. S.; BELLOUMI, M. Energy consumption, carbon dioxide emissions and economic growth: The case of Saudi Arabia. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 237–247, 2015.

ANDERSEN, R. A. The Microalgal Cell. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). Handbook of Microalgal Culture. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 1–20.

ANDRADE, G. A.; PAGANO, D. J.; GUZMAN, J. L.; BERENGUEL, M.; FERNANDEZ, I.; ACIEN, F. G. Distributed Sliding Mode Control of pH in Tubular Photobioreactors. **IEEE Transactions on Control Systems Technology**, v. 24, n. 4, p. 1160–1173, 2016.

APHA. American Public Health Association (APHA). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. Washington DC., 1998.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals. Michigan: McGraw-Hill, 1986.

BAUER, L. M.; COSTA, J. A. V.; ROSA, A. P. C.; SANTOS, L. O. Growth stimulation and

synthesis of lipids, pigments and antioxidants with magnetic fields in *Chlorella kessleri* cultivations. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1425–1432, 2017.

CHANG, Y.-M.; TSAI, W.-T.; LI, M.-H. Characterization of activated carbon prepared from *Chlorella*-based algal residue. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 344–348, 2015.

CHEAH, W. Y.; LING, T. C.; JUAN, J. C.; SHOW, P. L. Biorefineries of carbon dioxide: From carbon capture and storage (CCS) to bioenergies production. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 346–356, 2016.

CHEAH, W. Y; SHOW, P. L.; CHANG, J.-S.; LING, T. C.; JUAN, J. C. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 190–201, 2015.

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

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; FILHO, P. D.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 603–607, 2002.

DEAMICI, K. M.; CARDIAS, B. B.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, L. O. Static magnetic fields in culture of *Chlorella fusca*: Bioeffects on growth and biomass composition. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 7, p. 912–916, 2016.

DICKINSON, S.; MIENTUS, M.; FREY, D.; AMINI-HAJIBASHI, A.; OZTURK, S.; SHAIKH, F.; SENGUPTA, D.; EL-HALWAGI, M. M. A review of biodiesel production from microalgae. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 19, n. 3, p. 637–668, 2017.

DUARTE, J. H.; FANKA, L. S.; COSTA, J. A. V. Utilization of simulated flue gas containing CO₂, SO₂, NO and ash for *Chlorella fusca* cultivation. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 159–165, 2016.

DUARTE, J. H.; MORAIS, E. G.; RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Biological CO₂ mitigation from coal power plant by *Chlorella fusca* and *Spirulina* sp. **Bioresource Technology**, v. 234, p. 472–475, 2017.

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

FREDRIKSEN, S. B.; JENS, K.-J. Oxidative Degradation of Aqueous Amine Solutions of MEA, AMP, MDEA, Pz: A Review. **Energy Procedia**, v. 37, n. 1876, p. 1770–1777, 2013.

GROBBELAAR, J. U. Inorganic Algal Nutrition. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). Handbook of Microalgal Culture. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 123–133.

HÜSER, N.; SCHMITZ, O.; KENIG, E. Y. A comparative study of different amine-based solvents for CO₂-capture using the rate-based approach. **Chemical Engineering Science**, v. 157, p. 221–231, 2017.

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

LEUNG, D. Y. C.; CARAMANNA, G.; MAROTO-VALER, M. M. An overview of current status of carbon dioxide capture and storage technologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 39, p. 426–443, 2014.

LING, X.; GUO, J.; LIU, X.; ZHANG, X.; WANG, N.; LU, Y.; NG, I.-S. Impact of carbon and nitrogen feeding strategy on high production of biomass and docosahexaenoic acid (DHA) by *Schizochytrium* sp. LU310. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 139–147, 2015.

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, n. 1, p. 265–275, 1951.

LUIS, P. Use of monoethanolamine (MEA) for CO₂ capture in a global scenario: Consequences and alternatives. **Desalination**, v. 380, p. 93–99, 2016.

MARKOU, G. Fed-batch cultivation of *Arthrospira* and *Chlorella* in ammonia-rich wastewater: Optimization of nutrient removal and biomass production. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 35–41, 2015.

MARSH, J. B.; WEINSTEIN, D. B. Simple charring method for determination of lipids. **Journal of lipid research**, v. 7, n. 4, p. 574–576, 1966.

MASOJÍDEK, J.; TORZILLO, G.; KOBLÍŽEK, M. Photosynthesis in Microalgae. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 21–36.

MORAES, L.; ROSA, G. M.; CARDIAS, B. B.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A. V. Microalgal biotechnology for greenhouse gas control: Carbon dioxide fixation by *Spirulina* sp. at different diffusers. **Ecological Engineering**, v. 91, p. 426–431, 2016.

NASCIMENTO, I. A.; CABANELAS, I. T. D.; SANTOS, J. N. dos; NASCIMENTO, M. A.; SOUSA, L.; SANSONE, G. Biodiesel yields and fuel quality as criteria for algal-feedstock selection: Effects of CO₂-supplementation and nutrient levels in cultures. **Algal Research**, v. 8, p. 53–60, 2015.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1–61, 1979.

ROCHELLE, G. T. Thermal degradation of amines for CO₂ capture. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 1, n. 2, p. 183–190, 2012.

ROSA, G. M.; MORAES, L.; CARDIAS, B. B.; SOUZA, M. R. A. Z. de; COSTA, J. A. V. Chemical absorption and CO₂ biofixation via the cultivation of *Spirulina* in semicontinuous mode with nutrient recycle. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 321–327, 2015.

ROSA, G. M.; MORAES, L.; SOUZA, M. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* cultivation with a CO₂ absorbent: Influence on growth parameters and macromolecule production.

Bioresource Technology, v. 200, p. 528–534, 2016.

SIAUT, M.; CUINÉ, S.; CAGNON, C.; FESSLER, B.; NGUYEN, M.; CARRIER, P.; BEYLY, A.; BEISSON, F.; TRIANTAPHYLIDÈS, C.; LI-BEISSON, Y.; PELTIER, G. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. **BMC Biotechnology**, v. 11, n. 7, p. 1–15, 2011.

SUN, Z.; ZHANG, D.; YAN, C.; CONG, W.; LU, Y. Promotion of microalgal biomass production and efficient use of CO₂ from flue gas by monoethanolamine. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 90, n. 4, p. 730–738, 2015.

SYDNEY, E. B.; STURM, W.; CARVALHO, J. C. de; THOMAZ-SOCCOL, V.; LARROCHE, C.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 5892–5896, 2010.

TANS, P.; KEELING, R. Recent Monthly Average Mauna Loa CO₂. Disponível em: <www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>. Acesso em: 20 nov. 2017.

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.

VAIDYA, P. D.; KENIG, E. Y. CO₂-Alkanolamine Reaction Kinetics: A Review of Recent Studies. **Chemical Engineering & Technology**, v. 30, n. 11, p. 1467–1474, 2007.

VAZ, B. S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. de. CO₂ Biofixation by the Cyanobacterium *Spirulina* sp. LEB 18 and the Green Alga *Chlorella fusca* LEB 111 Grown Using Gas Effluents and Solid Residues of Thermoelectric Origin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 2, p. 418–429, 2016.

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, n. 2, 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.

ARTIGO 3

PRODUÇÃO DE BIOMASSA E FIXAÇÃO DE CO₂ EM CULTIVO SEMICONTÍNUO DE *Chlorella* COM ADIÇÃO DE MONOETANOLAMINA E RECICLO DE MEIO

PRODUÇÃO DE BIOMASSA E FIXAÇÃO DE CO₂ EM CULTIVO SEMICONTÍNUO DE *Chlorella* COM ADIÇÃO DE MONOETANOLAMINA E RECICLO DE MEIO

RESUMO

A ação antropogênica, com excessivas emissões de dióxido de carbono (CO₂), é determinada como uma das principais intensificadoras do efeito estufa. Neste sentido, a combinação de tecnologias, como a absorção química e o cultivo de microalgas, pode concretizar opção promissora para aumentar a fixação de CO₂ e gerar coprodutos. Com isso, o objetivo do trabalho foi cultivar Chlorella fusca LEB 111, em modo semicontínuo e adição de monoetanolamina (MEA), avaliando os efeitos na fixação de CO₂, produção de biomassa e macromoléculas. Os ensaios foram conduzidos segundo Delineamento Composto Central 2² com triplicata no ponto central, apresentando como variáveis independentes a taxa de reutilização de meio (T_R, 30 e 70 % v v⁻¹) e a concentração de corte (C_{corte}, 0,6 e 1,0 g L⁻¹). A cada ciclo de crescimento (N), foi adicionado 50 mg L⁻¹ de MEA. Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores tubulares verticais de 1,8 L, à 30°C, 44,8 μ mol_{fótons} m⁻² s⁻¹, fotoperíodo 12 h claro/12 h escuro, por 15 d. Assim, com T_R de 70 % v v⁻¹, C_{corte} de 1,0 g L⁻¹ e 3 adições de MEA, foram alcançados os maiores resultados de produtividade (144,2 mg L⁻¹ d⁻¹), biomassa gerada (1,8 g), eficiência de uso de CO₂ (41,5 % m m⁻¹) e concentração de carboidratos (35,7 % m m⁻¹). Portanto, foi demonstrado que o cultivo semicontínuo, com Chlorella fusca LEB 111 e MEA, pode ser promissor para redução de CO2 atmosférico, produção de biomassa e concentração de lipídios $(\sim 41,0 \% \text{ m m}^{-1})$ pela microalga.

Palavras-chave: Absorvente químico. Biomassa. Dióxido de carbono. Lipídios. MEA.

1 INTRODUÇÃO

As emissões antropogênicas crescentes e ininterruptas de gases de efeito de estufa (GEE), como o dióxido de carbono (CO₂), causam consequências a curto e a longo prazo (ZHENG et al., 2017). Entre essas, o aquecimento global se destaca com o principal problema, sobretudo na produção de alimentos. Ma e Herath (2016) demonstraram, em seu estudo de campo de um ano no Canadá, que ocorreu redução de 40 % m m⁻¹ na produção de canola devido ao calor excessivo. As emissões de CO₂ de usinas de geração de eletricidade são responsáveis por elevada proporção de emissões de GEE. No Reino Unido, por exemplo, 60 % do total de energia elétrica gerada em 2014 foram às custas de carvão mineral e gás natural (BROWN et al., 2016), os quais liberam para atmosfera CO₂ fóssil quando entram em combustão.

As tecnologias para a captura de CO₂ estudadas e testadas são diversas, mas as principais são aquelas baseadas em processos de tecnologia de membrana (REIS et al., 2018), adsorção física (JANG et al., 2018), absorção química (ZAIDIZA et al., 2017) e mitigação biológica (BASU et al., 2014). Contudo, as três primeiras tecnologias citadas, apesar de se tratarem de processos com elevado potencial de mitigação de CO₂ (superior até 90 % m m⁻¹), possuem design dispendioso ou geram passivos químicos tóxicos para os equipamentos e meio ambiente (LEUNG; CARAMANNA; MAROTO-VALER, 2014). O cultivo de microalgas, por outro lado, trata-se de um bioprocesso menos oneroso e que não disputa terras aráveis com a produção de alimentos (PERIN et al., 2017).

As microalgas, por meio da fotossíntese, utilizam a energia solar e convertem CO₂ e nutrientes em proteínas, carboidratos e lipídios (CAVINATO et al., 2017). Ademais, estes micro-organismos apresentam elevado potencial biotecnológico na produção de ração animal, alimentação humana e compostos farmacêuticos (PRIYADARSHANI; RATH, 2012). O cultivo de microalgas pode ser conduzido, principalmente, de forma descontínua (ou batelada), contínua e semicontínua. Esse último é o modo de cultivo mais empregado em grande escala (GÓMEZ-SERRANO et al., 2015), pois evita baixas taxas de produtividade de biomassa, devido a manutenção de elevados níveis de nutrientes e passagem de luz à cultura (HO; LU; CHANG, 2012). No entanto, a adição excessiva de meio de cultura pode causar aumento na pressão osmótica do meio, a qual pode afetar os pigmentos fotossintetizantes de microalgas (ROSA et al., 2015b).

A fixação de CO₂ por absorção química ou por cultivo de microalgas são processos, normalmente, conduzidos de forma descontínua, com alta eficiência de captura do gás e produção de biocompostos de interesse comercial, respectivamente. A utilização das potencialidades supracitadas pode ser encontrada nos trabalhos de Sun et al. (2015) e Rosa et al. (2015b) em modo semicontínuo, haja vista que tais processos foram realizados com *Scenedesmus* e *Spirulina*, respetivamente, e com parâmetros operacionais da condução fixos. Diante disso, cultivar *Chlorella* em modo semicontínuo, com reaproveitamento de nutrientes e absorvente químico pode ser alternativa promissora para reduzir os custos com nutrientes e maximizar a biofixação de carbono. Logo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a fixação de CO₂ pelo cultivo semicontínuo contendo *Chlorella* e monoetanolamina, assim como avaliar o crescimento e a concentração de macromoléculas produzidas pela microalga.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO

O micro-organismo utilizado foi a alga verde *Chlorella fusca* LEB 111, pertencente ao Filo Clorófita (LEE, 2008). Esta microalga é pertencente a Coleção de Culturas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). A cepa *C. fusca* LEB 111 foi escolhida porque apresentou melhor desempenho de crescimento e tolerância ao absorvente químico (Artigo 1). Além disso, como destacado por Duarte, Fanka e Costa (2016), a microalga selecionada é tolerante a condições adversas, pois o ambiente que a mesma foi isolada (Usina Termelétrica Presidente Médici, Candiota-RS, Brasil) apresenta pH acima de 9,0 e presença de particulados, os quais podem restringir a passagem de luz. O meio de cultivo utilizado nos ensaios foi o BG-11 (RIPPKA et al., 1979) isento de Na₂CO₃.

2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

2.2.1 Delineamento composto central (DCC)

O corrente trabalho foi conduzido segundo delineamento composto central (DCC) 2^2 com triplicata no ponto central (Tabela 1). As variáveis independentes do DCC foram a taxa de reutilização de meio (T_R, X₁) e concentração de corte (C_{corte}, X₂) e as variáveis dependentes foram a transferência de carbono para o meio de cultivo, crescimento e concentração das principais macromoléculas da microalga. A C_{corte} foi o valor de concentração de biomassa utilizada (0,6, 0,8 ou 1,0 g L⁻¹) como ponto de controle para, então, realizar a retirada o volume de meio a ser reutilizado (0,45, 0,75 ou 1,05 L), o qual correspondente a T_R (30, 50 ou 70 % v v⁻¹). O meio de cultivo reutilizado foi obtido após a separação da biomassa por centrifugação (15200 g, 20°C por 10 min) (ROSA et al., 2015).
Ensaio	X ₁	X2	X_1 (% v v ⁻¹)	X ₂ (g L ⁻¹)
1	-1	-1	30	0,6
2	+1	-1	70	0,6
3	-1	+1	30	1,0
4	+1	+1	70	1,0
5	0	0	50	0,8
6	0	0	50	0,8
7	0	0	50	0,8

Tabela 1 – Níveis codificados e reais do delineamento composto central (DCC) 2^2 , com tréplica no ponto central, utilizado para verificar a influência da monoetanolamina (MEA) a cada corte e das variáveis independentes taxa de reutilização de meio (X₁) e concentração de corte (X)

X₁: Taxa de reutilização de meio (T_R); X₂: Contração de corte (C_{corte})

2.2.2 Absorvente químico

Os cultivos de *C. fusca* LEB 111 foram adicionados do absorvente químico monoetanolamina (MEA, C₂H₇NO) P.S. Vetec, o qual apresentava pureza mínima de 99,0 % m m⁻¹. A cada corte realizado, a concentração de MEA de 50 mg L⁻¹, selecionada no Artigo 1, foi adicionada em relação ao volume reutilizado. Esta concentração empregada foi escolhida no Artigo 1, no qual foi pontuado nos estudos de Choi, Kim e Lee (2012) e Rosa et al. (2016).

2.2.3 Condições físico-químicas e de operação dos cultivos

Os cultivos, conduzidos segundo DCC 2^2 , foram mantidos a 30°C, fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h sem luz, iluminância promovida por lâmpadas fluorescentes frias (44,8 µmol_{fõtons} m⁻² s⁻¹) e agitação diária por injeção de ar comprimido (0,45 L min⁻¹). Os ensaios foram realizados em fotobiorreatores tubulares verticais (altura de 0,55 m, diâmetro de 0,06 m e volume útil 1,5 L útil) e tiveram duração de 15 d. A Figura A5 (em ANEXO) mostra os cultivos semicontínuos realizados segundo DCC 2^2 com réplica no ponto central.

2.2.4 Dióxido de carbono como fonte de carbono

A fonte de carbono utilizada nos cultivos foi o dióxido de carbono gasoso (CO₂) (pureza mínima de 99,5 %). Para o cálculo da demanda de carbono foi considerado a produtividade teórica de biomassa de 200 mg L⁻¹ d⁻¹, concentração de carbono na biomassa de 50 % m m⁻¹ e perda de CO₂ não dissolvido no meio líquido de 70 % v v⁻¹, totalizando vazão específica de 0,36 mL_{CO2} mL_{meio}⁻¹ d⁻¹ (10 % v v⁻¹ da vazão de agitação). O CO₂ foi mensurado em medidores de vazão de área variável com flutuador (Cole-Parmer, EUA) e adicionado no

menor tempo experimental possível (1 min h^{-1} , durante o período 12 h de luz), assim como realizado por Rosa et al. (2015). Com a intenção de aumentar o tempo de residência do CO₂ gasoso no meio líquido, a adição do mesmo foi realizada, precedida e seguida, pela interrupção de 1 min da aeração do sistema (ROSA et al., 2015).

2.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

Os ensaios foram monitorados diariamente quanto a concentração de biomassa e pH, enquanto que a cada 3 d foi monitorado também a alcalinidade dos cultivos.

A determinação da concentração de biomassa foi obtida em triplicata por espectrofotometria (em espectrofotômetro Shimadzu UV/VIS UVmini-1240, Japão) de acordo com Costa et al. (2002). Para isso, foram relacionadas as amostras lidas a 670 nm com curva padrão previamente realizada, a qual envolveu as absorbâncias de concentrações de biomassa (g L⁻¹) obtidas por peso seco do inóculo da microalga utilizada.

O pH dos ensaios foi medido nas amostras diariamente com pHmetro digital portátil (Mettler Toledo FiveGoTM, Suíça), ao passo que a alcalinidade das amostras foi determinada por titulação potenciométrica (APHA, 1998). Com estas duas determinações foi calculada a concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID), seguindo as equações de equilíbrio entre as espécies como demonstrado por Rosa et al. (2015).

2.4 RESPOSTAS AVALIADAS NO CULTIVO

Os cultivos semicontínuos foram estudados quanto a concentração de CID acumulado (CID_{AC}, mg L), biomassa gerada (Bg, g), produtividade volumétrica de biomassa (Px, mg L⁻¹ d⁻¹), taxa de biofixação de CO₂ (TB, mg L⁻¹ d⁻¹) e eficiência de uso de CO₂ (E, % m m⁻¹). Os máximos valores obtidos para P_X (P_{máx}), TB (TB_{máx}) e E (E_{máx}) foram os maiores valores de cada parâmetro, considerando todos os ciclos de crescimento de cada ensaio.

2.4.1 Concentração de carbono inorgânico dissolvido acumulado

Para avaliar a transferência de carbono inorgânico para o meio de cultivo, foi calculada a concentração de carbono inorgânico dissolvido acumulado (CID_{AC}, mg L⁻¹), subtraindo o valor final calculado pelo valor inicial de CID.

2.4.2 Biomassa gerada

A biomassa gerada ao final de cada ensaio (Bg, g) foi calculada a partir da concentração de biomassa final de cada ciclo de crescimento (X_{fi} , g L⁻¹), concentração inicial

de biomassa de cada ciclo de crescimento (X_{ii} , g L⁻¹) e o volume reutilizado de cada ciclo de crescimento (V_{Ci} , L) (ROSA et al., 2015b) (Equação III-1).

$$B_{g} = \sum [(X_{f1} - X_{i1})V_{C1} + (X_{f2} - X_{i2})V_{C2} + \dots + (X_{fn} - X_{in})V_{Cn}]$$
(III-1)

2.4.3 Produtividade volumétrica de biomassa

A produtividade volumétrica de biomassa (P_X , mg L⁻¹ d⁻¹) foi determinada de acordo com Molina Grima et al. (1999), considerando o produto da taxa de diluição (D, d⁻¹) pela concentração de biomassa (C_b , mg L⁻¹) de cada ensaio, como na Equação III-2. Para calcular D foi considerada a T_R (30, 50 ou 70 % v v⁻¹) de cada ensaio, número de ciclos de crescimento (N) e o tempo de cultivo (t_c , d), como mostra a Equação III-3.

$$P_X = C_b D \tag{III-2}$$

$$D=T_{R} 100^{-1} N t_{c}^{-1}$$
(III-3)

2.4.4 Avalição da biofixação de CO2 pela microalga

A biofixação de CO₂ por *Chlorella* fusca LEB 111 foi avaliada a partir da taxa de biofixação de CO₂ (TB, mg L⁻¹ d⁻¹) (TOLEDO-CERVANTES et al., 2013) e da eficiência de uso de CO₂ (E, % m m⁻¹) (ZHANG; KURANO; MIYACHI, 2002), como mostram as Equações III-4 e III-5, respectivamente.

$$TB = P_X x_{cbm} \frac{MM_{CO2}}{MM_C}$$
(III-2)

$$E = \frac{(\text{TB } V_{\text{útil}})}{\dot{m}} 100 \tag{III-3}$$

Para o cálculo de TB foram utilizados a P_X (mg L⁻¹ d⁻¹), x_{cbm} (fração mássica de carbono na biomassa, considerada 0,5, tal como Chang, Tsai e Li (2015)), massa molar de CO₂ (MM_{CO2}, g mol⁻¹) e massa molar de carbono (MM_C, g mol⁻¹). Para quantificar E foi utilizado TB (mg L⁻¹ d⁻¹), volume útil dos fotobiorreatores (V_{útil}, L) e a taxa mássica de CO₂ (m, mg d⁻¹).

2.5 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA PRODUZIDA

Ao final de cada ciclo de crescimento (N), a biomassa produzida foi separada do meio líquido por centrifugação (Hitachi Himac CR-GIII, Tóquio - Japão) a 15200 g, 20°C por 10 min, ressuspendida em água destilada (para melhorar a remoção dos sais do meio de cultivo) e centrifugada novamente nessas mesmas condições. A biomassa de cada N, recuperada ao final do processo de centrifugação, foi separada individualmente, congelada a -80°C, liofilizada por 48 h e armazenada a -20°C até serem realizadas as análises de caracterização.

2.6 DETERMINAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS E UMIDADE

A biomassa recuperada de cada ciclo de crescimento foi quantificada quanto à concentração de proteínas (LOWRY et al., 1951) e carboidratos (DUBOIS et al., 1956). Ao final dos ensaios, além da determinação da concentração das duas macromoléculas supracitadas, a biomassa também foi avaliada quanto ao teor de lipídios (MARSH; WEINSTEIN, 1966). As biomassas obtidas em todas as etapas foram quantificadas quanto a concentração de umidade por metodologia oficial da AOAC (2000), para calcular a concentração das macromoléculas em base seca.

2.6.1 Análise de proteínas e carboidratos

A análise de proteínas e carboidratos foi realizada a partir de extrato, contendo 10 mg de biomassa e 20 mL de água destilada, submetido a sonda ultrassônica (COLE PARMER CPX 130 – Illinois – E.U.A.) em 10 ciclos de funcionamento (59 s ligada e 59 s desligada).

A determinação da concentração de proteínas total, foi obtida, após pré-tratamento de solubilização térmica e alcalina das proteínas insolúveis, pelo método colorimétrico espectrofotométrico de Lowry et al. (1951) com curva padrão de albumina de soro bovino, como descrito no Artigo 1.

A quantificação da concentração carboidratos totais foi realizada por método espectrofotométrico fenol-sulfúrico de Dubois et al. (1956) com a utilização de curva padrão de glicose, como descrito no Artigo 1.

2.6.2 Lipídios

A concentração de lipídios foi determinada de acordo com Marsh e Weinstein (1966), a partir de curva padrão de tripalmitina (HOLLAND; GABBOTT, 1971), como mostrado no Artigo 1.

2.6.3 Umidade

A umidade presente nas biomassas recuperadas foi determinada por metodologia da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (AOAC, 2000), na qual triplicada de amostras de cada ensaio foram submetidas a secagem em estufa sem circulação de ar, a 105°C, até peso constante. Então, por gravimetria de diferença de massa foi calculada a porcentagem de umidade.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As respostas obtidas foram avaliadas por metodologia de planejamento experimental com o Software *Statistica* 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, EUA), considerando a estimativa de efeitos principais (L) e de interação das variáveis independentes ($T_R e C_{corte}$) sobre as variáveis dependentes (parâmetros de crescimento, fixação de CO₂ e concentração de macromoléculas). O erro padrão utilizado para avaliação foi baseado nas réplicas dos pontos centrais (erro puro) com nível de confiança 95,0 % de confiança.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CRESCIMENTO E BIOFIXAÇÃO DE CO2 POR Chlorella fusca LEB 111

O cultivo semicontínuo de microalgas é o principal modo de operação para a produção de biomassa em grande escala (GÓMEZ-SERRANO et al., 2015). Neste contexto, é importante determinar os melhores valores das principais variáveis do processo, tal como a taxa de reutilização de meio (T_R) e a concentração de corte (C_{corte}). Os perfis de concentração de biomassa (Figura 1) mostram que *C. fusca* LEB 111 não apresentou fase de adaptação em nenhum dos ensaios conduzidos segundo o Delineamento Composto Central (DCC) 2² com triplicata no ponto central.

No ensaio com taxa de reutilização de meio (T_R) de 30 % v v⁻¹ e concentração de corte (C_{corte}) de 0,6 g L⁻¹ (Figura 1a) foi alcançado o maior número de ciclos de crescimento (6) em comparação aos demais. Com exceção do último ciclo de crescimento, de cada ensaio, todos os outros ciclos de crescimento (N) foram delineados com funções exponenciais sempre com R > 0,98. Desta forma, foi possível constatar que a adição de MEA não foi limitante para o crescimento logarítmico da microalga em, pelo menos, 2 ciclos do crescimento para os ensaios 4, 5, 6 e 7, em 3 ciclos de crescimento para os ensaios 2 e 3 e em 5 ciclos de crescimento para o ensaio 1.

O resultado de pH dos ensaios de *C. fusca* LEB 111 foi relativamente estável, tal que o valor médio dos ensaios foi 9,4, 9,3, 9,3, 9,6, 9,0, 9,0 e 9,0, para os ensaios 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente. Ao longo do cultivo microalgais o pH aumenta, principalmente, devido ao consumo de nutrientes, como nitrogênio e carbono, e produção de álcalis. Além disso, o pH influencia o metabolismo das microalgas, pois esse potencial pode alterar não só a solubilidade de CO₂, mas também influencia a dissociação de minerais no meio (GROBBELAAR, 2013). Neste sentido, é possível afirmar que os maiores resultados obtidos pelo Ensaio 4 (T_R 70 % v v^{-1} e C_{corte} 1,0 g L⁻¹) podem estar atrelados ao maior valor médio de pH obtido em tal condição.

Figura 1 – Perfis de concentração de biomassa de *C. fusca* LEB 111 para os ensaios (E) variando a taxa de reutilização de meio (T_R) em % v v⁻¹ e concentração de corte (C_{corte}) em g L⁻¹: E1, 30 e 0,6 (a); E2, 70 e 0,6 (b); E3, 30 e 1,0 (c); E4, 70 e 1,0 (d); E5, E6 e E7 (pontos centrais), 50 e 0,8 (e)



O maior número de ciclos de crescimento (N), ensaios 1, 2 e 3, promoveu o maior resultado de acúmulo de carbono no meio (CID_{AC}), 68,1, 58,6 e 53,0 mg L⁻¹, respectivamente. A relação entre os fatores ocorre devido ao fato de que, com o maior número de N, maior foi o número de adições do absorvente químico e, consequentemente, maior foi o teor de carbono fixado. No entanto, o maior crescimento e biofixação de CO₂, foram obtidos com T_R de 70 % v v⁻¹ e C_{corte} de 1,0 g L⁻¹ (Tabela 2), o que indica que *C. fusca* LEB 111 não foi limitada quanto a fonte de carbono no meio.

cultivos semicontínuos com MEA segundo DCC 2 ² com triplicada no ponto central.								
Encoio	X ₁	X ₂	N	CID _{AC}	P _{máx}	Bg	TB _{máx}	E _{máx}
LIISAIO	(%)	(g L ⁻¹)	1	(mg L ⁻¹)	(mg L ⁻¹ d ⁻¹)	(g)	$(mg L^{-1} d^{-1})$	(% m m ⁻¹)
1	30	0,6	6	68,1	78,0	1,5	143,0	22,4
2	70	0,6	4	58,6	123,2	1,5	225,9	35,4
3	30	1,0	4	53,0	82,4	1,6	151,1	23,7
4	70	1,0	3	47,8	144,2	1,8	264,4	41,5
5	50	0,8	3	46,7	84,0	1,6	154,0	24,2
6	50	0,8	3	47,4	84,0	1,5	154,0	24,2
7	50	0,8	3	48,8	83,0	1,5	152,2	23,9

Tabela 2 – Resultados do número de ciclo de crescimento (N), concentração de CID acumulado (CID_{AC}), produtividade máxima de biomassa (P_{máx}), biomassa gerada (B_g), taxa de biofixação de CO₂ máxima (TB_{máx}) e eficiência de uso de CO₂ máxima (E_{máx}) obtidos nos gultivos semicontínuos com MEA segundo DCC 2² com triplicado no ponto control

 X_1 : Taxa de reutilização de meio (T_R); X_2 : Contração de corte (C_{corte})

O valor inicial de CID do meio BG-11 é 4,8 mg L⁻¹ (KIM et al., 2013), o qual é o mesmo resultado encontrado no ensaio controle abiótico do Artigo 2. Esse resultado é inferior a todos os resultados do parâmetro no início dos ensaios propostos segundo DCC 2^2 (23,1, 24,1, 25,1, 24,0, 27,6, 28,3 e 27,2 mg L⁻¹ de CID para os ensaios 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente). Isso ocorre, segundo Meldon e Morales-Cabrera (2011), pois o MEA instantaneamente forma o ânion bicarbonato quando reage com CO₂ em meio líquido, aumentando a concentração de CID no meio.

Sun et al. (2015), em cultivos com *Scenedesmus dimorphus*, em modo semicontínuo, C_{corte} de 1,5 g L⁻¹, taxa de renovação de meio de 66,6 % v v⁻¹, obtiveram N = 4 e ao aumentar a concentração de MEA adicionada para 50 e 100 mg L⁻¹, foram melhoradas as produtividades de biomassa em 14,7 e 16,7 %, respectivamente. Contudo, diferentemente do corrente trabalho, os citados autores não reutilizaram os nutrientes do cultivo a cada corte, os

quais segundo Rosa et al. (2015a) podem perdurar em níveis acima de 80 % do valor inicial por mais de 15 d, dependendo da demanda da microalga e condições de cultivo, principalmente. O maior valor de $P_{máx}$, obtido nas condições do Ensaio 4, foi superior ao encontrado por Deamici et al. (2016) na sua condição controle (140 mg L⁻¹ d⁻¹): cultivo de *C. fusca* LEB 111, fotobiorreatores tubulares de 2,0 L (muito similares ao do presente estudo), meio BG-11 e modo descontínuo por 15 d.

Embora a T_R de 70 % v v⁻¹ com C_{corte} de 1,0 g L⁻¹, associado ao menor número de adição de MEA (N = 3), proporcionou os melhores resultados, essa maior T_R, combinada a C_{corte} de 0,6 g L⁻¹ e N = 4 (Ensaio 2), promoveram elevados resultados de CID_{AC}, P_{máx}, TB_{máx} e E_{máx}. A exemplo disso, os valores de E_{máx}, obtidas no presente estudo, foram superiores ao obtida por Radmann et al. (2011) (13,4 % m m⁻¹) e Morais e Costa (2007) (em média 6,0 % m m⁻¹) em cultivos com *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus*, respectivamente, ambos estudos com concentração de CO₂ utilizada 18 vezes maior (6,48 mL_{CO2} mL_{meio}⁻¹ d⁻¹) e sistema adaptado para aumentar a biofixação de CO₂ (3 fotobiorreatores tubulares em série).

3.2 MACROMOLÉCULAS PRODUZIDAS POR Chlorella fusca LEB 111

A concentração de proteínas e carboidratos da biomassa de *C. fusca* LEB 111, obtida em cada ciclo de crescimento foi acompanhada durante todo o tempo de cultivo (Figura 2). Para melhor apresentação da concentração de proteínas e carboidratos, obtida nos ensaios 5, 6 e 7, são mostrados na Figura 2 perfis médios entre os três experimentos, denominados de PC.

O teor de proteínas, obtidos em todos os tratamentos, apresentaram perfis descendentes frente ao aumento do número de ciclos de crescimento. Em contrapartida, o perfil de concentração de carboidratos se manteve relativamente constante para quase todos os ensaios, com valores médios em % m m⁻¹ de 29,2 ± 4,1, 32,1 ± 4,9, 30,3 ± 2,0, 32,0 ± 3,3, 16,4 ± 3,3, para os ensaios 1, 2, 3, 4 e PC, respectivamente. Aumento da concentração de compostos de reserva, tal como carboidratos, conjuntamente com a redução do teor de proteínas, pode ser explicado quando as microalgas são submetidas a condições de estresse (COSTA et al., 2017), tal como causado pela adição de MEA. Como exceção, no ensaio 3 parece que a adição do absorvente químico, agregado a T_R de 30 % v v⁻¹ e C_{corte} 1,0 g L⁻¹, não foi tóxico a microalga, pois a concentração de ambas as macromoléculas se manteve estável durante os ciclos de crescimento.

Figura 2 – Perfis de concentração de proteínas (a) e carboidratos (b) de *C. fusca* LEB 111 para os ensaios (E) variando a taxa de reutilização de meio (T_R) em % v v⁻¹ e concentração de corte (C_{corte}) em g L⁻¹: 30 e 0,6 (E1); 70 e 0,6 (E2); 30 e 1,0 (E3); 70 e 1,0 (E4); 50 e 0,8 (PC, igual a média entre E5, E6 e E7)



A concentração de lipídios em microalgas aumenta, normalmente, em condições de estresse que limitem a formação proteica (falta de nitrogênio, por exemplo), assim como a de carboidratos. Entretanto, os lipídios são, para maioria de micro-organismos, a segunda opção de composto de reserva energética, depois dos carboidratos (HU, 2013). Desta maneira, o perfil do teor de lipídios não foi acompanhado, somente sua concentração final (Tabela 3). Os parâmetros utilizados nos ensaios 5, 6 e 7 (T_R 50 % e C_{corte} 0,8 g L⁻¹), combinados com 3 adições de 50 mg L⁻¹ de MEA (N =3), proporcionaram elevados teores de lipídios na biomassa de C. fusca LEB 111. Em geral, as algas verdes são relatadas como armazenadoras de amido como composto de reserva, mas também há relatos que mostram que microalgas do gênero Chlorella, por exemplo, armazenam lipídios submetida a condições de estresse hiperósmico, por exemplo (GUSCHINA; HARWOOD, 2006). Os resultados de Jerez et al. (2016) mostraram que Chlorella fusca, mesmo submetida a privação da fonte de nitrogênio ou enxofre, apresentou concentração de lipídios (em torno de 30 % m m⁻¹) menor que quase todas as respostas do parâmetro no corrente trabalho. De tal modo, o que pode ter ocorrido é que a combinação da T_R de 50 % v v⁻¹, C_{corte} de 0,8 g L⁻¹ e a adição de MEA 3 vezes, causou estresse e maior acúmulo de lipídios.

Ensaio	X1 (%)	$X_2 (g L^{-1}) =$	Concentração (% m m ⁻¹)				
	2 x 1 (70)		Proteínas	Carboidratos	Lipídios		
1	30	0,6	16,8	30,9	40,1		
2	70	0,6	26,5	30,0	37,6		
3	30	1,0	28,7	28,0	37,2		
4	70	1,0	22,5	35,7	23,0		
5	50	0,8	23,8	14,3	41,4		
6	50	0,8	23,0	14,0	40,9		
7	50	0,8	22,9	14,1	41,3		

Tabela 3 – Resultados de concentração de proteínas, carboidratos e lipídios presente na biomassa de *Chlorella fusca* LEB 111 no final dos ensaios semicontínuos com MEA, segundo DCC 2² com triplicada no ponto central.

X1: Taxa de reutilização de meio (TR); X2: Contração de corte (Ccorte)

As microalgas como *Chlorella*, quando cultivadas em condições ideais (nutricionais, de temperatura e luminosidade, principalmente) possuem composição bioquímica típica (% m m⁻¹) variável de proteínas (30-50), carboidratos (20-40) e lipídios (8-15). No entanto, espécies desse gênero podem acumular valores até 80 % m m⁻¹ de cada macromolécula, quando em condições de cultivo desfavoráveis (HU, 2013). Neste sentido, os tratamentos utilizados, promovidos pelas diferentes T_R , C_{corte} e adição de MEA a cada corte, culminaram na redução da concentração de proteínas e aumento considerável no teor de lipídios de *C. fusca* LEB 111

3.3 ESTIMATIVA DOS EFEITOS DE T_R E C_{corte} NAS RESPOSTAS OBTIDAS DO CULTIVO DE *Chlorella fusca* LEB 111

A estimativa de efeitos principais (L) mostrou que T_R e C_{corte} exerceram influência significativa (p < 0,05) e positiva para P_{máx} e E_{máx}, mas negativa pra CID_{AC} (Tabela 4). Dessa forma, quando se incrementou T_R, de 30 para 70 % v v⁻¹, foi obtido aumento médio de 53,5 mg L⁻¹ d⁻¹ e 15,4 % m m⁻¹ para P_{máx} e E_{máx}, respectivamente, e redução média de 7,4 mg L⁻¹ para CID_{AC}. Todavia, a respeito da concentração de CID_{AC}, a redução mais acentuada foi quando se incrementou a C_{corte} de 0,6 para 1,0 g L⁻¹ (12,9 mg L⁻¹). A interação entre as variáveis de estudo apresentou efeito significativo (p < 0,05) e positivo sobre P_{máx} e E_{máx}. Isso indica que, mantendo T_R em 70% e reduzindo C_{corte} de 1,0 para 0,6 g L⁻¹, ou, então, mantendo T_R em 30% e aumentando C_{corte} de 0,6 para 1,6 g L⁻¹, P_{máx} e E_{máx} foram incrementadas em média 8,3 mg L⁻¹ d⁻¹ e 2,4 % m m⁻¹, respectivamente.

Tabela 4 - Estimativa dos efeitos principais (L) e de interação das variáveis Taxa de reutilização de meio (T_R , % v v⁻¹) e concentração de corte (C_{corte} , g L⁻¹) nas respostas concentração de CID acumulado (CID_{AC}), produtividade máxima ($P_{máx}$), eficiência de uso de CO₂ ($E_{máx}$), concentração de proteínas, carboidratos e lipídios na biomassa de *Chlorella fusca* LEB 111 ao final dos ensaios semicontínuos.

		CID	AC		Pmá	X		Emáx	Σ.
Fator	(mg L ⁻¹)		$(mg L^{-1} d^{-1})$		(% m m ⁻¹)				
	Efeito	e.p.	р	Efeito	e.p.	р	Efeito	e.p.	р
Média	52,9	0,4	<0,0001	97,0	0,2	<0,0001	27,9	0,1	<0,00001
$T_{R}(L)$	-7,4	1,0	0,018	53,5	0,6	<0,001	15,4	0,2	<0,001
C _{corte} (L)	-12,9	1,0	0,006	12,7	0,6	0,002	3,7	0,2	0,002
$T_{R}(L) C_{corte}(L)$	2,1	1,0	0,171	8,3	0,6	0,005	2,4	0,2	0,005
	Р	roteí	nas	Ca	rboid	ratos		Lipídi	05
Fator	P (%	roteí % m	nas m ⁻¹)	Car (?	rboid % m	ratos m ⁻¹)	(1	Lipídi % m r	08 n ⁻¹)
Fator	P (% Efeito	roteí % m e.p.	nas m ⁻¹) p	Ca (9 Efeito	rboid % m e.p.	ratos m ⁻¹) p	(^t Efeito	Lipídi % m r e.p.	os n ⁻¹) p
Fator Média	P (9) Efeito 23,5	roteí % m e.p. 0,2	nas m ⁻¹) <u>p</u> <0,0001	Car (9 Efeito 23,9	rboid % m e.p. 0,1	ratos m ⁻¹) <u>p</u> <0,0001	(f Efeito 37,3	Lipídi % m r e.p. 0,3	os n ⁻¹) <u>p</u> <0,0001
Fator Média T _R (L)	P (% Efeito 23,5 1,8	roteí 6 m e.p. 0,2 0,5	nas m ⁻¹) <u>p</u> <0,0001 0,071	Ca (9 Efeito 23,9 3,4	rboid % m e.p. 0,1 0,2	ratos m ⁻¹) p <0,0001 0,002	(* Efeito 37,3 -8,7	Lipídi % m r e.p. 0,3 0,8	os n ⁻¹) <u>p</u> <0,0001 0,009
Fator Média T _R (L) C _{corte} (L)	P (9) Efeito 23,5 1,8 3,9	roteí 6 m e.p. 0,2 0,5 0,5	nas m ⁻¹) <u>p</u> <0,0001 0,071 0,016	Ca (9 Efeito 23,9 3,4 1,4	rboid /• m e.p. 0,1 0,2 0,2	ratos m ⁻¹) <u>p</u> <0,0001 0,002 0,012	(f Efeito 37,3 -8,7 -9,2	Lipídi % m r e.p. 0,3 0,8 0,8	os n ⁻¹) <u>p</u> <0,0001 0,009 0,008

e.p.: erro padrão; p: significância

A estimativa de efeitos obtidas nas principais macromoléculas de *C. fusca* LEB 111 é apresentada na Tabela 4. O incremento da C_{corte} levou ao aumento significativo (p < 0,05) e positivo (3,9 % m m⁻¹) da concentração de proteínas da microalga. Esse resultado vai ao encontro daquele obtido na estimativa de efeito de C_{corte} na P_{máx} (Tabela 4), haja vista que, com o aumento da produção de biomassa ocorre também o aumento da concentração de proteínas. O efeito de maior intensidade significativa (p < 0,05) em relação a concentração de proteínas foi o de interação entre T_R e C_{corte}, que em média causou 7,9 % m m⁻¹ de diminuição da macromolécula. Tal fato, entretanto, era esperado uma vez que, assim como a adição de MEA a cada corte, a reutilização de nutrientes, pode provocar alguma limitação do crescimento, a qual é demonstrada pela redução da concentração de proteínas, tal como encontrado por Rosa et al. (2015) com a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 também em cultivos semicontínuos.

A estimativa de efeitos sobre a concentração de carboidratos está de acordo com o efeito negativo de interação da concentração de proteínas citado, uma vez que a quantidade da macromolécula em questão apresentou incremento significativo (p < 0.05) e positivo nos efeitos

lineares e de interação entre T_R e C_{corte} . Neste contexto, a maior alteração promovida pelos parâmetros operacionais do cultivo semicontínuo foi resultante da interação de ambos, sendo a concentração de carboidratos acrescida, em média, 4,3 % m m⁻¹.

Em relação a estimativa de efeitos da concentração de lipídios, como os maiores resultados da macromolécula foram contemplados nos ensaios conduzidos com os níveis do ponto central (Tabela 3), era esperado efeito negativo na resposta para, pelo menos, uma das variáreis estudadas. Contudo, T_R , C_{corte} e a interação entre ambos parâmetros, apresentaram efeito negativo e significativo (p < 0,05) sobre a concentração de lipídios, sendo que a maior influência àquela proporcionada pela C_{corte} (redução de 9,2 % m m⁻¹, quando foi aumentado o parâmetro de 0,6 para 1,0 g L⁻¹).

4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, o cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111, em modo semicontínuo, com reaproveitamento de nutrientes e adição de monoetanolamina (MEA), aumentou a produção de biomassa e biofixação CO₂. Assim, com T_R de 70 % v v⁻¹, C_{corte} de 1,0 g L⁻¹ e com 3 adições de MEA, foram alcançados os maiores resultados de produtividade (144,2 mg L⁻¹ d⁻¹), biomassa gerada (1,8 g), taxa de biofixação de CO₂ (264,4 mg L⁻¹ d⁻¹), eficiência de uso de CO₂ (41,5 % m m⁻¹) e concentração de carboidratos (35,7 % m m⁻¹). Além disso, também com 3 adições de MEA, mas com T_R de 50% v v⁻¹ e C_{corte} de 0,8 g L⁻¹, elevado teor de lipídios (cerca de 41,0 % m m⁻¹) foi obtido pela microalga. Portanto, foi possível demonstrar que o sistema, constituído pelo cultivo semicontínuo de *C. fusca* LEB 111 com adição de MEA, se mostrou promissor quanto a redução de gás de efeito estufa e produção de macromoléculas pela microalga.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical ChemistsMaryland, 2000.

APHA. American Public Health Association (APHA). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. Washington DC., 1998.

BASU, S.; ROY, A. S.; MOHANTY, K.; GHOSHAL, A. K. CO₂ biofixation and carbonic anhydrase activity in *Scenedesmus obliquus* SA1 cultivated in large scale open system. **Bioresource Technology**, v. 164, p. 323–330, 2014.

BROWN, P.; BROOMFIELD M; BUYS G; CARDENAS, L.; KILROY E; MACCARTHY J; MURRELLS T; PANG Y; PASSANT N; RAMIREZ GARCIA J; THISTLETHWAITE G; WEBB N. **UK Greenhouse Gas Inventory, 1990 to 2014. Annual Report for Submission** under the Framework Convention on Climate ChangeScience Research Programme of the Department of Energy and Climate Change. 2016.

CAVINATO, C.; UGURLU, A.; DE GODOS, I.; KENDIR, E.; GONZALEZ-FERNANDEZ, C. Biogas production from microalgae BT - Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts. In: GONZALEZ-FERNANDEZ, C.; MUÑOZ, R. (Ed.). Woodhead Publishing Series in Energy. Cambridge: Woodhead Publishing - Elsevier Ltd., 2017. p. 155–182.

CHANG, Y.-M.; TSAI, W.-T.; LI, M.-H. Characterization of activated carbon prepared from *Chlorella*-based algal residue. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 344–348, 2015.

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

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; FILHO, P. D.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 603–607, 2002.

COSTA, J. A. V.; MORAES, L.; MOREIRA, J. B.; ROSA, G. M.; HENRARD, A. S. A.; MORAIS, M. G. Microalgae-Based Biorefineries as a Promising Approach to Biofuel Production. In: TRIPATHI, B. N.; KUMAR, D. (Ed.). **Prospects and Challenges in Algal Biotechnology**. Singapore: Springer Singapore, 2017. p. 113–140.

DEAMICI, K. M.; CARDIAS, B. B.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, L. O. Static magnetic fields in culture of *Chlorella fusca*: Bioeffects on growth and biomass composition. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 7, p. 912–916, 2016.

DUARTE, J. H.; FANKA, L. S.; COSTA, J. A. V. Utilization of simulated flue gas containing CO₂, SO₂, NO and ash for *Chlorella fusca* cultivation. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 159–165, 2016.

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

GÓMEZ-SERRANO, C.; MORALES-AMARAL, M. M.; ACIÉN, F. G.; ESCUDERO, R.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; MOLINA-GRIMA, E. Utilization of secondary-treated wastewater for the production of freshwater microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 16, p. 6931–6944, 2015.

GROBBELAAR, J. U. Inorganic Algal Nutrition. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). Handbook of Microalgal Culture. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 123–133.

GUSCHINA, I. A.; HARWOOD, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress in Lipid Research**, v. 45, n. 2, p. 160–186, 2006.

HO, S.; LU, W.; CHANG, J. 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.

HOLLAND, D. L.; GABBOTT, P. a. A Micro-Analytical Scheme for the Determination of Protein, Carbohydrate, Lipid and RNA Levels in Marine Invertebrate Larvae. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, v. 51, n. 3, p. 659, 1971.

HU, Q. Environmental Effects on Cell Composition. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 114–122.

JANG, E.; CHOI, S. W.; HONG, S. M.; SHIN, S.; LEE, K. B. Development of a costeffective CO₂ adsorbent from petroleum coke via KOH activation. **Applied Surface Science**, v. 429, p. 62–71, 2018.

JEREZ, C. G.; MALAPASCUA, J. R.; SERGEJEVOVÁ, M.; FIGUEROA, F. L.; MASOJÍDEK, J. Effect of Nutrient Starvation under High Irradiance on Lipid and Starch Accumulation in *Chlorella fusca* (*Chlorophyta*). **Marine Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 24– 36, 2016.

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

LEE, R. E. Basic characteristics of the algae. In: **Phycology**. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. p. 3–30.

LEUNG, D. Y. C.; CARAMANNA, G.; MAROTO-VALER, M. M. An overview of current status of carbon dioxide capture and storage technologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 39, p. 426–443, 2014.

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, n. 1, p. 265–275, 1951.

MA, B. L.; HERATH, A. W. Timing and rates of nitrogen fertiliser application on seed yield, quality and nitrogen-use efficiency of canola. **Crop and Pasture Science**, v. 67, n. 2, p. 167–180, 2016.

MARSH, J. B.; WEINSTEIN, D. B. Simple charring method for determination of lipids. **Journal of lipid research**, v. 7, n. 4, p. 574–576, 1966.

MELDON, J. H.; MORALES-CABRERA, M. A. Analysis of carbon dioxide absorption in and stripping from aqueous monoethanolamine. **Chemical Engineering Journal**, v. 171, n. 3, p. 753–759, 2011.

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

MORAIS, M. G. de; 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, n. 3, p. 439–445, 2007.

PERIN, G.; SIMIONATO, D.; BELLAN, A.; CARONE, M.; OCCHIPINTI, A.; MAFFEI, M. E.; MOROSINOTTO, T. Cultivation in industrially relevant conditions has a strong influence

on biological properties and performances of *Nannochloropsis gaditana* genetically modified strains. **Algal Research**, v. 28, p. 88–99, 2017.

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. Journal of Algal Biomass Utilization, v. 3, n. 4, p. 89–100, 2012.

RADMANN, E. M.; CAMERINI, F. V.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. Isolation and application of SO_X and NO_X resistant microalgae in biofixation of CO₂ from thermoelectricity plants. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 10, p. 3132–3136, 2011.

REIS, R. A.; PEREIRA, J. H. C.; CAMPOS, A. C. C.; BARBOZA, E. M.; DELPECH, M. C.; CESAR, D. V.; DAHMOUCHE, K.; BANDEIRA, C. F. Waterborne poly(urethane-urea) gas permeation membranes for CO₂/CH₄ separation. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 11, p. 46003, 2018.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1–61, 1979.

ROSA, A. P. C.; SANTOS, T. D.; RADMANN, E. M.; SANTANA, F. B.; COSTA, J. A. V. Production of *Spirulina* in semicontinuous cultivation using medium recycle. **IJERA**, v. 5, n. 4, p. 36–42, 2015a.

ROSA, G. M.; MORAES, L.; CARDIAS, B. B.; SOUZA, M. R. A. Z. de; COSTA, J. A. V. Chemical absorption and CO₂ biofixation via the cultivation of *Spirulina* in semicontinuous mode with nutrient recycle. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 321–327, 2015b.

ROSA, G. M.; MORAES, L.; SOUZA, M. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* cultivation with a CO₂ absorbent: Influence on growth parameters and macromolecule production. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 528–534, 2016.

SUN, Z.; ZHANG, D.; YAN, C.; CONG, W.; LU, Y. Promotion of microalgal biomass production and efficient use of CO₂ from flue gas by monoethanolamine. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 90, n. 4, p. 730–738, 2015.

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.

ZAIDIZA, D. A.; BELAISSAOUI, B.; RODE, S.; FAVRE, E. Intensification potential of hollow fiber membrane contactors for CO₂ chemical absorption and stripping using monoethanolamine solutions. **Separation and Purification Technology**, v. 188, p. 38–51, 2017.

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, n. 2, p. 97–101, 2002.

ZHENG, Q.; MARTIN, G. J. O.; WU, Y.; KENTISH, S. E. The use of monoethanolamine and potassium glycinate solvents for CO₂ delivery to microalgae through a polymeric membrane system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 128, p. 126–133, 2017.

ARTIGO 4

PRODUÇÃO DE Spirulina platensis EM ESCALA PILOTO: BALANÇO DE CARBONO E EFEITO DA MONOETANOLAMINA NA TAXA FOTOSSINTÉTICA DA MICROALGA EM CONDIÇÃO *EX SITU*

PRODUÇÃO DE Spirulina platensis EM ESCALA PILOTO: BALANÇO DE CARBONO E EFEITO DA MONOETANOLAMINA NA TAXA FOTOSSINTÉTICA DA MICROALGA EM CONDIÇÃO *EX SITU*

RESUMO

Os cultivos da cianobactéria Spirulina em escala de bancada são muito aplicados quanto a fixação de carbono e produção de biomassa. Contudo, são pouços estudos destinados a avaliar o balanço de carbono deste bioprocesso em maior escala. O objetivo do trabalho foi cultivar Spirulina platensis em escala piloto e condições outdoor, avaliando a utilização de carbono e produção de biomassa, bem como em condição *ex situ* a adição de monoetanolamina (MEA) na atividade fotossintética microalgal. Para isso, Spirulina platensis foi cultivada em Raceway de 14,0 m³, em modo semicontínuo, sob condições ambientais, durante 100 d. O equilíbrio de carbono do cultivo foi realizado com taxa de diluição de 0,03 d⁻¹ e concentração de bicarbonato de sódio de 8,3 g L⁻¹. Assim, foi constatado que S. *platensis* não foi fotoinibida, pois elevada concentração de biomassa (2,2 g L^{-1}) e produtividade de biomassa (27,2 g $m^{-2} d^{-1}$) foram obtidas. As concentrações de bicarbonato e carbonato determinadas do meio mantiveram pH médio elevado (10,2) e com radiação solar (763,5 W m⁻²) e temperatura (32,7 °C) mais alta, maiores resultados de produtividade média (4,6 g m⁻² d⁻¹) e eficiência de utilização de carbono (94,1 % m m⁻¹) foram obtidos entre 69°-73° d. Além disso, foi constatado que com adição de 25,0 mg L⁻¹ de MEA, em condição *ex situ*, a taxa fotossintética e de respiração se mantiveram similares ao ensaio controle. Portanto, foi demonstrado que Spirulina platensis, além de resistente a perturbações operacionais e ambientais, também é tolerante ao monoetanolamina.

Palavras-chave: Cianobactéria. Bicarbonato de sódio. Fonte de carbono. Microalga. Produtividade de biomassa.

1 INTRODUÇÃO

A queima de combustíveis fósseis é destacada como o principal contribuinte para o aumento dos gases de efeito estufa (GEE) na atmosfera, os quais são causadores primários da intensificação do aquecimento global (COSTA et al., 2017). Frente a isso, durante as últimas décadas se tornou inevitável o desenvolvimento de novas fontes de energia renováveis e processos sustentáveis e viáveis, minimizando a geração de passivos ambientais (VOLOSHIN et al., 2016). Neste contexto, as microalgas surgem com potencial de aplicação, não só em biocombustíveis, mas em outras aplicações atribuídas ao processo fotossintético, como a biofíxação de CO₂ (COSTA et al., 2015) e o tratamento de águas residuais (GÓMEZ-SERRANO et al., 2015).

O cultivo da microalga *Spirulina* pode ser realizado em reatores fechados ou abertos. Os sistemas abertos até agora foram o método de escolha para produzir biomassa de microalga comercialmente. Os principais produtores de *Spirulina* contam com este método há mais de 30 anos, aproveitando o fato de que o meio de crescimento para o gênero (altamente alcalino) não é adequado para espécies concorrentes. Entre os reatores abertos são incluídas as lagoas naturais, lagoas circulares, sistemas inclinados e *Raceway* (ZITTELLI et al., 2013).

Os sistemas abertos exibem vantagens frente a outras configurações, tais como na limpeza, exposição direta ao sol, auto refrigeração por evaporação e menor acúmulo de oxigênio. Em contrapartida, tais sistemas dependem do clima e possuem altas perdas de CO₂. O custo da construção de sistemas aberto é cerca de dez vezes inferior à dos sistemas fechados (CHISTI, 2013). Em escala industrial são utilizados reatores com área superficial de 1000 a 5000 m², com produtividade areal de até 150 t ha⁻¹ ano⁻¹ (CRAGGS; SUTHERLAND; CAMPBELL, 2012).

Entre os nutrientes necessários ao cultivo *Spirulina*, a fonte de carbono é o principal responsável por onerar sua produção. Como opção de redução de custos, é possível empregar gases de combustão a partir de fontes industriais se os mesmos estiverem disponíveis (ACIÉN et al., 2012). O cultivo de *Spirulina* pode ser realizado com melaço (ANDRADE; COSTA, 2007) ou resíduos urbanos (ZHAI et al., 2017) como fonte de carbono. Tais experiências, no entanto, em condições ambientais não controladas, podem gerar inconvenientes durante o cultivo ou na utilização posterior da biomassa, devido a contaminação com outros microorganismos. Em alternativa, os meios de cultivo tradicionais empregados com espécies de *Spirulina*, apresentam elevado pH e alcalinidade, o que, de acordo com Gershwin e Belay (2008), inibem o crescimento de seres oportunistas e resultam em monocultura da cianobactéria.

O equilíbrio químico da fonte de carbono no meio líquido, seja ela bicarbonato, carbonato ou CO₂, participam de equilíbrio químico ($CO_{2(g)} \leftrightarrow CO_{2(aq)} \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow HCO_3^- \leftrightarrow$ CO_3^{2-}) dependente do pH. Este balanço de carbono pode ser perturbado quando, por exemplo, o CO₂ é adicionado à cultura, removido na fotossíntese ou perdido por difusão para a atmosfera. No mencionado equilíbrio químico, entre pH 4,0 e 6,5, a concentração de CO₂ é 5 a 6 vezes superior as demais espécies químicas, ao passo que, entre pH 7,0 e 9,5, o mesmo ocorre para a concentração de HCO₃. (ANDRADE et al., 2016). Neste sentido, o pH do meio desempenha importante papel na transferência de massa e pode alterar consideravelmente a dinâmica de crescimento das microalgas (RINANTI, 2016).

As microalgas podem utilizar HCO₃⁻ e CO₂ como fonte de carbono, por meio dos mecanismos de absorção conhecidos como transportado ativo e difusão passiva, respectivamente (THAUER, 2007). O bicarbonato de sódio, como fonte de carbono, em cultivos descontínuos de *Spirulina*, mantêm o pH do meio estável (acima de 9,5) por alguns dias (DEAMICI; SANTOS; COSTA, 2018), evitando assim perdas para atmosfera. Contudo, se modo de cultivo alternativo, como o semicontínuo, não for empregado, valores de pH acima de 11,0 podem ser alcançados rapidamente. A utilização do absorvente químico monoetanolamina (MEA), agregado ao cultivo semicontínuo de *Spirulina*, apresenta maneira promissora de elevar a concentração de carbono no meio e manter estável o pH (ROSA et al., 2015).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o balanço de carbono, utilizando NaHCO₃ como fonte do nutriente, no cultivo de *Spirulina platensis* em escala piloto e condições *outdoor*, assim como avaliar o efeito da atividade fotossintética em condição *ex situ* da microalga frente a MEA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO

O micro-organismo utilizado foi a cianobactéria *Spirulina platensis*, pertencente a Coleção de Culturas do grupo de Biotecnologia de Algas Marinhas, da Universidad de Almería, Almería – Espanha (Figura A6, em ANEXO). O meio de cultivo utilizado (Tabela A2, em ANEXO) foi composto por fertilizantes agrícolas: nitrato de sódio (NaNO₃, 0,8 g L⁻¹), fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄, 0,25 g L⁻¹), sulfato de magnésio (MgSO₄, 0,3 g L⁻¹) e micronutrientes (Welgro hidroponic, 0,02 mL L⁻¹ e Karentol, 0,02 g L⁻¹) (CAMACHO-RODRÍGUEZ et al., 2013). A fonte de carbono adicionada ao cultivo foi o bicarbonato de sódio

(NaHCO₃), com concentração variando segundo operacionalização da planta piloto. Os valores adicionados foram 2,8 g L⁻¹ (13° ao 19° d e 55° ao 61° d), 4,2 g L⁻¹ (20° ao 26° e 62° ao 68° d), 6,3 g L⁻¹ (27 ao 40° d) e 8,3 g L⁻¹ (0 ao 12° d, 48° ao 54° d e 69° ao 100° d).

2.2 BIORREATOR UTILIZADO

A configuração deste reator, construído de fibra de vidro (espessura 3 mm), compreende dois canais de 50 m de comprimento por 1 m de largura, conectados por curvas em 180°, totalizando área de superfície de 100 m² e volume útil de 14 m³ (14 cm de altura de líquido) (Figura 1 e Figura A7 em ANEXO). O reator é equipado com fosso de 0,59 m³ (0,65 m de comprimento, 0,90 m de largura, 1 m de profundidade), localizado a 1,8 m a jusante das pás rotativas. Para determinar a concentração de carbono perdido como CO₂ (denominado CO_{2desprendido}), sobre o fosso foi utilizada sonda de CO₂ (Vaisala GMT220, Finlândia) anexada em uma câmara. O cultivo foi agitado entre os canais por pás rotativas de inox, acopladas em eixo, o qual foi rotacionado a 2 rad s⁻¹ (20 rpm) por motor elétrico trifásico. Para melhorar a agitação da cultura e reduzir o consumo de energia no reator, foram adicionados defletores removíveis de aço inox nas curvas, com distância de um quarto da largura do canal.



Figura 1 – Vista superior e lateral do desenho esquemático do reator Raceway utilizado

Fonte: Adaptado de Pawlowski et al. (2017)

O reator é equipado por sonda de oxigênio dissolvido (O.D.) (Crison OD5120, Espanha), de pH e temperatura combinados (Crison pH5083T, Barcelona - Espanha). A radiação solar incidida no reator foi mensurada por piranômetro termoelétrico acoplado a um adaptador AC-420 (LP-02, Geónica S.A., Espanha). Todos foram conectadas a multímetro (Crison MM44, Barcelona - Espanha) e, esse, em *software* de aquisição e controle de dados

(Azeotech Daqfactory, Arizona - EUA), o qual coletava um dado de cada parâmetro por minuto (1440 dados por dia). Para melhor visualização deste montante de dados, esses foram separados em dados da fase clara (radiação solar > 10 W m⁻²) e dados da fase escura (radiação solar < 10 W m⁻²). As sondas foram localizadas na saída do foço (Figura 1). Esse, foi adicionalmente equipado com sistema de injeção de ar comprimido através de três placas difusores de membrana (AFD 270). A vazão de ar empregada foi 80 L min⁻¹, a qual foi injetada continuamente para dessorver o O₂ dissolvido.

2.2.1 Propagação do inóculo

O cultivo no biorreator tipo *Raceway* foi iniciado a partir da propagação do inóculo em escala de laboratório (0,5 L até 20 L), depois em condições *outdoor*, sob estufa de filme transparente, em fotobiorreator tipo coluna de bolhas (0,1 m³) até fotobiorreator tubular horizontal (3,0 m³). A inoculação do *Raceway* foi realizada com 5 m³ de meio de cultivo, seguida pela adição de 3,0 m³ de cultivo (reator tubular horizontal). Após transcorrido 10 d de cultivo em batelada, o biorreator foi avolumado com meio de cultivo até 14 m³ (14 cm de altura de líquido).

2.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os ensaios foram realizados em escala piloto, sob condições *outdoor*, na Estação Experimental *Las Palmerillas* da Fundação CAJAMAR (Almería, Espanha). A concentração inicial de biomassa foi 0,2 g L⁻¹ e o cultivo foi conduzido em modo descontínuo até atingir concentração de biomassa superior a 1,0 g L⁻¹. A partir deste ponto, período de avaliação do corrente trabalho, o reator foi operado em modo semicontínuo. O cultivo foi conduzido por 100 d, sendo esse período compreendido entre o final do mês de junho e o início do mês de outubro de 2017 (87 d de verão e 13 d de outono). Neste trabalho, primeiramente, foi avaliado o cultivo da microalga de forma global, considerando todo o tempo de ensaio, com variações operacionais de taxa de diluição (D, entre 0,03 a 0,09 d⁻¹) e concentração de NaHCO₃ adicionado (2,8 a 8,3 g L⁻¹). Neste período, o montante de dados de pH e temperatura foram calculados a partir de médias de 3 d de cada semana.

No período entre o 69° e 100° d, a taxa de diluição $(0,03 d^{-1})$ e concentração de carbono $(8,3 g L^{-1})$ dentro de cada semana foi constante. O período de análise selecionado foi compreendido entre os dias 69°-73°, 73°-87°, 90°-94° e 96°-100°d, denominados S1, S2, S3 e S4, respectivamente. Neste período foi realizada a avaliação dos parâmetros físico-químicos e ambientais do cultivo de *S. platensis*, assim como os dados de produção de biomassa e fixação

de carbono. As réplicas dos parâmetros, para efeito de comparação estática, foram consideradas os dados obtidos em cada dia, para mesma hora, dentro da mesma semana.

2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

Os ensaios foram monitorados diariamente quanto a concentração de biomassa, e fluorescência da clorofila (Fv/Fm), enquanto que 2 a 3 vezes por semana o cultivo foi observado ao microscópio óptico, assim como a concentração de carbonato (CO₃-²), bicarbonato (HCO₃-) e carbono inorgânico total (CIT) foi avaliada.

A concentração de biomassa (X_b) foi obtida por meio de filtração a vácuo de 80 ml de amostra do cultivo em filtro com 1,0 μ m (WhatmanTM), com posterior secagem em estufa a 80°C, por 24 h.

A eficiência da atividade fotossintética das clorofilas das células da microalga foi avaliada pelo parâmetro Fv/Fm, em que Fv é a fluorescência variável e Fm é a fluorescência máxima do pigmento. Tal determinação consistiu em tomar de 3,5 mL de cultivo em cubetas, mantendo-as na ausência de luz por 15 min e quantificando Fv/Fm em fluorímetro (AquaPen AP 100, Photon Systems Instruments, República Checa) (IPPOLITI et al., 2016).

A observação microscópica foi realizada (Laica, ICC50 HD, Alemanha) para assegurar que o cultivo, de *Spirulina platensis* em *Raceway*, foi unialgal durante todo o período.

A concentração de CO_3^{-2} e HCO_3^{-1} foi determinada por volumetria com ácido sulfúrico 0,01 N em duas etapas: 1) titulação, com adição de fenolftaleína 1%, até mudança de cor do indicador (pH ~8,3); 2) seguida por nova titulação, com adição de alaranjado de metila 1%, até ponto de equivalência desse indicador (~pH 4,0) (GÓMEZ-SERRANO et al., 2015).

2.5 RESPOSTAS AVALIADAS NO CULTIVO

O cultivo foi estudado quanto a concentração de carbono total (CIT, g d⁻¹), produtividade volumétrica de biomassa (P_X , g L⁻¹ d⁻¹), demanda de carbono pela microalga (Dc, g d⁻¹), eficiência de uso de carbono (Ec, % m m⁻¹) e conversão de carbono em biomassa. Os valores apresentados desses parâmetros são valores médios com desvio padrão dos dados de cada semana.

2.5.1 Concentração de carbono inorgânico total

A concentração de CIT foi obtida pela soma dos ânions, CO_3^{-2} e HCO_3^{-1} determinados, levando em consideração as massas molares de cada átomo em cada molécula. Para efeito de comparação, no início do cultivo, a concentração de CIT também foi determinada por kit de análise (Hach-Lange LKC 381, Alemanha) em fotômetro (Dr Lange LASA 50, Alemanha). Mas, como os resultados foram similares, e as análises por kits são dispendiosas, foi considerada a determinação indireta mencionada.

2.5.2 Produtividade volumétrica de biomassa

A produtividade volumétrica de biomassa (P_X , g L⁻¹ d⁻¹) foi determinada de acordo com Molina Grima et al. (1999), considerando o produto da taxa de diluição (D, d⁻¹) pela concentração de biomassa (X_b , mg L⁻¹) de cada ensaio, como na Equação IV-1. Para calcular D foi considerado o volume refrescado de cultivo por semana (V_R , m³), o volume útil ($V_{útil}$, m³) e o tempo em dias considerado por semana, como mostra a Equação IV-2.

$$P_{X} = X_{b} D \tag{IV-1}$$

$$D = V_R V_{\text{útil}}^{-1} 7 d^{-1}$$
(IV-2)

2.5.3 Demanda de carbono pela microalga

A demanda de carbono (D_C, g d⁻¹) pela microalga (Equação IV-3) foi calculada a partir de P_X (g L⁻¹ d⁻¹), volume útil do reator (V_{útil}, L) e concentração de carbono na biomassa microalgal (C_{cbm}), a qual foi considerada 45,0 % m m⁻¹ (0,45 g_{carbono} g_{biomassa}⁻¹), como determinado em várias repetições em cultivo semicontínuo de *Spirulina* por (ROSA et al., 2015).

$$Dc = V_{\text{útil}} C_{cbm}$$
(IV-3)

2.5.4 Eficiência de uso de carbono

A determinação da eficiência de carbono (E_C , % m m⁻¹) foi precedida do cálculo da taxa mássica de carbono (\dot{m}_C , g d⁻¹) (Equação V-4), a partir da concentração de carbono inorgânico total (CIT, g L⁻¹), V_{útil} (L) e da diluição D (d⁻¹). A E_C foi, então, calculada a partir de D_C (g d⁻¹) e \dot{m}_C (g d⁻¹), conforme mostra a Equação IV-5.

$$\dot{m}_{\rm C} = {\rm CIT} \, {\rm V}_{\rm util} \, {\rm D}$$
 (IV-4)

$$E_{\rm C} = D_{\rm C} \dot{m}_{\rm C}^{-1} 100$$
 (IV-5)

2.5.5 Conversão de carbono em biomassa

A conversão de carbono em biomassa $(Y_{X/C}, g_{biomassa} g_{carbono}^{-1})$ foi calculado a partir de \dot{m}_C (g d⁻¹) e da D_C (g d⁻¹), conforme mostra a Equação IV-6.

$$Y_{X/C} = \dot{m}_C D_C^{-1} \tag{IV-6}$$

2.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA DE *Spirulina platensis* FRENTE A MONOETANOLAMINA

No último dia de cultivo semicontínuo de *S. platensis*, foram retiradas amostras no período de maior incidência luminosa (13, 14 e 15 h) para determinar de forma *ex situ* a atividade fotossintética de microalga com adição de monoetanolamina.

As amostras de 1,0 L de cultivo cada foram levadas à laboratório em câmara de respirometria para determinar a produção (evolução) de oxigênio pela microalga diante de duas concentrações de monoetanolamina (MEA): 6,1 e 25,0 mg L⁻¹. Este intervalo de concentração de MEA foi definido por Rosa et al. (2016) para a microalga *Spirulina* sp. LEB 18.

Os experimentos foram realizados em biorreator aberto de 50 mL (40 mL útil), modo descontínuo, por 30 min cada. Esta determinação foi realizada com cultivo de *S. platensis*, sem diluição, a partir da concentração de biomassa da amostragem (cerca de 0,80 g L⁻¹).

A irradiância utilizada foi 200 µmol_{fótons} m⁻² s⁻¹, medida no centro do cultivo por sensor de quantum submergível (Walz GmbH SQS-100, Alemanha) acoplado ao radiômetro (Walz GmbH ULM-500, Alemanha), em ciclos alternados entre claro e escuro. Esta irradiância foi promovida por sistema de LEDs, disposto em torno do reator, enquanto que agitação foi realizada por agitador magnético. O oxigênio dissolvido e temperatura do ensaio foram medidos em sonda apropriada (Crison Oxi 49P, Espanha). Todos estes dados foram coletados por *software* de aquisição de dados (Azeotech Daqfactory, Arizona - EUA).

A taxa de fotossíntese e de respiração da cianobactéria *Spirulina platensis* foi medida a partir da taxa de produção de oxigênio (TO₂) no meio líquido. Esta determinação foi calculada a partir da variação da concentração de oxigênio dissolvido em intervalos de 6 s. Assim, TO₂ (mg O₂ g_{biomassa⁻¹} m⁻¹) foi obtida segundo a Equação TO₂ = X_b^{-1} (dO₂ dt⁻¹), em que (dO₂ dt⁻¹) corresponde a inclinação da curva da concentração de oxigênio dissolvido ao longo dos 30 min e X_b é a concentração de biomassa (g L⁻¹) (COSTACHE et al., 2013; SANTOS, 2015). Quando a declividade da reta foi positiva, foi obtida a taxa fotossintética (TF), enquanto que a inclinação negativa foi denominada de taxa de respiração (TR). X_b foi determinada por filtração em membrana específica, com 1,0 µm de diâmetro de poro (WhatmanTM) e posterior secagem em estufa a 80 °C por 24 h.

A Figura 2 mostra a câmara de respiração em operação simulada com a luzes apagadas (Figura 2a) e acendidas (Figura 2b). No momento dos ensaios com *S. platensis* e MEA, a câmara foi fechada para garantir que não houvessem interferências externas.

Figura 2 – Aparato experimental (respirômetro) para determinação da taxa de fotossíntese e de respiração de *Spirulina platensis* em condição *ex situ* com adição de monoetanolamina em ciclo escuro (a) e claro (b)



(b)



2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As respostas obtidas foram tratadas em *software Statistica* 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, EUA), a partir de análise de variância (ANOVA), seguida por teste de Tukey, com nível de confiança de 95%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AVALIAÇÃO GLOBAL DO CULTIVO DE Spirulina platensis EM CONDIÇÕES OUTDOOR

Os dados mostrados de pH do cultivo (Figura 2a) são equivalentes à média semanal das medidas durante a fase clara, período compreendido, normalmente, entre 7 e 20 h de cada dia. O pH do cultivo de *Spirulina platensis* ao longo do tempo de cultivo foi estável (Figura 3a). O meio de cultivo de *Spirulina*, com 16,8 g L⁻¹ de NaHCO₃ tem pH após preparo de 8,7 e perde carbono, como CO₂, para atmosfera até atingir o pH de equilíbrio (10,2) (ALAVA; MELLO; WAGENER, 1997). Neste sentido, a média do parâmetro, no período claro (10,2 \pm 0,3) não permitiu que houvesse perdas de carbono por exaustão. Além disso, o pH médio foi benéfico para a economia com este nutriente e dispensa o uso de CO₂ como fonte de carbono, o qual segundo Acién et al. (2012) é um dos insumos que mais onera a produção de biomassa de microalgas.

Em cultivos descontínuos, o pH pode atingir valores elevados em torno de 13,0, como no estudo de Deamici, Santos e Costa (2018) (12,8), com *Spirulina* sp. LEB 18, em condições *outdoor*, sob estufa de filme transparente. Por outro lado, cultivos semicontínuos, como o presente trabalho, são a opção mais empregada industrialmente (LEE et al., 2013). Entre as vantagens do modo semicontínuo, destaca-se a renovação de parte do meio de cultivo, não permitindo que a microalga seja inibida por excesso de nutrientes ou metabólitos excretados no meio, os quais alteram os parâmetros do cultivo, como o pH.

Figura 3 – Perfís de pH (a) e temperatura (b) obtidos ao longo do acompanhamento do cultivo de *Spirulina platensis*



O perfil de temperatura do cultivo de *S. platensis* (Figura 2b) começou em torno de 25°C, depois, entre o tempo 0 e 87 d (verão), a temperatura aumentou acima dos 30°C e após, no outono (13 d) a temperatura ficou abaixo dos 24°C. Assim, a temperatura do cultivo média para o período claro foi de 28,4 \pm 2,8 °C, que é muito próximo a região de ótimo (30 – 40°C) de atividade fotossintética apresentado por Torzillo e Vonshak (1994), mas está de acordo com o intervalor ideal para o crescimento de microalgas (20 a 35 °C) (ACIÉN et al., 2017). No período escuro, entre 20 h e 7 h de cada dia, a temperatura média foi 25,7 \pm 0,3 °C. A redução da temperatura na ausência de luz, em cultivos *outdoor*, ocorre naturalmente e diminui a taxa de respiração celular, reduzindo a perda noturna de biomassa, que pode atingir 30% da produtividade do dia anterior (VONSHAK, 1997).

Andrade et al. (2016) apresentam proporção de carbono inorgânico total em meio líquido dividido entre bicarbonato (66,7 % m m⁻¹) e carbonato (33,3 % % m m⁻¹) em pH em torno de 10,0. Contudo, o presente estudo difere da situação ideal estabelecida pelos citados

autores, pois apresentou variações de parâmetros e condições de cultivo, como a taxa de diluição (0,03 e 0,09 d⁻¹), concentração de NaHCO₃ adicionado (2,8 a 8,3 g L⁻¹) e temperatura. Logo, poderia ser explicado a maior concentração de CO_3^{-2} em relação ao HCO_3^{-} durante todo o período de ensaio (Figura 4a). As concentrações de carbono (carbonato, bicarbonato e carbono inorgânico total) e pH, assim como a concentração de biomassa (X_b), produtividade de biomassa (P_X) e eficiência fotossintética (Fv/Fm), obtidos durante todo o cultivo de *Spirulina platensis* são mostrados na Figura 4.

Figura 4– Perfís de concentração de carbonato (CO₃⁻²), bicarbonato (HCO₃⁻), carbono inorgânico total (CIT) (a), concentração de biomassa (X_b), produtividade de biomassa (P_X) e Fv/Fm (b) determinados no acompanhamento do cultivo de *Spirulina platensis*



As concentrações de CO_3^{-2} foram superiores em todo período de cultivo em relação a concentração de HCO_3^{-} . Do ponto de vista nutricional, tal fato não foi benéfico para a microalga, uma vez que o carbono na forma deste ânion bivalente, segundo Giordano, Beardall e Raven (2005), não é assimilado pelo mecanismo de concentração de carbono das microalgas, assim como o carbono na forma de HCO_3^{-} e CO_2 . Contudo, por volta do 70° d a concentração de bicarbonato aumentou para cerca de 1,5 g L⁻¹, ao passo que a concentração de carbonato diminui para cerca de 2,5 g L⁻¹.

As maiores concentrações e produtividades de biomassa foram obtidas entre o 10° e 20° (2,1 g L⁻¹ e 27,2 g m⁻² d⁻¹), assim como entre o 50° e 70° d (2,2 g L⁻¹ e 23,3 g m⁻² d⁻¹). A produtividade média ao longo dos 100 d (10,1 g m⁻² d⁻¹) foi 53,0 % inferior ao estudo de (MORAIS et al., 2009) (21,6 g m⁻² d⁻¹) com a cepa *Spirulina* sp. LEB 18, reator *Raceway* (área superficial de 37,1 m⁻² e volume útil de 10 m⁻³) e sob estufa de filme transparente. Contudo,

considerando a área superficial de cada reator, a produção diária média obtida seria $26,0 \% (1,0 \text{ kg d}^{-1})$ maior que de Morais et al. (2009) (0,80 kg d⁻¹).

Os cultivos em reatores aberto, como os *Raceway*, a concentração de biomassa permanece próxima de 0,5 g L⁻¹ para favorecer a entrada de luz, mas isso dificulta o processo de colheita e aumenta a propensão a contaminação por outros micro-organismos (ACIÉN et al., 2017). No entanto, com baixas concentrações de biomassa, menores são os rendimentos e maior o número de colheitas de microalgas são necessárias para ser obtido a similar concentração de biomassa, quando maiores concentrações de células são mantidas.

As concentrações de biomassa do presente estudo não fotoinibiram *Spirulina*, pois a eficiência das clorofilas (Fv/Fm) foi constante ao longo do período de avaliação $(0,43 \pm 0,04)$. A relação Fv/Fm é frequentemente usada como estimativa do rendimento fotoquímico do fotossistema II (PS II), o qual varia de forma significativa, dependendo do regime de irradiância e do tratamento fisiológico (MASOJÍDEK; TORZILLO; KOBLÍŽEK, 2013). Logo, mesmo com as variações ambientais obtidas ao longo dos 100 d de cultivo, não foi observado danos ao aparato fotossintético da microalga. Por este ângulo, seria interessante estudar o cultivo desta cepa com maiores concentrações e produtividades de biomassa, o que levaria a redução de custos com recuperação da biomassa, por exemplo.

3.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E UTILIZAÇÃO DE CARBONO COM TAXA DE DILUIÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE CARBONO CONSTANTES

O cultivo semicontínuo de microalgas é o principal modo de operação para a produção de biomassa em grande escala (GÓMEZ-SERRANO et al., 2015). Contudo, variáveis deste processo, como taxa de diluição e concentração de carbono, são impactantes nos custos de produção de biomassa (ACIÉN et al., 2012). Neste contexto, foi possível perceber que mesmo com taxa de diluição constante, algumas respostas da microalga variaram (Tabela 1).

O pH influencia o metabolismo das microalgas, pois ele altera a solubilidade de CO_2 e influencia a dissociação de minerais no meio (GROBBELAAR, 2013). Contudo, o pH médio obtido, tanto na análise global (10,2 ± 0,3), como na corrente avaliação (Tabela 1 e Figura 4) foram ideais para o equilíbrio do carbono no meio, evitando, segundo Alava, Mello; wagener (1997), perdas de $CO_{2(aq)}$ à atmosfera.

A redução da relação Fv/Fm está correlacionada fortemente com a redução no rendimento quântico da evolução do oxigênio ou da absorção de CO_2 , que frequentemente exibe depressão diurna simétrica à intensidade da luz (RICHMOND; HU, 2013). Neste sentido, os maiores resultados (p < 0,05) desta relação foram obtidos nas últimas duas semanas de cultivo,

quando cessou o período de maior temperatura e intensidade luminosa (verão) e começou o outono, o que também pode ser observado na Figura 4h.

A maior (p < 0,05) produtividade média de biomassa foi obtida na primeira semana de avaliação (S1). Isso pode ter ocorrido porque os resultados médios de radiação solar (635,5 \pm 119,6 W m⁻²) e temperatura (27,4 \pm 3,4 °C) nesta semana (Tabela 2, Figura 4) proporcionaram melhores condições ambientais para *S. platensis*. Sánchez et al. (2008) mostraram a influência da temperatura na produtividade de biomassa para *Scenedesmus almeriensis*, a qual mostrou melhor resultado em 33°C em cultivo semicontínuo, similar ao que aconteceu no presente estudo com temperatura máxima de 32,7 \pm 1,5 °C.

Tabela 1 – Eficiência de fluorescência (Fv/Fm), produtividade média de biomassa (P_X), demanda de carbono (D_C), taxa mássica de carbono (m_C), eficiência de uso de carbono (E_C) e conversão de carbono em biomassa ($Y_{X/C}$) obtidos no cultivo de *Spirulina platensis* entre 69° e 100°d de ensaio

	e 100	J'a de ensalo.		
Parâmetro	S_1	S_2	S ₃	S ₄
Fv/Fm	$0,44 \pm 0,02^{b}$	$0,43 \pm 0,04^{b}$	$0,50 \pm 0,04^{a}$	$0,47 \pm 0,02^{a,b}$
$P_{m \acute{e} dio} \left(g \ m^{-2} \ d^{-1}\right)$	$4,6 \pm 0,4^{a}$	$3,2 \pm 0,5^{b}$	$3,1 \pm 0,4^{b}$	$3,3 \pm 0,3^{b}$
$D_{C} (g d^{-1})$	$233,1 \pm 16,0^{a}$	$153,7 \pm 19,7^{\rm b}$	$151,1 \pm 13,9^{b}$	$164,5 \pm 16,5^{b}$
$\dot{m}_{C} (g d^{-1})$	$242,4 \pm 16,0^{\circ}$	$323,1 \pm 3,0^{b}$	$385,7 \pm 4,7^{a}$	$391,1 \pm 17,7^{a}$
E_{C} (% m m ⁻¹)	$94,1 \pm 6,5^{a}$	$46,0 \pm 6,0^{\rm b}$	$39{,}2\pm4{,}0^{\mathrm{b}}$	$42,1\pm4,2^{b}$
$Y_{X/C}(g g^{-1})$	$1,0 \pm 0,1^{b}$	$2,2 \pm 0,3^{a}$	$2,6 \pm 0,2^{a}$	$2,4 \pm 0,3^{a}$

Letras iguais sobrescritas na mesma linha indicam que as médias não diferiram significativamente com nível de confiança de 95% (p > 0,05). Semanas de avaliação, S₁: 69°-73°d, S₂:73°-87°d, S₃:90°-94°d e S₄:96°-100°d.

Por conseguinte, devido ao maior crescimento e $P_{médio}$, a demanda de carbono calculada (D_C) foi maior (p < 0,05) que nas outras semanas. Todavia, em elevadas concentrações de carbono ocorre redução da fixação fotossintética de CO₂ e a evolução líquida de O₂, afetando a concentração de biomassa (HEIFETZ et al., 2000). A taxa mássica alimentada de carbono na primeira semana foi menor (p < 0,05) que as demais, provavelmente porque pode ter ocorrido acúmulo de carbono inorgânico total no cultivo ao longo de todo o período apresentado.

O resultado de eficiência de utilização de carbono pela microalga indicou que na primeira semana, mais de 94% do carbono alimentado foi consumido. Os resultados de S3 e S4, $39,2 \pm 4,0$ e $42,1 \pm 4,2$ % m m⁻¹, respectivamente, foram inferiores significativamente (p < 0,05) a S1 e iguais estatisticamente (p > 0,05) a S2. Esta situação pode ser explicada pela ocorrência de combinação de menores radiações solares e temperaturas, com maiores resultados

de O.D., os quais provocam dissipação de energia da luz através da fotorrespiração, inibição enzimática das vias fotossintéticas, danos ao aparelho fotossintético, em estruturas de membrana e DNA (UGWU; AOYAGI; UCHIYAMA, 2007; PENG; LAN; ZHANG, 2013).

Parâmetro		S_1	S_2	S_3	S_4
*Padiação solar	**Mínimo	$418,8 \pm 17,7$	351,4 ± 36,0	400,1 ± 81,6	403,3 ± 50,9
$(W m^{-2})$	**Máximo	763,5 ± 12,8	$703,9 \pm 34,4$	651,3 ± 79,9	$693,6 \pm 4,3$
(••• •••)	Média	635,5 ± 119,6	578,1 ± 133,6	515,9 ± 98,6	540,4 ± 108,4
	**Mínimo	$10,0 \pm 0,1$	9,9 ± 0,3	$10,0 \pm 0,1$	$10,0 \pm 1,0$
pН	**Máximo	$10,2 \pm 0,2$	$10,1 \pm 0,1$	$10,2 \pm 1,1$	10,2 ±< 0,1
	Média	$10,2 \pm 0,1$	10,0 ± <0,1	10,1 ± <0,1	10,1 ± <0,1
Temperatura	**Mínimo	$22,9 \pm 0,4$	19,2 ± 0,8	$20,0 \pm 1,0$	$19,9 \pm 0,7$
(°C)	**Máximo	$32,7 \pm 1,5$	$29,6\pm0,9$	$28,2 \pm 1,2$	$27,8 \pm 1,2$
(\mathbf{C})	Média	27,4 ± 3,4	$23,7 \pm 3,6$	$23,5 \pm 2,7$	$23,6 \pm 2,4$
*O D	**Mínimo	$144,3 \pm 5,1$	$132,1 \pm 8,7$	$148,1 \pm 10,7$	149,4 ± 11,4
(0/ acture a a)	**Máximo	$249,7\pm20,0$	$219,9\pm8,9$	251,8 ± 13,1	$247,6 \pm 7,4$
(70 saturação)	Média	$213,4 \pm 40,3$	191,2 ± 35,8	218,3 ± 37,5	217,1 ± 36,2

Tabela 2 – Resumo dos resultados de radiação solar, pH, temperatura do cultivo e oxigênio dissolvido (O.D.) obtidos durante as últimas semanas (S₁, S₂, S₃ e S₄) do cultivo de *Spirulina platensis* em condições *outdoor*

*Valores considerados para o intervalo das 10 às 16 h. **Valores mínimos e máximos são as médias dos valores mínimos e máximos de cada repetição (dia). Semanas de avaliação, S₁: 69°-73°d, S₂:73°-87°d, S₃:90°-94°d e S₄:96°-100°d.

A fotorrespiração é parte natural do ciclo de absorção de carbono e consiste, essencialmente, na utilização de O₂, formação de CO₂ fixado e amônio (tóxico as microalgas), por atividade da enzima Rubisco (Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase) como oxigenase. Assim, para rendimentos maiores em culturas em larga escala de microalgas é necessário minimizar os efeitos da fotorrespiração (MASOJÍDEK; TORZILLO; KOBLÍŽEK, 2013).

O sistema de dessorção de O.D., empregado no reator *Raceway* deste trabalho, utiliza corrente de ar comprimido injetada diretamente no fosso. Este sistema é mostrado por Acién et al. (2017), em reator idêntico ao utilizado no corrente trabalho, e mostram que a utilização do referido sistema reduz a concentração de O.D. de 600% para menos de 150% de saturação. Em contrapartida, a liberação massiva de O₂, em princípio, é indesejável, pois está atrelada ao aumento das perdas de $CO_{2(aq)}$ (PULZ; BRONESKE; WALDECK, 2013).



Figura 5 –Oxigênio dissolvido no meio (O.D.) e radiação solar incidente no cultivo de *Spirulina platensis* nas S1 (a), S2 (b), S3 (c) e S4 (d), bem como respostas obtidas de pH, temperatura e CO₂ desprendido do cultivo na S1 (e), S2 (f), S3 (g) e S4 (h)

O enriquecimento de CO₂ na alimentação de cultivos microalgais pode remover efetivamente o oxigênio dissolvido (PAWLOWSKI et al., 2017). Em contraste, esta fonte de carbono é dispendiosa à produção de microalgas (ACIÉN et al., 2012). O presente trabalho não utilizou CO₂ como fonte de carbono, porém foi monitorada a concentração deste gás como fator de perda de carbono. A concentração de CO₂ perdido (Figura 4) mostrou valores constantes em torno dos 450 mg L⁻¹, com aumento de 50 mg L⁻¹ na semana 1, entre as 14 e 16 h. Provavelmente, tal comportamento pode ter ocorrido devido as maiores temperaturas serem obtidas neste período (Tabela 2), o que segundo Perry e Green (2008) diminui a concentração de CO₂ em meio líquido. Contudo, a estabilidade desta medida ratifica que fonte de carbono não foi perdida para atmosfera como CO₂, o que segundo Alava, Mello e Wagener (1997) relatam que ocorre em meios de cultivos metaestáveis, como os utilizados com *Spirulina*.

3.3 EFEITO DA MONOETANOLAMINA NA TAXA DE FOTOSSÍNTESE DA MICROALGA

O oxigênio produzido via fotossíntese pode se acumular nos cultivos, resultando no aumento de processos como fotorrespiração e fotoinibição, os quais diminuem o rendimento de biomassa de microalgas (BADGER et al., 2000). A adição da maior concentração de MEA (25,0 mg L⁻¹) apresentou menores (p > 0,05) resultados de taxa fotossintética de *Spirulina platensis* (TF) (Tabela 3). Neste sentido, comparando as concentrações de MEA testadas, o ensaio em menor concentração (6,1 mg L⁻¹) apresentou TF 142 % maior. A cepa *Spirulina* sp. LEB 18, em condições controladas de luminosidade e temperatura, apresentou maiores respostas de concentração de biomassa ($X_{máx}$), quando foi testada com adição entre 6,1 e 12,2 mg L⁻¹ de MEA (ROSA et al., 2016).

Parâmetro	Controle	MEA (mg L^{-1})					
T urumetto		6,1	25,0				
TF (mgO ₂ g _{biomassa} ⁻¹ min ⁻¹)	$0,95 \pm 0,04^{\circ}$	$2,76 \pm 0,3^{a}$	$1,14 \pm 0,13^{b}$				
TR (mgO ₂ g _{biomassa} ⁻¹ min ⁻¹)	$-0,52 \pm 0,09^{\circ}$	$-1,22 \pm 0,2^{a}$	$-0,74 \pm 0,15^{b}$				
Temperatura (°C)	$24,9 \pm 0,5^{a}$	$25,0 \pm 0,2^{a}$	$25,4 \pm 0,4^{a}$				

Tabela 3 – Taxas fotossintéticas (TF) e de respiração (TR) da microalga *Spirulina platensis* com diferentes concentrações de monoetanolamina.

Letras iguais sobrescritas na mesma linha indicam que as médias não diferiram significativamente com nível de confiança de 95% (p > 0,05).

A mesma cepa do presente estudo apresentou maiores valores de TF (~1,1 mgO₂ $g_{biomassa}^{-1}$ min⁻¹) entre pH 8,0 e 10,0 (SANTOS, 2015). Estes resultados estão de acordo com as

TF encontradas no presente trabalho, para os ensaios controles e com 25,0 mg L⁻¹, mas é menos da metade da resposta em questão encontrada no ensaio com 6,1 mg L⁻¹. Este resultado, indica que MEA poderia ser adicionado no início do cultivo da microalga *Spirulina* sem diminuição da eficiência fotossintética, assim como foi comprovando por Rosa et al (2016) em cultivo semicontínuo com *Spirulina* sp. LEB 18 e CO₂.

A taxa máxima de produção de oxigênio não foi reduzida com a adição de MEA, no intervalo de 0 a 100 mg L⁻¹, mas quando a concentração do absorvente químico excedeu 150 mg L⁻¹, a microalga *Scenedesmus dimorphus* reduziu a TF (SUN et al., 2015). O estudo destes autores mostrou também que a TR desta microalga, em diferentes concentrações de MEA, não apresentou diferença significativa. Os resultados apresentados para a cianobactéria *S. platensis* são discrepantes aos autores mencionados, pois TR foi influenciado quando foi adicionado MEA em relação ao ensaio controle.

Os resultados de TR mostram que o maior consumo de O₂ ocorreu com a menor adição de MEA. Comparando TF e TR obtidos, o ensaio com maior TF (6,1 mg L⁻¹), também apresentou valor de TR mais elevado, sendo a diferença entre os parâmetros (1,54 mgO₂ $g_{biomassa}^{-1}$ min⁻¹) maior que com adição de 25,0 mg L⁻¹ de MEA (0,40 mgO₂ $g_{biomassa}^{-1}$ min⁻¹) e no ensaio controle (0,43 mgO₂ $g_{biomassa}^{-1}$ min⁻¹). A elevada TR é atribuída ao excesso de oxigênio no meio que, da mesma forma que a respiração mitocondrial em plantas, o metabolismo das microalgas libera o carbono, fixado no ciclo de Calvin-Benson, e consome o O₂ (NELSON; COX, 2014). Se trata de processo normal da bioquímica de microalgas, mas que em excesso reduz o rendimento da cultura (MASOJÍDEK; TORZILLO; KOBLÍŽEK, 2013).

Diante disso, considerando somente os resultados de TF e TR, seria melhor a adição de 25 mg L⁻¹ de MEA no cultivo de *Spirulina platensis*, pois a menor diferença entre os parâmetros foi obtida.

4 CONCLUSÃO

Diante do apresentado, a análise global do cultivo de *Spirulina platensis* mostrou que as variações ambientais não impossibilitaram a produção de biomassa microalgal. Neste sentido, foi obtida maior produtividade de biomassa (27,2 g m⁻² d⁻¹) quando a concentração de biomassa foi mais elevada (2,2 g L⁻¹). A partir do 70° d a concentração de bicarbonato atingiu 1,5 g L⁻¹ e a concentração de carbonato cerca de 2,5 g L⁻¹, mantiveram pH médio de (10,2) ideal para evitar perdas de carbono para atmosfera. Neste contexto, a maior radiação solar (763,5 W m⁻²) e temperatura (32,7 °C), proporcionaram maiores resultados de produtividade de biomassa (4,6 ± 0,4 g m⁻² d⁻¹) e eficiência de utilização de carbono (94,1 % m m⁻¹) na primeira semana
de avaliação com diluição de 0,03 d⁻¹ e concentração de NaHCO₃ de 8,3 g L⁻¹. A adição de 25,0 mg L⁻¹ de monoetanolamina, nos experimentos em condição *ex situ* de *Spirulina*, mostraram que a taxa fotossintética da microalga foi elevada (1,14 mgO₂ g_{biomassa}⁻¹ min⁻¹), assim como a taxa de respiração não foi muito acentuada em relação ao ensaio controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIÉN, F. G.; FERNÁNDEZ, J. M.; MAGÁN, J. J.; MOLINA, E. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1344–1353, 2012.

ACIÉN, F. G.; MOLINA, E.; REIS, A.; TORZILLO, G.; ZITTELLI, G. C.; SEPÚLVEDA, C.; MASOJÍDEK, J. Photobioreactors for the production of microalgae. In: GONZALEZ-FERNANDEZ, C.; MUÑOZ, R. (Ed.). Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts - From Feedstock Cultivation to End-Products. 1. ed. Cambridge: Elsevier, 2017. p. 1–44.

ALAVA, D. de; MELLO, P. C. de; 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, n. 5, p. 447–450, 1997.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, v. 264, n. 1–4, p. 130–134, 2007.

ANDRADE, G. A. de; PAGANO, D. J.; GUZMAN, J. L.; BERENGUEL, M.; FERNANDEZ, I.; ACIEN, F. G. Distributed Sliding Mode Control of pH in Tubular Photobioreactors. **IEEE Transactions on Control Systems Technology**, v. 24, n. 4, p. 1160– 1173, 2016.

BADGER, M. R.; VON CAEMMERER, S.; RUUSKA, S.; NAKANO, H. Electron flow to oxygen in higher plants and algae: rates and control of direct photoreduction (Mehler reaction) and rubisco oxygenase. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 355, n. 1402, p. 1433–1446, 2000.

CAMACHO-RODRÍGUEZ, J.; CERÓN-GARCÍA, M. C.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C. V.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; CONTRERAS-GÓMEZ, A.; MOLINA-GRIMA, E. A lowcost culture medium for the production of *Nannochloropsis gaditana* biomass optimized for aquaculture. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 57–66, 2013.

CHISTI, Y. Raceways-based Production of Algal Crude Oil. Green, v. 3, n. 3–4, p. 195–216, 2013.

COSTA, J. A. V.; MORAES, L.; MOREIRA, J. B.; ROSA, G. M.; HENRARD, A. S. A.; MORAIS, M. G. Microalgae-Based Biorefineries as a Promising Approach to Biofuel Production. In: B., T.; D., K. (Ed.). **Prospects and Challenges in Algal Biotechnology**. Singapore: Springer Singapore, 2017. p. 113–140.

COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; SANTANA, F. B.; SOUZA, M. R. A. Z. de; HENRARD, A. A.; ROSA, A. P. C.; BRUSCH, L. Biofixation of carbon dioxide from coal station flue gas using *Spirulina* sp. LEB 18 and *Scenedesmus obliquus* LEB 22.

COSTACHE, T. A.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; MORALES, M. M.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; STAMATIN, I.; MOLINA, E. Comprehensive model of microalgae photosynthesis rate as a function of culture conditions in photobioreactors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 17, p. 7627–7637, 2013.

CRAGGS, R.; SUTHERLAND, D.; CAMPBELL, H. Hectare-scale demonstration of high rate algal ponds for enhanced wastewater treatment and biofuel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 3, p. 329–337, 2012.

DEAMICI, K. M.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A. V. Magnetic field action on outdoor and indoor cultures of *Spirulina*: Evaluation of growth, medium consumption and protein profile. **Bioresource Technology**, p. 168–174, 2018.

GERSHWIN, M. E.; BELAY, A. *Spirulina* in Human Nutrition and Health. New York: CRC Press, 2008.

GIORDANO, M.; BEARDALL, J.; RAVEN, J. A. CO ₂ CONCENTRATING MECHANISMS IN ALGAE: Mechanisms, Environmental Modulation, and Evolution. Annual Review of Plant Biology, v. 56, n. 1, p. 99–131, 2005.

GÓMEZ-SERRANO, C.; MORALES-AMARAL, M. M.; ACIÉN, F. G.; ESCUDERO, R.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; MOLINA-GRIMA, E. Utilization of secondary-treated wastewater for the production of freshwater microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 16, p. 6931–6944, 2015.

GROBBELAAR, J. U. Inorganic Algal Nutrition. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). Handbook of Microalgal Culture. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 123–133.

HEIFETZ, P. B.; FÖRSTER, B.; OSMOND, C. B.; GILES, L. J.; BOYNTON, J. E. Effects of Acetate on Facultative Autotrophy in Chlamydomonas reinhardtii Assessed by Photosynthetic Measurements and Stable Isotope Analyses. **Plant Physiology**, v. 122, n. 4, p. 1439–1446, 2000.

IPPOLITI, D.; GONZÁLEZ, A.; MARTÍN, I.; SEVILLA, J. M. F.; PISTOCCHI, R.; ACIÉN, F. G. Outdoor production of Tisochrysis lutea in pilot-scale tubular photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 6, p. 3159–3166, 2016.

LEE, Y.-K.; CHEN, W.; SHEN, H.; HAN, D.; LI, Y.; JONES, H. D. T.; TIMLIN, J. A.; HU, Q. Basic Culturing and Analytical Measurement Techniques. In: **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 37–68.

LUCAS, B. F.; MORAIS, M. G. de; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. Spirulina for snack enrichment: Nutritional, physical and sensory evaluations. **LWT**, v. 90, n. August 2017, p. 270–276, 2018.

MASOJÍDEK, J.; TORZILLO, G.; KOBLÍŽEK, M. Photosynthesis in Microalgae. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 21–36.

MOLINA GRIMA, E.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; CAMACHO, F. G.; CHISTI, Y.

Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 231–247, 1999.

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, n. 1–2, p. 60–64, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: ARTMED EDITORA LTDA., 2014.

PAWLOWSKI, A.; GUZMÁN, J. L.; BERENGUEL, M.; ACIÉN, F. G.; DORMIDO, S. Event-Based Control Systems for Microalgae Culture in Industrial Reactors. In: TRIPATHI, B. N.; KUMAR, D. (Ed.). **Prospects and Challenges in Algal Biotechnology**. Singapore: Springer Singapore, 2017. p. 1–48.

PENG, L.; LAN, C. Q.; ZHANG, Z. Evolution, detrimental effects, and removal of oxygen in microalga cultures: A review. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 32, n. 4, p. 982–988, 2013.

PERRY, R. H.; GREEN, D. W. Perry's Chemical Engineers' Handbook. [s.l: s.n.]v. 1

PULZ, O.; BRONESKE, J.; WALDECK, P. IGV GmbH Experience Report, Industrial Production of Microalgae Under Controlled Conditions: Innovative Prospects. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 445–460.

RICHMOND, A.; HU, Q. Handbook of Microalgal Culture. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013.

RINANTI, A. Biotechnology Carbon Capture and Storage by Microalgae to Enhance CO2 Removal Efficiency in Closed- System Photobioreactor. In: THAJUDDIN, N.; DHANASEKARAN, D. (Ed.). Algae - Organisms for Imminent Biotechnology. [s.l.] InTech, 2016. p. 133–156.

ROSA, G. M.; MORAES, L.; CARDIAS, B. B.; SOUZA, M. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. Chemical absorption and CO₂ biofixation via the cultivation of *Spirulina* in semicontinuous mode with nutrient recycle. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 321–327, 2015.

ROSA, G. M.; MORAES, L.; SOUZA, M. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* cultivation with a CO₂ absorbent: Influence on growth parameters and macromolecule production. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 528–534, 2016.

SÁNCHEZ, J. F.; FERNÁNDEZ, J. M.; ACIÉN, F. G.; RUEDA, A.; PÉREZ-PARRA, J.; MOLINA, E. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain Scenedesmus almeriensis. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 398–405, 2008.

SANTOS, T. D. ENGENHARIA DE MICROALGAS NA FIXAÇÃO DE CO2 EM DIFERENTES BIORREATORES. 2015. Universidade Federal do Rio Grande, 2015.

SUN, Z.; ZHANG, D.; YAN, C.; CONG, W.; LU, Y. Promotion of microalgal biomass production and efficient use of CO 2 from flue gas by monoethanolamine. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, v. 90, n. 4, p. 730–738, 2015.

THAUER, R. K. A Fifth Pathway of Carbon Fixation. **Science**, v. 318, n. 5857, p. 1732–1733, 2007.

TORZILLO, G.; VONSHAK, A. Effect of light and temperature on the photosynthetic activity of the cyanobacterium Spirulina platensis. **Biomass and Bioenergy**, v. 6, n. 5, p. 399–403, 1994.

UGWU, C. U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Influence of irradiance, dissolved oxygen concentration, and temperature on the growth of Chlorella sorokinianaPhotosynthetica, 2007. .

VOLOSHIN, R. A.; RODIONOVA, M. V.; ZHARMUKHAMEDOV, S. K.; NEJAT VEZIROGLU, T.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Review: Biofuel production from plant and algal biomass. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 39, p. 17257–17273, 2016.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira)*: Physiology, Cell-Biology And Biotechnology. Londres: Taylor & Francis Ltda., 1997.

ZHAI, J.; LI, X.; LI, W.; RAHAMAN, M. H.; ZHAO, Y.; WEI, B.; WEI, H. Optimization of biomass production and nutrients removal by Spirulina platensis from municipal wastewater. **Ecological Engineering**, v. 108, p. 83–92, 2017.

ZITTELLI, G. C.; BIONDI, N.; RODOLFI, L.; TREDICI, M. R. Photobioreactors for Mass Production of Microalgae. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). Handbook of Microalgal Culture. Oxford, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2013. p. 225–266. CAPÍTULO IV

5 CONCLUSÃO GERAL

A cepa *Chlorella fusca* LEB 111 foi selecionada como tolerante a monoetanolamina, em contração máxima de 200 mg L⁻¹. Em cultivos em fotobiorreatores tubulares verticais, foram obtidos maiores acúmulos de CID e máxima eficiência de uso de CO_2 , além de produtividade de carboidratos e lipídios elevada, com adição de 100 e 150 mg L⁻¹ do absorvente químico.

O aumento das concentrações de MEA no meio de cultivo BG-11 promoveu a capacidade do meio em absorver CO₂. O carbono na forma de íon HCO_3^- foi a espécie química predominante em todos os tratamentos com MEA. Em batelada alimentada com CO₂ e MEA, maiores acúmulos de carbono no meio (81,4 mg L⁻¹), produtividade de biomassa (152,4 mg L⁻¹ d⁻¹), eficiência de uso de CO₂ (43,8% m m⁻¹), produtividade de proteínas (67,1 mg L⁻¹ d⁻¹) e lipídios (46,9 mg L⁻¹ d⁻¹) foram obtidos por *Chlorella fusca* LEB 111.

No cultivo semicontínuo de *Chlorella fusca* LEB 111, com taxa de reutilização de meio de 70 % v v⁻¹, concentração de corte de 1,0 g L⁻¹ e 3 adições de MEA, foram alcançados os maiores resultados de produtividade de biomassa (144,2 mg L⁻¹ d⁻¹), taxa de biofixação de CO_2 (264,4 mg L⁻¹ d⁻¹), eficiência de uso de CO_2 (41,5 % m m⁻¹) e concentração de carboidratos (35,7 % m m⁻¹). Além disso, com 3 adições de MEA, taxa de reutilização de 50% v v⁻¹ e concentração de corte de 0,8 g L⁻¹, cerca de 41,0 % m m⁻¹de lipídios foi obtido em *Chlorella*.

A análise dos 100 d de cultivo em escala piloto de *Spirulina platensis* mostrou que, em condições outdoor, foi obtida elevada produtividade de biomassa (27,2 g m⁻² d⁻¹) e concentração de biomassa (2,2 g L⁻¹). A partir do 70° d, devido ao equilíbrio nas concentrações de carbono no meio, foi obtido pH médio (10,2) ótimo para evitar perdas de carbono por exaustão. A maior radiação solar (763,5 W m⁻²) e temperatura (32,7 °C) proporcionaram maiores resultados de produtividade de biomassa e eficiência de utilização de carbono perto de 100 %, na primeira semana de avaliação. A adição de 25,0 mg L⁻¹ de monoetanolamina, nos experimentos em condição *ex situ* de *Spirulina*, mostraram que a taxa fotossintética da microalga foi elevada (1,14 mgO₂ g_{biomassa}⁻¹ min⁻¹), assim como a taxa de respiração foi moderada.

Diante do apresentado foi possível constatar que os cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 e *Spirulina platensis* são resistentes ao absorvente químico monoetanolamina. Além disso, tanto o sistema com a microalga verde, como o biossistema com a cianobactéria, adicionado de monoetanolamina ou em escala piloto, respectivamente, configuraram promissores métodos para reduzir o aumento do efeito estufa e aquecimento global. Neste sentido, foram obtidas

fixação de carbono no meio, assim como em biomassa, em diferentes modos de cultivo e condições ambientais. Em alguns destes sistemas, também foram obtidos elevadas concentrações e produtividades de macromoléculas com potencial aplicação em biocombustíveis, em especial a partir de lipídios.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a tolerância e fixação de CO₂ por microalgas com diferentes tipos e concentrações de absorventes químicos;
- Desenvolver método capaz de quantificar compostos como a monoetanolamina adicionados em meio de cultivo de microalgas;
- Estudar a utilização e/ou consumo de absorventes químicos como fonte de nutrientes para microalgas;
- 4. Desenvolver configuração de biorreator que aumente a retenção do CO₂ no cultivo;
- Levar a escala piloto e industrial o sistema integrado de fixação química e biológica de CO₂;
- 6. Produzir biocombustíveis a partir de biomassa gerada no sistema integrado mencionado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIÉN, F. G.; FERNÁNDEZ, J. M.; MAGÁN, J. J.; MOLINA, E. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1344–1353, 2012.

ACIÉN, F. G.; MOLINA, E.; REIS, A.; TORZILLO, G.; ZITTELLI, G. C.; SEPÚLVEDA, C.; MASOJÍDEK, J. Photobioreactors for the production of microalgae. In: GONZALEZ-FERNANDEZ, C.; MUÑOZ, R. (Ed.). Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts - From Feedstock Cultivation to End-Products. 1. ed. Cambridge: Elsevier, 2017. p. 1–44.

ALAVA, D. de; MELLO, P. C. de; 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, n. 5, p. 447–450, 1997.

ALSHEHRY, A. S.; BELLOUMI, M. Energy consumption, carbon dioxide emissions and economic growth: The case of Saudi Arabia. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 237–247, 2015.

AL-ZUHAIR, S.; ALKETBI, S.; AL-MARZOUQI, M. Regenerating Diethanolamine Aqueous solution for CO₂ absorption using microalgae. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 105–108, 2016.

ANDERSEN, R. A. The Microalgal Cell. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). Handbook of Microalgal Culture. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 1–20.

ANDRADE, G. A. de; PAGANO, D. J.; GUZMAN, J. L.; BERENGUEL, M.; FERNANDEZ, I.; ACIEN, F. G. Distributed Sliding Mode Control of pH in Tubular Photobioreactors. **IEEE Transactions on Control Systems Technology**, v. 24, n. 4, p. 1160– 1173, 2016b.

ANDRADE, G. A.; BERENGUEL, M.; GUZMÁN, J. L.; PAGANO, D. J.; ACIÉN, F. G. Optimization of biomass production in outdoor tubular photobioreactors. **Journal of Process Control**, v. 37, p. 58–69, 2016a.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga Spirulina platensis using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, v. 264, n. 1–4, p. 130–134, 2007.

ANVISA. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Novos ingredientes aprovados. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/. Acesso em: 17 jan. 2018.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 17° ed., 2000.

APHA. American Public Health Association (APHA). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. Washington DC., 1998.

BABUSKIN, S.; KRISHNAN, K. R.; BABU, P. A. S.; SIVARAJAN, M.; SUKUMAR, M. Functional foods enriched with marine microalga *Nannochloropsis oculata* as a source of w-3 fatty acids. **Food Technology and Biotechnology**, v. 52, n. 3, p. 292–299, 2014.

BADGER, M. R.; VON CAEMMERER, S.; RUUSKA, S.; NAKANO, H. Electron flow to

oxygen in higher plants and algae: rates and control of direct photoreduction (Mehler reaction) and rubisco oxygenase. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 355, n. 1402, p. 1433–1446, 2000.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals. Michigan: McGraw-Hill, 1986.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. Boca Raton: CRC Press - Taylor & Francis Group, 2006.

BASU, S.; ROY, A. S.; MOHANTY, K.; GHOSHAL, A. K. CO₂ biofixation and carbonic anhydrase activity in Scenedesmus obliquus SA1 cultivated in large scale open system. **Bioresource Technology**, v. 164, p. 323–330, 2014.

BAUER, L. M.; COSTA, J. A. V.; DA ROSA, A. P. C.; SANTOS, L. O. Growth stimulation and synthesis of lipids, pigments and antioxidants with magnetic fields in *Chlorella kessleri* cultivations. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1425–1432, 2017.

BELAY, A. *Spirulina platensis (Arthrospira*): production and quality assurance. In: GERSHWIN, M.; BELAY, A. (Ed.). **Spirulina in Human Nutrition and Health**. New York: CRC Press, 2008. p. 2–23.

BENEMANN, J. R. Utilization of carbon dioxide from fossil fuel-burning power plants with biological systems. **Energy Conversion and Management**, v. 34, n. 9–11, p. 999–1004, 1993.

BILANOVIC, D.; HOLLAND, M.; ARMON, R. Microalgal CO₂ sequestering - Modeling microalgae production costs. **Energy Conversion and Management**, v. 58, n. 2012, p. 104–109, 2012.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. Journal of Biotechnology, v. 70, n. 1–3, p. 313–321, 1999.

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, n. 2, p. 557–577, 2010.

BROWN, P.; BROOMFIELD M; BUYS G; CARDENAS, L.; KILROY E; MACCARTHY J; MURRELLS T; PANG Y; PASSANT N; RAMIREZ GARCIA J; THISTLETHWAITE G; WEBB N. UK Greenhouse Gas Inventory, 1990 to 2014. Annual Report for Submission under the Framework Convention on Climate ChangeScience Research Programme of the Department of Energy and Climate Change.

BRUNE, D. E.; NOVAK, J. T. The use of carbonate equilibrium chemistry in quantifying algal carbon uptake kinetics. **European Journal of Applied Microbiology Biotechnology**, v. 13, p. 71–76, 1981.

CAMACHO-RODRÍGUEZ, J.; CERÓN-GARCÍA, M. C.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C. V.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; CONTRERAS-GÓMEZ, A.; MOLINA-GRIMA, E. A lowcost culture medium for the production of *Nannochloropsis gaditana* biomass optimized for aquaculture. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 57–66, 2013. CARVALHO, A. P.; PONTES, I.; GASPAR, H.; MALCATA, F. X. Metabolic relationships between macro- and micronutrients, and the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid contents of *Pavlova lutheri*. Enzyme and Microbial Technology, v. 38, n. 3–4, p. 358–366, 2006.

CAVINATO, C.; UGURLU, A.; DE GODOS, I.; KENDIR, E.; GONZALEZ-FERNANDEZ, C. Biogas production from microalgae BT - Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts. In: GONZALEZ-FERNANDEZ, C.; MUÑOZ, R. (Ed.). Woodhead Publishing Series in Energy. Cambridge: Woodhead Publishing - Elsevier Ltd., 2017. p. 155–182.

CHANG, Y.-M.; TSAI, W.-T.; LI, M.-H. Characterization of activated carbon prepared from *Chlorella*-based algal residue. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 344–348, 2015.

CHANG, Y.-M.; TSAI, W.-T.; LI, M.-H. Characterization of activated carbon prepared from *Chlorella*-based algal residue. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 344–348, 2015.

CHEAH, W. Y.; LING, T. C.; JUAN, J. C.; SHOW, P. L. Biorefineries of carbon dioxide: From carbon capture and storage (CCS) to bioenergies production. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 346–356, 2016.

CHEAH, W. Y.; SHOW, P. L.; CHANG, J.-S.; LING, T. C.; JUAN, J. C. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 190–201, 2015.

CHEAH, W. Y.; SHOW, P. L.; CHANG, J.-S.; LING, T. C.; JUAN, J. C. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 190–201, 2015.

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

CHEN, J,;WANG, Y,; BENEMANN, J. R.; ZHANG, X.; HU, H.; QIN, S. Microalgal industry in China: challenges and prospects. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, p. 715-725, 2016.

CHEN, M.; TANG, H.; MA, H.; HOLLAND, T. C.; NG, K. Y. S.; SALLEY, S. O. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1649–1655, 2011.

CHINNASAMY, S.; RAMAKRISHNAN, B.; BHATNAGAR, A.; DAS, K. C. Biomass Production Potential of a Wastewater Alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under Elevated Levels of CO₂ and Temperature. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 2, p. 518– 532, 2009.

CHISTI, Y. Raceways-based Production of Algal Crude Oil. **Green**, v. 3, n. 3–4, p. 195–216, 2013.

CHISTI, Y.; YUSUF, C.; CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007.

CHO, Y.; LEE, J.-Y.; BOKARE, A. D. KWON, S.-B.; PARK, D.-S. JUNG, W.-S.; CHOI, J.-

S.; YANG, Y.-M.; LEE, J.-Y.; CHOI, W. LiOH-embedded zeolite for carbon dioxide capture under ambient conditions. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, v. 22, p. 350-356, 2015.

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

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; FILHO, P. D.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 603–607, 2002.

COSTA, J. A. V.; HENRARD, A. S. A.; MORAES, L.; MORAIS, E. G.; GONÇALVES, I. S.; MORAIS, M. G. Use of Flue Gas as Carbon Source. In: PIRES, J. C. M. (Ed.). Use of Flue Gas as Carbon Source. Sharjah: Bentham Science Publishers, 2017b. p. 173–201.

COSTA, J. A. V.; MORAES, L.; MOREIRA, J. B.; ROSA, G. M. da; HENRARD, A. S. A.; MORAIS, M. G.; DE MORAIS, M. G. Microalgae-Based Biorefineries as a Promising Approach to Biofuel Production. In: B., T.; D., K. (Ed.). **Prospects and Challenges in Algal Biotechnology**. Singapore: Springer Singapore, 2017. p. 113–140.

COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. de; RADMANN, E. M.; SANTANA, F. B.; SOUZA, M. da R. A. Z. de; HENRARD, A. A.; ROSA, A. P. C. da; BRUSCH, L. Biofixation of carbon dioxide from coal station flue gas using *Spirulina* sp. LEB 18 and *Scenedesmus obliquus* LEB 22. African Journal of Microbiology Research, v. 9, n. 44, p. 2202–2208, 2015.

COSTACHE, T. A.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; MORALES, M. M.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; STAMATIN, I.; MOLINA, E. Comprehensive model of microalgae photosynthesis rate as a function of culture conditions in photobioreactors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 17, p. 7627–7637, 2013.

CRAGGS, R.; SUTHERLAND, D.; CAMPBELL, H. Hectare-scale demonstration of high rate algal ponds for enhanced wastewater treatment and biofuel production. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 3, p. 329–337, 2012.

DEAMICI, K. M.; CARDIAS, B. B.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, L. O. Static magnetic fields in culture of *Chlorella fusca*: Bioeffects on growth and biomass composition. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 7, p. 912–916, 2016.

DEAMICI, K. M.; CARDIAS, B. B.; COSTA, J. A. V.; SANTOS, L. O. Static magnetic fields in culture of *Chlorella fusca*: Bioeffects on growth and biomass composition. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 7, p. 912–916, 2016.

DEAMICI, K. M.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A. V. Magnetic field action on outdoor and indoor cultures of *Spirulina* : Evaluation of growth, medium consumption and protein profile. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 168–174, 2018.

DEMIRBAS, A. Use of algae as biofuel sources. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 12, p. 2738–2749, 2010.

DICKINSON, S.; MIENTUS, M.; FREY, D.; AMINI-HAJIBASHI, A.; OZTURK, S.; SHAIKH, F.; SENGUPTA, D.; EL-HALWAGI, M. M. A review of biodiesel production

from microalgae. Clean Technologies and Environmental Policy, v. 19, n. 3, p. 637–668, 2017.

DLUGOKENCKY, E.; TANS, P. **Recent Global CO₂ - NOAA/ESRL**. Disponível em: <www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>. Acesso em: 15 jan. 2018.

DONG, L.; CHEN, J.; GAO, G. Solubility of Carbon Dioxide in Aqueous Solutions of 3-Amino-1-propanol. Journal of Chemical & Engineering Data, v. 55, n. 2, p. 1030–1034, 11 2010.

DONG, T.; KNOSHAUG, E. P.; DAVIS, R.; LAURENS, L. M. L.; VAN WYCHEN, S.; PIENKOS, P. T.; NAGLE, N. Combined algal processing: A novel integrated biorefinery process to produce algal biofuels and bioproducts. **Algal Research**, v. 19, p. 316–323, 2016.

DROOP, M. R. SOME THOUGHTS ON NUTRIENT LIMITATION IN ALGAE. Journal of Phycology, v. 9, n. 3, p. 264–272, 1973.

DUARTE, J. H.; COSTA, J. A. V. *Synechococcus nidulans* from a thermoelectric coal power plant as a potential CO₂ mitigation in culture medium containing flue gas wastes. **Bioresource Technology**, v. 241, p. 21–24, 2017.

DUARTE, J. H.; FANKA, L. S.; COSTA, J. A. V. Utilization of simulated flue gas containing CO₂, SO₂, NO and ash for *Chlorella fusca* cultivation. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 159–165, 2016.

DUARTE, J. H.; MORAIS, E. G. de; RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Biological CO₂ mitigation from coal power plant by *Chlorella* fusca and *Spirulina* sp. **Bioresource Technology**, v. 234, p. 472–475, 2017.

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

EBRAHIMIAN, A.; KARIMINIA, H. R.; VOSOUGHI, M. Lipid production in mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* in a mixture of primary and secondary municipal wastewater. **Renewable Energy**, v. 71, p. 502–508, 2014.

EIA, 2016. International Energy Outlook 2016. U.S. Energy Information Administration. Disponível em: www.eia.gov/outlooks/aeo/pdf/0383(2016).pdf. Acessado em: 18 de novembro de 2017.

EIA, 2017. International Energy Outlook 2017. Disponível em: www.eia.gov/outlooks/ieo/pdf/0484(2017).pdf. Acessado em: 18 novembro de 2017.

EIA. International Energy Outlook 2017International Energy Outlook, 2017. . Disponível em: <www.eia.gov/outlooks/ieo>.

FAO; IFAD; UNICEF; WFP; WHO. The State of Food Security and Nutrition in the World 2017. Building resilience for peace and food security. 2017.

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.

FREDRIKSEN, S. B.; JENS, K.-J. Oxidative Degradation of Aqueous Amine Solutions of MEA, AMP, MDEA, Pz: A Review. **Energy Procedia**, v. 37, n. 1876, p. 1770–1777, 2013.

GERSHWIN, M. E.; BELAY, A. *Spirulina* in Human Nutrition and Health. New York: CRC Press, 2008.

GIORDANO, M.; BEARDALL, J.; RAVEN, J. A. CO₂ CONCENTRATING MECHANISMS IN ALGAE: Mechanisms, Environmental Modulation, and Evolution. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, n. 1, p. 99–131, 2005.

GÓMEZ-SERRANO, C.; MORALES-AMARAL, M. M.; ACIÉN, F. G.; ESCUDERO, R.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; MOLINA-GRIMA, E. Utilization of secondary-treated wastewater for the production of freshwater microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 16, p. 6931–6944, 2015.

GONÇALVES, A. L.; SIMÕES, M.; PIRES, J. C. M. The effect of light supply on microalgal growth, CO₂ uptake and nutrient removal from wastewater. **Energy Conversion and Management**, v. 85, p. 530–536, 2014.

GROBBELAAR, J. U. Inorganic Algal Nutrition. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). Handbook of Microalgal Culture. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 123–133.

GUSCHINA, I. A.; HARWOOD, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. **Progress in Lipid Research**, v. 45, n. 2, p. 160–186, 2006.

HAGEMANN, N.; SUBDIAGA, E.; ORSETTI, S.; DE LA ROSA, J. M.; KNICKER, H.; SCHMIDT, H. P.; KAPPLER, A.; BEHRENS, S. Effect of biochar amendment on compost organic matter composition following aerobic compositing of manure. **Science of the Total Environment**, v. 613–614, p. 20–29, 2018.

HEDIN, N.; CHEN, L.; LAAKSONEN, A. Sorbents for CO₂ capture from flue gas—aspects from materials and theoretical chemistry. **Nanoscale**, v. 2, n. 10, p. 1819, 2010.

HEIFETZ, P. B.; FÖRSTER, B.; OSMOND, C. B.; GILES, L. J.; BOYNTON, J. E. Effects of Acetate on Facultative Autotrophy in Chlamydomonas reinhardtii Assessed by Photosynthetic Measurements and Stable Isotope Analyses. **Plant Physiology**, v. 122, n. 4, p. 1439–1446 2000.

HENRARD, A. A.; ROSA, G. M.; MORAES, L.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Effect of the Carbon Concentration, Blend Concentration, and Renewal Rate in the Growth Kinetic of *Chlorella* sp. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

HERNÁNDEZ, D.; SOLANA, M.; RIAÑO, B.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. C.; BERTUCCO, A. Biofuels from microalgae: Lipid extraction and methane production from the residual biomass in a biorefinery approach. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 370–378, 2014.

HO, M. T.; ALLINSON, G. W.; WILEY, D. E. Factors affecting the cost of capture for Australian lignite coal fired power plants. **Energy Procedia**, v. 1, n. 1, p. 763–770, 2009.

HO, S.; LU, W.; CHANG, J. 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.

HOLLAND, D. L.; GABBOTT, P. a. A Micro-Analytical Scheme for the Determination of Protein, Carbohydrate, Lipid and RNA Levels in Marine Invertebrate Larvae. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, v. 51, n. 3, p. 659, 1971.

HU, Q. Environmental Effects on Cell Composition. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 114–122.

HÜSER, N.; SCHMITZ, O.; KENIG, E. Y. A comparative study of different amine-based solvents for CO₂-capture using the rate-based approach. **Chemical Engineering Science**, v. 157, p. 221–231, 2017.

IEA. **Key world Energy Statistics**, 2017. . Disponível em: https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/KeyWorld2017.pdf>.

IPCC. Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC, Pachauri, R.K e Reisinger, A (Ed.). Genebra, Suíça, 104 pp, 2007

IPCC. Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Genebra, Suíça: Cambridge University Press, 2014.

IPCC. **Summary for Policymakers**. Clima Change 2013. STOCKER, T. F.;QIN, D., *et al.* Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA: Cambridge University Press, 2013. 27 p.

IPPOLITI, D.; GONZÁLEZ, A.; MARTÍN, I.; SEVILLA, J. M. F.; PISTOCCHI, R.; ACIÉN, F. G. Outdoor production of *Tisochrysis lutea* in pilot-scale tubular photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 6, p. 3159–3166, 2016.

JANG, E.; CHOI, S. W.; HONG, S. M.; SHIN, S.; LEE, K. B. Development of a costeffective CO₂ adsorbent from petroleum coke via KOH activation. **Applied Surface Science**, v. 429, p. 62–71, 2018.

JEREZ, C. G.; MALAPASCUA, J. R.; SERGEJEVOVÁ, M.; FIGUEROA, F. L.; MASOJÍDEK, J. Effect of Nutrient Starvation under High Irradiance on Lipid and Starch Accumulation in *Chlorella fusca* (Chlorophyta). **Marine Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 24–36, 2016.

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

KOYTSOUMPA, E. I.; BERGINS, C.; KAKARAS, E. The CO₂ economy: Review of CO₂ capture and reuse technologies. **Journal of Supercritical Fluids**, 2017.

LAM, M. K.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Current status and challenges on microalgae-

based carbon capture. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 10, p. 456–469, 2012.

LEE, R. E. Basic characteristics of the algae. In: LEE, R. E. (Ed.). **Phycology**. 4. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2008. p. 3–30.

LEE, R. E. Phycology. 2. ed. Cambridge, New York: Cambridge University Press, 1989.

LEE, Y.-K. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, n. 4, p. 307–315, 2001.

LEE, Y.-K.; CHEN, W.; SHEN, H.; HAN, D.; LI, Y.; JONES, H. D. T.; TIMLIN, J. A.; HU, Q. Basic Culturing and Analytical Measurement Techniques. In: **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 37–68.

LEUNG, D. Y. C.; CARAMANNA, G.; MAROTO-VALER, M. M. An overview of current status of carbon dioxide capture and storage technologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 39, p. 426–443, 2014.

LI, F. S.; LABRECHE, Y.; LIVELY, R. P.; LEE, J. S.; JONES, C. W.; KOROS, W. J. Poly(ethyleneimine) infused and functionalized Torlon®-silica hollow fiber sorbents for post-combustion CO₂ capture. **Polymer**, v. 55, n. 6, p. 1341–1346, 2014.

LI, H.; TAN, Y.; DITARANTO, M.; YAN, J.; YU, Z. Capturing CO₂ from Biogas Plants. **Energy Procedia**, v. 114, p. 6030–6035, 2017.

LING, X.; GUO, J.; LIU, X.; ZHANG, X.; WANG, N.; LU, Y.; NG, I.-S. Impact of carbon and nitrogen feeding strategy on high production of biomass and docosahexaenoic acid (DHA) by *Schizochytrium* sp. LU310. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 139–147, 2015.

LIU, J.; HU, Q. Chlorella : Industrial Production of Cell Mass and Chemicals. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 327–338.

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, n. 1, p. 265–275, 1951.

LUCAS, B. F.; MORAIS, M. G. de; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. Effect of *Spirulina* addition on the physicochemical and structural properties of extruded snacks. **Food Science and Technology**, v. 37, p. 16–23, 2017.

LUCAS, B. F.; MORAIS, M. G. de; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* for snack enrichment: Nutritional, physical and sensory evaluations. **LWT**, v. 90, n. August 2017, p. 270–276, 2018.

LUIS, P. Use of monoethanolamine (MEA) for CO₂ capture in a global scenario: Consequences and alternatives. **Desalination**, v. 380, p. 93–99, 2016.

MA, B. L.; HERATH, A. W. Timing and rates of nitrogen fertiliser application on seed yield, quality and nitrogen-use efficiency of canola. **Crop and Pasture Science**, v. 67, n. 2, p. 167–180, 2016.

MARGARITES, A. C. F.; COSTA, J. A. V. Increment of carbohydrate concentration of *Chlorella minutissima* microalgae for bioethanol production. Journal of Engineering Research and Applications www.ijera.com ISSN, v. 4, n. 3, p. 2248–962280, 2014.

MARKOU, G. Fed-batch cultivation of *Arthrospira* and *Chlorella* in ammonia-rich wastewater: Optimization of nutrient removal and biomass production. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 35–41, 2015.

MARSH, J. B.; WEINSTEIN, D. B. Simple charring method for determination of lipids. **Journal of lipid research**, v. 7, n. 4, p. 574–576, 1966.

MASOJÍDEK, J.; TORZILLO, G.; KOBLÍŽEK, M. Photosynthesis in Microalgae. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 21–36.

McCONNAUGHEY, T. Acid secretion, calcification, and photosynthetic carbon concentrating mechanisms. **Canadian Journal of Botany**, v. 76, p. 1119-1126, 1998.

MELDON, J. H.; MORALES-CABRERA, M. A. Analysis of carbon dioxide absorption in and stripping from aqueous monoethanolamine. **Chemical Engineering Journal**, v. 171, n. 3, p. 753–759, 2011.

MEMARDOOST, S.; HASHEMI AMREI, S. M. H.; MOLAEI DEHKORDI, A. Modelling and simulation of carbon dioxide absorption by aqueous MEA solution in hollow fibre membrane contactors. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 92, n. 10, p. 1725–1738, 2014.

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

MORAES, L.; ROSA, G. M.; CARDIAS, B. B.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A. V. Microalgal biotechnology for greenhouse gas control: Carbon dioxide fixation by *Spirulina* sp. at different diffusers. **Ecological Engineering**, v. 91, p. 426–431, 2016.

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, n. 3, p. 439–445, 2007a.

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, n. 9, p. 1349–1352, 2007c.

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, n. 7, 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 fur Naturforschung. C, Journal of biosciences**, v. 63, n. 1–2, p. 144–50, 2008.

MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M. E. M.; COSTA, J. A. V. V. Biofixation of CO2 from

synthetic combustion gas using cultivated microalgae in three-stage serial tubular photobioreactors. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 66, n. 5–6, p. 313–318, 2011.

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, n. 1–2, p. 60–64, 2009.

MOREIRA, J. B.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Evaluation of different modes of operation for the production of *Spirulina* sp. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, 2016.

MOREIRA, J. B.; TERRA, A. L. M.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. UTILIZATION OF CO₂ in semi-continuous cultivation of *Spirulina* sp. and *Chlorella fusca* and evaluation of biomass composition. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, n. 3, p. 691–698, 2016.

NAPP, T. A.; GAMBHIR, A.; HILLS, T. P.; FLORIN, N.; FENNELL, P. . A review of the technologies, economics and policy instruments for decarbonising energy-intensive manufacturing industries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 30, p. 616–640, 2014.

NASCIMENTO, I. A.; CABANELAS, I. T. D.; SANTOS, J. N. dos; NASCIMENTO, M. A.; SOUSA, L.; SANSONE, G. Biodiesel yields and fuel quality as criteria for algal-feedstock selection: Effects of CO₂-supplementation and nutrient levels in cultures. **Algal Research**, v. 8, p. 53–60, 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: ARTMED EDITORA LTDA., 2014.

NORSKER, N.-H.; BARBOSA, M. J.; VERMUË, M. H.; WIJFFELS, R. H. Microalgal production — A close look at the economics. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 1, p. 24–27, 2011.

PAWLOWSKI, A.; GUZMÁN, J. L.; BERENGUEL, M.; ACIÉN, F. G.; DORMIDO, S. Event-Based Control Systems for Microalgae Culture in Industrial Reactors. In: TRIPATHI, B. N.; KUMAR, D. (Ed.). **Prospects and Challenges in Algal Biotechnology**. Singapore: Springer Singapore, 2017. p. 1–48.

PENG, L.; LAN, C. Q.; ZHANG, Z. Evolution, detrimental effects, and removal of oxygen in microalga cultures: A review. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 32, n. 4, p. 982–988, 2013.

PENG, Y.; ZHAO, B.; LI, L. Advance in Post-Combustion CO₂ Capture with Alkaline Solution: A Brief Review Yuanchang. **Energy Procedia**, v. 14, n. 2011, p. 1516–1522, 2012.

PERIN, G.; SIMIONATO, D.; BELLAN, A.; CARONE, M.; OCCHIPINTI, A.; MAFFEI, M. E.; MOROSINOTTO, T. Cultivation in industrially relevant conditions has a strong influence on biological properties and performances of *Nannochloropsis gaditana* genetically modified strains. **Algal Research**, v. 28, n. November, p. 88–99, 2017.

PERRY, R. H.; GREEN, D. W. Perry's Chemical Engineers' Handbook. 2008.

POSTEN, C.; WALTER, C. Microalgal Biotechnology: Potential and Production. 2012

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. Journal of Algal Biomass Utilization, v. 3, n. 4, p. 89–100, 2012.

PULZ, O.; BRONESKE, J.; WALDECK, P. IGV GmbH Experience Report, Industrial Production of Microalgae Under Controlled Conditions: Innovative Prospects. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 445–460.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 65, n. 6, p. 635–648, 2004.

RADMANN, E. M.; CAMERINI, F. V.; SANTOS, T. D.; COSTA, J. A. V. Isolation and application of SO_X and NO_X resistant microalgae in biofixation of CO_2 from thermoelectricity plants. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 10, p. 3132–3136, 2011.

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

REIS, R. A.; PEREIRA, J. H. C.; CAMPOS, A. C. C.; BARBOZA, E. M.; DELPECH, M. C.; CESAR, D. V.; DAHMOUCHE, K.; BANDEIRA, C. F. Waterborne poly(urethane-urea) gas permeation membranes for CO₂ /CH₄ separation. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 11, p. 46003, 2018.

RICHMOND, A.; HU, Q. Handbook of Microalgal Culture. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013.

RINANTI, A. Biotechnology Carbon Capture and Storage by Microalgae to Enhance CO₂ Removal Efficiency in Closed- System Photobioreactor. In: THAJUDDIN, N.; DHANASEKARAN, D. (Ed.). **Algae - Organisms for Imminent Biotechnology**. [s.l.] InTech, 2016. p. 133–156.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1–61, 1979.

ROCHELLE, G. T. Thermal degradation of amines for CO₂ capture. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 1, n. 2, p. 183–190, 2012.

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, n. 8–9, p. 3071–3073, 2011.

ROSA, A. P. C.; SANTOS, T. D.; RADMANN, E. M.; SANTANA, F. B.; COSTA, J. A. V. Production of *Spirulina* in semicontinuous cultivation using medium recycle. **IJERA**, v. 5, n. 4, p. 36–42, 2015a.

ROSA, G. M.; MORAES, L.; CARDIAS, B. B.; SOUZA, M. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. Chemical absorption and CO₂ biofixation via the cultivation of *Spirulina* in semicontinuous mode with nutrient recycle. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 321–327, 2015.

ROSA, G. M.; MORAES, L.; SOUZA, M. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* cultivation with a CO₂ absorbent: Influence on growth parameters and macromolecule production. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 528–534, 2016.

RUBIO, F. C.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; SÁNCHEZ PÉREZ, J. a.; GARCÍA CAMACHO, F.; MOLINA GRIMA, E. Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, n. 1, p. 71–86, 1999.

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

SÁNCHEZ, J. F.; FERNÁNDEZ, J. M.; ACIÉN, F. G.; RUEDA, A.; PÉREZ-PARRA, J.; MOLINA, E. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 398–405, 2008.

SANTOS, T. D. ENGENHARIA DE MICROALGAS NA FIXAÇÃO DE CO₂ EM DIFERENTES BIORREATORES. 2015. Universidade Federal do Rio Grande, 2015.

SANTOS, T. D.; FREITAS, B. C. B.; MOREIRA, J. B.; ZANFONATO, K.; COSTA, J. A. V. Development of powdered food with the addition of Spirulina for food supplementation of the elderly population. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 37, p. 216–220, 2016.

SANTOS, T. D.; MENDOZA-MARTÍN, J. L.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; MOLINA, E. M.; COSTA, J. A. V.; HEAVEN, S. Optimization of carbon dioxide supply in raceway reactors: Influence of carbon dioxide molar fraction and gas flow rate. **Bioresource Technology**, v. 212, p. 72–81, 2016b.

SIAUT, M.; CUINÉ, S.; CAGNON, C.; FESSLER, B.; NGUYEN, M.; CARRIER, P.; BEYLY, A.; BEISSON, F.; TRIANTAPHYLIDÈS, C.; LI-BEISSON, Y.; PELTIER, G. Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii* : characterization , variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. **BMC Biotechnology**, v. 11, n. 7, p. 1–15, 2011.

SKJÅNES, K.; LINDBLAD, P.; MULLER, J. BioCO₂ – A multidisciplinary, biological approach using solar energy to capture CO₂ while producing H₂ and high value products. **Biomolecular Engineering**, v. 24, n. 4, p. 405–413, 2007.

SLEGERS, P. M.; VAN BEVEREN, P. J. M.; WIJFFELS, R. H.; VAN STRATEN, G.; VAN BOXTEL, A. J. B. Scenario analysis of large scale algae production in tubular photobioreactors. **Applied Energy**, v. 105, p. 395–406, 2013.

SOUNDARAPANDIAN, P.; VASANTHI, B. Effects of chemical parameters on spirulina platensis biomass production: Optimized method for phycocyanin extraction. **International Journal of Zoological Research**, v. 6, n. 4, p. 293–303, 2010.

STEWART, C.; HESSAMI, M.-A. A study of methods of carbon dioxide capture and sequestration—the sustainability of a photosynthetic bioreactor approach. **Energy Conversion and Management**, v. 46, n. 3, p. 403–420, 2005.

SUN, Z.; ZHANG, D.; YAN, C.; CONG, W.; LU, Y. Promotion of microalgal biomass production and efficient use of CO₂ from flue gas by monoethanolamine. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 90, n. 4, p. 730–738, 2015.

SYDNEY, E. B.; STURM, W.; CARVALHO, J. C. de; THOMAZ-SOCCOL, V.; LARROCHE, C.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 5892–5896, 2010.

TANS, P.; KEELING, R. Recent Monthly Average Mauna Loa CO₂. Disponível em: <www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>. Acesso em: 20 nov. 2017.

TAVONI, M.; SOCOLOW, R. Modeling meets science and technology: An introduction to a special issue on negative emissions. **Climatic Change**, v. 118, n. 1, p. 1–14, 2013.

TEBBANI, S.; LOPES, F.; FILALI, R.; DUMUR, D.; PAREAU, D. **CO₂ Biofixation by Microalgae**. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2014.

THAUER, R. K. A Fifth Pathway of Carbon Fixation. **Science**, v. 318, n. 5857, p. 1732–1733, 2007.

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.

TUBIELLO, F. N.; SALVATORE, M.; FERRARA, A. F.; HOUSE, J.; FEDERICI, S.; ROSSI, S.; BIANCALANI, R.; CONDOR GOLEC, R. D.; JACOBS, H.; FLAMMINI, A.; PROSPERI, P.; CARDENAS-GALINDO, P.; SCHMIDHUBER, J.; SANZ SANCHEZ, M. J.; SRIVASTAVA, N.; SMITH, P. The Contribution of Agriculture, Forestry and other Land Use activities to Global Warming, 1990-2012. **Global Change Biology**, v. 21, n. 7, p. 2655– 2660, 2015.

UGWU, C. U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Influence of irradiance, dissolved oxygen concentration, and temperature on the growth of *Chlorella sorokiniana*. **Photosynthetica**, 2007.

VAIDYA, P. D.; KENIG, E. Y. CO₂-Alkanolamine Reaction Kinetics: A Review of Recent Studies. **Chemical Engineering & Technology**, v. 30, n. 11, p. 1467–1474,2007.

VAZ, B. S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. CO₂ Biofixation by the Cyanobacterium *Spirulina* sp. LEB 18 and the Green Alga *Chlorella fusca* LEB 111 Grown Using Gas Effluents and Solid Residues of Thermoelectric Origin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 2, p. 418–429, 2016.

VAZ, B. S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Use of solid waste from thermoelectric plants for the cultivation of microalgae. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59,p. 1–8, 2016a.

VOLOSHIN, R. A.; RODIONOVA, M. V.; ZHARMUKHAMEDOV, S. K.; NEJAT VEZIROGLU, T.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Review: Biofuel production from plant and algal biomass. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 39, p. 17257–17273, 2016.

VONSHAK, A. *Spirulina Platensis (Arthrospira*): Physiology, Cell-Biology And Biotechnology. Londres: Taylor & Francis, 1997.

WANG, B.; LI, Y.; WU, N.; LAN, C. Q. CO₂ bio-mitigation using microalgae. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 79, n. 5, p. 707–718, 2008.

WANG, Z. P.; ZHAO, Y. MORPHOLOGICAL REVERSION OF SPIRULINA (ARTHROSPIRA) PLATENSIS (CYANOPHYTA): FROM LINEAR TO HELICAL1. **Journal of Phycology**, v. 41, n. 3, p. 622–628, 2005.

WIJFFELS, R. H. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 26–31, 2008.

WOLLENBERG, E.; RICHARDS, M.; SMITH, P.; HAVLÍK, P.; OBERSTEINER, M.; TUBIELLO, F. N.; HEROLD, M. Reducing emissions from agriculture to meet the 2 °C target. **Global Change Biology**, v. 22, n. 12, p. 3859–3864, 2016.

ZAIDIZA, D. A.; BELAISSAOUI, B.; RODE, S.; FAVRE, E. Intensification potential of hollow fiber membrane contactors for CO₂ chemical absorption and stripping using monoethanolamine solutions. **Separation and Purification Technology**, v. 188, p. 38–51, 2017.

ZEMKE, P. E. Mass Cultivation of Phototrophic Microalgae. In: LIU, J.; SUN, Z.; GERKEN, H. (Ed.). **Recent Advances in Microalgal Biotechnology**. Foster City: OMICS Group eBooks, 2016. p. 147–162.

ZHAI, J.; LI, X.; LI, W.; RAHAMAN, M. H.; ZHAO, Y.; WEI, B.; WEI, H. Optimization of biomass production and nutrients removal by *Spirulina platensis* from municipal wastewater. **Ecological Engineering**, v. 108, p. 83–92, 2017.

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, n. 2, p. 97–101, 2002.

ZHANG, X.; SINGH, B.; HE, X.; GUNDERSEN, T.; DENG, L.; ZHANG, S. Postcombustion carbon capture technologies: Energetic analysis and life cycle assessment. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 27, p. 289–298, 2014.

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.

ZHENG, Q.; MARTIN, G. J. O. J. O.; WU, Y.; KENTISH, S. E. E. The use of monoethanolamine and potassium glycinate solvents for CO₂ delivery to microalgae through a polymeric membrane system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 128, p. 126–133, 2017.

ZITTELLI, G. C.; BIONDI, N.; RODOLFI, L.; TREDICI, M. R. Photobioreactors for Mass Production of Microalgae. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 225–266. ANEXOS

Figura A1 – Algas verdes *Chlorella fusca* LEB 111 (a) e *Chlorella* sp. observadas ao microscópio, com aumento de 400x

(a)



(b)



Figura A2 – Cultivos com *Chlorella fusca* LEB 111 (a) e *Chlorella* sp. para seleção das concentrações de MEA

(a)



(b)





Figura A3 – Cultivos descontínuos em duplicata de *Chlorella fusca* LEB 111 com adição de 50, 100 e 150 mg L⁻¹ de MEA, em fotobiorreatores tubulares verticais de 1,8 L

Figura A4 – Cultivos abióticos descontínuos (a) e com *Chlorella fusca* LEB 111 em batelada alimentada (CO₂ + MEA), controle negativo e controle com CO₂ (b), em fotobiorreatores tubulares verticais de 1,8 L



(a)

(b)





Figura A5 – Cultivos semicontínuo de C. fusca LEB 111
Figura A6 – Cianobactéria *Spirulina platensis* observada ao microscópio com aumento de 100x



Figura A7 – Cultivo de Spirulina platensis no biorreator Raceway de 14 m³



Número	Nomenclatura	Fórmula Química	Concentração (g L ⁻¹)
1	Nitrato de sódio	NaNO ₃	1,5
2	Fosfato de potássio dibásico trihidratado	K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,040
3	Sulfato de magnésio heptahidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075
4	Cloreto de cálcio bihidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,036
5	Citrato férrico amoniacal	C ₆ H ₁₁ FeNO ₇	0,006
6	EDTA dissódico	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8.2H_2O$	0,001
7	Carbonato de sódio	Na ₂ CO ₃	0,020
8	Ácido cítrico	$C_6H_8O_7$	0,006
A5+Co	Solução traço+cobalto	*	1 mL L ⁻¹

Tabela A1 - Concentração dos componentes do meio de cultura BG-11.

*Solução A5+Co (g.L⁻¹): H₃BO₃ (2,86), MnCl₂.4H₂O (1,81), ZnSO₄.7H₂O (0,222), NaMoO₄ (0,015), CuSO₄. 5H₂O (0,079), Co(NO₃).6H₂O (0,0494).

Fonte: RIPPKA et al. (1979)

Principais componentes		g L-1
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio	2,8 a 8,3
NaNO ₃	Nitrato de sódio	0,80
KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potássio	0,25
$MgSO_4$	Sulfato de magnésio	0,30
Oligoelen	mg L ⁻¹	
В	Boro	0,23
Cu	Cobre	0,09
Fe	Ferro	2,10
Mn	Manganês	1,17
Мо	Molibdênio	0,07
Zn	Zinco	0,35

 Tabela A2 - Meio de cultivo utilizado no Artigo 4, a partir de fertilizantes agrícolas

Fonte – Camacho-Rodríguez et al. (2013)