



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

PRODUÇÃO DE MACROMOLÉCULAS NO CULTIVO DE *Spirulina* E *Chlorella* COM
CO₂, CINZAS E REDUÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO

Vagner da Silva Braga

Prof^a. Dr^a. Michele Greque de Moraes
Orientadora

Rio Grande, RS
2018

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

PRODUÇÃO DE MACROMOLÉCULAS NO CULTIVO DE *Spirulina* E *Chlorella* COM
CO₂, CINZAS E REDUÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO

Vagner da Silva Braga

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

Prof^ª. Dr^ª. Michele Greque de Moraes
Orientadora

Rio Grande, RS

2018

Ficha catalográfica

B813p Braga, Vagner da Silva.
Produção de macromoléculas no cultivo de *Spirulina* e *Chlorella*
com CO₂, cinzas e redução da fonte de nitrogênio / Vagner da Silva
Braga. – 2018.
137 p.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos,
Rio Grande/RS, 2018.

Orientadora: Dra. Michele Greque de Moraes.

1. Bioetanol 2. Carboidratos 3. Dióxido de carbono 4. Nutrientes
5. Microalgas I. Moraes, Michele Greque de II. Título.

CDU 664

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Vagner da Silva Braga e aprovada em 01 de fevereiro de 2018, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

Michele Morais

Profa. Dra. Michele Greque de Morais - FURG

Luciane Maria Colla

Profa. Dra. Luciane Maria Colla - UPF

Michele Da Rosa Andrade Zimmermann de Souza

Profa. Dra. Michele Da Rosa Andrade Zimmermann de Souza - FURG

Bárbara de Freitas

Dra. Bárbara Catarina Bastos de Freitas - FURG

Aos meus pais, Iloni e Donário (*in memoriam*)
À minha irmã, Carem Eluza
Ao meu sobrinho, Davy
À minha amada, Gisele

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem Ele não teria traçado o meu caminho na Engenharia.

Aos meus pais, Iloni e Donário, que ao longo dessa caminhada sempre me apoiaram. Infelizmente, nunca mais ouvirei de meu pai comentários de reconhecimento do meu esforço. Mas pai, você me deixou uma grande herança: o teu caráter, e é isso que guardarei para sempre. Obrigado pelos ensinamentos, exemplos de conduta, amor para com o próximo, inspiração... enfim não há palavras para te agradecer! Saudade eterna...

À minha irmã, Carem Eluza, pelo seu caráter, humildade e amor que sentimos um pelo outro. Ao meu sobrinho e afilhado, Davy, por sempre me proporcionar momentos de descontração e alegrias.

À Gisele, por me incentivar a fazer mestrado. Te agradeço pelo companheirismo, amor, confiança e, principalmente, dedicação pelas inúmeras horas disponibilizadas para me ajudar na correção deste trabalho. Sem a tua ajuda, eu não teria conseguido cumprir os prazos estipulados. Te amo!

À minha orientadora, prof. Michele Morais, pela orientação com inúmeras dicas e questionamentos que fortaleceram a parte experimental e escrita deste trabalho. Agradeço pela confiança e por estar sempre disponível para ajudar, seja no âmbito acadêmico, seja no âmbito pessoal. Obrigado por me orientar todos esses anos, você foi (e continua sendo) muito importante na minha formação.

Ao prof. Jorge Alberto Vieira Costa, por disponibilizar toda a infraestrutura do LEB e por estar sempre disposto a auxiliar na compra de materiais para condução deste trabalho.

À Luana Marques, minha IC, pelas longas jornadas de trabalho, disponibilidade incondicional e amizade que construímos nestes últimos meses de trabalho.

À Duna Mastrantonio, minha IC, por me acompanhar sempre com paciência nas longas, cansativas e sofridas metanólises, que na maioria das vezes eram frustrantes. Podemos não ter conseguido mostrar conteúdo de PHB significativo, mas conseguimos outros resultados muito bons.

À Jessica Cardoso, minha primeira IC, pela ajuda nos primeiros experimentos. Apesar de muitas vezes ter aprendido as coisas junto com você, espero ter contribuído de alguma forma na tua formação profissional.

À Jéssica Duarte, pela amizade, empenho e profissionalismo ao explicar todas as minhas dúvidas, mesmo as mais óbvias. Você foi essencial para condução de todos os meus experimentos. Obrigado por sempre me passar segurança, você é um exemplo a ser seguido.

À Juliana Moreira, pela amizade, brincadeiras e, principalmente, por me mostrar estatisticamente que os meus resultados eram representativos e que eu tinha condições de escrever uma dissertação. Graças a você, eu perdi o medo de mostrar e tratar os resultados.

À Roberta Kosinski, que com um carisma imensurável contagia o ambiente por onde passa. Obrigado pela amizade, palavras de apoio e, principalmente, por me ajudar sempre quando tinha tempo livre.

Aos demais colegas do MIBI e LEB, que de certa forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

À FURG, por disponibilizar moradia, excelente infraestrutura, bibliotecas e refeições.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida.

A todos que indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho...

O homem não é nada além daquilo que a educação faz com ele.

Immanuel Kant

PRODUÇÃO DE MACROMOLÉCULAS NO CULTIVO DE *Spirulina* E *Chlorella* COM CO₂, CINZAS E REDUÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO

RESUMO

As mudanças climáticas têm estimulado a busca por alternativas para minimizar os problemas ambientais causados pelo CO₂, principal gás do efeito estufa. Nesse sentido, micro-organismos fotossintetizantes como as microalgas se destacam, pois possuem capacidade de utilizar diretamente CO₂ para produzir biomoléculas. Além disso, cinzas provenientes da queima do carvão mineral podem ser utilizadas em cultivo microalgal, uma vez que contêm micronutrientes essenciais para o crescimento celular. A adição de CO₂, cinzas bem como a redução da fonte de nitrogênio podem alterar a composição da biomassa microalgal e incrementar o acúmulo de compostos de reserva como lipídios, carboidratos e PHB em relação ao conteúdo proteico. Desta forma, o objetivo deste estudo foi estimular a produção de biomoléculas a partir das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 cultivadas com redução da fonte de nitrogênio e diferentes concentrações e fontes de carbono bem como cinzas oriundas da indústria termelétrica. O trabalho foi dividido em três partes; a primeira e segunda etapas foram realizadas com *Spirulina* e a terceira com *Chlorella fusca* utilizando 10 e 50% da concentração de NaNO₃ do meio de cultivo, respectivamente. Primeiramente foram testados os tempos de injeção de 1 e 5 min e as vazões de 0,05 e 0,3 vvm ($\text{mL}_{\text{mistura}} \cdot \text{mL}_{\text{meio}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) de CO₂ a cada 40 min na fase clara do fotoperíodo. Para a segunda etapa foi selecionada a vazão de 0,3 vvm de CO₂ injetada a cada 20 min por 1 e 5 min. Nesta etapa foram testadas as concentrações de 0, 120 e 160 ppm de cinzas para verificar o seu potencial para substituir parcialmente os micronutrientes do meio de cultivo. Por fim, o tempo de injeção de 5 min, a vazão de 0,3 vvm injetados a cada 20 min e a adição de 0, 40 e 120 ppm de cinzas foram estudadas para a microalga *Chlorella fusca*. Ambos experimentos foram conduzidos em biorreatores tubulares, durante 15 d em câmara termostatizada a 30°C com iluminância de 41,6 $\mu\text{mol}_{\text{fótons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 12 h claro/escuro. Os parâmetros cinéticos de crescimento, taxa de biofixação de CO₂, concentração de carbono inorgânico dissolvido e de nitrogênio foram avaliados ao longo dos ensaios, enquanto que a composição da biomassa (carboidratos, proteínas, lipídios e biopolímero) foram determinadas após o término do cultivo. A utilização de 8,4 g L⁻¹ de NaHCO₃ e a adição de 0,3 vvm de CO₂ por 5 min para o cultivo de *Spirulina* proporcionaram a síntese de até 59,1% de carboidratos com produção teórica de bioetanol de 43,1%. Os ensaios com 120 ppm de cinzas apresentaram os melhores parâmetros cinéticos e taxa de biofixação de CO₂, independentemente do tempo de injeção de CO₂, enquanto que os experimentos com 120 e 160 ppm de cinzas e injeção de CO₂ por 1 min apresentaram 63,3 e 61,0% de carboidratos e 46,2 e 44,6 mL de etanol teórico por 100 g de biomassa, respectivamente. Nos cultivos de *Chlorella fusca* com CO₂ e 40 ppm de cinzas foram encontradas as maiores velocidades específicas de crescimento e os menores tempos de geração, sendo estatisticamente ($p < 0,05$) superiores àqueles sem o gás e as cinzas. Neste estudo, observou-se ainda que a redução de 50% da fonte de nitrogênio é uma estratégia para acumular até 35,2% de carboidratos que resulta em 25,5 mL de produção teórica de bioetanol para cada 100g de biomassa. Portanto, a utilização de CO₂, cinzas e redução da fonte de nitrogênio representam uma estratégia para minimizar os custos com fontes de nutrientes para o cultivo das microalgas, além da minimização dos problemas ambientais causados por esses efluentes. A utilização destes nutrientes nas condições estudadas permitem o acúmulo de carboidratos que podem ser fermentados para produção de bioetanol.

Palavras chave: Bioetanol. Carboidratos. Dióxido de Carbono. Nutrientes. Microalgas.

PRODUCTION OF MACROMOLECULES IN *Spirulina* AND *Chlorella* CULTIVATIONS WITH CO₂, ASH AND NITROGEN SOURCE REDUCTION

ABSTRACT

Climate change has stimulated the search for alternatives to minimize the environmental problems caused by CO₂, the main greenhouse gas. In this sense, photosynthetic microorganisms such as microalgae stand out because they have the capacity of using CO₂ to produce biomolecules. Moreover, ashes from coal burning can be used in microalgal cultivation, since they have essential micronutrients for cell growth. The addition of CO₂, ashes as well as the reduction of the nitrogen source supply can alter the composition of the microalgal biomass and increase the accumulation of reserve compounds such as lipids, carbohydrates and PHB in relation to the protein content. Thus, the objective of this study was to stimulate the production of biomolecules from *Spirulina* sp. LEB 18 and *Chlorella fusca* LEB 111 cultivated with reduction of nitrogen source and different concentrations and sources of carbon as well as ash from the thermoelectric industry. The work was divided into three parts; the first and second steps were performed with *Spirulina* and the third with *Chlorella fusca* using 10 and 50% of the NaNO₃ concentration in the culture medium, respectively. First, the injection times of 1 and 5 min and the flow rates of 0.05 and 0.3 vvm (mL_{mixture} · mL_{medium}⁻¹ · min⁻¹) of CO₂ were tested every 40 min in the lightening phase of the photoperiod. For the second stage, the flow rate of 0.3 vvm CO₂ was selected and injected every 20 min for 1 and 5 min. At this stage, the concentrations of 0, 120 and 160 ppm of ashes were tested to verify their potential to partially replace the micronutrients of the culture medium. Finally, the injection time of 5 min, the flow rate of 0.3 vvm injected every 20 min and the addition of 0, 40 and 120 ppm of ash were studied for the *Chlorella fusca* microalgae. All experiments were conducted in tubular bioreactors for 15 days in a thermostated chamber at 30 °C with illuminance of 41.6 μmol_{photons} m⁻² s⁻¹ and 12 h light/dark photoperiod. The kinetic growth parameters, CO₂ biofixation rate, dissolved inorganic carbon and nitrogen concentration were evaluated during the experiments, while the biomass composition (carbohydrates, proteins, lipids and biopolymer) was determined after the end of the cultivation. The use of 8.4 g L⁻¹ of NaHCO₃ and the addition of 0.3 vvm of CO₂ for 5 min for *Spirulina* cultivation provided the synthesis of up to 59.1% (w w⁻¹) of carbohydrate with theoretical bioethanol yield of 43.1%. The assays with 120 ppm of ash presented the best kinetic parameters and CO₂ biofixation rate, regardless of CO₂ injection time, while the experiments with 120 and 160 ppm of ash and CO₂ injection for 1 min presented 63.3 and 61.0% carbohydrate and 46.2 and 44.6 ml theoretical ethanol yield for each 100 g of biomass, respectively. In the experiments of *Chlorella fusca* with CO₂ and 40 ppm of ash were found the highest specific growth rates and the shortest generation times, being statistically (p < 0.05) higher than those without CO₂ and ashes. In this study, it was observed that the reduction of 50% of the nitrogen source is a strategy to accumulate up to 35.2% of carbohydrates that result in 25.5 mL of theoretical production yield of bioethanol for each 100 g of biomass. Therefore, the use of CO₂, ash and the reduction of nitrogen source supply represent a strategy to minimize costs with nutrient sources for microalgae cultivation, as well as to minimize the environmental problems caused by these effluents. The use of these nutrients under the studied conditions allows the accumulation of carbohydrates that can be fermented for the production of bioethanol.

Keywords: Bioethanol. Carbohydrates. Carbon dioxide. Nutrients. Microalgae.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% m m ⁻¹	Concentração percentual em massa
% v v ⁻¹	Concentração percentual em volume
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Trifosfato de adenosina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CaCO ₃	Carbonato de cálcio
CCM	Mecanismo de concentração de CO ₂
CO ₂	Dióxido de carbono
CO ₃ ²⁻	Carbonato
DIC	Carbono inorgânico dissolvido (g)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FURG	Universidade Federal do Rio Grande
GEE	Gás de efeito estufa
GRAS	Geralmente Reconhecido como Seguro
MEA	Monoetanolamina
NADPH	Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida fosfato (forma reduzida)
NADP ⁺	Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida fosfato (forma oxidada)
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaNO ₃	Nitrato de sódio
NO _x	Óxido de nitrogênio
ONU	Organização das Nações Unidas
p	Nível de significância
P _{et}	Produção teórica de etanol (mL)
PET	Poli (tereftalato de etileno)
pH	Potencial hidrogênio iônico (mol L ⁻¹)
PHB	Polihidroxibutirato
P _{máx}	Máximo valor de produtividade volumétrica de biomassa (g L ⁻¹ d ⁻¹)
PNMC	Política Nacional sobre Mudança do Clima
ppm	Partes por milhão
PVC	Policloreto de polivinila
P _x	Produtividade volumétrica de biomassa (g L ⁻¹ d ⁻¹)

SO _x	Óxido de enxofre
t	Tempo (d)
t ₀	Tempo inicial (d)
TB	Taxa de biofixação de dióxido de carbono (g L ⁻¹ d ⁻¹)
TB _{máx}	Máximo taxa de biofixação de dióxido de carbono (g L ⁻¹ d ⁻¹)
t _g	Tempo de geração (d)
UTPM	Unidade Termelétrica Presidente Médici
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto
V _{útil}	Volume útil do fotobiorreator (L)
X	Concentração celular (g L ⁻¹)
X ₀	Concentração celular inicial (g L ⁻¹)
μ _{máx}	Velocidade específica máxima de crescimento (d ⁻¹)

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Microalgas estudadas para mitigação de CO ₂ e a produtividade da biomassa (P _x)	33
Tabela 2 – Composição proximal em % (m m ⁻¹) de diversas espécies de microalgas	34
Tabela 3 – Composição proximal em % (m m ⁻¹) de cepas de <i>Chlorella</i>	35
Tabela 4 – Nutrientes utilizados para produção de PHB microalgal.....	38
Tabela 5 – Composição química das cinzas leves da UTPM.....	41

CAPÍTULO III

3.1 REDUÇÃO DE NITROGÊNIO E ADIÇÃO DE CO₂ EM CULTIVO DE *Spirulina* PARA PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS

Tabela 1 – Composição do meio de cultivo Zarrouk (ZARROUK, 1966) e Zarrouk modificado (MARTINS et al., 2014).....	55
Tabela 2 – Concentração celular máxima (X _{máx} , g L ⁻¹), produtividade volumétrica máxima (P _{máx} , g L ⁻¹ d ⁻¹), velocidade específica máxima de crescimento (μ _{máx} , d ⁻¹), tempo de geração (t _g , d) e taxa de biofixação máxima (TB _{máx} , g L ⁻¹ d ⁻¹) dos cultivos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 realizados com redução de 90% de nitrogênio, NaHCO ₃ ou CO ₂ em diferentes vazões e tempos de injeção.....	58
Tabela 3 – Composição da biomassa (m m ⁻¹) e produtividade teórica de etanol (mL em 100 g de biomassa ⁻¹) na <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 cultivada com redução de 90% de nitrogênio, NaHCO ₃ ou CO ₂ em diferentes vazões e tempos de injeção	64

3.2 AUMENTO DO CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS EM *Spirulina* ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE CO₂ E CINZAS PROVENIENTES DE TERMELÉTRICA

Tabela 1 – Concentração celular máxima (X _{máx} , g L ⁻¹), produtividade volumétrica máxima (P _{máx} , g L ⁻¹ d ⁻¹), velocidade específica máxima de crescimento (μ _{máx} , d ⁻¹), tempo de geração (t _g , d) e taxa de biofixação máxima (TB _{máx} , g L ⁻¹ d ⁻¹) dos cultivos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 realizados com redução de 90% de nitrogênio, adição de CO ₂ em diferentes tempos de injeção e de cinzas em concentrações distintas.....	81
Tabela 2 – Composição da biomassa em % (m m ⁻¹) e produtividade teórica de etanol (mL em 100 g de biomassa ⁻¹) em <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 cultivada com redução de 90% de nitrogênio, diferentes concentrações de CO ₂ e cinzas oriundas da UTPM.....	87

3.3 *Chlorella fusca* LEB 111 CULTIVADA COM CO₂ E CINZAS DE TERMELÉTRICA PARA PRODUÇÃO DE MACROMOLÉCULAS

Tabela 1 – Concentração celular máxima (X _{máx} , g L ⁻¹), produtividade volumétrica máxima (P _{máx} , g L ⁻¹ d ⁻¹), velocidade específica máxima de crescimento (μ _{máx} , d ⁻¹), tempo de geração (t _g , d) e taxa de biofixação máxima (TB _{máx} , g L ⁻¹ d ⁻¹) dos experimentos com <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 cultivada com diferentes fontes de carbono, concentrações de cinzas e de nitrogênio	104
Tabela 2 – Composição da biomassa (m m ⁻¹ , %) e produção teórica de etanol (mL 100g biomassa ⁻¹) dos experimentos de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 cultivada com diferentes fontes de carbono, concentrações de cinzas e nitrogênio.....	110

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1 – Micrografia de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.....	29
Figura 2 – Micrografia de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111	31
Figura 3 – Influência do pH na concentração de carbonato, bicarbonato e dióxido de carbono em água a condições padrões de temperatura e pressão (25°C, 1 atm).....	32
Figura 4 – Metabolismo da síntese de PHB por microalgas	36

CAPÍTULO III

3.1 REDUÇÃO DE NITROGÊNIO E ADIÇÃO DE CO₂ EM CULTIVO DE *Spirulina* PARA PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS

Figura 1 – Curvas de crescimento (a) e produtividade (b) da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 cultivada com redução de 90% de nitrogênio, NaHCO ₃ ou CO ₂ em diferentes vazões e tempos de injeção: (●) (8,4 g L ⁻¹ de NaHCO ₃); (▲) (0,05 vvm, 1 min); (■) (0,05 vvm, 5 min); (+) (0,3 vvm, 1 min) e (◆) (0,3 vvm, 5 min).....	60
Figura 2 – pH (a) e concentração de carbono inorgânico dissolvido no meio (b) ao longo dos cultivos nos experimentos com redução de 90% de nitrogênio, NaHCO ₃ ou CO ₂ em diferentes vazões e tempos de injeção: (●) (8,4 g L ⁻¹ de NaHCO ₃); (▲) (0,05 vvm, 1 min); (■) (0,05 vvm, 5 min); (+) (0,3 vvm, 1 min) e (◆) (0,3 vvm, 5 min).....	61
Figura 3 – Concentração de NaHCO ₃ e CaCO ₃ nos cultivos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 com redução de 90% nitrogênio e diferentes vazões (vvm) e tempo de injeção de CO ₂ (min)	62

3.2 AUMENTO DO CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS EM *Spirulina* ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE CO₂ E CINZAS PROVENIENTES DE TERMELÉTRICA

Figura 1 – Curvas de crescimento da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 cultivada com redução de 90% de nitrogênio e adição de CO ₂ durante 1 min (a) ou 5 min (b) contendo: 0 ppm (●); 120 ppm (▲); 160 ppm (■) de cinzas	81
Figura 2 – Produtividade diária da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 cultivada com redução de 90% de nitrogênio e adição de CO ₂ durante 1 min (a) ou 5 min (b) contendo: (b) contendo: 0 ppm (●); 120 ppm (▲); 160 ppm (■) de cinzas	82
Figura 3 – Curvas de nitrogênio (a) pH (b) e carbono inorgânico dissolvido (c) da <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 cultivada com redução de 90% de nitrogênio, adição de CO ₂ em diferentes tempos de injeção e de cinzas em concentrações distintas: (●) 1 min, 0 ppm; (▲) 1 min, 120 ppm; (■) 1 min, 160 ppm; (○) 5 min, 0 ppm; (Δ) 5 min, 120 ppm; (□) 5 min, 160 ppm	84
Figura 4 – Concentração de NaHCO ₃ e CaCO ₃ nos cultivos de <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 com redução de 90% de nitrogênio, adição de CO ₂ em diferentes tempos de injeção e de cinzas em concentrações distintas	85

3.3 *Chlorella fusca* LEB 111 CULTIVADA COM CO₂ E CINZAS DE TERMELÉTRICA PARA PRODUÇÃO DE MACROMOLÉCULAS

Figura 1 – Curvas de crescimento de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 cultivada com diferentes fontes de carbono e concentrações de cinzas, 100% (a) e 50% (b) de NaNO ₃ : (●) Na ₂ CO ₃ , 0 ppm; (▲) CO ₂ , 0 ppm; (■) CO ₂ , 40 ppm e (◆) CO ₂ , 120 ppm	105
--	-----

Figura 2 – Curvas de produtividade da microalga <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 cultivada com diferentes fontes de carbono e concentrações de cinzas, 100% (a) e 50% (b) de NaNO ₃ : (●) Na ₂ CO ₃ , 0 ppm; (▲) CO ₂ , 0 ppm; (■) CO ₂ , 40 ppm e (◆) CO ₂ , 120 ppm	106
Figura 3 – Curvas de nitrogênio (a), pH (b) e carbono inorgânico dissolvido (c) da microalga <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 cultivada com diferentes fontes de carbono e diferentes concentrações de cinzas, 100% de NaNO ₃ : (●) Na ₂ CO ₃ , 0 ppm; (▲) CO ₂ , 0 ppm; (■) CO ₂ , 40 ppm e (◆) CO ₂ , 120 ppm; e 50% de NaNO ₃ (○) Na ₂ CO ₃ , 0 ppm; (Δ) CO ₂ , 0 ppm; (□) CO ₂ , 40 ppm e (◇) CO ₂ , 120 ppm.....	107
Figura 4 – Concentração de NaHCO ₃ e CaCO ₃ nos cultivos de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 cultivada com 100% (a, b, c, d) e 50% (e, f, g, h) da fonte de nitrogênio e diferentes fontes de carbono e concentrações de cinzas.....	109

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	21
1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 OBJETIVOS.....	24
1.1.1 Objetivo geral.....	24
1.1.2 Objetivos específicos.....	25
CAPÍTULO II.....	27
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	29
2.1 MICROALGA <i>Spirulina</i>	29
2.2 MICROALGA <i>Chlorella</i>	30
2.3 BIOFIXAÇÃO DE CO ₂ POR MICROALGAS.....	31
2.4 SÍNTESE DE BIOMOLÉCULAS POR MICROALGAS.....	34
2.5 USO DE EFLUENTES DA INDÚSTRIA ENERGÉTICA PARA SÍNTESE MACROMOLÉCULAS POR MICROALGAS.....	38
2.5.1 Carbono.....	39
2.5.2 Cinzas.....	40
CAPÍTULO III.....	43
3 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO.....	45
3.1 REDUÇÃO DE NITROGÊNIO E ADIÇÃO DE CO ₂ EM CULTIVO DE <i>Spirulina</i> PARA PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS.....	47
3.1.1 Introdução.....	53
3.1.2 Material e métodos.....	54
3.1.2.1 Micro-organismo, meio de cultivo e condições experimentais.....	54
3.1.2.2 Concentração de biomassa e pH dos cultivos.....	55
3.1.2.3 Carbono inorgânico dissolvido.....	56
3.1.2.4 Parâmetros de crescimento celular.....	56
3.1.2.5 Taxa de biofixação de CO ₂	57
3.1.2.6 Quantificação do biopolímero na biomassa.....	57
3.1.2.7 Composição proximal da biomassa microalgal.....	57
3.1.2.8 Produção teórica de etanol.....	58
3.1.2.9 Análise estatística.....	58
3.1.3 Resultados e discussão.....	58
3.1.4 Conclusão.....	64
3.2.1 Introdução.....	75
3.2.2 Material e métodos.....	76
3.2.2.1 Micro-organismo e meio de cultivo.....	76
3.2.2.2 Cinzas.....	77
3.2.2.3 Condições experimentais.....	77
3.2.2.4 Determinações analíticas.....	77
3.2.2.5 Parâmetros cinéticos.....	78
3.2.2.6 Taxa de biofixação de CO ₂	79
3.2.2.7 Quantificação do biopolímero na biomassa.....	79
3.2.2.8 Composição proximal da biomassa microalgal.....	79
3.2.2.9 Produção teórica de etanol.....	80
3.2.2.10 Análise estatística.....	80
3.2.3 Resultados e discussão.....	80
3.2.4 Conclusão.....	88

3.3 <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 CULTIVADA COM CO ₂ E CINZAS DE TERMELÉTRICA PARA PRODUÇÃO DE MACROMOLÉCULAS.....	93
3.3.1 Introdução.....	99
3.3.2 Material e métodos.....	100
3.3.2.1 Micro-organismo e meio de cultivo	100
3.3.2.2 Cinzas.....	100
3.3.2.3 Condições experimentais	101
3.3.2.4 Determinações analíticas.....	101
3.3.2.5 Parâmetros cinéticos	102
3.3.2.6 Taxa de biofixação de CO ₂	103
3.3.2.7 Quantificação do biopolímero na biomassa	103
3.3.2.8 Composição proximal da biomassa microalgal	103
3.3.2.9 Produção teórica de etanol	104
3.3.2.10 Análise estatística.....	104
3.3.3 Resultados e discussão	104
3.3.4 Conclusão.....	112
CAPÍTULO IV.....	117
CONCLUSÃO GERAL.....	119
CAPÍTULO V.....	121
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123
CAPÍTULO VI.....	135
SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	137

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas foram identificadas como um dos grandes problemas da humanidade. Em virtude disso, foi instituído o Protocolo de Kyoto que obriga as nações signatárias a reduzir a emissão de gases do efeito estufa (GEE) (FERNANDÉZ et al., 2012). O Brasil aderiu ao Protocolo de Kyoto e instituiu a Política Nacional sobre Mudança do Clima (PNMC), que oficializa o compromisso do Brasil perante à Organização das Nações Unidas (ONU) de minimizar as emissões de GEE (BRASIL, 2009). A projeção de emissão de GEE foi estimada em 3.236 milhões de toneladas de CO₂ para 2020 (BRASIL, 2010). A meta da PNMC é reduzir entre 36,1% e 38,9% das emissões de GEE até 2020 (BRASIL, 2009), correspondendo à redução das emissões entre 1.168 e 1.259 milhões de toneladas de CO₂, respectivamente (BRASIL, 2010).

No cenário global, a concentração de CO₂ na atmosfera vem aumentando gradualmente, passando de 391,30 ppm em 2012 para 407,98 ppm em janeiro de 2018 (NOAA, 2018), valor duas vezes superior ao estimado em 1959 (KUMAR; BANERIJEE, DAS, 2014). A queima de combustíveis fósseis, com destaque para o carvão mineral em usinas termelétricas, representa grande parte dos GEE emitidos para atmosfera (COSTA et al., 2015). Além disso, as cinzas causam dificuldade na transferência de calor durante a combustão devido ao seu baixo valor calórico e o seu transporte e disposição final causam problemas ambientais (VAZ, COSTA; MORAIS, 2016a). Desta forma, a utilização de tecnologias capazes de transformar este gás de combustão e as cinzas em bioprodutos emerge como alternativa. Assim, os processos biotecnológicos utilizando resíduos como fonte de nutrientes para geração de bioprodutos (SCHMITZ; MAGRO; COLLA, 2012), incluindo CO₂ e cinzas de termelétrica (VAZ; COSTA, MORAIS, 2016a; VAZ; COSTA, MORAIS, 2016b), podem auxiliar na redução da poluição atmosférica.

Dentre as alternativas disponíveis para biofixação de CO₂ destaca-se o cultivo de microalgas (COSTA et al., 2015). As microalgas são micro-organismos capazes de converter carbono inorgânico em carbono orgânico através da fotossíntese (HO et al., 2011). Além disso, o cultivo microalgal é atrativo e promissor, uma vez que estes organismos podem ser cultivados em terras não aráveis, utilizando águas salinas ou residuais. Estas considerações têm instigado governantes e empresas a subsidiar a produção de bioprodutos de origem microalgal (LARKUM et al., 2012). O CO₂ biofixado pelas microalgas pode ser utilizado por diferentes rotas metabólicas, com produção de diversos compostos de interesse, entre eles os biopolímeros (VAZ; COSTA, MORAIS, 2016b), o biodiesel (CHISTI et al., 2007) e o bioetanol (SALLA et

al., 2016). Ainda, as cinzas presentes no carvão mineral possuem minerais que podem substituir parcialmente os nutrientes necessários ao crescimento microalgal (VAZ; COSTA; MORAIS, 2016b). Portanto, a utilização de resíduos provenientes da queima do carvão mineral pode ser alternativa sustentável para produção de biocompostos pela microalgas.

Quanto a composição química, cerca de 50% da biomassa seca de microalga é carbono (SCHMITZ; DAL MAGRO; COLLA, 2012). Portanto, para produzir 1 kg de biomassa é necessário disponibilizar 1,8 kg de CO₂ no cultivo microalgal, considerando que todo o CO₂ seja convertido em biomassa (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016). Como tanto a biomassa da microalga *Spirulina* quanto da *Chlorella* são compostas majoritariamente por proteínas, carboidratos e lipídios (HENRIKSON, 2009), a alteração das condições de cultivo e do fornecimento de nutrientes pode alterar a quantidade de cada uma destas macromoléculas (GUCCIONE et al., 2014). A redução da fonte de nitrogênio, por exemplo, pode reduzir o crescimento celular e produção de proteínas e clorofila. Contudo, a concentração de produtos de reserva como os carboidratos, lipídios e biopolímeros pode aumentar em relação aos demais componentes da biomassa (LOURENÇO, 2006).

A realização deste trabalho justifica-se pelo fato de que as macromoléculas produzidas podem ser matéria-prima para obtenção de diferentes bioprodutos. Os lipídios extraídos da biomassa podem ser utilizados para produção de biodiesel; o PHB pode ser utilizado para produção de embalagens biodegradáveis; as proteínas, por exibirem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticâncer podem ser destinadas às indústrias farmacêutica e alimentícia. Por fim, os carboidratos podem ser utilizados como fonte de carbono em processos para produção de bioetanol (YEN et al., 2013).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Estimular a produção de macromoléculas a partir das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 cultivadas com redução da fonte de nitrogênio e diferentes concentrações e fontes de carbono bem como cinzas oriundas da indústria termelétrica.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Estudar se diferentes tempos de injeção e vazões de CO₂ bem como redução de 90% na fonte de nitrogênio afetam a síntese de biomoléculas e a biofixação de CO₂ no cultivo de *Spirulina*;
- b) Avaliar se as fontes de carbono (CO₂ e ou bicarbonato de sódio) na *Spirulina* sp. LEB 18 e (CO₂ e ou carbonato de sódio) na *Chlorella fusca* LEB 111 em conjunto com a redução da fonte afetam o crescimento celular e a produção de biomoléculas;
- c) Verificar se a adição de diferentes concentrações de cinzas de termelétrica nos cultivos das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 afetam o crescimento celular e a síntese de biomoléculas de interesse.

CAPÍTULO II

2 REVISÃO DA LITERATURA

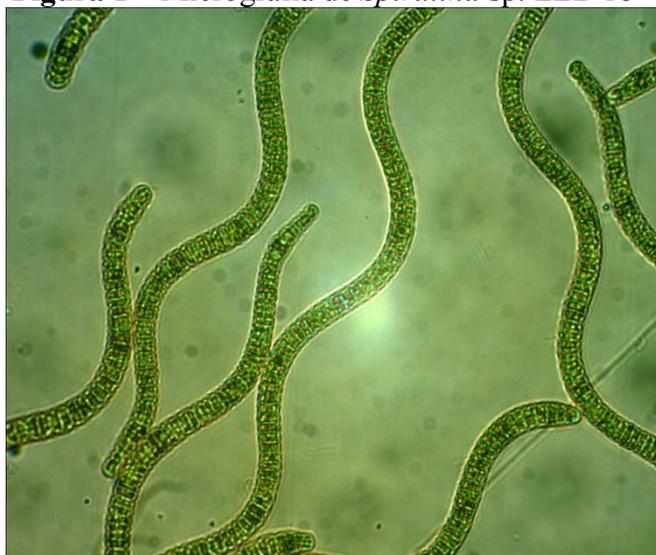
2.1 MICROALGA *Spirulina*

As microalgas constituem um grupo heterogêneo de micro-organismos fotossintéticos, apresentando diversas diferenças e semelhanças entre si. Podem ser eucarióticas ou procarióticas, geralmente unicelulares e com coloração devido à presença de pigmentos fotossintéticos. As microalgas procarióticas, também conhecidas por algas verde-azuladas, são chamadas de cianobactérias (LOURENÇO, 2006).

A versatilidade das microalgas permite a elas crescer e se adaptar a ambientes diversos, incluindo águas salinas, água doce, nascentes quentes, iluminância baixa ou elevada, variadas composições nutricionais, entre outros fatores ambientais. Isto contribui para a variabilidade genética e diversidade química na composição destes micro-organismos (LARKUM et al., 2012).

A *Spirulina* é uma cianobactéria, fotossintética, filamentosa e espiralada que vem sendo produzida em grande escala (Figura 1). Essa microalga pode possuir elevado conteúdo proteico, ácidos graxos essenciais, vitaminas e sais minerais, dependendo das condições de cultivo, o que garante aplicação como suplemento alimentar, para produção de biodiesel, biopolímeros, fármacos, bioetanol, dentre outras aplicações (WUANG et al., 2016; COSTA et al., 2017).

Figura 1 – Micrografia de *Spirulina* sp. LEB 18



Fonte: Banco de cepas de microalgas do LEB/FURG.

A biomassa de *Spirulina* tem sido produzida comercialmente desde os anos 70 e atualmente destaca-se como líder no mercado com produção duas vezes maior que *Chlorella*. Os valores da biomassa dependem do produtor, do processo produtivo, volume, condições de mercado, entre outros fatores. Em larga escala, a sua produção é autotrófica, utilizando CO₂ e luz solar como fontes de carbono e energia (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016).

A popularidade da microalga *Spirulina* está intrinsicamente ligada a sua versatilidade de aplicação e ao certificado GRAS (*Generally Recognized as Safe*) emitido pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (FDA, 2003). Este certificado permite que a *Spirulina* seja legalmente comercializada como alimento ou complemento alimentar, desde que cultivada sob adequadas condições higiênico-sanitárias (FDA, 2012). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) também reconhece que essa microalga pode ser utilizada na alimentação (BRASIL, 2013). Diversos estudos apontaram outras aplicações para as microalgas como produção de biopolímeros, com destaque para o PHB (COELHO, 2013; MARTINS, 2014; MARTINS et al., 2014; MORAIS, 2008; SILVA, 2016) e para produção de bioetanol (MARKOU et al., 2013; ROSA et al., 2015; SALLA et al., 2016).

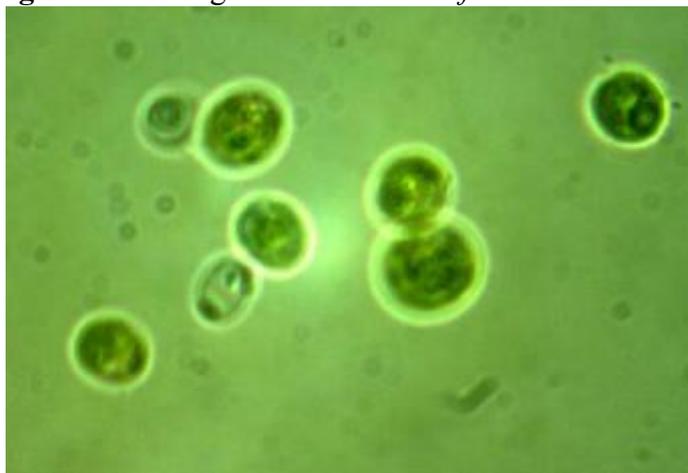
2.2 MICROALGA *Chlorella*

A *Chlorella* é uma microalga eucariótica pertencente ao grupo das clorófitas, unicelular e com diâmetro de 2 a 10 µm podendo apresentar formato globular, esférico ou elipsoidal. A parede celular desta microalga é envolvida por uma camada fina de celulose que circunda o cloroplasto (Figura 2). Essa microalga pode ser encontrada tanto em água doce quanto em salgada, porém é mais comumente encontrada em águas doces. Sua composição em base seca é reportada por conter aproximadamente 45% de proteínas, 20% de carboidratos, 20% de lipídios e 10% de minerais e vitaminas (PHUKAN et al., 2011). Contudo, esses valores variam de acordo a literatura. Henrikson (2009), por exemplo, afirma que a biomassa de *Chlorella* contendo 5% de umidade apresenta 60% de proteínas, 18% de carboidratos, 10% lipídios e 7% minerais e vitaminas. Conforme Guccione et al. (2014), a variação na composição ocorre devido as condições de cultivo e ao fornecimento de nutrientes. Todavia, como os trabalhos podem não ter utilizado a mesma condição de processo e/ou composição do meio de cultivo, os teores de macromoléculas tendem a variar.

Os primeiros estudos de microalga em planta piloto foram desenvolvidos com *Chlorella* por volta de 1950 e visavam aplicação na alimentação humana. Nos anos 60, a produção comercial de microalga teve início também com *Chlorella*. Em 2016, Slocombe e

Benemann relataram que a produção anual de biomassa é de aproximadamente 10.000 toneladas. Mais recentemente, além da aplicação na alimentação, diversos estudos têm sido conduzidos visando o aproveitamento da biomassa de *Chlorella* para produção de biodiesel (FAROOQ et al., 2015), biorremediação (KASSAS; MOHAMED, 2014), redução de CO₂ proveniente do gás de combustão industrial (KAO et al., 2014) e produção de bioetanol (RIZZA et al., 2017).

Figura 2– Micrografia de *Chlorella fusca* LEB 111



Fonte: Banco de cepas de microalgas do LEB/FURG.

Da mesma forma que a *Spirulina*, a *Chlorella* possui certificado GRAS emitido pelo FDA, podendo ser utilizada e comercializada como alimento, desde que atenda aos padrões higiênicos-sanitários estabelecidos (DUARTE, 2015).

2.3 BIOFIXAÇÃO DE CO₂ POR MICROALGAS

Durante a fotossíntese os micro-organismos utilizam a energia da luz, CO₂ e H₂O para sintetizar moléculas orgânicas e liberar oxigênio molecular (HELLIER; PURTON; LADOMMATOS, 2015). O processo de fotossíntese ocorre em duas fases: etapas clara e escura (CAMPBELL; FARRELL, 2006).

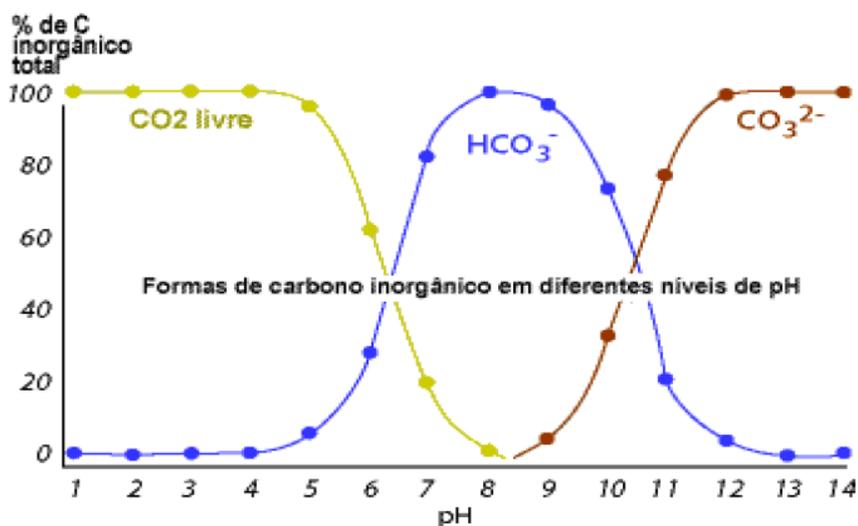
As reações dependentes da luz ocorrem nos fotossistemas I e II localizados nos estromas da membrana tilacóide. Enquanto no fotossistema I ocorre a redução de NADP⁺ a NADPH, no fotossistema II ocorre a oxidação para produção de oxigênio. As reações que ocorrem nos fotossistemas são interligadas e interagem entre si através da cadeia transportadora de elétrons. A luz excita os elétrons do fotossistema II, o elétron energizado é transferido para

o fotossistema I, resultando na formação de ATP. O ATP e o NADPH produzidos na etapa clara fornecem energia e o potencial redutor para biofixação de CO_2 (CAMPBELL; FARRELL, 2006). Enquanto a biofixação de CO_2 ocorre no estroma do cloroplasto em plantas superiores, nas cianobactérias o processo ocorre no citoplasma (MORAES, 2014).

Na fotossíntese, a taxa de biofixação depende de fatores internos e externos e da interação entre eles. O gênero, espécie da microalga e estágio de crescimento celular são fatores internos, enquanto o suprimento de carbono inorgânico, pH, níveis de oxigênio, suprimento de nutrientes, temperatura e luminosidade são classificados como fatores externos. A interação entre estes fatores controla a quantidade e a atividade das enzimas responsáveis pela fotossíntese e pela biofixação de CO_2 (MORAIS, 2006).

As microalgas possuem a capacidade de utilizar o CO_2 proveniente do ar atmosférico como fonte de carbono. Contudo, esse processo é limitado pela baixa concentração de CO_2 no ar (REDAELLI, 2012), aproximadamente 407,98 ppm (NOAA, 2018). O pH da fase aquosa determina a concentração relativa das espécies de carbono, sendo o CO_2 a principal espécie em pH ácido, enquanto em pH alcalino, comumente utilizado no cultivo microalgal (pH= 7,5-8,5), o principal componente é o bicarbonato (Figura 3) (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016).

Figura 3 - Influência do pH na concentração de carbonato, bicarbonato e dióxido de carbono em água a condições padrões de temperatura e pressão (25°C, 1 atm)



Fonte: SLOCOMBE; BENEMANN, 2016.

O uso de CO_2 , proveniente de gases de combustão de termelétrica, para cultivo de microalgas foi proposto e submetido a uma análise tecno-econômica em 1960. O objetivo era a produção de biogás em larga escala e, posteriormente, a produção de eletricidade a partir de microalga cultivada com resíduos. Durante os anos 90, o governo japonês conduziu um

programa com o objetivo de utilizar microalgas para a biofixação de CO₂ para reduzir os gases do efeito estufa (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016). Alguns estudos demonstraram o potencial de microalgas em converter CO₂ em biomassa (CHIU et al., 2008; FERNANDÉZ et al. 2012; MOREIRA et al. 2016). Diversos autores estudaram microalgas para biofixação de CO₂ (Tabela 1).

Tabela 1 – Microalgas mais estudadas para mitigação de CO₂ e a produtividade da biomassa (P_x)

Microalga	CO₂ (% v v⁻¹)	P_x (g L⁻¹ d⁻¹)	Referência
<i>Chlorella</i> sp.	2	0,528	(CHIU et al., 2008)
<i>Chlorella</i> sp.	5	0,491	(CHIU et al., 2008)
<i>Chlorella</i> sp.	10	0,458	(CHIU et al., 2008)
<i>Chlorella</i> sp.	15	0,369	(CHIU et al., 2008)
<i>Chlorella kessleri</i>	18	0,087	(MORAIS; COSTA, 2007a)
<i>Scenedesmus</i> sp.	10	0,218	(YOO et al., 2010)
<i>Chlorella vulgaris</i>	10	0,105	(YOO et al., 2010)
<i>Botryococcus braunii</i>	10	0,027	(YOO et al., 2010)
<i>Scenedesmus</i> sp	5,5	0,203	(YOO et al., 2010)
<i>Botryococcus braunii</i>	5,5	0,077	(YOO et al., 2010)
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,037	0,04	(SCRAGG et al., 2002)
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,037	0,024	(SCRAGG et al., 2002)
<i>Heamatococcus pluvialis</i>	16-34	0,076	(HUNTLEY; REDALJE, 2007)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0,038	0,009	(GÓMEZ-VILLA et al., 2005)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0,038	0,016	(GÓMEZ-VILLA et al., 2005)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	18	0,14	(MORAIS; COSTA, 2007a)
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	12	0,22	(MORAIS; COSTA, 2007a)

Fonte: Adaptado de REDAELLI (2012)

2.4 SÍNTESE DE BIOMOLÉCULAS POR MICROALGAS

Nos últimos anos observa-se que há uma crescente demanda por biomassa microalgal (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016). Neste cenário, a composição química é de suma importância para identificar as potenciais aplicações comerciais das microalgas (BECKER, 2007). A composição lipídica, proteica e de carboidratos em base seca de diversas microalgas são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição proximal em % ($m\ m^{-1}$) de diversas espécies de microalgas

Microalga	Proteínas	Carboidratos	Lipídios
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	62	23	3
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Euglena gracilis</i>	39-61	14-18	14-20
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Spirogyra</i> sp.	6-20	33-64	11-21
<i>Arthrospira maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Synechococcus</i> sp.	63	15	11

Fonte: Becker (2007).

As proteínas são compostas por sequências de aminoácidos. Assim, a qualidade nutricional de uma proteína é determinada basicamente pelo conteúdo, proporção e disponibilidade de seus aminoácidos (BECKER, 2007). As proteínas de origem microalgal possuem diversas aplicações, tais como indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, ração animal e medicina (YEN et al., 2013).

Apesar das microalgas *Spirulina* e *Chlorella* apresentarem elevado conteúdo de proteínas (BECKER, 2007), a composição pode ser alterada por meio de diversas condições de cultivo (GUCCIONE et al., 2014). O estresse nutricional, principalmente em meio sem nitrogênio ou fósforo, limita o crescimento microalgal aumentando o teor de carboidratos e

lipídios na biomassa (Tabela 3). Assim a limitação de nutrientes representa uma das estratégias mais eficientes para aumentar o conteúdo de produtos de reserva para produção de biocombustíveis (GUCCIONE et al., 2014).

Tabela 3 – Composição proximal em % ($m\ m^{-1}$) de cepas de *Chlorella*

Cepa de <i>Chlorella</i>	Nitrogênio suficiente			Limitação de nitrogênio		
	Proteínas	Carboidratos	Lipídios	Proteínas	Carboidratos	Lipídios
F&M-M49	45,4±1,6	24,2±0,6	22,8±1,9	28,2±2,7	53,0±0,5	15,4±0,6
CCAP 211- 11b	44,1±1,2	26,6±2,8	22,0±2,1	25,2±0,0	24,3±3,3	46,0±1,3
IAM C-212	40,5±0,2	26,8±0,2	24,3±0,8	25,9±3,8	51,9±0,3	17,1±0,7
PROD1	39,9±0,8	28,3±0,5	28,1±0,2	26,8±1,5	21,5±3,9	47,4±0,0

Fonte: Guccione et al., 2014.

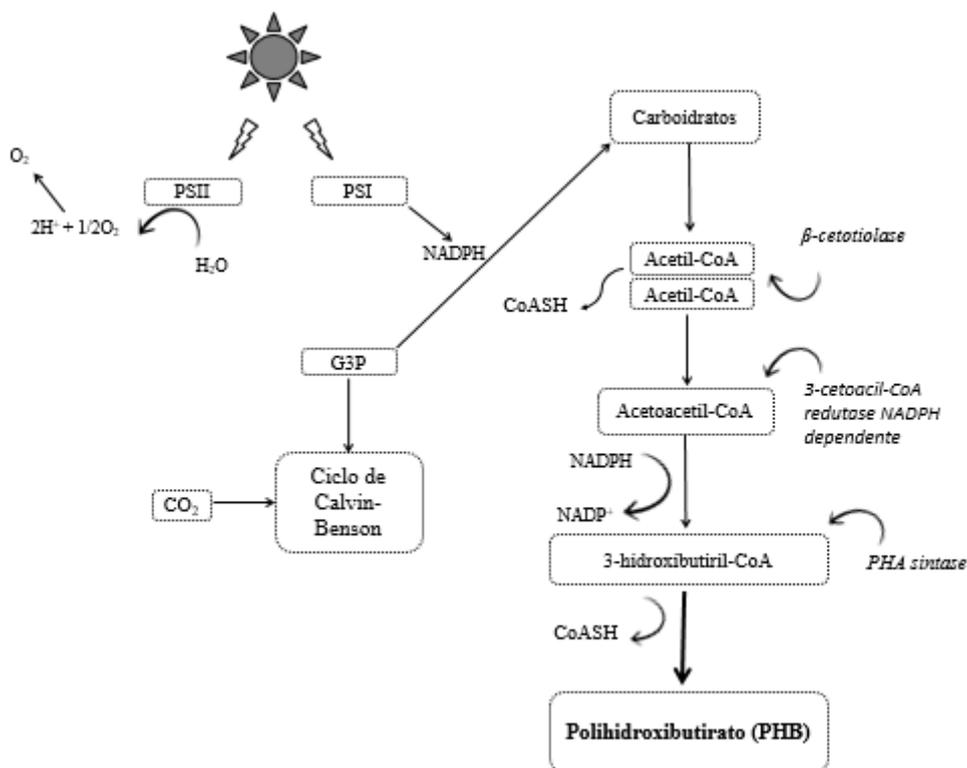
Na limitação de nutrientes ou elevadas intensidades luminosas, algumas espécies microalgais acumulam até 65% de carboidratos (GONZALÉZ-FERNANDES; BALLESTEROS, 2012; MARKOU; ANGELIDAKI; GEORGAKAKIS, 2012). Choi, Nguyen e Sim (2010) e Nguyen et al (2009) cultivando *Chlamydomonas reinhardtii* sob intensidade luminosa de $450\ \mu E\ m^{-2}\ s^{-1}$ e regulando o pH através da adição de ácido acético obtiveram 60% de carboidratos em base seca. Da mesma forma, Miranda, Passarinho e Gouveia (2012) e Ho et al. (2013) cultivando *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris*, respectivamente, sob limitação de nitrogênio, obtiveram elevado conteúdo de carboidratos. Em todos esses estudos, a biomassa rica em carboidratos foi utilizada para produção de bioetanol.

Várias estratégias de redução de nitrogênio têm sido empregadas para o acúmulo de lipídios. Elas podem ser divididas em dois tipos. O primeiro método consiste em limitar o nitrogênio em duas etapas, onde inicialmente a microalga é cultivada na presença de nitrogênio para estimular o crescimento celular. Após certo período de cultivo, a biomassa é coletada e o inóculo é submetido a limitação de nitrogênio para acumular lipídios. O segundo método consiste em uma única fase em que a concentração inicial de nitrogênio é ajustada a um nível desejável para controlar o tempo necessário para atingir a limitação de nitrogênio. O cultivo da microalga passará automaticamente para o estágio de limitação quando o teor de nitrogênio no meio estiver esgotado. Os efeitos dos dois tipos de limitação de nitrogênio na eficiência da produção de lipídios parecem depender da espécie de microalga (YEN et al., 2013). *Chlorella vulgaris* e *Chlorella emeronii* apresentam 28 e 25 % ($m\ m^{-1}$) de lipídios, respectivamente. Em

condições de limitação de nitrogênio, o conteúdo lipídico pode ser incrementado para 58 e 34 % (m m^{-1}), respectivamente, para estas espécies (SCRAGG et al., 2002).

A síntese de PHB por cianobactérias pode ser alternativa à síntese bacteriana devido a sua capacidade de utilizar resíduos como nutrientes e a sua natureza fotoautotrófica (BALAJI; GOPI; MUTHVELAN, 2013; MARTINS et al., 2014). Além disso, o biopolímero microalgal tem capacidade de reduzir a poluição ambiental quando comparado aos polímeros petroquímicos (MARTINS et al., 2014). A biossíntese do PHB ocorre com a interação de duas moléculas de acetil-CoA (intermediário entre as vias de degradação de carboidratos e o ciclo de Krebs). Com a ação da enzima *β -cetotiolase*, ocorre a produção de acetoacetil-CoA. A enzima *3-cetoacil-CoA redutase NADPH dependente*, reduz a molécula a 3-hidroxiacetil-CoA numa reação estereoespecífica. Na última reação para síntese do composto ocorre a polimerização da unidade de 3-hidroxiacetil-CoA, catalisada pela enzima *PHA sintase* (Figura 4) (LIMA et al., 2001; MARTINS, 2014).

Figura 4 – Metabolismo da síntese de PHB por microalgas



O PHB é um polímero termoplástico e sua resina se torna altamente viscosa e moldável em temperaturas próximas ou acima do seu ponto de fusão. Suas propriedades são similares às do polipropileno. Isso garante aplicabilidade na produção de embalagens (KAPLAN, 2010). Segundo Khosravi-Darani e Bucci (2015), o PHB possui aplicação potencial para embalagens

ambientalmente amigáveis. Além disso, na fabricação de embalagens, possui como vantagens a permeabilidade ao vapor de água similar à do policloreto de vinila (PVC) ou poli (tereftalato de etileno) (PET), além da menor hidrofobicidade quando comparado a outros biopolímeros (celulose, amido e quitosana) (KHOSRAVI-DARANI; BUCCI, 2015).

A biossíntese do biopolímero e seu rendimento podem ser maximizados submetendo a microalga ao excesso da fonte de carbono e a limitação de, pelo menos, um nutriente essencial ao crescimento, ao uso de cepas recombinantes, ao controle da taxa metabólica e ao uso de diferentes configurações de biorreatores (LIMA et al., 2001; MARTINS et al., 2014). As microalgas têm capacidade de produzir altas concentrações de PHB alcançando a relação PHB/biomassa seca de 55% (m m^{-1}) em *Synechococcus* sp. MA19 (NISHIOKA et al., 2001); 38% (m m^{-1}) em *Synechossystis* sp. (PANDA; MALLICK, 2007) e 44% (m m^{-1}) em *Spirulina* sp. LEB 18 (MARTINS et al., 2014). A viabilidade do processo é possível com o uso fontes alternativas de nutrientes (GOPI; BALAJI; MUTHUVELAN, 2014). Isso ocorre porque o custo com o suprimento de matéria-prima para os cultivos de microalgas supera 50% dos gastos totais da produção de PHB (TROSCHL; MEIXNER; DROSG, 2017). Em cultivos autotróficos de microalgas, a fonte de carbono (NaHCO_3) pode representar até 60% do dispêndio total com nutrientes (BORGES et al., 2013). Rahman et al. (2015) consideram que em média 4,3 kg de carbono são necessários para produzir 1 kg de PHB.

Martins et al. (2014) com redução da fonte de nitrogênio $0,25 \text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3 (10% da concentração do meio Zarrouk padrão) estudaram a influência do cultivo heterotrófico de *Spirulina* sp. LEB 18 com substituição do bicarbonato de sódio (NaHCO_3) do meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) por glicose ou acetato de sódio. Além disso, o cultivo mixotrófico de *Spirulina* sp. LEB 18 com NaHCO_3 como fonte de carbono inorgânico, suplementado com 0,2, 0,4 ou 0,6 g L^{-1} de glicose ou acetato de sódio foi estudado. Os experimentos com glicose e acetato apresentaram rendimento máximo de 12,3 e 11,9% (m m^{-1}), respectivamente. O maior rendimento (44,2%, m m^{-1}) foi obtido com meio Zarrouk contendo $8,4 \text{ g L}^{-1}$ de NaHCO_3 e $0,25 \text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3 (MARTINS et al., 2014).

Muitos estudos visando a produção de PHB têm sido direcionados para limitação de nitrogênio e para o uso de fontes alternativas de nutrientes como pode ser observado na Tabela 4. Quando CO_2 é utilizado como fonte de nutriente para o cultivo de microalgas (COSTA et al., 2015) e para produção de PHB (JAU et al., 2005) ele contribui para a redução dos efeitos ambientais causados pela emissão de CO_2 para atmosfera, além de reduzir o custo da fonte de carbono, que é o principal nutriente no cultivo (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016).

Tabela 4 – Nutrientes estudados para produção de PHB microalgal

Microalga	Fonte de Carbono	Fonte de nitrogênio	Rendimento de PHB (% m m⁻¹)	Referência
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	8,4 g L ⁻¹ de NaHCO ₃	0,25 g L ⁻¹ de NaNO ₃	44,2	MARTINS et al., 2014
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	16,8 g L ⁻¹ de NaHCO ₃ e 0,4 g L ⁻¹ de C ₆ H ₁₂ O ₆	0,25 g L ⁻¹ de NaNO ₃	12,3	MARTINS et al., 2014
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	16,8 g L ⁻¹ de NaHCO ₃ e 0,6 g L ⁻¹ de CH ₃ COONa	0,25 g L ⁻¹ de NaNO ₃	12,0	MARTINS et al., 2014
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	16,8 g L ⁻¹ de NaHCO ₃	0,05 g L ⁻¹ de NaNO ₃	30,7	COELHO et al., 2015
<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	0,02 g L ⁻¹ de Na ₂ CO ₃ e 0,4 g L ⁻¹ de CH ₃ COONa	Não houve adição	35,0	KHETKORN et al., 2016
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	8,4 g L ⁻¹ de NaHCO ₃ e 25% (v v ⁻¹) de resíduo de extração do PHB	0,25 g L ⁻¹ de NaNO ₃	10,6	SILVA, 2016
<i>Botryococcus</i> <i>braunii</i>	60% de águas residuais	0,60 g L ⁻¹ de NO ₃ ⁻	24,7	KAVITHA et al., 2016

2.5 USO DE EFLUENTES DA INDÚSTRIA ENERGÉTICA PARA SÍNTESE MACROMOLÉCULAS POR MICROALGAS

Nas últimas décadas, diversos métodos para captação de CO₂ pós combustão foram desenvolvidos, sendo eles químicos, físicos e biológicos. Entre os métodos biológicos, aqueles envolvendo fotossíntese microalgal merecem destaque, pois a taxa de biofixação de CO₂ nestes micro-organismos é maior do que na plantas terrestres (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016). Assim, os gases de combustão são um recurso ainda a ser plenamente explorado na biotecnologia microalgal, não somente para reduzir o efeito estufa, mas também para alavancar o uso das microalgas para aplicações inovadoras (HENDE; VERVAEREN; BOON, 2012). Como alternativas vale ressaltar a produção de biomassa rica em carboidratos como fonte renovável de energia (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016) e a produção de biopolímeros (MORAIS, 2008; MOZUMBER et al., 2015).

Tipicamente, os gases de exaustão industrial contém 10-20% de CO₂, bem como pequenas quantidades de SO_x e NO_x (CUELLAR-BERMUDEZ, et al., 2015; HO et al., 2011), contudo estes valores variam baseados na mistura do combustível, consumo de energia, tecnologia da planta, entre outros fatores (HO et al., 2011). Os gases de combustão da fase C da Usina Termelétrica Presidente Médici possuem cerca de 10-12% de CO₂ (v v⁻¹), 680 ppm de NO_x, 1700 ppm de SO_x e 265 ppm de cinzas (DUARTE; FANKA; COSTA, 2016). A seleção de cepas de microalga tem efeito significativo sobre a eficácia e o custo competitivo do processo de mitigação de CO₂ (CUELLAR-BERMUDEZ et al., 2015). Os atributos desejáveis à microalga incluem elevada taxa de crescimento, capacidade de utilização de CO₂ e alta tolerância aos constituintes traços do gás de combustão (CUELLAR-BERMUDEZ et al., 2015; REDAELLI, 2012).

2.5.1 Carbono

Seja qual for a aplicação futura da microalga, a produção de biomassa necessita de fonte de carbono, pois este é o elemento requerido em maiores concentrações para o crescimento microalgal. A síntese das moléculas orgânicas (lipídeos, carboidratos, proteínas, vitaminas, ácidos nucleicos, entre outros) necessita de carbono e por isso justifica-se a sua demanda elevada (LOURENÇO, 2006). A biomassa microalgal apresenta cerca de 50% de carbono na sua composição. Assim, o fornecimento deste nutriente aos cultivos representa uma fração elevada nos custos de produção (SCHMITZ; DAL MAGRO; COLLA, 2012). Para produção de PHB, por exemplo, o custo com a fonte de carbono pode representar de 25 a 45% dos gastos totais do processo (NARANJO; CARDONA; HIGUITA, 2014).

Diversas fontes de carbono gasoso na forma de dióxido de carbono, ou sólido, principalmente na forma de bicarbonato podem ser utilizadas (SCHMITZ; DAL MAGRO; COLLA, 2012). No entanto, o CO₂, menos oneroso que os carbonatos, é a fonte de carbono inorgânico preferida (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016), uma vez que no processo de fotossíntese, as microalgas, possuem a capacidade de sintetizar moléculas orgânicas utilizando a energia da luz, CO₂ e H₂O (HELLIER; PURTON; LADOMMATOS, 2015). Além disso, o fornecimento de CO₂ permite o controle do pH do meio (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016).

A concentração de carbono no cultivo microalgal não pode ser inferior a concentração crítica (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016) que é dependente da luminosidade e do coeficiente de transferência de CO₂ específicos de cada biorreator (PCHARA, 2016), caso contrário a fonte de carbono pode prejudicar a fotossíntese. Os limites de carbono são específicos para cada

espécie, meio de cultivo e processo (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016). Conforme estudo conduzido por Martins et al. (2014) no cultivo da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 utilizando três fontes distintas de carbono (bicarbonato de sódio, glicose e acetato de sódio), o bicarbonato de sódio proporcionou o maior crescimento celular, uma vez que a microalga possui as enzimas fotossintéticas necessárias para assimilação do carbono.

Independente da fonte de carbono utilizada, duas condições essenciais para o cultivo devem ser exploradas: (1) o fornecimento de carbono deve ser suficiente para suprir as necessidades do cultivo, desta forma evitando condições que limitem carbono e (2) a otimização do fornecimento de CO₂ deve evitar a perda dióxido de carbono para atmosfera, pois esta perda promove o impacto ambiental (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016).

2.5.2 Cinzas

O carvão brasileiro pós combustão possui elevado teor de cinzas (aproximadamente 50% na UTPM) bem como elementos traços tóxicos. Cuidados especiais na destinação destas cinzas precisam ser tomados, no entanto, na UTPM em Candiota, por exemplo, a disposição final é o interior das cavas das minas abandonadas; em outras usinas são utilizadas áreas próximas a rios ou arroios como banhados e terrenos sem uso (Baixo Jacuí, Tubarão e Criciúma) (SOARES; SANTOS; POSSA, 2008).

A formação das cinzas e sua característica física, mineralógica e química dependem de diversos fatores, entre os quais pode-se destacar: tipo de carvão, processo de combustão (temperatura e tempo de exposição) e equipamento de controle (precipitadores eletrostáticos, filtros, ciclones). Apesar dos equipamentos de controle possuírem alta eficiência de retenção (>99,9%), seu desempenho é reduzido para partículas menores que 10µm e, desta forma, quantidades consideráveis de cinzas podem ser emitidas à atmosfera. Estas partículas finas podem acarretar sérios problemas ao ser humano, pois permanecem por longos períodos de tempo na atmosfera, são transportadas a centenas de quilômetros da fonte emissora e podem ser capturadas pelos alvéolos pulmonares (SOARES; SANTOS; POSSA, 2008).

Segundo Duarte (2015), as cinzas leves ou volantes são partículas finas, vitrificadas e ocas; material heterogêneo constituído de fases amorfas e cristalinas. Os principais componentes das cinzas são sílica (SiO₂), alumina (Al₂O₃), óxido de ferro (Fe₂O₃) e óxido de cálcio (CaO) (Tabela 5) (CARDOSO et al., 2011). Outros elementos como Cd, Cu, K, Na, Ni e Mg podem ser encontrados. Muitos destes minerais são necessários para o cultivo microalgal,

como: Fe, Ca, Cu, K e Mg e podem substituir parcialmente os nutrientes necessários para o crescimento microalgal (VAZ; COSTA; MORAIS, 2016b).

Tabela 5 – Composição química das cinzas leves da UTPM

Componentes	Composição (%)
Elementos principais	
SiO ₂	65,8
Al ₂ O ₃	21,5
Fe ₂ O ₃	4,6
TiO ₂	0,7
P ₂ O ₅	<0,03
CaO	1,8
MgO	0,8
Na ₂ O	0,1
K ₂ O	1,9
SO ₃	1,4
Elementos traços (mg kg ⁻¹)	
Co	18,0
Cr	68,8
Cu	31,5
Mn	183,0
Ni	12,5
Zn	103,8

Fonte: Vaz; Costa; Morais (2016b)

Os micro-organismos possuem mecanismos que podem afetar o equilíbrio das espécies metálicas entre as fases líquida e sólida. Assim, os micro-organismos podem influenciar a especiação de metais presentes nas cinzas de termelétrica, por meio de sua capacidade ativa ou mediadora nos processos de mobilização ou imobilização de metais. (GADD, 2004). Entre os micro-organismos que podem remover metais pesados do meio ambiente estão as bactérias, algas e fungos. A capacidade de remoção, assim como os mecanismos de acúmulo, podem variar amplamente, de acordo com a espécie microbiana, ou até mesmo com a espécie de micro-organismo (LEMOS et al., 2008). Wang et al., (2010) estudaram a remoção de íons metálicos pela microalga *Chlorella* sp. e constaram que esta espécie de microalga foi capaz de remover

íons de alumínio, cádmio, ferro, magnésio e manganês de plantas de tratamento de águas residuais.

Vaz, Costa e Morais (2016) estudaram a adição de 40, 80 e 120 ppm de cinzas de termelétrica nas microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 e observaram que essas concentrações de cinzas não alteraram os parâmetros máximos concentração de biomassa, produtividade, velocidade específica e biofixação diária. Em estudo com *Chlorella fusca* LEB 111, Duarte; Fanka e Costa verificaram que a adição de 40 ppm de cinzas não afetou o crescimento microalgal. Segundo os autores, essa espécie de está adaptada ao ambiente elevada concentração de resíduos sólidos e gasosos uma vez que foi isolada da lagoa de decantação de cinzas da Unidade Termelétrica Presidente Médici.

CAPÍTULO III

3 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

A dissertação está dividida em 3 artigos, conforme descrito a seguir:

Artigo 1: Redução de nitrogênio e adição de CO₂ em cultivo de *Spirulina* para produção de carboidratos.

Artigo 2: Aumento do conteúdo de carboidratos em *Spirulina* através da utilização de CO₂ e cinzas provenientes de termelétrica.

Artigo 3: *Chlorella fusca* LEB 111 cultivada com CO₂ e cinzas de termelétrica para produção de macromoléculas.

ARTIGO 1
REDUÇÃO DE NITROGÊNIO E ADIÇÃO DE CO₂ EM CULTIVO DE *Spirulina*
PARA PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS

3.1 REDUÇÃO DE NITROGÊNIO E ADIÇÃO DE CO₂ EM CULTIVO DE *Spirulina* PARA PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS

Resumo

As mudanças climáticas têm estimulado a busca por alternativas afim de minimizar os problemas ambientais causados pelo CO₂. Neste sentido, micro-organismos fotossintetizantes como as microalgas podem ser utilizados na redução de gases do efeito estufa e na geração de biocompostos como carboidratos, que podem ser fermentados para a produção de bioetanol. Desta forma, o trabalho teve como objetivo verificar se a redução de nitrogênio associada à injeção de CO₂ em diferentes vazões e tempos de injeção afetam a concentração intracelular de carboidratos na *Spirulina*. A redução de 90% da fonte de nitrogênio (0,25 g L⁻¹ de NaNO₃) bem como a adição de 10% (v v⁻¹) de CO₂ com a vazão de 0,05 ou 0,3 vvm durante 1 ou 5 min alteraram o crescimento celular e a composição da biomassa. A maior quantidade de CO₂ injetado (0,3 vvm por 5 min) pode propiciar a produção de 49,3% (m m⁻¹) de carboidratos e 36,0 (mL em 100 g de biomassa⁻¹) de produção teórica de bioetanol enquanto que a adição de 8,4 g L⁻¹ de NaHCO₃ resultou em 59,1% (m m⁻¹) de carboidratos e 43,1 mL de produção teórica de bioetanol. Desta forma, este estudo representa um passo importante para a definição de condições de cultivo que incrementem a produção de carboidratos pela microalga *Spirulina*.

Palavras-chave: Bicarbonato de sódio. Bioetanol. Dióxido de Carbono. Microalgas. Macromoléculas.

NITROGEN REDUCTION AND CO₂ ADDITION IN *Spirulina* CULTIVATION FOR CARBOHYDRATE PRODUCTION

Abstract

Climate change have been stimulating the search for alternatives to reduce environmental problems caused by CO₂ emissions. In this sense, photosynthetic microorganisms such as microalgae can be applied in the biofixation of greenhouse gases besides of producing biocompounds that includes carbohydrates, which can be fermented for the production of bioethanol. The objective of this study was to verify if the reduction of the nitrogen source associated to CO₂ injection at different flow rates and times of injection affects the intracellular concentration of carbohydrates in *Spirulina*. The reduction of 90% of nitrogen supply source to 0.25 g L⁻¹ of NaNO₃ as well as the addition of 10% (v v⁻¹) of CO₂ in a flow rate of 0.05 or 0.3 vvm for 1 or 5 min altered cell growth and biomass composition. The highest amount of CO₂ injected (0.3 vvm for 5 min) provided the production of 49.3% (w w⁻¹) of carbohydrates and 36.0 mL of theoretical production of ethanol in 100 g of biomass, while the addition of 8.4 g L⁻¹ of NaHCO₃ resulted in 59.1% (w w⁻¹) of carbohydrates and 43.1 mL of theoretical production of ethanol. Thus, this study represents an important step to define culture conditions that enhance the production of carbohydrates in *Spirulina*.

Keywords: Sodium bicarbonate. Bioethanol. Carbon dioxide. Microalgae. Macromolecules.

3.1.1 Introdução

O impacto ambiental causado pelas emissões de gases do efeito estufa na atmosfera e o uso inadequado de combustíveis fósseis têm conduzido à procura de recursos renováveis e tecnologias que atendam às necessidades do mercado mundial (FERNANDÉZ et al., 2012). Estimativas do *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA) demonstraram que a concentração de CO₂ na atmosfera teve aumento significativo, passando de 391 ppm em 2012 para 408 ppm em 2018 (NOAA, 2018). Neste cenário, as microalgas se destacam, uma vez que são consideradas um sistema biológico eficiente na captação de energia solar e utilização de CO₂ para produção de compostos orgânicos (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016). Além disso, esses micro-organismos fotossintéticos vêm sendo estudados para o tratamento de águas residuais (WUANG et al., 2016), biossorção de metais pesados (DOTTO; CADAVAL JR; PINTO, 2012), síntese de biopolímeros (COELHO et al., 2015; MARTINS et al., 2014), biofixação de CO₂ (DUARTE; FANKA; COSTA, 2016; ROSA et al., 2016), bem como para produção de biocombustíveis (COSTA; MORAIS, 2011; MARKOU et al., 2013; SALLA et al., 2016). Contudo, é importante observar as vazões de injeção do gás uma vez que a concentração de CO₂ no meio de cultivo não deve ser inferior à requerida para o crescimento mínimo de um micro-organismo, mas também não deve exceder a tolerância máxima do micro-organismo, evitando assim redução da taxa de biofixação e/ou perdas para atmosfera (MORAIS; COSTA, 2007; SLOCOMBE; BENEMANN, 2016).

O CO₂ no cultivo de microalgas estimula maior eficiência fotossintética (COSTA et al., 2000) e proporciona altas taxas de crescimento (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016). Outra vantagem do cultivo microalgal é a não competição com culturas alimentares por terras aráveis (LARKUM et al., 2012), além da possibilidade de utilização de efluentes industriais como nutrientes para o seu crescimento (BAICHA et al., 2016; MEIXNER et al., 2016). Portanto, as microalgas são alternativa sustentável para obtenção de fontes de energia renováveis para o futuro (KHOO et al., 2013).

Dentre as microalgas, a *Spirulina* tem sido mundialmente utilizada na alimentação humana devido à sua diversidade e concentração de nutrientes. Em base seca, a *Spirulina* apresenta pelo menos 60% de proteína, sendo o restante composta majoritariamente por lipídios e carboidratos (HENRIKSON, 2009). Entretanto, as condições de cultivo podem ser modificadas a fim de induzir maior produção de biocompostos específicos (SALLA et al., 2016).

A produção de carboidratos configura-se como um campo a ser explorado na pesquisa com cultivo microalgal (COSTA; MORAIS, 2011; MARKOU et al., 2013; SALLA et al., 2016). Alguns estudos confirmaram a potencialidade da *Spirulina* em acumular carboidratos a partir da limitação de fontes de nutrientes (MARKOU et al., 2013; SALLA et al., 2016). Esses carboidratos podem ser utilizados como substratos fermentescíveis para a produção de bioetanol (FREITAS et al., 2017; ROSA et al., 2015), contribuindo para a redução dos efeitos ambientais negativos causados pela emissão de CO₂ para atmosfera (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016). Desta forma, o trabalho teve como objetivo verificar se a redução de nitrogênio associada à injeção de CO₂ em diferentes vazões e tempos de injeção afetam a concentração intracelular de carboidratos na *Spirulina*.

3.1.2 Material e métodos

3.1.2.1 Micro-organismo, meio de cultivo e condições experimentais

A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 (MORAIS et al., 2008) pertencente ao banco de cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica foi utilizada neste estudo. O meio de cultivo Zarrouk modificado (MARTINS et al., 2014) foi empregado para manutenção do inóculo e cultivo da microalga (Tabela 1). Para adaptação do inóculo por 7 d, o bicarbonato de sódio (NaHCO₃) do meio Zarrouk modificado foi substituído por 2% (v v⁻¹) de CO₂ (White Martins, Brasil). Neste período, a mistura do CO₂ com o ar foi injetada a cada 40 min na fase clara dos cultivos por 1 min a 0,05 vvm (mL_{mistura} mL_{meio}⁻¹ min⁻¹) (DUARTE; FANKA; COSTA, 2016).

O ensaio controle foi realizado com meio Zarrouk modificado (8,4 g L⁻¹ de NaHCO₃ e 0,25 g L⁻¹ de NaNO₃). Nos demais ensaios, o NaHCO₃ do meio Zarrouk modificado foi substituído por 10% v v⁻¹ CO₂. O gás foi injetado a cada 40 min na concentração durante o período claro do cultivo. A combinação de diferentes tempos de injeção de CO₂ (1 e 5 min) e vazão 0,05 (DUARTE; FANKA; COSTA, 2016) e 0,3 vvm (MORAES et al., 2016) (mL_{mistura} mL_{meio}⁻¹ min⁻¹) foram estudados para avaliar o comportamento dos cultivos.

Tabela 1 – Composição do meio de cultivo Zarrouk (ZARROUK, 1966) e Zarrouk modificado (MARTINS et al., 2014)

Reagentes	Zarrouk	Zarrouk modificado
	Concentração (g L ⁻¹)	
NaHCO ₃	16,80	8,40
K ₂ HPO ₄	0,50	0,50
NaNO ₃	2,50	0,25
K ₂ SO ₄	1,00	1,00
NaCl	1,00	1,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20	0,20
CaCl ₂	0,04	0,04
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01	0,01
EDTA	0,08	0,08

Solução A₅ (1 mL L⁻¹): (g.L⁻¹): H₃BO₃: 2,86; MnCl₂.4H₂O: 1,81; ZnSO₄.7H₂O: 0,222; CuSO₄.5.H₂O: 0,079; NaMoO₄: 0,015.

Solução B₆ (1 mL L⁻¹): (mg.L⁻¹): NH₄VO₃: 22,96; K₂Cr₂(SO₄)₄. 24H₂O: 96; NiSO₄.7H₂O: 47,85; Na₂WO₄.2H₂O: 17,94; TiOSO₄.H₂SO₄.8H₂O: 61,1; Co(NO₃)₂. 6H₂O: 43,98.

Os experimentos foram realizados em fotobiorreatores do tipo tubular de 2 L (MORAIS; COSTA, 2007), com volume útil de 1,5 L e aeração contínua. A concentração inicial de biomassa foi 0,2 g L⁻¹. Os cultivos tiveram duração de 15 d e foram conduzidos em câmara termostaticada a 30 °C, iluminância de 41,6 μmol_{fótons} m⁻² s⁻¹ (mantida por lâmpadas fluorescentes de 40 W) e fotoperíodo 12 h claro/escuro (MARTINS et al., 2014). A aeração dos ensaios foi realizada por aspersão, através de pedra porosa, utilizando ar comprimido e a vazão de entrada foi controlada através de válvula solenoide. Para manter o volume dos ensaios constantes foi adicionada água estéril para suprir as perdas de meio que ocorreram por evaporação. Os experimentos foram realizados em duplicata.

3.1.2.2 Concentração de biomassa e pH dos cultivos

A concentração de biomassa (X, g L⁻¹) foi monitorada diariamente por densidade óptica a 670 nm em espectrofotômetro (Q7980RM, Quimis, Brasil). Curva de calibração relacionando densidade óptica e peso seco da biomassa foi previamente construída. O pH foi acompanhado diariamente com pHmetro digital (Q400AS, Quimis, Brasil).

3.1.2.3 Carbono inorgânico dissolvido

A concentração de carbono inorgânico foi determinada a cada 3 dias por método indireto, relacionando pH, temperatura e alcalinidade. A alcalinidade foi medida a partir de titulação de 10 mL de amostra com ácido clorídrico (HCl) 0,1 M sob agitação e acompanhamento do pH até chegar a 4,3. O volume de HCl gasto foi utilizado na determinação da alcalinidade total relacionada à concentração de carbono no meio de cultivo (CARMOUZE, 1994).

3.1.2.4 Parâmetros de crescimento celular

A partir da curva de crescimento celular da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foram avaliados os parâmetros: concentração celular máxima ($X_{máx}$, g L⁻¹), produtividade volumétrica de biomassa (P_x , g L⁻¹ d⁻¹) (BAILEY; OLLIS, 1986), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$, d⁻¹) (SCHMIDELL et al., 2001) e tempo de geração (t_g , d) (BAILEY; OLLIS, 1986).

A produtividade volumétrica de biomassa foi obtida através da Equação 1, onde X é a concentração da biomassa (g L⁻¹) no tempo t (d) e X_0 é a concentração da biomassa (g L⁻¹) no tempo t_0 (d). O valor máximo de produtividade por experimento em cada batelada é a produtividade volumétrica máxima ($P_{máx}$, g L⁻¹ d⁻¹).

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

A velocidade específica máxima de crescimento foi obtida através da regressão exponencial aplicada à fase logarítmica de crescimento. O $\mu_{máx}$ é o coeficiente angular desta curva. O tempo de geração foi determinado na fase exponencial de crescimento da microalga, de acordo com a Equação 2.

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

Ao final dos cultivos, a biomassa foi separada do meio líquido por centrifugação (HITACHI himac CR-GIII, Japão) (15200 g, 20 °C, 15 min), ressuspensa em água destilada

e novamente centrifugada nas mesmas condições, para remoção dos sais do meio de cultivo. A biomassa concentrada foi congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriormente utilização nas análises (ROSA et al., 2016).

3.1.2.5 Taxa de biofixação de CO_2

A taxa de biofixação de CO_2 (TOLEDO-CERVANTES et al., 2013) foi calculada assumindo-se que a biomassa de *Spirulina* contém aproximadamente 50% (m m^{-1}) de carbono em composição (BORGES et al., 2013). A fórmula molecular da biomassa microalgal ($\text{CO}_{0,48}\text{H}_{1,83}\text{N}_{0,11}\text{P}_{0,01}$) permite calcular a taxa de biofixação (TB) por meio da Equação 3 (TOLEDO-CERVANTES et al., 2013).

$$\text{TB} = 1,88 \cdot \text{P}_{\text{máx}} \quad (3)$$

3.1.2.6 Quantificação do biopolímero na biomassa

A concentração do biopolímero na biomassa foi determinada por cromatografia gasosa ao final de cada experimento. A biomassa seca ($105\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h) foi submetida a lise celular, hidrólise do polímero e metanólise em 1 mL de clorofórmio, 0,85 mL de metanol e 0,15 mL de ácido sulfúrico a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3,5 h (BRANDL et al., 1988). Os grupos metil éster formados foram analisados em cromatógrafo gasoso (Shimadzu, Japão) equipado com coluna capilar de sílica Restek Rtx-5 (30 m, 0,25 mm, $0,25\mu\text{m}$) e detector de ionização de chama (FID). As condições de operação foram de $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ para injetor e detector. A programação utilizada para separar os metil ésteres foi $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min, taxa de incremento de $25\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até atingir $180\text{ }^{\circ}\text{C}$. A curva de calibração foi construída utilizando como padrão poli (ácido 3-hidroxi-butírico-co-3-hidroxi-valérico) 88 mol % HB e 12 mol % HV (Sigma Aldrich) (BRANDL et al., 1988; ZHANG et al., 2015).

3.1.2.7 Composição proximal da biomassa microalgal

A concentração de carboidratos na biomassa foi determinada conforme o método de fenol-sulfúrico, utilizando curva padrão de glicose (DUBOIS et al., 1956). O método consiste na desidratação dos carboidratos pelo ácido sulfúrico seguida pela subsequente complexação dos produtos formados com o fenol. A concentração de lipídios foi determinada por método

gravimétrico (FOLCH et al., 1957). Este método utiliza a mistura clorofórmio:metanol (2:1) para extração dos lipídios apolares e a mistura de metanol:água (2:1) para extração dos lipídios polares. A concentração de proteínas foi determinada pelo método colorimétrico (LOWRY et al., 1951), utilizando tratamento térmico e alcalino na biomassa e curva padrão de albumina.

3.1.2.8 Produção teórica de etanol

A produção teórica de etanol (P_{Et}) da biomassa (100 g) foi calculada considerando-se a conversão estequiométrica teórica de glicose em etanol (0,511) e a eficiência de conversão de 70% (FREITAS et al., 2017; ROSA et al., 2015).

3.1.2.9 Análise estatística

As respostas das duplicatas foram avaliadas utilizando análise de variância seguida pelo teste de Tukey a um nível de confiança de 95%.

3.1.3 Resultados e discussão

Os ensaios com maior adição de CO_2 (0,3 vvm) e o controle ($NaHCO_3$) apresentaram os maiores crescimentos celulares (Tabela 2). A concentração máxima de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 utilizando 10% ($v v^{-1}$) de CO_2 como fonte de carbono foi obtida no cultivo com vazão de 0,3 vvm e tempo de injeção de 5 min.

Tabela 2 – Concentração celular máxima ($X_{m\acute{a}x}$, $g L^{-1}$), produtividade volumétrica máxima ($P_{m\acute{a}x}$, $g L^{-1} d^{-1}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$, d^{-1}), tempo de geração (t_g , d) e taxa de biofixação máxima ($TB_{m\acute{a}x}$, $g L^{-1} d^{-1}$) dos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 realizados com redução de 90% de nitrogênio, $NaHCO_3$ ou CO_2 em diferentes vazões e tempos de injeção

Ensaio	$X_{m\acute{a}x}$	$P_{m\acute{a}x}$	$\mu_{m\acute{a}x}$	t_g	$TB_{m\acute{a}x}$
8,4 $g L^{-1}$ de $NaHCO_3$	0,97±0,02 ^a	0,07≤0,01 ^a	0,16≤0,01 ^a	4,37±0,02 ^a	-
0,05 vvm, 1 min	0,57±0,09 ^b	0,03≤0,01 ^c	0,08≤0,01 ^b	7,45±0,19 ^b	0,06≤0,01 ^b
0,05 vvm, 5 min	0,63±0,07 ^b	0,05≤0,01 ^b	0,14≤0,01 ^a	4,80±0,01 ^a	0,10±0,01 ^a
0,3 vvm, 1 min	0,71±0,01 ^{ab}	0,06≤0,01 ^b	0,15±0,01 ^a	4,72±0,35 ^a	0,11±0,01 ^a
0,3 vvm, 5 min	0,81±0,01 ^{ab}	0,05≤0,01 ^b	0,15±0,01 ^a	4,71±0,03 ^a	0,10±0,01 ^a

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os ensaios com adição de 0,05 vvm de CO₂ por 1 min apresentaram menor crescimento celular comparado ao experimento com bicarbonato de sódio. Outros parâmetros que corroboram com essa afirmativa são a velocidade específica máxima de crescimento, tempo de geração e produtividade máxima em que o ensaio com menor vazão e tempo de injeção de CO₂ foi significativamente menor que os demais experimentos. Segundo Hille et al. (2013), o fornecimento suficiente de CO₂ para a enzima ribulose-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) representa uma etapa crucial para a conversão de carbono inorgânico em biomassa

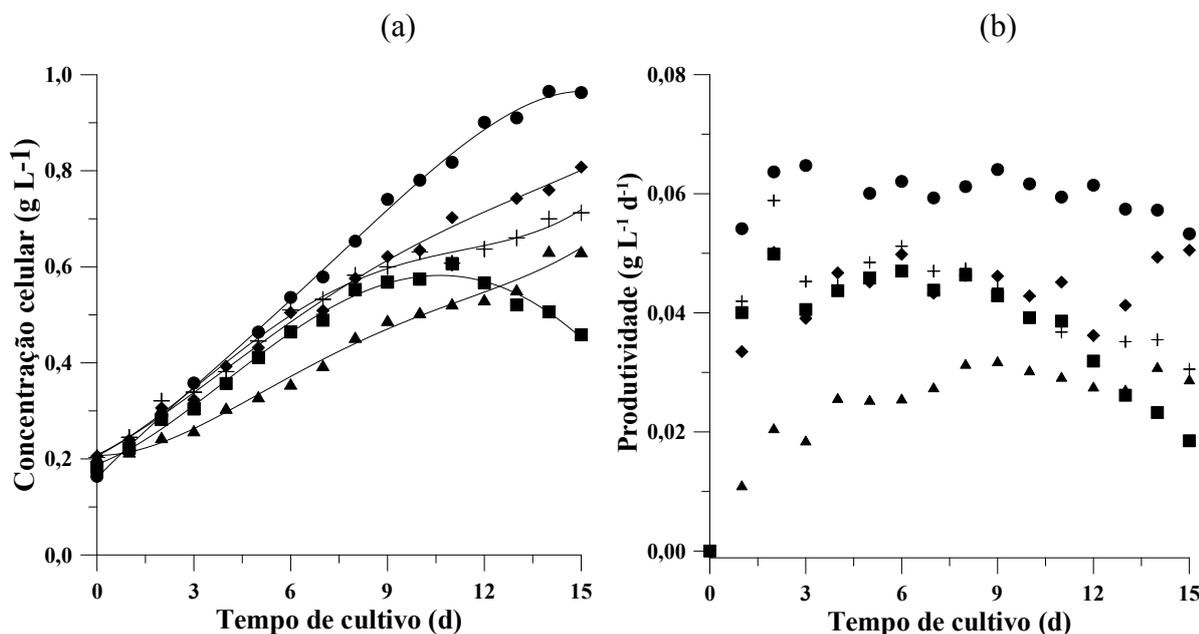
Na curva de crescimento celular da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 (Figura 1a) não ocorreu fase de latência nos experimentos, uma vez que o inóculo estava previamente adaptado ao CO₂. Isso pode ter ocorrido, pois a fase de crescimento é o período no qual são sintetizadas as enzimas necessárias ao metabolismo dos componentes presentes no meio. Com a adaptação do inóculo, o tempo referente ao fenômeno de indução pode ser reduzido ou não existir (SHIMIDELL et al., 2001). Contudo, tanto os ensaios com NaHCO₃ quanto com CO₂ apresentaram concentração de biomassa inferior a 1 g L⁻¹. A baixa concentração de biomassa pode ter ocorrido devido à limitação de nitrogênio nos ensaios, que corresponde a 10% da concentração deste nutriente no meio Zarrouk (COELHO et al., 2015; LOURENÇO, 2006). O nitrogênio é um elemento fundamental presente em três substâncias estruturais das células: ácidos nucleicos, pigmentos fotossintetizantes (clorofilas e ficobilinas) e proteínas. Na limitação deste nutriente, constata-se redução do crescimento celular, proteínas e clorofila. Desta forma, a concentração de produtos de reserva como os carboidratos, pode aumentar em relação aos demais componentes da biomassa (LOURENÇO, 2006).

O bicarbonato de sódio promoveu crescimento celular (Figura 1a) e produtividade volumétrica (Figura 1b) superiores aos ensaios com CO₂. A partir do 13º dia de cultivo, o ensaio com 0,05 vvm e tempo de injeção de 5 min apresentou declínio no crescimento celular.

Segundo Freitas et al. (2016), a enzima Rubisco é estável em condições ótimas de crescimento. Em cultivos com elevadas concentrações desta enzima, ocorre o consumo de quantidade significativa do nitrogênio e do enxofre necessários para o crescimento celular. Assim, a baixa produtividade diária da microalga pode ser atribuída à quantidade limitada de nitrogênio disponível. Corroborando com essa afirmativa, observa-se que os valores de produtividade máxima foram encontrados no 2º dia de cultivo, para os ensaios nas condições 0,05 vvm, 5 min e 0,3 vvm, 1 min, respectivamente e 3º dia para o cultivo com NaHCO₃. No início dos cultivos ainda havia disponibilidade de nutrientes para o crescimento celular. O experimento com vazão de 0,3 vvm por 5 min também apresentou essa tendência no início do cultivo, porém obteve incremento na produtividade a partir do 13º dia de cultivo. Isso pode ter

ocorrido devido a tendência ao acúmulo de compostos de reserva que facilita a biofloculação e promove a precipitação da biomassa (MARKOU et al., 2013). A partir da injeção de ar e CO₂ na maior vazão e tempo de injeção, a biomassa que precipitou no tubular pode ter sido ressuspensa e ter promovido esse aumento na produtividade.

Figura 1 – Curvas de crescimento (a) e produtividade (b) da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com redução de 90% de nitrogênio, NaHCO₃ ou CO₂ em diferentes vazões e tempos de injeção: (●) (8,4 g L⁻¹ de NaHCO₃); (▲) (0,05 vvm, 1 min); (■) (0,05 vvm, 5 min); (+) (0,3 vvm, 1 min) e (◆) (0,3 vvm, 5 min)

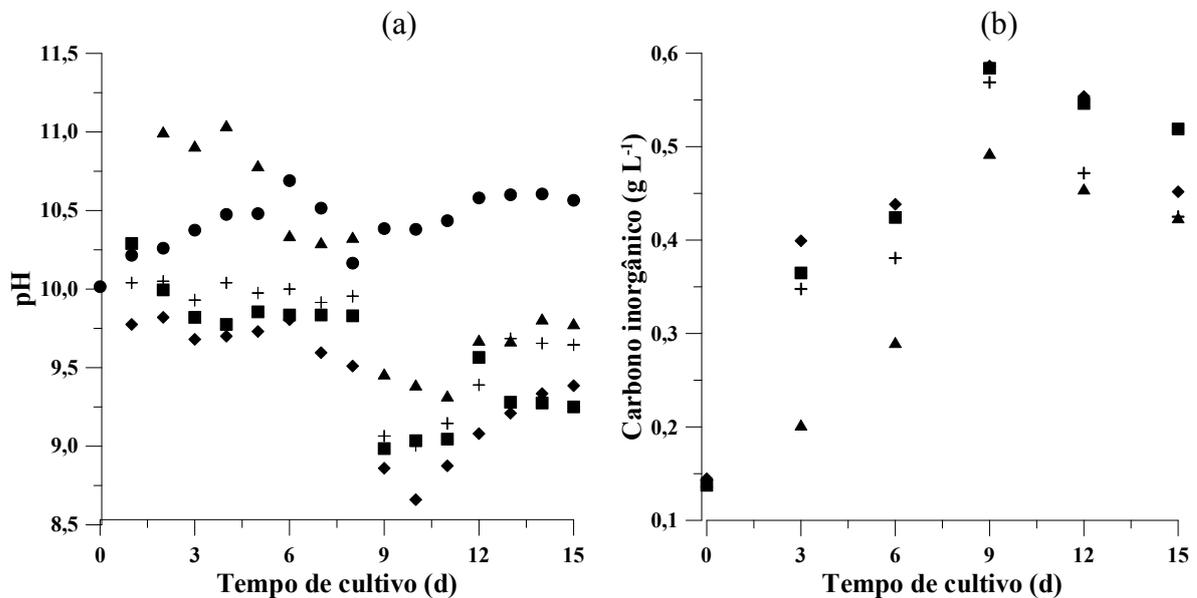


Os pHs nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 variaram de acordo com a vazão, o tempo de injeção e o crescimento celular (Figura 2a). Na maioria dos dias, os cultivos com CO₂ apresentaram pH menores que o ensaio controle, pois a injeção de CO₂ acidificou o meio. Segundo Costa et al. (2002), o cultivo de *Spirulina* requer pH entre 8,3 e 11,0. Nesta faixa de pH há maior disponibilidade de carbonato ou bicarbonato de sódio promovendo condições ótimas de crescimento para o cultivo de *Spirulina* (RADMANN et al., 2011).

Com exceção dos primeiros dias de cultivo do ensaio com 0,05 vvm por 1 min, o pH permaneceu dentro da faixa estabelecida para o crescimento da *Spirulina*. O pH acima de 11 corroborou com o baixo crescimento e produtividade celular da microalga no ensaio com menor vazão e tempo de injeção nos primeiros dias de cultivo. Do 8º ao 9º dia de cultivo ocorreu a redução do pH nos experimentos com CO₂ enquanto que o ensaio com NaHCO₃ se manteve mais estável, uma vez que o bicarbonato exerce ação tamponante. Além disso, nota-se que no 9º dia houve maior concentração de carbono inorgânico nos cultivos (Figura 2b) bem como

maior concentração de HCO_3^- (Figura 3) que interfere na eficiência energética do cultivo. Isso ocorre porque a *Spirulina* contém um mecanismo de concentração de CO_2 (CCM) para elevar os níveis de CO_2 em torno da enzima Rubisco (KLANCHUI et al., 2017). Mangan et al. (2016) afirmam que o pH afeta o acúmulo de carbono inorgânico. O mecanismo de concentração de CO_2 se torna mais eficiente em pH em torno de 8. Isso demonstra que o pH não pode ser negligenciado ao descrever o crescimento de cianobactérias, pois ele interage com as espécies de carbono inorgânico (MANGAN et al., 2016).

Figura 2– pH (a) e concentração de carbono inorgânico dissolvido no meio (b) ao longo dos cultivos nos experimentos com redução de 90% de nitrogênio, NaHCO_3 ou CO_2 em diferentes vazões e tempos de injeção: (●) ($8,4 \text{ g L}^{-1}$ de NaHCO_3); (▲) (0,05 vvm, 1 min); (■) (0,05 vvm, 5 min); (+) (0,3 vvm, 1 min) e (◆) (0,3 vvm, 5 min)

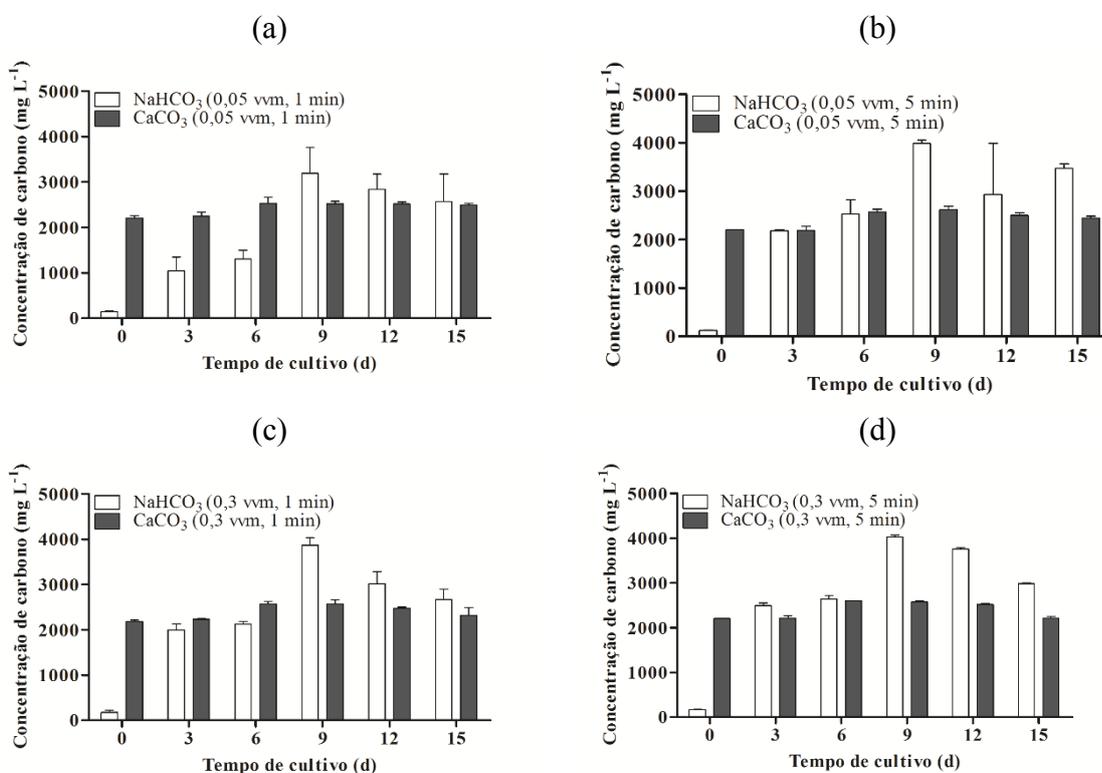


O pH determina a distribuição das espécies químicas (RADMANN et al., 2011). Em pH abaixo de 6 predomina o ácido carbônico, enquanto que em pH entre 6 e 10,5 o bicarbonato (HCO_3^-) é mais abundante. O carbonato (CO_3^{2-}) está presente em maior proporção em pH acima de 10,5 (HILLE et al., 2013). Quanto maior o pH do meio, mais facilmente o CO_2 que está disponível é convertido a CO_3^{2-} (RADMANN et al., 2011). No entanto, a *Spirulina* não tolera pH acima de 11,5 provocando efeitos inibitórios no crescimento (BINAGHI et al., 2003). Este fenômeno pode ser provocado pelo efeito da solução fortemente alcalina sobre a fisiologia celular ou pela baixa concentração de CO_2 livre e HCO_3^- nestas condições.

O carbono inorgânico dissolvido (DIC) corresponde a CO_2 , HCO_3^- e CO_3^{2-} , fonte de carbono para o crescimento microalgal (MORAES et al., 2016). Nos cultivos houve aumento da concentração de carbono inorgânico até o 9º dia de cultivo, após esse período houve uma

redução gradual em todos os experimentos. Isso pode ter comprometido a atividade fotossintética da microalga e aliado ao possível esgotamento da fonte de nitrogênio reduziu a capacidade de biofixar o CO_2 deste micro-organismo. Como a concentração de carbono inorgânico dissolvido está relacionada ao pH, a redução de ambos promoveu o aumento da concentração de HCO_3^- no meio. Nota-se também que a concentração de carbono dissolvido foi menor no ensaio 0,05 vvm, 1 min. Isso comprova que o crescimento reduzido do experimento está relacionado a baixa concentração de carbono inorgânico dissolvido.

Figura 3– Concentração de NaHCO_3 e CaCO_3 nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 com redução de 90% nitrogênio e diferentes vazões (vvm) e tempo de injeção de CO_2 (min)



Quanto ao conteúdo proteico encontrado na biomassa da *Spirulina* (Tabela 3), o maior percentual foi encontrado no ensaio com adição de 0,05 vvm de CO_2 por 1 min a cada 40 min, diferindo significativamente ($p < 0,05$) do ensaio com $8,4 \text{ g L}^{-1}$ de NaHCO_3 . O conteúdo obtido está relacionado ao consumo do nitrogênio pela microalga, pois como ela apresentou crescimento reduzido com 0,05 vvm por 1 min há a tendência de maior tempo de cultivo para esgotar o nitrogênio do meio. A produção de proteínas para o crescimento e a multiplicação celular é favorecida em condições ótimas de crescimento, principalmente quando há nitrogênio disponível no meio. Quando a disponibilidade de nitrogênio é um fator limitante no cultivo

ocorre o acúmulo de compostos de reserva na forma de lipídios e/ou carboidratos (PAES et al., 2016). Nos cultivos com meio Zarrouk a concentração proteínica pode alcançar até 60% (m m^{-1}) (HENRIKSON, 2009), porém neste trabalho as condições de limitação de nitrogênio direcionaram o metabolismo para a produção de carboidratos.

O ensaio com $8,4 \text{ g L}^{-1}$ de NaHCO_3 apresentou maior concentração de carboidratos, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) do ensaio com 0,05 vvm por 1 min. Assim, mesmo alterando a fonte de carbono a microalga continuou produzindo carboidratos. Isso pode ser explicado por que o metabolismo de biofixação de CO_2 pela microalga é capaz de utilizar tanto CO_2 quanto HCO_3^- como substratos através de mecanismos de concentração de carbono inorgânico. Desta forma, quando há quantidade suficiente de carbono inorgânico no meio, a microalga produz quantidades similares de macromoléculas. Os componentes essenciais dos mecanismos de concentração de carbono incluem o transporte ativo de carbono inorgânico para o acúmulo de bicarbonato intracelular e para anidrase carbônica interna visando suprir para Rubisco através da desidratação do bicarbonato acumulado (HO et al., 2011). Os carboidratos produzidos pela microalga podem ser armazenados como compostos de reserva ou transformados em estruturas celulares. A fermentação destes polissacarídeos após a conversão em açúcares fermentescíveis é uma alternativa para a produção de bioetanol (SALLA et al., 2016).

A produtividade teórica de etanol no ensaio com $8,4 \text{ g L}^{-1}$ de NaHCO_3 foi 43,1% (Tabela 3), sendo estatisticamente diferente ($p < 0,05$) do ensaio com 0,05 vvm por 1 min. Freitas et al. (2017) obtiveram a partir do cálculo teórico 39,1 mL etanol em 100 g de biomassa utilizando *Chlorella minutissima* cultivada com pentoses e Rosa et al. (2015) obtiveram 12,8 mL com *Spirulina* sp. LEB 18 utilizando CO_2 e absorvente químico monoetanolamina (MEA). Assim, todos os resultados de produtividade teórica de etanol foram superiores aos obtidos por Rosa et al. (2015), utilizando a mesma cepa de microalga. Markou et al. (2013) limitando fósforo obtiveram entre 60 e 65% de carboidratos em *Spirulina*. Neste estudo, obtivemos resultado similar ao limitar o nitrogênio. Isso comprova que a estratégia de utilizar 10% da fonte de nitrogênio e CO_2 reduz custos com meio de cultivo e tem potencialidade para produção de bioetanol.

Quanto ao conteúdo lipídico na biomassa, os ensaios não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$). Resultados similares para produção de lipídios foram encontrados nos trabalhos de Deamici, Costa e Santos (2016) e Rosa et al. (2016) que obtiveram produção de lipídios entre 7,46 e 11 % (m m^{-1}) utilizando campos magnéticos e absorvente químico, respectivamente.

Tabela 3 – Composição da biomassa (%) e produtividade teórica de etanol (mL em 100 g de biomassa⁻¹) na *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com redução de 90% de nitrogênio, NaHCO₃ ou CO₂ em diferentes vazões e tempos de injeção

Ensaio	PHB	Proteínas	Lipídios	Carboidratos	P _{Et}
8,4 g L ⁻¹ de NaHCO ₃	0,69±0,14 ^a	17,2±1,8 ^b	9,5±0,9 ^a	59,1±0,2 ^a	43,1±0,2 ^a
0,05 vvm, 1 min	0,88±0,45 ^a	26,9±1,6 ^a	8,8±0,7 ^a	39,9±4,3 ^b	29,1±3,2 ^b
0,05 vvm, 5 min	0,45±0,06 ^a	22,5±1,5 ^{ab}	9,3±0,9 ^a	48,3±2,4 ^{ab}	35,2±1,8 ^{ab}
0,3 vvm, 1 min	0,42±0,06 ^a	19,7±1,2 ^{ab}	7,7±0,3 ^a	48,5±2,4 ^{ab}	35,4±2,2 ^{ab}
0,3 vvm, 5 min	0,36±0,08 ^a	20,9±3,3 ^{ab}	6,6±0,5 ^a	49,3±2,5 ^{ab}	36,0±1,8 ^{ab}

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Quanto ao percentual de PHB na biomassa, os teores obtidos não foram significativos entre os ensaios ($p > 0,05$). Campbell et al. (1982) obtiveram a fração mássica 0,06 (% m m⁻¹) de PHB em *Spirulina* durante a fase exponencial de crescimento. Este foi o primeiro estudo utilizando produção autotrófica de PHA com injeção de 5% de CO₂ e 95% de ar e sob iluminação constante. Jau et al. (2005) produziram 0,03 (% m m⁻¹) de PHB em *Spirulina platensis* UMACC 159 e 0,01 (% m m⁻¹) para UMACC 161 e 162 em meio Korasic, sem nitrogênio, suplementado com CO₂ proveniente da injeção de ar, durante 15 dias de cultivo. Apesar do percentual de PHB na biomassa ser reduzido em comparação com outras microalgas, esse estudo é relevante para fins de avaliar a capacidade da produção autotrófica de PHB por *Spirulina*.

3.1.4 Conclusão

Neste artigo prova-se que a redução da fonte de nitrogênio tanto com NaHCO₃ quanto com CO₂ alteraram o crescimento microalgal e a composição da biomassa. Essa estratégia de cultivo pode ser adotada para estimular a produção de carboidratos na *Spirulina*. A adição de 0,3 vvm de CO₂ por 5 min e 8,4 g L⁻¹ de NaHCO₃ proporcionaram a síntese de 49,3 e 59,1% de carboidratos com produção teórica de bioetanol de 36,0 e 43,1%, respectivamente. Tanto os parâmetros cinéticos de crescimento quanto a composição da biomassa e produção de bioetanol não apresentaram diferença significativa entre o uso de NaHCO₃ e as maiores adições de CO₂ (0,3 vvm por 1 ou 5 min). Isso evidencia a possibilidade de utilizar CO₂ oriundo de termelétricas ou de outros processos industriais com as vantagens de redução de custos com nutrientes do meio bem como das emissões desse gás para atmosfera.

Referências

- BAILEY, J. E., OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2. ed. Singapore: McGraw-Hill, 1986.
- BAICHA, Z.; SALAR-GARCÍA, M. J.; ORTIZ-MARTÍNEZ, V. M.; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, F. J.; DE LOS RÍOS, A. P.; LABJAR, N.; LOTFI, E.; ELMAHI, M. A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: a promising low cost substrate for microbial fuel cells. **Fuel Processing Technology**, v. 154, p. 104-116, 2016.
- BINAGHI, L.; DEL BORGE, A.; LODI, A.; CONVERTI, A.; DEL BORGHI, M. Batch and fed-batch uptake of carbon dioxide by *Spirulina platensis*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1341-1346, 2003.
- BORGES, J. A.; ROSA, G. M. MEZA, L. H. R.; SOUZA, M. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* sp. LEB-18 culture using effluent from the anaerobic digestion. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n.2, p. 277-287, 2013.
- BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1977-1982, 1988.
- CAMPBELL, J.; STEVENS JR, E.; BALKWILL. Accumulation of poli- β -hydroxybutyrate in *Spirulina platensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 149, n. 1, p. 361-363, 1982.
- CARMOUZE, J. P. **O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas**. São Paulo: Editora Edgard Blucher: FAPESP, 1994.
- CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNG, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 1, p. 71-80, 1975.
- COELHO, V. C.; SILVA, C. K.; TERRA, A. L.; COSTA, J. A.; MORAIS, M. G. Polyhydroxybutyrate production by *Spirulina* sp. LEB 18 grown under different nutrient concentrations. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, p. 1586-1594, 2015.
- COSTA, J. A. V.; LINDE, G. A.; ATALA, D. I. P.; MIBIELLI, G. M.; KRÜGER, R. T. Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 15-18, 2000.
- COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, p. 603 - 607, 2002.
- COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2-9, 2011.
- 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. 248, p. 168-174, 2016.

- DOTTO, G. L.; CADAVAL, T. R. S.; PINTO, L. A. A. Preparation of bionanoparticles derived from *Spirulina platensis* and its application for Cr(VI) removal from aqueous Solutions. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 18, p. 1925–1930, 2012.
- DUARTE, J. H.; FANKA, L. S.; COSTA, J. A. V. Utilization of simulated flue gas containing CO₂, SO₂, NO and ash for *Chorella fusca* cultivations. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 159-165, 2016.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analitical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
- FERNANDÉZ, F. G. A.; GONZÁLES-LOPES, C. V.; SEVILLA, J. M. F.; GRIMA, E. M. Conversion of CO₂ into biomass by microalgae: how realistic a contribution may it be to significant CO₂ removal? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 577-586, 2012.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.
- FREITAS, B. C. B.; ESQUÍVEL, M. G.; MATOS, R. G.; ARRAIANO, C. M.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Nitrogen balancing and xylose addition enhances growth capacity and protein content in *Chlorella minutissima* cultures. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 129-133, 2016.
- FREITAS, B. C. B.; CASSURIAGA, A. P. A.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Pentoses and light intensity increase the growth and carbohydrate production and alter the protein profile of *Chlorella minutissima*. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 248-253, 2017.
- HENRIKSON, R. **Earth Food Spirulina**. Hawaii: Ronore Enterprises, 2009.
- HILLE, R. V.; FAGAN, M.; BROMFIELD, L.; POTT, R. A modified pH drift assay for inorganic carbon accumulation and external carbonic anhydrase activity in microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 1, p. 377–385, 2013.
- HO, S. H.; CHEN, C.; LEE, D. CHANG, J. Perspectives on microalgal CO₂- emissions mitigation systems – a review. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 189- 198, 2011.
- JAU, M. H.; YEW, S. P.; TOH, P. S. Y.; CHONG, A. S. C. CHU, W. L. PHANG, S. M.; NAJIMUDIN, N.; SUDESH, K. Biosynthesis and mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] by *Spirulina platensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 36, p. 144-151, 2005.
- KHOO, H.; KOH, C.; SHAIK, M.; SHARRATT, P. Bioenergy co-products derived from microalgae biomass via thermochemical conversion–life cycle energy balances and CO₂ emissions. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 298–307, 2013.
- KLANCHUI, A.; CHEEVADHANARAK, S.; PROMMEENATE, P.; MEECHAI, A. Exploring components of the CO₂-Concentrating Mechanism in alkaliphilic cyanobacteria through genome-based analysis. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v.

15, p. 340-350, 2017.

LARKUM, A. W. D.; ROSS, I. L.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 198-205, 2012.

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

LOWRY, O.; ROSENBROUGH, N.; FARR, A.; RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–272, 1951.

MANGAN, N. M.; FLAMHOLZ, A.; HOOD, R. D.; MILO, R.; SAVAGE, D. F. pH determines the energetic efficiency of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 36, p. 5354-5362, 2016.

MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; NERANTZIS, E.; GEORGAKAKIS, D. Bioethanol production by carbohydrate-enriched biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. **Energies**, v. 6, p. 3937-3950, 2013.

MARTINS, R. G.; GONÇALVES, I. S.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Bioprocess engineering aspects of biopolymer production by the cyanobacterium *Spirulina* Strain LEB 18. **International Journal of Polymer Science**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

MEIXNER, K.; FRITZ, I.; DAFFERT, C.; MARKL, K.; FUCHS, W.; DROSG, B. Processing recommendations for using low-solids digestate as nutrient solution for poly-β-hydroxybutyrate production with *Synechocystis salina*. **Journal of Biotechnology**, v. 240, p. 61–67, 2016.

MORAES, L.; ROSA, G. M. R.; 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. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. **Energy Conversion and Management**, v. 29, p. 1349-1352, 2007.

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

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.

NOAA. **National Oceanic and Atmospheric Administration**. 2018. Disponível em: <https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>. Acesso em: 07 de fev. 2018.

PAES, C. R. S.; FARIA, G. R.; TINOCO, N. A. B.; CASTRO, D. J. F. A.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. Growth, nutrient uptake and chemical composition of *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis* oculata under nitrogen starvation. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 44, n. 2, p. 275-292, 2016.

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, p. 3132-3136, 2011.

RIZZA, L. S.; SMACHETTI, M. E. S.; NASCIMENTO, M.; SALERNO, G. L.; CURATTI, L. Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol. **Algal Research**, v. 22, p. 140-147, 2017.

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.

SALLA, A. C. V.; MARGERITES, A. C.; SEIBEL, F. I.; HOLZ, L. C.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 133-141, 2016.

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

SLOCOMBE, S. P.; BENEMANN, J. R. **Microalgal production for biomass and high-value products**. Boca Ratón: CRC Press, 2016.

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.

WUANG, S. C.; KHIN, M. C.; CHUA, P. Q. D.; LUO, Y. D. Use of *Spirulina* biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers. **Algal Research**, v. 15, p. 59-64, 2016.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthèse de *Spirulina maxima*** Geitler. 1966. 96 f. Ph.D. Thesis, University of Paris, Paris, 1966.

ZHANG, Y. Z.; LIU, G. M.; WENG, W. Q.; DING, J. Y.; LIU, S. J. Engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose. **Journal of Biotechnology**, v. 195, p. 82–88, 2015.

ARTIGO 2

AUMENTO DO CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS em *Spirulina* ATRAVÉS DA
UTILIZAÇÃO DE CO₂ E CINZAS PROVENIENTES DE TERMELÉTRICA

3.2 AUMENTO DO CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS em *Spirulina* ATRAVÉS DA UTILIZAÇÃO DE CO₂ E CINZAS PROVENIENTES DE TERMELÉTRICA

Resumo

O aumento gradual da concentração de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera tem sido questão de pesquisa potencial nas últimas décadas, visto que este incremento tem contribuído para a alteração climática global. Neste contexto, o cultivo de microalgas é alternativa para capturar o excesso de CO₂ presente na atmosfera e produzir metabólitos, principalmente carboidratos. Estes carboidratos podem ser utilizados para a geração de bioetanol, afim de substituir combustível de transporte derivado do petróleo, sem alterar a oferta de alimentos e culturas alimentares. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar se a injeção de CO₂ associada ao uso de cinzas e detrimento de nitrogênio afeta a produção de carboidratos intracelulares. A utilização de 10% da fonte de nitrogênio (0,25 g L⁻¹ de NaNO₃) juntamente com a injeção 10% (v v⁻¹) de CO₂ na vazão de 0,3 vvm durante 1 ou 5 min e a adição de 0, 120 e 160 ppm de cinzas alteraram o crescimento celular e a composição da biomassa da microalga. Os ensaios com adição de 120 ppm de cinzas resultaram nos melhores parâmetros cinéticos e taxa de biofixação de CO₂, independentemente do tempo de injeção de CO₂, enquanto que os experimentos com 120 e 160 ppm de cinzas e injeção de CO₂ por 1 min apresentaram 63,3 e 61,0% de carboidratos e 46,2 e 44,6 mL de etanol teórico em 100 g de biomassa, respectivamente. Assim, este estudo representa uma estratégia para incrementar o acúmulo de carboidratos em *Spirulina* com potencial aplicação na produção de bioetanol.

Palavras-chave: Bioetanol. Cianobactéria. Dióxido de Carbono. Resíduos industriais.

ENHANCEMENT OF CARBOHYDRATE CONTENT IN *Spirulina* BY THE USE OF CO₂ AND THERMELECTRIC ASHES

Abstract

The gradual increase in the concentration of carbon dioxide (CO₂) in the atmosphere has been a question of many researches in recent decades, since its concentration increase has contributed to global climate change. In this context, the cultivation of microalgae is an alternative to capture the excess of CO₂ existing in the atmosphere in order to produce metabolites, mainly carbohydrates. These carbohydrates can be applied for the generation of bioethanol in order to replace petroleum-derived transport fuel without changing the supply of food and food crops. Thus, the objective of this study was to evaluate if the injection of CO₂ associated to the use of ashes and detriment of nitrogen affects the production of intracellular carbohydrates. The use of 10% of the nitrogen source (0.25 g L⁻¹ NaNO₃) along with 10% (v v⁻¹) of CO₂ injection in a flow rate of 0.3 vvm for 1 or 5 min and the addition of 0, 120 and 160 ppm of ashes altered cell growth and biomass composition of the microalga. The assays with 120 ppm of ash resulted in the best kinetic parameters and CO₂ biofixation rate, regardless of the CO₂ injection time, while the experiments with 120 and 160 ppm of ash and CO₂ injection for 1 min presented 63.3 and 61.0% of carbohydrates and 46.2 and 44.6 mL of theoretical ethanol in 100 g of biomass, respectively. Thus, this study represents a strategy to increase the accumulation of carbohydrates in *Spirulina* with potential application in the production of bioethanol.

Keywords: Bioethanol. Cyanobacteria. Carbon dioxide. Industrial waste.

3.2.1 Introdução

As mudanças climáticas, caracterizadas especialmente pelo aquecimento global, têm sido um dos principais desafios para a sociedade. Neste sentido, a redução da concentração de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera proveniente da combustão de combustíveis fósseis é um desafio constante, visto que este é um dos principais fatores associados ao aquecimento global (DING et al., 2009; GLEICK et al., 2010). De acordo com o *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA), a concentração média de CO₂ na atmosfera terrestre aumentou significativamente nas últimas décadas, atingindo 407,98 ppm em 2018 (NOAA, 2018).

Adicionalmente, a extensa utilização de combustíveis fósseis contribuiu para a crise energética global e a demanda por energia tem aumentado em todo o mundo. Biocombustíveis, como bioetanol, derivados de culturas alimentares não são suficientes para atender a crescente necessidade de combustíveis para transporte (GHOSH et al., 2016), além de contribuírem para o desmatamento (CHISTI 2007; NEPSTAD et al., 2008). Desta forma, biocombustíveis produzidos a partir do CO₂ biofixado por microalgas poderiam ser uma das alternativas potenciais para reduzir a utilização de biomassa lignocelulósica com base em alimentos (MONDAL et al., 2017).

Dentre as microalgas, a *Spirulina* é uma das mais estudadas devido ao seu alto valor nutricional e à presença de diversos biocompostos de interesse (HENRIKSON, 2009). Diversas fontes de carbono gasoso na forma de CO₂, ou sólido, principalmente na forma de bicarbonato podem ser utilizadas (SCHMITZ; DAL MAGRO; COLLA, 2012). No entanto, o CO₂, menos oneroso que os carbonatos, é a fonte de carbono inorgânico mais utilizada (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016), uma vez que no processo de fotossíntese, as microalgas possuem a capacidade de sintetizar moléculas orgânicas utilizando a energia da luz, CO₂ e H₂O (HELLIER; PURTON; LADOMMATOS, 2015).

O processo natural de sequestro de carbono, definido como biofixação de CO₂, é realizado por todas as plantas terrestres e por alguns micro-organismos fotossintetizantes. Contudo, as plantas são responsáveis por 3 a 6% da biofixação de CO₂ (CUELLAR-BERNUDEZ et al., 2015). Isto contribuiu para o estudo das microalgas, pois elas crescem mais rápido que plantas terrestres e possuem capacidade de biofixação de CO₂ de 10 a 50 vezes maior (COSTA et al., 2000). Além disso, a *Spirulina* possui capacidade de crescer em lagoas de estabilização de cinzas de usina termelétrica (DUARTE et al., 2017).

O carvão brasileiro apresenta elevada concentração de cinzas, aproximadamente 50% na Unidade Termelétrica Presidente Médici (UTPM). Essas cinzas apresentam elementos tóxicos e, portanto, requerem cuidados especiais para sua disposição final. Contudo, as termelétricas brasileiras têm depositado essas cinzas no interior de cavas abandonadas da mina ou até mesmo encostas de córregos e rios promovendo um grave problema ambiental (SOARES; SANTOS; POSSA, 2008). As cinzas provenientes de termelétrica podem ser aproveitadas no cultivo de microalgas, uma vez que possuem minerais necessários ao crescimento microalgal como Fe, Ca, Cu, K e Mg (DUARTE; FANKA; COSTA, 2016; VAZ; COSTA; MORAIS, 2016a; VAZ; COSTA; MORAIS, 2016b). Portanto, a adição de cinzas pode reduzir parcialmente a adição de sais no meio de cultivo. A utilização de CO₂ e cinzas de termelétrica para produção de carboidratos contribui para a sustentabilidade do processo produtivo, uma vez que uma macromolécula pode ser produzida fotoautotroficamente a partir de efluentes sólidos e gasosos de uma indústria altamente poluidora (DUARTE; FANKA; COSTA, 2016). Em vista dos fatores acima mencionados, o objetivo deste estudo foi avaliar se a injeção de CO₂ associada ao uso de cinzas e detrimento de nitrogênio afeta a produção de carboidratos intracelulares.

3.2.2 Material e métodos

3.2.2.1 Micro-organismo e meio de cultivo

A microalga *Spirulina* sp. LEB 18, isolada da Lagoa Mangueira (latitude 33°31'08"S e longitude 53°22'05"W) (MORAIS et al., 2008) e pertencente ao banco de cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica foi utilizada nos experimentos. Esta microalga foi cultivada em meio Zarrouk com 50% da fonte de carbono e 10% da fonte de nitrogênio. O meio Zarrouk modificado apresenta a seguinte composição (g L⁻¹): NaHCO₃ (8,40); K₂HPO₄ (0,50); NaNO₃ (0,25); K₂SO₄ (1,00); NaCl (1,00); MgSO₄·7H₂O (0,20); CaCl₂ (0,04); FeSO₄·7H₂O (0,01); EDTA (0,08); H₃BO₃ (2,86); MnCl₂·4H₂O (1,81); ZnSO₄·7H₂O (0,222); CuSO₄·5H₂O (0,079); Na₂MoO₄ (0,015); em (mg L⁻¹), NH₄VO₃ (22,86); K₂Cr₂(SO₄)₄·24H₂O (96,00); NiSO₄·7H₂O (47,85); Na₂WO₄·2H₂O (17,94); TiOSO₄·H₂SO₄·8H₂O (61,10); Co(NO₃)₂·6H₂O (43,98) (MARTINS et al., 2014).

Para adaptar as microalgas ao CO₂, os inóculos foram mantidos durante 7 d em meio de cultivo mencionado adicionado de 2% (v v⁻¹) de CO₂ em ar. Neste período, a mistura do CO₂

com o ar foi injetada a cada 40 min na fase clara dos cultivos por 1 min a 0,05 vvm ($\text{mL}_{\text{mistura}} \text{mL}_{\text{meio}}^{-1} \text{min}^{-1}$) (DUARTE; FANKA; COSTA, 2016).

3.2.2.2 Cinzas

As cinzas de carvão mineral utilizadas nos experimentos foram provenientes da Usina Termelétrica Presidente Médice - UTPM (Candiota, Brasil). As cinzas foram coletadas em silos de decantação da UTPM, conforme descrito por Vaz, Costa e Moraes (2016a). A composição química das cinzas foi descrita por estes autores.

3.2.2.3 Condições experimentais

Os experimentos foram realizados substituindo os 8,4 g L⁻¹ de NaHCO₃ do meio Zarrouk modificado (MARTINS et al., 2014) por 10% (v v⁻¹) de CO₂ (White Martins, Brasil) em ar injetado na vazão de 0,3 vvm a cada 20 min durante 1 ou 5 min e adição de cinzas provenientes da UTPM nas concentrações de 0, 120 e 160 ppm.

Os experimentos foram realizados em fotobiorreatores do tipo tubular de 2 L (MORAIS; COSTA, 2007a), com volume útil de 1,5 L e concentração inicial de biomassa 0,15 g L⁻¹. A temperatura foi controlada em câmara termostatzada a 30 °C com iluminância de 41,6 $\mu\text{mol}_{\text{fótons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (mantida por lâmpadas fluorescentes de 40 W) e fotoperíodo 12 h claro/escuro (MARTINS et al., 2014). Para manter o volume dos ensaios constantes foi adicionada água estéril afim de suprir as perdas de meio que ocorreram por evaporação. A aeração foi realizada de forma contínua, por aspersão, através de pedra porosa, utilizando ar comprimido e a vazão de entrada foi controlada através de válvula solenóide. Os experimentos foram realizados em duplicata e tiveram duração de 15 d.

3.2.2.4 Determinações analíticas

A concentração de biomassa (X, g L⁻¹) foi monitorada diariamente por densidade óptica a 670 nm em espectrofotômetro (Q7980RM, Quimis, Brasil). Curva de calibração relacionando densidade óptica e peso seco da biomassa foi previamente construída. O pH foi acompanhado diariamente com pHmetro digital (Q400AS, Quimis, Brasil).

A concentração de carbono inorgânico foi determinada a cada 3 dias por método indireto, relacionando pH, temperatura e alcalinidade. A alcalinidade foi medida a partir de

titulação de 10 mL de amostra com ácido clorídrico (HCl) 0,1 M sob agitação e acompanhamento do pH até alcançar 4,3. O volume de HCl gasto foi utilizado na determinação da alcalinidade total relacionada à concentração de carbono no meio de cultivo (CARMOUZE, 1994).

A concentração de nitrogênio foi determinada a cada 3 dias por método colorimétrico, correlacionando os resultados de absorvância com a curva padrão de NaNO₃. O procedimento consistiu em centrifugar 10 mL de inóculo e retirar 200 µL do sobrenadante. Nesta alíquota foram adicionados 0,8 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) com 5 % de ácido salicílico (C₇H₆O₃). Após 20 min foram adicionados 19 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 2 M vagarosamente para obter pH acima de 12. Após o resfriamento foi realizada a leitura de absorvância a 410 nm (CATALDO et al., 1975).

3.2.2.5 Parâmetros cinéticos

A partir da curva de crescimento celular da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foram avaliados os parâmetros: concentração celular máxima ($X_{m\acute{a}x}$, g L⁻¹), produtividade volumétrica de biomassa (P_x , g L⁻¹ d⁻¹) (BAILEY; OLLIS, 1986), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$, d⁻¹) (SCHMIDELL et al., 2001) e tempo de geração (t_g , d) (BAILEY; OLLIS, 1986).

A produtividade volumétrica de biomassa foi obtida através da Equação 1, onde X é a concentração da biomassa (g L⁻¹) no tempo t (d) e X₀ é a concentração da biomassa (g L⁻¹) no tempo t₀ (d). O valor máximo de produtividade por experimento em cada batelada é a produtividade volumétrica máxima ($P_{m\acute{a}x}$, g L⁻¹ d⁻¹).

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

A velocidade específica máxima de crescimento foi obtida através da regressão exponencial aplicada à fase logarítmica de crescimento. O $\mu_{m\acute{a}x}$ é o coeficiente angular desta curva. O tempo de geração foi determinado na fase exponencial de crescimento da microalga, de acordo com a Equação 2.

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad (2)$$

Ao final dos cultivos, a biomassa foi separada do meio líquido por centrifugação (HITACHI himac CR-GIII, Japão) (15200 g, 20 °C, 15 min), ressuspensa em água destilada e novamente centrifugada nas mesmas condições, para remoção dos sais do meio de cultivo. A biomassa concentrada foi congelada a -20 °C para posterior utilização nas análises (ROSA et al., 2016).

3.2.2.6 Taxa de biofixação de CO₂

A taxa de biofixação de CO₂ (TOLEDO-CERVANTES et al., 2013) foi calculada assumindo-se que a biomassa de *Spirulina* contém aproximadamente 50% (m m⁻¹) de carbono em composição (BORGES et al., 2013). A fórmula molecular da biomassa microalgal (CO_{0,48}H_{1,83}N_{0,11}P_{0,01}) permite calcular a taxa de biofixação (TB) por meio da Equação 3 (TOLEDO-CERVANTES et al., 2013).

$$TB = 1,88 \cdot P_{\text{máx}} \quad (3)$$

3.2.2.7 Quantificação do biopolímero na biomassa

A concentração do biopolímero na biomassa foi determinada por cromatografia gasosa ao final de cada experimento. A biomassa seca (105 °C por 24 h) foi submetida a lise celular, hidrólise do polímero e metanólise em 1 mL de clorofórmio, 0,85 mL de metanol e 0,15 mL de ácido sulfúrico a 100 °C por 3,5 h (BRANDL et al., 1988). Os grupos metil éster formados foram analisados em cromatógrafo gasoso (Shimadzu, Japão) equipado com coluna capilar de sílica Restek Rtx-5 (30 m, 0,25 mm, 0,25µm) e detector de ionização de chama (FID). As condições de operação foram de 250 °C para injetor e detector. A programação utilizada para separar os metil ésteres foi 60 °C por 2 min, taxa de incremento de 25 °C min⁻¹ até atingir 180 °C. A curva de calibração foi construída utilizando como padrão poli (ácido 3-hidroxi-butírico-co-3-hidroxi-valérico) 88 mol % HB e 12 mol % HV (Sigma Aldrich) (BRANDL et al., 1988; ZHANG et al., 2015).

3.2.2.8 Composição proximal da biomassa microalgal

A concentração de carboidratos na biomassa foi determinada conforme o método de fenol-sulfúrico, utilizando curva padrão de glicose (DUBOIS et al., 1956). O método consiste

na desidratação dos carboidratos pelo ácido sulfúrico seguida pela subsequente complexação dos produtos formados com o fenol. A concentração de lipídios foi determinada por método gravimétrico (FOLCH et al., 1957). Este método utiliza a mistura clorofórmio:metanol (2:1) para extração dos lipídios apolares e a mistura de metanol:água (2:1) para extração dos lipídios polares. A concentração de proteínas foi determinada pelo método colorimétrico (LOWRY et al., 1951), utilizando tratamento térmico e alcalino na biomassa e curva padrão de albumina.

3.2.2.9 Produção teórica de etanol

A produção teórica de etanol (P_{Et}) da biomassa (100 g) foi calculada considerando-se a conversão estequiométrica teórica de glicose em etanol (0,511) e a eficiência de conversão de 70% (FREITAS et al., 2017; ROSA et al., 2015).

3.2.2.10 Análise estatística

As respostas experimentais foram avaliadas utilizando análise de variância (ANOVA), seguida por teste de Tukey a um nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

3.2.3 Resultados e discussão

Os melhores resultados cinéticos e de biofixação de CO_2 foram observados nos ensaios com adição de 120 ppm de cinzas independente do tempo de injeção de CO_2 (Tabela 1). Apesar dos resultados não terem diferido significativamente ($p > 0,05$), pode-se afirmar pela Figura 1 que as cinzas estimularam o crescimento da microalga. De encontro ao resultado deste estudo, Vaz, Costa e Moraes (2016a) obtiveram $X_{m\acute{a}x}$ de 0,64 g L^{-1} utilizando 120 ppm de cinzas e bicarbonato de sódio como fonte de carbono.

O aumento da velocidade específica máxima de crescimento promove a redução do tempo de geração. Enquanto as microalgas possuem a capacidade de duplicar sua biomassa em menos de 7 dias, as plantas superiores demoram meses ou até mesmo anos (MORAIS; COSTA, 2007b). Neste estudo, a adição de 120 ppm de cinzas e injeção de 10% de CO_2 por 5 min proporcionou menor tempo de geração e maiores velocidade específica máxima e taxa de biofixação de CO_2 quando comparado ao ensaio sem adição de cinzas no mesmo tempo de injeção do gás.

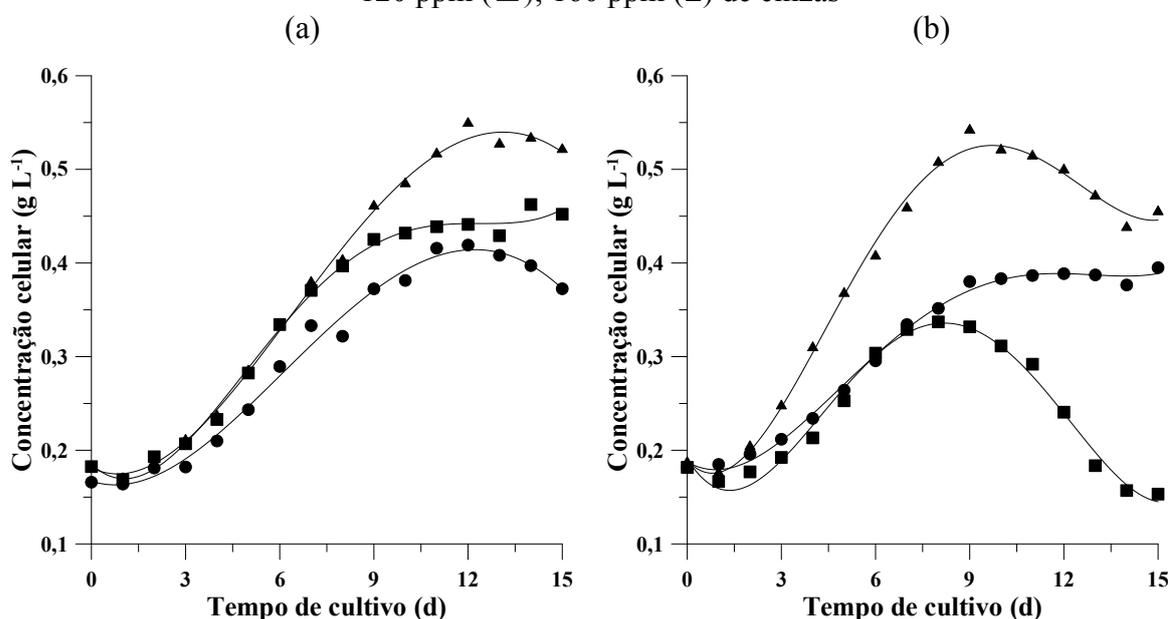
Tabela 1 – Concentração celular máxima ($X_{\text{máx}}$, g L⁻¹), produtividade volumétrica máxima ($P_{\text{máx}}$, g L⁻¹ d⁻¹), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, d⁻¹), tempo de geração (t_g , d) e taxa de biofixação máxima ($TB_{\text{máx}}$, g L⁻¹ d⁻¹) dos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 realizados com redução de 90% de nitrogênio, adição de CO₂ em diferentes tempos de injeção e de cinzas em concentrações distintas

Tempo de injeção de CO ₂ e concentração de cinzas	$X_{\text{máx}}$	$P_{\text{máx}}$	$\mu_{\text{máx}}$	t_g	$TB_{\text{máx}}$
1 min, 0 ppm	0,41±0,12 ^a	0,02±0,00 ^b	0,14±0,01 ^{ab}	4,88±0,22 ^{ab}	0,04±0,02 ^{ab}
1 min, 120 ppm	0,56±0,02 ^a	0,03±0,00 ^{ab}	0,14±0,00 ^{ab}	4,79±0,07 ^{ab}	0,06±0,01 ^{ab}
1 min, 160 ppm	0,48±0,13 ^a	0,03±0,00 ^{ab}	0,14±0,00 ^b	5,11±0,09 ^{ab}	0,05±0,01 ^{ab}
5 min, 0 ppm	0,40±0,04 ^a	0,02±0,00 ^b	0,10±0,01 ^c	7,02±0,49 ^c	0,04±0,01 ^b
5 min, 120 ppm	0,54±0,01 ^a	0,04±0,00 ^a	0,16±0,01 ^a	4,31±0,31 ^a	0,08±0,00 ^a
5 min, 160 ppm	0,35±0,04 ^a	0,02±0,00 ^b	0,13±0,00 ^b	5,32±0,17 ^a	0,04±0,00 ^b

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

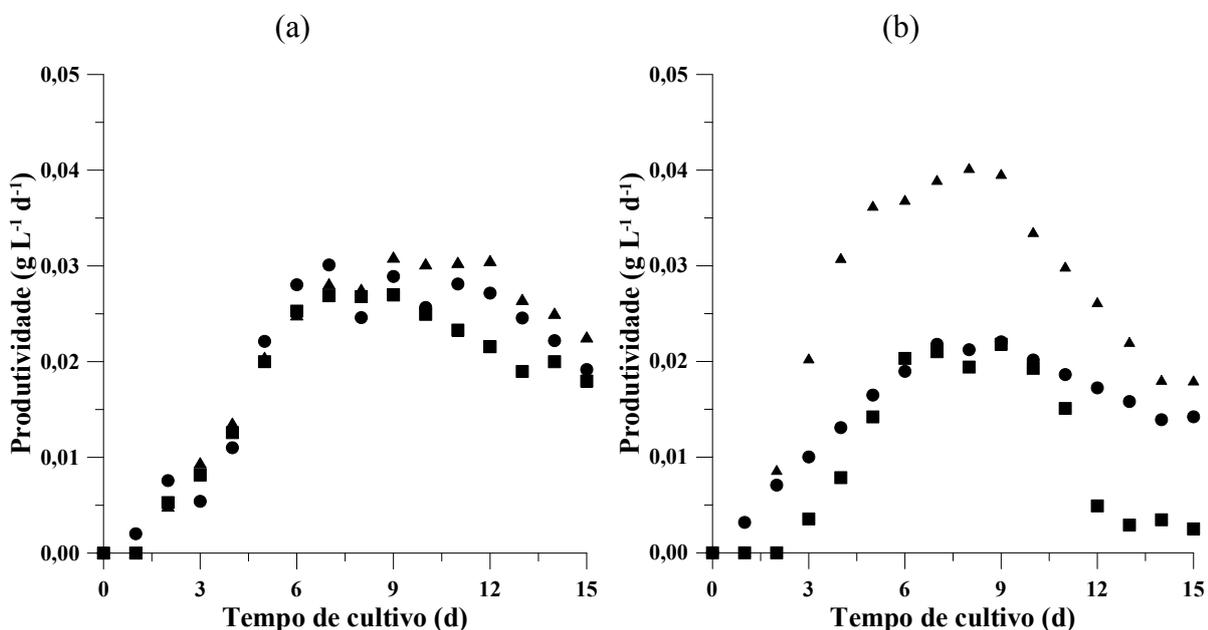
Nas curvas de crescimento celular da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 (Figura 1), observa-se a fase lag nos dois primeiros dias de cultivo. O curto período de latência se deve a microalga possuir as enzimas necessárias para o crescimento, uma vez que estava previamente adaptada ao CO₂. Apesar da cinza ser adicionada aos cultivos, ela não propiciou o aumento da fase de adaptação, uma vez que possui diversos minerais que já são utilizados no meio de cultivo, tais como cobre, cobalto, cromo, manganês, molibdênio, níquel e zinco.

Figura 1– Curvas de crescimento da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com redução de 90% de nitrogênio e adição de CO₂ durante 1 min (a) ou 5 min (b) contendo: 0 ppm (●); 120 ppm (▲); 160 ppm (■) de cinzas



A produtividade da microalga nos ensaios com injeção de CO₂ durante 1 min (Figura 2) apresentou os maiores incrementos até o 6º dia de cultivo. A partir deste período, os ensaios com 120 ppm mostraram-se estáveis por mais 4 dias e depois reduziram a produtividade, enquanto que os ensaios sem cinzas ou com 160 ppm apresentaram redução de produtividade logo após o 6º dia. Em geral, os ensaios com adição de CO₂ durante 1 min, bem como o cultivo com 120 ppm e injeção por 5 min apresentaram produtividades mais elevadas comparado com os ensaios com injeção de CO₂ por 5 min sem adição de cinzas ou com a maior concentração adicionada. O P_{máx} do ensaio com injeção de CO₂ por 5 min e adição de 120 ppm de cinzas foi superior aos demais ensaios e diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos experimentos com o mesmo tempo de injeção sem cinzas e com 160 ppm de cinzas. Apesar das cinzas provenientes da termelétrica possuem minerais necessários ao crescimento microalgal que podem substituir parcialmente os nutrientes do meio de cultivo, a combinação de elevada concentração de cinzas e CO₂ limitou o crescimento celular.

Figura 2– Produtividade diária da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com redução de 90% de nitrogênio e adição de CO₂ durante 1 min (a) ou 5 min (b) contendo: (b) contendo: 0 ppm (●); 120 ppm (▲); 160 ppm (■) de cinzas



Em todas condições experimentais, o nitrogênio disponível no meio de cultivo foi consumido nos seis primeiros dias de experimento (Figura 3a). Isso justifica a redução na taxa de incremento das produtividades ter ocorrido no 6º e 9º dias de cultivo nos ensaios com adição de CO₂ durante 1 e 5 min, respectivamente. Além disso, observa-se o declínio ou estabilização

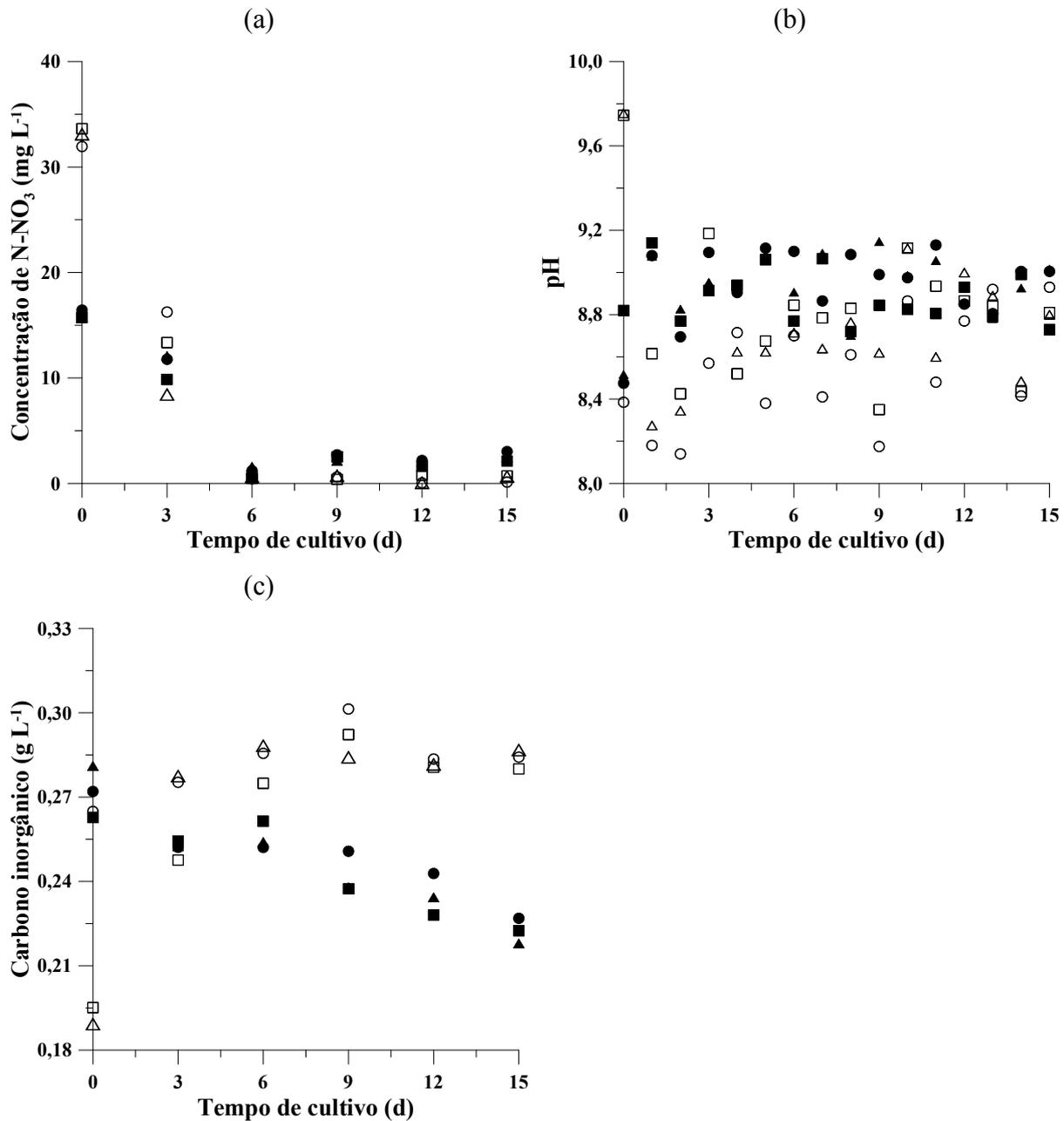
do crescimento em torno do 9º e 11º dia em todos os ensaios, comprovando a importância da fonte de nitrogênio para promover o crescimento celular

A fotossíntese é altamente dependente do nitrogênio para produção de proteínas e clorofila; portanto, quando o fornecimento de nitrogênio é diminuído, a redução da atividade fotossintética pode fornecer nitrogênio para reciclagem (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016). Quando o nitrogênio é abundante, observa-se tendência ao aumento de proteínas e de clorofilas nas células (LOURENÇO, 2006) que permitem elevadas taxas de crescimento e de biofixação de CO₂ pela microalga (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016). Na limitação de nitrogênio, a fotossíntese é desviada da síntese de proteínas para produção de carboidratos ou lipídios (RICHMOND, 2004). Conteúdo maior de carotenoides e menor de clorofilas são produzidos em limitações de nitrogênio, gerando mudança de cor em culturas velhas, que tendem a ter o aspecto amarelado (LOURENÇO, 2006). Essa mudança de cor foi observada nos ensaios após o 8º dia de cultivo, comprovando a limitação de nitrogênio nos cultivos.

O pH inicial do cultivo foi superior nos ensaios com adição de cinzas (Figura 3b). Isso ocorre porque as cinzas do silo de decantação da termelétrica apresentam predomínio de óxidos de silício e de alumínio e também pequenas concentrações de óxidos de cálcio que contribuem para o seu caráter alcalino (SOARES et al., 2006; VAZ; COSTA; MORAIS, 2016). Observou-se que os experimentos com injeção de CO₂ por 1 min apresentaram tendência a pHs superiores àqueles com adição do gás por 5 min. Isso ocorre porque além de ser fonte de carbono, o fornecimento de CO₂ promove a redução do pH do meio (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016). Segundo Costa et al. (2002), o cultivo de *Spirulina* requer pH entre 8,3 e 11,0. Como o pH se manteve dentro dessa faixa durante os experimentos, a injeção de CO₂ não prejudicou o crescimento da microalga.

A concentração de carbono inorgânico dissolvido (DIC) apresentou dois perfis (Figura 3c). Com injeção de CO₂ por 5 min a concentração de carbono inorgânico dissolvido no meio aumentou até atingir valores constantes a partir do 9º dia. A presença de carbono disponível torna a assimilação do nitrogênio mais rápida (PAES et al., 2016). Isso pode ser observado nos ensaios com injeção de CO₂ por 5 min que apesar da maior concentração de NaNO₃, estavam em condições de limitação no 6º dia de cultivo. Quando o gás foi injetado por 1 min, a microalga foi gradativamente utilizando mais CO₂ enquanto crescia. Assim, o CO₂ disponível nos ensaios com injeção foi reduzindo a partir do instante em que houve limitação de nitrogênio. Em bateladas com maior duração ou em modo contínuo esse fenômeno pode ser um problema, pois além da limitação da fonte de nitrogênio também poderá haver a limitação da fonte de carbono, o que prejudicaria a síntese de biomoléculas.

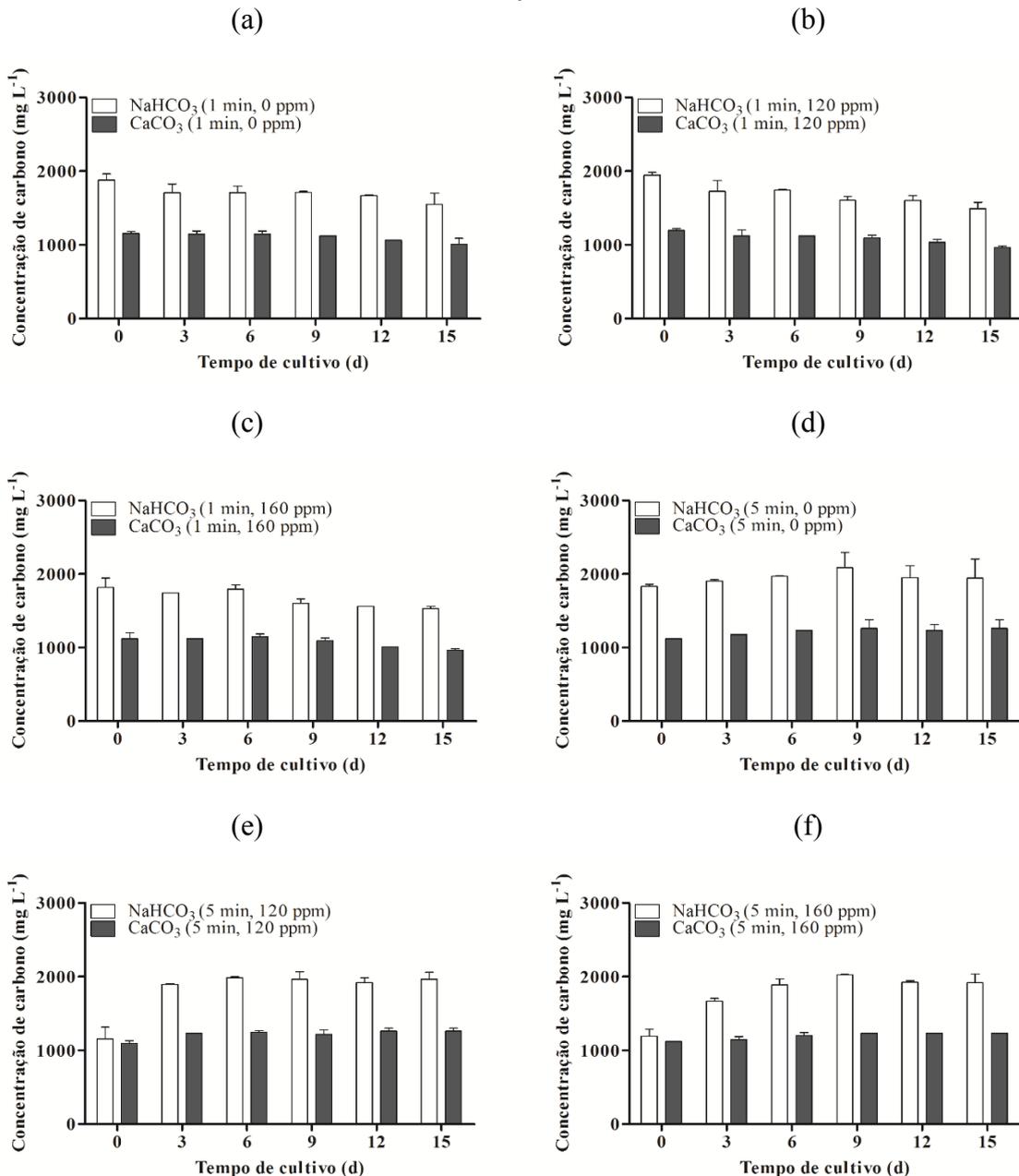
Figura 3– Curvas de nitrogênio (a) pH (b) e carbono inorgânico dissolvido (c) da *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com redução de 90% de nitrogênio, adição de CO₂ em diferentes tempos de injeção e de cinzas em concentrações distintas: (●) 1 min, 0 ppm; (▲) 1 min, 120 ppm; (■) 1 min, 160 ppm; (○) 5 min, 0 ppm; (△) 5 min, 120 ppm; (□) 5 min, 160 ppm



Como a concentração de carbono inorgânico dissolvido no meio representa a fonte de carbono para o crescimento microalgal e consiste nas espécies químicas CO₂, HCO₃⁻ e CO₃²⁻, há uma relação intrínseca entre o DIC e o pH (MORAES et al., 2016). Isso ocorre porque o pH é o principal fator que afeta o mecanismo de concentração de CO₂ e está relacionado ao equilíbrio das espécies químicas (H₂CO₃, CO₂, HCO₃⁻ e CO₃²⁻). Em pH elevado os íons (HCO₃⁻ e CO₃²⁻) são predominantes, enquanto que em pH de 6 a 8, predomina HCO₃⁻. O H₂CO₃ e CO₂

estão presentes em maior quantidade quando o pH está abaixo de 6. (KLANCHUI et al., 2017) Os componentes essenciais do mecanismo de concentração de CO_2 incluem o transporte ativo de acumulação intracelular de bicarbonato e a anidrase carbônica interna para suprir CO_2 para Rubisco por meio da desidratação do bicarbonato acumulado (SPALDING, 2008). Nos experimentos observa-se que o pH encontra-se na maioria dos dias de cultivo entre 8 e 9,2. Desta forma, as espécies HCO_3^- e CO_3^{2-} expressas como NaHCO_3 e CaCO_3 , respectivamente, predominam nos cultivos (Figura 4).

Figura 4 – Concentração de NaHCO_3 e CaCO_3 nos cultivos de *Spirulina* sp. LEB 18 com redução de 90% de nitrogênio, adição de CO_2 em diferentes tempos de injeção e de cinzas em concentrações distintas



Como não há grande variação do pH, a concentração de cada espécie se mantém praticamente constante ao longo de todos os ensaios. A concentração elevada de carbono disponível aliada à limitação de nitrogênio promovem o acúmulo de compostos de reserva. Nas condições estudadas houve aumento expressivo na concentração de carboidratos comparado com estudos sem a redução da fonte de nitrogênio

Em todos os ensaios, os carboidratos foram os componentes em maiores concentrações (Tabela 2). Os experimentos com cinzas e injeção de CO₂ por 1 min apresentaram conteúdo superior a 60% de carboidratos. Segundo Dismukes et al. (2008), muitas microalgas produzem grande quantidade de proteínas, principalmente quando o meio de cultivo é rico em nitrogênio. A produção de carboidratos e outros compostos não nitrogenados é estimulada quando ocorre adição de uma fonte de carbono orgânico ou limitação da fonte de nitrogênio (SALLA et al., 2016). A *Spirulina platensis* possui entre 8 e 14% de carboidratos dependendo das condições de cultivo (BECKER, 2007). No entanto, a limitação de nitrogênio, a injeção de CO₂ e a adição de cinzas propiciaram o incremento do conteúdo de carboidratos em até 450%. A produção de carboidratos ocorre durante o metabolismo de biofixação da microalga por meio da fotossíntese (HO et al., 2011). Esses polissacarídeos podem ser acumulados como composto de reserva ou transformados em componentes da parede celular (MORAES et al., 2016).

Os carboidratos presentes na microalga permitem a sua rápida conversão em açúcares fermentescíveis para produção de bioetanol, uma vez que que esses micro-organismos são desprovidos de lignina nas suas estruturas celulares (CHEN et al., 2013). As maiores produtividades teóricas de bioetanol, 46,2 e 44,6 mL por 100 g de biomassa foram encontradas nos ensaios com injeção de CO₂ por 1 min e adição de 120 e 160 ppm de cinzas, respectivamente. Esse resultado é aproximadamente 350% maior que os 12,8 mL calculados por Rosa et al. (2015) para a mesma microalga. Outro estudo conduzido por Freitas et al. (2017) com *Chlorella minutissima*, microalga que se caracteriza por maior acúmulo de carboidratos que a *Spirulina*, resultou em produtividade teórica de 39,1 mL de etanol teórico por 100g de biomassa. Assim, observamos a potencialidade da nossa estratégia de cultivo para produzir carboidratos e aplicá-los na produção de bioetanol.

Geralmente, a *Spirulina* apresenta aproximadamente 60% de proteínas, sendo o restante majoritariamente carboidratos e lipídios (HENRIKSON, 2009). Neste estudo, o teor de proteínas foi reduzido aproximadamente duas vezes, ficando em torno de 20%. Isso ocorreu devido ao esgotamento da fonte de nitrogênio que reduziu o crescimento e promoveu o direcionamento do metabolismo para a produção de carboidratos.

Quanto ao teor de lipídios, o ensaio com 120 ppm de cinzas diferiu significativamente ($p < 0,05$) do experimento com 120 ppm de cinzas por 5 min. Conforme Becker (2007), a *Spirulina platensis* apresenta de 4 a 9% de lipídios em massa seca. Portanto, não houve alteração relevante no conteúdo lipídico ao adicionar cinzas e limitar o nitrogênio, visto que todos os ensaios se mantiveram nessa faixa de lipídios.

Tabela 2 – Composição da biomassa em % ($m\ m^{-1}$) e produtividade teórica de etanol (mL em 100 g de biomassa $^{-1}$) em *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada com redução de 90% de nitrogênio, diferentes concentrações de CO₂ e cinzas oriundas da UTPM

Tempo de injeção de CO ₂ e concentração de cinzas	PHB	Proteínas	Lipídios	Carboidratos	P _{Et}
1 min, 0 ppm	0,60±0,02 ^{bc}	21,7±0,5 ^a	7,1±0,4 ^{ab}	53,9±4,7 ^{ab}	39,4±3,5 ^{ab}
1 min, 120 ppm	0,53±0,08 ^{bc}	15,1±0,2 ^b	5,7±0,0 ^b	63,3±2,9 ^a	46,2±2,1 ^a
1 min, 160 ppm	0,46±0,08 ^c	16,4±0,8 ^b	6,1±0,7 ^{ab}	61,0±0,4 ^a	44,6±0,3 ^a
5 min, 0 ppm	1,29±0,53 ^{abc}	16,0±1,5 ^b	7,0±0,1 ^{ab}	52,6±3,7 ^{ab}	38,4±2,7 ^{ab}
5 min, 120 ppm	2,15±0,02 ^a	14,8±0,1 ^b	7,9±0,9 ^a	47,1±1,3 ^b	34,4±1,0 ^b
5 min, 160 ppm	1,37±0,11 ^{ab}	17,0±2,4 ^{ab}	7,1±0,1 ^{ab}	46,0±1,4 ^b	33,6±1,0 ^b

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

As microalgas têm capacidade de produzir altas concentrações de PHB alcançando a relação PHB/biomassa seca de 55% ($m\ m^{-1}$) em *Synechococcus* sp. MA19 (NISHIOKA et al., 2001); 38% ($m\ m^{-1}$) em *Synechossystis* sp. (PANDA; MALLICK, 2007) e 44% ($m\ m^{-1}$) em *Spirulina* sp. LEB 18 (MARTINS et al., 2014). Contudo, nas condições estudadas em cultivo autotrófico a máxima concentração de PHB na célula foi 2,15%, utilizando 120 ppm de cinzas e injetando CO₂ por 5 min. Esse resultado foi superior aos de Campbell et al. (1982) que obtiveram 0,06 (% $m\ m^{-1}$) de PHB em relação a biomassa seca, produzida durante a fase exponencial de crescimento. Além disso, estes resultados são superiores aos de Jau et al. (2005) que obtiveram 0,03% de PHB em *Spirulina platensis* UMACC 159 e 0,01 % para UMACC 161 e 162 em meio Korasic, sem nitrogênio, suplementado com CO₂ proveniente da injeção de ar, durante 15 dias de cultivo.

3.2.4 Conclusão

Os ensaios com 120 ppm de cinzas resultaram nos melhores parâmetros cinéticos e taxa de biofixação de CO₂ enquanto o ensaio com 120 ppm de cinzas por 1 min propiciou o maior acúmulo de carboidratos. Assim, observa-se que as condições de cultivo influenciam diretamente a composição da biomassa. Na *Spirulina* sp. LEB 18 a utilização de 10% da concentração de nitrogênio do meio Zarrouk, injeção de 10% de CO₂ e adição de cinzas resultaram em acúmulo de carboidratos pela microalga. Essa estratégia de cultivo é importante para instigar a aplicação destes carboidratos em bioetanol de terceira geração. Além disso, o uso de cinzas de termelétrica e CO₂ representam redução na poluição ambiental e nos custos com o meio de cultivo através do aproveitamento de resíduos sólidos (cinzas) e gasosos (CO₂) como fonte de nutrientes para o cultivo microalgal.

Referências

- BAILEY, J. E., OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2. ed. Singapore: McGraw-Hill, 1986.
- BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology advances**, v. 25, p. 207-210, 2007.
- BORGES, J. A.; ROSA, G. M. MEZA, L. H. R.; SOUZA, M. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* sp. LEB-18 culture using effluent from the anaerobic digestion. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n.2, p. 277-287, 2013.
- BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1977-1982, 1988.
- CAMPBELL, J.; STEVENS JR, E.; BALKWILL. Accumulation of poli- β -hydroxybutyrate in *Spirulina platensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 149, n. 1, p. 361-363, 1982.
- CARMOUZE, J. P. **O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas**. São Paulo: Editora Edgard Blucher: FAPESP, 1994.
- CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNG, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 1, p. 71-80, 1975.
- CHEN, C.Y.; ZHAO, X. Q.; YEN, H. W.; HO, S. H.; CHENG, C. L.; LEE, D. J.; BAI, F. W.; CHANG, J. S. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p.1-10, 2013.

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

COSTA, J. A. V.; LINDE, G. A.; ATALA, D. I. P.; MIBIELLI, G. M.; KRÜGER, R. T. Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 15-18, 2000.

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

CUELLAR-BERMUDEZ, S. P.; GARCIA-PEREZ, J. S.; RITTMANN, B. E.; PARRA-SALDIVAR, R. Photosynthetic bioenergy utilizing CO₂: an approach on flue gases utilization for third generation biofuels. **Journal of Cleaner Production**, v. 98, p. 53-65, 2015.

DING, Z. L.; DUAN, X. N.; GE, Q.S.; ZHANG, Z. Q. Control of atmospheric CO₂ concentration by 2050: A calculation on the emission rights of different countries. **Science in China Series D: Earth Sciences**, v. 52, n. 10, p. 1447–1469, 2009.

DISMUKES, G.C.; CARRIERI, D.; BENNETT, N.; ANANYEV, G.M.; POSEWITZ, M.C. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v.19, p.235–240, 2008.

DUARTE, J. H.; FANKA, L. S.; COSTA, J. A. V. Utilization of simulated flue gas containing CO₂, SO₂, NO and ash for *Chorella fusca* cultivations. **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. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

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

FREITAS, B. C. B.; CASSURIAGA, A. P. A.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Pentoses and light intensity increase the growth and carbohydrate production and alter the protein profile of *Chlorella minutissima*. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 248-253, 2017.

GHOSH, A.; KHANRA, S.; MONDAL, M.; HALDER G.; TIWARI, O.N.; SAINI, S.; BHOWMICK, T. K.; GAYEN, K. Progress toward isolation of strains and genetically engineered strains of microalgae for production of biofuel and other value added chemicals: a review. **Energy Conversion Management**, v. 113, p. 104-118, 2016.

GLEICK, P. H.; ADAMS, R. M.; AMASINO, R. M. et al. Climate change and the integrity of science. **Science**, v. 328, n. 5979, p. 689–690, 2010.

HELLIER, P.; PURTON, S.; LADOMMATOS, N. Molecular structure of photosynthetic microbial biofuel for improved engine combustion and emissions characteristics. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.3, p. 1-12, 2015.

HENRIKSON, R. **Earth Food *Spirulina***. Hawaii: Ronore Enterprises, 2009.

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

JAU, M. H.; YEW, S. P.; TOH, P. S. Y.; CHONG, A. S. C. CHU, W. L. PHANG, S. M.; NAJIMUDIN, N.; SUDESH, K. Biosynthesis and mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] by *Spirulina platensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 36, p. 144-151, 2005.

KLANCHUI, A.; CHEEVADHANARAK, S.; PROMMEENATE, P.; MEECHAI, A. Exploring components of the CO₂-concentrating mechanism in alkaliphilic cyanobacteria through genome-based analysis. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 15, p. 340-350, 2017.

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

LOWRY, O.; ROSENBROUGH, N.; FARR, A.; RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–272, 1951.

MARTINS, R. G.; GONÇALVES, I. S.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Bioprocess engineering aspects of biopolymer production by the cyanobacterium *Spirulina* strain LEB 18. **International Journal of Polymer Science**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

MONDAL, M.; GOSWAMI, S.; GHOSH, A.; OINAM, G.; TIWARI, O. N.; DAS, P.; GAYEN, K.; MANDAL, M. K.; HALDER. Production of biodiesel from microalgae through biological carbon capture: a review. **3 Biotec**, n. 7, v. 99, p. 1-21, 2017.

MORAES, L.; ROSA, G. M. R.; 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. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. **Energy Conversion and Management**, v. 29, p. 1349-1352, 2007a.

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

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

NEPSTAD D. C.; STICKLER, C. M.; FILHO B. S, MERRY, F. Interactions among Amazon land use, forests and climate: prospects for a near-term forest tipping point. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 363, p. 1737- 1746, 2008.

NISHIOKA N, NAKAI K, MIYAKE M, ASADA Y, TAYA M. Production of poly- β -hydroxybutyrate by thermophilic cyanobacteria, *Synechococcus* sp. MA19, under phosphate limitation. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1095-1099, 2001.

NOAA. **National Oceanic and Atmospheric Administration**. 2018. Disponível em: <https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>. Acesso em: 07 de fev. 2018.

PAES, C. R. S.; FARIA, G. R.; TINOCO, N. A. B.; CASTRO, D. J. F. A.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. Growth, nutrient uptake and chemical composition of *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis oculata* under nitrogen starvation. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 44, n. 2, p. 275-292, 2016.

PANDA B., MALLICK N. Enhanced poly- β -hydroxybutyrate accumulation in a unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 2, p.194–198, 2007.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgae culture: biotechnology and applied phycology**. Bodmin: Blackwell Science, 2004.

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.

SALLA, A. C. V.; MARGERITES, A. C.; SEIBEL, F. I.; HOLZ, L. C.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 133-141, 2016.

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

SCHMITZ, R.; DAL MAGRO, C.; COLLA, L. M. Aplicações ambientais das microalgas. **Revista CIATEC**, v. 4, n. 1, p. 48-60, 2012.

SLOCOMBE, S. P.; BENEMANN, J. R. **Microalgal production for biomass and high-value products**. Boca Ratón: CRC Press, 2016.

SOARES, E. R.; MELLO, J. W. V.; SCHAEFER, E. G. R.; COSTA, L. M. Cinza e carbonato de cálcio na mitigação de drenagem ácida em estéril de mineração de carvão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p. 171-181, 2006.

SPALDING, M. H. Microalgal carbon-dioxide-concentrating mechanisms: *Chlamydomonas* inorganic carbon transportes. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 7, p. 1463-1473, 2008.

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. Use of solid waste from thermoelectric plants for cultivation of microalgae. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, p. 1-8, 2016a.

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, p. 418-429, 2016b.

ZHANG, Y. Z.; LIU, G. M.; WENG, W. Q.; DING, J. Y.; LIU, S. J. Engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of poly(3- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose. **Journal of Biotechnology**, v. 195, p. 82-88, 2015.

ARTIGO 3

Chlorella fusca LEB 111 CULTIVADA COM CO₂ E CINZAS DE
TERMELÉTRICA PARA PRODUÇÃO DE MACROMOLÉCULAS

3.3 *Chlorella fusca* LEB 111 CULTIVADA COM CO₂ E CINZAS DE TERMELÉTRICA PARA PRODUÇÃO DE MACROMOLÉCULAS

Resumo

As microalgas são micro-organismos capazes de converter carbono inorgânico em carbono orgânico por meio da fotossíntese, produzindo o esqueleto carbônico de proteínas, carboidratos e lipídios. A quantidade de cada macromolécula pode ser alterada através de modificações no meio de cultivo. A redução da fonte de nitrogênio é um exemplo, outra possibilidade pode ser a utilização de cinzas de termelétrica que possuem minerais presentes no meio de cultivo da microalga e podem estimular a produção de compostos de reserva. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi verificar se a redução do fornecimento de fonte de nitrogênio juntamente com o uso de CO₂ e cinzas de termelétricas alteram a produção de macromoléculas em *Chlorella fusca* LEB 111. A adição de 100 ou 50% da fonte de nitrogênio juntamente com a injeção 10% (v v⁻¹) de CO₂ na vazão de 0,3 vvm durante 5 min a cada 20 min e a adição de 0, 40 e 120 ppm de cinzas alteraram o crescimento e a composição da biomassa da microalga. Neste trabalho observou-se que como 50% da fonte de nitrogênio não limitou esse nutriente. O conteúdo de proteínas não foi prejudicado, paralelamente houve aumento de até 25% no conteúdo de carboidratos. Todos os ensaios apresentaram mais de 10% (m m⁻¹) de lipídios, promovendo uma potencial aplicação na produção de biodiesel. Por fim, a *Chlorella fusca* apresentou crescimento celular e potencialidade para biofixação de CO₂ e para aumentar o acúmulo de carboidratos utilizando CO₂ e cinzas de termelétrica. Uma estratégia para incrementar ainda mais a produção de carboidratos poderia ser a adição menores concentrações de NaNO₃ no meio de cultivo.

Palavras-chave: Bioetanol. Biofixação de CO₂. Carboidratos. Dióxido de carbono. Nitrogênio. Nutrientes.

Chlorella Fusca LEB 111 CULTIVATED WITH CO₂ AND THERMOELECTRIC ASHES FOR PRODUCTION OF MACROMOLECULES

Abstract

Microalgae are microorganisms capable of converting inorganic carbon into organic carbon by photosynthesis, producing the carbonic backbone of proteins, carbohydrates and lipids. The amount of each macromolecule can be altered by modifications in the culture medium. The reduction of the nitrogen source supply is an example, other possibility may be the use of thermoelectric ashes that present several minerals of the microalgae culture medium and may stimulate the production of storage compounds. In this sense, objective of this study was to verify if the reduced supply of the nitrogen source along with the use of CO₂ and thermoelectric ashes alter the production of macromolecules in *Chlorella fusca* LEB 111. The addition of 100 or 50% of the nitrogen source along with the injection of 10% (v v⁻¹) of CO₂ in the flow rate of 0.3 vvm for 5 min every 20 min along with the addition of 0, 40 and 120 ppm of ashes altered the growth and the composition of the microalgae. In this study, it was observed that 50% of the nitrogen source did not limit this nutrient source. Protein content was not impaired, and in parallel there was an increase of up to 25% in the carbohydrate content. All the assays presented more than 10% (m m⁻¹) of lipids, promoting a potential application in biodiesel production. Finally, *Chlorella fusca* has presented cellular growth and potential for biofixation of CO₂ and for enhancing the accumulation of carbohydrates using CO₂ and ashes from thermoelectric. One strategy to further increase carbohydrate production could be to add lower concentrations of NaNO₃ in the culture medium.

Keywords: Bioethanol. Biofixation of CO₂. Carbohydrates. Carbon dioxide. Nitrogen. Nutrients.

3.3.1 Introdução

As mudanças climáticas têm estimulado a busca por alternativas para minimizar os problemas ambientais causados pelo CO₂, que é o principal promotor de gás do efeito estufa na atmosfera (CAMERINI et al., 2016). Nas últimas décadas, diversos métodos para captação de CO₂ atmosférico foram desenvolvidos, sendo eles químicos, físicos e biológicos (SLOCOMBE; BENEMANN, 2016). Entre os métodos biológicos destaca-se o sequestro de CO₂ por microalgas, que apresentam como vantagens produção de biocompostos de elevado valor agregado e eficiência fotossintética aproximadamente 10 vezes maior que a de plantas terrestres (KUMAR; BANERIJEE, DAS, 2014).

Apesar da maior capacidade de biofixação de CO₂ das microalgas outras variáveis precisam ser avaliadas. Nesse sentido, a seleção de cepas de microalgas tem efeito significativo sobre a eficácia e o custo competitivo do processo de biomitigação de CO₂. Os atributos desejáveis à estirpe de microalga incluem taxa crescimento, capacidade elevada de utilização de CO₂ e tolerância aos constituintes traços do gás de combustão (CUELLAR-BERMUDEZ et al., 2015). A microalga *Chlorella fusca* LEB 111 preenche tais atributos, uma vez que foi isolada da lagoa de decantação de cinzas da Usina Termelétrica Presidente Médici (UTPM), Candiota - RS (MORAIS; DUARTE, 2012). Estudos descreveram que espécies nativas de microalgas, como a *Chlorella fusca* LEB 111 apresentam maior tolerância a resíduos sólidos e ao CO₂, bem como maior taxa de biofixação e produtividade de biomassa quando comparadas às espécies isoladas de outros locais (DUARTE et al., 2017; VAZ; COSTA; MORAIS, 2016a, VAZ; COSTA; MORAIS, 2016b).

Adicionalmente, cepas de *Chlorella* apresentam elevado conteúdo proteico (60%) em sua biomassa bem como 18% de carboidratos e 10% lipídios (HENRIKSON, 2009). Contudo, a quantidade de lipídios e carboidratos pode ser incrementada dependendo das condições de cultivo (GUCCIONE et al., 2014). Os lipídios, carboidratos e proteínas podem ser matéria-prima para obtenção de diferentes bioprodutos. Os lipídios extraídos da biomassa podem ser utilizados como matéria-prima para a produção de biodiesel, enquanto que proteínas e pigmentos exibem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticâncer, podendo ser destinados às indústrias farmacêutica e alimentícia. Por fim, os carboidratos podem ser utilizados como fonte de carbono em processos para produção de bioetanol (YEN et al., 2013).

Uma estratégia para estimular o crescimento microalgal bem como para produção de macromoléculas é a utilização de cinzas provenientes dos silos de decantação de cinzas de termelétrica. O carvão brasileiro pós combustão possui aproximadamente 50% de cinzas que

apresentam elementos traços tóxicos. Cuidados especiais precisam ser tomados na destinação destas cinzas. No entanto, a disposição final destas cinzas é muitas vezes o interior das cavas das minas abandonadas ou áreas próximas a rios ou arroios como banhados e terrenos sem uso promovendo poluição ambiental (SOARES; SANTOS; POSSA, 2008). Aplicações das cinzas no cultivo de microalga têm sido exploradas por diversos autores a fim minimizar o problema do acúmulo deste resíduo, uma vez que as cinzas contém diversos minerais, incluindo cobalto, cobre, magnésio, molibdênio e zinco e podem substituir parcialmente os nutrientes necessários ao crescimento microalgal (DUARTE; FANKA; COSTA, 2016; VAZ; COSTA; MORAIS, 2016a; VAZ; COSTA; MORAIS, 2016b). Dessa forma, o objetivo deste estudo foi verificar se a redução do fornecimento de fonte de nitrogênio juntamente com o uso de CO₂ e cinzas de termoeletricas alteram a produção de macromoléculas em *Chlorella fusca* LEB 111.

3.3.2 Material e métodos

3.3.2.1 Micro-organismo e meio de cultivo

A microalga *Chlorella fusca* LEB 111, isolada da lagoa de decantação de cinzas da Termelétrica Presidente Médici - UTPM (Candiota, Brasil) (MORAIS; DUARTE, 2012) e pertencente ao banco de cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica foi utilizada neste estudo. Esta microalga foi mantida em meio BG-11 (RIPPKA et al., 1979) sem fonte de carbono, apresentando a seguinte composição (g L⁻¹): NaNO₃ (1,50); K₂HPO₄.3H₂O (0,04); MgSO₄.7H₂O (0,075); CaCl₂.2H₂O (0,036); C₆H₁₁FeNO₇ (0,006); C₁₀H₁₄N₂Na₂.2H₂O (0,001); C₆H₈O₇ (0,006); ZnSO₄.7H₂O (0,222); MnCl₂.4H₂O (1,81); Na₂MoO₄.2H₂O (0,390); H₃BO₃ (2,86); CuSO₄.5H₂O (0,079); Co(NO₃)₂.6H₂O (0,0494).

3.3.2.2 Cinzas

As cinzas de carvão mineral utilizada no estudo foram provenientes da UTPM. As cinzas foram coletadas em silos de decantação, conforme descrito por Vaz, Costa e Morais (2016a). A composição química das cinzas foi descrita por estes autores.

3.3.2.3 Condições experimentais

O ensaio controle foi realizado com meio BG-11. Nos demais ensaios, o Na_2CO_3 do meio BG-11 foi substituído por 10% (v v⁻¹) de CO_2 (White Martins, Brasil) injetado na vazão de 0,3 vvm a cada 20 min durante 5 min e adição de cinzas provenientes da UTPM nas concentrações de 0, 40 e 120 ppm. Para cada condição de cultivo foram testados 100% e 50% da fonte de nitrogênio do meio BG-11.

Os experimentos foram conduzidos em fotobiorreatores do tipo tubular de 2 L, com volume útil de 1,5 L (MORAIS; COSTA, 2007) e concentração inicial de biomassa 0,15 g L⁻¹. A temperatura foi controlada em câmara termostaticada a 30 °C com iluminância de 41,6 $\mu\text{mol}_{\text{fótons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (mantida por lâmpadas fluorescentes de 40 W) e fotoperíodo 12 h claro/escuro (MARTINS et al., 2014). Para manter o volume dos ensaios constantes foi adicionada água estéril afim de suprir as perdas de meio que ocorreram por evaporação. A aeração foi realizada de forma contínua, por aspersão, através de pedra porosa, utilizando ar comprimido e a vazão de entrada foi controlada através de válvula solenóide. Os experimentos foram realizados em duplicata e tiveram duração de 15 d.

3.3.2.4 Determinações analíticas

A concentração de biomassa (X , g L⁻¹) foi monitorada diariamente por densidade óptica a 670 nm em espectrofotômetro (Q7980RM, Quimis, Brasil). Curva de calibração relacionando densidade óptica e peso seco da biomassa foi previamente construída. O pH foi acompanhado diariamente com pHmetro digital (Q400AS, Quimis, Brasil).

A concentração de carbono inorgânico foi determinada por método indireto, relacionando pH, temperatura e alcalinidade. A alcalinidade foi medida a partir de titulação de 10 mL de amostra com ácido clorídrico (HCl) 0,1 M sob agitação e acompanhamento do pH até alcançar 4,3. O volume de HCl gasto foi utilizado na determinação da alcalinidade total relacionada à concentração de carbono no meio de cultivo (CARMOUZE, 1994).

A concentração de nitrogênio foi determinada por método colorimétrico, correlacionando os dados de absorvância com a curva padrão de NaNO_3 . O procedimento consistiu em centrifugar 10 mL de inóculo e retirar 200 μL do sobrenadante. Nesta alíquota foram adicionados 0,8 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) com 5 % de ácido salicílico ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$). Após 20 min foram adicionados 19 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 2 M vagorosamente para

obter pH acima de 12. Após o resfriamento foi realizada a leitura de absorvância a 410 nm (CATALDO et al., 1975).

3.3.2.5 Parâmetros cinéticos

A partir da curva de crescimento celular da microalga *Chlorella fusca* LEB 111 foram avaliados os parâmetros: concentração celular máxima ($X_{\text{máx}}$, g L⁻¹), produtividade volumétrica de biomassa (P_x , g L⁻¹ d⁻¹) (BAILEY; OLLIS, 1986), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, d⁻¹) (SCHMIDELL et al., 2001) e tempo de geração (t_g , d) (BAILEY; OLLIS, 1986).

A produtividade volumétrica de biomassa foi obtida através da Equação 1, onde X é a concentração da biomassa (g L⁻¹) no tempo t (d) e X_0 é a concentração da biomassa (g L⁻¹) no tempo t_0 (d). O valor máximo de produtividade por experimento em cada batelada é a produtividade volumétrica máxima ($P_{\text{máx}}$, g L⁻¹ d⁻¹).

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

A velocidade específica máxima de crescimento foi obtida através da regressão exponencial aplicada à fase logarítmica de crescimento. O $\mu_{\text{máx}}$ é o coeficiente angular desta curva. O tempo de geração foi determinado na fase exponencial de crescimento da microalga, de acordo com a Equação $t_g = \ln(2)/\mu_{\text{máx}}$.

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

Ao final dos cultivos, a biomassa foi separada do meio líquido por centrifugação (HITACHI himac CR-GIII, Japão) (15200 g, 20 °C, 15 min), ressuspendida em água destilada e novamente centrifugada nas mesmas condições, para remoção dos sais do meio de cultivo. A biomassa concentrada foi congelada a -20 °C para posterior utilização nas análises (ROSA et al., 2016).

3.3.2.6 Taxa de biofixação de CO₂

A taxa de biofixação de CO₂ (TOLEDO-CERVANTES et al., 2013) foi calculada assumindo-se que a biomassa da microalga contém aproximadamente 50% (m m⁻¹) de carbono em composição (BORGES et al., 2013). A fórmula molecular da biomassa microalgal (CO_{0,48}H_{1,83}N_{0,11}P_{0,01}) permite calcular a taxa de biofixação (TB) por meio da Equação 3 (TOLEDO-CERVANTES et al., 2013).

$$TB = 1,88 \cdot P_{\text{máx}} \quad (3)$$

3.3.2.7 Quantificação do biopolímero na biomassa

A concentração do biopolímero na biomassa foi determinada por cromatografia gasosa ao final de cada experimento. A biomassa seca (105 °C por 24 h) foi submetida a lise celular, hidrólise do polímero e metanólise em 1 mL de clorofórmio, 0,85 mL de metanol e 0,15 mL de ácido sulfúrico a 100 °C por 3,5 h (BRANDL et al., 1988). Os grupos metil éster formados foram analisados em cromatógrafo gasoso (Shimadzu, Japão) equipado com coluna capilar de sílica Restek Rtx-5 (30 m, 0,25 mm, 0,25µm) e detector de ionização de chama (FID). As condições de operação foram de 250 °C para injetor e detector. A programação utilizada para separar os metil ésteres foi 60 °C por 2 min, taxa de incremento de 25 °C min⁻¹ até atingir 180 °C. A curva de calibração foi construída utilizando como padrão poli (ácido 3-hidroxitúrico-co-3-hidroxitúrico) 88 mol % HB e 12 mol % HV (Sigma Aldrich) (BRANDL et al., 1988; ZHANG et al., 2015).

3.3.2.8 Composição proximal da biomassa microalgal

A concentração de carboidratos na biomassa foi determinada conforme o método de fenol-sulfúrico, utilizando curva padrão de glicose (DUBOIS et al., 1956). O método consiste na desidratação dos carboidratos pelo ácido sulfúrico seguida pela subsequente complexação dos produtos formados com o fenol. A concentração de lipídios foi determinada por método gravimétrico (FOLCH et al., 1957). Este método utiliza a mistura clorofórmio:metanol (2:1) para extração dos lipídios apolares e a mistura de metanol:água (2:1) para extração dos lipídios polares. A concentração de proteínas foi determinada pelo método colorimétrico (LOWRY et al., 1951), utilizando tratamento térmico e alcalino na biomassa e curva padrão de albumina.

3.3.2.9 Produção teórica de etanol

A produção teórica de etanol (P_{Et}) da biomassa (100 g) foi calculada considerando-se a conversão estequiométrica teórica de glicose em etanol (0,511) e a eficiência de conversão de 70% (FREITAS et al., 2017; ROSA et al., 2015).

3.3.2.10 Análise estatística

As respostas experimentais foram avaliadas utilizando análise de variância (ANOVA), seguida por teste de Tukey a um nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

3.3.3 Resultados e discussão

Os experimentos com CO_2 e 40 ppm de cinzas apresentaram velocidade específica máxima superior ($p < 0,05$) e menor tempo de geração que ensaio controle com meio BG-11, demonstrando a potencialidade da utilização de cinzas e CO_2 para o cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111 (Tabela 1).

Tabela 1 – Concentração celular máxima ($X_{m\acute{a}x}$, g L⁻¹), produtividade volumétrica máxima ($P_{m\acute{a}x}$, g L⁻¹ d⁻¹), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$, d⁻¹), tempo de geração (t_g , d) e taxa de biofixação máxima ($TB_{m\acute{a}x}$, g L⁻¹ d⁻¹) dos experimentos com *Chlorella fusca* LEB 111 cultivada com diferentes fontes de carbono, concentrações de cinzas e de nitrogênio

Fonte de Carbono, concentração de cinzas	$X_{m\acute{a}x}$	$P_{m\acute{a}x}$	$\mu_{m\acute{a}x}$	t_g	$TB_{m\acute{a}x}$
100 % NaNO ₃					
Na ₂ CO ₃ , 0 ppm	2,23±0,09 ^a	0,16±0,01 ^a	0,27±0,01 ^b	2,57±0,08 ^a	-
CO ₂ , 0 ppm	1,68±0,08 ^{bc}	0,15±0,03 ^a	0,27±0,02 ^b	2,57±0,17 ^a	0,29±0,05 ^a
CO ₂ , 40 ppm	1,68±0,17 ^{bc}	0,18±0,03 ^a	0,33±0,01 ^a	2,12±0,05 ^b	0,34±0,05 ^a
CO ₂ , 120 ppm	1,80±0,05 ^b	0,18±0,01 ^a	0,29±0,00 ^{ab}	2,43±0,03 ^{ab}	0,34±0,01 ^a
50% de NaNO ₃					
Na ₂ CO ₃ , 0 ppm	1,61±0,05 ^{bcd}	0,19±0,00 ^a	0,31±0,01 ^{ab}	2,24±0,09 ^{ab}	-
CO ₂ , 0 ppm	1,34±0,01 ^d	0,20±0,05 ^a	0,28±0,01 ^{ab}	2,45±0,12 ^{ab}	0,38±0,08 ^a
CO ₂ , 40 ppm	1,43±0,10 ^{cd}	0,21±0,04 ^a	0,32±0,01 ^a	2,15±0,07 ^b	0,40±0,07 ^a
CO ₂ , 120 ppm	1,54±0,01 ^{bcd}	0,22±0,04 ^a	0,31±0,00 ^{ab}	2,22±0,01 ^{ab}	0,41±0,07 ^a

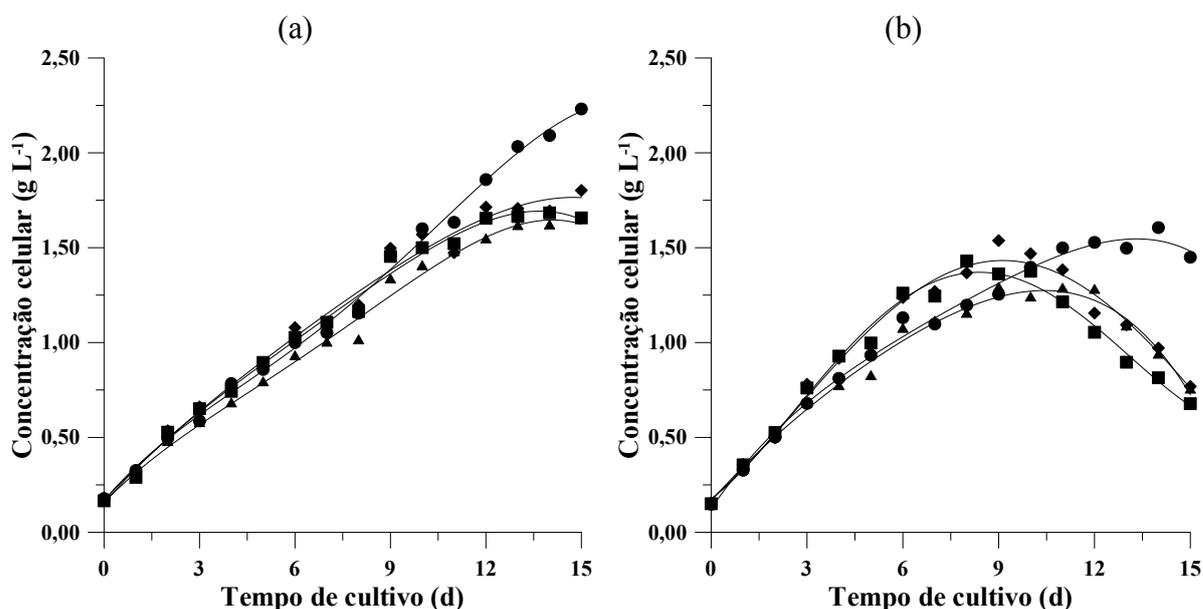
*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Segundo Chisti (2007), as microalgas podem duplicar a sua concentração de biomassa em aproximadamente 24 h. No presente estudo, obtivemos a duplicação celular em aproximadamente 48 horas.

A concentração celular máxima foi obtida utilizando Na_2CO_3 como fonte de carbono e 100% de NaNO_3 , que corresponde aos nutrientes disponíveis no meio BG-11. Esse resultado foi significativamente superior ($p < 0,05$) aos ensaios com CO_2 e com redução de nitrogênio, independente da concentração de cinzas. Apesar disso, não houve diferença significativa em relação a produtividade máxima e taxa de biofixação máxima dos ensaios ($p > 0,05$). Maiores taxas de produtividade máxima resultam em incremento na taxa de biofixação máxima (TOLEDO-CERVANTES et al., 2013). A taxa de biofixação máxima deste estudo foi superior ao trabalho de Duarte, Fanka e Costa (2016) que obtiveram de 0,19 a 0,25 ($\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$), utilizando gás de combustão simulado contendo 10% de CO_2 .

Na curva de crescimento celular da microalga *Chlorella fusca* LEB 111 (Figura 1), observou-se que a redução de nitrogênio exerceu maior influência no crescimento da microalga que a adição de cinzas ou CO_2 . Isso ocorre porque a microalga foi isolada da lagoa de decantação de cinzas da Unidade Termelétrica Presidente Médici. Portanto, a *Chlorella fusca* LEB 111 está adaptada ao ambiente elevada concentração de resíduos sólidos e gasosos e não apresentou fase de latência.

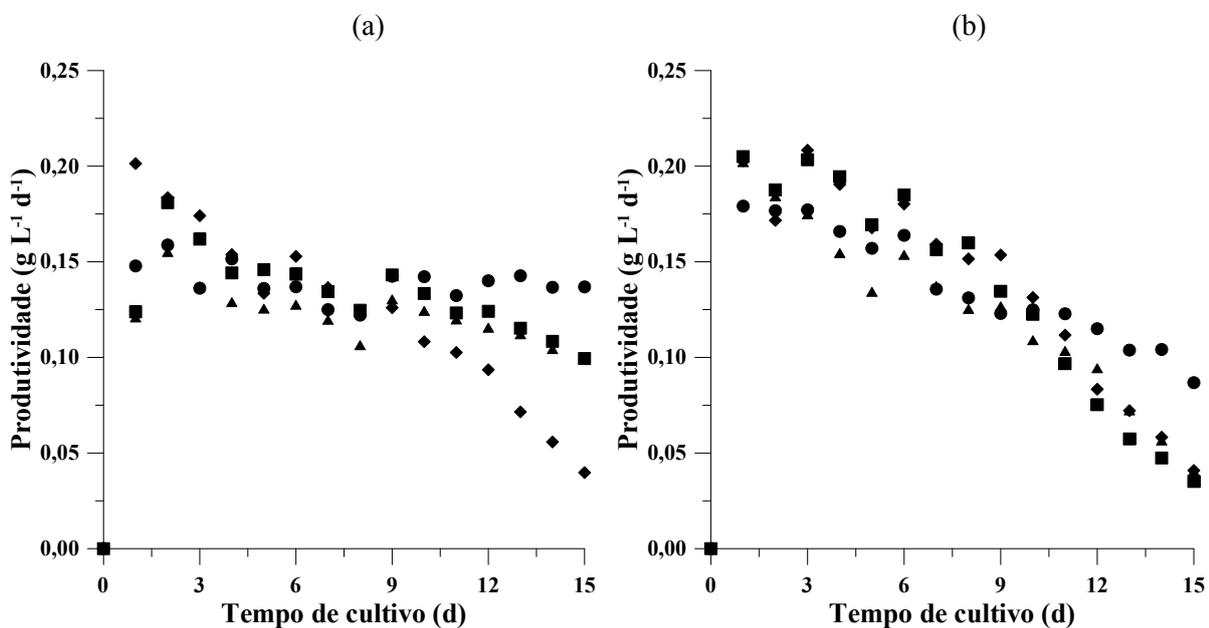
Figura 1 – Curvas de crescimento de *Chlorella fusca* LEB 111 cultivada com diferentes fontes de carbono e concentrações de cinzas, 100% (a) e 50% (b) de NaNO_3 : (●) Na_2CO_3 , 0 ppm; (▲) CO_2 , 0 ppm; (■) CO_2 , 40 ppm e (◆) CO_2 , 120 ppm



Nos cultivos apenas o ensaio controle com BG-11 foi finalizado na fase exponencial de crescimento, enquanto que nos ensaios com adição de CO₂ com 100% da fonte de nitrogênio, a fase estacionária iniciou a partir do 12º dia de cultivo. Nos ensaios com redução de 50% de NaNO₃, apenas o experimento com Na₂CO₃ entrou em fase estacionária no 11º dia de cultivo enquanto os ensaios com CO₂ estavam todos em fase de declínio no mesmo período de cultivo devido à baixa quantidade de nitrogênio disponível para o crescimento celular

Os maiores valores de produtividade foram obtidos no início do cultivo, quando havia abundância de nutrientes para o crescimento celular (Figura 2). Yoo et al. (2010) obtiveram produtividade de 0,10 g L⁻¹ d⁻¹ no 14º dia de cultivo de *Chlorella vulgaris* utilizando meio BG-11 suplementado com 10% de CO₂. Esse resultado é similar ao encontrado no presente estudo com 100% da fonte de nitrogênio, exceto para o ensaio com adição de 120 ppm de cinzas que apresentou a maior redução de produtividade ao longo do tempo de cultivo. Ao reduzir a fonte de nitrogênio em 50% houve redução gradual da produtividade em todos ensaios.

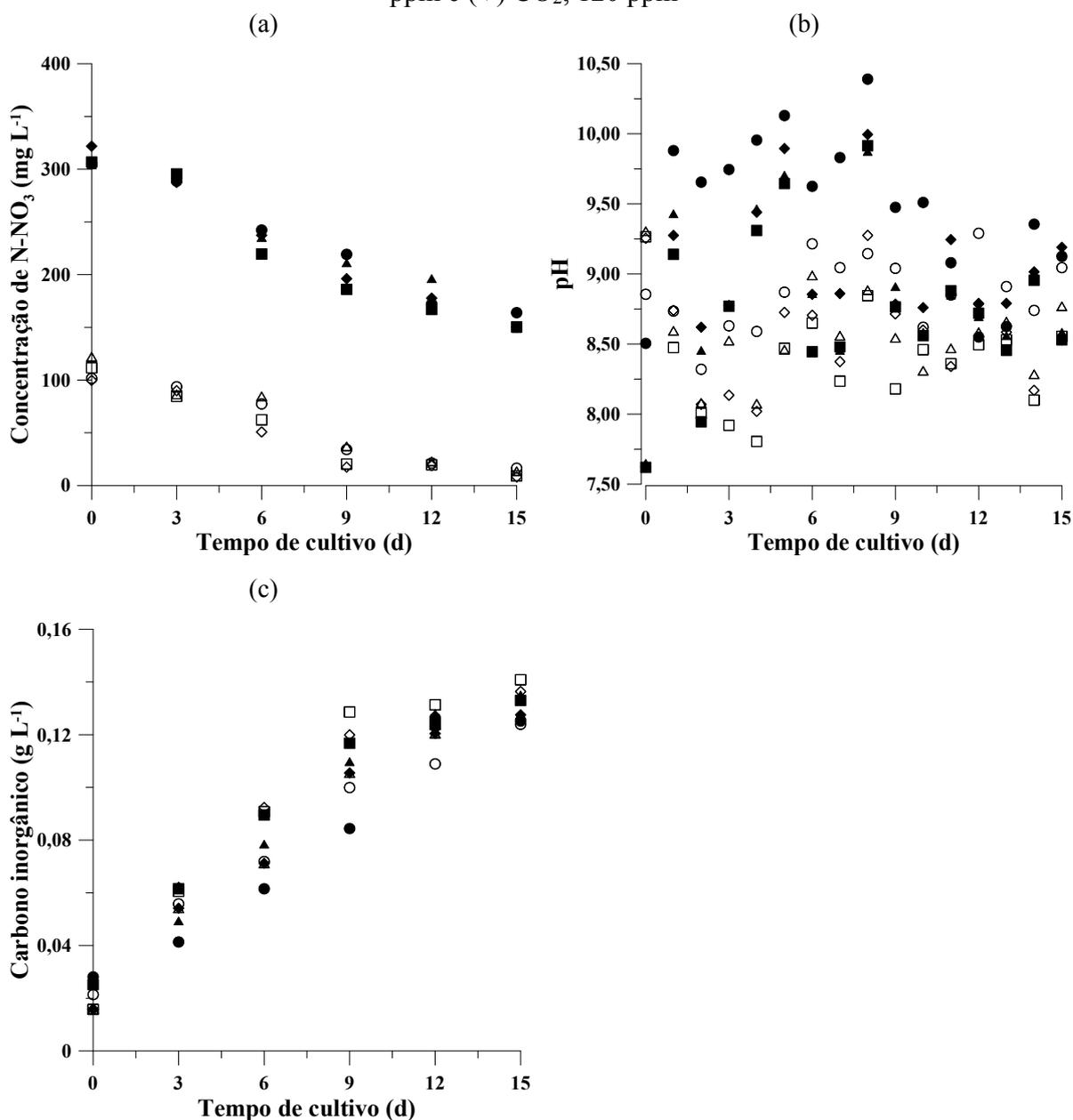
Figura 2– Curvas de produtividade da microalga *Chlorella fusca* LEB 111 cultivada com diferentes fontes de carbono e concentrações de cinzas, 100% (a) e 50% (b) de NaNO₃: (●) Na₂CO₃, 0 ppm; (▲) CO₂, 0 ppm; (■) CO₂, 40 ppm e (◆) CO₂, 120 ppm



Nos ensaios com 50% de NaNO₃ houve tendência ao esgotamento da fonte de nitrogênio ao longo dos 15 d de cultivo (Figura 3a). O nitrogênio é um elemento essencial para produção de ácidos nucleicos, pigmentos fotossintetizantes e proteínas. Com a redução da quantidade de nitrogênio houve menor disponibilidade deste nutriente para a síntese destas substâncias estruturais da célula necessárias ao crescimento celular (LOURENÇO, 2006),

promovendo menor concentração celular e produção de biomassa após o 8º dia de cultivo. Portanto, devido a menor disponibilidade de nitrogênio no meio, todos os ensaios com adição de CO₂ e redução de nitrogênio alcançaram a fase de declínio no 11º dia de cultivo. Outra observação importante é que a presença de carbono disponível torna a assimilação do nitrogênio mais rápida, propiciando maior crescimento do cultivo por meio da síntese de aminoácidos (PAES et al., 2016).

Figura 3 – Curvas de nitrogênio (a), pH (b) e carbono inorgânico dissolvido (c) da microalga *Chlorella fusca* LEB 111 cultivada com diferentes fontes de carbono e diferentes concentrações de cinzas, 100% de NaNO₃: (●) Na₂CO₃, 0 ppm; (▲) CO₂, 0 ppm; (■) CO₂, 40 ppm e (◆) CO₂, 120 ppm; e 50% de NaNO₃ (○) Na₂CO₃, 0 ppm; (△) CO₂, 0 ppm; (□) CO₂, 40 ppm e (◇) CO₂, 120 ppm

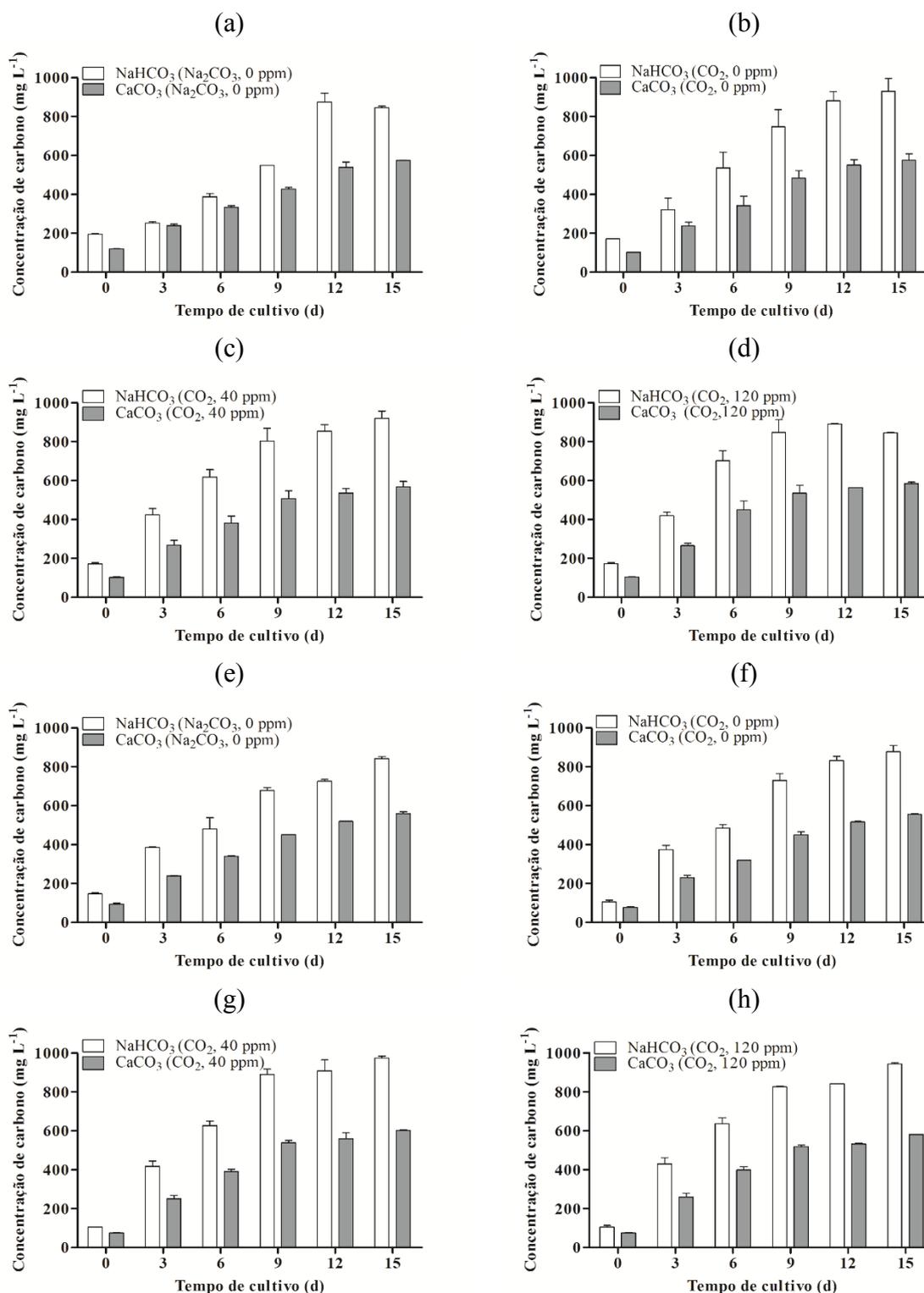


A maior variação do pH ocorreu nos ensaios sem redução da fonte de nitrogênio (Figura 3b). Morais e Costa (2007), encontraram que o pH se torna mais alcalino ao longo de crescimento celular da microalga. Essa afirmativa é confirmada na presente estudo, pois os ensaios com redução 50% de NaNO_3 , que tiveram o menor crescimento celular apresentaram a menor variação de pH. Nos ensaios com 100% da fonte de nitrogênio esse perfil de pH foi encontrado nos primeiros dias de cultivo, enquanto que nos experimentos com 50% deste nutriente houve um pequeno incremento do pH do 5º ao 8º dia de cultivo

A fonte de carbono inorgânico disponível para o crescimento microalgal é representada pela concentração de carbono inorgânico dissolvido no meio (DIC) que possui relação intrínseca com o pH (MORAES et al., 2016). Enquanto o pH afeta o mecanismo de concentração de CO_2 , o DIC informa qual espécie predomina (KLANCHUI et al., 2017). Ao longo do tempo de cultivo houve incremento do DIC, portanto havia carbono disponível para a microalga durante todo o período de cultivo. Isso pode ter estimulado o acúmulo de carboidratos.

A concentração de carbono na forma de NaHCO_3 é superior a forma de CaCO_3 (Figura 4). Esse padrão se repete ao longo dos cultivos independentemente da fonte de carbono e da concentração de cinzas. No 12º dia de cultivo tanto os ensaios sem redução da fonte de nitrogênio quanto os com redução apresentaram concentrações de carbono similares. Isso ocorreu porque a alcalinidade e o pH de todos os experimentos foram próximos nos últimos dias de cultivo.

Figura 4 – Concentração de NaHCO_3 e CaCO_3 nos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 cultivada com 100% (a, b, c, d) e 50% (e, f, g, h) da fonte de nitrogênio e diferentes fontes de carbono e concentrações de cinzas



O estudo Kavitha et al. (2016) ressaltou pela primeira vez o potencial de uma microalga eucariótica (*Botryococcus braunii*) para produção de PHB, o mesmo fenômeno foi

observado na microalga *Chlorella fusca* LEB 111, apesar de ter produzido menos 1% de PHB em base seca (Tabela 2) nas condições de cultivo estabelecidas. Estudos futuros com diferentes fontes de nutrientes e condições de cultivo são necessários para melhor elucidar se a *Chlorella fusca* apresenta potencialidade para incrementar a produção deste biopolímero.

Tabela 2 – Composição da biomassa (m m^{-1} , %) e produção teórica de etanol ($\text{mL } 100\text{g biomassa}^{-1}$) dos experimentos de *Chlorella fusca* LEB 111 cultivada com diferentes fontes de carbono, concentrações de cinzas e nitrogênio

Fonte de carbono, concentração de cinzas	PHB	Proteínas	Lipídios	Carboidratos	PE _t
100% de NaNO ₃					
Na ₂ CO ₃ , 0 ppm	0,4±0,0 ^a	43,9±0,4 ^{ab}	15,7±1,4 ^a	25,5±0,6 ^c	18,6±0,4 ^c
CO ₂ , 0 ppm	0,3±0,1 ^a	41,9±0,1 ^b	13,9±3,4 ^a	27,0±3,4 ^{bc}	19,7±2,5 ^{bc}
CO ₂ , 40 ppm	0,2±0,1 ^a	46,6±0,1 ^{ab}	12,8±2,2 ^a	29,4±0,7 ^{abc}	21,5±0,5 ^{abc}
CO ₂ , 120 ppm	0,3±0,0 ^a	47,6±0,9 ^a	11,7±0,9 ^a	30,2±2,1 ^{abc}	22,1±1,5 ^{abc}
50% de NaNO ₃					
Na ₂ CO ₃ , 0 ppm	0,2±0,1 ^a	46,2±2,8 ^{ab}	17,1±1,8 ^a	33,3±0,7 ^{ab}	24,3±0,5 ^{ab}
CO ₂ , 0 ppm	0,3±0,1 ^a	47,8±1,8 ^a	13,2±1,9 ^a	32,8±0,5 ^{ab}	23,9±0,4 ^{ab}
CO ₂ , 40 ppm	0,2±0,1 ^a	46,2±1,3 ^{ab}	13,6±0,6 ^a	32,8±2,7 ^{ab}	24,0±2,0 ^{ab}
CO ₂ , 120 ppm	0,2±0,0 ^a	44,2±1,6 ^{ab}	12,0±0,5 ^a	35,2±1,2 ^a	25,7±0,9 ^a

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Nos cultivos com redução da fonte de nitrogênio, não houve redução significativa no conteúdo proteico ($p > 0,05$), uma vez que o nitrogênio não foi totalmente consumido nos 15 dias de cultivo. Conforme Duarte, Fanka e Costa (2016), a concentração de proteínas na célula tende a aumentar quando a quantidade de nitrogênio disponível no meio é elevada. Neste trabalho os experimento com CO₂ sem adição de cinzas diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$), porém o ensaio com 50% de NaNO₃ apresentou o maior conteúdo proteico. Portanto, se o objetivo do estudo for a síntese de proteínas, pode-se diminuir a quantidade de fonte de nitrogênio em 50%, que a produção será a mesma mas os custos do processo serão reduzidos.

Além disso, no ensaio com redução da fonte de nitrogênio para 50% da composição e utilização Na₂CO₃ como fonte de carbono houve incremento de aproximadamente 25% na produção de carboidratos. Estudos demonstraram que a microalga responde à limitação de nitrogênio degradando macromoléculas nitrogenadas e acumulando compostos de reserva como

lipídios e carboidratos (PAES et al., 2016; SURENDHIRAN et al., 2015). Neste estudo não houve o esgotamento da fonte de nitrogênio, todavia observou-se um incremento significativo ($p > 0,05$) no conteúdo de carboidratos no cultivo com adição de CO_2 e 120 ppm de cinzas comparando com o ensaio controle com Na_2CO_3 e com o ensaio controle com CO_2 . Em estudo com 100% da fonte de nitrogênio Duarte, Fanka e Costa (2016) encontraram entre 18,8 e 20,7% de carboidratos utilizando CO_2 e cinzas nos cultivos. Comparando com o nosso estudo, conseguimos incrementar mais de 50% no teor de carboidratos utilizando a mesma cepa de *Chlorella*.

Segundo Chen et al. (2013) os principais carboidratos presentes na biomassa microalgal são a celulose na parede celular e o amido nos plastídios. Apesar da biomassa microalgal não estar facilmente acessível para o micro-organismo fermentativo (RIZZA et al., 2017), os teores reduzidos de hemicelulose e ausência de lignina permitem a rápida conversão dos carboidratos em açúcares fermentescíveis para produção de bioetanol, quando comparados a biomassas lignocelulósicas (CHEN et al., 2013; RIZZA et al., 2017). A maior produção teórica de etanol foi encontrada no ensaio com redução de nitrogênio e utilização de CO_2 e máxima adição de cinzas. Esse resultado foi estatisticamente superior ao ensaio com meio BG-11 padrão e ao ensaio com substituição do Na_2CO_3 por CO_2 sem adição de cinzas. Isso comprova que tanto a redução de nitrogênio quanto a adição de cinzas exerceram efeito positivo na produção de bioetanol. Seguindo essa estratégia de cultivo estudos futuros podem reduzir ainda mais a concentração de NaNO_3 visando incrementar a síntese de carboidratos.

A microalga apresentou os maior teores de lipídios no ensaio com Na_2CO_3 e 50% da concentração de NaNO_3 , porém a redução da fonte de nitrogênio não exerceu influência significativa no teor de lipídios ($p > 0,05$). Duarte, Fanka e Costa (2016) encontraram 14,6 % (m m^{-1}) de lipídios nos ensaios com Na_2CO_3 e $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de NaNO_3 para mesma cepa de microalga enquanto nos ensaios com CO_2 e cinzas foram encontrados entre 11,9 e 15,9% (m m^{-1}) de lipídios. Portanto, não houve alteração relevante no conteúdo lipídico da microalga utilizando redução da fonte de nitrogênio e adicionando cinzas aos cultivos, comparando ambos estudos. Anjos et al. (2013) expondo a microalga *Chlorella vulgaris* a 6% de CO_2 obtiveram 10% (m m^{-1}) de lipídios. Os autores afirmam que essa concentração da fonte de carbono não foi suficiente para estimular a produção de lipídios. Em outro estudo Kao et al., (2014) obtiveram 33,8% (m m^{-1}) adicionando 24% de CO_2 . Esses valores são aproximadamente 2 vezes maiores que o obtido em nosso estudo. Isso comprova que se o objetivo do estudo for incrementar significativamente o conteúdo de lipídios na *Chlorella* não é somente necessário reduzir a concentração da fonte de nitrogênio mas também adicionar maior concentração de CO_2 .

3.3.4 Conclusão

Os cultivos com CO₂ e adição de 40 ppm de cinzas apresentaram as maiores velocidades específicas de crescimento e os menores tempos de geração, sendo estatisticamente superiores ($p < 0,05$) ao ensaio com 100% de NaNO₃, Na₂CO₃ e cinzas. Neste estudo observou-se ainda que a redução de 50% da fonte de nitrogênio é uma estratégia para acumular até 35,2% de carboidratos que resulta em 25,5 mL de produção teórica de bioetanol para cada 100 g de biomassa. Não houve incremento significativo ($p > 0,05$) no conteúdo lipídico da microalga independente da fonte de carbono e da concentração de nitrogênio e cinzas. Além disso, a redução da concentração de nitrogênio para 50% resultou em teor de proteínas igual ou superior os ensaios com 100% da fonte de nitrogênio. Dessa forma, a utilização de CO₂, cinzas e redução da fonte de nitrogênio representam uma estratégia para minimizar os custos com fontes de nutrientes para o cultivo da microalga, além da minimização dos problemas ambientais causados por esses efluentes. Por fim, se o objetivo for incrementar a produção de carboidratos, menores concentrações de NaNO₃ no meio de cultivo podem ser estudadas. Todavia, se o interesse for acumular lipídios uma estratégia seria aumentar a concentração de CO₂.

Referências

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

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

BORGES, J. A.; ROSA, G. M. MEZA, L. H. R.; SOUZA, M. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* sp. LEB-18 culture using effluent from the anaerobic digestion. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n.2, p. 277-287, 2013.

BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1977-1982, 1988.

CAMERINI, F.; SOUZA, M. R. A. Z.; MORAIS, M. G.; VAZ, B. S.; MORAIS, E. G.; COSTA, J. A. V. Biofixation of CO₂ on a pilot scale: scaling of the process for industrial application. **African Journal of Microbiology Research**, 10, 768 – 774, 2016.

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

CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNG, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 1, p. 71–80, 1975.

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

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

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

CUELLAR-BERMUDEZ, S. P.; GARCIA-PEREZ, J. S.; RITTMANN, B. E.; PARRA-SALDIVAR, R. Photosynthetic bioenergy utilizing CO₂: an approach on flue gases utilization for third generation biofuels. **Journal of Cleaner Production**, v. 98, p. 53-65, 2015.

DUARTE, J. H.; FANKA, L. S.; COSTA, J. A. V. Utilization of simulated flue gas containing CO₂, SO₂, NO and ash for *Chorella fusca* cultivations. **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. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

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

FREITAS, B. C. B.; CASSURIAGA, A. P. A.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Pentoses and light intensity increase the growth and carbohydrate production and alter the protein profile of *Chlorella minutissima*. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 248-253, 2017.

GUCCIONE, A.; BIONDI, N.; SAMPIETRO, G.; RODOLFI, L.; BASSI, N.; TREDICE, M. R. *Chlorella* for protein and biofuels: from strain selection to outdoor cultivation in a Green Wall Panel photobioreactor. **Biotechnology for Biofuels**, n. 7, v. 84, p. 1-12, 2014.

HENRIKSON, R. **Earth Food *Spirulina***. Hawaii: Ronore Enterprises, 2009.

KAO, C. Y.; CHEN, T. Y.; CHANG, Y. B.; CHIU, T. W.; LIN, H. Y.; CHEN, C.; CHANG, J. S.; LIN, C. S. Utilization of carbon dioxide in industrial flue gases for the cultivation of microalgae *Chlorella* sp. **Bioresource Technology**, v. 166, p. 485–493, 2014.

KAVITHA, G.; KURINJIMALAR C.; SIVAKUMAR K.; KAARTHIK M.; ARAVIND R.; PALANI P.; RENGASAMY R. Optimization of polyhydroxybutyrate production utilizing wastewater as nutrient source by *Botryococcus braunii* Kütz using response surface methodology. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.93, p. 534-542, 2016.

KLANCHUI, A.; CHEEVADHANARAK, S.; PROMMEENATE, P.; MEECHAI, A. Exploring components of the CO₂-Concentrating Mechanism in alkaliphilic cyanobacteria through genome-based analysis. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 15, p. 340-350, 2017.

KUMAR, K.; BANERJEE, D.; DAS, D. Carbon dioxide sequestration from industrial flue gas by *Chlorella sorokiniana*. **Bioresource Technology**, v.152, p. 225–233, 2014.

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

LOWRY, O.; ROSENBROUGH, N.; FARR, A.; RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–272, 1951.

MARTINS, R. G.; GONÇALVES, I. S.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Bioprocess engineering aspects of biopolymer production by the cyanobacterium *Spirulina* strain LEB 18. **International Journal of Polymer Science**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

MORAES, L.; ROSA, G. M. R.; 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. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. **Energy Conversion and Management**, v. 48, p. 2169-2173, 2007.

MORAIS, E. G.; DUARTE, J. H. **Isolamento de microalgas para biofixação de CO₂ proveniente de geração termelétrica**. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

PAES, C. R. S.; FARIA, G. R.; TINOCO, N. A. B.; CASTRO, D. J. F. A.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. Growth, nutrient uptake and chemical composition of *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis oculata* under nitrogen starvation. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 44, n. 2, p. 275-292, 2016.

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, p. 3132-3136, 2011.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. W.; HERDMAN, M.; STANIER, R. G. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.

RIZZA, L. S.; SMACHETTI, M. E. S.; NASCIMENTO, M.; SALERNO, G. L.; CURATTI, L. Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production

of bioethanol. **Algal Research**, v. 22, p. 140-147, 2017.

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.

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

SLOCOMBE, S. P.; BENEMANN, J. R. **Microalgal production for biomass and high-value products**. Boca Ratón: CRC Press, 2016.

SOARES, E. R.; MELLO, J. W. V.; SCHAEFER, E. G. R.; COSTA, L. M. Cinza e carbonato de cálcio na mitigação de drenagem ácida em estéril de mineração de carvão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p. 171-181, 2006.

SURENDRHIRAN, D.; VIJAY, M.; SIVAPRAKASH, M. B.; SIRANJUNNISA, A. Kinetic modeling of microalgal growth and lipid synthesis for biodiesel production. **3 Biotech**, v. 5, n. 5, p. 663-669, 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.

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

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, p. 418-429, 2016b.

YEN, H.W.; HU, I. C.; CHEN, C. Y.; HO, S. H.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Microalgae-based biorefinery— From biofuels to natural products. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 166–174, 2013.

YOO, C.; JUN, S. Y.; LEE, J. Y.; ANH, C. Y.; OH, H. M. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 71-74, 2010.

ZHANG, Y. Z.; LIU, G. M.; WENG, W. Q.; DING, J. Y.; LIU, S. J. Engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of poly(3- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose. **Journal of Biotechnology**, v. 195, p. 82–88, 2015.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÃO GERAL

A redução de 90% da fonte de nitrogênio, independente da fonte de carbono e da concentração incrementou a produção de carboidratos na microalga *Spirulina* sp. LEB 18. A adição de cinzas incrementou mais ainda a produção desta macromolécula. O conteúdo proteico foi reduzido em até 400%, enquanto que os carboidratos aumentaram na mesma proporção. Não houve alteração relevante no conteúdo lipídico, que ficou dentro da faixa de 4 a 9%, conforme descrito na literatura. A produção de PHB alcançou até 2,15% (m m^{-1}) com a adição de cinzas, porém os dados obtidos são inferiores aos normalmente encontrados para *Spirulina* cultivada com redução da fonte de nitrogênio. Neste sentido, observa-se que as condições de cultivo realmente influenciam diretamente na composição da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18. A estratégia de cultivo desenvolvida no presente estudo é relevante para produção de carboidratos com potencial aplicação na produção de bioetanol de terceira geração.

Além disso, a vazão de 0,3 vvm de CO_2 apresentou os resultados mais satisfatórios para os parâmetros cinéticos, taxa de biofixação e produção de macromoléculas. Tanto os parâmetros cinéticos de crescimento quanto a composição da biomassa e produção teórica de bioetanol não apresentaram diferença significativa entre o uso de NaHCO_3 e as maiores adições de CO_2 (0,3 vvm por 1 ou 5 min). Entretanto, o uso de CO_2 apresenta a vantagem de redução de custos com nutrientes do meio bem como das emissões desse gás para atmosfera.

Os cultivos de *Chlorella fusca* com CO_2 e 40 ppm de cinzas apresentaram as maiores velocidades específicas de crescimento e os menores tempos de geração, sendo estatisticamente ($p < 0,05$) superiores àqueles com 100% de NaNO_3 e Na_2CO_3 como fonte de carbono. A redução de 50% na fonte de nitrogênio não chegou a promover a limitação deste nutriente nos cultivos, por isso a produção de proteínas foi elevada, resultando em teores iguais ou superiores aos ensaios com 100% da fonte de nitrogênio. Além disso, a redução da quantidade de NaNO_3 no meio resultou em acúmulo de até 35,2% (m m^{-1}) de carboidratos. O conteúdo lipídico alcançou até 17,1% (m m^{-1}), porém não houve incremento significativo ($p > 0,05$) no conteúdo lipídico da microalga independente da fonte de carbono e da concentração de nitrogênio e de cinzas. Uma tática para alterar o conteúdo lipídico seria estudar a adição de maiores concentrações de CO_2 nos cultivos. A estratégia de cultivo desenvolvida para *Chlorella fusca* representa tanto economia em nutrientes do meio de cultivo se o interesse for produzir proteínas quanto aumento no conteúdo de carboidratos para produção de bioetanol. Se o objetivo for aumentar ainda mais a produção de carboidratos, menores concentrações de NaNO_3 podem ser estudadas.

Por fim, a utilização de CO₂, cinzas de termelétrica e redução da fonte de nitrogênio representam uma técnica para minimizar os custos com fontes de nutrientes para o cultivo das microalgas, além da minimização dos problemas ambientais causados por esses efluentes. Essa estratégia de cultivo pode ser adotada para estimular o acúmulo de carboidratos na *Spirulina* sp. LEB 18 e na *Chlorella fusca* LEB 111, que podem ser fermentados para produção de bioetanol.

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANJOS, M.; FERNANDES, B. D.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; DRAGONE, G. Optimization of CO₂ bio-mitigation by *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 149–154, 2013.
- BAICHA, Z.; SALAR-GARCÍA, M. J.; ORTIZ-MARTÍNEZ, V. M.; HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, F. J.; DE LOS RÍOS, A. P.; LABJAR, N.; LOTFI, E.; ELMAHI, M. A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: a promising low cost substrate for microbial fuel cells. **Fuel Processing Technology**, v. 154, p. 104-116, 2016.
- BAILEY, J. E., OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2^a Edition. Singapore: McGraw-Hill, 1986.
- BALAJI, S.; GOPI, K.; MUTHVELAN, B. A review on production of poly- β -hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. **Algal Research**, v. 2, p. 278-285, 2013.
- BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology advances**, v. 25, p. 207-210, 2007.
- BINAGHI, L.; DEL BORGE, A.; LODI, A.; CONVERTI, A.; DEL BORGHI, M. Batch and fed-batch uptake of carbon dioxide by *Spirulina platensis*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1341-1346, 2003.
- BORGES, J. A.; ROSA, G. M. MEZA, L. H. R.; SOUZA, M. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* sp. LEB-18 culture using effluent from the anaerobic digestion. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n.2, p. 277-287, 2013.
- BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1977-1982, 1988.
- BRASIL. Lei nº 12.187, de 29 de dezembro de 2009. Institui a Política Nacional sobre Mudança do Clima - PNMC e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 29 dez. 2009. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/lei/112187.htm>. Acesso em: 04 maio. 2017.
- BRASIL. Decreto nº 7.390, de 9 de dezembro de 2010. Regulamenta os arts. 6º, 11 e 12 da Lei nº 12.187, de 29 de dezembro de 2009, que institui a Política Nacional sobre Mudança do Clima - PNMC, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 9 dez. 2010. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2010/Decreto/D7390.htm>. Acesso em: 04 maio. 2016.
- BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. VII Lista dos novos ingredientes aprovados. Brasília: Comissões Tecno-científicas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. 2013. Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_ingredientes.htm>. Acesso em jan. 2018.

CAMERINI, F.; SOUZA, M. R. A. Z.; MORAIS, M. G.; VAZ, B. S.; MORAIS, E. G.; COSTA, J. A. V. Biofixation of CO₂ on a pilot scale: scaling of the process for industrial application. **African Journal of Microbiology Research**, 10, 768 – 774, 2016.

CAMPBELL, J.; STEVENS JR, E.; BALKWILL. Accumulation of poli- β -hydroxybutyrate in *Spirulina platensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 149, n. 1, p. 361-363, 1982.

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

CARDOSO, A. M.; TONIOLO, R.; PIRES, M. FERRET, L. Síntese de zeólitas a partir de cinzas de carvão visando uma produção mais limpa e econômica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CARVÃO MINERAL, 09, 2011, Porto Alegre. **Anais do III Congresso Brasileiro de Carvão Mineral**. Porto Alegre: REDE CARVÃO, 2011.

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

CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNG, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, n. 1, p. 71–80, 1975.

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

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

CHIU, S. Y.; KAO, C. Y.; CHEN, C. H.; KUAN, T. C.; ONG, S. C.; LIN, C. S. Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3389-3396, 2008.

CHOI, S. P.; NGUYEN, M. T.; SIM, S. J. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5330–5336, 2010.

COELHO, V. C. **Síntese de biopolímeros pela microalga *Spirulina* sp. LEB-18 cultivada em diferentes concentrações de nutrientes**. 2013. 53 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2013.

COELHO, V. C.; SILVA, C. K.; TERRA, A. L.; COSTA, J. A.; MORAIS, M. G. Polyhydroxybutyrate production by *Spirulina* sp. LEB 18 grown under different nutrient concentrations. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, p. 1586-1594, 2015.

COSTA, J. A. V.; LINDE, G. A.; ATALA, D. I. P.; MIBIELLI, G. M.; KRÜGER, R. T. Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 15-18, 2000.

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

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

COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; SANTANA, F. S.; CAMERINI, F.; SOUZA, M. R. A. Z.; 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. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, p. 2202-2208, 2015.

COSTA, J. A. V.; MORO, G. M. B.; FILGUEIRA, D. M. V. B.; CORSINI, E.; BERTOLIN, T. E. The Potential of *Spirulina* and its bioactive metabolites as ingested agents for skin care. **Industrial Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 244-252, 2017.

CUELLAR-BERMUDEZ, S. P.; GARCIA-PEREZ, J. S.; RITTMANN, B. E.; PARRA-SALDIVAR, R. Photosynthetic bioenergy utilizing CO₂: an approach on flue gases utilization for third generation biofuels. **Journal of Cleaner Production**, v. 98, p. 53-65, 2015.

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. 248, p. 168-174, 2016.

DING, Z. L.; DUAN, X. N.; GE, Q.S.; ZHANG, Z. Q. Control of atmospheric CO₂ concentration by 2050: A calculation on the emission rights of different countries. **Science in China Series D: Earth Sciences**, v. 52, n. 10, p. 1447-1469, 2009.

DISMUKES, G.C.; CARRIERI, D.; BENNETT, N.; ANANYEV, G.M.; POSEWITZ, M.C. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v.19, p.235-240, 2008.

DOTTO, G. L.; CADAVAL, T. R. S.; PINTO, L. A. A. Preparation of bionanoparticles derived from *Spirulina platensis* and its application for Cr(VI) removal from aqueous Solutions. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 18, p. 1925-1930, 2012.

DUARTE, J. H. **Utilização de efluentes gasosos e resíduo sólido de termolétrica à carvão nos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 e *Synechococcus nidulans* LEB 115.** 2015. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.

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

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric

method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

FAROOQ, W.; MOON, M.; RYU, B. G.; SUH, W. I.; SHRIVASTAV, A.; PARK, M. S.; MISHRA, S. K.; YANG, J. W. Effect of harvesting methods on the reusability of water for cultivation of *Chlorella vulgaris*, its lipid productivity and biodiesel quality. **Algal Research**, v. 8, p. 1-7, 2015.

FERNANDÉZ, F. G. A.; GONZÁLES-LOPES, C. V.; SEVILLA, J. M. F.; GRIMA, E. M. Conversion of CO₂ into biomass by microalgae: how realistic a contribution may it be to significant CO₂ removal? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 577-586, 2012.

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

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000127**. CFSAN/Office of Food Additive Safety. 2003. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm267267.pdf>>. Acesso em jan. 2018.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Food Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN000424**. 2012. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm335743.htm>>. Acesso em jan. 2018.

FREITAS, B. C. B.; ESQUÍVEL, M. G.; MATOS, R. G.; ARRAIANO, C. M.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Nitrogen balancing and xylose addition enhances growth capacity and protein content in *Chlorella minutissima* cultures. **Bioresource Technology**, v. 218, p. 129-133, 2016.

FREITAS, B. C. B.; CASSURIAGA, A. P. A.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Pentoses and light intensity increase the growth and carbohydrate production and alter the protein profile of *Chlorella minutissima*. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 248-253, 2017.

GADD, G. M. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. **Geoderma**, v. 122, p. 109-119, 2004.

HENRIKSON, R. **Earth Food Spirulina**. Hawaii: Ronore Enterprises, 2009.

GHOSH, A.; KHANRA, S.; MONDAL, M.; HALDER G.; TIWARI, O.N.; SAINI, S.; BHOWMICK, T. K.; GAYEN, K. Progress toward isolation of strains and genetically engineered strains of microalgae for production of biofuel and other value added chemicals: a review. **Energy Conversion Management**, v. 113, p. 104-118, 2016.

GLEICK, P. H.; ADAMS, R. M.; AMASINO, R. M. et al. Climate change and the integrity of science. **Science**, v. 328, n. 5979, p. 689-690, 2010.

GÓMEZ-VILLA, H.; VOLTRONA, D.; NIEVES, M.; PIÑA, P. Biomass production and nutriente budget in outdoor cultures of *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyceae) in artificial

wastewater, under the winter and summer conditions of Mazatlan, Sinaloa, Mexico. **Vie et Milieu, Life and Environment**, v. 55, n. 2, p. 121-126, 2005.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; BALLESTEROS, M. Linking microalgae and cyanobacteria culture conditions and key-enzymes for carbohydrate accumulation. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1655–1661, 2012.

GOPI, K.; BALAJI, S.; MUTHVELAN, B. Isolation, purification and screening of biodegradable polymer PHB producing cyanobacteria from marine and fresh water resources. **Iranian Journal of Energy and Environment**, v. 5, n. 1, p. 94-100, 2014.

GUCCIONE, A.; BIONDI, N.; SAMPIETRO, G.; RODOLFI, L.; BASSI, N.; TREDICE, M. R. *Chlorella* for protein and biofuels: from strain selection to outdoor cultivation in a Green Wall Panel photobioreactor. **Biotechnology for Biofuels**, n. 7, v. 84, p. 1-12, 2014.

HELLIER, P.; PURTON, S.; LADOMMATOS, N. Molecular structure of photosynthetic microbial biofuel for improved engine combustion and emissions characteristics. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.3, p. 1-12, 2015.

HENDE, S. V. D.; VERVAEREN, H.; BOON, N. Flue gas compounds and microalgae: (Bio) chemical interactions leading to biotechnological opportunities. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1405-1424, 2012.

HENRIKSON, R. **Earth Food *Spirulina***. Hawaii: Ronore Enterprises, 2009.

HILLE, R. V.; FAGAN, M.; BROMFIELD, L.; POTT, R. A modified pH drift assay for inorganic carbon accumulation and external carbonic anhydrase activity in microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 1, p. 377–385, 2013.

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

HO, S.-H.; HUANG, S.-W.; CHEN, C.-Y.; HASUNUMA, T.; KONDO, A.; CHANG, J.-S. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 191-198, 2013.

HUNTLEY, M.; REDALJE, D. CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: a new appraisal. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 12, n. 4, p. 573-608, 2007.

JAU, M. H.; YEW, S. P.; TOH, P. S. Y.; CHONG, A. S. C. CHU, W. L. PHANG, S. M.; NAJIMUDIN, N.; SUDESH, K. Biosynthesis and mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] by *Spirulina platensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 36, p. 144-151, 2005.

KAO, C. Y.; CHEN, T. Y.; CHANG, Y. B.; CHIU, T. W.; LIN, H. Y.; CHEN, C.; CHANG, J. S.; LIN, C. S. Utilization of carbon dioxide in industrial flue gases for the cultivation of microalgae *Chlorella* sp. **Bioresource Technology**, v. 166, p. 485–493, 2014.

KAPLAN, D. L. **Biopolymers from renewable resources**. Berlin: Springer, 2010, 417 p.

KASSAS, A. Y.; MOHAMED, L. A. Bioremediation of the textile waste effluente by *Chlorella vulgaris*. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 40, p. 301-308, 2014.

KAVITHA, G.; KURINJIMALAR C.; SIVAKUMAR K.; KAARTHIK M.; ARAVIND R.; PALANI P.; RENGASAMY R. Optimization of polyhydroxybutyrate production utilizing wastewater as nutrient source by *Botryococcus braunii* Kütz using response surface methodology. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.93, p. 534-542, 2016.

KHETKORN W, INCHAROENSAKDI A, LINDBLAD P, JANTARO S. Enhancement of poly-3-hydroxybutyrate production in *Synechocystis* sp. PCC 6803 by overexpression of its native biosynthetic genes. **Bioresource Technology**, v. 214, p. 761-768, 2016.

KHOO, H.; KOH, C.; SHAIK, M.; SHARRATT, P. Bioenergy co-products derived from microalgae biomass via thermochemical conversion—life cycle energy balances and CO₂ emissions. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 298–307, 2013.

KHOSRAVI-DARANI, K.; BUCCI, D.Z. Application of Poly(hydroxyalkanoate) in Food Packaging: Improvements by Nanotechnology. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 29, n. 2, p. 275-285, 2015.

KLANCHUI, A.; CHEEVADHANARAK, S.; PROMMEENATE, P.; MEECHAI, A. Exploring components of the CO₂-Concentrating Mechanism in alkaliphilic cyanobacteria through genome-based analysis. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 15, p. 340-350, 2017.

KUMAR, K.; BANERJEE, D.; DAS, D. Carbon dioxide sequestration from industrial flue gas by *Chlorella sorokiniana*. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 225-233, 2014.

LARKUM, A. W. D.; ROSS, I. L.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 198-205, 2012.

LEMOS, J. L. S.; CARLOS, M. C.; FARIAS, Y. P-T. M. M.; SANTOS, R. L. C. **Revisão acerca da utilização de microrganismos na biorremediação de rejeitos industriais contendo metais pesados**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008, 65p.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial**. 3ª Edição. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001, v. 3 593 p.

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

LOWRY, O.; ROSENBROUGH, N.; FARR, A.; RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–272, 1951.

MANGAN, N. M.; FLAMHOLZ, A.; HOOD, R. D.; MILO, R.; SAVAGE, D. F. pH determines the energetic efficiency of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 36, p. 5354-5362, 2016.

MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; GEORGAKAKIS, D. Microalgal carbohydrates: An overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.96, p. 631-645, 2012.

MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; NERANTZIS, E.; GEORGAKAKIS, D. Bioethanol production by carbohydrate-enriched biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. **Energies**, v. 6, p. 3937-3950, 2013.

MARTINS, R. G. **Síntese, extração e caracterização de biopolímeros de origem microalgal para desenvolvimento de nanofibras**. 2014. 148 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

MARTINS, R. G.; GONÇALVES, I. S.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Bioprocess Engineering Aspects of Biopolymer Production by the Cyanobacterium *Spirulina* Strain LEB 18. **International Journal of Polymer Science**, v. 2014, p. 1-6, 2014.

MEIXNER, K.; FRITZ, I.; DAFFERT, C.; MARKL, K.; FUCHS, W.; DROSG, B. Processing recommendations for using low-solids digestate as nutrient solution for poly- β -hydroxybutyrate production with *Synechocystis salina*. **Journal of Biotechnology**, v. 240, p. 61–67, 2016.

MIRANDA, J.; PASSARINHO, P.; GOUVEIA, L. Bioethanol production from *Scenedesmus obliquus* sugars: The influence of photobioreactors and culture conditions on biomass production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 555-564, 2012.

MONDAL, M.; GOSWAMI, S.; GHOSH, A.; OINAM, G.; TIWARI, O. N.; DAS, P.; GAYEN, K.; MANDAL, M. K.; HALDER. Production of biodiesel from microalgae through biological carbon capture: a review. **3 Biotec**, n. 7, v. 99, p. 1-21, 2017.

MORAES, L. **Aumento da eficiência de biofixação de CO₂ por microalgas**. 2014. 130 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

MORAES, L.; ROSA, G. M. R.; 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. **Fixação de dióxido de carbono e produção de ácidos graxos por microalga**. 2006. 112 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2006.

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. **Energy Conversion and Management**, v. 29, p. 1349-1352, 2007a.

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

MORAIS, M. G. **Bioengenharia microalgal na utilização de gás de combustão e extração de biopolímeros para desenvolvimento de nanofibras**. 2008. 119 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008.

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

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.

MORAIS, E. G.; DUARTE, J. H. **Isolamento de microalgas para biofixação de CO₂ proveniente de geração termelétrica**. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

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, p. 1345-1348, 2016.

MOZUMDER, M. S. I.; GARCIA-GONZALES, L.; WEVER, H.; VOLCKE, E. I. P. Poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) production from CO₂: Model development and process optimization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 98, p. 107-116, 2015.

NARANJO, J. M.; CARDONA, C. A.; HIGUITA, J. C. Use of residual banana for polyhydroxybutyrate (PHB) production: Case of study in an integrated biorefinery. **Waste Management**, v. 34, p. 2634-2640, 2014.

NEPSTAD D. C.; STICKLER, C. M.; FILHO B. S, MERRY, F. Interactions among Amazon land use, forests and climate: prospects for a near-term forest tipping point. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 363, p. 1737- 1746, 2008.

NGUYEN, M. T.; CHOI, S. P.; LEE, J.; LEE, J. H.; SIM, S. J. Hydrothermal acid pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 161-166, 2009.

NISHIOKA N, NAKAI K, MIYAKE M, ASADA Y, TAYA M. Production of poly-β-hydroxybutyrate by thermophilic cyanobacteria, *Synechococcus* sp. MA19, under phosphate limitation. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1095-1099, 2001.

NOAA. **National Oceanic and Atmospheric Administration**. 2018. Disponível em: <https://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>. Acesso em: 07 de fev. 2018.

PAES, C. R. S.; FARIA, G. R.; TINOCO, N. A. B.; CASTRO, D. J. F. A.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. Growth, nutrient uptake and chemical composition of *Chlorella* sp.

and *Nannochloropsis oculata* under nitrogen starvation. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 44, n. 2, p. 275-292, 2016.

PANDA B., MALLICK N. Enhanced poly- β -hydroxybutyrate accumulation in a unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 2, p.194–198, 2007.

PCHARA, F. R. F. **Estudo da transferência de CO₂ por borbulhamento para o cultivo de microalgas em laboratório**. 2016. 62f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

PHUKAN, M. M.; CHUTIA, R. S.; KONWAR, B. K.; KATAKI, R. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. **Applied Energy**, v. 88, p. 3307-3312, 2011.

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, p. 3132-3136, 2011.

RAHMAN, A.; PUTMAN, R. J; INAN, K.; SAL, F. A.; SATHISH, A.; SMITH, T.; NIELSEN, C.; SIMS, R. C.; MILLER, C. D. Polyhydroxybutyrate production using a wastewater microalgae based media. **Algal Research**, v. 8, p. 95-98, 2015.

REDAELLI, C. **Estudo da produção de lipídeos e carotenoides por *Chlorella minutíssima* em fotobiorreator**. 2012. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgae culture: biotechnology and applied phycology**. Bodmin: Blackwell Science, 2004.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. W.; HERDMAN, M.; STANIER, R. G. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.

RIZZA, L. S.; SMACHETTI, M. E. S.; NASCIMENTO, M.; SALERNO, G. L.; CURATTI, L. Bioprospecting for native microalgae as an alternative source of sugars for the production of bioethanol. **Algal Research**, v. 22, p. 140-147, 2017.

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.

SALLA, A. C. V.; MARGERITES, A. C.; SEIBEL, F. I.; HOLZ, L. C.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 133-141, 2016.

- SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U., AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. v. 2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.
- SCHMITZ, R.; DAL MAGRO, C.; COLLA, L. M. Aplicações ambientais das microalgas. **Revista CIATEC**, v. 4, n. 1, p. 48-60, 2012.
- SCRAGG, A. H.; ILLMAN, A. M.; CARDEN, A.; SHALES, S. W. Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular reactor. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, n.1, p. 67-73, 2002.
- SILVA C. K. **Produção biotecnológica de biopolímeros aplicando processo cíclico de reutilização de resíduo da extração de poli-hidroxibutirato (PHB)**. 2016. 71 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2016.
- SLOCOMBE, S. P.; BENEMANN, J. R. **Microalgal production for biomass and high-value products**. Boca Ratón: CRC Press, 2016.
- SOARES, E. R.; MELLO, J. W. V.; SCHAEFER, E. G. R.; COSTA, L. M. Cinza e carbonato de cálcio na mitigação de drenagem ácida em estéril de mineração de carvão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p. 171-181, 2006.
- SOARES, P. S. M.; SANTOS, M. D. C.; POSSA, M. V. **Carvão Brasileiro: tecnologia e meio ambiente**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008.
- SPALDING, M. H. Microalgal carbon-dioxide-concentrating mechanisms: *Chlamydomonas* inorganic carbon transportes. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 7, p. 1463-1473, 2008.
- SURENDRHIRAN, D.; VIJAY, M.; SIVAPRAKASH, M. B.; SIRANJUNNISA, A. Kinetic modeling of microalgal growth and lipid synthesis for biodiesel production. **3 Biotech**, v. 5, n. 5, p. 663-669, 2015.
- TROSCHL, C.; MEIXNER, K.; DROSG, B. Cyanobacterial PHA production – review of recent advances and a summary of three years’ working experience running a pilot plant. **Bioengineering**, v. 4, n. 26, p. 1-19, 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. Use of solid waste from thermoelectric plants for cultivation of microalgae. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, p. 1-8, 2016a.
- 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, p. 418-429, 2016b.

WANG, L.; MIN, M.; LI, Y.; CHEN, P.; CHEN, Y.; LIU, Y. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1174–1186, 2010.

WUANG, S. C.; KHIN, M. C.; CHUA, P. Q. D.; LUO, Y. D. Use of *Spirulina* biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers. **Algal Research**, v. 15, p. 59-64, 2016.

YEN, H.W.; HU, I. C.; CHEN, C. Y.; HO, S. H.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Microalgae-based biorefinery– From biofuels to natural products. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 166–174, 2013.

YOO, C.; JUN, S. Y.; LEE, J. Y.; ANH, C. Y.; OH, H. M. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 71-74, 2010.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthèse de *Spirulina maxima* Geitler.** 1966. 96 f. Ph.D. Thesis, University of Paris, Paris, 1966.

ZHANG, Y. Z.; LIU, G. M.; WENG, W. Q.; DING, J. Y.; LIU, S. J. Engineering of *Ralstonia eutropha* for the production of poly(3- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from glucose. **Journal of Biotechnology**, v. 195, p. 82–88, 2015.

CAPÍTULO VI

SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Estudar diferentes concentrações da fonte de nitrogênio e seus efeitos na produção de macromoléculas em *Spirulina* e *Chlorella*.

Fermentar os carboidratos produzidos para avaliar a produção real de bioetanol.

Estudar as melhores condições de cultivo estabelecidas neste estudo em reatores *raceways*.

Investigar o efeito de maiores concentrações de CO₂ visando incrementar o conteúdo lipídico.

Substituir os minerais do meio por cinzas e verificar os efeitos na cinética de crescimento e composição da biomassa.

Estudar a tolerância dos cultivos a maiores concentrações de cinzas