



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

**ENGENHARIA DE MICROALGAS PARA CONCEPÇÃO DE UMA
BIORREFINARIA UTILIZANDO CO₂ COMO FONTE DE CARBONO**

JULIANA BOTELHO MOREIRA

Prof^ª. Dr^ª. MICHELE GREQUE DE MORAIS

Orientadora

Prof. Dr. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA

Co-orientador

RIO GRANDE, RS

2014

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

**ENGENHARIA DE MICROALGAS PARA CONCEPÇÃO DE UMA
BIORREFINARIA UTILIZANDO CO₂ COMO FONTE DE CARBONO**

JULIANA BOTELHO MOREIRA

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 MORAIS

Orientadora

Prof. Dr. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA

Co-orientador

RIO GRANDE, RS

2014

Dedico este trabalho aos meus pais e meu namorado, pelo amor, imensa dedicação e apoio em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus,

por permitir concretizar mais um sonho e dar mais um passo em minha caminhada.

Aos meu pais Luiz Henrique E. S. Moreira e Maria de Fátima Botelho Moreira,
pela imensa dedicação, amor incondicional, carinho e incentivo para que eu chegasse até aqui.
Agradeço por acreditarem em mim e apoiarem as minhas decisões, isso sempre me motivou.

À minha querida orientadora Prof^a Dr^a Michele Greque de Moraes,
pela orientação, incentivo, confiança, aprendizado e tempo disponibilizado, sua presença marcante em todos os momentos, conselhos e ideias estimulantes foram decisivas e conquistaram minha admiração, respeito e amizade.

Ao Prof. Dr. Jorge Alberto Alberto Vieira Costa,
pela co-orientação, pela oportunidade de fazer parte do grupo LEB, no qual iniciei e terminei minha iniciação científica e agora, o Mestrado. Agradeço também pela confiança e aprendizado durante esses 6 anos.

Ao meu querido namorado Maurício Neumann de Oliveira,
pelo amor, carinho, paciência nos momentos difíceis, pela Paz que me transmite, e com isso me mostra que a Vida pode ser mais tranquila...

À minha madrinha Gicelda Botelho Àvila,
que sempre me apoiou, e com amor e carinho sempre demonstrou acreditar em mim.

À minha amiga Joice Aline Borges,
que para mim é como se fosse uma irmã. Não tenho palavras para agradecer a tua ajuda. Agradeço também a tua amizade, as palavras de incentivo, o carinho e compreensão. Uma das melhores “coisas” que me aconteceu durante a graduação foi ter te conhecido.

Aos Iniciantes Científicos Ana Luiza Terra Jéssica Corá,
pela competência, que assumiram este trabalho como nosso e contribuíram também para minha formação pessoal e profissional.

À minha amiga Mery Luiza Vieira,
pela nossa amizade e convivência, pela companhia de “apê” maravilhosa que é.

Aos colegas do LEB,
que muito me ajudaram quando precisei, conviveram comigo, deram-me forças, auxílio,
amizade. Não os nomearei, pois todos de certa forma tiveram sua contribuição.

Ao técnico do LEB Roque Zílio e secretaria Islanda Passos,
pela disposição na solução dos problemas.

À Universidade Federal do Rio Grande,
pelo ensino e pesquisa de qualidade, onde cursei a graduação e agora tive a oportunidade de
cursar a pós-graduação, e assim, estendo a todos os professores e funcionários com os quais
convivi.

À CAPES e CNPq,
pelo apoio financeiro.

À todas as pessoas que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho,
as quais, direta ou indiretamente, participaram da minha formação como profissional e ser
humano, a minha eterna gratidão.

Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é “muito” para ser insignificante.

Augusto Branco

RESUMO

A biorrefinaria é um processamento sustentável em planta industrial que integra os processos de conversão de biomassa para produzir biocombustíveis, bioprodutos de valor agregado e energia. As microalgas constituem uma biomassa com grande potencialidade para uso como matéria prima para produção desses bioprodutos, além de apresentarem a capacidade de biofixar o CO₂ atmosférico. O objetivo deste trabalho foi estudar o cultivo semicontínuo de *Spirulina* sp LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111, avaliando a potencialidade das biomassas produzidas para concepção de uma biorrefinaria microalgal. Os cultivos com duração de 55 d foram mantidos a 30°C, 41,6 µmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo 12 h claro/escuro, em fotobiorreatores tubulares verticais. A concentração inicial de biomassa foi 0,2 g.L⁻¹ e as taxas de renovação estudadas, 20 e 40% (v/v). Primeiramente foram estudados diferentes modos de condução de cultivo semicontínuo para a microalga *Spirulina* sp. LEB 18, avaliando-se as melhores respostas cinéticas. Em ambos os modos a primeira remoção de produto e adição de meio novo (corte) foi realizada no final da fase exponencial de crescimento. Contudo, em um modo de condução de cultivo estabeleceu-se uma concentração celular de corte fixa e em outra, a remoção de produto e adição de meio novo foi realizados a cada 3 d. As máximas produtividade média (0,092 g.L⁻¹.d⁻¹) e concentração de biomassa produzida (8,37 g) foram encontradas com taxa de renovação de 40% (v/v) no ensaio com concentração celular de corte fixa, demonstrando que essa é a melhor condução de cultivo semicontínuo. Em um segundo momento, selecionado o modo de condução, foi estudado o cultivo semicontínuo das microalgas *Spirulina* sp LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 com CO₂ como fonte de carbono, a fim de avaliar a potencial aplicação das biomassas produzidas. A concentração celular de corte foi 1,6 g.L⁻¹. Para a caracterização das biomassas foram determinados carboidratos, proteínas, lipídios e cinzas. Na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 ainda foi avaliado o rendimento em biopolímeros. Quando cultivada com 10% (v/v) de CO₂ e taxa de renovação de 20% (v/v), a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou biomassa rica em proteínas, sendo 60,1 % (p/p), 14,4% (p/p) de carboidratos e máximo teor lipídico de 9,8% (p/p). O máximo rendimento em biopolímeros encontrado foi 7,1% (p/p) no ensaio com 10% (v/v) de CO₂. A biomassa da microalga *Chlorella fusca* LEB 111 apresentou teores máximos de proteínas (56,1%, p/p), carboidratos (30,2%, p/p) e lipídios (13,3%, p/p) quando a microalga foi cultivada com CO₂ como fonte de carbono. Nos cultivos com esse gás foi observado que a taxa de renovação de meio não influenciou na cinética de crescimento da microalga *Spirulina* sp. LEB 18. Esta microalga apresentou maior produtividade média, velocidade específica de crescimento e máxima biomassa produzida, quando cultivada com CO₂. As biomassas das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111, obtida a partir do cultivo com 10% (v/v) de CO₂, apresentam potencial para obtenção de bioprodutos como biopeptídeos, bioetanol e ácidos graxos essenciais e podem ser utilizadas como matéria prima em biorrefinarias, favorecendo a autossustentabilidade.

Palavras Chave: composição química, fase exponencial de crescimento, processo semicontínuo.

ABSTRACT

A biorefinery is a sustainable industrial processing plant that integrates biomass conversion processes to produce biofuels, bioproducts and value-added energy. The microalgae biomass constitute a great potential for use as a feedstock for the production of these byproducts, in addition to having the ability to biofix atmospheric CO₂. The objective of this work was to study the semi cultivation of *Spirulina* sp LEB 18 and *Chlorella fusca* LEB 111, evaluating the potential of biomass produced for designing a microalgal biorefinery. The cultivations during 55 d were maintained at 30 °C, 41.6 μmolm⁻²s⁻¹ and photoperiod 12 h light/dark, in vertical tubular photobioreactors. The initial biomass concentration was 0.2 g L⁻¹ and the renewal rates studied were 20 and 40% (v/v). Firstly different driving modes of semicontinuous cultivation for *Spirulina* sp LEB 18 were studied evaluating the best kinetic responses. In both modes the first product removal and addition of fresh medium was taken at the end of the exponential growth phase. However, in a driving style cultivation established a fixed blend concentration and other the removal of product and addition of fresh medium was performed every 3 d. The maximum average productivity (0.092 g L⁻¹.d⁻¹) and concentration of produced biomass (8.37 g) were found with a renewal rate of 40% (v/v) in the assay with fixed blend concentration, demonstrating that this is the best driving semicontinuous cultivation. In a second step, the selected driving mode, the semicontinuous cultivation of microalgae *Spirulina* sp LEB 18 and *Chlorella fusca* LEB 111 with CO₂ as a carbon source was studied in order to evaluate the potential application of biomass produced. The blend concentration was 1.6 g.L⁻¹ (late exponential growth phase). For the characterization of biomass carbohydrates, proteins, lipids and ash were determined. Biomass of *Spirulina* sp. LEB 18 was further assessed the performance in biopolymers. When grown at 10% (v/v) CO₂, and renewal rate of 20% (v/v) to *Spirulina* sp. LEB 18 presented biomass rich in protein, 60.1% (w/w), 14.4% (w/w) of carbohydrate and lipid content of maximum 9.8% (w/w). The maximum yield was found biopolymers 7.1% (w/w) in the assay with 10% (v/v) CO₂. The biomass of microalgae *Chlorella fusca* LEB 111 showed maximum protein content (56.1%, w/w), carbohydrates (30.2%, w/w) and lipids (13.3%, w/w) when the microalgae was grown with CO₂ as the carbon source. In cultivations with this gas was observed that the renewal rate means no influence on the kinetics of growth of *Spirulina* sp. LEB 18. This microalgae showed higher average productivity, specific growth rate and maximum biomass production when grown with CO₂. Biomass of microalgae *Spirulina* sp. LEB 18 and *Chlorella fusca* LEB 111, obtained from cultivation with 10% (v/v) CO₂, have potential for obtaining biopeptides as bioproducts, ethanol and essential fatty acids and can be used as raw material for biorefineries, favoring self-sustainability.

Keywords: chemical composition, exponential growth phase, semicontinuous process.

LISTA DE SIGLAS

$\mu_{\text{médio}}$ - Velocidade específica média

μ_x - Velocidade específica

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BC₁ - Biomassa obtida do 1º corte

BC₂ - Biomassa obtida do 2º corte

BC_n - Biomassa do último dia de cultivo

B_p - Biomassa produzida

CGTEE - Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica

FDA - Food and Drug Administration

GEE - Gases de efeito estufa

GRAS - Generally Recognized As Safe

m - Biomassa microalgal

mb - Massa final de biopolímeros

MDL - Mecanismo de Desenvolvimento Limpo

N - Ciclos de crescimento

P_{médio} - Produtividade média

P_x - Produtividade

t - Tempo final

t₀ - Tempo inicial

TR - Taxa de renovação

V_c - volume retirado de cada corte

V_f - Volume útil do fotobiorreator

X - Concentração celular final

X₀ - Concentração celular inicial

η - Rendimento em biopolímeros

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 - Ciclo de Calvin.	29
Figura 2 - Geometrias de fotobiorreatores utilizadas em cultivos de microalgas: (a) Plana. (b) Tubular. (c) Cilíndrica.	34
Figura 3 - Fotobiorreatores abertos para produção de microalgas. (a) Produção de <i>Dunaliella salina</i> em lagoas abertas na Austrália. (b) Fotobiorreator do tipo <i>raceway</i> , cultivo de <i>Spirulina</i> nos EUA. (c) Lagoa circular para produção de <i>Chlorella</i> em Taiwan. (d) Produção de <i>Nannochloropsis</i> para aquicultura.	35
Figura 4 - Diferentes tipos de fotobiorreatores fechados. (a) Fotobiorreatores do tipo erlenmeyer; (b) Fotobiorreatores tubulares verticais; (c) Fotobiorreator tubular horizontal....	37
Figura 5 - Representação esquemática entre o conceito de refinaria e o de biorrefinaria.	38
Figura 6 - Esquema geral do conceito de Biorrefinarias a partir de biomassa aquática.	39
Figura 7 - Fluxograma da unidade autossustentável do NPDEAS (Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável).	40

ARTIGO 1 - *Spirulina* sp. LEB 18 EM DIFERENTES CONDUÇÕES DE CULTIVO SEMICONTÍNUO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA

Figura 1 - Configuração do fotobiorreator tubular vertical de 2 L. Todas as dimensões em mm.	49
Figura 2 - Curvas de crescimento da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 obtidas em cultivo semicontínuo com cortes na concentração celular fixa em 1,6 g.L ⁻¹ (a) e cortes a cada 3 d (b): Taxa de renovação 20% (v/v) (□); Taxa de renovação 40% (v/v) (•).	52
Figura 3 - Acompanhamento do pH ao longo do cultivo semicontínuo da <i>Spirulina</i> sp. LEB 18, cortes com concentração celular fixa em 1,6 g.L ⁻¹ e taxa de renovação de 20% (v/v) (a) e 40% (v/v) (b); cortes a cada 3 d e taxa de renovação de 20% (v/v) (c) e 40% (v/v) (d).	58

ARTIGO 2 - BIORREFINARIA MICROALGAL: A POTENCIALIDADE DA BIOMASSA COMO MATÉRIA PRIMA

Figura 1 - Curvas de crescimento da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 com taxa de renovação de 20% (a) e 40% (b): meio Zarrouk (□); 10% (v/v) de CO₂ (•)..... 71

Figura 2 - Curvas de crescimento da microalga *Chlorella fusca* LEB 111 com taxa de renovação de 20% (a) e 40% (b): meio BG-11 modificado (□); 10% (v/v) de CO₂ (•). 72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Parâmetros cinéticos obtidos em cada ciclo de crescimento da microalga *Spirulina* sp. LEB 18, em ambos modos de condução de cultivo semicontínuo.....99

Quadro 2 - Parâmetros cinéticos obtidos em cada ciclo de crescimento das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111, quando cultivadas com 10% (v/v) CO₂..101

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1 - Composição química de algumas espécies de microalgas	31
--	----

ARTIGO 1 - *Spirulina* sp. LEB 18 EM DIFERENTES CONDUÇÕES DE CULTIVO SEMICONTÍNUO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA

Tabela 1 - Composição do meio de cultivo Zarrouk para 1 L.....	48
---	----

Tabela 2 - Experimentos realizados para análise cinética dos cultivos semicontínuos da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18.....	49
--	----

Tabela 3 – Parâmetros cinéticos e biomassa produzida (B_p) obtidos nos cultivos semicontínuos da microalga <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 expostos a cortes realizados na concentração celular fixa de $1,6 \text{ g.L}^{-1}$ ou cortes a cada 3 d.....	54
---	----

ARTIGO 2 - BIORREFINARIA MICROALGAL: A POTENCIALIDADE DA BIOMASSA COMO MATÉRIA-PRIMA

Tabela 1 - Experimentos realizados para análise cinética e caracterização da biomassa das microalgas <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 e <i>Chlorella fusca</i> LEB 111..	68
--	----

Tabela 2 - Parâmetros cinéticos e biomassa produzida (B_p) obtidos dos cultivos semicontínuos das microalgas	73
---	----

Tabela 3 - Determinação de proteínas, carboidratos, lipídios e cinzas em biomassa microalgal.	78
---	----

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE SIGLAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE QUADROS	12
LISTA DE TABELAS	13
CAPÍTULO I.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 JUSTIFICATIVA	20
3.1 Histórico da linha de pesquisa	21
CAPÍTULO II.....	23
4 REVISÃO DA LITERATURA	24
4.1 Aumento das emissões de CO ₂	24
4.2 Microalgas	25
4.3 Processo fotossintético em microalgas	27
4.4 Biofixação de CO ₂ por microalgas	28
4.5 Composição química de microalgas	30
4.6 Regimes de cultivo.....	32
4.6.1 Contínuo	32
4.6.2 Descontínuo e descontínuo alimentado.....	32
4.7 Fotobiorreatores para o cultivo de microalgas.....	34
4.7.1 Fotobiorreatores abertos	35
4.7.2 Fotobiorreatores fechados	36
4.8 Microalgas no conceito de biorrefinaria	37
CAPÍTULO III	42
5 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	43
5.1 ARTIGO 1 - “ <i>Spirulina</i> sp. LEB 18 EM DIFERENTES CONDUÇÕES DE CULTIVO SEMICONTÍNUO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA”.....	44

RESUMO.....	45
ABSTRACT.....	46
1INTRODUÇÃO.....	47
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
2.1 Micro-organismos e condições de cultivo.....	48
2.2 Concentração de biomassa microalgal e monitoramento do pH.....	50
2.3 Parâmetros cinéticos.....	50
2.5 Metodologia Estatística.....	51
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4 CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
5.2 ARTIGO 2 - “BIORREFINARIA MICROALGAL: A POTENCIALIDADE DA BIOMASSA COMO MATÉRIA-PRIMA”.....	63
RESUMO.....	64
ABSTRACT.....	65
1INTRODUÇÃO.....	66
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	67
2.1 Microalgas e condições de cultivo.....	67
2.2 Concentração de biomassa microalgal e monitoramento do pH.....	68
2.3 Parâmetros cinéticos.....	68
2.5 Caracterização da biomassa microalgal.....	69
2.5 Análise Estatística.....	70
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
4 CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
CAPÍTULO IV.....	83
6 CONCLUSÃO GERAL.....	84
CAPÍTULO V.....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
APÊNDICES.....	98
APÊNDICE 1.....	99
APÊNDICE 2.....	101

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

Para a redução da poluição e geração de novos produtos, processos biológicos tornaram-se interessantes. Esses processos utilizam o metabolismo microbiano para degradar e remover poluentes (GADD, 2009), bem como para transformar matérias primas em produtos menos nocivos ao meio ambiente. Neste cenário, destacam-se microalgas de diversas espécies, as quais tem sido utilizadas em estudos de tratamento de efluentes, biossorção de metais tóxicos (DOTO; CADAVAL; PINTO, 2012; DAL MAGRO; HEMKEMEIER; COLLA, 2011; MEZZOMO et al., 2010), biofixação de dióxido de carbono (RADMANN et al., 2011), produção de biocombustíveis (XU; MI, 2011), produção de biopolímeros e nanofibras (MORAIS et al., 2014; STEFFENS et al., 2014).

As microalgas representam os micro-organismos fotossintéticos procarióticos e eucarióticos que vivem em ambiente aquático (VONSHAK, 1997). Entre as abordagens para redução das emissões de CO₂, a biofixação desse gás por microalgas é considerada uma das soluções mais eficazes (MORAIS; COSTA, 2007b).

O dióxido de carbono (CO₂) é um dos principais gases contribuintes para o efeito estufa e tem agravado o aquecimento global (MOREIRA; GIOMETTI, 2008). O aumento da concentração de CO₂ na atmosfera tem gerado desafios em todo o mundo (BODEN; MARLAND; ANDRES, 2010; ZENG et al., 2011). A redução do uso de combustíveis fósseis, bem como promover a captura e sequestro de CO₂ são alternativas para reduzir as emissões deste gás (HO, CHEN; CHANG, 2010) e as microalgas são potenciais atuantes nesse processo.

O cultivo de microalgas pode ser realizado em modo contínuo, descontínuo e semicontínuo. No semicontínuo o fotobiorreator é carregado inicialmente com meio de cultivo e mantido sob condições ótimas de temperatura, nutrientes e pH. Após determinado período, uma parcela do meio de cultivo com microalgas é removida e substituída por meio novo, sem células. Esse cultivo propicia elevada produção de biomassa, o consumo de nutrientes é grande e a produtividade de biomassa é elevada. Avaliar esse regime de cultivo é importante, uma vez que o modo de operação influencia nas características cinéticas da cultura e obtenção de biocompostos (LOURENÇO, 2006).

Para tornar os bioprodutos obtidos de biomassa microalgal sustentável, é necessário explorar, no mínimo, três desses. A fonte de carbono, que é o nutriente em maior requerimento, deve ser de baixo custo, o que pode ser obtido com a biofixação de CO₂. Além

disso, a condução de cultivo deve proporcionar alta produtividade de biomassa, o que pode ser obtida em processo semicontínuo.

A biorrefinaria é considerada como processamento sustentável, que integra os processos de conversão de biomassa para produzir biocombustíveis, produtos de valor agregado e energia. Assim, a combinação dos benefícios pelo uso das microalgas na produção de biocombustíveis e biocompostos, a possibilidade de biotratamento de águas residuais, a fixação de CO₂, dentre outras vantagens, apontam o grande potencial de aplicação das microalgas em biorrefinarias (BORGES, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi estudar o cultivo semicontínuo das microalgas *Spirulina* sp LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111, avaliando a potencialidade das biomassas produzidas para concepção de uma biorrefinaria microalgal.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar o melhor modo de condução de cultivo semicontínuo, avaliando as características cinéticas do cultivo;
- Avaliar a influência da taxa de renovação de meio e CO₂ como fonte de carbono, nas características cinéticas das microalgas *Spirulina* sp LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111, bem como na composição química das biomassas produzidas;
- Verificar as potenciais aplicações da biomassa microalgal.

3 JUSTIFICATIVA

A preocupação com questões ambientais tem se tornado cada vez mais evidente em função da demasiada utilização de recursos naturais em processos produtivos (BARCELLOS, OLIVEIRA; CARVALHO, 2009). Diante disso, busca-se aliar desenvolvimento econômico com proteção ambiental, desenvolvendo-se novos produtos, alternativas de processos e técnicas eficientes no combate e remediação da poluição (SCHMITZ; DAL MAGRO; COLLA, 2012).

Os combustíveis fósseis são um dos principais responsáveis pelo aumento das emissões de CO₂. Projeções indicam que, em 2030, esse aumento poderá chegar a 55% das emissões do ano de 2004, fato que é preocupante, uma vez que o CO₂ é um dos principais gases do efeito estufa que tem contribuído para o aquecimento global. A elevação das emissões de CO₂ é realidade devido à grande demanda de energia primária no mundo. Os combustíveis fósseis representarão 85% dessa energia (SCHAEFFER, 2009). De acordo com Pacala e Socolow (2004) as emissões mundiais de carbono em 2005 eram de 7GtC/ano e chegarão, em 2055, a 14 GtC/ano. Com isso, surgem tecnologias para promover a redução dessas emissões e consequentemente mitigar as mudanças climáticas. A implementação de novas fontes de energia, em alguns casos, é muito cara e a economia mundial ainda é sustentada pelos combustíveis fósseis (IPCC, 2007).

Dentre as abordagens a fim de promover a redução das emissões de CO₂ destaca-se o cultivo de microalgas. Estes organismos fotossintéticos e autotróficos suportam até 50% de CO₂, bem como a presença de outros compostos como NO_x e SO_x (LEE et al., 2002; MORAIS; COSTA, 2008a; RADMANN et al., 2011). Quando comparadas às plantas terrestres, as microalgas têm maior eficiência de fixação de CO₂ (BROWN; ZEILER, 1993). Atributos desejáveis para a fixação de CO₂ por microalgas incluem: altas taxas de crescimento e utilização de CO₂; elevada tolerância aos constituintes dos gases de combustão; possibilidade de obtenção de produtos; tolerância a altas temperaturas, minimizando custos do resfriamento de gases de combustão e capacidade de utilizar águas residuais (BRENNAN; OWENDE, 2010).

A biomassa microalgal obtida de cultivo com CO₂ pode ser utilizada em substituição a fontes fósseis de energia de acordo com seu poder calorífico. O elevado teor de carboidratos e lipídios na biomassa pode ser utilizado para produção de biocombustíveis como bioetanol e biodiesel, respectivamente. A biomassa também pode ser utilizada como alimento e ração animal. No Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal

do Rio Grande já foram desenvolvidos mais de 15 alimentos com a microalga *Spirulina* que apresenta certificado GRAS, podendo ser utilizada como ingrediente sem oferecer risco à saúde humana (FOX, 1996).

Dependendo das condições de cultivo, as microalgas podem ser estimuladas a sintetizar biopolímeros. A maioria dos estudos refere-se ao incremento da fonte de carbono. Com isso, o cultivo de microalgas com CO₂ como fonte de carbono pode contribuir para minimizar os problemas gerados pela elevação da concentração desse gás na atmosfera e descarte inadequado de polímeros de origem petroquímica.

Cultivos semicontínuos tornam-se alternativas para produção em maior escala. Esse modo de cultivo apresenta vantagens operacionais, como dispensar a constante troca de inóculo, além de manter o micro-organismo em elevadas velocidades de crescimento (LOURENÇO, 2006). No cultivo semicontínuo o mesmo inóculo pode ser utilizado por longo período, além de manter o controle de parâmetros nutricionais e cinéticos (REICHERT, REICHERT; COSTA, 2006). Segundo Lourenço (2006) para cultivos semicontínuos a espécie deve ser resistente, o que é observado em microalgas como *Spirulina* e *Chlorella*, sendo capaz de crescer rapidamente, suportando manipulações frequentes.

3.1 Histórico da linha de pesquisa

O Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) estuda o cultivo de microalgas desde 1996. Em 2005, juntamente com a ELETROBRÁS – Centrais Elétricas Brasileiras S.A. e com a Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica (CGTEE), foi firmada uma parceria com objetivo de estudar a biofixação de CO₂ dos gases de combustão do carvão através do cultivo de microalgas. Em 2006, foi assinado novo convênio para implantação de uma planta piloto de cultivo de microalgas para biofixação de CO₂. Em função desse projeto os parceiros ingressaram na *International Network for Biofixation of CO₂ and Greenhouse Gas Abatement with Microalgae*, uma rede de troca de informações sobre biofixação de gases do efeito estufa por microalgas.

Relacionado a esse projeto foram estudados o isolamento e seleção de microalgas para biofixação de dióxido de carbono de usinas termelétricas (MORAIS; COSTA 2007a), biofixação de dióxido de carbono por *Spirulina* sp. e *Scenedesmus obliquus* cultivadas em fotobiorreatores tubulares (MORAIS; COSTA, 2007b), conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO (COSTA; RADMANN, 2008), bioprocessos para remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por

microalgas (MORAIS; COSTA, 2008a), perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono (MORAIS; COSTA, 2008b), preparação de nanofibras com a microalga *Spirulina* (MORAIS et al., 2010), isolamento de microalgas e a aplicação de SO_x e NO_x na biofixação de CO₂ (RADMANN et al., 2011); fixação de dióxido de carbono por microalgas cultivadas em biorreatores abertos (ROSA et al., 2011), biofixação de CO₂ do gás de combustão sintético usando microalgas cultivadas em fotobiorreatores em série (MORAIS et al., 2011).

No ano de 2012, foi reativada a parceria com a CGTEE. Neste projeto estão envolvidos 6 professores e 10 pos-graduandos vinculados ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da FURG. Novos trabalhos estão sendo desenvolvidos nesse projeto, com intuito de ampliar os estudos e conhecimentos sobre a utilização de microalgas para a biofixação de gases de combustão.

CAPÍTULO II

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Aumento das emissões de CO₂

O efeito estufa é um fenômeno natural, causado pela presença de determinados gases presentes na atmosfera, chamados de gases de efeito estufa (GEE). O óxido nitroso (N₂O), metano (CH₄), dióxido de carbono (CO₂) são considerados os mais abundantes GEE. O efeito estufa garante que a temperatura média do planeta esteja próxima aos 15°C, portanto 32°C acima do que seria sem ele. Além disso, sem o efeito estufa, o planeta estaria sujeito a variações bruscas de temperatura entre a noite e o dia, como acontece na lua e desertos (RAVEN, EVERT, EICHHOM; 2001).

O aquecimento global, induzido por concentração de GEE na atmosfera, tem sido tema de grande preocupação. Os combustíveis fósseis são um dos grandes responsáveis pelo aumento das emissões de CO₂ e projeções indicam que, em 2030, esse aumento pode chegar a 55% das emissões do ano de 2004. O aumento das emissões de CO₂ é realidade devido a alta demanda de energia primária no mundo. Os combustíveis fósseis representarão 85% da demanda dessa energia. O carvão mineral contribui com um maior volume de GEE por unidade de eletricidade gerada, que a queima de petróleo ou gás natural. A queima de carvão no mundo libera na atmosfera cerca de 10 Gton CO₂/ano. Petróleo e gás natural contribuem com 10,6 e 5,8 Gton, respectivamente (IEA, 2011).

O aumento nas emissões de CO₂ pode resultar em elevação significativa da temperatura no planeta. Diante disso, governos têm debatido sobre formas de minimizar essas emissões, sem prejudicar o crescimento econômico. Os acordos se baseiam em redução das emissões, aquisição de créditos de carbono, implementação de projetos baseados em tecnologias limpas em outros países. O Mecanismo de Desenvolvimento Limpo (MDL) foi criado na Conferência de Kyoto. Países desenvolvidos podem investir em projetos em países em desenvolvimento, com a promoção de sequestro de carbono, contabilizando redução em suas emissões (BARRETO, FREITAS; PAIVA, 2009).

Acordos internacionais, como o Protocolo de Kyoto, determinam uma quantidade máxima que países desenvolvidos podem emitir desses gases. Os países criam leis que restringem as emissões das indústrias. Portanto, empresas que não conseguem cumprir as metas estabelecidas nacional e internacionalmente, são obrigadas a comprar a cota de poluição que outra empresa ou outro país deixou de emitir. Por sua vez, as indústrias que conseguiram diminuir suas emissões abaixo das cotas determinadas, podem vender o

excedente de "redução de emissão" ou "permissão de emissão" no mercado nacional ou internacional (C&T BRASIL, 2006).

Diante do aumento de emissões de CO₂ surgem tecnologias para promover a redução dessas emissões e consequentemente mitigar as mudanças climáticas. A implementação de novas fontes de energia, em alguns casos, ainda é muito cara e a economia mundial ainda é sustentada pelos combustíveis fósseis. O planeta Terra possui cerca de 70% de água, sendo que 97% dessa encontram-se nos oceanos. Nos oceanos, é onde ocorre cerca de 50% da fixação do CO₂ devido as microalgas. Muitas vezes o processo de fixação (fotossíntese) supera o processo de liberação (respiração), fato que ocorre na zona eufótica devido a presença de organismos fotossintetizantes denominados microalgas (OHSE et al., 2007).

4.2 Microalgas

O termo microalga engloba micro-organismos procarióticos e eucarióticos fotossintéticos que podem se desenvolver rapidamente e sobreviver em condições rigorosas. As microalgas podem ser encontradas em ambientes aquáticos e na superfície de solos. Podem se apresentar como células isoladas, agrupadas ou encadeadas sob a forma de segmentos lineares de células (LOURENÇO, 2006; MATA, MARTINS; CAETANO, 2010; TOMASELLI, 2004).

Fotossinteticamente, as microalgas são mais eficientes que as plantas vasculares e podem ser produzidas em meios de cultivos relativamente simples e em larga escala (SCRAGG et al., 2002). Devido ao seu rápido crescimento, a fixação de CO₂ pelas microalgas é maior quando comparado a cultura terrestres (WANG et al., 2008; BENEMANN, 1997). A biomassa obtida nos cultivos de microalgas pode ser utilizada na formulação de alimento humano e ração animal, extração de pigmentos e vitaminas. Estudos têm apresentado sua aplicação na produção de biocombustíveis (XU; MI, 2011), na mitigação de gases que causam o efeito estufa (RADMANN et al., 2011), extração de biopolímeros (MORAIS et al., 2014 e preparação de nanofibras (STEFFENS et al., 2014).

A biomassa microalgal apresenta cerca de 50% de carbono na sua composição. Assim, o fornecimento deste nutriente aos cultivos representa um importante componente dos custos de produção, seja gasoso na forma de dióxido de carbono, ou sólido, principalmente na forma de bicarbonato (VONSHAK, 1997).

Sob condições de estresse, muitas microalgas alteram sua rota biossintética para formação e acúmulo de bioprodutos de interesse. Os principais estímulos ao estresse químico são a composição, salinidade e o pH do meio de cultivo. A limitação de nitrogênio nos meios de cultivo pode alterar rotas relacionadas com a síntese de proteínas, que poderá ser desviada para sintetizar carboidratos ou lipídios (FOGG, 1966). Entre os estresses físicos, a temperatura e a intensidade luminosa são os mais importantes.

A microalga *Spirulina* pertence ao grupo das *Cyanophytas*, também denominadas algas azuis. Esta microalga apresenta organização celular procariótica, filamentosa, que forma tricomas cilíndricos multicelulares, com 1 a 12 μm de diâmetro, e se dispõem na forma espiralada, com até 1 mm de comprimento (VONSHAK, 1997). Sua biomassa contém alto teor de proteína, sendo encontrados valores entre 46 e 86% (BECKER, 2006; MORAIS et al., 2009). A parede celular da microalga *Spirulina* é mais digerível do que outras, pois é constituída por mucopolissacarídeos e não por celulose. A ausência da parede celulósica é uma vantagem do ponto de vista de preservação da integridade de componentes como vitaminas e ácidos graxos poliinsaturados, uma vez que dispensa o uso de calor para disponibilizar os nutrientes (TOMASELLI, 1997).

A microalga *Chlorella* pertence ao grupo das *Chlorophytas* (*Chlorophyceae*), ou algas verdes. Esta microalga é unicelular, com formato esférico, globular ou elipsoidal, não móvel que pode atingir diâmetros entre 2 e 10 μm . Essa microalga é produzida por mais de setenta companhias, sendo a japonesa Nihon *Chlorella* Inc. a precursora em 1961. Inicialmente ela foi comercializada como suplemento alimentar, e depois como alimento para a aquicultura marinha. A microalga *Chlorella* possui grande capacidade fotossintética, é rica em micronutrientes, possui alto teor de clorofila, proteínas, vitaminas, sais minerais e ácidos graxos (HENRIKSON, 1994). Tem sido reconhecida e bastante estudada para produção de biodiesel, devido ao alto teor de lipídios que pode acumular. Illman, Scragg e Shales (2000) em cultivo de *Chlorella emersonii* obtiveram 63 % de lipídios em meio de cultura deficiente de nitrogênio. O principal componente para a saúde humana presente nessa microalga é o β -1,3-glicano, que é um ativo imunoestimulador e que reduz radicais livres e a quantidade de lipídeos no sangue (IWAMOTO, 2004; SPOLAORE et al., 2006).

Em 1981, o FDA (*Food Drug Administration*) emitiu o certificado GRAS (*Generally Recognized As Safe*) no qual a microalga *Spirulina* foi legalmente aceita como fonte de proteínas, vitaminas e minerais. Ela pode ser comercializada como alimento ou complemento alimentar desde que precisamente qualificada, livre de contaminantes e de adulteração (FOX, 1996). No Brasil, a ANVISA também reconhece a *Spirulina* como

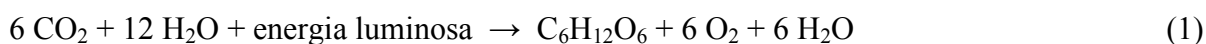
ingrediente que pode ser utilizado nas formulações de alimentos. A microalga *Chlorella*, assim como a *Spirulina*, possui certificado GRAS emitido pelo FDA, podendo ser utilizada como alimento sem oferecer risco à saúde humana.

4.3 Processo fotossintético em microalgas

A fotossíntese é realizada por microalgas como metabolismo principal para a obtenção de carbono orgânico através do carbono inorgânico contido no CO₂, utilizando a energia solar e liberando oxigênio na atmosfera. O processo de fotossíntese envolve duas importantes reações. A primeira é a reação de rompimento da molécula de água, que envolve oxigênio como coproduto. A segunda é a fixação de CO₂ em compostos orgânicos (MASOJÍDEK, KOBLÍZEK; TORZILLO, 2004)

A fotossíntese é um processo metabólico realizado por todos os organismos fotoautotróficos, tais como bactérias fotossintéticas (*Rhodopseudomonas* sp., *Rhodospirillum* sp.), microalgas em geral (*Spirulina* sp., *Synechococcus* sp., *Anabaena* sp.) e plantas superiores (MOHANTY, MADHULIKA; KRISHNA, 1997). A fotossíntese das microalgas assemelha-se à das plantas superiores. O conhecimento do processo de fotossíntese é importante, portanto, em estudos de cultivo de microalgas, uma vez que estas são micro-organismos fotossintéticos responsáveis por uma parcela substancial da produção de O₂ e fixação de CO₂ (ZASLAVSKAIA et al., 2001).

A fotossíntese pode ser definida como um processo físico-químico, mediante o qual os organismos fotossintéticos sintetizam compostos orgânicos a partir de energia solar, água, dióxido de carbono e sais minerais. A reação global de fotossíntese pode ser representada pela Equação 1.

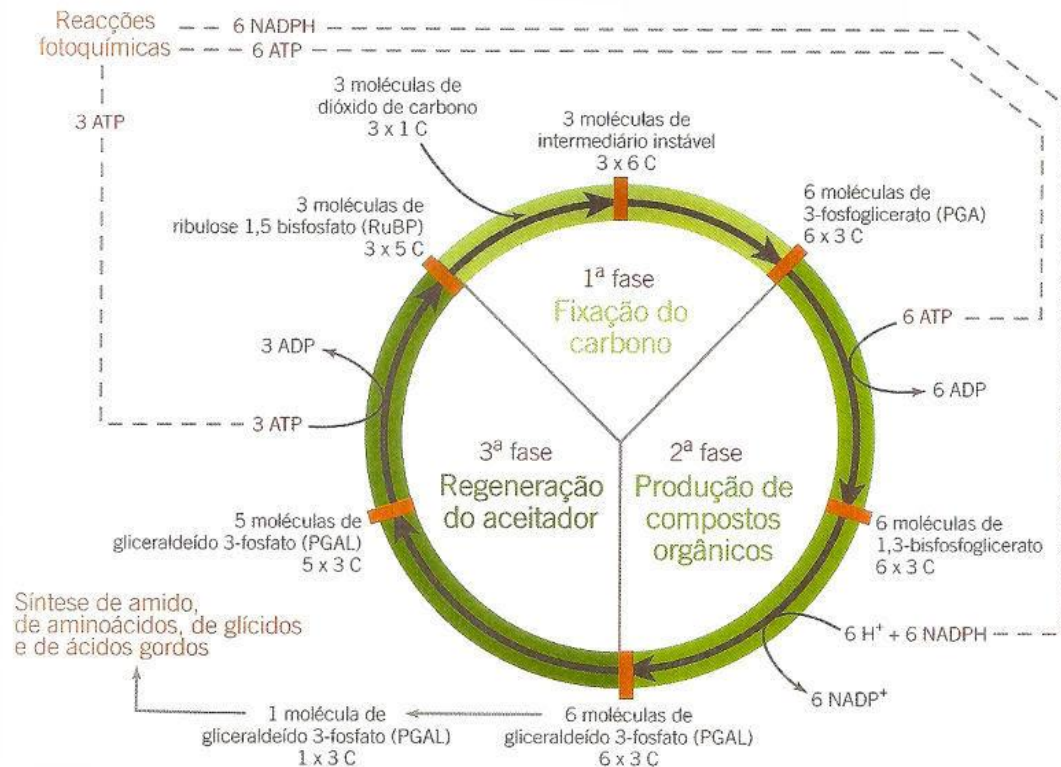


Através desta reação global, duas fases distintas podem ser identificadas: a fase clara (etapa fotoquímica) e a fase escura (etapa química). As reações da fase clara envolvem a captação da energia luminosa e conversão do ATP com redução de energia realizada pelo transporte de elétrons da H₂O para o NADP⁺. O local destas reações que envolvem o transporte de elétrons são as membranas tilacóides dispersas nas células. As reações da fase escura, de natureza enzimática, utilizam a energia gerada das reações da fase clara para converter CO₂ em carboidratos (VONSHAK, 1997).

4.4 Biofixação de CO₂ por microalgas

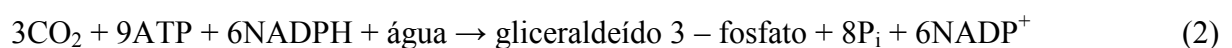
Entre as abordagens de redução de emissão de dióxido de carbono (CO₂), o uso de microalgas é considerado uma das soluções mais eficazes (MORAIS; COSTA, 2007b). O CO₂ liberado por indústrias, termelétricas à base de carvão ou queima de outros combustíveis fósseis, poderá ser utilizado no processo fotossintético, produzindo biomassa. A seleção de cepas de microalgas adequadas para fixação de CO₂ tem efeito significativo sobre a eficácia e a competitividade dos custos de processo de fixação. Atributos desejáveis para a fixação de CO₂ incluem altas taxas de crescimento e tolerância a vestígios de constituintes dos gases de combustão, tais como SO_x e NO_x, materiais particulados, possibilidade de produção de bioprodutos, como biodiesel e bioetanol. Facilidade de colheita, associados a sedimentação espontânea ou características de biofloculação, tolerância a altas temperaturas para minimizar o custo de resfriamento de gases de combustão e capacidade de utilizar águas residuais também são considerados (BRENNAN; OWENDE, 2010).

O CO₂ solubilizado na fase aquosa dos cultivos de microalgas pode ser sequestrado por precipitação química, por meio da reação dos íons bicarbonato e carbonato com elementos presentes no meio de cultivo, como cálcio e magnésio (LEE; APEL; WALTON, 2004; MARCUS, 1997). A biofixação de carbono pelas microalgas é efetuada segundo o ciclo de Calvin-Benson (Figura 1), em que enzimas presentes nestes organismos catalisam reações que incorporam átomos de carbono, oriundos do CO₂ (FALKOWSKI, 1997).

Figura 1 - Ciclo de Calvin.

Fonte: CARRAJOLA, CASTRO; HILÁRIO (2007).

Na reação central de fixação de carbono, um átomo de carbono inorgânico é convertido em carbono orgânico. O CO_2 disponível combina-se com a ribulose 1,5 bifsosfato e água para resultar em duas moléculas do composto 3 – fosfoglicerato. Esta reação de fixação é catalisada no estroma cloroplástico pela ribulose bifsosfato carboxilase. A reação de fixação de CO_2 é energeticamente favorável devido à reatividade do composto ribulose 1,5-bifsosfato rico em energia, sobre o qual cada molécula de CO_2 é adicionada. Porém, para produzir um suprimento suficiente de ribulose 1,5-bifsosfato, é necessária uma série de reações que consomem grandes quantidades de NADPH e ATP. No ciclo de fixação de carbono (Ciclo de Calvin), 3 moléculas de ATP e 2 moléculas de NADPH são consumidas para cada molécula de CO_2 convertida em carboidrato, de acordo com a Equação 2 (ALBERTS et al., 1994).



O gliceraldeído 3-fosfato produzido nos cloroplastos pelo ciclo de fixação do carbono é um açúcar de 3 carbonos que serve como intermediário central da glicólise. Grande parte dele é transportada pelo citosol, onde pode ser convertido em frutose 6-fosfato e glicose

1-fosfato, pela inversão de várias reações da glicólise. A glicose 1-fosfato é então convertida no nucleotídeo-açúcar UDP-glicose, e este se combina com a glicose 6-fosfato para formar sacarose-fosfato, o precursor imediato do dissacarídeo sacarose. A sacarose é a principal forma em que açúcar é transportado entre as células vegetais: assim como a glicose é transportada no sangue de animais, a sacarose é exportada das folhas por meio dos feixes vasculares, fornecendo o carboidrato necessário pelo resto do vegetal. A maior parte do gliceraldeído 3-fosfato que permanece no cloroplasto é convertido em amido no estroma. À noite, o amido é quebrado para auxiliar no suprimento das necessidades metabólicas do vegetal (ALBERTS et al., 1994).

Existe uma grande variedade de espécies de microalgas e para projetos de sequestro de CO₂, deve-se avaliar a cepa a ser utilizada tanto em relação à expectativa de sequestro quanto em relação à resistência a condições adversas.

4.5 Composição química de microalgas

Muitas microalgas são utilizadas para produção em grande escala. Entretanto, a escolha de espécies envolve questões diversas, como a velocidade de crescimento e sua composição química. Essas variáveis são influenciadas por alguns fatores como o meio de cultura utilizado, idade do cultivo, intensidade luminosa, temperatura, salinidade e o fotoperíodo (BROWN et al., 1997).

Diante disso, existe demanda por pesquisas prospectivas de fisiologia e composição química de microalgas para identificar espécies úteis a aplicações comerciais. Os principais constituintes da composição química das microalgas são as proteínas, carboidratos, lipídios, pigmentos, antioxidantes, ácidos graxos e vitaminas. Becker (2004) afirma que as microalgas podem apresentar de (1 a 40%) de lipídios. Os principais fatores intervenientes na produção de lipídios são a composição do meio de cultivo, a salinidade, pH e a intensidade luminosa. Lipídios de microalgas são compostos por glicerol ou bases esterificadas de ácidos graxos saturados ou insaturados. Entre todos os ácidos graxos encontrados em microalgas, os da família ω 3 e ω 6 são de particular interesse (SPOLAORE et al., 2006). A Tabela 1 apresenta o conteúdo lipídico, de proteínas e carboidratos em algumas espécies de microalgas.

Tabela 1 – Composição química de algumas espécies de microalgas.

Espécie	Proteína (% p/p)	Carboidrato (% p/p)	Lipídios (% p/p)
<i>Anabaena cylindrica</i>	43-56	25-30	4-7
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Synechococcus</i> sp.	63	15	11
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14

Fonte: BECKER (2006).

As microalgas *Spirulina* e *Chlorella* tem sido foco de muitas pesquisas. A *Spirulina* é uma microalga com reconhecido valor nutricional devido ao seu alto teor de proteínas (64 - 84%) e à presença de ácidos graxos essenciais (γ -linolênico) em seu conteúdo lipídico (COHEN, 1997; MORAIS et al., 2009). De acordo com Quillet (1975) os carboidratos constituem cerca de 15 - 25% do peso seco da microalga *Spirulina*. Moléculas simples como glicose, frutose e sacarose estão presentes em pequenas quantidades. Do ponto de vista nutricional, o único carboidrato de ocorrência em quantidade de interesse é o mesoinositol fosfato, uma excelente fonte de fósforo orgânico e inositol. Os minerais em maior quantidade na microalga *Spirulina* são cálcio, ferro, fósforo, magnésio, manganês, potássio e zinco (BRANGER et al., 2003). As principais vitaminas presentes são B₁, B₂, B₁₂ e E (SHIMAMATSU, 2004).

A microalga *Chlorella* possui em média, 20% de lipídios, 45% de proteínas, 20% de carboidratos e 10% de minerais e vitaminas (PHUKAN et al., 2011). Essa microalga contém ainda mais de 2% de clorofila, o que lhe permite rápido crescimento, pois seu metabolismo principal é a fotossíntese, onde a fonte principal de energia é a luz solar (VONHAK, 1997). Conforme Scragg et al. (2002), teores lipídicos de 28 e 25% podem ser encontrados em *Chlorella vulgaris* e *Chlorella emersonii*, respectivamente. Para meio de cultivo com baixo teor de nitrogênio 58 e 34% de lipídios foram encontrados para *Chlorella vulgaris* e *Chlorella emersonii*, respectivamente.

Os biopolímeros são polímeros ou copolímeros produzidos a partir de matérias primas de fontes renováveis. Esses materiais poliméricos são acumulados como reserva de

carbono e energia, por diversos micro-organismos, incluindo as microalgas. Dependendo das condições de cultivo, a microalga *Spirulina* é estimulada a sintetizar biopolímeros que poderão substituir os polímeros de origem petroquímica. As condições de cultivo são limitação de nutrientes essenciais como nitrogênio, fósforo, enxofre ou oxigênio, e na presença de excesso de fonte de carbono (LEE; CHOI; WONG, 1999). O uso de microalgas como fornecedores de matérias primas renováveis é adequado para aumentar a eficiência econômica de biopolímeros (HAASE, HUCHZER MEYER; RATH, 2012).

4.6 Regimes de cultivo

Os regimes de cultivos podem ser classificados em contínuo, descontínuo, descontínuo alimentado e semicontínuo. Essa classificação é importante, uma vez que tem consequência direta no aproveitamento da biomassa microalgal (LOURENÇO, 2006).

4.6.1 Contínuo

O processo contínuo consiste na adição contínua de substrato, havendo também retirada do produto na mesma vazão de alimentação da cultura (BORZANI et al., 2001; TREVAN et al., 1990). Esse regime de cultivo pode exigir dias ou semanas para se estabilizar, encontrando o estado de equilíbrio entre a produção de biomassa e a entrada de meio de cultivo. O uso de medida de crescimento, de consumo de nutrientes e de densidade óptica, auxilia a determinação das condições experimentais necessárias (LOURENÇO, 2006).

Cultivos contínuos eram basicamente utilizados em pesquisa, principalmente em função do custo, dos cuidados necessários e da complexidade dos sistemas envolvidos. Contudo, em função do desenvolvimento de aplicações biotecnológicas de cultivo de microalgas, investimentos no desenvolvimento tecnológico de equipamentos vêm viabilizando o uso de cultivos contínuos em nível comercial (LOURENÇO, 2006).

4.6.2 Descontínuo e descontínuo alimentado

Cultivos descontínuos, também conhecidos como batelada ou estanques são caracterizados pelas modificações intensas na composição do meio de cultura ao longo do desenvolvimento do cultivo. Neste tipo de cultivo, as células são inoculadas no meio de cultura fresco e nenhum outro componente é adicionado ao longo do cultivo. O frasco pode

ser amostrado e seu conteúdo pode ser totalmente removido em determinado momento ou, ainda, ser parcialmente retirado e aproveitado, mas o volume removido não é substituído por novo meio de cultura (LOURENÇO, 2006). Apesar de ser muito utilizado, este método não permite ao micro-organismo condições ótimas de crescimento, devido à depleção do substrato, pois dependendo do tempo, alguns nutrientes serão totalmente consumidos antes do término do cultivo. O processo em batelada alimentada consiste da adição contínua de substrato ao longo do cultivo, eliminando o fenômeno de depleção pelos nutrientes e permitindo aumento no período produtivo do processo (BORZANI et al., 2001; TREVAN et al., 1990). Os cultivos estanques podem ser utilizados em diversas aplicações, desde pesquisa e manutenção de cepas em laboratório até aplicações comerciais (LOURENÇO, 2006).

4.6.3 Semicontínuo

São cultivos que propiciam grande produção de células por intervalo de tempo. No regime semicontínuo há substituição de parte do meio de cultivo em intervalos periódicos e coleta da biomassa, geralmente quando a concentração desta é alta (LOURENÇO, 2006). Essa operação, também chamada de corte, deve ser realizada sempre que o cultivo atingir este estágio. A concentração do micro-organismo no qual é realizado o corte é denominada de concentração celular de corte, e a fração de meio de cultivo retirada com posterior adição de meio novo é chamada de taxa de renovação de meio. O corte deve ser feito quando o micro-organismo está na fase de crescimento exponencial, para não haver fase de adaptação, conseguindo-se assim, um processo quase contínuo de produção de biomassa (BORZANI et al., 2001).

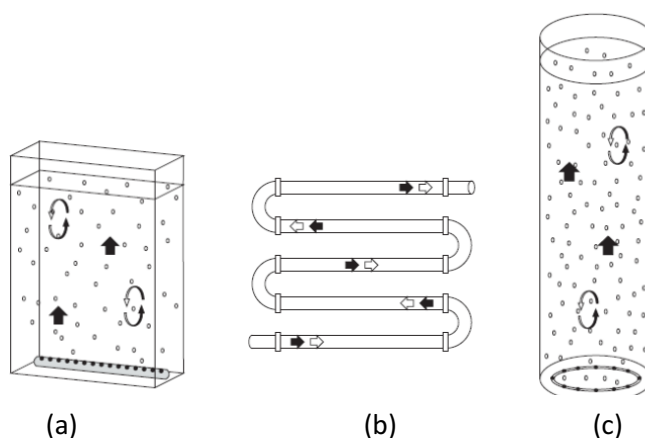
As curvas de crescimento típicas nesse modo de cultivo apresentam variações bruscas na concentração de células. A produtividade é elevada, bem como o consumo de nutrientes. Para microalgas o cultivo semicontínuo apresenta vantagens operacionais, como dispensar a constante troca de inóculo, além de manter o micro-organismo em elevadas velocidades de crescimento. Com o cultivo semicontínuo é possível a manutenção da cultura de crescimento por tempos mais prolongados, procedendo-se apenas a alimentação periódica de meio de cultivo novo. O uso de cultivos semicontínuos em sistemas comerciais é bastante difundido, a espécie deve ser resistente, sendo capaz de crescer em taxas altas, suportando manipulações frequentes (LOURENÇO, 2006).

4.7 Fotobiorreatores para o cultivo de microalgas

Os sistemas de produção de microalgas são baseados em fotobiorreatores abertos e fechados. O termo fotobiorreator diz respeito a sistemas onde micro-organismos fotoautotróficos são produzidos ou utilizados para realizar uma reação fotobiológica. A viabilidade técnica de cada sistema é influenciada pelas propriedades intrínsecas das espécies de microalgas, de condições climáticas, dentre outros. A produção comercial de biomassa fotoautotrófica é limitada a poucas espécies cujas culturas são realizadas em sistemas abertos, muitos dos quais não podem ser mantidos por tempos longos em função do risco de contaminação. Ao contrário dos sistemas abertos, os fotobiorreatores fechados oferecem ambiente protegido, menos suscetível a contaminação e que possibilita melhor controle (BRENNAN; OWENDE, 2010; OHSE et al., 2007; TREDICI, 2004).

Os fotobiorreatores também podem ser classificados quanto a geometria como planos ou tubulares, horizontais, inclinados, verticais ou espirais, e do tipo *manifold* ou serpentina (Figura 2). Esses sistemas podem ser de uma fase, preenchidos com meio e as trocas gasosas sendo efetuadas em um trocador de gases externo, ou de duas fases, no qual gás e líquido estão presentes no interior do reator, onde ocorrem as trocas gasosas. É comum o uso de materiais transparentes, podendo ser rígidos ou flexíveis (TREDICI, 2004).

Figura 2 - Geometrias de fotobiorreatores utilizadas em cultivos de microalgas: (a) Plana. (b) Tubular. (c) Cilíndrica.

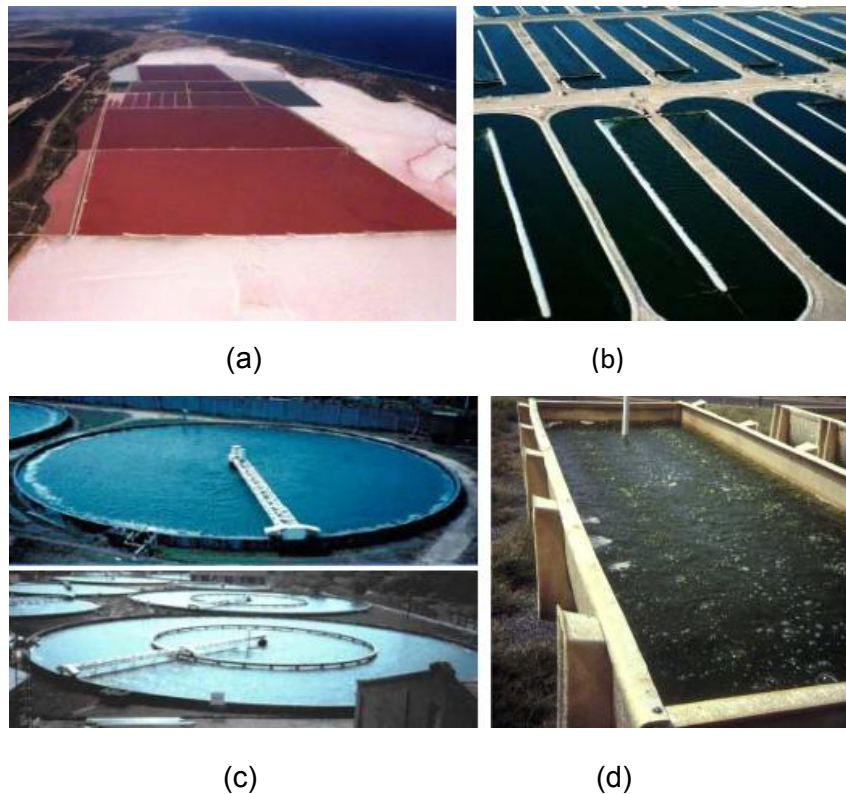


Fonte: JACOBI, IVANOVA; POSTEN (2010), adaptado.

4.7.1 Fotobiorreatores abertos

Os sistemas abertos podem ser divididos em águas naturais (lagos, lagoas) ou tanques artificiais (CARVALHO; MEIRELES; MALCATA, 2006). Os melhores exemplos de cultivo de microalgas em lagoas naturais são o cultivo de *Dunaliella salina* no México e na Austrália (Figura 3a). Sistemas do tipo *raceways* são utilizados nos cultivos de *Arthrospira* nos Estados Unidos (Figura 3b) e *Dunaliella salina* em Israel. Lagoas circulares são utilizadas no Japão, Taiwan e Indonésia para cultivo de *Chlorella* (Figura 3c). Tanques são geralmente utilizados para produção em menor escala para gêneros utilizados na aquicultura, como a *Nannochloropsis oculata* (BOROWITZKA, 2005; LOURENÇO, 2006; TREDICI, 2004).

Figura 3 - Fotobiorreatores abertos para produção de microalgas. (a) Produção de *Dunaliella salina* em lagoas abertas na Austrália. (b) Fotobiorreator do tipo *raceway*, cultivo de *Spirulina* nos EUA. (c) Lagoa circular para produção de *Chlorella* em Taiwan. (d) Produção de *Nannochloropsis* para aquicultura.



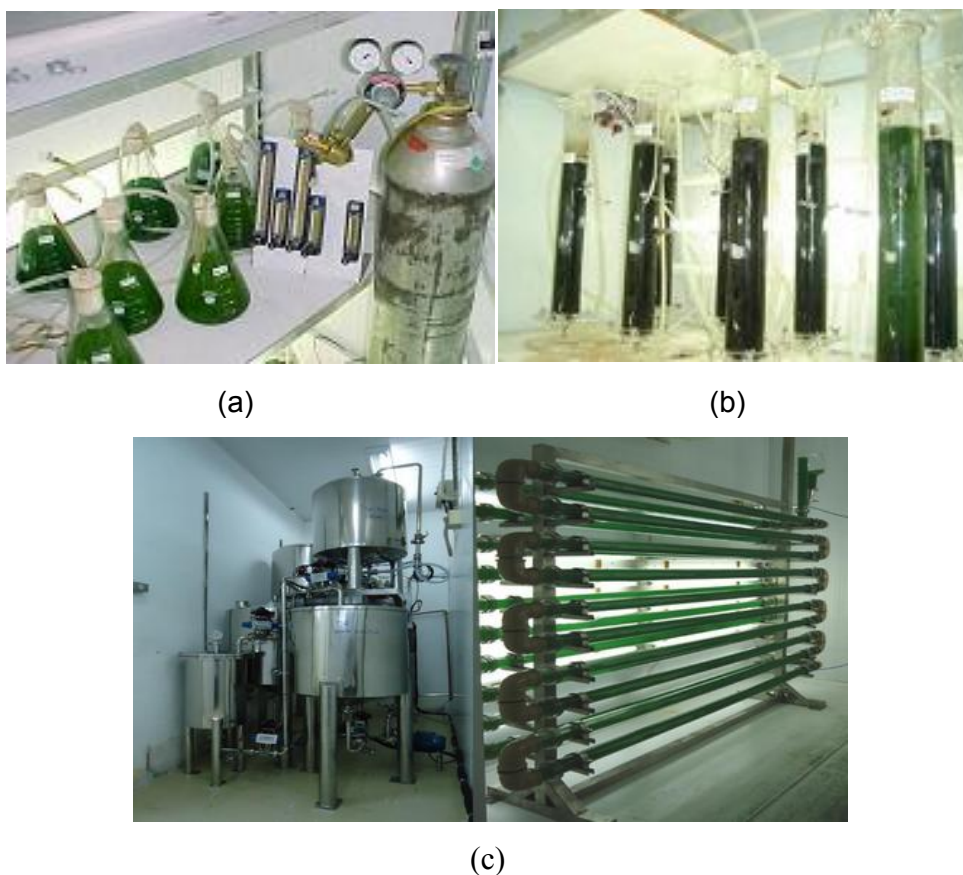
Fonte: BOROWITZKA (2005); CHISTI (2007).

Estes fotobiorreatores podem apresentar zonas de estagnação da cultura, onde as células não recebem luz, afetando o processo fotossintético e baixando a absorção de CO₂, bem como o crescimento celular. Outro problema dos sistemas abertos é que as produtividades obtidas são menores que as teoricamente possíveis, devido à dificuldade de controle dos parâmetros ambientais de cultivo. A temperatura é o principal fator limitante, assim como variações sazonais de radiação solar que levam a obtenção de baixas concentrações de biomassa. Os sistemas abertos eram considerados os mais utilizados para cultivo de microalgas, entretanto a preparação de produtos com alto valor agregado como fármacos e cosméticos foram as bases para a adoção de sistemas fechados, os quais possibilitam maior reprodutividade (JIMÉNEZ et al., 2003; OGBONNA; TANAKA, 2000).

4.7.2 Fotobiorreatores fechados

Embora os fotobiorreatores fechados (Figura 4) necessitem de mais investimento na sua construção e operação, há uma série de vantagens no uso desses sistemas: menores perdas de água por evaporação; redução dos problemas de contaminação por outros micro-organismos; facilidade na colheita da biomassa, que se concentra em menores volumes de cultura; controle maior das trocas gasosas entre o cultivo e o ar atmosférico ou gas de combustão; são compactos; maior rendimento por unidade de área e volume (LOURENÇO, 2006; UGWU, AOYAGI; UCHIYAMA, 2008).

Figura 4 - Diferentes tipos de fotobiorreatores fechados. (a) Fotobiorreatores do tipo erlenmeyer; (b) Fotobiorreatores tubulares verticais; (c) Fotobiorreator tubular horizontal



Fonte: Laboratório de Engenharia Bioquímica – FURG.

Segundo LOURENÇO (2006), a maioria dos fotobiorreatores fechados apresenta formato tubular ou cilíndrico, com disposição vertical ou horizontal dos tubos. Os fotobiorreatores planos começaram a ser desenvolvidos, indicados como muito promissores no cultivo de microalgas, pois possibilitam utilizar eficientemente a energia solar, através do ajuste do ângulo e orientação de seus painéis. Borbulhamento de ar pode ser adotado para obter eficiência de mistura e promover trocas gasosas. Esses sistemas são utilizados com frequência em laboratório pela facilidade em medir a irradiância na sua superfície (LOURENÇO, 2006; TREDICI, 2004).

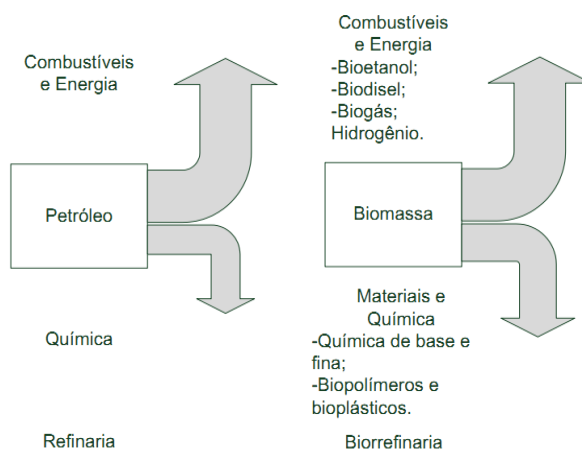
4.8 Microalgas no conceito de biorrefinaria

O uso da biomassa na indústria de bioprodutos ainda enfrenta obstáculos técnicos. Contudo, pesquisas contribuem para geração de dados úteis e criação de oportunidades para produtos de alto valor agregado, com uma utilização otimizada de biomassa.

Consequentemente, isso se torna uma das principais razões para dar enfoque no desenvolvimento de biorrefinarias no Brasil (BORGES, 2010).

A refinaria tradicional, que utiliza petróleo como matéria-prima, abastece principalmente combustíveis de transporte e energia, e somente uma fração relativamente pequena é direcionada para a química. Através de processos de biorrefinarias uma quantia relativamente maior pode ser direcionada para a bioquímica e produção de biocompostos (KAMM; GRUBER; KAMM, 2006). Um paralelo entre os conceitos de uma refinaria de petróleo tradicional e de uma biorrefinaria são esquematicamente representados na Figura 5.

Figura 5 - Representação esquemática entre o conceito de refinaria e o de biorrefinaria.

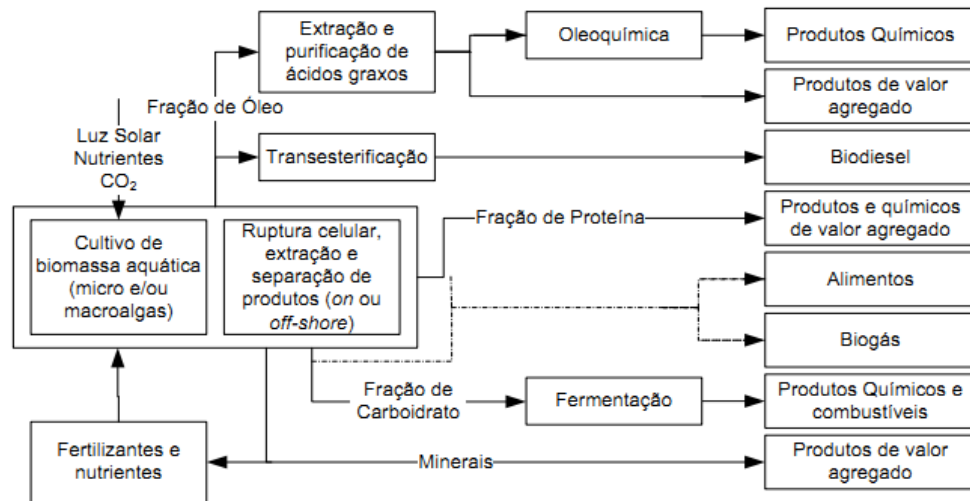


Fonte: REE; ANNEVELINK (2007).

A biorrefinaria é considerada como processamento sustentável em planta industrial que integra os processos de conversão de biomassa para produzir biocombustíveis, bioprodutos de valor agregado e energia (REE; ANNEVELINK, 2007).

As fontes de biomassas competitivas para o uso em biorrefinarias no Brasil são os resíduos vegetais, sólidos urbanos, industriais, animais e florestais, além de uma alternativa emergente que tem recebido especial atenção, as microalgas. As biorrefinarias são distinguidas em biorrefinarias verdes, de cereais, de lignocelulose, de duas plataformas, termo-químicas e aquáticas (BORGES, 2010). No conceito biorrefinarias aquáticas encontram-se as microalgas (Figura 6).

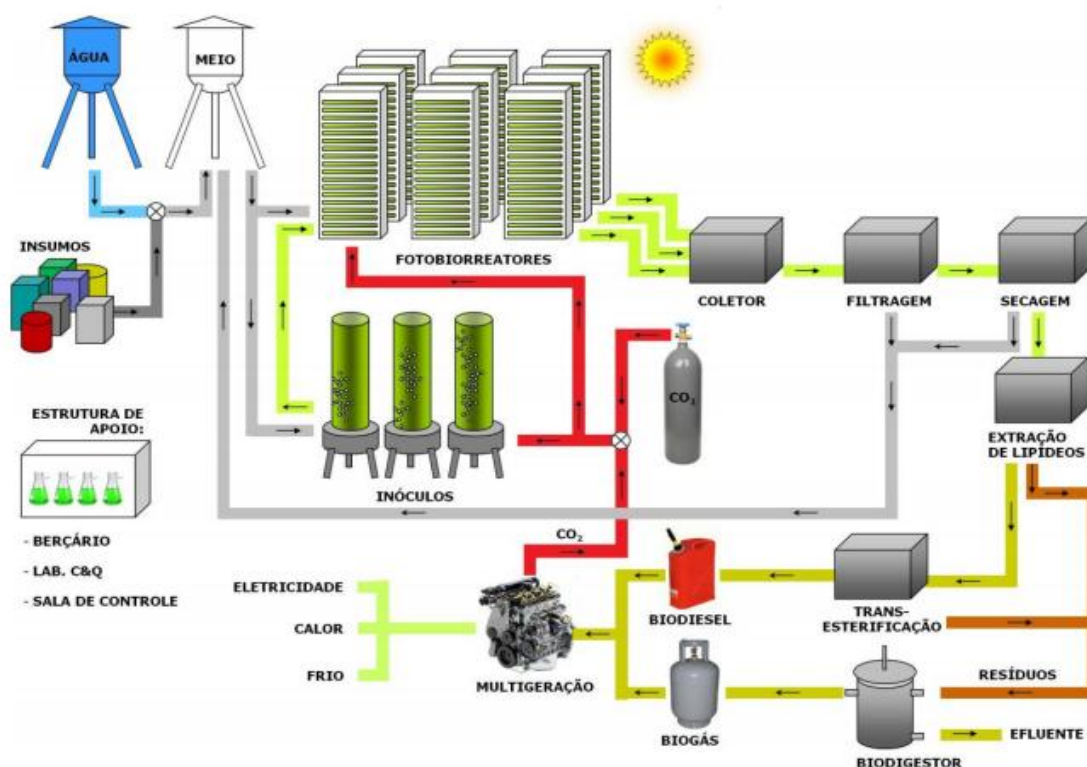
Figura 6 - Esquema geral do conceito de biorrefinarias a partir de biomassa aquática.



Fonte: REE; ANNEVELINK (2007).

O biodiesel produzido por microalgas tem se destacado devido a sua elevada potencialidade para substituir a dependência dos combustíveis fósseis, principalmente no domínio dos transportes. Contudo, diversas formas alternativas de energia podem ser produzidas por esses micro-organismos, como etanol, hidrogênio, metano, biomassa para combustão e gaseificação. Após a extração lipídica para a produção de biodiesel, os carboidratos existentes na biomassa remanescente podem ser utilizados como substrato de fermentação para a produção de bioetanol, o que permite otimização da biomassa potencialmente energética. O etanol é obtido por microalgas (ricas em polissacarídeos) através da conversão do amido e da celulose. O processo baseia-se, fundamentalmente, na fermentação dos carboidratos. O CO₂ resultante do processo de fermentação pode, por sua vez, alimentar a produção nova de biomassa, o que permite o funcionamento em sistema fechado (Figura 7).

Figura 7 - Fluxograma da unidade autossustentável do NPDEAS (Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável).



Fonte: MARIANO et al. (2009).

De acordo com Borges (2010), a produção anual de 100.000 t/ano de microalgas consome 188.356 kg/CO₂. Oliveira (2010) considera a hipótese de direcionar todo o CO₂ da fermentação para o cultivo de microalgas, e afirma que poderia ser produzido cerca de 260.000 t/ano de microalgas com teor de lipídios variando de 30 a 70%. Para ser analisado o potencial de produção de biocombustíveis de terceira geração, foi adotado teor de lipídios de 50% na composição das microalgas. Neste caso, o complexo poderia ofertar cerca de 130.000 t/ano de biodiesel. Além disso, a fração não lipídica poderia ser convertida em biogás para aumentar a oferta da biomassa microalga como matéria-prima.

Os principais produtos de uma biorrefinaria são biocompostos, biocombustíveis, energia, materiais, amido e madeira, além de minerais, CO₂ e H₂O. O CO₂ e H₂O produzidos nos processos de uma biorrefinaria também podem ser utilizados no crescimento de biomassa das microalgas, fechando o ciclo e aproveitando todo o potencial de produção. A combinação dos benefícios pelo uso das microalgas na produção de biocombustíveis e outros produtos de valor agregado, a fixação de CO₂, dentre outras vantagens, apontam o grande potencial das

microalgas para biorrefinarias. Por isso, é importante determinar a melhor forma para se efetuar a captura de CO₂, associada a uma utilização da biomassa gerada (BORGES, 2010).

CAPÍTULO III

5 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

O trabalho foi dividido em duas etapas, em que a partir de cada uma foi gerado um artigo que será submetido para publicação em periódico de circulação internacional, de acordo com o QUALIS.

Na primeira etapa (artigo 1) foram estudados diferentes modos de conduzir o cultivo semicontínuo da microalga *Spirulina* sp. LEB 18, avaliando-se a cinética de crescimento. Na segunda (artigo 2), o melhor modo de condução de semicontínuo, selecionado no artigo 1, foi estudado no cultivo das microalgas *Spirulina* sp LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 com dióxido de carbono (CO₂) como fonte de carbono. Nesta etapa foram avaliados os parâmetros cinéticos e foi realizada caracterização das biomassas, a fim de verificar a potencial utilização dessas para uma biorrefinaria microalgal.

Diante do exposto, os artigos desenvolvidos nessa dissertação de mestrado foram:

ARTIGO 1 - *Spirulina* sp. LEB 18 em diferentes conduções de cultivo semicontínuo para produção de biomassa (item 5.1)

ARTIGO 2 - Biorrefinaria Microalgal: a potencialidade da biomassa como matéria prima (item 5.2)

5.1 ARTIGO 1 - “*Spirulina* sp. LEB 18 EM DIFERENTES CONDUÇÕES DE CULTIVO SEMICONTÍNUO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA”

***Spirulina* sp. LEB 18 EM DIFERENTES CONDUÇÕES DE CULTIVO
SEMICONTÍNUO PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA**

RESUMO

Cultivos semicontínuos de microalgas são alternativas para produção em maior escala, mantendo o micro-organismo em elevadas velocidades de crescimento. Estudos demonstram que os cultivos semicontínuos podem ser conduzidos de dois modos. Em um destes é fixado uma concentração celular de corte, na fase exponencial. No outro tipo de condução é fixado em intervalo de tempo de corte. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi selecionar o modo de condução do cultivo semicontínuo para a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 que apresentasse melhores respostas cinéticas. Os cultivos foram realizados a 30°C, 41,6 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fotoperíodo 12 h claro/escuro, em fotobiorreatores tubulares verticais, com volume útil de 1,5 L. Para analisar a cinética dos cultivos e produção de biomassa, foram estudados dois modos de conduzir o cultivo. Para ambos os métodos iniciou-se os cortes ao final da fase exponencial de crescimento. Em um dos ensaios os cortes foram realizados quando o experimento alcançou a concentração celular fixa de 1,6 g.L^{-1} . No outro, os cortes foram realizados a cada 3 d. Os parâmetros cinéticos avaliados foram velocidade específica de crescimento e produtividade de biomassa, assim como, foi avaliada a concentração de biomassa produzida. Os máximos valores de produtividade média (0,092 $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) e concentração de biomassa (8,37 g) foram encontrada no ensaio com concentração celular de corte fixa em 1,6 g.L^{-1} e taxa de renovação de 40% (v/v). Este trabalho comprova a importância de ser fixada uma concentração celular de corte, com fundamento teórico bioquímico e biotecnológico.

Palavras Chave: cinética de crescimento, fase exponencial de crescimento, taxa de renovação.

ABSTRACT

Semi-continuous cultivations of microalgae are alternatives for large-scale production, maintaining the microorganism at high growing speeds. Studies show that semi-continuous cultivation can be conducted in two ways. In one of these, a cell concentration cutoff is set in the exponential phase. In the other type of conduction, it is set in the interval of the time cutoff. Thus, the aim of this work was to select the conduction mode for the semi-continuous cultivation of *Spirulina* sp. LEB 18 that presents the best kinetic responses. The cultivations were performed at 30 °C, 41.6 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, photoperiod 12 h light/dark, in vertical tubular photobioreactors, with a working volume of 1.5 L. To analyze the kinetics of the cultivations and biomass production two modes of conducting the cultivation were studied. For both methods, the cutoffs were started at the end of the exponential growth phase. In one of the assays, the cutoffs were done when the experiment reached a fixed blend concentration of 1.6 g L⁻¹. In the other, the cutoffs were carried out every 3 d. The kinetic parameters evaluated were specific growth rate and biomass productivity as well as the concentration of biomass production was evaluated. The maximum values of average productivity (0.092 g.L⁻¹.d⁻¹) and biomass concentration (8.37 g) were found in the assay with cell concentration cutoff set at 1.6 g.L⁻¹ and a renewal rate of 40% (v/v). This work proves the importance of setting a cell concentration cutoff, with theoretical biochemical and biotechnological basis.

Keywords: growth kinetics, exponential phase of growth, renewal rate.

1INTRODUÇÃO

Os processos biológicos são considerados como alternativas no combate a poluição e geração de novos produtos. O metabolismo microbiano degrada e remove poluentes, gerando produtos menos nocivos ao meio ambiente. Neste cenário, destacam-se as microalgas que têm sido estudadas no tratamento de efluentes, biossorção de metais tóxicos (DOTTO; CADAVAL; PINTO, 2012; DAL MAGRO; HEMKEMEIER; COLLA, 2011; MEZZOMO et al., 2010), biofixação de dióxido de carbono (CO₂) (RADMANN et al., 2011), produção de biocombustíveis (XU; MI, 2011), biopolímeros e nanofibras (MORAIS et al., 2014; STEFFENS et al., 2014).

A fim de aumentar a produtividade da biomassa microalgal e reduzir os custos de produção, diversas condições de cultivo são estudadas. Cultivos semicontínuos oferecem vantagens em comparação aos processos descontínuo e contínuo. O processo semicontínuo consiste em substituir, periodicamente, parte do meio de cultivo contendo a microalga por meio de cultura novo (corte), de modo a manter constante o volume da cultura (HUANG; PLESHA; MCDONALD, 2010). Esse modo de cultivo pode ser utilizado para produção de biomassa em maior escala, mantendo o micro-organismo em elevadas velocidades de crescimento. O mesmo inóculo pode ser utilizado por longo período, evitando o tempo morto de colheita de biomassa formada, limpeza do fotobiorreator e início do processo. Segundo Reichert, Reinehr e Costa (2006), outra vantagem desse processo é o controle de parâmetros nutricionais e cinéticos.

Pesquisas científicas relacionadas a cultivos semicontínuos de microalgas mencionam dois modos de conduzir o processo (BEZERRA et al., 2011; CHIU et al., 2008; HENRARD; MORAIS; COSTA, 2011; REICHERT; REINEHR; COSTA, 2006). Em ambos o corte inicial ocorre quando a microalga atinge a fase exponencial de crescimento. Contudo, nos demais cortes, em um modo é fixado a concentração celular de corte encontrada nessa fase e no outro, o período para realização dos cortes, independente da fase de crescimento. Para cultivos semicontínuos, é importante que as células sejam mantidas na fase exponencial de crescimento, em que a velocidade de crescimento se mantém máxima e constante. Nessa fase as células apresentarão estado fisiológico favorável, e fatores limitantes como condição nutricional, fotoinibição e fotolimitação não prejudicarão o processo.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi selecionar o modo de condução do cultivo semicontínuo da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 que apresentasse as melhores respostas cinéticas

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismos e condições de cultivo

A microalga utilizada neste estudo foi *Spirulina* sp. LEB 18 (MORAIS et al., 2008), mantida em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966), no qual a composição é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição do meio de cultivo Zarrouk para 1 L.

Reagentes	Massa (g)
NaHCO ₃	16,8
K ₂ HPO ₄	0,5
NaNO ₃	2,5
K ₂ SO ₄	1,0
NaCl	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
CaCl ₂	0,04
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
EDTA	0,08
Soluções	Volume (mL)
A ₅	1 mL
B ₆	1 mL

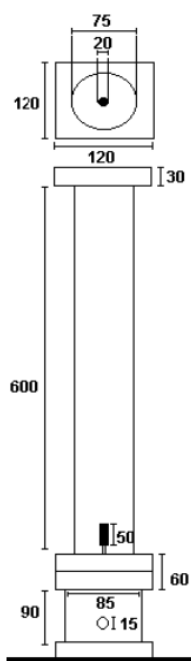
Solução A₅: 2,86g/L de H₃BO₃; 1,81g/L de MnCl₂.4H₂O; 0,222g/L de ZnSO₄.7H₂O; 0,079g/L de CuSO₄. 5H₂O; 0,015g/L de NaMoO₄

Solução B₆: 22,96mg/L de NH₄VO₃; 96mg/L de K₂Cr₂(SO₄)₄.24H₂O; 47,85mg/L de NiSO₄.7H₂O; 17,94mg/L de Na₂WO₄.2H₂O; 61,1mg/L de TiOSO₄.H₂SO₄.8H₂O; 43,98mg/L de Co(NO₃)₂.6H₂O

Os cultivos foram realizados em duplicata, durante 55 d, sob condições controladas em câmara termostatzada a 30°C, 41,6 umol/m².s e fotoperíodo 12 h claro/escuro, com iluminação provida por lâmpadas fluorescentes de 40 W. A concentração inicial dos

cultivo de *Spirulina* sp. foi $0,2 \text{ g.L}^{-1}$. A microalga foi cultivada em fotobiorreatores tubulares verticais de 2 L (Figura 1), com volume útil de 1,5 L.

Figura 1 - Configuração do fotobiorreator tubular vertical de 2 L. Todas as dimensões em mm.



Fonte: MORAIS; COSTA (2007a).

Para analisar a cinética dos cultivos e produção de biomassa, foram estudados dois modos de conduzir o processo (Tabela 2).

Tabela 2 – Experimentos realizados para análise cinética dos cultivos semicontínuos da microalga *Spirulina* sp. LEB 18.

Modo de condução de cultivo	TR (%)
Cortes na concentração celular fixa	20
Cortes na concentração celular fixa	40
Cortes a cada 3 d	20
Cortes a cada 3 d	40

TR: taxa de renovação de meio.

No primeiro modo a remoção de produto e adição de substrato (corte) foi realizada quando o cultivo alcançou o final da fase exponencial de crescimento. A concentração celular que o cultivo encontrava-se nessa fase foi fixada como concentração celular de corte. No outro modo, quando os cultivos alcançaram o final da fase exponencial de crescimento realizou-se o primeiro corte, seguido dos demais cortes a cada 3 d. As taxas de renovação estudadas para ambas condições foram 20 e 40% (v/v), sendo estas definidas com base em estudos anteriores (REICHERT; REINEHR; COSTA, 2006; HENRARD; MORAIS; COSTA, 2011).

2.2 Concentração de biomassa microalgal e monitoramento do pH

Diariamente foram coletadas amostras para determinação da concentração de biomassa, calculada através da medida da densidade ótica a 670 nm (COSTA et al., 2002) em espectrofotômetro (Q7980RM, Quimis, Brasil), utilizando curva de calibração relacionando densidade ótica e peso seco de biomassa de microalga. O pH também foi acompanhado diariamente, através de medida em pHmetro digital (Q400AS, Quimis, Brasil).

2.3 Parâmetros cinéticos

A partir da realização dos cortes, originavam-se ciclos de crescimento da microalga. Assim, os parâmetros cinéticos de velocidade específica de crescimento (μ_x , d⁻¹) e produtividade de biomassa (P_x , g.L.d⁻¹) foram determinados para cada ciclo crescimento, sendo o valor final a média dos ciclos. A μ_x foi obtida por regressão exponencial na fase logarítmica de crescimento celular, de acordo com a Equação 1.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dx}{dt} \quad (1)$$

A produtividade (P_x) foi calculada segundo a Equação 2, em que X (g.L⁻¹) é a concentração celular final, X_0 (g.L⁻¹) é a concentração celular inicial do cultivo, t (d) é o tempo final e t_0 é o tempo inicial do cultivo.

$$P_x = \left(\frac{X_t - X_0}{t - t_0} \right) \quad (2)$$

2.4 Biomassa produzida

A biomassa produzida (B_p) foi calculada a partir da Equação 3, em que BC_{c1} é concentração de biomassa final ($g.L^{-1}$) quando obtida a concentração de corte no primeiro ciclo de crescimento da microalga e BC_{c2} , a do segundo ciclo. O V_{c1} é o volume retirado (L) do primeiro corte, e V_{c2} , do segundo corte. A BC_{cn} e V_f são a concentração de biomassa ($g.L^{-1}$) e volume retirado (L) ao final do cultivo.

$$B_p = \Sigma [BC_{c1}.V_{c1} + BC_{c2}.V_{c2})... + (BC_{cn}.V_f)] \quad (3)$$

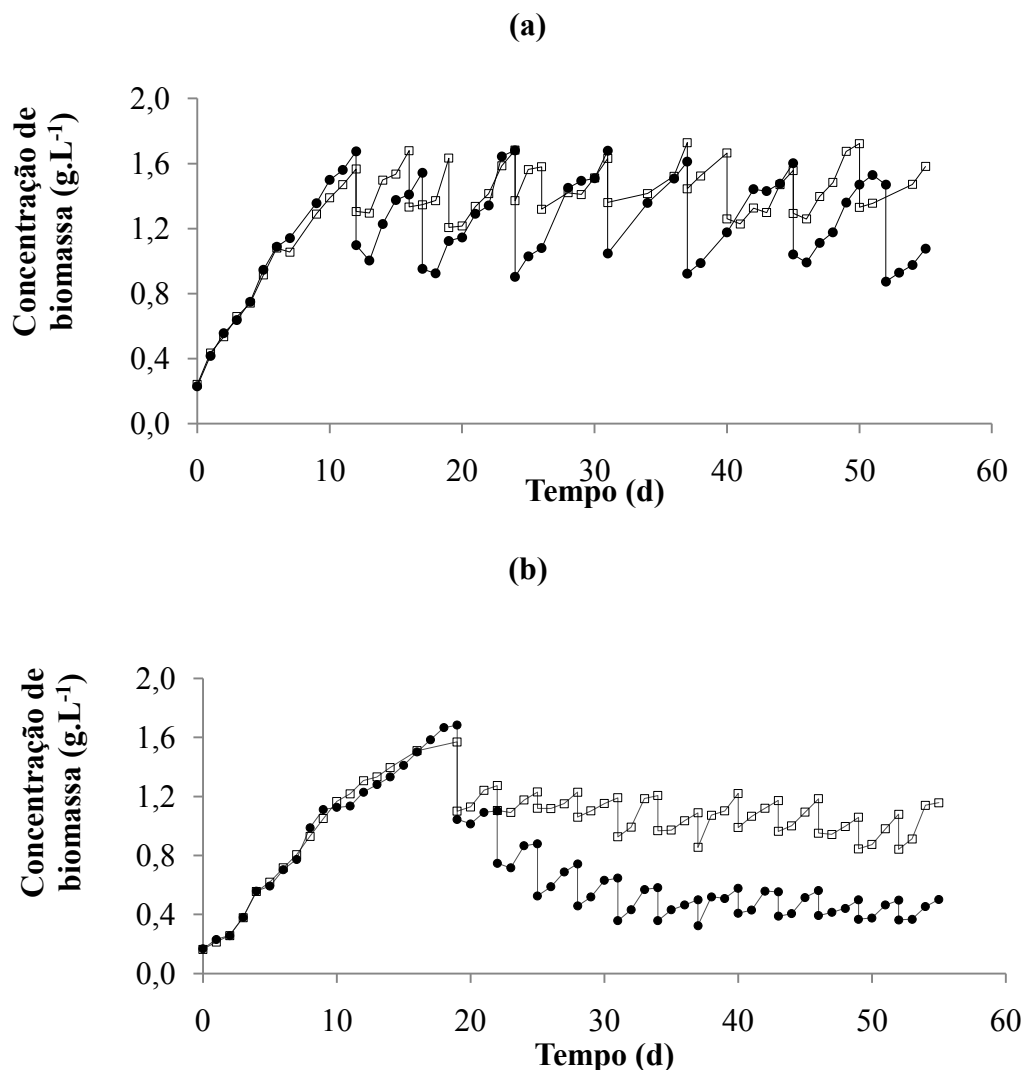
2.5 Metodologia Estatística

Para comparação das médias dos parâmetros cinéticos foi aplicado Análise de Variância (ANOVA), com nível de confiança de 99% ($p \leq 0,01$), utilizando Teste de Tukey.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em estudos sobre cultivo de microalgas tem que ser considerado seu ciclo reprodutivo. A fase lag ocorre após a inoculação do meio com o micro-organismo e é tipicamente observada como adaptação microbiana a uma súbita mudança no ambiente. Essa fase é um período de ajuste, em que os micro-organismos se adaptam a fim de obter as condições necessárias para crescer exponencialmente (SWINNEN et al., 2004). No entanto, essa fase não foi observada neste trabalho (Figuras 2a e 2b) porque as diferenças entre as condições de cultivo e a manutenção do inóculo antes do experimento foram discretas, em que o meio de cultivo, temperatura, iluminância e aeração foram mantidos iguais. Além disso, as microalgas foram mantidas na fase exponencial de crescimento, o que contribui para adaptação mais rápida às condições experimentais desejadas, pois nessa fase elas estão nas condições ideais de crescimento.

Figura 2 - Curvas de crescimento da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 obtidas em cultivo semicontínuo com cortes na concentração celular fixa em $1,6 \text{ g.L}^{-1}$ (a) e cortes a cada 3 d (b): Taxa de renovação 20% (v/v) ($\square$); Taxa de renovação 40% (v/v) ($\bullet$).



No cultivo da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 o final da fase exponencial de crescimento foi alcançado na concentração celular de $1,6 \text{ g.L}^{-1}$. Observa-se que no cultivo semicontínuo, em que os cortes foram realizados a cada 3 d, a taxa de renovação de 40% (v/v) fez com que a concentração celular no momento do corte fosse diminuindo a cada renovação de meio. Com taxa de renovação de 20% (v/v), a concentração celular se manteve em média de $1,2 \text{ g.L}^{-1}$.

No cultivo semicontínuo da *Spirulina* sp. LEB 18, realizar a renovação de 40% (v/v) a cada 3 d pode ter ocasionado acúmulo de nutrientes e, conseqüentemente, aumento da salinidade no sistema. Fatores ambientais como temperatura, luz UV, irradiação e a salinidade

são conhecidos por afetar a fotossíntese em microalgas. Estudos têm sido realizados sobre a atividade do elétron transportador da fotossíntese tanto sob o estresse salino, como excesso de luz em células inteiras e nas membranas tilacóides. Em *Spirulina platensis*, o stress salino é pronunciado com a redução do transporte de elétrons para fotossistema II (PSII) através do aumento do número de quinonas B (QB) não redutoras (LU; VONSHAK, 1999; SUDHIR et al., 2005). De acordo com Vonshak et al. (1996), o estresse salino e a intensidade de luz moderada levam ao dano da proteína D1 e altera o perfil de emissão de fluorescência da clorofila a, que é uma proteína do complexo antena das membranas tilacóides, importante para a fotossíntese e que apresenta papel central no arranjo dos fotossistemas para a captação de energia luminosa. Sudhir et al. (2005) constataram que a exposição da *Spirulina platensis* ao estresse salino inibe a atividade PSII e afeta os processos de transferência de energia através da indução de alterações nas proteínas da membrana tilacóide.

O declínio da concentração celular na curva de crescimento do cultivo semicontínuo da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 com cortes a cada 3 d e taxa de renovação de 40% (v/v), também pode ser explicado devido ao tempo para realização dos cortes. Com o intervalo de 3 d o cultivo ficou diluído, chegando ao final do experimento com concentração celular de 0,4 g.L⁻¹. Isso indica que a continuidade desse cultivo levaria a concentração celular a valores inferiores a concentração inicial. A microalga não conseguia uma adaptação suficiente para consumir os nutrientes de modo a evitar o aumento da salinidade.

Essa suposição foi confirmada comparando os dois modos de condução dos cultivos, com a renovação de 40% (v/v). Para retomar a concentração celular fixa de 1,6 g.L⁻¹, o intervalo correspondente a cada corte era, em média 8 d. O cultivo com cortes na concentração celular fixa e taxa de renovação de 40% (v/v) apresentou a máxima produtividade média (0,092 g.L⁻¹.d⁻¹), pois em 8 d as células eram capazes de consumir os nutrientes, não permitindo que a salinidade prejudicasse o sistema. Isso demonstra que o modo de condução do cultivo semicontínuo influencia nesses parâmetros (Tabela 3).

Tabela 3 – Parâmetros cinéticos e biomassa produzida (B_P) obtidos nos cultivos semicontínuos da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 expostos a cortes realizados na concentração celular fixa de $1,6 \text{ g.L}^{-1}$ ou cortes a cada 3 d.

TR	N	$P_{\text{média}} (\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1})^*$	$\mu_{\text{médio}} (\text{d}^{-1})^*$	$B_P (\text{g})^*$
Cortes na concentração celular fixa ($1,6 \text{ g.L}^{-1}$)				
20	11	$0,081 \pm 0,005^{\text{bB}}$	$0,060 \pm 0,002^{\text{cB}}$	$7,49 \pm 0,04^{\text{bB}}$
40	8	$0,092 \pm 0,003^{\text{aA}}$	$0,079 \pm 0,003^{\text{bA}}$	$8,37 \pm 0,14^{\text{aA}}$
Cortes a cada 3 d				
20	13	$0,066 \pm 0,003^{\text{cC}}$	$0,069 \pm 0,001^{\text{bcD}}$	$6,07 \pm 0,12^{\text{cC}}$
40	13	$0,061 \pm 0,007^{\text{cC}}$	$0,119 \pm 0,013^{\text{aC}}$	$6,11 \pm 0,08^{\text{cC}}$

TR: Taxa de renovação (%); N: Ciclo de crescimento; *: Valores são média $\pm$ desvio padrão; Letras minúsculas na mesma coluna comparam todos ensaio entre si; Letras maiúsculas na mesma coluna comparam cada modo de condução entre si; Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p > 0,01$) pelo teste de Tukey.

Quando comparado separadamente para cada modo de condução de cultivo, nota-se que o com concentração celular de corte fixa os máximos de $P_{\text{médio}}$ e $\mu_{\text{médio}}$ foram obtidos com a renovação de 40% (v/v). Com essa taxa de renovação de meio houve produção fotossintética mais eficiente de ATP e NADPH, devido ao aumento de disponibilidade de luz, a redução de células, e a condição nutricional ideal, acelerando a velocidade específica de crescimento (μ_x). Também foi observado que, em ambos os ensaios, ao aumentar a taxa de renovação de 20 para 40% (v/v), obteve-se maiores $\mu_{\text{médio}}$. No cultivo em que os cortes foram realizados na concentração celular fixa, a diluição de 20% (v/v) reduzia a concentração de biomassa para, aproximadamente $1,3 \text{ g.L}^{-1}$, enquanto a diluição de 40% (v/v), para $1,0 \text{ g.L}^{-1}$. O valor de concentração celular apresentado pela renovação de 40% (v/v) após os cortes evita a fotolimitação causada pelo sombreamento entre as células, o que pode ter proporcionado a elevação de $\mu_{\text{médio}}$.

Nota-se que os maiores $\mu_{\text{médio}}$ foram encontrados nos cultivos com cortes a cada 3 d. O máximo ($0,119 \text{ d}^{-1}$) foi alcançado nesse modo de condução através da taxa de renovação de 40% (v/v), diferindo significativamente ($p < 0,01$) dos demais ensaios. De acordo com Borzani et al. (2001) a integração da equação $\mu_x = (1/X).(\text{d}X/\text{d}t)$ leva a $\ln(X/X_0) = \mu_x.t$ que, ao transformar para logaritmos decimais, pode-se projetar graficamente os valores de log “X” versus o tempo (t), obtendo-se uma reta. Assim, o intervalo de 3 d pode ter interferido para se obter os maiores valores de μ_x . Enquanto a cada 3 d de renovação de meio geravam-se 3

dados, os cultivos com cortes na concentração celular fixa, geravam, em média, de 5 a 8 dados com as renovações de 20 e 40% (v/v), respectivamente. Com isso, a probabilidade do μ_x ser elevado pode ser maior, uma vez que, graficamente, poucos dados (pontos) podem se distribuir mais facilmente à reta, interferindo a correlação e, conseqüentemente, no valor de μ_x . Em algumas situações dos gráficos gerados no cultivo semicontínuo realizado com corte a cada 3 d, teve-se que retirar 1 ponto da reta, o que pode, de certa forma, equivocar o resultado de μ_x .

Nos ensaios com cortes realizados na concentração celular fixa obtiveram-se elevadas velocidades específicas (μ_x) e produtividades (P_x) no 1º ciclo de crescimento da microalga. Este fato é explicado porque no início do cultivo a quantidade de nutrientes em excesso é relativamente maior que no decorrer do cultivo. O maior consumo desses nutrientes para o metabolismo da microalga possibilitará elevadas μ_x e P_x . Os valores encontrados foram para μ_x 0,099 d⁻¹ com taxa de renovação de 20% (v/v) e 0,113 d⁻¹ com 40% (v/v). Com relação às P_x , foram obtidos 0,110 e 0,120 g.L⁻¹.d⁻¹ com as renovações de 20 e 40% (v/v), respectivamente. Contudo, em geral, pode-se afirmar que em ambos modos de condução do cultivo semicontínuo não foi observada redução na μ_x e P_x a cada ciclo de crescimento, como pode ser observado no Apêndice 1, devido a reposição periódica de meio de cultivo novo.

Com a renovação de 40% (v/v), no decorrer do cultivo em que os cortes eram realizados a cada 3 foi observada adaptação em 54% dos cortes realizados, enquanto que no ensaio com cortes na concentração celular de corte fixa foi observado 38%. Isso pode ter interferido nos menores valores de produtividades para o ensaio com corte a cada 3 d. Neste ensaio, os cortes não foram necessariamente realizados na fase exponencial de crescimento, pois o tempo foi fixo, com exceção do primeiro corte que foi realizado ao final dessa fase. Segundo Lourenço (2006), na fase exponencial de crescimento, as células apresentam melhor estado fisiológico. Após curto período de aceleração, a velocidade de crescimento se mantém máxima e constante. Por isso, é importante que os cortes sejam realizados nessa fase. Assim, não haverá fase de adaptação, estimulando um processo contínuo de produção de biomassa (BORZANI et al., 2001). A condução de cultivo semicontínuo a partir da concentração celular fixa em 1,6 g.L⁻¹ foi embasada nessa teoria, o que garantiu as melhores respostas cinéticas.

Cultivos semicontínuos da microalga *Spirulina platensis*, com reposição de meio, foram realizados por Reichert, Reinehr e Costa (2006) em fotobiorreatores fechados. Esses autores observaram 13 ciclos de crescimento no cultivo e máxima μ_x de 0,111 d⁻¹, utilizando taxa de renovação de meio de cultivo de 50%. Os valores foram semelhantes aos encontrados no ensaio, em que a renovação de 40% (v/v) foi realizada a cada 3 d (13 ciclo e 0,119 d⁻¹).

Radmann, Reinehr e Costa (2007) em 8 ciclos de crescimento observaram que com concentração celular de corte $0,8 \text{ g.L}^{-1}$, 20% (v/v) de renovação e meio Zarrouk obteve μ_x de $0,039 \text{ d}^{-1}$ e P_x de $0,029 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Com a mesma taxa de renovação, porém o dobro da concentração celular de corte ($1,6 \text{ g.L}^{-1}$) foi encontrado $0,060 \text{ d}^{-1}$ e $0,081 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Assim, constata-se que essas diferenças cinéticas obtidas entre Radmann, Reinehr e Costa (2007) e o presente trabalho, pode ser devido ao fotobiorreator utilizado e a concentração celular de corte estudada. Os fotobiorreatores tubulares tem superfície de contato maior do que os reatores do tipo raceway e erlenmeyer, aumentando a incidência de luz e a taxa fotossintética. A maior concentração celular de corte ($1,6 \text{ g.L}^{-1}$) reduz os possíveis problemas relacionados a excesso de intensidade luminosa, como o fenômeno de fotoinibição. Fotoinibição é a perda da capacidade fotossintética devido a danos causados por intensidades luminosas acima da requerida para realização da fotossíntese. Esse fenômeno ocorre quando o fluxo de fótons absorvido pelos cloroplastos é tão alto que a concentração de elétrons de alta energia na célula é excessiva para ser consumida pelo ciclo de Calvin. Estes elétrons de alta energia reagem com a água, formando peróxido de hidrogênio que é tóxico as células (CHOJNACKA; NOWORYTA, 2004; GRIMA et al., 1996).

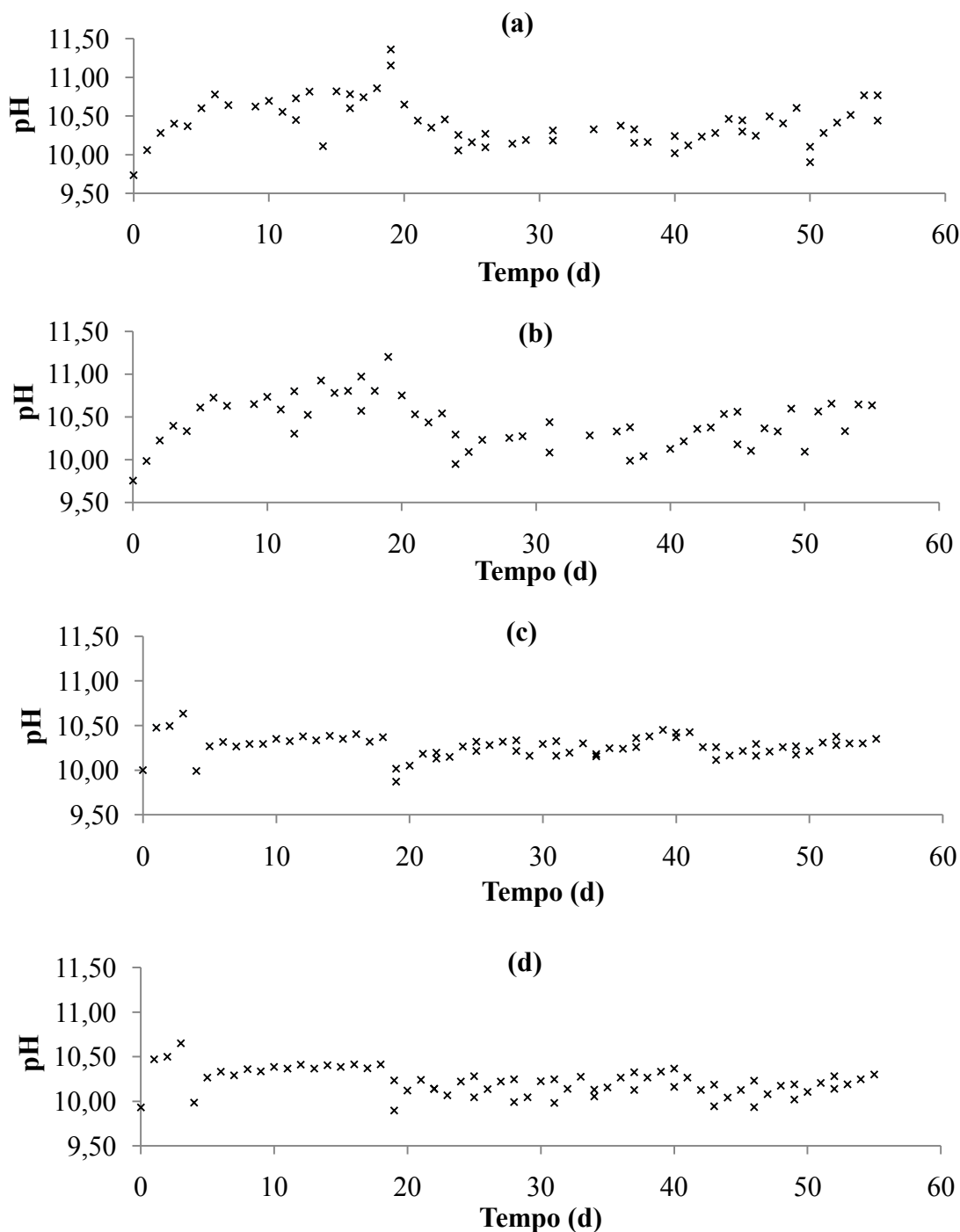
Como os cortes eram realizados a cada 3 d, nestes cultivos houve 13 ciclos de crescimento no decorrer dos 55 d. Quando os cortes foram realizados na concentração celular fixa, houve redução do número de ciclos de crescimento da microalga, contudo maiores concentrações de biomassa foram produzidas. O valor máximo de biomassa produzida foi com a taxa de renovação de 40% (v/v) (8,37 g). A cada ciclo de crescimento da microalga são necessários mão de obra para realização dos cortes e gastos com nutrientes. Por isso, é importante que cultivos semicontínuos com menores ciclos de crescimento produzam maiores concentração de biomassa e produtividade, como ocorreu neste estudo. Com essa taxa de renovação foi produzido $0,152 \text{ g.d}^{-1}$ no cultivo com concentração celular de corte fixa e $0,136 \text{ g.d}^{-1}$ no cultivo com cortes a cada 3 d. Segundo Camacho et al. (1999), a taxa de diluição ou renovação, influencia diretamente na densidade celular da cultura. Quanto maior a taxa de renovação, menor a concentração de biomassa e consequentemente maior a disponibilidade de luz. Altas taxas de diluição são apropriadas para células de crescimento rápido. Baixas taxas de renovação originam culturas com crescimento limitado pelo sombreamento provocado pelas próprias células. Analisando os valores de biomassa obtidos nos ensaios, concluiu-se que este fenômeno pode ter acontecido no cultivo semicontínuo com cortes realizados na concentração celular fixa, quando estudada a renovação de 20% (v/v). Este ensaio apresentou menor quantidade de biomassa (7,49 g) quando comparado à

renovação de 40% (v/v). A influência do sombreamento não foi observada nos cultivos com cortes a cada 3 d, pois as renovações de meio eram realizadas seguidamente. Assim, para os cultivos com cortes a cada 3 d pode-se constatar que a taxa de renovação não influenciou na quantidade de biomassa produzida, visto que entre estas não houve diferença significativa ($p>0,01$).

O acompanhamento do pH durante os cultivos de microalgas é essencial para que os componentes do meio de cultivo possam ser efetivamente absorvidos, afetando diretamente a disponibilidade de vários elementos químicos (LOURENÇO, 2006). Ao longo do cultivo, o pH apresentou comportamento semelhante entre os ensaios (Figura 3). No cultivo com os cortes realizados a cada 3 d os valores ficaram entre 9,87 e 10,64 ao utilizar taxa de renovação de 20% (v/v) e, 9,90 a 10,65 foi alcançado para o cultivo com taxa de renovação de 40% (v/v). Nos cultivos com cortes realizados na concentração celular fixa a faixa de pH foi superior (9,74 a 11,36 e 9,76 a 11,20 para os cultivos com taxa de renovação de 20 e 40% (v/v), respectivamente).

O valor ótimo para o crescimento da microalga *Spirulina* está entre 9,5 e 10,5. Valores menores que 9,5 podem facilitar a contaminação dos cultivos com outras microalgas, como *Chlorella*. Entretanto, valores maiores de pH podem limitar o crescimento, devido a concentração de carbonatos (CO_3^{2-}) e limitação de CO_2 no meio de cultivo. Em cultivos da microalga *Spirulina* geralmente é necessária uma fonte externa de carbono, na forma de bicarbonato (HCO_3^-). Embora a *Spirulina* possa crescer fotoautotroficamente, a captação de CO_2 atmosférico depende do pH do meio de cultivo. Quanto maior o pH do meio, mais facilmente o CO_2 é assimilado e convertido em CO_3^{2-} (BINAGHI et al., 2003; VONSHAK, 1997).

Figura 3 - Acompanhamento do pH ao longo do cultivo semicontínuo da *Spirulina* sp. LEB 18, cortes com concentração celular fixa em $1,6 \text{ g.L}^{-1}$ e taxa de renovação de 20% (v/v) (a) e 40% (v/v) (b); cortes a cada 3 d e taxa de renovação de 20% (v/v) (c) e 40% (v/v) (d).



Durante o cultivo semicontínuo da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi observado que, após a realização dos cortes, ocorria decréscimo do pH. No decorrer do tempo o pH aumentava devido ao consumo de HCO_3^- do meio Zarrouk e à formação de CO_3^{2-} . Isso pode

justificar os valores de pH dos cultivos com cortes a cada 3 d não apresentarem variações bruscas, pois o intervalo correspondente aos cortes era menor.

4 CONCLUSÃO

O melhor modo de condução de cultivo semicontínuo para a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi fixar a concentração celular de corte. Nessa condução de cultivo foi encontrada máxima produtividade média e maiores concentrações de biomassa produzida, uma vez que o processo semicontínuo foi conduzido com embasamento bioquímico e biotecnológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BINAGHI, L.; BORGHI, A. D.; LODI, A.; CONVERTI, A.; BORGHI, M. D. Batch and fed-batch uptake of carbon dioxide by *Spirulina platensis*. **Process Biochemistry**, v. 38, 1341–1346, 2003.

BEZERRA, R. P.; MONTOYA, E. Y. O.; SATO, S.; PEREGO, P.; CARVALHO, J. C. M.; CONVERTI, A. Effects of light intensity and dilution rate on the semicontinuous cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. A kinetic Monod-type approach. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3215–3219, 2011.

BORZANI, W.; SHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda. 2001, v. 1, 254 p.

CAMACHO, F. G.; GOMEZ, A. C.; SEVILLA, J. M. F.; GRIMA, E. M. Use of concentric-tube airlift photobioreactors for microalgal outdoor mass cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 164-172, 1999.

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

CHOJNACKA, K.; NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 461-465, 2004.

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.

DAL MAGRO, C.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Remoção de cromo VI e DQO de meio de cultivo adicionado de efluente com elevada concentração de cromo a partir da microalga *Spirulina platensis*. In: XVIII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2011, Caxias do Sul. **Anais...** Caxias do Sul: Editora da UCS, 2011. 1 CD-ROM.

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.

GRIMA, E. M.; SEVILLA, J. M. F.; PÉREZ, J. A. S.; CAMACHO, F. G. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. **Journal of Biotechnology**, v. 45, p. 59-69, 1996.

HENRARD, A. A.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Vertical tubular photobioreactor for semicontinuous culture of *Cyanobium* sp. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4897–4900, 2011.

HUANG, T. K.; PLESHA, M. A.; MCDONALD, K.A. Semicontinuous bioreactor production of a recombinant human therapeutic protein using a chemically inducible viral amplicon expression system in transgenic plant cell suspension cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 106, p. 408–421, 2010.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas – Princípios e Aplicações** – São Carlos: RiMa, 2006. 588p.

LU, C.; VONSHAK, A. Characterization of PSII photochemistry in salt-adapted cells of cyanobacterium *Spirulina platensis*. **New Phytologist**, v. 141, p. 231-239, 1999.

MEZZOMO, N.; SAGGIORATO, A. G.; SIEBERT, R.; TATSCH, P.O.; LAGO, M. C.; HEMKEMEIER, M.; COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 173-178, 2010.

MORAIS, M. G. ; VAZ, B. S. ; MORAIS, E. G.; COSTA, J. A. V. Biological Effects of *Spirulina* (*Arthrospira*) Biopolymers and Biomass in the Development of Nanostructured Scaffolds. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

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

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

RADMANN, E. M.; CAMERINI, F.; 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.

REICHERT C. C.; REINEHR C. O.; COSTA J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, p. 23-28, 2006.

STEFFENS D. ; LEONARDI, D. ; SOSTER, P. R. L. ; LERSCH, M. ; ROSA, A. ; CRESTANI, T. ; SCHER, C.; MORAIS, M. G. ; COSTA, J. A. V.; PRANKE, P. H. L. Development of a new nanofiber scaffold for use with stem cells in a third degree burn animal model. **Burns**, v. 1, p. 1-11, 2014.

SUDHIR, P-R; POGORYELOV, D. KOVÁCS, L.; GARAB, G.; MURTHY, S. D. S. The Effects of Salt Stress on Photosynthetic Electron Transport and Thylakoid Membrane Proteins in the Cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 481-485, 2005.

SWINNEN, I. A.; BERNAERTS, K.; DENS, E. J.; GEERAERD, A. H.; VAN IMPE, J. F. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 137-159, 2004.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) Physiology, cell-biology and biotechnology. Londres: Taylor & Francis, 1997. 233p.

VONSHAK, A.; KANCHARAKSA, N.; BUNNAG, B.; TANTICHAROEN, M. Role of light and photosynthesis on the acclimation process of the cyanobacterium *Spirulina platensis* to salinity stress. **Journal of Applied Phycology**, v. 8, p. 119-124, 1996.

XU, R.; MI, Y. Simplifying the Process of Microalgal Biodiesel Production Through In Situ Transesterification Technology. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 1, p. 91-99, 2011.

ZARROUK, C. Contribution a Letude Dune Cyanophycee, Influence de Divers Facteurs physiques et Chimiques sur la Croissance et photosynthese de *Spirulina* maxima geitler.
Ph.D. Thesis University of Paris. 1966.

**5.2 ARTIGO 2 - “BIORREFINARIA MICROALGAL: A POTENCIALIDADE DA
BIOMASSA COMO MATÉRIA-PRIMA”**

BIORREFINARIA MICROALGAL: A POTENCIALIDADE DA BIOMASSA COMO MATÉRIA-PRIMA

RESUMO

A biomassa microalgal é matéria-prima potencial para produção de bioprodutos de alto valor agregado, biocombustível, biopolímero ou energia, de forma isolada ou integrada. A biorrefinaria microalgal é um conceito de produção de bioprodutos utilizando a biomassa de forma maximizada, com redução dos impactos ambientais e custos com nutrientes. O objetivo deste trabalho foi verificar a potencialidade da biomassa microalgal na concepção de uma biorrefinaria. Os cultivos com *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 foram conduzidos em modo semicontínuo, com 10 % (v/v) de CO₂. A concentração celular de corte foi 1,6 g.L⁻¹, sendo 20 e 40% (v/v) as taxas de renovação estudadas. Os cultivos com duração de 55 d foram mantidos a 30°C, 41,6 μmol.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo 12 h claro/escuro, em fotobiorreatores tubulares verticais. A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou melhores resultados cinéticos e máxima concentração de biomassa e rendimento em biopolímero quando cultivada com CO₂ como fonte de carbono. Nesta mesma condição (10% (v/v) de CO₂) as microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 apresentaram teores máximos de proteínas, carboidratos e lipídios. A biomassa da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou potencial para uso como matéria-prima em biorrefinarias. Por meio do processo semicontínuo, com a taxa de renovação de 20% (v/v), o cultivo dessa microalga com CO₂ como fonte de carbono proporciona redução de custos do processo.

Palavras Chave: bioprodutos, processo semicontínuo, sustentabilidade.

ABSTRACT

Microalgal biomass is a potential raw material for the production of high value-added bioproducts, biofuels, biopolymers or energy, in an isolated or integrated form. The microalgal biorefinery is a concept of producing bioproducts using biomass in a maximized form, with a reduction in environmental impacts and in the costs of nutrients. The objective of this study was to assess the potential of microalgal biomass in the design of a biorefinery. *Spirulina* sp. LEB 18 and *Chlorella fusca* LEB 111 were cultivated in semi-continuous mode, with 10% (v/v) CO₂. The cut-off cell concentration was 1.6 g.L⁻¹, and 20 and 40% (v/v) renewal rates were studied. The cultures with 55 d duration were maintained at 30 °C, 41.6 μmol.m⁻².s⁻¹ and a 12 h light/dark photoperiod, in vertical tubular photobioreactors. The *Spirulina* sp. LEB 18 produced best kinetic results, maximum biomass concentration and biopolymer yield when grown with CO₂ as the carbon source. Under the same conditions (10% (v/v) of CO₂), the microalgae *Spirulina* sp. LEB 18 and *Chlorella fusca* LEB 111 had maximum levels of protein, carbohydrates and lipids. The *Spirulina* sp. LEB 18 biomass showed potential for use as a raw material in biorefineries. Using the semi-continuous process, with a 20% renewal rate, the cultivation of this microalga using CO₂ as a carbon source reduces the production costs.

Keywords: bioproducts, semi-continuous process, sustainability.

1INTRODUÇÃO

O crescente preço dos combustíveis fósseis, o impacto ambiental causado pelas emissões gasosas, o descarte inadequado de polímeros de origem petroquímica e o desperdício de matéria-prima têm conduzido à procura de recursos renováveis e tecnologias que atendam às necessidades do mercado mundial (ANTUNES; SILVA, 2010).

Neste contexto, as biorrefinarias surgem como alternativas promissoras para substituir as refinarias tradicionais. Segundo Ree e Annevelink (2007), o conceito de biorrefinaria consiste em processamento sustentável, que integra os processos de extração de biocompostos da biomassa para produzir biocombustíveis, produtos de valor agregado e energia, visando a utilização otimizada dos recursos disponíveis. A utilização de microalgas na produção de biodiesel, bioetanol, hidrogênio, metano, biopolímeros, biopeptídeos, ácidos graxos essenciais e outros bioprodutos com elevado potencial de sustentabilidade, a fixação de CO₂ e a possibilidade de biotratamento de águas residuais, apontam o grande potencial das microalgas em biorrefinarias.

As microalgas são consideradas um sistema biológico eficiente para a captação de energia solar e produção de componentes orgânicos. A produção de microalgas pode ser realizada durante todo o ano, necessitando de pouca água quando comparada a plantas terrestres. A composição bioquímica das microalgas pode ser manipulada, através da alteração das condições de cultivo e estresses ambientais (HU et al., 2008), sendo induzidas a produzirem altas concentrações de biocompostos de importância comercial (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Cultivos semicontínuos são alternativas para produção de biomassa microalgal em biorrefinarias. Esse processo mantém o micro-organismo em elevadas velocidades de crescimento, favorecendo a sustentabilidade. A retirada de produto e adição do substrato periodicamente, evita o tempo estagnado de colheita da biomassa produzida e limpeza do fotobiorreator. Além disso, para uma biorrefinaria baseada em microalgas ser sustentável e ambientalmente correta é necessário o uso de fontes alternativas de carbono originadas de efluentes industriais (CO₂) para redução dos custos de produção, bem como a obtenção de no mínimo três bioprodutos da biomassa.

O objetivo deste trabalho foi verificar a potencialidade da biomassa microalgal na concepção de uma biorrefinaria.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microalgas e condições de cultivo

As microalgas utilizadas neste estudo foram *Spirulina* sp. LEB 18 (MORAIS et al., 2008) e *Chlorella fusca* LEB 111 isolada de lagoas próximas à região da Usina Termelétrica Presidente Médici, Candiota-RS (MORAIS; DUARTE, 2012). Os cultivos da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foram conduzidos em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) e Zarrouk modificado substituindo a fonte original de carbono (16 g.L^{-1} de NaHCO_3) por 10 % (v/v) de CO_2 . A microalga *Chlorella fusca* LEB 111 foi cultivada em meio BG-11 (RIPPKA et al., 1979) modificado (sendo acrescentado $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ de NaHCO_3). Cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 também foram estudados, em que as fontes de carbono (Na_2CO_3 do meio BG-11 e NaHCO_3) foram substituídas por 10 % (v/v) de CO_2 .

Os cultivos foram realizados em duplicata, sob condições controladas em câmara termostatzada a 30°C , $41,6 \text{ umol/m}^2.\text{s}$ e fotoperíodo 12 h claro/escuro, com iluminação provida por lâmpadas fluorescentes de 40 W. A concentração inicial de biomassa nos cultivos das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 foi de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$. As microalgas foram cultivadas em fotobiorreatores tubulares verticais de 2 L, com volume útil de 1,5 L.

A aeração foi realizada por aspersão, utilizando pedra porosa, por meio de ar comprimido misturado ao CO_2 disposto em cilindro industrial (White Martins). A vazão de entrada da mistura nos cultivos foi 0,3 vvm, controlada através de válvula solenóide. A injeção de 10% (v/v) de CO_2 foi realizada diretamente nos fotobiorreatores, a cada 2 h, durante 10 min, no período claro.

Os cultivos foram conduzidos em modo semicontínuo, sendo definida a condução de cultivo de acordo com o Artigo 1. Assim, a concentração celular de corte foi fixa em $1,6 \text{ g.L}^{-1}$ e as taxas de renovação estudadas foram 20 e 40% (v/v). Os experimentos realizados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Experimentos realizados para análise cinética e caracterização da biomassa das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111.

Microalga	TR (%)	Meio de cultivo
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	20	Zarrouk (controle)
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	40	Zarrouk (controle)
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	20	Zarrouk modificado (10% (v/v) CO ₂)
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	40	Zarrouk modificado (10% (v/v) CO ₂)
<i>Chlorella fusca</i> LEB 111	20	BG-11 modificado (controle)
<i>Chlorella fusca</i> LEB 111	40	BG-11 modificado (controle)
<i>Chlorella fusca</i> LEB 111	20	BG-11 modificado (10% (v/v) CO ₂)
<i>Chlorella fusca</i> LEB 111	40	BG-11 modificado (10% (v/v) CO ₂)

TR: taxa de renovação de meio.

2.2 Concentração de biomassa microalgal e monitoramento do pH

Diariamente foram coletadas amostras para determinação da concentração de biomassa, calculada através da medida densidade ótica a 670 nm (COSTA et al., 2002) em espectrofotômetro (Q7980RM, Quimis, Brasil) com curva de calibração relacionando densidade ótica e peso seco de biomassa da microalga. O pH também foi acompanhado diariamente, através de pHmetro digital (Q400AS, Quimis, Brasil).

2.3 Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos determinados foram velocidade específica de crescimento (μ_x , d⁻¹) e produtividade de biomassa (P_x , g.L.d⁻¹). A μ_x foi obtida por regressão exponencial na fase logarítmica de crescimento celular, de acordo com a Equação 1.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dx}{dt} \quad (1)$$

A produtividade (P_x) foi calculada segundo a Equação 2, em que X (g.L⁻¹) é a concentração celular final, X_0 (g.L⁻¹) é a concentração celular inicial do cultivo, t (d) é o tempo final e t_0 é o tempo inicial do cultivo.

$$P_x = \left(\frac{X_t - X_0}{t - t_0} \right) \quad (2)$$

Esses parâmetros foram calculados para cada ciclo de crescimento da microalga, e posteriormente, realizou-se a média dos valores para cada ensaio.

2.4 Biomassa produzida

A biomassa produzida (BP) foi calculada a partir da Equação 3, em que BC_{c1} é concentração de biomassa final ($g.L^{-1}$) quando obtida a concentração de corte no primeiro ciclo de crescimento da microalga e BC_{c2} , a do segundo ciclo. O V_{c1} é o volume retirado (L) do primeiro corte, e V_{c2} , do segundo corte. A BC_{cn} e V_f são a concentração de biomassa ($g.L^{-1}$) e volume retirado (L) ao final do cultivo.

$$B_p = \sum [BC_{c1}.V_{c1} + BC_{c2}.V_{c2} + \dots] + (BC_{cn} * V_f) \quad (3)$$

2.5 Caracterização da biomassa microalgal

A partir de cada corte realizado no cultivo semicontínuo, a biomassa microalgal foi recuperada por centrifugação a 16920 g, 20°C por 20 min para separá-la do meio de cultivo. Posteriormente, foi realizada lavagem com água destilada, para eliminação de resíduos de sais do meio e foi realizada nova centrifugação. Em seguida, a biomassa microalgal foi armazenada sob refrigeração a -20°C. Ao final do cultivo semicontínuo, juntou-se a biomassa obtida em cada corte e as amostras foram liofilizadas. A biomassa liofilizada foi submetida a um pré-tratamento em sonda ultrassônica. Esse procedimento consistiu em adicionar 10 mL de H₂O destilada em 5 mg de biomassa microalgal e sonicar por 10 min em ciclos de 59 s (59 s ligada e 50 s desligada). O extrato obtido foi homogeneizado em agitador magnético para posterior realização das análises de caracterização.

2.4.1 Composição centesimal

As biomassas obtidas dos cultivos semicontínuos das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 foram caracterizadas quanto ao teor de carboidratos pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), proteínas pelo método colorimétrico de Lowry

(LOWRY et al., 1951), e lipídios por Folch, Less e Stanley (1957), adaptado por Colla (2002). O teor de umidade e cinzas foi determinado segundo a metodologia da AOAC (2000). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados, apresentados em base seca.

2.4.2 Rendimento em biopolímero

A extração do biopolímero foi realizada na microalga *Spirulina* sp LEB 18, através de digestão diferencial. A biomassa liofilizada foi agitada em agitador magnético (753A, Fisatom, Brasil) com hipoclorito de sódio (NaOCl) 10% (v/v) e água destilada. Após, foi submetida à centrifugação (14100 g, 20°C por 20 min). O precipitado foi submetido a lavagem, e agitado durante 10 min com água destilada, repetindo-se o processo de centrifugação. Posteriormente, realizou-se a lavagem do precipitado com acetona, sob agitação, seguido de centrifugação (14100 g, 15°C por 20 min) e secagem em estufa (35°C) por aproximadamente 48 h (MORAIS, 2008).

O rendimento em biopolímeros (η) foi calculado, a partir da Equação 4, em que η é o rendimento de biopolímeros em relação a biomassa microalgal (%), mb é a massa final de biopolímeros (g) e m é a biomassa microalgal (g).

$$\eta = \frac{mb \cdot 100}{m} \quad (4)$$

A extração de biopolímeros foi realizada na biomassa obtida a partir do cultivo com meio Zarrouk e também nos ensaios com 10% (v/v) de CO₂, em ambas taxas de renovação, 20 e 40% (v/v).

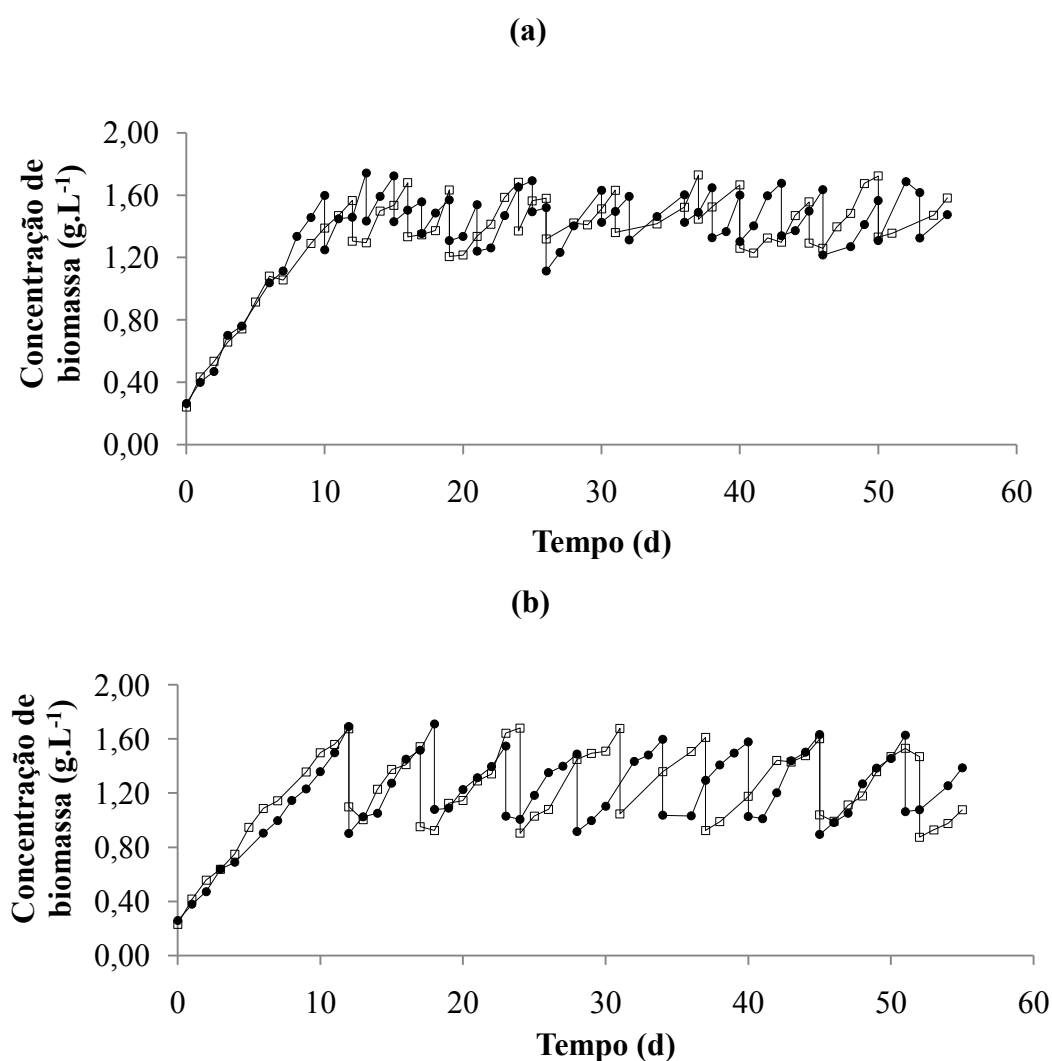
2.5 Análise Estatística

Para comparação das médias dos resultados de cinética de crescimento, bem como de caracterização da biomassa de cada microalga, foi aplicado Análise de Variância (ANOVA), com nível de confiança de 99% ($p \leq 0,01$), utilizando Teste de Tukey.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou final da fase exponencial em aproximadamente 10 d, enquanto a microalga *Chlorella fusca* LEB 111, em 15 d. Os cultivos com CO₂ e renovação de meio de 20% (v/v) de ambas as microalgas apresentaram maiores números de ciclos de crescimento que nos ensaios com NaHCO₃ como fonte de carbono (Figuras 1 e 2), favorecendo a produção de biomassa microalgal.

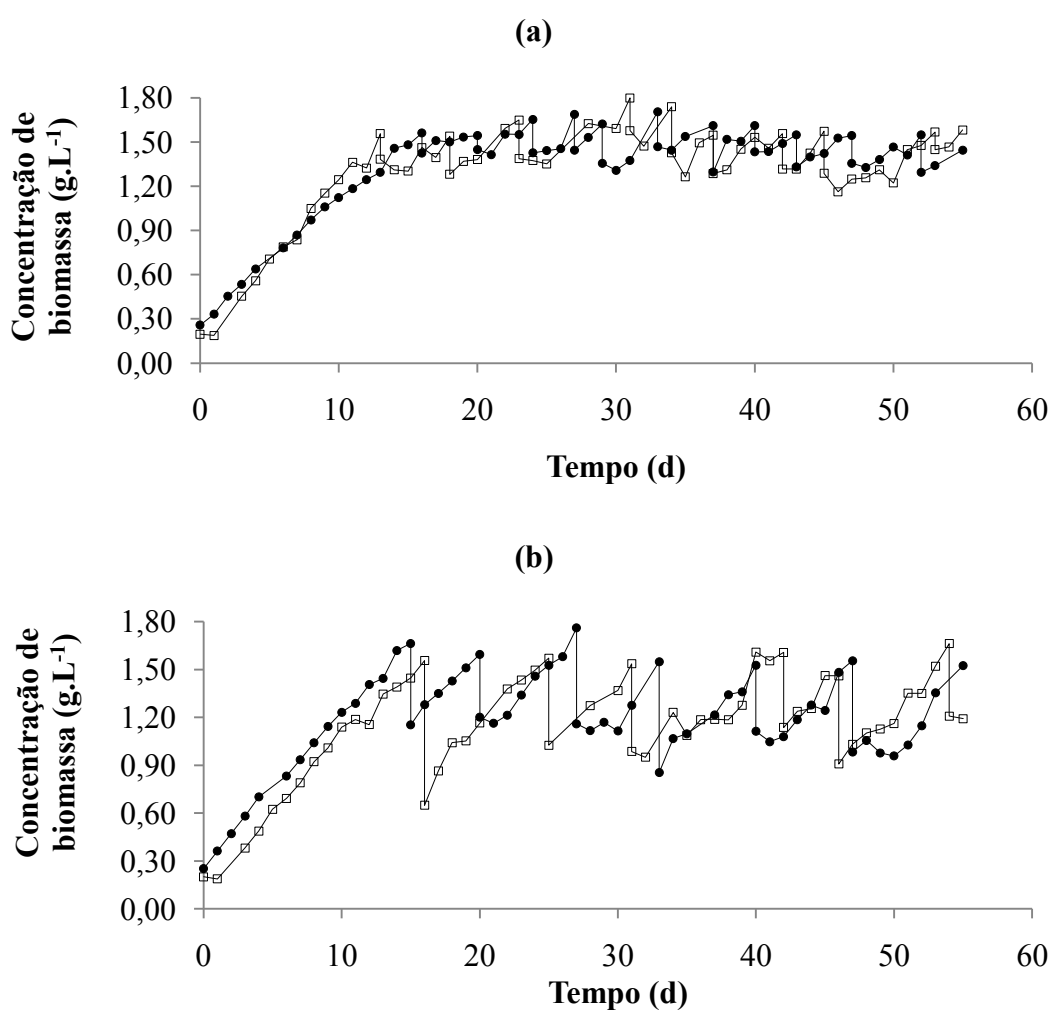
Figura 1 - Curvas de crescimento da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 com taxa de renovação de 20% (a) e 40% (b): meio Zarrouk (□); 10% (v/v) de CO₂ (•).



Nos cultivos das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 não houve fase de adaptação. A fase de adaptação ou fase lag ocorre pela necessidade das células

se adaptarem ao novo meio, até que possam dar início ao seu desenvolvimento (AGUIRRE et al., 2013). Essa fase pode ser evitada quando células em crescimento exponencial avançado são usadas como inóculo. Além disso, se as células forem adaptadas previamente às condições do experimento, o tempo referente ao fenômeno de indução pode ser reduzido ou não existir (SHIMIDELL et al., 2001).

Figura 2 - Curvas de crescimento da microalga *Chlorella fusca* LEB 111 com taxa de renovação de 20% (a) e 40% (b): meio BG-11 modificado (□); 10% (v/v) de CO₂ (•).



Entre as microalgas estudadas, a *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou maiores valores em produtividade, velocidade específica de crescimento e biomassa produzida (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos e biomassa produzida (B_P) obtidos dos cultivos semicontínuos das microalgas.

TR	N	$P_{\text{média}} (\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1})^*$	$\mu_{\text{médio}} (\text{d}^{-1})^*$	$B_P (\text{g})^*$
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18 (Meio Zarrouk - controle)				
20	11	$0,081 \pm 0,005^{\text{bcC}}$	$0,060 \pm 0,002^{\text{dC}}$	$7,49 \pm 0,04^{\text{bcB}}$
40	8	$0,092 \pm 0,003^{\text{bB}}$	$0,079 \pm 0,003^{\text{bB}}$	$8,37 \pm 0,14^{\text{abcAB}}$
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18 (Meio Zarrouk - controle)				
20	18	$0,105 \pm 0,004^{\text{aA}}$	$0,091 \pm 0,005^{\text{aA}}$	$10,46 \pm 0,12^{\text{Aa}}$
40	9	$0,108 \pm 0,004^{\text{aA}}$	$0,092 \pm 0,001^{\text{aA}}$	$9,81 \pm 0,62^{\text{abA}}$
<i>Chlorella fusca</i> LEB 111 (Meio BG-11 modificado - controle)				
20	10	$0,060 \pm 0,002^{\text{dC}}$	$0,058 \pm 0,001^{\text{dB}}$	$6,92 \pm 0,21^{\text{cA}}$
40	7	$0,075 \pm 0,010^{\text{cAB}}$	$0,058 \pm 0,001^{\text{dB}}$	$7,42 \pm 0,72^{\text{cA}}$
<i>Chlorella fusca</i> LEB 111 (10% (v/v) CO_2)				
20	12	$0,062 \pm 0,002^{\text{dBC}}$	$0,057 \pm 0,002^{\text{dB}}$	$7,45 \pm 0,50^{\text{cA}}$
40	7	$0,079 \pm 0,009^{\text{bcA}}$	$0,071 \pm 0,002^{\text{cA}}$	$8,08 \pm 0,56^{\text{bcA}}$

TR: Taxa de renovação (%); N: Ciclo de crescimento; *: Valores são média $\pm$ desvio padrão; Letras minúsculas na mesma coluna comparam todos ensaio entre si; Letras maiúsculas na mesma coluna, cada microalga entre si; Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p > 0,01$) pelo teste de Tukey.

Devido a reposição periódica do meio de cultivo, não foi observado decréscimo dos valores dos parâmetros cinéticos nos ensaios com as microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 no decorrer dos 55 d. Os resultados encontrados em cada ciclo de crescimento do ensaio controle da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 podem ser visualizados no Apêndice 1, e os obtidos nos ensaios com ambas microalgas cultivadas com 10% (v/v) CO_2 , assim como o ensaio controle da microalga *Chlorella fusca* LEB 111, no Apêndice 2. Nos cultivos com 10% (v/v) de CO_2 foi constatado que a taxa de renovação de meio não influenciou nos resultados de cinética da microalga *Spirulina* sp. LEB 18, contudo influenciou nos obtidos pela microalga *Chlorella fusca* LEB 111. Desta forma, o cultivo semicontínuo da

microalga *Spirulina* sp. LEB 18 pode proporcionar redução de custos dos nutrientes durante o processo, com a menor taxa de renovação de meio utilizada (20% v/v).

Para ambas as microalgas foi observado que os cultivos com 10% (v/v) de CO₂ apresentaram valores mais baixo de pH. Os máximos e mínimos valores de pH foram encontrados nos ensaios com taxa de renovação de 40% (v/v). Contudo, no decorrer dos cultivos os valores de pH tenderam a ser mais estáveis, em torno de 9,0. Zeng et al. (2012) também observaram que a alta aeração de CO₂ resultou em redução do pH da cultura durante o cultivo. No entanto, os experimentos controle apresentaram perfis de pH estáveis. De acordo com Barsanti e Gualtieri (2006), a inserção de CO₂ no meio de cultivo é alternativa utilizada para diminuir o pH do meio e prevenir mudanças bruscas. O CO₂ se dissolve no meio e o ácido carbônico formado evita o aumento do pH durante o crescimento de microalgas.

No cultivo da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 com meio Zarrouk o máximo pH foi 11,20 e no cultivo da *Chlorella fusca* LEB 111 com meio BG-11 modificado, 11,59. Segundo Cuaresma et al. (2006) o aumento do pH em cultivos fotossintéticos ocorre devido à atividade biológica das células que produz redução no conteúdo de carbono inorgânico dissolvido através do consumo direcionado ao crescimento celular. Desta forma, proporciona deslocamento do equilíbrio carbonato-bicarbonato no sistema tampão. O pH do meio de cultivo irá determinar as formas de carbono inorgânico (CO₂, CO₃⁻² ou HCO₃⁻) dissolvida na fase líquida.

A influência da concentração de CO₂ nos cultivos das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 foi observada, uma vez que com 10% (v/v) de CO₂ foram apresentadas as melhores respostas cinéticas. Para microalga *Spirulina* sp. LEB 18 o incremento de CO₂ nos cultivos proporcionou aumento da concentração de biomassa produzida em 39,7% (p/p), com a taxa de renovação de 20% (v/v). Zeng et al. (2012) também observaram que as culturas microalgais de *Spirulina platensis* com CO₂ apresentaram melhor crescimento de microalgas em comparação com o controle realizado sem esse gás.

As respostas cinéticas obtidas nos cultivos microalgais com 10% (v/v) de CO₂ podem ser explicadas pela assimilação desse gás realizada através do Ciclo de Calvin. A reação inicial do ciclo de Calvin é a fixação de CO₂ na ribulose, que é catalizada pela enzima ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase, denominada Rubisco. Considerando que as características cinéticas da rubisco exijam concentrações elevadas de CO₂ no seu sítio ativo para manter a atividade carboxilase e inibir a oxigenasse (SCHENK et al., 2008), é

justificado que a adição de CO₂ em cultivos de microalgas proporcione melhores resultados de parâmetros cinéticos.

Para uma biorrefinaria microalgal, o processo semicontínuo e CO₂ como fonte de carbono são pontos favoráveis na sustentabilidade. No cultivo semicontínuo, a colheita de produto e renovação do substrato periodicamente, evita o tempo de colheita de toda biomassa formada, limpeza do fotobiorreator e início do processo. Além disso, esse regime de cultivo mantém a célula em seu estado exponencial de crescimento, onde a condição nutricional não proporciona limitação e todas as células encontram-se em sua máxima velocidade específica de crescimento. O uso de CO₂ reduz os custos do processo, pois é o nutriente em maior requerimento na cultura microalgal. O CO₂ pode ser obtido sem custos a partir da queima do carvão, proporcionando benefício ambiental com a redução da emissão desse gás para atmosfera.

A cada ciclo de Calvin completo são produzidos carboidratos, mas ácidos graxos, aminoácidos e ácidos orgânicos também podem ser sintetizados na fixação fotossintética de CO₂ (SCHENK et al., 2008). A microalga *Chlorella fusca* LEB 111 produziu o teor máximo de carboidratos quando cultivada com 10% (v/v) de CO₂ e taxa de renovação de 40% (v/v) (Tabela 3).

As maiores concentrações protéicas foram obtidas para a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 nos ensaios com CO₂ como fonte de carbono. A *Chlorella fusca* LEB 111 obteve máximo conteúdo protéico no ensaio com 10% (v/v) de CO₂ e taxa de renovação de 40% (v/v), não diferindo estatisticamente ($p > 0,01$) do maior valor de *Spirulina* sp. LEB 18. Segundo Lourenço et al. (2004), se o suprimento de nitrogênio é abundante em cultivos, verifica-se tendência de aumento nas concentrações de proteínas e de clorofila nas células. De acordo com a literatura, o teor de proteínas é maior durante a fase exponencial de crescimento (SETTA et al., 2014). Isso também pode justificar os teores de proteínas relativamente elevados obtidos nas biomassas das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111.

Tabela 3 - Determinação de proteínas, carboidratos, lipídios e cinzas em biomassa microalgal.

TR (%v/v)	Carboidratos (%, p/p)	Proteínas (%, p/p)	Lipídios (%, p/p)	Cinzas (%, p/p)
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18 (Meio Zarrouk)				
20	19,1 ± 0,97 ^{cA}	42,9 ± 4,50 ^{dB}	9,2 ± 0,65 ^{bcA}	28,1 ± 1,90 ^{Aa}
40	18,8 ± 1,00 ^{cA}	47,8 ± 2,25 ^{cB}	9,3 ± 1,39 ^{bcA}	22,7 ± 0,97 ^{Bb}
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18 (10% (v/v) CO₂)				
20	13,7 ± 0,45 ^{dB}	60,1 ± 1,18 ^{aA}	9,8 ± 0,61 ^{abcA}	14,4 ± 0,94 ^{Cc}
40	14,4 ± 0,35 ^{dB}	59,7 ± 1,66 ^{aA}	8,8 ± 1,01 ^{Ca}	13,8 ± 0,92 ^{cC}
<i>Chlorella fusca</i> LEB 111 (Meio BG-11 modificado)				
20	27,4 ± 1,37 ^{bB}	51,3 ± 1,91 ^{bcAB}	11,8 ± 1,38 ^{abcA}	5,3 ± 0,30 ^{dA}
40	30,1 ± 1,32 ^{aA}	49,5 ± 0,81 ^{cB}	12,9 ± 1,62 ^{abA}	5,7 ± 0,28 ^{dA}
<i>Chlorella fusca</i> LEB 111 (10% (v/v) CO₂)				
20	29,4 ± 0,59 ^{abAB}	51,03 ± 2,49 ^{bcAB}	13,3 ± 1,46 ^{aA}	3,5 ± 0,05 ^{dB}
40	30,2 ± 1,10 ^{aA}	56,1 ± 3,60 ^{abA}	11,6 ± 1,72 ^{abcA}	4,0 ± 0,43 ^{dB}

Resultados em base seca. TR: Taxa de renovação; *: Valores são média ± desvio padrão; Letras minúsculas na mesma coluna comparam todos ensaio entre si; Letras maiúsculas na mesma coluna comparam cada microalga entre si; Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ($p > 0,01$) pelo teste de Tukey.

Quando analisada a composição química da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 nota-se que houve relação inversa no teor de proteínas e carboidratos. Os maiores teores de proteínas e menor de carboidratos foram os obtidos quando a microalga foi cultivada com 10% (v/v) de CO₂. Derner (2006) constatou que a utilização de CO₂ causou aumento no conteúdo de proteínas, especialmente em culturas de *Thalassiosira fluviatilis*. Castro Araújo e Garcia (2005) verificaram que a concentração de carboidratos foi menor com o emprego de CO₂ nas culturas de *Chaetoceros* cf. *weighamii*.

As microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 apresentaram máximos teores de lipídios nos ensaios com 10% (v/v) de CO₂ e renovação de 20% (v/v). O acúmulo de lipídios ocorre quando o acetil-CoA é convertido em malonil-CoA seguido por ácidos graxos após ciclos contínuos, catalisada pela acetil-CoA carboxilase (ACCase). O acúmulo de lipídios ocorre no cloroplasto e ACCase exerce intensa regulamentação da síntese

de ácidos graxos em microalgas (LV et al., 2010). Nos cloroplastos, dependendo do estágio de desenvolvimento da célula, a atividade da piruvato desidrogenase é frequentemente baixa. Por outro lado, acetil-CoA sintetase nos cloroplastos possui alta afinidade pelo acetato e consome ATP para converter a acetil-CoA (HELDT, 2005). Assim, a adição de CO₂ nos cultivos das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111, proporcionou rapidamente a síntese de ATP para converter a acetil-CoA e iniciar a biossíntese de lipídios.

Relacionado ao teor de cinzas, para a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi observado que os ensaios com NaHCO₃ como fonte de carbono apresentaram os máximos valores de cinzas, sendo justificada pela elevada concentração desse nutriente no meio Zarrouk (16,8 g.L⁻¹). Nos ensaios de *Spirulina* sp. LEB 18 com CO₂ sendo a fonte de carbono, os teores de cinzas foram menores, uma vez que o NaHCO₃ do meio Zarrouk foi substituído por 10% (v/v) de CO₂. Os ensaios de *Chlorella fusca* LEB 111 apresentaram teores de cinzas menores que os obtidos nos ensaios da *Spirulina* sp. LEB 18. No meio BG-11, utilizado no cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111, a concentração de nutrientes é menor quando comparada a do meio Zarrouk. Além disso, observou-se que o NaHCO₃ também pode ter influenciado no teor de cinzas dos ensaios da *Chlorella fusca* LEB 111. Os ensaios desta microalga, com meio BG-11 modificado continham 0,4 g.L⁻¹ de NaHCO₃ e apresentaram maiores teores de cinzas. Nos ensaios de *Chlorella fusca* LEB 111 com CO₂ os teores de cinzas foram menores devido a substituição da fonte de carbono do meio por 10% (v/v) de CO₂.

O conhecimento dos parâmetros cinéticos para a síntese de biopolímeros é importante, uma vez que é desejado que as cepas tenham velocidades específicas de crescimento e produtividades elevadas, que possam utilizar substratos de baixo custo e que apresentem concentração elevada de biopolímero em relação a massa total seca. Isso demonstra que os custos de produção de biopolímeros estão diretamente ligados a seleção do tipo do micro-organismo e do substrato (CHEN, 2009; KHANNA; SRIVASTAVA, 2005).

O valor máximo de rendimento em biopolímero, 7,1% (p/p) obtido pela microalga *Spirulina* sp. LEB 18 foi no ensaio com 10% (v/v) de CO₂ e taxa de renovação de 40 % (v/v), diferindo estatisticamente dos demais ensaios (p<0,01). Com a taxa de renovação de 20% (v/v) foi encontrado 3,9% (p/p). O cultivo com CO₂ estimulou a síntese de biopolímeros pela microalga, pois este nutriente foi disponibilizado durante todo o cultivo, não permitindo que ocorresse limitação.

No cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 com NaHCO₃ (16,8 g.L⁻¹) como fonte de carbono obteve-se rendimento em biopolímero de 3,7% (p/p) em ambas taxas de renovação. Em estudos anteriores realizados por nossa equipe, observou-se que a concentração ideal de

NaHCO₃ para *Spirulina* na síntese de biopolímeros é 8,4 g.L⁻¹. Khanna e Srivastava (2005) sugerem o excesso de carbono para produzir PHB. Entretanto, concentrações superiores a 8,4 g.L⁻¹ para a *Spirulina* produzem altas concentrações de NADPH, inibindo a enzima citrato sintase, responsável pela entrada do acetil-CoA no ciclo dos ácidos carboxílicos, onde ela fica disponível para a 3-β-cetatiolase. A 3-β-cetatiolase liga duas moléculas de acetil-CoA formando acetoacetil-CoA, o qual é reduzido a (R)-3-hidroxiacetil-CoA. Assim, o PHB é sintetizado pela polimerização de moléculas de (R)-3-hidroxiacetil-CoA pela enzima PHA sintase (KHANNA; SRIVASTAVA, 2005).

Os ensaios com NaHCO₃ como fonte de carbono proporcionaram a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 condições necessárias à multiplicação celular. De acordo com Lima et al. (2001), em condições balanceadas de crescimento, onde todos os nutrientes necessários à multiplicação celular estão disponíveis espera-se que os níveis de coenzima A (CoA) livre sejam altos. Assim, é possível suprir às grandes demandas por grupos acetil pelo ciclo de Krebs para formação de esqueletos carbônicos e a geração de energia. A CoA livre tem efeito inibitório sobre a enzima β-cetotiolase, impedindo deste modo a síntese de PHB. Por isso, os rendimentos em biopolímeros apresentados neste trabalho, nos ensaios com NaHCO₃ como fonte de carbono foram baixos em comparação aos ensaios com CO₂.

O incremento de biopolímero em cultivo semicontínuo da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 pode ser realizado com posteriores estudos relacionados à limitação de nutrientes no cultivo dessa microalga, como nitrogênio e fósforo. Miyake et al. (1996) estudaram o cultivo da microalga *Synechococcus* sp. MA19 com CO₂ e sem nitrogênio e encontraram 30% (v/v) de PHB. Nishioka et al. (2001) alcançaram 66% de PHB com a mesma cepa cultivada com CO₂, porém o diferencial foi utilizar meio de cultivo livre de fosfato. A limitação de fosfato altera a formação equilibrada de ATP e NADPH através da fotossíntese, produzindo a redução potencial responsável pela mudança metabólica a síntese de PHB (MARZAN; SHIMIZU, 2011). Sob limitação de nitrogênio, as células não produzem mais proteínas e ocorre o acúmulo de ATP. Excesso de ATP provoca diminuição da fosforilação oxidativa, e assim, o acúmulo de coenzimas reduzidas (NADH), que levam a formação de PHB (CARLSON; WLASCHIN; SRIENC, 2005).

Em uma biorrefinaria microalgal nas condições realizadas neste estudo, as proteínas poderiam ser utilizadas para alimentação humana ou obtenção de peptídeos bioativos. Os carboidratos, utilizados para produção de bioetanol e os lipídios, para produção de biodiesel, biossurfactantes ou ácidos graxos essenciais. As cinzas poderiam retornar ao cultivo como fonte de minerais e o biopolímero, aplicado como revestimento de nanocápsulas

de peptídeos bioativos ou outra aplicação destinada a polímeros de origem petroquímica. Possíveis resíduos que viessem a surgir da matéria-prima ou dos processos poderiam ser utilizados para digestão anaeróbia.

Assim, a partir das biomassas de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111 é possível obter no mínimo cinco bioprodutos: biopeptídeos, bioetanol, ácidos graxos essenciais, biopolímeros, biogás, reduzindo ainda as emissões de CO₂ para a atmosfera.

4 CONCLUSÃO

No cultivo semicontínuo da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 com CO₂ como fonte de carbono e taxa de renovação de meio de 20% (v/v) foi encontrada produtividade média de $0,105 \pm 0,004 \text{ g.L}^{-1}$, velocidade específica de crescimento de $0,091 \pm 0,005 \text{ d}^{-1}$, $10,46 \pm 0,12 \text{ g}$ de biomassa produzida, $13,7 \pm 0,45\%$ (p/p) de carboidratos, $60,1 \pm 1,18\%$ (p/p) de proteínas, $9,8 \pm 0,61\%$ de lipídios e $14,4 \pm 0,94\%$ de cinzas. Essa condição é favorável, pois menores taxas de renovação proporcionam menos custos nutricionais a cada corte realizado. Além disso, o uso de CO₂ reduz custos com a fonte de carbono que é o nutriente em maior requerimento no cultivo, bem como os problemas ambientais com a emissão desse gás para atmosfera.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE J. S.; GONZÁLEZ, A.; OZÇELIK, N.; RODRÍGUES, M. R.; FERNANDO, G. D. G. Modeling the *Listeria innocua* micropopulation lag phase and its variability. **International Journal of Food Microbiology**, v. 164, p. 60-69, 2013.

ANTUNES, R; SILVA, I. C. **Utilização de algas para a produção de biocombustíveis**. Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, 2010.

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

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006.

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

CARLSON, R., WLASCHIN, A., SRIENC, F. Kinetic studies and biochemical pathway analysis of anaerobic poly-(R)-3-hydroxybutyric acid synthesis in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**. 71, 713–720, 2005.

CASTRO ARAÚJO, S.; GARCIA, V. M. Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros cf. wighamii brightwell* under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. **Aquaculture**, v. 246, p. 405-412, 2005.

CHEN, G. Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. **Chemical society Review**, v.38, p.2434-2446, 2009.

COLLA, L. M. **Influencia das condições de crescimento sobre o potencial antioxidante da microalga *Spirulina platensis* e seu potencial na redução da hipercolesterolemia**, 2002. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Fundação Universidade Federal do Rio Grande-RS, 2002.

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.

CUARESMA, M.; GARBAYO, I.; VEGA, J.M.; VÍLCHEZ, C. Growth and photosynthetic utilization of inorganic carbon of the microalga *Chlamydomonas acidophila* isolated from Tinto river. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.158-162, 2006.

DERNER, R.B. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poli-insaturados**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

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

FOLCH, J.; LESS, 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.

HELDT, H. W. **Plant biochemistry**. 3th. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 629p.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal Triacylglycerols as feedstocks for biofuel production and advances. **Plan Journal**, v. 54, p. 621-639, 2008.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 607-619, 2005.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial Processos Fermentativos e Enzimáticos**, São Paulo: Edgard Blücher 2001. v.3, 593p.

LOURENÇO, S. O.; BARBARINO, E.; LAVÍN, P. L.; MARQUEZ, U. M. L.; AIDAR, E. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae. Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. **European Journal of Phycology**, v.41, p. 17-32, 2004.

LOWRY, O. H. ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. L. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p. 265-275, 1951.

LV, J. M.; CHENG, L.H.; XU, X. H.; ZHANG, L.; CHEN, H. L. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6797-6804, 2010.

MARZAN, L. W.; SHIMIZU, K. Metabolic regulation of *Escherichia coli* and its *phoB* and *phoR* genes knockout mutants under phosphate and nitrogen limitations as well as at acidic condition. **Microbial Cell Factories**. 10, 39, 2011.

MIYAKE, M.; ERATA, M.; ASADA, Y. A thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MA19, capable of accumulating poly- β -hydroxybutyrate. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, p. 512-514, 1996.

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

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

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

NISHIOKA, M.; NAKAI, N.; MIYAKE, M.; ASADA, Y.; TAYA, M. MASAT. Production of poly- β -hydroxybutyrate by thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MA19, under phosphate-limited conditions. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1095–1099, 2001.

REE, R. V.; ANNEVELINK, B. **Status Report Biorefinery 2007**. Agrotechnology and Food Sciences Group. Wageningen: November, 2007.

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.

SCHENK, P.M.; THOMAS-HALL; S.R., STEPHENS, E.; MARX, U.C.; MUSSGNUG, J.H.; POSTEN C.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. **Bioenergy Research**, v.1, p. 20-43, 2008.

SETTA, B. R. S.; BARBARINO, E.; PASSOS, F. B.; LOURENÇO, S. O. An assessment of the usefulness of the cyanobacterium *Synechococcus subsalsus* as a source of biomass for biofuel production. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 42, n. 2, p. 364-375, 2014.

TASTAN, B. E.; DUYGU, E.; ATAKOL, O.; DONMEZ, G. SO₂ and NO₂ tolerance of microalgae with the help of some growth stimulators. **Energy Conversion And Management**. v. 64, p. 28-34, 2012.

ZARROUK, C. **Contribution a Letude Dune Cyanophycee, Influence de Divers Facteurs physiques et Chimiques sur la Croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* geitler**. Ph.D. Thesis University of Paris. 1966.

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

CAPÍTULO IV

6 CONCLUSÃO GERAL

O melhor modo de conduzir o cultivo semicontínuo de microalgas foi fixar a concentração celular de corte. Essa condução de cultivo, possibilitou à microalga *Spirulina* sp. LEB 18 elevadas produtividades e concentração de biomassa produzida. Com a taxa de renovação de 40% (v/v) a produtividade média encontrada foi 0,092 g.L⁻¹.d⁻¹ e a biomassa produzida, 8,37 g. Ao aumentar a taxa de renovação de meio de 20 para 40% (v/v) foi obtido maior velocidade específica de crescimento (0,079 d⁻¹).

Os cultivos com 10% (v/v) de CO₂ como fonte de carbono conferiu as microalgas *Spirulina* sp, LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111, as melhores respostas cinéticas e concentrações de biomassa produzida. O incremento de CO₂ nos cultivos da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 proporcionou aumento de 39,7% (p/p) na produção de biomassa. Nos cultivos com CO₂ foi constatado que a taxa de renovação de meio não influenciou nos valores de parâmetros cinéticos obtidos pela microalga *Spirulina* sp. LEB 18, contudo, influenciou nos obtidos pela microalga *Chlorella fusca* LEB 111.

A biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 apresentou 13,7% (p/p) de carboidratos, 60,1% (p/p) de proteínas e 9,8% (p/p) de lipídios após ser cultivada com 10% (v/v) de CO₂ e renovação de 20% (v/v). A biomassa da microalga *Chlorella fusca* LEB 111 apresentou teores máximos de carboidratos (30,2%, p/p), proteínas (56,1%, p/p) e lipídios (13,3%, p/p) quando a microalga foi cultivada com CO₂ como fonte de carbono. Com isso, foi verificado que com o cultivo dessas microalgas é possível a obtenção de bioprodutos como biopeptídeos, bioetanol, ácidos graxos essenciais, biopolímeros e biogás.

Além disso, a possibilidade do uso de CO₂ nos cultivos de microalgas juntamente com a favorável composição química e utilização otimizada das biomassas produzidas, torna a biorrefinaria microalgal uma alternativa bastante promissora, ambientalmente correta e autossustentável.

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE J. S.; GONZÁLEZ, A.; OZÇELIK, N.; RODRÍGUES, M. R.; FERNANDO, G. D. G. Modeling the *Listeria innocua* micropopulation lag phase and its variability. **International Journal of Food Microbiology**, v. 164, p. 60-69, 2013.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. Brasil: Editora Artes Médicas, 1994. 1549p.
- ANTUNES, R; SILVA, I. C. **Utilização de algas para a produção de biocombustíveis**. Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, 2010.
- AOAC- **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 17 th HORWITZ, W.; ed. Maryland: Association of Official Analytical Chemists, 2000.
- BARCELLOS, F. C.; OLIVEIRA, J. C.; CARVALHO, P. G. M. Investimento ambiental em indústrias sujas e intensivas em recursos naturais e energia. **Revista Iberoamericana de Economia Ecológica**, v. 12, p. 33-50, 2009.
- BARRETO, L. V.; FREITAS, A. C. S.; PAIVA, L. C. **Sequestro de Carbono**. Centro Científico Conhecer. Goiânia, Enciclopédia Biosfera, 2009.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006.
- BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biorechnology Advances**, v. 25, p. 207-210, 2006.
- BECKER, W. Microalgal in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed) **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. London: Blackwell Science, p. 312-351, 2004. cap. 18.
- BENEMANN, JR. CO₂ mitigation with microalgal systems. **Energy Conversion and Management**, v. 38, p. 475-479, 1997.
- BINAGHI, L.; BORGHI, A. D.; LODI, A.; CONVERTI, A.; BORGHI, M. D. Batch and fed-batch uptake of carbon dioxide by *Spirulina platensis*. **Process Biochemistry**. v. 38, 1341–1346, 2003.

BODEN, T. A.; MARLAND, G.; ANDRES, R. J. **Global, regional, and national fossil-fuel CO₂ emissions**, in: ORNL, Carbon Dioxide Information Analysis Center, US Department of Energy, Oak Ridge, TN, USA, 2010.

BORGES, F.C. **Proposta de um modelo conceitual de biorrefinaria com estrutura descentralizada**. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

BOROWITZKA, M. A. Culturing microalgae in outdoor ponds. In ANDERSEN, R. A. **Algal Culturing Techniques**. United States of America: Elsevier Inc, p. 205-218, 2005.

BORZANI, W.; SHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda. 2001, v. 1, 254 p.

BRANGER, B.; CADUDAL, J.L.; DELOBEL, M.; OUOBA, H.; YAMEOGO, P.; OUEDRAOGO, D.; GUERIN, D.; VALEA, A.; ZOMBRE, C.; ANCEL, P. *Spirulina* as a food supplement in case of infant malnutrition in Burkina-Faso. **Archives de pédiatrie**, v. 10, n. 5, p. 424-431 2003.

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

BROWN, L. M.; ZEILER, K. G. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. **Energy Conversion and Management**, v. 34, 1005-13, 1993.

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

C&T Brasil. **Entendendo a mudança do clima: um guia para iniciantes da Convenção - Quadro das Nações Unidas e seu Protocolo de Quioto**. Disponível em: www.mct.gov.br/clima. Acesso em: outubro de 2013.

CAMACHO, F. G.; GOMEZ, A. C.; SEVILLA, J. M. F.; GRIMA, E. M. Use of concentric-tube airlift photobioreactors for microalgal outdoor mass cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 164-172, 1999.

CARLSON, R., WLASCHIN, A., SRIENC, F. Kinetic studies and biochemical pathway analysis of anaerobic poly-(R)-3-hydroxybutyric acid synthesis in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.** 71, 713–720, 2005.

CARRAJOLA, C.; CASTRO, M. J.; HILÁRIO, T. **Planeta com Vida Biologia**. v.2, 1ª ed. Carnaxide: Santillana Constancia, 207.

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

CASTRO ARAÚJO, S.; GARCIA, V. M. Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros cf. wighamii brightwell* under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. **Aquaculture**, v. 246, p. 405-412, 2005.

CHEN, G. Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. **Chemical society Review**, v.38, p.2434-2446, 2009.

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

CHOJNACKA, K.; NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 461-465, 2004.

COHEN, Z. The chemicals of *Spirulina*. In: VONSHAK, A. ***Spirulina platensis* (Arthrospira) physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997. 233 p.

COLLA, L. M. **Influencia das condições de crescimento sobre o potencial antioxidante da microalga *Spirulina platensis* e seu potencial na redução da hipercolesterolemia**, 2002. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Fundação Universidade Federal do Rio Grande-RS, 2002.

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

CUARESMA, M.; GARBAYO, I.; VEGA, J.M.; VÍLCHEZ, C. Growth and photosynthetic utilization of inorganic carbon of the microalga *Chlamydomonas acidophila* isolated from Tinto river. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.158-162, 2006.

DAL MAGRO, C.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Remoção de cromo VI e DQO de meio de cultivo adicionado de efluente com elevada concentração de cromo a partir da microalga *Spirulina platensis*. In: XVIII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2011, Caxias do Sul. **Anais...** Caxias do Sul: Editora da UCS, 2011. 1 CD-ROM.

DERNER, R.B. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poli-insaturados.** Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

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.

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.

FALKOWSKI, P. G.; RAVEN, J.A. **Aquatic photosynthesis**. Malden: Blackwell Science, 1997. 375p.

FOGG, G. E. Algal cultures and phytoplankton ecology. **Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie**, v. 51, p. 203-204, 1966.

FOLCH, J.; LESS, 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.

FOX, R. D. ***Spirulina* Production & Potencial**. França: Edisud, 1996. 232 p.

GADD, G.M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, p. 13-28, 2009.

GRIMA, E. M.; SEVILLA, J. M. F.; PÉREZ, J. A. S.; CAMACHO, F. G. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. **Journal of Biotechnology**, v. 45, p. 59-69, 1996.

HAASE, S. M.; HUCHZERMEYER, B.; RATH, T. PHB accumulation in *Nostoc muscorum* under different carbon stress situations. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, p.157 –162, 2012.

HELDT, H. W. **Plant biochemistry**. 3th. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 629p.

HENRIKSON, R. **Microalga *Spirulina*: Superalimento del futuro**. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, 1994. 222p.

HO, S.H.; CHEN, W. M.; CHANG, J. S.; *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production, **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8725–8730, 2010.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal Triacylglycerols as feedstocks for biofuel production and advances. **Plan Journal**, v. 54, p. 621-639, 2008.

IEA - INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. **CO₂ Emission from fuel Combustion (2011 edition)**, IEA, 2011.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme Microbial Technology**, n. 27, p. 631-635, 2000.

IPCC. Special Report on Carbon Dioxide Capture and Storage. Preparado pelo Grupo de trabalho 3 do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (Metz, B., Davidson, O., Coninck, H., Loos, M., Meyer, L.) Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2007, 442 p.

IWAMOTO, H. Industrial Production of Microalgal Cell-mass and Secondary Products – Major Industrial Species – *Chlorella*. In: A. Richmon (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**: Blackwell Publishing Ltd, 2004.

JACOBI, A.; IVANOVA, B.; POSTENC. Photobioreactors: hydrodynamics and mass transfer. **Proceedings of the 11th International Symposium on Computer Applications in Biotechnology**. Belgium, p. 7-9, 2010.

JIMÉNEZ, C.; COSSIO, B.; LABELLA, D.; NIELL, F. X. The feasibility of industrial production of *Spirulina* (Arthrospira) in Southern Spain. **Aquaculture**, v. 217, p. 179-190, 2003.

KAMM, B.; GRUBER, P. R.; KAMM, M. **Biorefineries – Industrial Processes and Products: Status Quo and Future Directions**, Weinheim: WILEY-VCH, Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 607-619, 2005.

LEE, B. D.; APEL, W. A.; WALTON, M. R. Screening of cyanobacterial species for calcification. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 1345-1351, 2004.

LEE, J. S.; KIM, D. K.; LEE, J. P.; PARK, S. C.; KOH, J. H.; CHO, H. S.; KIM, S. W. Effects of SO₂ and NO on growth of *Chlorella* sp. KR-1. **Bioresource Technology**, v. 82, p. 1-4, 2002.

LEE, S. Y., CHOI, J., WONG, H. H. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 31-36, 1999.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial Processos Fermentativos e Enzimáticos**, São Paulo: Edgard Blücher 2001. v.3, 593p.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas – Princípios e Aplicações** – São Carlos: RiMa, 2006. 588p.

LOURENÇO, S. O.; BARBARINO, E.; LAVÍN, P. L.; MARQUEZ, U. M. L.; AIDAR, E. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae. Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. **European Journal of Phycology**, v.41, p. 17-32, 2004.

LOWRY, O. H. ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. L. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p. 265-275, 1951.

LU, C.; VONSHAK, A. Characterization of PSII photochemistry in salt-adapted cells of cyanobacterium *Spirulina platensis*. **New Phytologist**, v. 141, p. 231-239, 1999.

LV, J. M.; CHENG, L.H.; XU, X. H.; ZHANG, L.; CHEN, H. L. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6797-6804, 2010.

MARCUS, Y. Distribution of inorganic carbon among its component species in cyanobacteria: do cyanobacteria in fact actively accumulate inorganic carbon? **Journal of Theoretical Biology**, n. 185, p. 31-45, 1997.

MARIANO, A. B.; TORRENS, J.; SATYANARAYANA, K. G.; VARGAS, J. V. C. 2009, Energia auto-sustentável a partir de biodiesel derivado de microalgas. In: 4º Congresso Internacional de Bioenergia ; 1º Congresso Brasileiro de Geração Distribuída e Energias Renováveis 2009, Curitiba. **Anais...** Curitiba, Brazil. p. 62., 2009.

MARZAN, L. W.; SHIMIZU, K. Metabolic regulation of *Escherichia coli* and its *phoB* and *phoR* genes knockout mutants under phosphate and nitrogen limitations as well as at acidic condition. **Microbiol. Cell Fact.** 10, 39, 2011.

MASOJÍDEK, J.; KOBLÍZEK, M.; TORZILLO, G. Photosynthesis in Microalgae: In RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing company, 2004.

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

MEZZOMO, N.; SAGGIORATO, A. G.; SIEBERT, R.; TATSCH, P.O.; LAGO, M. C.; HEMKEMEIER, M.; COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 173-178, 2010.

MIYAKE, M.; ERATA, M.; ASADA, Y. A thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MA19, capable of accumulating poly- β -hydroxybutyrate. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, p. 512-514, 1996.

MOHANTY, P., MADHULIKA, S., KRISHNA, K. The Photosynthetic Apparatus of *Spirulina*: Electron Transport and Energy Transfer: in VONSHAK, A. ***Spirulina platensis* (*Arthrospira*) Physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997.

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

MORAIS, M. G. ; VAZ, B. S. ; MORAIS, E. G.; COSTA, J. A. V. Biological Effects of *Spirulina* (*Arthrospira*) Biopolymers and Biomass in the Development of Nanostructured Scaffolds. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

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

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Bioprocessos para remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por microalgas visando a utilização de gases gerados durante a combustão do carvão. **Química Nova**, v. 31, p. 1038- 1042, 2008a.

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

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Perfil de Ácidos Graxos de Microalgas Cultivadas com Dióxido de Carbono. **Ciências agrotecnicas**, Lavras, v. 32, n.4, p. 1245-1251, 2008b.

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

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

MORAIS, M. G.; STILLINGS, C. ; DERSCH, R.; RUDISILE, M.; PRANKE, P; COSTA, J. A. V.; WENDORFF, J. Preparation of nanofibers containing the microalga *Spirulina* (*Arthrospira*). **Bioresource Technology** v. 101, p. 2872-2876, 2010.

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

MOREIRA, H. M.; GIOMETTI, A. B. R. Protocolo de Quioto e as possibilidades de inserção do Brasil no Mecanismo de Desenvolvimento Limpo por meio de projetos em energia limpa. **Contexto Internacional**, Rio de Janeiro, v. 30, 2008.

NISHIOKA, M.; NAKAI, N.; MIYAKE, M.; ASADA, Y.; TAYA, M. MASAT. Production of poly- β -hydroxybutyrate by thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MA19, under phosphate-limited conditions. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1095–1099, 2001.

OGBONNA, J. C.; TANAKA, H. Light requirement and photosynthetic cell cultivation: development of processes for efficient light utilization in photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**. v. 12, p. 201 – 207, 2000.

OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. A.; CUNHA, P. C. R.; LAMARCA, C. P.; SANTOS, M. E.; MENDES, L. B. B. Revisão: Sequestro de Carbono Realizado por Microalgas e Florestas e a Capacidade de Reprodução de Lipídios Pelas Microalgas. **INSULA**, Florianópolis, p. 39-74. 2007.

OLIVEIRA, A. B. **Análise Prospectiva da Utilização de uma Usina como Plataforma para uma Biorefinaria**. Dissertação (Mestrado). Fundação Getúlio Vargas. Escola de Economia de São Paulo, São Paulo, 2010.

PACALA, S.; SOCOLOW, R. “Stabilization Wedges: Solving the Climate Problem for the next 50 years with current technologies”. **Science**, v.305, p. 968-972, 2004.

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.

QUILLET, M. Recherches sur les substances glucidiques élaborées par les Spirulines. **Annales de la nutrition et de l'alimentation**. v. 29, 553 – 561, 1975.

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.

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

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHOM, S. E. **Biologia Vegetal**. 6 ed. Editora: Guanabara Koogan, 2001, 906 p.

REE, R. V.; ANNEVELINK, B. **Status Report Biorefinery 2007**. Agrotechnology and Food Sciences Group. Wageningen: November, 2007.

REICHERT C. C.; REINEHR C. O.; COSTA J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, p. 23–28, 2006.

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.

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

SCHAEFFER, R, SZKLO, A., CASTELO BRANCO, D., CUNHA, D., COSTA, I. “Cenários futuros de baixa emissão de carbono nas cadeias de produção de combustíveis fósseis (downstream).” Banco Mundial. 2009.

SCHENK, P.M.; THOMAS-HALL; S.R., STEPHENS, E.; MARX, U.C.; MUSSGUG, J.H.; POSTEN C.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. **Bioenergy Research**, v.1, p. 20-43, 2008.

SCHMITZ, R.; DAL MAGRO, C.; COLLA, L. M. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC – UPF**, v. 4, 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 bioreactor. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 67-73, 2002.

SETTA, B. R. S.; BARBARINO, E.; PASSOS, F. B.; LOURENÇO, S. O. An assessment of the usefulness of the cyanobacterium *Synechococcus subsalsus* as a source of biomass for biofuel production. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 42, n. 2, p. 364-375, 2014.

SHIMAMATSU, H. Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. **Hydrobiologia**, v. 512, p. 39-44, 2004.

SPOLAORE, P.; CASSAN, C. J.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Review: Commercial Applications of Microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Japan, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

STEFFENS D. ; LEONARDI, D. ; SOSTER, P. R. L. ; LERSCH, M. ; ROSA, A. ; CRESTANI, T. ; SCHER, C.; MORAIS, M. G. ; COSTA, J. A. V.; PRANKE, P. H. L. Development of a new nanofiber scaffold for use with stem cells in a third degree burn animal model. **Burns**, v. 1, p. 1-11, 2014.

SUDHIR, P-R; POGORYELOV, D. KOVÁCS, L.; GARAB, G.; MURTHY, S. D. S. The Effects of Salt Stress on Photosynthetic Electron Transport and Thylakoid Membrane Proteins in the Cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 481-485, 2005.

TASTAN, B. E.; DUYGU, E.; ATAKOL, O.; DONMEZ, G. SO₂ and NO₂ tolerance of microalgae with the help of some growth stimulators. **Energy Conversion And Management**. v. 64, p. 28-34, 2012.

TOMASELLI, I. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*). In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) Physiology, cell-biology and biotechnology. Londres: Taylor & Francis, 1997. 233p.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. In ROCHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotchnology and Applied Phycology**. England: Blackwell Publishing, 2004.

TREDICI, M. Mass production of microalgae: phtotobioreactors. In RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. England: Blackwell Publishing, p. 178-214, 2004.

TREVAN, M. D., BOFFEY, S., GOULDING, K. H., STANBURY, P. **Biotechnologia: princípios biológicos**. Zaragoza: Ed. Acribia, 1990.

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

VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) physiology, cell-biology and biotechnoloby. London: Taylor & Francis, ISBN 0-7484-0674-3, 1997.

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

XU, R.; MI, Y. Simplifying the Process of Microalgal Biodiesel Production Through In Situ Transesterification Technology. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 1, p. 91-99, 2011.

ZARROUK, C. **Contribution a Letude Dune Cyanophycee, Influence de Divers Facteurs physiques et Chimiques sur la Croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* geitler.** Ph.D. Thesis University of Paris. 1966.

ZASLAVSKAIA, L. A.; LIPPMEIER, J. C.; SHIH, C.; EHRHARDT, D.; GROSSMAN, A. R.; APT, K. E. Trophic conversion of an obligate photoautotrophic organism through metabolic engineering. **Science**, v. 292, p. 2073-2075, 2001.

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

ZENG, X.; DANQUAH, M. K.; CHEN, X.D.; LU, Y. Microalgae bioengineering: From CO₂ fixation to biofuel production, **Renewable & Sustainable Energy Reviews**. v. 15 p. 3252–3260, 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Quadro 1 - Parâmetros cinéticos obtidos em cada ciclo de crescimento da microalga *Spirulina* sp. LEB 18, em ambos modos de condução de cultivo semicontínuo

(continuação)

Microalga/Ensaio	TR (%)	Ciclo de crescimento	P_x (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	μ_x (d ⁻¹)
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18 /Cortes na concentração celular de 1,6 g.L ⁻¹	20	1	0,110	0,099
		2	0,094	0,063
		3	0,100	0,054
		4	0,095	0,082
		5	0,104	0,082
		6	0,062	0,044
		7	0,061	0,022
		8	0,073	0,047
		9	0,059	0,051
		10	0,086	0,073
		11	0,050	0,099
	40	1	0,120	0,113
		2	0,089	0,067
		3	0,104	0,074
		4	0,111	0,081
		5	0,094	0,073
		6	0,085	0,068
		7	0,061	0,090
		8	0,068	0,070
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18 /Cortes a cada 3 d	20	1	0,074	0,100
		2	0,056	0,054
		3	0,042	0,035
		4	0,037	0,045
		5	0,044	0,042
		6	0,093	0,090
		7	0,040	0,051
		8	0,122	0,120
		9	0,061	0,057
		10	0,074	0,069
		11	0,036	0,042
		12	0,078	0,081
		13	0,105	0,108

TR: taxa de renovação de meio; P_x : Produtividade de biomassa; μ_x : velocidade específica de crescimento.

Quadro 1- Parâmetros cinéticos obtidos em cada ciclo de crescimento da microalga *Spirulina* sp. LEB 18, em ambos modos de condução de cultivo semicontínuo

(conclusão)

Microalga/Ensaio	TR (%)	Ciclo de crescimento	P_x (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	μ_x (d ⁻¹)
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18/ Cortes a cada 3 d	40	1	0,080	0,079
		2	0,042	0,078
		3	0,053	0,068
		4	0,076	0,120
		5	0,062	0,114
		6	0,079	0,163
		7	0,042	0,075
		8	0,092	0,205
		9	0,055	0,133
		10	0,068	0,152
		11	0,043	0,106
		12	0,048	0,121
		13	0,053	0,136

TR: taxa de renovação de meio; P_x : Produtividade de biomassa; μ_x : velocidade específica de crescimento.

APÊNDICE 2

Quadro 2 - Parâmetros cinéticos obtidos em cada ciclo de crescimento das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111, quando cultivadas com 10% (v/v) CO₂

(continuação)

Microalga/Ensaio	TR (%)	Ciclo de crescimento	P _x (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	μ _x (d ⁻¹)
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18/10% (v/v) CO₂	20	1	0,133	0,143
		2	0,164	0,109
		3	0,145	0,092
		4	0,063	0,043
		5	0,108	0,093
		6	0,115	0,131
		7	0,113	0,135
		8	0,025	-
		9	0,130	0,095
		10	0,083	0,055
		11	0,073	0,050
		12	0,111	0,073
		13	0,137	0,158
		14	0,125	0,084
		15	0,099	0,068
		16	0,087	0,094
		17	0,103	0,069
		18	0,075	0,054
	40	1	0,120	0,109
		2	0,135	0,105
		3	0,094	0,062
		4	0,092	0,076
		5	0,114	0,095
		6	0,090	0,076
		7	0,121	0,122
		8	0,122	0,099
		9	0,081	0,084
<i>Chlorella fusca</i> LEB 111/ 10% (v/v) CO₂	20	1	0,082	0,070
		2	0,030	0,060
		3	0,051	0,054
		4	0,087	0,077
		5	0,088	0,058
		6	0,087	0,092
		7	0,036	0,052
		8	0,105	0,073
		9	0,039	0,020
		10	0,053	0,038
		11	0,038	0,038
		12	0,050	0,046

TR: taxa de renovação de meio; P_x: Produtividade de biomassa; μ_x: velocidade específica de crescimento.

Quadro 2 - Parâmetros cinéticos obtidos em cada ciclo de crescimento das microalgas *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella fusca* LEB 111, quando cultivadas com 10% (v/v) CO₂

(conclusão)

Microalga/Ensaio	TR (%)	Ciclo de crescimento	P _x (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	μ _x (d ⁻¹)
<i>Chlorella fusca</i> LEB 111/ 10% (v/v) CO ₂	40	1	0,085	0,085
		2	0,102	0,063
		3	0,085	0,054
		4	0,056	0,048
		5	0,081	0,073
		6	0,094	0,078
		7	0,008	0,006
<i>Chlorella fusca</i> LEB 111/ BG-11 modificado	20	1	0,105	0,123
		2	0,031	0,050
		3	0,073	0,054
		4	0,051	0,040
		5	0,054	0,032
		6	0,040	0,060
		7	0,054	0,046
		8	0,086	0,090
		9	0,035	0,038
		10	0,068	0,045
	40	1	0,085	0,085
		2	0,102	0,063
		3	0,085	0,054
		4	0,056	0,048
		5	0,081	0,073
		6	0,094	0,078
		7	0,008	0,006

TR: taxa de renovação de meio; P_x: Produtividade de biomassa; μ_x: velocidade específica de crescimento.