



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

BIOENGENHARIA DE MICROALGAS APLICADA NO PROCESSO DE FIXAÇÃO DE
CO₂: PRODUÇÃO DE BIOMASSA E MACROMOLÉCULAS

Luiza Moraes

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa
Orientador

Prof.^a. Dr.^a. Lucielen Oliveira dos Santos
Coorientadora

Prof. Dr. Francisco Gabriel Acién Fernández
Coorientador no exterior

RIO GRANDE, RS

2018

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

BIOENGENHARIA DE MICROALGAS APLICADA NO PROCESSO DE FIXAÇÃO DE
CO₂: PRODUÇÃO DE BIOMASSA E MACROMOLÉCULAS

Luiza Moraes

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

Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa
Orientador

Prof.^a. Dr.^a. Lucielen Oliveira dos Santos
Coorientadora

Prof. Dr. Francisco Gabriel Acién Fernández
Coorientador no exterior

RIO GRANDE, RS

2018

Ficha catalográfica

M827b Moraes, Luiza.
Bioengenharia de microalgas aplicada no processo de fixação de CO₂: produção de biomassa e macromoléculas / Luiza Moraes. – 2018.
195 p.

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

Orientador: Dr. Jorge Alberto Vieira Costa.

Coorientadora: Dra. Lucielen Oliveira dos Santos.

Coorientador no exterior: Dr. Francisco Gabriel Acién Fernández.

1. Fixação de CO₂ 2. Biomassa 3. Microalgas 4. Macromoléculas
I. Costa, Jorge Alberto Vieira II. Santos, Lucielen Oliveira dos
III. Fernández, Francisco Gabriel Acién IV. Título.

CDU 664

APROVAÇÃO

Tese defendida por Luiza Moraes aprovada em 09 de fevereiro de 2018, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



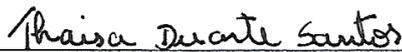
Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa – FURG



Prof. Dr. Paulo Duarte Filho - Unipampa



Profa. Dra. Ana Priscila Centeno da Rosa - FURG



Dra. Thaisa Duarte dos Santos – FURG

Dedico este trabalho aos meus pais
Marcelino e Rose e ao meu companheiro de vida Gabriel.

AGRADECIMENTOS

Ao Gabriel por todo o amor, carinho, paciência, dedicação, por ser meu melhor amigo ao longo desta caminhada e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos.

À minha família por todo o amor, carinho e por sempre acreditarem em que esse sonho seria possível.

Ao meu orientador Jorge Alberto Vieira Costa por todos os ensinamentos, confiança, palavras de incentivo e inúmeras oportunidades de aprendizagem ao longo desses 10 anos de LEB.

À minha coorientadora Lucielen Oliveira dos Santos por todos os ensinamentos, incentivo, contribuições com o trabalho e disponibilidade em me ajudar em todos os momentos.

Ao meu coorientador no exterior Professor Gabriel Ación Fernández por me receber na Espanha, por toda a paciência e pelos inúmeros ensinamentos que contribuíram imensamente para a realização do doutorado sanduíche.

Aos professores da banca de qualificação e de defesa final, Luiz A. Almeida Pinto, Ana Priscila Centeno da Rosa, Paulo Duarte Filho e Thaisa Duarte Santos por todas as contribuições para o enriquecimento deste trabalho.

À professora Eliana Badiale Furlong,
pela paciência, atenção, pelas palavras de incentivo e disponibilidade em sanar as minhas dúvidas ao longo desta caminhada.

À professora Michele Greque de Moraes,
pelas contribuições com o trabalho de tese, pelo incentivo e por todas as oportunidades de aprendizagem.

À querida amiga de todas as horas Ana Priscila Centeno da Rosa por sempre estar disposta a me ajudar, pelas conversas científicas e não tão científicas, cafês, pelas palavras de incentivo e por todos os ensinamentos desde a iniciação científica.

À querida Thaisa Duarte Santos por ser uma amiga tão especial de todas as horas, por toda ajuda, pelas palavras de incentivo, por cuidar com todo o amor e carinho da nossa “Modri” quando fomos para Espanha.

Aos amigos Ana Cláudia de Freitas Margarites, Pâmela Guder Goularte e Vitor Badiale Furlong que mesmo estando distantes fisicamente, sempre estiveram presentes na minha vida e na do Gabriel.

À amiga Bárbara Catarina Bastos de Freitas pela amizade, incentivo e pela ajuda com a análise de eletroforese.

Às queridas iniciantes científicas Isabela Michel Lucini e Gabriela Kurowiski, por todo o comprometimento, dedicação e colaboração na realização deste trabalho. Meninas a ajuda de vocês fez toda a diferença!

Aos colegas e amigos do LEB e MIBI, em especial ao Adriano Henrard, Ana Paula Cassuriaga, Igor S. Gonçalves, Bruna Barcelos Cardias, Jéssica Duarte, Kricelle Deamici, Jéssica Silveira, Camila Cruz, Bárbara Lucas, Cristiane Lisboa, pela amizade, pelas palavras de confiança principalmente nos momentos finais do doutorado e por sempre tornarem o LEB não somente um ambiente de trabalho muito agradável, mas também uma segunda casa.

A todos das equipes LEB e MIBI que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho de tese.

Aos colegas e amigos que fiz no doutorado sanduíche na Espanha, Martina, Mati, Cíntia, Víctor, David, Marlino, Dário, Begoña, Ana, Ainoa, Ismael, Peter, Alícia, Marta e Cláudia, por nos receberem, por toda a ajuda na execução do trabalho, ensinamentos, confraternizações e por fazerem o Gabriel e eu nos sentirmos em casa em todos os momentos. A vocês todos “muchas gracias y hasta pronto”!

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

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos e aos seus professores pela contribuição com a minha formação profissional.

Aos Laboratórios e seus coordenadores pela ajuda nas análises e empréstimos de material para a realização deste trabalho.

À CAPES,
pela concessão das bolsas de estudos ao longo do doutorado e no período sanduíche no exterior.

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

RESUMO

O aquecimento global se deve as crescentes concentrações atmosféricas de dióxido de carbono (CO₂) e outros gases de efeito estufa (GEE). Este fenômeno provoca o aumento da temperatura média da superfície terrestre e desencadeia diversas implicações nocivas ao meio ambiente. Neste contexto, abordagens são propostas para a redução da concentração de CO₂ na atmosfera. Estudos indicam que a mitigação de CO₂ por microalgas é uma tecnologia promissora para capturar e armazenar carbono. Parâmetros físico-químicos e hidrodinâmicos podem influenciar a fixação de CO₂ por microalgas. Ademais, fatores como salinidade e a aplicação de estratégias de cultivo podem contribuir para o aumento da produtividade de biomassa e de macromoléculas em microalgas. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo aumentar a fixação de CO₂, produtividade de biomassa e de macromoléculas de microalgas mediante o estudo de parâmetros físico-químicos, hidrodinâmicos e estratégias de cultivo. Para tal, o trabalho foi realizado em quatro etapas, a saber: (1) A primeira etapa consistiu na avaliação da influência da concentração de CO₂ no crescimento, fixação de CO₂ e composição da biomassa de *Chlorella fusca* LEB 111. (2) A segunda etapa contemplou a avaliação da adição de cloreto de sódio (NaCl) em estratégia de único (UE) e duplo estágio (DE) com injeção de CO₂ na produtividade de biomassa (Px) e de macromoléculas por *C. fusca* LEB 111. (3) Na terceira etapa foi avaliada a influência da vazão de CO₂ no controle do pH, nas produtividades de biomassa e lipídica e na eficiência de utilização de CO₂ (E_{CO2}) por *Nannochloropsis gaditana* cultivada em condições *outdoor*. (4) Na quarta etapa foi verificado o efeito do pH na Px e E_{CO2} por *N. gaditana* quando cultivada sob condições *outdoor*. Os maiores resultados de Px (194,3 mg L⁻¹ d⁻¹) e fixação de CO₂ (390,9 mg L⁻¹ d⁻¹) foram verificados quando *C. fusca* foi cultivada com 15% de CO₂. O fornecimento de 10% de CO₂ ao cultivo resultou na máxima concentração de carboidratos na biomassa (31,9% m m⁻¹) e produção teórica de etanol (14,5 mL 100 g⁻¹ de biomassa). A adição de 200 mmol L⁻¹ de NaCl no cultivo de *C. fusca* em UE promoveu o incremento da produtividade de carboidratos em 81,0% em comparação ao ensaio controle (EC), enquanto que no cultivo em DE, a adição de 15% de CO₂ e 100 mmol L⁻¹ de NaCl favoreceu o aumento de 33,8% da produtividade lipídica em comparação ao EC. A vazão de 5 L min⁻¹ de CO₂ foi selecionada para o controle do pH dos cultivos de *N. gaditana*. Nesta condição foi verificada E_{CO2} pela microalga de aproximadamente 70% (m m⁻¹) e máxima produtividade de biomassa (0,24 g L⁻¹ d⁻¹). O pH 8,0 foi considerado ideal para o crescimento de *N. gaditana*, sendo verificadas as máximas Px (0,17 g L⁻¹ d⁻¹) e E_{CO2} (79% m m⁻¹). Diante do exposto, foi verificada a importância da determinação de parâmetros e estratégias de cultivo para tornar a conversão de carbono em biomassa mais eficiente, contribuindo assim para o aumento da aplicação de microalgas para a produção de bioenergia e mitigação de GEE.

Palavras-chave: *Chlorella*. Dióxido de carbono. Duplo estágio. *Nannochloropsis*. pH. Parâmetros hidrodinâmicos.

MICROALGAE BIOENGINEERING APPLIED IN THE CO₂ FIXATION PROCESS: BIOMASS AND MACROMOLECULES PRODUCTION

ABSTRACT

Global warming is caused by increasing atmospheric concentrations of carbon dioxide (CO₂) and other greenhouse gases (GHG). This phenomenon causes the increase of the average temperature of the terrestrial surface and triggers several harmful implications to the environment. In this context, approaches are proposed to reduce the CO₂ concentration in the atmosphere. Studies indicate that microalgal CO₂ mitigation is a promising technology for capturing and storing carbon. Physicochemical and hydrodynamic parameters can influence CO₂ fixation by microalgae. In addition, factors, such as salinity and the application of cultivation strategies, may contribute to the increase the biomass productivity and macromolecules in microalgae. Therefore, the present work aimed to increase CO₂ fixation, biomass productivity, and macromolecules into microalgae by means of the study of physicochemical and hydrodynamic parameters, and cultivation strategies. To accomplish this, the work was conducted in four stages, namely: (1) The first stage consisted of the evaluation of the influence of CO₂ concentration on growth, CO₂ fixation, and biomass composition of *Chlorella fusca* LEB 111; (2) The second stage evaluated the addition of sodium chloride (NaCl) in a single-stage (SS) and two-stage (TS) strategy with CO₂ injection on biomass productivity (Px) and macromolecules by *C. fusca* LEB 111. (3) In the third step, we assessed the influence of the CO₂ flow rate on pH control, biomass and lipid productivity, and CO₂ utilization efficiency (E_{CO2}) by *Nannochloropsis gaditana* cultivated in outdoor conditions. (4) In the fourth step, the pH effect on Px and E_{CO2} by *N. gaditana* when cultivated under outdoor conditions was verified. The highest Px (194.3 mg L⁻¹ d⁻¹) and CO₂ fixation (390.9 mg L⁻¹ d⁻¹) results were verified when *C. fusca* was cultivated with 15% CO₂. The supply of the 10% CO₂ to the cultivation resulted in the maximum carbohydrate concentration (31.9% w w⁻¹) in biomass and theoretical ethanol production (14.5 mL 100 gbiomass⁻¹). The addition of 200 mmol L⁻¹ NaCl to the *C. fusca* SS cultivation promoted an increase in carbohydrate productivity in 81.0% compared to the control assay (CA), whereas in TS cultivation, the addition of 15% CO₂ and 100 mmol L⁻¹ of NaCl favored a 33.8% increase in lipid productivity compared to CA. The CO₂ flow rate of 5 L min⁻¹ was selected for pH control in *N. gaditana* cultivation. In this condition was verified E_{CO2} by microalgae of approximately 70% (w w⁻¹) and maximum Px (0.24 g L⁻¹ d⁻¹). The pH 8.0 was considered the optimum for the growth of *N. gaditana* in outdoor conditions, being verified by the maximum Px (0.17 g L⁻¹ d⁻¹) and E_{CO2} (79% w w⁻¹). In view of the above, the importance of determining parameters and cultivation strategies to make the carbon conversion into biomass more efficient was verified, thus contributing to the increase of the application of microalgae for bioenergy production and GHG mitigation.

Keywords: Carbon dioxide. *Chlorella*. Hydrodynamic parameters. *Nannochloropsis*. pH. Two-stage.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1 – Cultivos em duplo estágio com diferentes condições de estresse, efeitos e produtividade de macromoléculas (P_M , $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$)..... 55

CAPÍTULO III

ARTIGO 1 - FIXAÇÃO DE CO_2 POR *Chlorella fusca*: POTENCIAL PARA A MITIGAÇÃO DE GASES DE EFEITO ESTUFA E PRODUÇÃO DE BIOMASSA

Tabela 1 – Resultados de concentração máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$), produtividade máxima de biomassa ($P_{\text{máx}}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e tempo de geração (t_g) dos cultivos de *C. fusca* LEB 111. 74

Tabela 2 - Taxa máxima de fixação de CO_2 ($T_{\text{CO}_2\text{max}}$), eficiência máxima de utilização de CO_2 ($E_{\text{CO}_2\text{max}}$) e concentração de carbono (C) na biomassa de *C. fusca*. 77

Tabela 3 - Resultados de concentração de proteínas, carboidratos e lipídios na biomassa (base seca) de *C. fusca* LEB 111 e produção teórica de etanol (P_{Etanol})..... 78

ARTIGO 2 - CULTIVO DE *Chlorella fusca* EM DUPLO ESTÁGIO COM ADIÇÃO DE CO_2 E NaCl

Tabela 1 - Concentração de proteínas, carboidratos e lipídios na biomassa em base seca de *Chlorella fusca* LEB 111 cultivada com diferentes concentrações de NaCl (mmol L^{-1}) em fotobiorreatores do tipo *Erlenmeyers*. 99

Tabela 2 - Concentração máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$), produtividade máxima de biomassa ($P_{\text{máx}}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), tempo de geração (t_g), concentração de proteínas, carboidratos, lipídios, cinzas (base seca) e produtividade de carboidratos e lipídios na biomassa de *Chlorella fusca* cultivada com NaCl em único estágio (UE). 101

Tabela 3 – Concentração máxima de biomassa ($X_{m\acute{a}x}$), produtividade média de biomassa ($P_{m\acute{e}dia}$), taxa de fixação de CO_2 (T_{CO_2}), eficiência de utilização de CO_2 (E_{CO_2}) e pH médio nos ensaios de *Chlorella fusca* em duplo estágio (DE). 105

Tabela 4 – Concentração de proteínas, carboidratos, lipídios, cinzas (base seca) e produtividade de carboidratos e lipídios para os cultivos de *Chlorella fusca* em DE. 108

ARTIGO 3 – PRODUÇÃO DE *Nannochloropsis gaditana* EM FOTOBIORREATORES TUBULARES EM ESCALA PILOTO: INFLUÊNCIA DA VAZÃO DE CO_2 NO CONTROLE DO pH E NO FORNECIMENTO DE CARBONO

Tabela 1 - Resultados obtidos para os cultivos de *N. gaditana*, concentração e produtividade de lipídios na biomassa da microalga em diferentes vazões de CO_2 131

ARTIGO 4 – AVALIAÇÃO DO EFEITO pH NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Nannochloropsis gaditana* E NO FORNECIMENTO DE CO_2 EM FOTOBIORREATORES TUBULARES

Tabela 1 - Resultados obtidos para os ensaios com *N. gaditana* cultivada com diferentes valores de pH. 150

ANEXOS

Tabela A1 - Concentração dos componentes do meio de cultura BG-11. 193

Tabela A2 – Meio de cultivo composto por água do mar artificial e fertilizantes agrícolas. 195

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 - Dados estimados das emissões de GEE por setores ligados a atividades antropogênicas (2014)	39
Figura 2 – Processo de fotossíntese: reações dependentes e independentes da luz.....	43
Figura 3 – Ciclo de Calvin-Benson: Estágios de fixação de CO ₂ em organismos fotossintéticos	43
Figura 4 – Resultados de produtividade de biomassa de <i>Scenedesmus almeriensis</i> em função do pH	46
Figura 5 – Vista aérea de biorreatores <i>Raceway</i> localizados na Estação experimental <i>Las Palmerillas</i> (Fundação Cajamar, Almería, Espanha)	50
Figura 6 – Fotobiorreator tubular vertical (2 L) (a) e em série (b) empregados no processo de fixação de CO ₂ por microalgas.....	51
Figura 7 – Fotobiorreatores tubulares verticais (3.000 L) (a) e horizontal (3.000 L) (b) empregados na produção de <i>Scenedesmus almeriensis</i> localizados na Estação experimental <i>Las Palmerillas</i> (Fundação Cajamar, Almería, Espanha)	52

CAPÍTULO III

ARTIGO 1 - FIXAÇÃO DE CO₂ POR *Chlorella fusca*: POTENCIAL PARA A MITIGAÇÃO DE GASES DE EFEITO ESTUFA E PRODUÇÃO DE BIOMASSA

Figura 1 – Diagrama esquemático do fotobiorreator tubular vertical	66
Figura 2 - Concentração de biomassa (a) e produtividade de biomassa de <i>C. fusca</i> (b): (●) controle, (+) 0,03% CO ₂ , (□) 5% CO ₂ , (◆)10% CO ₂ e (Δ) 15% CO ₂ (média ± desvio padrão)	73
Figura 3 - Concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID) em função do tempo (a) e frações de CID (HCO ₃ ⁻ e CO ₃ ²⁻) no meio líquido dos ensaios com diferentes concentrações de CO ₂ no 15º d (b) (média ± desvio padrão)	75
Figura 4 – Perfil de pH em função do tempo nos cultivos de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111: (●) controle, (+) 0,03% CO ₂ , (□) 5% CO ₂ , (◆)10% CO ₂ e (Δ) 15% CO ₂ (média ± desvio padrão)	76

Figura 5 - Eletroforese descontínua em gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) comparativa para o perfil proteico da biomassa de *C. fusca* LEB 111 (amostras do 15º d): padrão de proteína (PS); poço 1 - 0,03% de CO₂; poço 2 - controle; poço 3 - 5% de CO₂; poço 4 - 10% de CO₂; poço 5 - 15% de CO₂..... 80

ARTIGO 2 – CULTIVO DE *Chlorella fusca* EM DUPLO ESTÁGIO COM ADIÇÃO DE CO₂ E NaCl

Figura 1 – Diagrama esquemático dos ensaios realizados em fotobiorreatores do tipo *Erlenmeyer* (a) e em fotobiorreatores tubulares verticais (b): (1) cilindro de CO₂ industrial; (2) válvula de abertura do cilindro; (3) manômetro e medidor de vazão; (4) válvula solenoide; (5) mini compressor de ar; (6) conjunto de controladores de vazão; (7) fotobiorreator; (8) amostrador; (9) aspersor de ar ou de CO₂ 93

Figura 2 – Concentração de biomassa (a) e pH (b) em função do tempo para os cultivos de *C. fusca* LEB 111 em diferentes concentrações de NaCl: (●) Controle (sem adição de NaCl), (○) 100 mmol L⁻¹, (▶) 200 mmol L⁻¹, (■) 300 mmol L⁻¹, (◇) 400 mmol L⁻¹, (◆) 500 mmol L⁻¹, (+) 600 mmol L⁻¹ de NaCl (média ± desvio padrão) 98

Figura 3 – Cultivos de *C. fusca* LEB 111 realizados em fotobiorreatores do tipo *Erlenmeyer* com diferentes concentrações de NaCl 99

Figura 4 – Resultados de concentração de biomassa (a) e produtividade de biomassa (b) para os ensaios de *C. fusca* LEB 111 em FBRTv em UE: (●) Controle; (□) 100 mmol L⁻¹ de NaCl; (◆) 200 mmol L⁻¹ de NaCl (média ± desvio padrão)..... 100

Figura 5 -Eletroforese descontínua em gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) comparativa para o perfil proteico dos cultivos controle (a) 100 mmol L⁻¹ (b) e 200 mmol L⁻¹ de NaCl (c) nos tempos de cultivo 0, 3, 6, 9, 12 e 15 d 103

Figura 6 - Resultados de concentração de biomassa (a) e produtividade de biomassa (b) em função do tempo para os cultivos de *C. fusca* LEB 111 em DE: (●) Controle; (□) 15% de CO₂ e 100 mmol L⁻¹ de NaCl; (◆) 15% de CO₂ e 200 mmol L⁻¹ de NaCl (média ± desvio padrão) (linha tracejada indica fim do 1º estágio e o início do 2º estágio) 104

Figura 7 – Resultados de concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID) em função do tempo (a) e frações de CID (HCO₃⁻, CO₃²⁻) (b) no meio líquido dos ensaios cultivados em duplo estágio no 18º d (média ± desvio padrão) 106

ARTIGO 3 – PRODUÇÃO DE *Nannochloropsis gaditana* EM FOTOBIORREATORES TUBULARES EM ESCALA PILOTO: INFLUÊNCIA DA VAZÃO DE CO₂ NO CONTROLE DO pH E NO FORNECIMENTO DE CARBONO

Figura 1 – Diagrama do fotobiorreator tubular com vista lateral.....	121
Figura 2 – Perfis de radiação solar (cinza escuro), oxigênio dissolvido (O.D., cinza claro) e temperatura (preto) para ensaio com vazão de CO ₂ de 1 L min ⁻¹ ao longo de 24 h de cultivo de <i>N. gaditana</i>	126
Figura 3 - Valores de pH (cinza) e de abertura de válvula de CO ₂ (preto) para os cultivos de <i>N. gaditana</i> com vazão de CO ₂ de 1,0 (a), 3,0 (b), 5,0 (c), 8,0 (d) e 20,0 L min ⁻¹ (e).....	128
Figura 4 – Porcentagem de abertura de válvula de CO ₂ (preto) e fornecimento de CO ₂ por hora (QCO ₂) (cinza) no cultivo de <i>N. gaditana</i> com injeção de CO ₂ na vazão de 1,0 L min ⁻¹	129

ARTIGO 4 – AVALIAÇÃO DO EFEITO pH NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Nannochloropsis gaditana* E NO FORNECIMENTO DE CO₂ EM FOTOBIORREATORES TUBULARES

Figura 1 - Diagrama do fotobiorreator tubular com vista lateral.....	143
Figura 2 - Perfis de radiação solar (cinza escuro), oxigênio dissolvido (O.D., cinza claro) e temperatura (preto) para ensaio com pH 8,0 ao longo de 24 h de cultivo de <i>N. gaditana</i>	147
Figura 3 – Valores de pH (cinza) e de abertura de válvula de CO ₂ (preto) para os cultivos de <i>N. gaditana</i> com pH 6,0 (a), 7,0 (b), 8,0 (c), 9,0 (d),10 (e) e produtividade de biomassa em função do pH (f)	149

ANEXOS

Figura A1 – Micrografia da microalga <i>Chlorella fusca</i> LEB 111: (aumento de 1000x)	181
Figura A2 – Cultivo de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 em fotobiorreatores tubulares verticais com injeção de CO ₂	183
Figura A3 – Cultivos para seleção da concentração de cloreto de sódio em fotobiorreatores <i>Erlenmeyers</i> na condição controle, com adição de 100, 200 mmol L ⁻¹ de NaCl (a), 300, 400, 500 e 600 mmol L ⁻¹ de NaCl (b).....	185
Figura A4 – Cultivo em único estágio (UE) em fotobiorreatores tubulares verticais, ensaio controle e com adição 100 e 200 mmol L ⁻¹ de cloreto de sódio	187

Figura A5 – Cultivos em duplo estágio (DE) em fotobiorreatores tubulares verticais, ensaios controle, com adição de 15% CO ₂ e 100 mmol L ⁻¹ de NaCl e 15% CO ₂ e 200 mmol L ⁻¹ de NaCl	187
Figura A6 – Micrografias da microalga <i>Nannochloropsis gaditana</i> : aumento de 400x (a) e de 1000 x (b).....	189
Figura A7 – Fotobiorreatores tubulares em estufa de filme transparente	191

NOMENCLATURA

$\% m m^{-1}$	Concentração percentual em massa
$\% v v^{-1}$	Concentração percentual em volume
C	Carbono elementar (percentual em massa)
CID	Carbono inorgânico dissolvido ($mg L^{-1}$)
CIT	Carbono inorgânico total ($g L^{-1}$)
D	Taxa de diluição (d^{-1})
D_{CO_2}	Demanda de CO_2 pelo cultivo
E_{CO_2}	Eficiência de utilização de dióxido de carbono (percentual em massa)
$E_{CO_2máx}$	Eficiência máxima de utilização de dióxido de carbono (percentual em massa)
FBRT _v	Fotobiorreator tubular vertical
f_{CL}	Concentração de carboidratos e lipídios na biomassa ($mg mg_{biomassa}^{-1}$)
$f_{lipídica}$	Concentração de lipídios na biomassa ($mg mg_{biomassa}^{-1}$)
F _m	Fluorescência máxima
F _v	Fluorescência variável
F _v /F _m	Fluorescência da clorofila
ln	Logaritmo natural
MM _C	Massa molar de carbono ($g mol^{-1}$)
MM _{CO₂}	Massa molar de dióxido de carbono ($g mol^{-1}$)
\dot{m}_{CO_2}	Taxa mássica diária de CO_2 ($mg d^{-1}$)
O.D.	Oxigênio dissolvido
p	Nível de significância
ppm	Partes por milhão
P _{Etanol}	Produção teórica de etanol ($mL 100 g^{-1}$ de biomassa).
pH	Potencial hidrogênio iônico ($mol L^{-1}$)
P _{Lipídica}	Produtividade lipídica ($mg L^{-1} d^{-1}$)
P _M	Produtividade de carboidratos e lipídios ($mg L^{-1} d^{-1}$)
P _x	Produtividade volumétrica de biomassa ($mg L^{-1} d^{-1}$ ou $g L^{-1} d^{-1}$)
P _{máx}	Produtividade volumétrica máxima de biomassa ($mg L^{-1} d^{-1}$)
P _{média}	Produtividade volumétrica média de biomassa ($mg L^{-1} d^{-1}$)

Q_{CO_2}	Vazão de dióxido de carbono ($L h^{-1}$)
R^2	Coefficiente de determinação
SAT	Saturação do ar (%)
t	Tempo (d)
t_0	Tempo inicial (d)
T_{CO_2}	Taxa de fixação de dióxido de carbono ($mg L^{-1} d^{-1}$)
$T_{CO_2máx}$	Máximo valor da taxa de fixação de dióxido de carbono ($mg L^{-1} d^{-1}$)
t_g	Tempo de geração ou tempo de duplicação celular (d)
$V_{útil}$	Volume útil do fotobiorreator (L)
X_b	Concentração de biomassa ($g L^{-1}$)
$X_{máx}$	Concentração máxima de biomassa ($g L^{-1}$)
X_0	Concentração de biomassa inicial ($g L^{-1}$)
X_t	Concentração de biomassa no tempo t ($g L^{-1}$)
X_{cbm}	Fração mássica de carbono elementar determinado na biomassa
$R_{CO_2/biomassa}$	Razão entre o fornecimento de dióxido de carbono e a produção de biomassa ($g CO_2 g biomassa^{-1}$)
$\mu_{máx}$	Velocidade específica máxima de crescimento (d^{-1})

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	29
1 INTRODUÇÃO	31
2 OBJETIVOS	35
2.1 GERAL	35
2.2 ESPECÍFICOS	35
CAPÍTULO II	37
3 REVISÃO DA LITERATURA	39
3.1 EMISSÕES DE GASES DE EFEITO ESTUFA E O AQUECIMENTO GLOBAL	39
3.2 MICROALGAS: APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS	40
3.3 FIXAÇÃO DE CO ₂ POR MICROALGAS	42
3.3.1 Fotossíntese: processo metabólico de fixação de CO₂	42
3.3.2 Fatores que influenciam a fixação de CO₂ por microalgas	44
3.3.2.1 Concentração e vazão de CO ₂	44
3.3.2.2 pH	45
3.3.2.3 Temperatura.....	47
3.3.2.4 Luz.....	48
3.3.2.5 Biorreatores	49
3.4 ESTRATÉGIAS DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE MACROMOLÉCULAS ...	52
3.4.1 Salinidade	53
3.4.2 Duplo estágio	54
3.5 HISTÓRICO DA LINHA DE PESQUISA EM QUE A TESE ESTÁ INSERIDA	55
CAPÍTULO III	57
4 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	59
ARTIGO 1	61
1 INTRODUÇÃO	65
2 MATERIAL E MÉTODOS	66
2.1 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO	66
2.2 FOTOBIORREATOR E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	66
2.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	67
2.4 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA	69
2.5 PERFIL PROTEICO	70
2.6 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO.....	70

2.7 PARÂMETROS DE FIXAÇÃO DE CO ₂	71
2.8 CONVERSÃO TEÓRICA DE CARBOIDRATOS EM ETANOL	72
2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	72
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
4 CONCLUSÃO	81
ARTIGO 2	87
1 INTRODUÇÃO	91
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	92
2.1 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO	92
2.2 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	92
2.2.1 Seleção da concentração de cloreto de sódio e ensaios em único estágio	92
2.2.2 Ensaios em duplo estágio	94
2.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	94
2.3.1 Concentração de biomassa	94
2.3.2 pH e carbono inorgânico dissolvido	94
2.4 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA	95
2.5 PERFIL PROTEICO	95
2.6 RESPOSTAS AVALIADAS	96
2.6.1 Parâmetros de crescimento	96
2.6.2 Parâmetros de fixação de CO₂	96
2.6.3 Produtividade das macromoléculas.....	97
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	97
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
3.1 SELEÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE NaCl E CULTIVO EM ÚNICO ESTÁGIO	97
3.2 CULTIVOS DE <i>Chlorella fusca</i> EM DUPLO ESTÁGIO	104
4. CONCLUSÃO	109
ARTIGO 3	115
1 INTRODUÇÃO	119
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	120
2.1. MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO	120
2.2 FOTOBIORREATOR TUBULAR.....	121
2.3 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	122
2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	122
2.5 RECUPERAÇÃO E COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA	123

2.6 RESPOSTAS AVALIADAS.....	123
2.6.1 Produtividade de biomassa	124
2.6.2 Demanda de CO₂	124
2.6.3 Eficiência de utilização de CO₂	124
2.6.4 Razão entre o fornecimento de CO₂ e a produção de biomassa.....	124
2.6.5 Concentração e produtividade lipídica.....	125
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	125
4 CONCLUSÃO.....	133
ARTIGO 4.....	137
1 INTRODUÇÃO	141
2 MATERIAL E MÉTODOS	142
2.1. MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO	142
2.2. PROPAGAÇÃO DO INÓCULO	142
2.3 FOTOBIOREATOR TUBULAR E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	142
2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	144
2.5 RESPOSTAS AVALIADAS.....	145
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	146
4 CONCLUSÃO.....	152
CAPÍTULO IV.....	157
5 CONCLUSÃO GERAL	159
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	161
CAPÍTULO V	163
ANEXOS	179

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A ação antropogênica a partir da revolução industrial causou grande influência sobre as mudanças climáticas sentidas no período contemporâneo. Este fato se deve às excessivas emissões de gases de efeito estufa (GEE) para a atmosfera, causadas principalmente pela industrialização e o uso de combustíveis fósseis (ZHU et al., 2017). Entre os GEE emitidos, o dióxido de carbono (CO₂) tem sido apontado como o principal intensificador do aquecimento global (IPCC, 2014).

Diante disso, estratégias para a redução da concentração de CO₂ na atmosfera são assuntos pesquisados em plena expansão. Nesse sentido, abordagens são propostas para a redução deste GEE na atmosfera, tal como armazenamento, absorção e adsorção por meios geológicos, químicos e biológicos (ZHOU et al., 2017). Entre essas, a fixação biológica de CO₂ por microalgas tem sido considerada um método promissor em processos de pós-combustão, captura e armazenamento de CO₂. As microalgas apresentam elevada capacidade de fixar e armazenar o carbono pela fotossíntese, convertendo na presença de luz o CO₂ e água em compostos orgânicos, sem consumo de energia adicional e poluição secundária (ZHAO; SU, 2014).

Diversos parâmetros podem influenciar a fixação de CO₂ pelas microalgas, os quais necessitam ser avaliados e ao mesmo tempo otimizados a fim de melhorar a eficiência do processo. Os parâmetros podem ser classificados em três categorias, tais como biológicos (espécie da microalga), físico-químicos (temperatura, luz, pH, concentração do inóculo e de nutrientes) e hidrodinâmicos (vazão, taxa de mistura e transferência de massa) e adicionalmente a configuração do fotobiorreator (YADAV; SEN, 2017).

Com relação as espécies de microalga, cepas como *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Spirulina* e *Nannochloropsis* apresentaram potencial para mitigar CO₂ (SINGH; SINGH, 2014). Entre essas podemos destacar a cepa *Chlorella fusca* LEB 111, a qual foi isolada em lagoas de sedimentação de cinzas da Usina Termelétrica Presidente Médici. Esta cepa nativa apresentou resultados promissores quanto a fixação de CO₂ e produção de biomassa quando cultivada com gás de combustão do carvão mineral (DUARTE et al. 2017a). *Nannochloropsis gaditana* é uma microalga encontrada naturalmente no Mar Mediterrâneo, com elevado teor de lipídios em sua composição, apresentando potencial para a produção de biodiesel (CAMACHO-RODRÍGUEZ et al. 2015).

O carbono na biomassa microalgal pode representar entre 30 e 50% da massa seca (ACIÉN et al., 2017). As fontes habituais de carbono empregadas podem ser o CO₂ atmosférico, fixado quimicamente na forma de carbonatos solúveis (NaHCO₃ e Na₂CO₃) ou proveniente de gases de combustão (5-15% de CO₂) (ACIÉN et al., 2017; WANG et al., 2008). Estima-se que para a produção de 1,0 kg de biomassa microalgal são necessários cerca de 1,8 kg de CO₂, podendo esse representar até 30% dos custos de produção de microalgas (ACIÉN et al., 2012a). A concentração de CO₂ na corrente gasosa e a vazão de alimentação não só podem influenciar a disponibilidade da fonte de carbono para os cultivos, afetando diretamente a produtividade e a composição da biomassa produzida, como também o pH (DUARTE-SANTOS et al., 2016; MORAES et al., 2016).

O CO₂ pode ser fornecido como fonte de carbono aos cultivos na forma pura, alimentado por meio de vazões baixas ou até mesmo na forma de misturas e gases de combustão, em vazões mais elevadas. Nesse sentido, independentemente do tipo de fornecimento empregado, este deve ser adequadamente projetado para maximizar a eficiência de utilização de CO₂ pelas microalgas, minimizar as variações de pH do cultivo, bem como reduzir as perdas para a atmosfera (ACIÉN et al., 2017).

O pH é um parâmetro que pode afetar significativamente o crescimento e a taxa de fixação de CO₂ por microalgas por meio de modificações nas atividades metabólicas e a distribuição de nutrientes do meio de cultivo. O valor ou intervalo ótimo de pH pode variar de acordo com a espécie da microalga (ZHOU et al., 2017). Entre os métodos aplicados para o controle deste parâmetro, destaca-se a injeção de CO₂, que além de promover a manutenção do pH no valor ótimo, também é fonte de carbono para os cultivos (GROBBELAAR, 2013).

A fixação de CO₂ por microalgas, além de contribuir para a redução deste GEE na atmosfera é acompanhada pela produção de biomassa, a qual possui ampla aplicabilidade na alimentação humana, animal, cosméticos, biomateriais, fertilizantes, bem como na produção de biocombustíveis (COSTA; MORAIS, 2011; MORAIS et al., 2016; PIRES et al., 2012). Todavia, é importante destacar que mesmo que as microalgas convertam o CO₂ de forma eficiente, outros fatores podem influenciar a composição da biomassa, principalmente compostos de reserva, como lipídios e carboidratos.

Neste sentido, podem ser empregadas estratégias de cultivo que promovam condições de estresse nas microalgas, com o objetivo de desencadear a biossíntese de compostos de reserva do metabolismo microalgal. Entre as condições estudadas, podemos citar a restrição de nitrogênio, aumento da iluminância e temperatura, incremento da salinidade do meio e estratégias de cultivo, como o modo em duplo estágio (CHEN et al., 2017). Este modo

de cultivo vem sendo sugerido para aumentar a produtividade das macromoléculas nas células microalgais. Para tal são aplicados dois estágios de cultivo, sendo o primeiro para a produção de biomassa, seguido pela fase de estresse, na qual ocorre o acúmulo dos compostos de reserva (PANCHA et al., 2015; RA et al., 2015).

Diante do exposto, a presente tese teve como objetivo aumentar a fixação de CO₂ por microalgas por meio do estudo de parâmetros físico-químicos e hidrodinâmicos, bem como avaliar o desenvolvimento de estratégias de cultivo para aumentar a produtividade de biomassa e de macromoléculas.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

O presente trabalho teve como objetivo aumentar a fixação de CO₂, produtividade de biomassa e macromoléculas de microalgas mediante o estudo de parâmetros físico-químicos, hidrodinâmicos e estratégias de cultivo.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência de diferentes concentrações de CO₂ nos parâmetros de crescimento, perfil proteico, fixação de CO₂ e composição da biomassa nos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111;

- Cultivar *Chlorella fusca* LEB 111 em modo de duplo estágio mediante a aplicação de processo integrado com injeção de CO₂ e adição de NaCl para aumentar a produtividade de biomassa e de macromoléculas;

- Determinar a influência de diferentes vazões de CO₂ no controle de pH, eficiência de utilização de CO₂ e nas produtividades de biomassa e lipídica de *Nannochloropsis gaditana*, quando cultivada em fotobiorreatores tubulares em escala piloto;

- Verificar o efeito do pH no crescimento e na capacidade de utilização de CO₂ por *Nannochloropsis gaditana* cultivada em fotobiorreatores tubulares em condições *outdoor*.

CAPÍTULO II

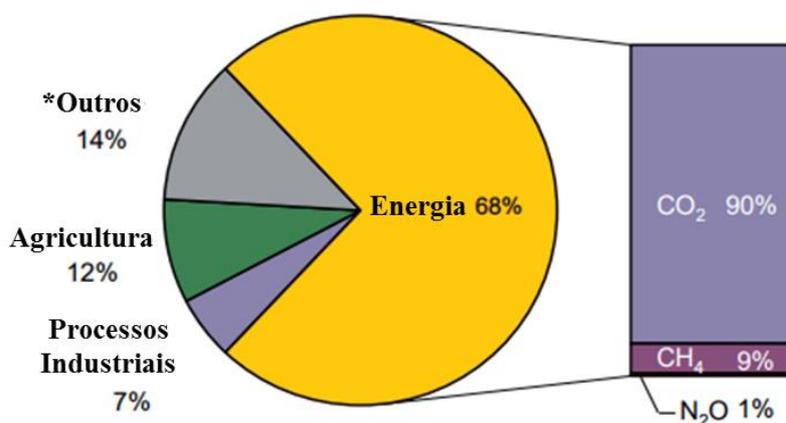
3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 EMISSÕES DE GASES DE EFEITO ESTUFA E O AQUECIMENTO GLOBAL

O aumento das emissões antropogênicas de gases de efeito estufa (GEE) desde a era pré-industrial até o período contemporâneo, em grande parte é atribuído ao crescimento econômico e demográfico. Os efeitos das emissões, bem como outros fatores antropogênicos, foram detectados em todo o sistema climático, sendo muito provável que tenham sido a principal causa do aquecimento terrestre observado a partir da segunda metade do século XX. As projeções indicam que o aumento da temperatura da superfície irá perdurar ao longo do século XXI, e em consequência disso as mudanças climáticas podem ser intensificadas, como ondas de calor mais frequentes, aumento de precipitações, acidificação e aumento do nível dos oceanos (IPCC, 2014).

Segundo dados divulgados pela *International Energy Agency* é notável que entre as atividades antropogênicas, o setor de energia é responsável pela maior parcela das emissões de GEE, enquanto que as menores correspondem a agricultura (como criação de gado e cultivo de arroz) e aos processos industriais não ligados ao setor energético (Figura 1). Do montante das emissões de GEE, 90% é representada pelo CO₂ (IEA, 2017). De acordo com o monitoramento realizado pela Administração Nacional Oceânica e Atmosférica dos Estados Unidos (NOAA), a concentração de CO₂ na atmosfera tem aumentado em média 2 ppm por ano na última década. Em 2017, o valor médio no mês de outubro já havia atingido valores de 403,96 ppm (DLUGOKENCKY; TANS, 2018).

Figura 1 - Dados estimados das emissões de GEE por setores ligados a atividades antropogênicas (2014)



Fonte: Adaptado de IEA (2017)

Devido aos impactos ambientais e sociais causados pelo aquecimento terrestre, nos últimos anos este tema tornou-se uma questão internacionalmente importante nos campos da ciência, meio ambiente, economia e política (ZHAO; SU, 2014). Neste contexto, estratégias de armazenamento e sequestro de CO₂ têm sido investigadas a fim de reduzir os níveis deste GEE na atmosfera. Estas incluem métodos físicos, tais como separação por membranas, injeção de CO₂ em reservatórios geológicos e oceanos; químicos como a adsorção e absorção; e biológicos como o reflorestamento (incorporação do CO₂ atmosférico por meio da fotossíntese das plantas superiores), fertilização dos oceanos (crescimento de organismos fotossintéticos desencadeado pela adição de fontes extras de ferro) e cultivo de microalgas (ZHOU et al., 2017).

3.2 MICROALGAS: APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

As microalgas são organismos unicelulares, microscópicos (2-200µm) que por meio da fotossíntese utilizam CO₂, água, luz solar e sais inorgânicos para o seu crescimento (RAZZAK et al., 2013). Estes micro-organismos podem ser classificados em quatro principais grupos: (1) Cyanophyta (cianobactérias), procarióticas, possuem clorofila *a* e ficobiliproteínas; (2) Chlorophyta (algas verdes), eucarióticas, possuem clorofila *a* e *b* e são capazes de armazenar amido no interior dos cloroplastos; (3) Glaucophyta (eucarióticas); (4) Rhodophyta (algas vermelhas), também eucarióticas, possuem clorofila *a* e ficobiliproteínas, sem células flageladas e capazes de armazenar amido das florídeas como produto de reserva (LEE, 2008).

Microalgas podem estar presentes tanto em ambientes aquáticos (água doce ou marinha), quanto em terrestres, sendo estimado a existência de mais de 50.000 espécies, embora apenas 30.000 destas foram isoladas e analisadas (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

A biomassa microalgal é composta principalmente por proteínas, carboidratos e lipídios, sendo que as concentrações destas macromoléculas podem variar em função das espécies das microalgas e das condições de cultivo aplicadas. Segundo relatado por Hu (2013), fatores ambientais, tais como luz, temperatura, nutrientes e salinidade no meio não só podem afetar o crescimento, como também a composição da biomassa.

O elevado conteúdo proteico presente nas microalgas faz com que elas sejam consideradas fontes de proteína (HAYES et al., 2017). Microalgas como *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* e *Spirulina maxima* podem alcançar valores de proteínas de até 58, 56 e 71% em massa seca, respectivamente (BECKER, 2004). As proteínas além de serem utilizadas na alimentação humana e animal, podem também ser empregadas como fertilizantes, enzimas industriais, bioplásticos e tensoativos (TRIVEDI et al., 2015).

Quanto ao teor de carboidratos, as microalgas podem conter entre 8 a 64% (m m^{-1}) (BECKER, 2004). Nas células microalgais, os carboidratos acumulam-se como materiais de reserva (amido) ou constituintes da parede celular (celulose) (TRIVEDI et al., 2015). Neste sentido, a biomassa microalgal pode ser considerada matéria-prima promissora para produção de bioetanol (MORAIS et al., 2016). Estudos relataram que modificações nas condições de cultivo, como a privação da fonte nitrogênio e fósforo (MARGARITES; COSTA, 2014), elevadas concentrações de CO_2 , uso de pentoses no meio de cultivo (FREITAS; MORAIS; COSTA, 2017a,b), bem como o aumento da salinidade (PANCHHA et al., 2015), podem estimular o acúmulo de carboidratos em microalgas.

Os lipídios na sua grande maioria são constituídos por ácidos graxos, e essas macromoléculas podem ser classificadas em duas principais categorias: (1) lipídios neutros que correspondem aos acilgliceróis e ácidos graxos livres e (2) lipídios polares que podem ser subcategorizados em fosfolipídios e glicolipídios. Os lipídios neutros nas microalgas são utilizados como armazenamento de energia (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012), enquanto os lipídios polares são importantes constituintes da membrana externa, membrana dos cloroplastos e do retículo endoplasmático (PANCHHA et al., 2014). Cabe ressaltar que alguns tipos de lipídios neutros presentes nas microalgas não contêm em sua composição ácidos graxos, entre eles hidrocarbonetos, esteróis, cetonas e pigmentos (carotenos e clorofilas) (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012).

O conteúdo e a composição dos lipídios presentes nas microalgas podem variar de acordo com a espécie, com as fases de crescimento e com as condições de cultivo. Estima-se que a concentração de lipídios pode atingir até 77% (m m^{-1}) da massa seca (CHISTI, 2007). Modificações nas condições de cultivos podem acarretar no aumento do conteúdo lipídico das células microalgais, entre elas pode-se citar a privação de nitrogênio, temperatura, concentração da fonte de carbono e salinidade (CHOKSHI et al., 2015; PANCHHA et al., 2014; TANG et al., 2011). Entre as principais aplicações dos lipídios de microalgas pode-se citar a produção de biodiesel e extração de ácidos graxos poli-insaturados (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; VANTHOOR-KOOPMANS et al., 2013).

Além das aplicações da biomassa como fonte de alimentos, cosméticos, fármacos, produtos para agricultura, compostos bioativos (pigmentos, ácidos graxos poli-insaturados e peptídeos) e na produção de vetores energéticos, as microalgas também podem ser empregadas no tratamento de águas residuais, biossorção de metais pesados e na fixação de CO_2 (REIS; GOUVEIA, 2013).

3.3 FIXAÇÃO DE CO₂ POR MICROALGAS

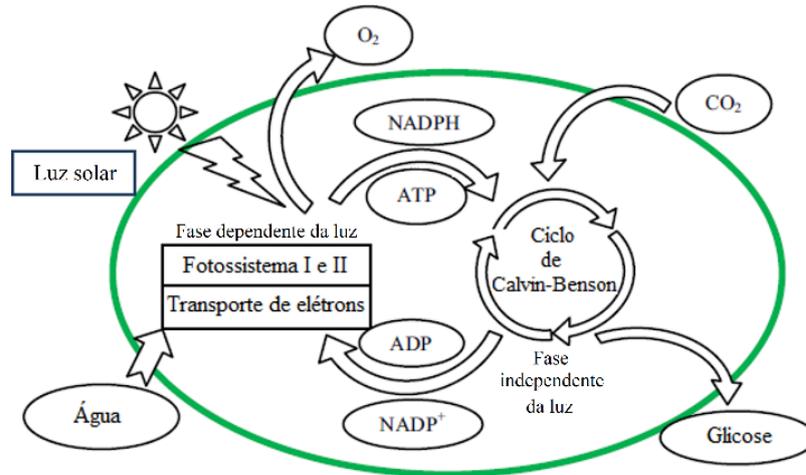
Diante dos problemas ambientais causados pelas emissões excessivas de gases de efeito estufa (GEE), as microalgas têm sido consideradas um potencial método para a redução dos níveis destes gases na atmosfera (ZHAO; SU, 2014). A utilização de microalgas no processo de fixação de CO₂ apresenta vantagens, devido a elevada taxa fotossintética e de crescimento comparadas as plantas terrestres (WANG et al., 2008). Estes micro-organismos fotossintéticos possuem capacidade de fixar tanto baixas, quanto altas concentrações de CO₂ (a partir de gases de combustão) (DUARTE et al., 2017a; MORAIS; COSTA, 2007a; VAZ; COSTA; MORAIS, 2016b) e podem ser cultivados em ambientes adversos, como meios altamente salinos e alcalinos. Além disso, o cultivo de microalgas pode ser realizado em terras não aráveis, desta maneira não competindo com culturas alimentares (CHISTI, 2007; SHEEHAN et al., 1998). A biomassa microalgal produzida mediante a conversão de carbono pode ser utilizada na produção de bioenergia e de produtos de alto valor agregado, representando benefício adicional ao processo (ZHAO; SU, 2014).

3.3.1 Fotossíntese: processo metabólico de fixação de CO₂

A fotossíntese é o processo metabólico realizado por plantas terrestres e por micro-organismos fotossintéticos, como por exemplo microalgas. É composta por uma série de complexas reações redox, durante as quais a energia luminosa é absorvida por pigmentos, principalmente clorofila, sendo convertida em energia química. Isto resulta na produção de oxigênio e carboidratos, bem como outros metabólitos secundários (TEBBANI et al., 2014). A fotossíntese essencialmente engloba dois processos: reações dependentes da luz e reações independentes da luz ou de assimilação de carbono (Figura 2) (CAMPBELL; FARRELL, 2011).

As reações da fotossíntese dependentes da luz ocorrem nas membranas tilacoides, as quais são realizadas por dois fotossistemas diferentes, ambos contendo um centro de reação. No fotossistema II ocorre a oxidação da água para produzir o oxigênio. A reação de redução do NADP⁺ a NADPH ocorre no fotossistema I. Os fotossistemas operam em série conectados por uma cadeia transportadora de elétrons, geralmente visualizados no chamado esquema Z (MASOJÍDEK; TORZILLO; KOBLÍŽEK, 2013). A produção de ATP é vinculada ao transporte de elétrons em um processo semelhante à produção de ATP pelo transporte mitocondrial de elétrons (CAMPBELL; FARRELL, 2011).

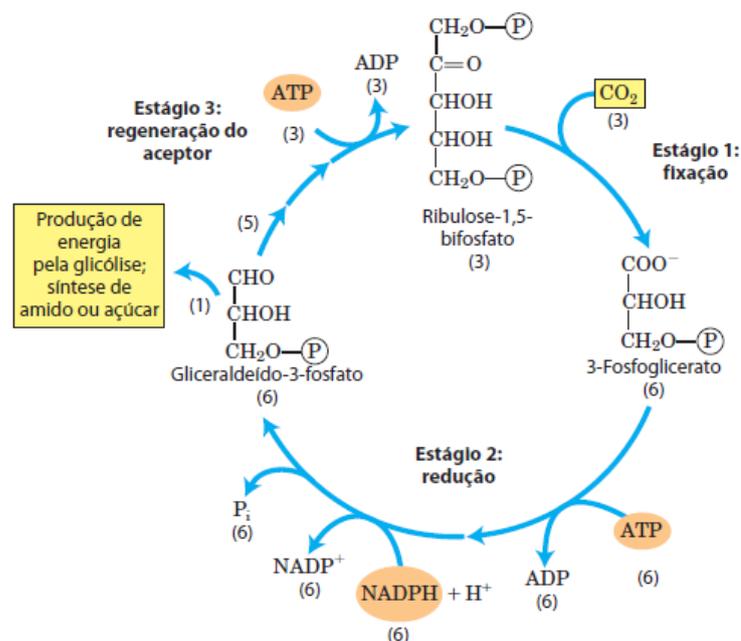
Figura 2 – Processo de fotossíntese: reações dependentes e independentes da luz



Fonte: Adaptado de Cheah et al. (2015)

A fixação do dióxido de carbono ocorre na fase independente da luz, utilizando NADPH e ATP produzidos na fase dependente da luz. A fim de fixar uma molécula de CO_2 , duas moléculas de NADPH e três de ATP são necessárias (NELSON; COX, 2014). A conversão de CO_2 em carboidratos ocorre por via cíclica completa, em três estágios distintos, denominado ciclo de Calvin (CAMPBELL; FARRELL, 2011; NELSON; COX, 2014).

Figura 3 – Ciclo de Calvin-Benson: Estágios de fixação de CO_2 em organismos fotossintéticos



Fonte: Nelson e Cox (2014)

No estágio 1 ocorre a fixação de CO₂ em 3-fosfoglicerato. A enzima que catalisa a incorporação do CO₂ em forma orgânica é a ribulose-1,5-bifosfato-*carboxilase/oxigenase* (Rubisco). No estágio 2 o 3-fosfoglicerato formado no estágio 1 é convertido em gliceraldeído-3-fosfato. No estágio 3 ocorre a regeneração da ribulose-1,5-bifosfato a partir das trioses-fosfato (Figura 3) (NELSON; COX, 2014). Os principais produtos da fotossíntese são os carboidratos, mas ácidos graxos, aminoácidos e ácidos orgânicos também podem ser sintetizados no processo de fixação de CO₂. Condições de cultivo, como intensidade luminosa, concentrações de CO₂, O₂ e nutrientes podem influenciar a formação de produtos na fotossíntese (MASOJÍDEK; TORZILLO; KOBLÍŽEK, 2013).

3.3.2 Fatores que influenciam a fixação de CO₂ por microalgas

A fixação de CO₂ por microalgas pode ser influenciada por diversos parâmetros como espécie da microalga, físico-químicos (pH, temperatura, intensidade de luz, nutrientes, concentração inicial do inóculo e poluentes tóxicos dos gases de combustão), parâmetros hidrodinâmicos (vazão, taxa de mistura e transferência de massa) (ZHAO; SU, 2014; YADAV; SEN, 2017) e configuração do biorreator (CHEAH et al., 2015; PIRES et al., 2012).

Os tópicos descritos a seguir abordarão os principais aspectos que influenciam o processo de fixação de CO₂ por microalgas, estes relacionados com o presente trabalho de tese.

3.3.2.1 Concentração e vazão de CO₂

O carbono é o principal constituinte das microalgas, representando entre 30 e 50% da massa seca das células. A fonte de carbono pode ser fornecida ao cultivo pela adição de bicarbonato e carbonato ao meio de cultura ou pela injeção de CO_{2(g)} (ar atmosférico 0,03%, puro, misturas com ar ou proveniente de gases de combustão). Quando o CO_{2(g)} é fornecido aos cultivos, deve-se levar em consideração que apenas o carbono que foi eficientemente transferido para a fase líquida é a fração que está disponível para o consumo das células. Ao ser injetado, o CO₂ reage com o meio líquido e é transformado em ácido carbônico (H₂CO₃), bicarbonato (HCO₃⁻) ou carbonato (CO₃²⁻) de acordo com o pH do meio (ACIÉN et al., 2017).

Ao longo dos anos diversos estudos vêm sendo realizados para investigar os efeitos das concentrações e vazões de CO₂ no cultivo de microalgas. Estes levam em consideração fatores como tolerância das cepas, produtividade e composição bioquímica da biomassa, aspectos de transferência de massa, a fim de melhorar a eficiência do processo (DUARTE-SANTOS et al., 2016; FAN et al., 2007; MAEDA et al., 1995; MORAIS; COSTA, 2007a,

2007b, ROSA et al., 2011, Rosa et al., 2016; TANG et al., 2011; TOLEDO-CERVANTES et al., 2013).

Tang et al. (2011) em cultivos de *Chlorella pyrenoidosa* SJTU-2 relataram que o aumento da concentração de CO₂ (0,03 para 50% v v⁻¹) causou a redução do pH de 8,7 para 5,2. A redução do pH devido a injeção de CO₂ é um aspecto que necessita ser avaliado no cultivo de microalgas. Quando elevadas concentrações ou vazões de CO₂ são fornecidas aos cultivos, pode ocorrer o decréscimo do pH, prejudicando a atividade de enzimas envolvidas no processo de fixação de CO₂.

Moraes et al. (2016) avaliaram o efeito de diferentes vazões de CO₂ em fotobiorreatores tubulares verticais na fixação de CO₂ e composição da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18. Os autores verificaram que o uso de menor vazão (0,085 L min⁻¹), está enriquecida com 12% (v v⁻¹) de CO₂, resultou em maior eficiência de fixação de CO₂ (80,1% m m⁻¹) e elevado conteúdo proteico na biomassa (78,6% m m⁻¹).

A utilização de CO₂ a partir de gases de combustão vem sendo investigada como potencial fonte de carbono para o cultivo de microalgas (COSTA et al., 2015; DUARTE; FANKA; COSTA, 2016; DUARTE et al., 2017a; DUARTE; COSTA, 2017b; RADMANN et al., 2011; VAZ; COSTA; MORAIS, 2016b). A composição destes gases pode variar de acordo com a matriz empregada na combustão para a geração de energia. A queima do carvão mineral pode emitir gases contendo concentrações entre 5 e 15% de CO₂ (US DOE, 2010). Duarte et al. (2017a) verificaram que *Chlorella fusca* LEB 111 apresentou potencial para fixar CO₂ a partir de gases de combustão da queima do carvão mineral, este contendo 10% de CO₂ e injetado a uma vazão de 0,05 vvm. Nesta condição experimental, o cultivo com esta microalga atingiu resultados máximos de produtividade de biomassa e fixação diária de CO₂ de 80 mg L⁻¹ d⁻¹ e 360,1 mg L⁻¹ d⁻¹, respectivamente.

3.3.2.2 pH

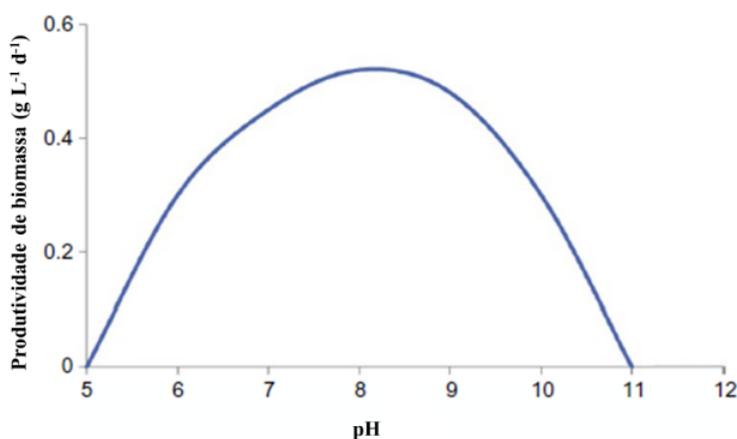
O pH ideal para a maioria das microalgas encontra-se no intervalo entre 7,0 e 9,0 (WANG; LAN; HORSMAN, 2012), enquanto gêneros como *Spirulina* apresentam melhores taxas de crescimento entre 9,0 e 10,0 (VONSHAK, 1997). Este parâmetro físico-químico pode influenciar a disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo, bem como afetar o crescimento das microalgas por meio de alterações nas rotas metabólicas, influenciando assim a absorção de nutrientes pelas células (ZHOU et al., 2017). Segundo Zhao e Su (2014), a enzima Rubisco pode ter sua atividade inibida em pH baixo, afetando o processo de fixação de CO₂.

As variações do pH nos cultivos microalgais são resultados das reações envolvidas no consumo de espécies de carbono e nitrogênio do meio de cultivo (ACIÉN et al., 2017). Um exemplo disso, é o aumento do pH durante a fotossíntese, devido a fixação de CO₂ e o acúmulo de íons OH⁻ no meio líquido (GROBBELAAR, 2013). Quando o pH do cultivo é elevado pode limitar a disponibilidade de CO₂, e assim inibir o crescimento celular. No entanto, o pH elevado pode suprimir a contaminação do cultivo com outros micro-organismos (CHEN; DURBIN, 1994).

O controle do pH no cultivo de microalgas pode ser realizado mediante a adição de tampões, ácidos e álcalis (BARTLEY et al., 2014; LOURENÇO, 2006), sendo estes mais aplicados em escala de bancada, quando pequenos volumes são utilizados (LOURENÇO, 2006). Em cultivos em grande escala, o controle do pH é realizado por meio da adição de CO₂, o qual pode ser injetado puro ou incorporado (1-5% v v⁻¹) com ar. Outra potencial fonte de CO₂ é a utilização de gases de combustão (5-15% de CO₂) (ACIÉN et al., 2017). Neste sentido, o CO₂ além de manter o pH na faixa ideal para o crescimento das microalgas, também pode ser utilizado como fonte de carbono pelas células (LOURENÇO, 2006).

Sánchez et al. (2008) verificaram a influência do pH no crescimento e na eficiência fotossintética de *Scenedesmus almeriensis*. O controle do pH dos cultivos foi realizado mediante a injeção de CO₂ puro por demanda. Os autores observaram o maior resultado de produtividade de biomassa (Figura 4) quando *S. almeriensis* foi cultivada em pH 8,0.

Figura 4 – Resultados de produtividade de biomassa de *Scenedesmus almeriensis* em função do pH



Fonte: Adaptado de Acién et al. (2017)

Qiu et al. (2017) avaliaram o efeito do controle do pH em diferentes valores (6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5) por meio da injeção de CO₂ em cultivos de *Chlorella sorokiniana*. Os autores verificaram máxima produtividade de biomassa em pH 6,5 (6,51 g d⁻¹), com adição de 13,32 gCO₂ g_{biomassa}⁻¹, resultando em custo de produção de 200\$ ton⁻¹ de biomassa. No entanto, em pH 8,0 a produtividade de biomassa foi menor (4,62 g d⁻¹), contando com a adição de 2,01 gCO₂ g_{biomassa}⁻¹ e custo de produção de 30\$ ton⁻¹ de biomassa, sendo considerada a condição mais rentável quanto ao fornecimento de CO₂.

3.3.2.3 Temperatura

A temperatura é considerada um dos fatores que não só influencia a fixação de CO₂ pelas microalgas, mas também a dissolução deste gás no meio líquido. Quanto a solubilidade do CO₂ no meio líquido, segundo a Lei de Henry essa diminui com o aumento da temperatura e redução da pressão. Com relação a atividade fotossintética das microalgas, tanto temperaturas baixas quanto elevadas não favorecem a fixação de CO₂ e a produção de biomassa (YADAV; SEN, 2017).

Segundo Zhou et al. (2017), a faixa ideal de temperatura para o cultivo de microalgas pode variar entre 15 e 30°C. No entanto, algumas espécies podem apresentar tolerância à elevadas temperaturas. Maeda et al. (1995) avaliando o desempenho de *Chlorella* sp. T-1 frente a diferentes temperaturas, verificaram que o valor ideal para o cultivo da cepa foi 35°C, embora esta apresentou crescimento até 40°C. Os autores também ratificaram a importância da seleção de cepas que possuam tolerância a condições adversas de cultivo (elevadas concentrações de CO₂ e temperatura), a fim de ampliar a aplicação de microalgas na mitigação de gases de combustão.

Em cultivos microalgais, a temperatura aumenta principalmente devido à absorção de calor por radiação proveniente da fonte de luz utilizada (ACIÉN et al., 2017). Neste sentido, o controle de temperatura é importante, a fim de garantir elevadas taxas de crescimento. Nos cultivos em condições *indoor*, o controle pode ser realizado utilizando salas climatizadas isoladas termicamente (LOURENÇO, 2006). Em condições *outdoor*, em reatores em grande escala, o fornecimento de calor pela radiação solar é alto, podendo ocasionar o superaquecimento das culturas (sistemas fechados) (BOSMA et al., 2007). Diante disso, se faz necessário o emprego de sistemas para o controle da temperatura em uma faixa favorável para o crescimento (WANG; LAN; HORSMAN, 2012). Entre os métodos empregados, podemos citar a pulverização com água, imersão do reator em meio líquido, sombreamento ou

incorporação de trocadores de calor no fotobiorreator (ACIÉN et al., 2017; WANG; LAN; HORSMAN, 2012).

3.3.2.4 Luz

A luz é considerada o fator mais importante que influencia diretamente o crescimento e a produtividade de biomassa por micro-organismos fotossintéticos (RICHMOND, 2013). As fontes de luz utilizadas em cultivos microalgais podem ser divididas em duas categorias, tais como: luz solar natural, a qual é utilizada como fonte de energia por cultivos *outdoor* (reatores abertos ou fechados) e a luz artificial, que é principalmente aplicada em cultivos *indoor* (sistemas fechados). O efeito deste parâmetro em cultivos microalgais é avaliado por meio da intensidade luminosa e pelos ciclos de luz (claro: escuro) (ZHAO; SU, 2014).

Como supracitado, o crescimento das microalgas não só é influenciado pela disponibilidade de luz, mas também pelo uso eficiente dessa forma de energia. Quando o fornecimento de luz ocorre de maneira inadequada, este pode comprometer a produtividade de biomassa, mesmo que as demais condições de cultivo estejam fixadas em seus valores ótimos (TEBBANI et al., 2014).

Fatores como intensidade luminosa, profundidade do cultivo e concentração celular podem influenciar os níveis de radiação incidente em cultivos microalgais (ACIÉN et al., 2017). Em cultivos submetidos a baixas intensidades luminosas, ou até mesmo com elevada concentração de biomassa pode ocorrer o fenômeno de fotolimitação, no qual a radiação incidente é insuficiente para manutenção do crescimento (TEBBANI et al., 2014; ZHAO; SU, 2014). Por outro lado, quando microalgas são expostas a elevadas intensidades luminosas, pode ocorrer a redução da atividade fotossintética das células pelo excesso de luz, fenômeno este denominado como fotoinibição (ACIÉN; FERNÁNDEZ SEVILLA; MOLINA GRIMA, 2013).

Os efeitos da intensidade luminosa foram avaliados por Sung et al. (1999) no crescimento de *Chlorella* KR-1 quando cultivada com injeção de 10% de CO₂. Os autores verificaram que a microalga supracitada apresentou crescimento celular em todas as intensidades luminosas empregadas (40, 120, 310 e 470 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). No entanto, os autores verificaram que a concentração máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$) (2,72 g L⁻¹) foi obtida com a maior intensidade luminosa (470 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Rosa et al. (2011) avaliaram o crescimento de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Chlorella kessleri* em condições *indoor* e *outdoor* com injeção de CO₂. Os autores observaram que

Spirulina apresentou $X_{\text{máx}}$ (4,95 g L⁻¹) e fixação máxima diária de CO₂ (0,21 gCO₂fixado gCO₂injetado⁻¹ d⁻¹) quando cultivada com 6% de CO₂ em condições *outdoor*. Para o cultivo de *C. kessleri*, os valores máximos de $X_{\text{máx}}$ (2,62 e 2,50 g L⁻¹) foram verificados nas concentrações de 12% e 18% de CO₂, quando cultivada em condições *outdoor*.

3.3.2.5 Biorreatores

O cultivo de microalgas pode ser desenvolvido em duas principais categorias de biorreatores, classificados como abertos e fechados (ACIÉN et al., 2017; CHEAH et al., 2015; CHISTI, 2007; PIRES et al., 2012).

Os sistemas abertos são amplamente empregados para a produção de biomassa em escala comercial, devido ao baixo custo de construção e de operação (SLADE; BAUEN, 2013). Como exemplo de sistemas abertos podemos citar as lagoas naturais, biorreatores do tipo *Raceway* e de superfície inclinada (ZITTELLI et al., 2013). Este tipo de sistema possui vantagens, tais como: fácil limpeza e manutenção, exposição direta a luz solar, menor acúmulo de oxigênio dissolvido e dispensam controle de temperatura. Por outro lado, a produção de biomassa em biorreatores abertos é dependente das condições climáticas e estes são mais susceptíveis a contaminação por outros micro-organismos. Também podem apresentar elevadas perdas de CO₂ e altas taxas de evaporação de água, bem como necessitam de maior disponibilidade de área de terra para instalação em comparação aos sistemas fechados (ACIÉN et al., 2017; CHISTI, 2013).

Devido ao reduzido nível de controle, os biorreatores abertos são indicados para a produção de biomassa de microalgas mais tolerantes, como *Chlorella*, *Nannochloropsis*, *Scenedesmus* (ACIÉN et al., 2017) e cepas que apresentam crescimento em meios seletivos, como *Spirulina* (meio alcalino) e *Dunaliella* (meio altamente salino) (ACIÉN et al., 2017; ZITTELLI et al., 2013;).

Os biorreatores *Raceway* são comumente empregados no cultivo de microalgas, principalmente para a produção de energia e no tratamento de águas residuais (Figura 5). A transferência de massa nesta configuração é limitada devido ao baixo tempo de residência do gás no meio de cultura, o que acaba por dificultar a aplicação deste tipo de sistema na fixação de CO₂ (ACIÉN; FERNÁNDEZ SEVILLA; MOLINA GRIMA, 2013). Diante disso, são propostas modificações no projeto do biorreator *Raceway*, o qual é equipado com fosso (aumento da coluna de líquido) para aumentar o tempo de contato gás/líquido (DUARTE-SANTOS et al., 2016; GODOS et al., 2014).

Os fotobiorreatores podem ser definidos como sistemas fechados, no qual a principal fonte de energia (fótons) para o crescimento das microalgas não incide diretamente na superfície do cultivo, mas necessitam permear as paredes do biorreator antes de atingir as células (TREDICI, 2004; ZITTELLI et al., 2013). Outro aspecto relevante é a limitação de trocas gasosas e de contaminantes entre o cultivo e a atmosfera (ACIÉN; FERNÁNDEZ SEVILLA; MOLINA GRIMA, 2013).

Figura 5 – Vista aérea de biorreatores *Raceway* localizados na Estação experimental *Las Palmerillas* (Fundação Cajamar, Almería, Espanha)



Fonte: CÉSPEDES (2016)

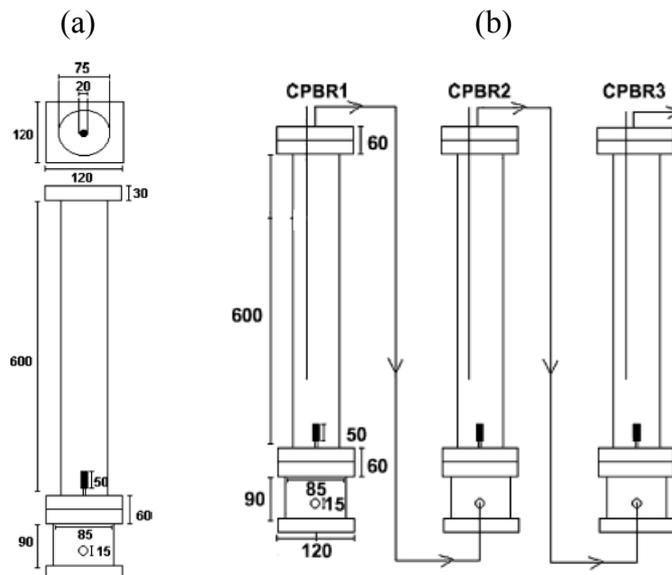
Os sistemas fechados (fotobiorreatores) podem ser classificados quando a configuração, tais como: (i) tubulares ou planos; (ii) horizontais, verticais, inclinados e espiral, (iii) serpentina; (iv) híbridos; (v) flutuantes e (vi) biorreatores de biofilme (ZITTELLI et al., 2013). O cultivo de microalgas em fotobiorreatores pode utilizar como fonte de energia, tanto a luz natural (IPPOLITI et al., 2016; PAWLOWSKI et al., 2014a), quanto a artificial (FREITAS et al., 2017b; ROSA et al., 2016).

A utilização dos fotobiorreatores apresenta vantagens em relação aos sistemas abertos, as quais podemos incluir: maior controle das condições de cultivo (pH, temperatura), maior eficiência fotossintética, menor área para a instalação, menores taxas de evaporação de água, menores perdas de CO₂ para atmosfera, elevada produtividade de biomassa e menores riscos de contaminação com outros micro-organismos (ACIÉN; FERNÁNDEZ SEVILLA; MOLINA GRIMA, 2013; PIRES et al., 2012). Este tipo de sistema é comumente empregado

para a produção de biomassa com alto valor agregado, está com aplicação na alimentação humana, animal e na extração de biocompostos utilizados em cosméticos e fármacos (ACIÉN; FERNÁNDEZ SEVILLA; MOLINA GRIMA, 2013). No entanto, estes sistemas apresentam elevado custo de construção e operação, o que acaba por dificultar o aumento de escala (HO et al., 2011).

Entre as configurações de fotobiorreatores mais empregadas para o cultivo de microalgas destaca-se os tubulares, tanto em cultivos *indoor* em escala de bancada (Figura 6), quanto em *outdoor* em escala piloto (Figura 7). Como exemplo de cultivos utilizando tubulares em escala de bancada, podemos destacar os estudos realizados por Morais e Costa (2007c) e Moraes et al. (2016), os quais empregaram fotobiorreatores tubulares com volume de 2 L para o cultivo de microalgas como *Spirulina* sp., *Chlorella kessleri* e *C. vulgaris*, utilizando CO₂ como fonte de carbono (Figura 6a). Morais e Costa (2007b) também avaliaram a taxa de fixação de CO₂ e a produção de biomassa por *Spirulina* sp. e *Scenedesmus obliquus* em fotobiorreatores tubulares verticais em série (Figura 6b). Os autores verificaram que o cultivo de *Spirulina* sp. com o fornecimento de 6% de CO₂, conduzido em fotobiorreatores tubulares em série resultou em taxa média de fixação de CO₂ de 37,9%.

Figura 6 – Fotobiorreator tubular vertical (2 L) (a) e em série (b) empregados no processo de fixação de CO₂ por microalgas

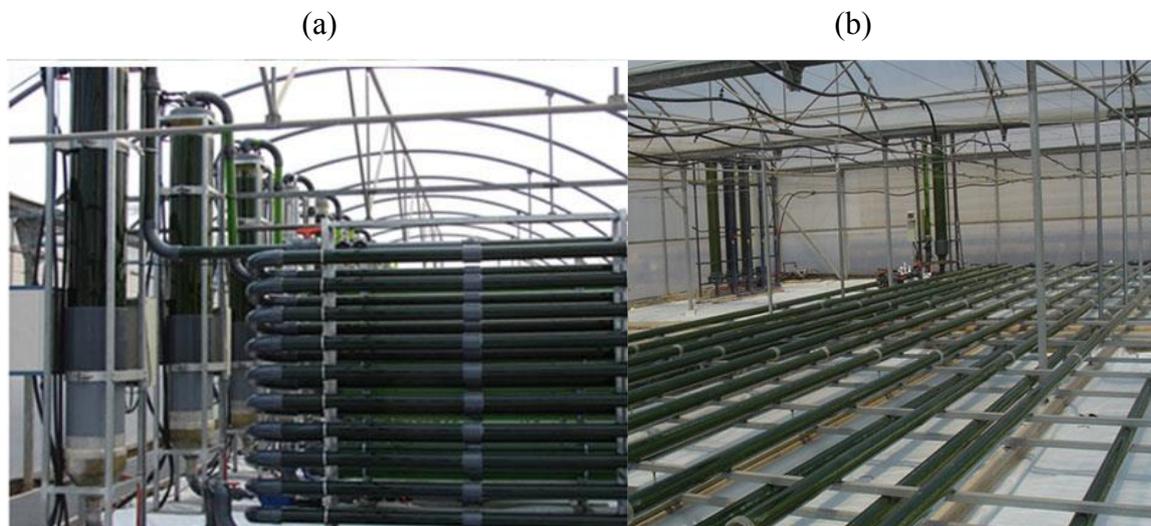


Fonte: (a) Morais e Costa (2007c) e (b) Morais e Costa (2007b)

Em escala piloto, podemos destacar a Planta de produção de biomassa microalgal localizada na Estação Experimental *Las Palmerillas*, Espanha. Esta planta possui 10

fotobiorreatores tubulares verticais com volume de 3000 L (Figura 7a) e um fotobiorreator tubular horizontal (Figura 7b), os quais são empregados na produção de biomassa de microalgas como *Scenedesmus almeriensis* e *Nannochloropsis gaditana*. Estes sistemas fechados são constituídos por tubulação receptora de luz e coluna de bolhas, por onde ocorre a recirculação do cultivo. Um dos inconvenientes do tubulares é o elevado acúmulo de oxigênio, o qual favorece a ocorrência do fenômeno de fotorrespiração, prejudicando o crescimento das microalgas. Para resolver este problema, ar comprimido é injetado na coluna de bolhas, facilitando a dessorção do O₂. O CO₂ também pode ser fornecido pela coluna de bolhas, o qual em cultivos em grande escala é utilizado para o controle do pH e como fonte de carbono pelas células. Outra problemática é o aumento de temperatura devido a elevada absorção de calor pela radiação solar. Neste sentido, se faz necessário a utilização de um sistema de controle de temperatura, conforme descrito do item 3.3.2.3 desta revisão (ACIÉN; FERNÁNDEZ SEVILLA; MOLINA GRIMA, 2013).

Figura 7 – Fotobiorreatores tubulares verticais (3.000 L) (a) e horizontal (3.000 L) (b) empregados na produção de *Scenedesmus almeriensis* localizados na Estação experimental *Las Palmerillas* (Fundação Cajamar, Almería, Espanha)



Fonte: Acién, Fernández Sevilla e Molina Grima (2013)

3.4 ESTRATÉGIAS DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE MACROMOLÉCULAS

Diversas pesquisas relataram o efeito de condições de estresse no aumento da concentração de lipídios e carboidratos e compostos de alto valor agregado, como carotenoides na biomassa microalgal. Entre as condições avaliadas podemos citar, a limitação da fonte de

nitrogênio (MARGARITES; COSTA, 2014; PANCHA et al., 2014), elevada temperatura (CHOKSHI et al., 2015), luz (FREITAS et al., 2017a), aplicação de campos magnéticos (BAUER et al., 2017) e salinidade (PANDIT; FULEKAR; KARUNA, 2017; PANCHA et al., 2015; XIA et al., 2014). Além disso, são propostas estratégias de cultivo para o aumento da produtividade destas macromoléculas, como a aplicação do duplo estágio, batelada alimentada e gradientes de salinidade (CHEN et al., 2017).

No presente trabalho de tese as variáveis de estudo foram a salinidade e aplicação da estratégia de duplo estágio na produção de macromoléculas, as quais foram abordados nos tópicos a seguir.

3.4.1 Salinidade

Os efeitos nocivos da salinidade sob plantas terrestres e algas estão associados a estresse oxidativo, osmótico, iônico e nutricional (MANSOUR, 2013; MANSOUR; SALAMA; ALLAM, 2015). Microalgas marinhas podem tolerar até 500 mmol L⁻¹ de NaCl, concentração presente na água do mar. Por outro lado, espécies de água doce tem seu crescimento prejudicado pelo aumento da concentração do sal no meio, devido ao elevado gasto de energia para eliminar os íons e pela síntese de osmorreguladores (KIRROLIA; BISHNOI; SINGH, 2013; LARI et al., 2016).

As algas possuem diferentes mecanismos fisiológicos e bioquímicos para tolerar elevada salinidade do meio. Entre as modificações do metabolismo podemos citar a interrupção da divisão celular e o estímulo do armazenamento de energia, acúmulo de osmorreguladores, regulação da troca iônica através da membrana celular e restauração da pressão de turgor (GU et al., 2012; MCNEIL; NUCCIO; HANSON, 1999; TALEBI et al., 2013). Ademais, o estresse salino pode influenciar a fotossíntese por meio da inibição do fotossistema II (FSII). Este fato é atribuído principalmente pela inibição da síntese proteica, a qual impede o reparo de danos no FSII (TORZILLO; VONSHAK, 2013).

Diversos estudos relataram que o aumento da salinidade do meio pode promover o incremento de lipídios em microalgas, os quais acumulam-se preferencialmente na forma de triacilglicerol (TAG) (CHEN et al., 2017; LARI et al., 2016; PANCHA et al., 2015; PALIWAL et al., 2017; PANDIT; FULEKAR; KARUNA, 2017; XIA et al., 2014). Shen et al. (2015) ao adicionarem 50 g L⁻¹ de NaCl no cultivo de *C. vulgaris*, verificaram aumento no conteúdo lipídico da biomassa (28% m m⁻¹). Pandit, Fulekar e Karuna (2017) observaram que o aumento

da concentração de NaCl de 60 para 400 mmol L⁻¹ resultou no incremento do teor de lipídios de 31,5 para 49,5% m m⁻¹ na biomassa de *Chlorella vulgaris*.

Quanto aos carboidratos, também é relatado o acúmulo desta macromolécula durante o estresse salino. Aikawa et al. (2014) verificaram que o emprego de água do mar para o cultivo *Synechococcus* sp., resultou em maior acúmulo de glicogênio (amido das cianobactérias) nas células em comparação ao cultivo conduzido com água doce. Da mesma forma, Pandit, Fulekar e Karuna (2017) observaram acúmulo de carboidratos na biomassa (47,0% m m⁻¹) de *Chlorella vulgaris* quando cultivada com 400 mmol L⁻¹ de NaCl. Os autores atribuíram este acúmulo aos açúcares solúveis, os quais atuam na regulação osmótica das células frente ao estresse salino.

3.4.2 Duplo estágio

Ao longo dos anos diversas estratégias vêm sendo investigadas visando o desenvolvimento de cultivos mais eficientes quanto a produtividade de macromoléculas. Segundo Ho et al. (2013, 2014) o processo considerado ideal deveria contemplar condições que favoreçam o crescimento e ao mesmo tempo o acúmulo de lipídios e carboidratos. No entanto, o acúmulo de compostos de reserva, sejam os carboidratos ou lipídios está acompanhado pela redução da produtividade de biomassa. Isso ocorre, sobretudo, pela mudança das rotas metabólicas em resposta as condições de estresse.

Diante da demanda por maior produtividade de lipídios e carboidratos, a estratégia de cultivo em duplo estágio é proposta a fim de ampliar a viabilidade de produção de biomassa com aplicação em biocombustíveis e produtos de alto valor agregado (PANCHHA et al., 2015; RA et al., 2015; WANG et al., 2016). A estratégia de duplo estágio é desenvolvida em duas etapas. No primeiro estágio é utilizado meio de cultivo repleto de nutrientes e demais condições ótimas até alcançar elevada concentração de biomassa. Logo após os cultivos são submetidos ao segundo estágio, no qual são aplicadas as condições de estresse. Esta estratégia de cultivo favorece tanto o crescimento celular, quanto o acúmulo de compostos de reserva na biomassa, aumentando assim a produtividade das macromoléculas. Entre as estratégias aplicadas relatadas na literatura podemos citar: privação da fonte de nitrogênio, adição de cloreto de sódio e concentração inadequada de íons (HO et al., 2014).

A Tabela 1 apresenta estudos da aplicação de estratégia em duplo estágio para diferentes gêneros de microalgas e os resultados de produtividade de macromoléculas após a aplicação da condição de estresse.

Tabela 1 – Cultivos em duplo estágio com diferentes condições de estresse, efeitos e produtividade de macromoléculas (P_M , $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$).

Microalga	Duplo estágio	Efeito	P_M ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Privação de *N + luz**	Aumento do crescimento e de lipídios	76,6 (lipídios)
<i>N. gaditana</i>	Contínuo*** + privação de *N	Aumento do crescimento e de lipídios	51,0 (lipídios)
<i>C. vulgaris</i> AG10032	Privação de *N	Crescimento diminui ligeiramente e aumento significativo de lipídios	77,8 (lipídios)
<i>S. obliquus</i> CNW-N	Privação de *N	Crescimento raramente afetado e aumento de carboidratos	352,9 (carboidratos)
<i>S. obliquus</i> CNW-N	Privação de *N	Crescimento melhorou ligeiramente e os lipídios aumentaram	78,7 (lipídios)
<i>N. oleoabundans</i>	Privação de *N + luz** + Fe	Crescimento raramente afetado e aumento de TAG****	51,6 (TAG)
<i>S. obtusus</i> XJ-15	Adição de NaCl	Crescimento raramente afetado e aumento significativo de lipídios	60,7 (lipídios)

Fonte: Adaptado de Ho et al. (2014) * fonte de nitrogênio; ** intensidade luminosa; *** cultivo contínuo; **** triacilglicerol

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

O Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) vem desenvolvendo pesquisas com cultivos de microalgas desde 1996. Entre os projetos desenvolvidos pelo LEB, a biofixação de CO_2 por microalgas teve início no ano de 2005, a partir do convênio firmado com a Eletrobrás e a Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica (CGTEE). Com o desenvolvimento das pesquisas foi projetada e construída uma Planta de Biofixação de CO_2 por Microalgas na Usina Termelétrica Presidente Médici (UTPM), no município de Candiota no Rio Grande do Sul (RS).

A partir deste convênio foram desenvolvidos diversos estudos relacionados à fixação de CO_2 por microalgas, a nível de graduação, mestrado e doutorado, dos quais originaram diversos artigos científicos publicados em periódicos internacionais. Estes contemplaram o desenvolvimento e utilização de diferentes fotobiorreatores (MORAIS; COSTA, 2007b,c), emprego de diferentes concentrações de CO_2 (MORAIS; COSTA, 2007b, 2007c, 2008a; ROSA et al., 2011) e o isolamento de cepas nativas (MORAIS; COSTA, 2007a;

RADMANN et al., 2011). Ademais, foram realizados estudos aplicando gás de combustão real (proveniente da UTPM) (COSTA et al., 2015; DUARTE et al., 2017a; VAZ; COSTA; MORAIS, 2016b), gás de combustão simulado (DUARTE; FANKA; COSTA, 2016; DUARTE; COSTA, 2017b) e efluentes sólidos (cinzas) (VAZ; COSTA; MORAIS, 2016a). Quanto aos parâmetros do processo, a transferência de massa de CO₂ para o meio líquido (MORAES et al., 2016), modos de condução (MOREIRA; COSTA; MORAIS, 2016) e reciclo de nutrientes (MORAES et al., 2015) foram avaliados. Também se buscou realizar a integração da fixação química (absorvente químico) e biológica (microalgas), a fim de maximizar a conversão do CO₂ em biomassa (ROSA et al., 2015, 2016). Outro aspecto avaliado foi a composição da biomassa quanto ao conteúdo lipídico e o perfil de ácidos graxos (MORAIS; COSTA, 2008b; RADMANN; COSTA, 2008).

Parte do trabalho de tese foi desenvolvido durante o período de doutoramento sanduíche no exterior, junto ao Grupo de pesquisa de “Biotecnologia de Microalgas Marinhas da Universidad de Almería”, Espanha. Entre as linhas de pesquisa abordadas pelo presente grupo, destacam-se o emprego de microalgas no tratamento de águas residuais (GÓMEZ-SERRANO et al., 2015; POSADAS et al., 2015) e o desenvolvimento, controle, operação e dimensionamento de fotobiorreatores em escala piloto para produção de biomassa microalgal (ACIÉN et al., 1998, 2012, 2017; ACIÉN; FERNÁNDEZ SEVILLA; MOLINA GRIMA, 2013; ANDRADE et al., 2016a, 2016b; BERENGUEL et al., 2004; DUARTE-SANTOS et al., 2016; FERNÁNDEZ et al., 2012, 2014; GODOS et al., 2014; IPPOLITI et al., 2016; MENDOZA et al., 2013a, 2013b; MOLINA GRIMA et al., 1999; MOLINA et al., 2001; PAWLOWSKI et al., 2014a, 2014b, SAN PEDRO et al., 2014, 2015, 2016). O grupo desenvolve as atividades de pesquisa na Universidad de Almería e na Estação Experimental *Las Palmerillas* pertencente a Fundação Cajamar. Esta estação experimental conta com uma planta piloto com dez fotobiorreatores tubulares verticais e um horizontal, utilizados para a produção de biomassa microalgal. A planta também possui oito biorreatores do tipo *Raceway* utilizados no cultivo de microalgas com águas residuais.

Neste sentido, o presente trabalho de tese buscou contribuir com as linhas de pesquisa, mediante o estudo de parâmetros de processo e avaliação de estratégias de cultivo para aumento da fixação de CO₂ por microalgas e ampliação da aplicabilidade da biomassa na produção de bioenergia.

CAPÍTULO III

4 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

O presente trabalho de tese foi dividido em quatro etapas, sendo que as duas primeiras foram desenvolvidas no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) na Universidade Federal do Rio Grande (FURG). Na primeira etapa foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de dióxido de carbono (CO_2) no cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111. Na segunda etapa foi avaliada a influência da adição de cloreto de sódio e da aplicação da estratégia de cultivo em duplo estágio com injeção de CO_2 no crescimento e na produtividade de macromoléculas de *C. fusca* LEB 111. A cepa utilizada nestas etapas do trabalho foi isolada pela equipe do LEB em lagoas de sedimentação de cinzas da Usina Termelétrica Presidente Médici (UTPM).

As demais etapas foram realizadas durante o período de doutorado sanduíche no exterior, juntamente com o grupo de pesquisa de Biotecnologia de Microalgas Marinhas da Universidad de Almería, na Espanha. Neste período foram avaliados os efeitos da vazão de CO_2 e do pH no crescimento e eficiência de utilização de CO_2 pela microalga marinha *Nannochloropsis gaditana*.

Cada etapa do trabalho correspondeu a um artigo científico, distribuídos do seguinte modo:

Artigo 1 - Fixação de CO_2 por *Chlorella fusca*: Potencial para a mitigação de gases de efeito estufa e produção de biomassa.

Artigo 2 – Cultivo de *Chlorella fusca* em duplo estágio com adição de CO_2 e NaCl.

Artigo 3 - Produção de *Nannochloropsis gaditana* em fotobiorreatores tubulares em escala piloto: Influência da vazão de CO_2 no controle do pH e no fornecimento de carbono.

Artigo 4 - Avaliação do efeito do pH na produção de biomassa de *Nannochloropsis gaditana* e no fornecimento de CO_2 em fotobiorreatores tubulares.

ARTIGO 1

FIXAÇÃO DE CO₂ POR *Chlorella fusca*: POTENCIAL PARA A MITIGAÇÃO DE GASES DE EFEITO ESTUFA E PRODUÇÃO DE BIOMASSA

FIXAÇÃO DE CO₂ POR *Chlorella fusca*: POTENCIAL PARA A MITIGAÇÃO DE GASES DE EFEITO ESTUFA E PRODUÇÃO DE BIOMASSA

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi verificar a influência de diferentes concentrações de CO₂ no cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111 por meio de parâmetros de crescimento, fixação de CO₂, perfil proteico, composição e potencial de aplicação da biomassa. Os ensaios foram realizados em fotobiorreatores tubulares verticais de 1,8 L, a 30°C, 44,8 $\mu\text{mol}_{\text{fótons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperíodo 12h claro:12 h escuro, por 15 d. No período claro, a corrente gasosa utilizada para agitação dos cultivos, com vazão de 0,45 L min⁻¹, foi enriquecida com CO₂ nas concentrações de 5, 10 e 15% v v⁻¹. Para efeito de comparação, ensaios controles foram realizados, com meio BG-11 padrão e com injeção de ar (0,03% de CO₂). Com esse estudo foi possível verificar que o fornecimento de 15% de CO₂ resultou em maiores valores de produtividade de biomassa (194,3 mg L⁻¹ d⁻¹) e taxa de fixação de CO₂ (390,9 mg L⁻¹ d⁻¹), sendo estes resultados 42,3% e 55,8% superiores, respectivamente, quando comparado ao ensaio cultivado com 0,03% de CO₂. Com relação ao teor de carboidratos (31,9% m m⁻¹) e produção teórica de etanol (14,5 mL 100 g⁻¹ de biomassa), as maiores respostas foram encontradas com a adição de 10% de CO₂. O fornecimento das concentrações de 5% (29,6% m m⁻¹) e 15% de CO₂ (28,3% m m⁻¹) também contribuíram para o acúmulo de lipídios na biomassa. Portanto, foi demonstrado que *C. fusca* apresenta potencial na mitigação de CO₂ e a biomassa produzida pode ser aplicada na produção de biocombustíveis, como biodiesel e bioetanol.

Palavras-chave: Aquecimento global. Biocombustíveis. Biofixação. Dióxido de carbono. Microalga.

1 INTRODUÇÃO

A ação antrópica, principalmente relacionada a queima de combustíveis fósseis e desmatamento florestal, intensificou a emissão de gases de efeito estufa (GEE) para a atmosfera (CHEAH et al., 2015). Entre os GEE, o dióxido de carbono (CO₂) é considerado um dos principais causadores desse efeito, contribuindo para o aumento da temperatura terrestre e mudanças climáticas sentidas no período contemporâneo (KASSIM; MENG, 2017). A concentração de CO₂ nos gases de combustão pode variar de acordo com o combustível utilizado, por exemplo, de 5 a 6% para o gás natural e de 10 a 15% para o carvão mineral (HENDE; VERVAEREN; BOON, 2012; US DOE, 2010).

Diversas estratégias de mitigação de CO₂ vêm sendo aplicadas e investigadas, tais como processos físicos, químicos e biológicos (ZHOU et al., 2017). A biotecnologia microalgal é considerada uma estratégia biológica promissora, por esses micro-organismos apresentarem elevada eficiência fotossintética na bioconversão de CO₂ em biomassa em comparação com as plantas terrestres (WANG et al., 2008; ZHAO; SU, 2014). Além disso, a biomassa produzida é composta principalmente de proteínas, carboidratos e lipídios, que podem ser utilizados na produção de bioprodutos de alto valor agregado e biocombustíveis, como biodiesel e bioetanol (CHEAH et al., 2015, 2016; MORAIS et al., 2016).

O carbono é considerado um dos principais nutrientes no cultivo de microalgas, representando em média 50% do teor de biomassa (GROBBELAAR, 2013). Dessa forma, a fonte de carbono representa um recurso chave para a manutenção do crescimento (HENDE; VERVAEREN; BOON, 2012). Neste contexto, o uso de gases de combustão no cultivo de microalgas, não só contribui com a redução de custos com a fonte de carbono, como também se torna uma alternativa promissora para capturar GEE (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). A microalga *Chlorella fusca* LEB 111, isolada de água proveniente da lagoa de sedimentação de cinzas da Usina Termoeletrica Presidente Médici (UTPM), apresentou resultados promissores quando cultivada com gás de combustão e cinzas, estes resíduos do processo da usina (DUARTE; FANKA; COSTA, 2016; VAZ; COSTA; MORAIS, 2016).

O processo de fixação de CO₂ por microalgas pode ser influenciado por diversos parâmetros, tais como: espécie da microalga, concentração de CO₂, vazão, pH, configuração do fotobiorreator, temperatura e luz (ZHAO; SU, 2014; ZHOU et al., 2017).

Diante disso do exposto, o objetivo do presente estudo foi verificar a influência de diferentes concentrações de CO₂ no cultivo de *Chlorella* por meio da determinação de

parâmetros de crescimento, fixação de CO₂, perfil proteico, composição da biomassa, bem como potencial de aplicação da biomassa.

2 MATERIAL E MÉTODOS

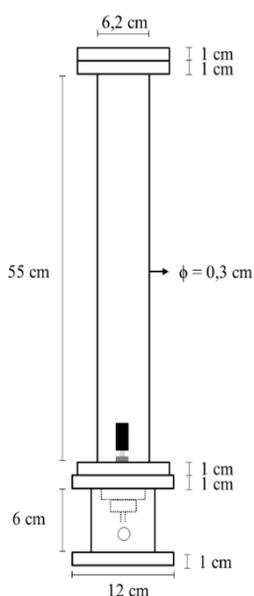
2.1 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO

A microalga utilizada foi *Chlorella fusca* LEB 111 pertencente à Coleção de Culturas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Brasil (ANEXO I – Figura A1). A cepa foi isolada de água proveniente de lagoa de sedimentação de cinzas na Usina termoelétrica Presidente Médici (UTPM), na cidade de Candiota, sul do Brasil (DUARTE; FANKA; COSTA, 2016). A cepa foi mantida em meio de cultivo BG-11 (Anexo I – Tabela A1) (RIPPKA et al., 1979), sendo que o inóculo utilizado foi mantido em meio BG-11 sem carbonato de sódio (Na₂CO₃).

2.2 FOTOBIORREATOR E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Os ensaios foram realizados em duplicada em fotobiorreatores tubulares verticais (FBRTv), com volume total de 1,8 L e volume útil de 1,5 L (Figura 1).

Figura 1 – Diagrama esquemático do fotobiorreator tubular vertical



Fonte: Adaptado de Moraes e Costa (2007)

Os cultivos foram mantidos por 15 d a 30°C, fotoperíodo 12 h claro e 12 h escuro e iluminância de 44,8 $\mu\text{mol}_{\text{fótons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, essa fornecida por lâmpadas tubulares fluorescentes de 40 W. A concentração inicial do cultivo foi 0,2 g L⁻¹ (MORAIS; COSTA, 2007) e o meio de cultivo empregado foi BG-11 modificado, isento de carbonato de sódio (Na₂CO₃) (Anexo I - Figura A2).

Os ensaios foram conduzidos em modo de batelada alimentada em relação à fonte de carbono (CO₂ puro, 99,5%). A agitação dos cultivos foi realizada mediante borbulhamento de ar comprimido injetado através de aspersor (pedra sinterizada), localizado na parte inferior do fotobiorreator, à vazão de 0,45 L min⁻¹ (MORAES et al., 2016). No período claro, a corrente gasosa composta por ar comprimido foi enriquecida com diferentes concentrações de CO₂ (5, 10 e 15% v v⁻¹). O CO₂ foi fornecido de maneira intermitente, 1 min h⁻¹. As vazões de ar e CO₂ foram controladas por medidores de vazão (Cole Parmer, EUA).

A fim de avaliar o efeito das diferentes concentrações de CO₂ no cultivo foram realizados um ensaio controle, com meio de cultivo BG-11 contendo como fonte de carbono o Na₂CO₃ e outro ensaio com 0,03% (v v⁻¹) de CO₂ (concentração de CO₂ presente no ar) com meio BG-11 isento de carbonato de sódio. Nestes ensaios a agitação também foi realizada mediante a injeção de ar comprimido. A evaporação dos cultivos foi compensada diariamente pela adição de água destilada estéril.

2.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

A concentração de biomassa (X_b) foi determinada diariamente por espectrofotometria (Shimadzu UV/VIS UVMMini-1240, Japão) a 670 nm (COSTA et al., 2002), utilizando curva padrão de *C. fusca* LEB 111 ($X_b = 0,2612 \text{ absorbância} - 0,0064$, com $R^2 = 0,9941$). O pH foi determinado diariamente por meio de pHmetro digital (Mettler Toledo FiveGo™, Suíça) e a alcalinidade total foi determinada por titulação potenciométrica a cada 72 h (APHA, 1998). Essas respostas foram utilizadas para calcular a concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID) e as frações de carbonato (CO₃²⁻) e bicarbonato (HCO₃⁻), seguindo as equações de equilíbrio (BRUNE; NOVAK, 1981; CAMACHO RUBIO et al., 1999), como demonstrado por Rosa et al. (2015).

Para isso, presume-se que todas as espécies químicas em equilíbrio (Equação 1) representam o carbono inorgânico total dissolvido.



A soma das concentrações das espécies CO_2 e H_2CO_3 foi representada por CO_2^* , pois a concentração no equilíbrio da primeira é considerada aproximadamente 650 vezes maior que a segunda. As Equações 2 e 3 mostram as constantes de equilíbrio na Equação 1 a 30°C .

$$K_1 = \frac{[\text{HCO}_3^-][\text{H}^+]}{[\text{CO}_2^*]} = 10^{-6,327} \quad (2)$$

$$K_2 = \frac{[\text{CO}_3^{2-}][\text{H}^+]}{[\text{HCO}_3^-]} = 10^{-10,29} \quad (3)$$

As concentrações de cada espécie (Equações 4, 5 e 6) foram calculadas a partir das frações de ionização (α) e da concentração de carbono inorgânico total (TC).

$$[\text{CO}_2] = \alpha_0 \cdot \text{TC} \quad (4)$$

$$[\text{HCO}_3^-] = \alpha_1 \cdot \text{TC} \quad (5)$$

$$[\text{CO}_3^{2-}] = \alpha_2 \cdot \text{TC} \quad (6)$$

As frações de ionização de cada espécie química no equilíbrio foram calculadas como uma função do pH e das constantes de ionização k_1 e k_2 (Equações 7, 8 e 9).

$$\alpha_0 = \frac{1}{\left(1 + \frac{k_1}{\text{H}^+} + \frac{k_1 k_2}{(\text{H}^+)^2}\right)} \quad (7)$$

$$\alpha_1 = \frac{1}{\left(1 + \frac{\text{H}^+}{k_1} + \frac{k_2}{\text{H}^+}\right)} \quad (8)$$

$$\alpha_2 = \frac{1}{\left(1 + \frac{(\text{H}^+)^2}{k_1 k_2} + \frac{\text{H}^+}{k_2}\right)} \quad (9)$$

A concentração de TC não pode ser determinada diretamente, então foi substituída pela alcalinidade total (Equação 10).

$$\text{Alc}_C = [\text{HCO}_3^-] + 2[\text{CO}_3^{2-}] = \alpha_1 \text{TC} + 2\alpha_2 \text{TC} \quad (10)$$

A concentração de cada espécie química no balanço de carbono foi obtida de acordo com as Equações 11, 12 e 13.

$$[\text{CO}_2] = \alpha_0 \frac{\text{Alc}_C}{\alpha_1 + 2\alpha_2} \quad (11)$$

$$[\text{HCO}_3^-] = \alpha_1 \frac{\text{Alc}_C}{\alpha_1 + 2\alpha_2} \quad (12)$$

$$[\text{CO}_3^{2-}] = \alpha_2 \frac{\text{Alc}_C}{\alpha_1 + 2\alpha_2} \quad (13)$$

Assim, a partir da concentração de cada espécie química no equilíbrio, foi calculada a concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID) (Equação 14).

$$[\text{CID}] = [\text{CO}_2] + [\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_3^{2-}] \quad (14)$$

2.4 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

Ao final dos ensaios, a biomassa foi recuperada do meio líquido por centrifugação (Hitachi himac - CR-GIII, Japão) (15.200 g, 20°C e 10 min), ressuspensa em água destilada e novamente centrifugada nas mesmas condições para remoção dos sais. Ademais, a biomassa concentrada foi congelada a -80°C durante 48 h, liofilizada (Labconco, EUA) e armazenada a -20°C para posterior caracterização.

A quantificação do teor de proteínas e carboidratos foi realizada em extratos, preparados com 10 mg de biomassa liofilizada ressuspensa em 20 mL de água destilada e posteriormente submetida a ruptura celular em sonda ultrassônica (Cole Parmer, CPX130, EUA), com amplitude de 25%, 10 ciclos de funcionamento, sendo 59 s ligado e 59 s desligado. O procedimento de ruptura celular foi realizado em banho de gelo, a fim de evitar o aquecimento, bem como a degradação dos compostos presentes na biomassa.

A concentração de proteínas nos extratos supracitados foi determinada pelo método colorimétrico proposto por Lowry et al. (1951), com prévia hidrólise térmica e alcalina, utilizando curva padrão de albumina de soro bovino (pureza de 98%). O teor de carboidratos nos extratos foi quantificado pelo método fenol-sulfúrico, empregando curva padrão de glicose (DUBOIS et al., 1956).

Os lipídios presentes na biomassa foram quantificados pelo método colorimétrico proposto por Marsh e Weinstein (1966). O presente método baseia-se na extração dos lipídios de 10 mg de biomassa liofilizada, mediante o emprego da mistura de solventes clorofórmio: metanol, seguida de agitação em agitador de tubos com esferas de vidro e aquecimento a 60°C. Após o extrato lipídico obtido foi novamente evaporado e carbonizado com ácido sulfúrico P.A em termobloco, a 200°C, por 15 min. A quantificação dos lipídios na biomassa foi realizada por espectrofotometria (SHIMADZU UV MINI 1240, Japão) a 375 nm, utilizando curva padrão de tripalmitina (HOLLAND; GABBOTT, 1971).

O teor de umidade na biomassa foi determinado utilizando metodologia da AOAC (2000). A concentração de carbono elementar na biomassa foi determinada em analisador elementar CHNS/O (Perkin Elmer 2400, EUA), utilizando acetanilida como padrão de referência certificado.

2.5 PERFIL PROTEICO

As proteínas foram extraídas de 2 mg de biomassa liofilizada (FREITAS et al., 2017a) por adição de tampão amostra (4x tampão amostra: Tris/HCl (80 mmol L⁻¹ - pH 6,8), dodecilsulfato de sódio-SDS (2% m v⁻¹), glicerol (15% v v⁻¹), *m*-cresol púrpura (0,006% m v⁻¹) e 2-mercaptoetanol (0,1 mol L⁻¹)). As amostras foram aquecidas durante 5 min a 98°C, seguido de centrifugação a 10.000 g durante 1 min. Os extratos de proteína foram submetidos à eletroforese descontínua em gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). A eletroforese das proteínas foi realizada de acordo com Laemmli (1970), utilizando gel de acrilamida de concentração (5%) e gel de acrilamida de separação (12,5%). Os poços foram carregados igualmente com 15 µL de extrato.

2.6 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO

A partir dos valores de concentração de biomassa foram obtidas as concentrações máximas de biomassa ($X_{m\acute{a}x}$, g L⁻¹) e calculadas as produtividades volumétricas de biomassa (P_x , mg L⁻¹ d⁻¹) por meio da Equação 15, onde X_t (mg L⁻¹) é a concentração de biomassa no

tempo t (d) e X_0 (mg L^{-1}) é a concentração de biomassa no tempo t_0 (d). A produtividade volumétrica máxima de biomassa ($P_{\text{máx}}$, $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) foi o máximo valor de produtividade obtido em cada ensaio.

$$P_X = \frac{X_t - X_0}{t - t_0} \quad (15)$$

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, d^{-1}) foi obtida por regressão linear da fase logarítmica de crescimento da microalga ($\ln X$ versus t). O tempo de geração de biomassa (t_g , d) foi calculado aplicando a Equação 16.

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{máx}}} \quad (16)$$

2.7 PARÂMETROS DE FIXAÇÃO DE CO_2

A taxa de fixação de CO_2 (T_{CO_2} , $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) foi calculada por meio da Equação 17, onde P_X ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) é a produtividade de biomassa, x_{cbm} é a fração de carbono determinada pela análise elementar, MM_{CO_2} (g mol^{-1}) e MM_C (g mol^{-1}) são as massas molares de dióxido de carbono e carbono, respectivamente (TOLEDO-CERVANTES et al., 2013).

$$T_{\text{CO}_2} = P_X \cdot x_{\text{cbm}} \cdot \frac{\text{MM}_{\text{CO}_2}}{\text{MM}_C} \quad (17)$$

A eficiência de utilização de CO_2 (E_{CO_2} , % m m^{-1}) foi calculada aplicando a Equação 18, onde T_{CO_2} ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) é a taxa de fixação de CO_2 , $V_{\text{útil}}$ (L) é o volume útil do fotobiorreator e \dot{m}_{CO_2} (mg d^{-1}) é a taxa mássica de CO_2 fornecida aos cultivos (ZHANG; KURANO; MIYACHI, 2002). A concentração de CO_2 presente no ar comprimido (0,03% v v¹) injetado foi considerada no cálculo da taxa mássica de CO_2 .

$$E_{\text{CO}_2} = \frac{(T_{\text{CO}_2} \cdot V_{\text{útil}})}{\dot{m}_{\text{CO}_2}} \cdot 100 \quad (18)$$

2.8 CONVERSÃO TEÓRICA DE CARBOIDRATOS EM ETANOL

A conversão teórica de carboidratos em etanol foi calculada utilizando base de cálculo de 100 g de biomassa, concentração de carboidratos na biomassa, conversão estequiométrica teórica de glicose em etanol de 0,511 e eficiência de conversão da biomassa em etanol de 70% (ROSA et al., 2015).

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos ensaios foram avaliados mediante análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para comparação de médias com 95% de confiança.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

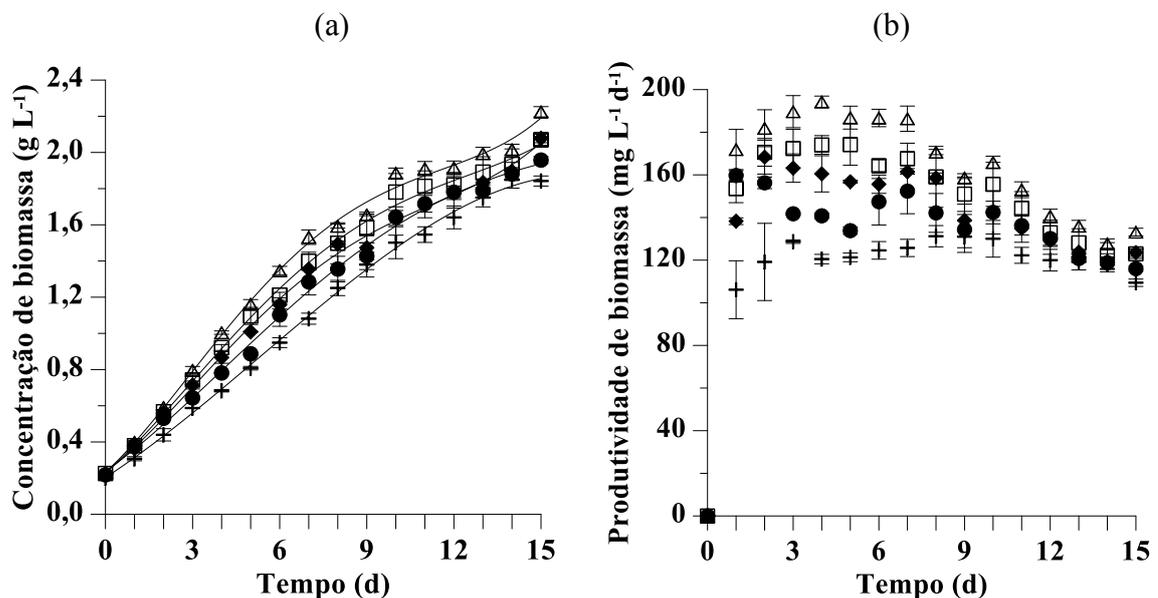
Os cultivos de *C. fusca* com diferentes concentrações de CO₂ e o ensaio controle (Figura 2a) não apresentaram fase de adaptação. Os resultados estão de acordo com Duarte et al. (2016), que encontraram ausência de fase de adaptação utilizando a mesma cepa, mas com injeção de gás de combustão sintético no cultivo. Os autores sugerem que o fato da microalga ter sido isolada próxima a uma Usina termoelétrica, fonte emissora de CO₂, pode ter contribuído com a pré-adaptação do micro-organismo a essas condições. Portanto, essa cepa possui maior capacidade em tolerar altas concentrações de CO₂, sem apresentar fase *lag* de crescimento.

A fase exponencial de crescimento, em todas as condições experimentais, foi considerada entre o tempo 0 e o 3º d de cultivo (Tabela 1). Os melhores resultados de produtividade da biomassa para os ensaios com adição de 5, 10 e 15% de CO₂ (Figura 2b) foram observados entre o 2º e o 5º d. Para os cultivos com a adição de ar (0,03% de CO₂) e controle (adição de Na₂CO₃), os maiores valores de P_x foram verificados entre o 1º e 2º d e 2º e 3º d de cultivo, respectivamente. Após estes períodos foi possível observar declínio dos valores de P_x, possivelmente pela ocorrência da fotolimitação dos cultivos. De acordo com Chen et al. (2013), quando a concentração de biomassa aumenta pode ocorrer o efeito de fotolimitação, limitando a passagem da luz para o cultivo. Esse fenômeno também foi observado por Moraes et al. (2016) ao cultivar *Spirulina* sp. LEB 18 com injeção de CO₂.

A tolerância a altas concentrações de CO₂ e a capacidade de fixação desse gás, estão relacionadas às características de gênero e espécie das microalgas (SINGH; SINGH, 2014). Estudos relataram que algas verdes apresentam resultados promissores quando cultivadas em meios de cultivo com elevada concentração de CO₂ (DUARTE et al., 2017a; FAN et al., 2007;

TANG et al., 2011; TOLEDO-CERVANTES et al., 2013; VAZ; COSTA; MORAIS, 2016b). Entre as cepas estudadas, *Chlorella* é amplamente utilizada no processo de fixação de CO₂ (SINGH; SINGH, 2014). No presente estudo foi utilizada a microalga *Chlorella fusca* LEB 111, a qual em outros estudos também apresentou potencial para fixar de CO₂ proveniente de gases de combustão (DUARTE; FANKA; COSTA, 2016; VAZ; COSTA; MORAIS, 2016b).

Figura 2 - Concentração de biomassa (a) e produtividade de biomassa de *C. fusca* (b): (●) controle, (+) 0,03% CO₂, (□) 5% CO₂, (◆) 10% CO₂ e (Δ) 15% CO₂ (média ± desvio padrão)



O ensaio com injeção de 15% de CO₂ apresentou os maiores resultados de $X_{\text{máx}}$ (2,22 g L⁻¹), $P_{\text{máx}}$ (194,3 mg L⁻¹ d⁻¹) e $\mu_{\text{máx}}$ (0,42 d⁻¹) e o menor t_g (1,67 d) ($p < 0,05$) (Tabela 1). Além disso, todos os ensaios com CO₂ (5, 10 e 15% v v⁻¹) apresentaram melhores resultados desses parâmetros, com diferença significativa ($p < 0,05$) em relação aos ensaios controle e com adição de 0,03% de CO₂. A injeção de 15% de CO₂ no cultivo promoveu o aumento de 19,4% de $X_{\text{máx}}$, 42,3% de $P_{\text{máx}}$ e 16,7% de $\mu_{\text{máx}}$, bem como redução de t_g em 13,9%, quando comparado ao ensaio com 0,03% de CO₂. Desta forma, verificou-se que o aumento da concentração de CO₂ (Tabela 1) permitiu o incremento do crescimento da microalga.

Da mesma forma, Tang et al. (2011) observaram que o aumento de 0,03 para 10% da concentração de CO₂, melhorou as respostas de crescimento ($X_{\text{máx}}$, $P_{\text{máx}}$ e $\mu_{\text{máx}}$) das microalgas *Scenedesmus obliquus* SJTU-3 e *Chlorella pyrenoidosa* SJTU-2. Kassim e Meng (2017) cultivando *Tetraselmis suecica* também verificaram que os maiores resultados de $X_{\text{máx}}$ (0,72 g L⁻¹) e $P_{\text{máx}}$ (67,6 mg L⁻¹ d⁻¹) foram obtidos nos cultivos com injeção de 15% de CO₂.

Tabela 1 – Resultados de concentração máxima de biomassa ($X_{m\acute{a}x}$), produtividade máxima de biomassa ($P_{m\acute{a}x}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) e tempo de geração (t_g) dos cultivos de *C. fusca* LEB 111.

Ensaio	$X_{m\acute{a}x}$ (g L ⁻¹)	$P_{m\acute{a}x}$ (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (d ⁻¹)	t_g (d)	Δt (d)*	R^{2**}
Controle	1,96 ^c ± 0,02	160,7 ^c ± 2,2	0,36 ^c ± 0,01	1,93 ^c ± 0,01	0-3	0,952 ± 0,004
0,03%	1,86 ^d ± 0,04	136,8 ^d ± 1,5	0,36 ^c ± 0,01	1,94 ^c ± 0,04	0-3	0,988 ± 0,012
5%	2,07 ^b ± 0,03	176,5 ^b ± 7,1	0,40 ^b ± 0,01	1,75 ^b ± 0,06	0-3	0,981 ± 0,001
10%	2,08 ^b ± 0,02	171,9 ^b ± 4,1	0,39 ^b ± 0,01	1,78 ^b ± 0,04	0-3	0,980 ± 0,001
15%	2,22 ^a ± 0,03	194,3 ^a ± 2,7	0,42 ^a ± 0,01	1,67 ^a ± 0,04	0-3	0,980 ± 0,003

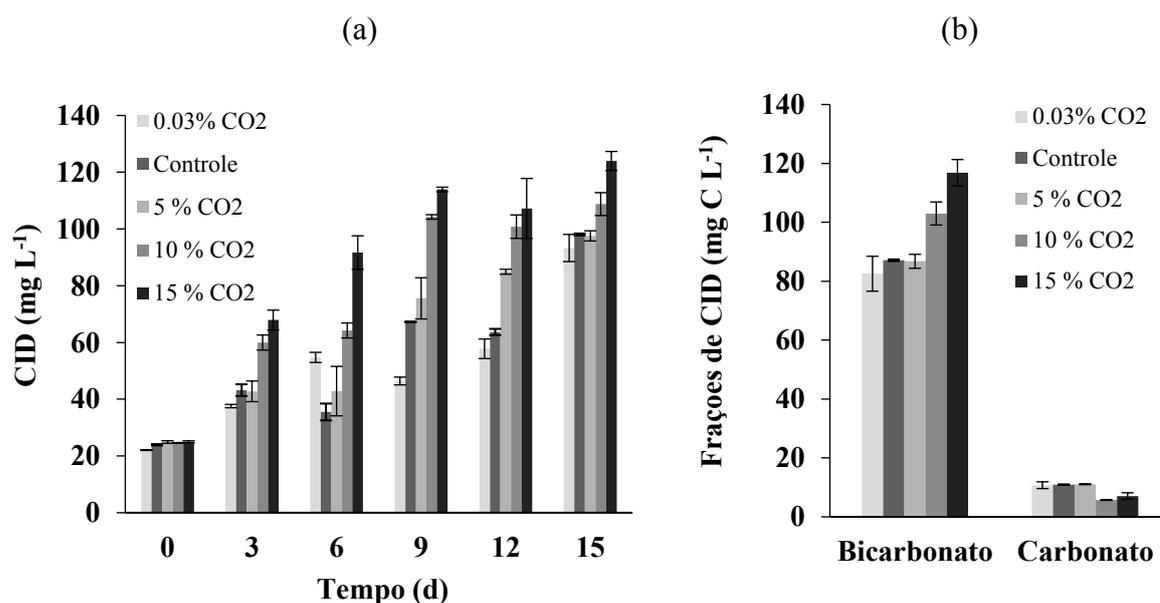
Letras sobrescritas iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferiram estatisticamente ao nível de 95% de confiança ($p > 0,05$); Δt : início-fim da fase exponencial de crescimento; ** R^2 : Coeficiente de determinação da regressão linear aplicada à fase logarítmica de crescimento do perfil $\ln x$ versus t .

Além de fatores como a concentração de CO₂ na corrente gasosa e a vazão, a determinação da forma como este gás será injetado no cultivo deve ser considerada. De acordo com estudos realizados por Chiu et al. (2009), Acién et al. (2012b) e Jiang et al. (2013), o CO₂ pode ser injetado no cultivo de microalgas continuamente, por demanda ou intermitente, resultando assim em alterações do pH do cultivo, bem como influenciando no crescimento e na capacidade de absorção do carbono pelas células. Chiu et al. (2009) cultivando *Nannochloropsis oculata* com injeção contínua de gás enriquecido com diferentes concentrações de CO₂ verificaram incremento no crescimento com 2% de CO₂ em comparação com o cultivo com injeção de ar (0,03%). Os autores também relataram que o fornecimento de 5%, 10% e 15% de CO₂ inibiu completamente o crescimento da microalga. Contudo, Duarte e Costa (2017b) cultivando *Synechococcus nidulans* LEB 115, observaram que a injeção intermitente de gás de combustão simulado (10% de CO₂) não resultou na redução do pH do cultivo, bem como contribuiu para que fosse alcançada produtividade de biomassa semelhante ao resultado obtido no ensaio controle. De acordo com Jiang et al. (2013), o fornecimento de gás de combustão por meio de injeção intermitente por *feedback* de pH, atenuou a acidificação do meio de cultivo, além de contribuir para o aumento da eficiência de utilização de CO₂. No presente estudo, o CO₂ foi também fornecido aos cultivos de forma intermitente, evitando reduções acentuadas nos valores de pH, as quais poderiam comprometer a produtividade de biomassa e a fixação de CO₂.

O carbono inorgânico dissolvido (CID) em ambientes aquáticos pode estar disponível nas formas de CO₂, H₂CO₃, HCO₃⁻ e CO₃²⁻ (ZHOU et al., 2017). Contudo, o CO₂ e o HCO₃⁻ são as principais formas utilizadas por microalgas como fonte de carbono (ZHAO;

SU, 2014). O valor de CID no meio líquido (Figura 3a) aumentou ao longo do tempo de cultivo, sendo que a maior concentração de CID ($124,0 \text{ mg L}^{-1}$) foi verificada no ensaio com 15% de CO_2 . Esse valor obtido no ensaio com adição de 15% de CO_2 foi 32,8%, 26,4%, 27,1% e 14,0% superior aos ensaios com 0,03% de CO_2 , controle, 5% e 10% de CO_2 , respectivamente.

Figura 3 - Concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID) em função do tempo (a) e frações de CID (HCO_3^- e CO_3^{2-}) no meio líquido dos ensaios com diferentes concentrações de CO_2 no 15º d (b) (média \pm desvio padrão)

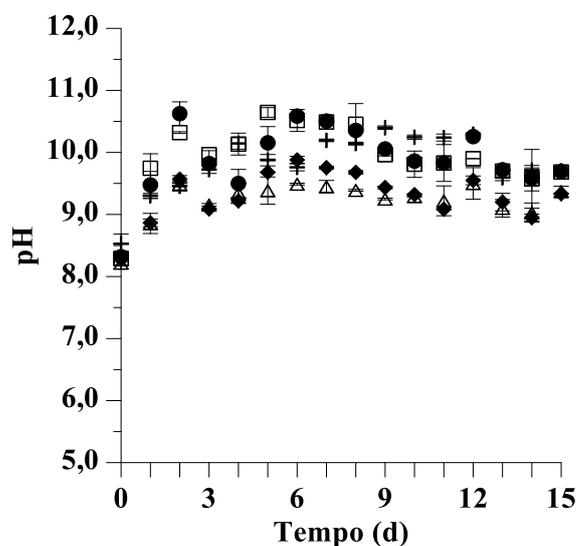


Tang et al. (2011) verificaram que o aumento das concentrações de CO_2 de 0,03% para 50% (v v^{-1}) resultaram no incremento de CID no meio líquido no cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* de 15,0 para $79,6 \text{ mg L}^{-1}$. No corrente trabalho, embora a maior parcela de CID em todos os tratamentos foi representada na forma de HCO_3^- , a maior concentração desse íon foi verificada no ensaio com 15% de CO_2 . As concentrações de CO_3^{2-} variaram entre 5,7 e $10,9 \text{ mg L}^{-1}$, com as maiores frações do ânion nos ensaios controle, com 0,03% e 5% de CO_2 (Figura 3b).

O pH do meio de cultivo BG-11 após ser esterilizado e resfriado apresenta valor de pH de 7,40 (RIPPKA et al., 1979). Os valores iniciais de pH dos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 mantiveram-se entre 8,22 e 8,55, sendo observado aumento gradual deste parâmetro ao longo do tempo de cultivo. De acordo com Grobbelaar (2013), esse incremento do pH ocorre devido ao consumo de CO_2 pelas microalgas e ao acúmulo de álcalis no meio de cultivo. Ao longo dos ensaios, os maiores valores de pH foram verificados nos ensaios controle (com adição

de 0,02 g L⁻¹ de Na₂CO₃), 0,03% (CO₂ do ar) e 5% de CO₂, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação aos demais tratamentos. Por outro lado, o pH dos ensaios com 10% e 15% de CO₂ atingiram valores máximos de 9,88 e 9,61, respectivamente. Tais valores de pH foram menores em comparação aos verificados nos demais ensaios, devido a injeção de maiores concentrações de CO₂ (Figura 4).

Figura 4 – Perfil de pH em função do tempo nos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111: (●) controle, (+) 0,03% CO₂, (□) 5% CO₂, (◆) 10% CO₂ e (△) 15% CO₂ (média ± desvio padrão)



A relação entre a concentração de CO₂ e o pH no cultivo de microalgas é complexa (GROBBELAAR, 2013; ZHAO; SU, 2014). Este fato foi demonstrado por Andrade et al. (2016), o qual relatou que a distribuição das formas de carbono inorgânico no interior do fotobiorreator pode apresentar alterações de acordo com modificações do pH. Quando os valores de pH permanecem entre 6,5 e 10,5, a fração bicarbonato é a forma química mais abundante presente no meio líquido. No entanto, o CO₂ é predominante em pH baixo (< 6,5) e o CO₃²⁻ em valores elevados de pH (> 10,5). Se o equilíbrio químico entre as diferentes formas de carbono inorgânico é perturbado (fornecimento de CO₂, consumo de carbono na fotossíntese ou perdas por difusão), serão realizadas mudanças para restabelecer esse equilíbrio. Quando o CO₂ é injetado na cultura, a concentração de íons H⁺ aumenta após a produção de H₂CO₃, levando a redução do pH do meio e, por conseguinte o aumento da concentração de carbono inorgânico total. No entanto, quando o CO₂ é consumido pelas microalgas durante a fotossíntese ou perdido para a atmosfera, a concentração de íons H⁺ diminui. Nesse caso, a fração de CO₃²⁻

aumenta ligeiramente, impedindo o aumento do pH do sistema e a redução da concentração de carbono inorgânico total.

Tabela 2 - Taxa máxima de fixação de CO₂ (T_{CO₂máx}), eficiência máxima de utilização de CO₂ (E_{CO₂máx}) e concentração de carbono (C) na biomassa de *C. fusca*.

Ensaio	T _{CO₂máx} (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	E _{CO₂máx} (% m m ⁻¹)	C (% m m ⁻¹)
Controle	-	-	52,7 ^{a, b} ± 1,4
0,03%	250,9 ^d ± 2,7	91,5 ^a ± 1,0	50,0*
5%	347,4 ^b ± 15,2	60,7 ^b ± 2,7	53,7 ^a ± 0,2
10%	316,6 ^c ± 2,3	36,0 ^c ± 0,3	50,2 ^b ± 1,1
15%	390,9 ^a ± 2,5	33,1 ^d ± 0,2	54,9 ^a ± 0,6

Letras sobscritas iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferiram estatisticamente ao nível de 95% de confiança (p > 0,05); *considerada a fração de 50,0% (m m⁻¹) de carbono na biomassa.

O carbono constitui aproximadamente 50% da biomassa microalgal (GROBBELAAR, 2013). No presente trabalho, o teor de carbono na biomassa variou entre 50,2% e 54,9% (m m⁻¹), sendo os maiores valores verificados nos ensaios com o fornecimento de 5% e 15% de CO₂ (Tabela 2). A taxa de fixação de CO₂ e a eficiência de utilização de CO₂ são parâmetros importantes para avaliar o potencial de remoção desse gás de efeito de estufa (ROSA et al., 2015). O maior valor para T_{CO₂máx} foi observado com o fornecimento de 15% de CO₂ (390,9 mg L⁻¹ d⁻¹) e esse resultado foi significativamente diferente (p < 0,05) dos demais tratamentos. Quando comparado com o ensaio realizado com injeção de ar (0,03% de CO₂), a taxa de fixação máxima para o cultivo com 15% de CO₂ foi 55,8% superior. No entanto, foi observado redução de 63,8% no valor de E_{CO₂máx} com o aumento da concentração de CO₂ de 0,03% para 15% (Tabela 2). Freitas, Morais e Costa (2017b) observaram incremento no valor de T_{CO₂} por *Chlorella minutissima* quando a concentração de CO₂ passou de 10% (250,4 mg L⁻¹ d⁻¹) para 20% (v v⁻¹) (274,6 mg L⁻¹ d⁻¹). Ademais, o aumento da concentração de CO₂ (10-20%) fornecido ao cultivo resultou no decréscimo de 70,7% para 38,8% da resposta E_{CO₂}.

Os resultados encontrados estão de acordo com Chai e Zhao (2012), que verificaram em cultivos de *Chlorococcum* sp. redução de 19% na eficiência de fixação de CO₂ com o aumento da concentração de CO₂ na corrente gasosa de 10% para 15% (v v⁻¹). Conforme relatado por Duarte-Santos et al. (2016) não só o aumento da concentração de CO₂ na corrente gasosa, como também o incremento da vazão de injeção, pode resultar em maiores perdas de carbono para a atmosfera. Isso ocorre devido a sobressaturação do cultivo com a fonte de

carbono quando são utilizadas altas concentrações de CO₂, levando a maiores perdas do gás para a atmosfera.

A adição de CO₂ no cultivo de microalgas não só influencia o crescimento, como também o metabolismo e a composição bioquímica da biomassa (KASSIM; MENG, 2017). A biomassa microalgal é considerada fonte de proteínas. Para a sua aplicação em alimentos, essa pode ser usada na sua forma completa, ou as proteínas podem ser extraídas e incorporadas em produtos destinados a alimentação humana e/ou animal (HAYES et al., 2017). Como podemos observar na Tabela 3, as proteínas representam a maior fração entre as macromoléculas avaliadas. As maiores concentrações de proteínas foram obtidas no ensaio controle e com 0,03% de CO₂, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) das demais condições avaliadas. Desta forma, os ensaios com injeção de maiores concentrações de CO₂ apresentaram os menores valores do teor de proteínas na biomassa de *C. fusca*.

Tabela 3 - Resultados de concentração de proteínas, carboidratos e lipídios na biomassa (base seca) de *C. fusca* LEB 111 e produção teórica de etanol (P_{Etanol}).

Ensaio	Proteínas (% m m ⁻¹)	Carboidratos (% m m ⁻¹)	Lipídios (% m m ⁻¹)	*P _{Etanol} (mL 100 g ⁻¹)
Controle	40,6 ^a ± 0,7	24,9 ^c ± 0,4	25,4 ^c ± 0,8	11,3 ^c ± 0,2
0,03%	38,3 ^a ± 1,8	23,7 ^c ± 0,3	26,0 ^c ± 1,6	10,8 ^c ± 0,1
5%	31,6 ^b ± 1,2	29,2 ^b ± 0,7	29,6 ^a ± 1,0	13,3 ^b ± 0,3
10%	33,5 ^b ± 1,3	31,9 ^a ± 1,2	26,2 ^{b, c} ± 0,8	14,5 ^a ± 0,5
15%	32,5 ^b ± 1,6	28,7 ^b ± 1,4	28,3 ^{a, b} ± 0,7	13,0 ^b ± 0,6

Letras sobrescritas iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferiram estatisticamente ao nível de 95% de confiança ($p > 0,05$); *P_{Etanol} – produção teórica de etanol (mL 100 g⁻¹ biomassa)

Conforme relatado por Ación et al. (2012b), a biomassa é composta por macromoléculas, tais como proteínas, carboidratos e lipídios, e todas essas frações devem ser avaliadas e utilizadas de alguma forma, a fim de viabilizar o processo de cultivo microalgal. Nesse sentido, os lipídios podem ser extraídos e utilizados para a produção de biodiesel mediante processo de transesterificação. O resíduo de biomassa proveniente desse processo pode ser empregado na produção de biogás por meio da digestão anaeróbica, que pode ser utilizado como fonte de energia e CO₂. Outro uso proposto para a biomassa seria como fonte de aminoácidos e/ou para produzir bioetanol.

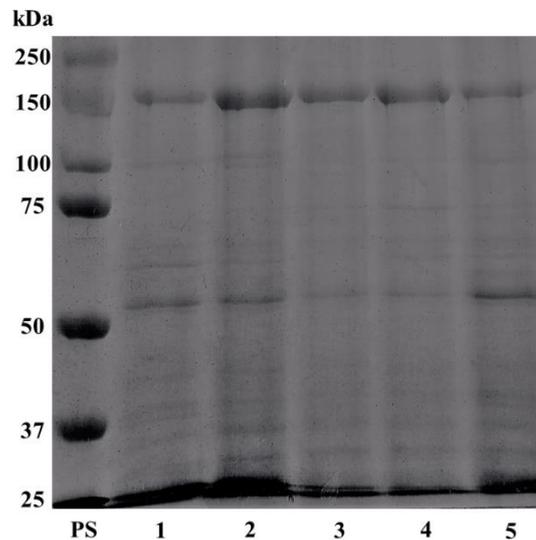
As maiores concentrações de lipídios foram verificadas nos ensaios com 5% e 15% de CO₂, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) em comparação com os demais ensaios

(Tabela 3). O teor de lipídios do ensaio com 5% de CO₂ foi aproximadamente 86,2% superior ao obtido com a mesma cepa por Duarte, Fanka e Costa (2016) em cultivos com 10% de CO₂, 200 ppm de SO₂, 200 ppm de NO e 40 ppm de cinzas. Basu et al. (2014) relataram a redução do teor de proteínas e o incremento de lipídios na biomassa de *Scenedesmus obliquus* SA1 com o aumento da concentração de CO₂ em comparação com o ensaio controle. De acordo com Toledo-Cervantes et al. (2013) o aumento da concentração de CO₂ de 0,04% para 5% (v v⁻¹) favoreceu o acúmulo de lipídios de 15% para 49%, respectivamente, na biomassa *Scenedesmus obtusiusculus*. Segundo Solovchenko e Khozin-Goldberg (2013), nessas condições, as microalgas podem produzir compostos energéticos, como o triacilglicerol, que contribuem para a tolerância desses micro-organismos a elevados níveis de CO₂. Este fato pode ocorrer devido à capacidade das microalgas em redirecionar a via metabólica quando há excesso de produtos da fotossíntese.

A biomassa de microalgas é considerada matéria-prima promissora para a produção de bioetanol, devido ao elevado teor de carboidratos (MORAIS et al., 2016). A injeção de CO₂ no cultivo de *C. fusca* promoveu o incremento da concentração de carboidratos na biomassa. No ensaio com 10% de CO₂, verificou-se a maior concentração de carboidratos (31,9% m m⁻¹) e conseqüentemente a maior produção teórica de etanol (14,5 mL 100 g⁻¹ de biomassa) (Tabela 3), com diferença significativa (p < 0,05) em relação aos demais tratamentos. Nesse ensaio, foi possível verificar que o fornecimento de 10% de CO₂ aumentou em 34,4% o teor de carboidratos na biomassa *C. fusca* LEB 111, em comparação ao cultivo com 0,03% de CO₂. Freitas, Moraes e Costa (2017b) também observaram que a adição de 20% de CO₂ (v v⁻¹), associada à redução da fonte de nitrogênio (1,25 mmol L⁻¹ N) em cultivos de *Chlorella minutissima* favoreceu o acúmulo de carboidratos (52,3% m m⁻¹) na biomassa, bem como maior produção teórica de etanol (33,9 mL 100 g⁻¹ de biomassa). Rosa et al. (2015) verificaram que a adição de CO₂ juntamente com o absorvente químico monoetanolamina (MEA), favoreceu a produção de carboidratos (28,2% m m⁻¹) em *Spirulina* sp. LEB 18, e conseqüentemente aumentou a produção teórica de etanol (12,8 mL 100 g⁻¹ de biomassa).

A ribulose-1,5-bisfosfato-carboxilase/oxigenase (Rubisco) é considerada uma enzima chave no processo de fixação de CO₂ (FREITAS; MORAIS; COSTA, 2017b; PINTO et al., 2013; SPREITZER; SALVUCCI, 2002). Os perfis de proteínas foram obtidos por SDS-PAGE (Figura 5) e comparados com padrão de proteína conhecido (PS). A proteína encontrada em todos os ensaios pode então ser atribuída a Rubisco (subunidade de 56 kDa). Entre os tratamentos aplicados, os maiores níveis de Rubisco foram verificados quando a microalga foi cultivada com 15% de CO₂ (poço 5) (Figura 5).

Figura 5 - Eletroforese descontínua em gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) comparativa para o perfil proteico da biomassa de *C. fusca* LEB 111 (amostras do 15º d): padrão de proteína (PS); poço 1 - 0,03% de CO₂; poço 2 - controle; poço 3 - 5% de CO₂; poço 4 - 10% de CO₂; poço 5 - 15% de CO₂



Os resultados para o perfil proteico juntamente com a taxa de fixação de CO₂ e produtividade de biomassa obtidos com 15% de CO₂ são semelhantes aos verificados por Freitas, Morais e Costa (2017b). Esses autores relacionaram os níveis elevados de Rubisco em *Chlorella minutissima* com os altos valores de biofixação de CO₂ e crescimento celular, quando a microalga foi cultivada com CO₂ e pentose, atribuindo a menor degradação da referida proteína com as condições experimentais empregadas.

Os ensaios controle (poço 2) e com adição do CO₂ do ar (0,03% de CO₂) (poço 1) também apresentaram bandas com maior intensidade para a proteína Rubisco (Figura 5). Este resultado pode ser atribuído a maior concentração de proteínas totais na biomassa (Tabela 3) observada nestas condições experimentais. Para os ensaios com injeção de 5% e 10% de CO₂ foi possível observar redução nos níveis de Rubisco (Figura 5 - poços 3 e 4), quando comparados as bandas detectadas nos demais ensaios. Conforme relatado na literatura, o carbono resultante da degradação de proteínas, como a Rubisco, pode ser utilizado para a formação de carboidratos (GHYSELS; FRANCK, 2010; PINTO et al., 2013; ZHANG; HAPPE; MELIS, 2002), como observado no ensaio com adição de 10% de CO₂ (Tabela 3).

4 CONCLUSÃO

Com este estudo foi possível verificar que *Chlorella fusca* LEB 111 apresentou maiores resultados de produtividade de biomassa ($194,3 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e taxa de fixação de CO_2 ($390,9 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) quando cultivada com 15% de CO_2 . O fornecimento de 15% de CO_2 contribuiu para o aumento dos níveis da proteína Rubisco. Resultados promissores também foram verificados quanto às concentrações de carboidratos na biomassa ($31,9\% \text{ m m}^{-1}$) e produção teórica de etanol ($14,5 \text{ mL } 100 \text{ g}^{-1}$ de biomassa) quando a microalga foi cultivada com 10% de CO_2 . As maiores concentrações de lipídios na biomassa foram verificadas quando adicionado CO_2 nas concentrações de 5% ($29,6\% \text{ m m}^{-1}$) e 15% ($28,3\% \text{ m m}^{-1}$). Portanto, foi constatado que *C. fusca* apresenta potencial para ser cultivada com elevadas concentrações de CO_2 , estas semelhantes as presentes nos gases de combustão, e com isso produzir biomassa com potencial de aplicação em biocombustíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACIÉN, F. G.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C. V.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J. M.; MOLINA GRIMA, E. Conversion of CO_2 into biomass by microalgae: How realistic a contribution may it be to significant CO_2 removal? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 3, p. 577–586, 2012.
- ANDRADE, G. A. De; PAGANO, D. J.; GUZMAN, J. L.; BERENGUEL, M.; FERNANDEZ, I.; ACIEN, F. G. Distributed Sliding Mode Control of pH in Tubular Photobioreactors. **IEEE Transactions on Control Systems Technology**, v. 24, n. 4, p. 1160–1173, 2016.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. **Association of Official Analysis Chemists International**, 2000.
- APHA. **American Public Health Association (APHA). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed.** Washington DC., 1998.
- BASU, S.; ROY, A. S.; MOHANTY, K.; GHOSHAL, A. K. CO_2 biofixation and carbonic anhydrase activity in *Scenedesmus obliquus* SA1 cultivated in large scale open system. **Bioresource Technology**, v. 164, p. 323–330, 2014.
- BRUNE, D. E.; NOVAK, J. T. The use of carbonate equilibrium chemistry in quantifying algal carbon uptake kinetics. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 71–76, 1981.
- CAMACHO RUBIO, F.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; SÁNCHEZ PÉREZ, J. A.; GARCÍA CAMACHO, F.; MOLINA GRIMA, E. Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide

concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, n. 1, p. 71–86, 1999.

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

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

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

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

CHIU, S. Y.; KAO, C. Y.; TSAI, M. T.; ONG, S. C.; CHEN, C. H.; LIN, C. S. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 833–838, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

FREITAS, B. C. B.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. *Chlorella minutissima* cultivation with CO₂ and pentoses: Effects on kinetic and nutritional parameters. **Bioresource Technology**, v. 244, n. July, p. 338–344, 2017b.

GHYSELS, B.; FRANCK, F. Hydrogen photo-evolution upon S deprivation stepwise: an illustration of microalgal photosynthetic and metabolic flexibility and a step stone for future biotechnological methods of renewable H₂ production. **Photosynthesis Research**, v. 106, n. 1–2, p. 145–154, 2010.

GROBBELAAR, J. U. Inorganic Algal Nutrition. In: RICHMOND, A.; QIANG, H. (Ed.). **Handbook of microalgal culture : applied phycology and biotechnology**. Second ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2013. p. 123–133.

HAYES, M.; SKOMEDAL, H.; SKJÅNES, K.; MAZUR-MARZEC, H.; TORUŃSKA-SITARZ, A.; CATALA, M.; ISLETEN HOSOGLU, M.; GARCÍA-VAQUERO, M. 15 - Microalgal proteins for feed, food and health A2 - Gonzalez-Fernandez, Cristina. In: MUÑOZ, R. B. T.-M.-B. B. AND B. (Ed.). **Woodhead Publishing Series in Energy**. [s.l.] Woodhead Publishing, 2017. p. 347–368.

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

HOLLAND, D. L.; GABBOTT, P. A. A Micro-Analytical Scheme for the Determination of Protein, Carbohydrate, Lipid and RNA Levels in Marine Invertebrate Larvae. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 51, n. 3, p. 659–668, 1971.

JIANG, Y.; ZHANG, W.; WANG, J.; CHEN, Y.; SHEN, S.; LIU, T. Utilization of simulated flue gas for cultivation of *Scenedesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 359–364, 2013.

KASSIM, M. A.; MENG, T. K. Carbon dioxide (CO₂) biofixation by microalgae and its potential for biorefinery and biofuel production. **Science of the Total Environment**, v. 584–585, p. 1121–1129, 2017.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

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

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

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.

- MORAES, L.; ROSA, G. M.; CARDIAS, B. B.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A. V. Microalgal biotechnology for greenhouse gas control : Carbon dioxide fixation by *Spirulina* sp. at different diffusers. **Ecological Engineering**, v. 91, p. 426–431, 2016.
- MORAIS, E. G.; MORAES, L.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Biodiesel and Bioethanol from Microalgae. In: SOCCOL, C. R.; BRAR, S. K.; FAULDS, C.; RAMOS, L. P. (Ed.). **Green Fuels Technology**. Green Energy and Technology. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 359–386.
- MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 9, p. 1349–1352, 2007.
- PINTO, T. S.; MALCATA, F. X.; ARRABAÇA, J. D.; SILVA, J. M.; SPREITZER, R. J.; ESQUÍVEL, M. G. Rubisco mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* enhance photosynthetic hydrogen production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 12, p. 5635–5643, 2013.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1–61, 1979.
- ROSA, G. M.; MORAES, L.; CARDIAS, B. B.; SOUZA, M. da R. A. Z.; COSTA, J. A. V. Chemical Absorption and CO₂ Biofixation via the Cultivation of *Spirulina* in Semicontinuous Mode with Nutrient Recycle. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 321–327, 2015.
- SINGH, S. P.; SINGH, P. Effect of CO₂ concentration on algal growth : A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 38, p. 172–179, 2014.
- SOLOVCHENKO, A.; KHOZIN-GOLDBERG, I. High-CO₂ tolerance in microalgae: Possible mechanisms and implications for biotechnology and bioremediation. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 11, p. 1745–1752, 2013.
- SPREITZER, R. J.; SALVUCCI, M. E. RUBISCO: Structure, Regulatory Interactions, and Possibilities for a Better Enzyme. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, n. 1, p. 449–475, 2002.
- TANG, D.; HAN, W.; LI, P.; MIAO, X.; ZHONG, J. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3071–3076, 2011.
- TOLEDO-CERVANTES, A.; MORALES, M.; NOVELO, E.; REVAH, S. Carbon dioxide fixation and lipid storage by *Scenedesmus obtusiusculus*. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 652–658, 2013.
- US DOE. **National Algal Biofuels Technology Roadmap** U.S. Department of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, 2010.
- VAZ, B. S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. CO₂ Biofixation by the Cyanobacterium *Spirulina* sp. LEB 18 and the Green Alga *Chlorella fusca* LEB 111 Grown Using Gas Effluents and Solid Residues of Thermoelectric Origin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 178, p. 418–429, 2016.

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

ZHANG, K.; KURANO, N.; MIYACHI, S. Optimized aeration by carbon dioxide gas for microalgal production and mass transfer characterization in a vertical flat-plate photobioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 25, n. 2, p. 97–101, 2002.

ZHANG, L.; HAPPE, T.; MELIS, A. Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). **Planta**, v. 214, n. 4, p. 552–561, 2002.

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

ZHOU, W.; WANG, J.; CHEN, P.; JI, C.; KANG, Q.; LU, B.; LI, K.; LIU, J.; RUAN, R. Bio-mitigation of carbon dioxide using microalgal systems: Advances and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, n. April 2016, p. 1163–1175, 2017.

ARTIGO 2

CULTIVO DE *Chlorella fusca* EM DUPLO ESTÁGIO COM ADIÇÃO DE CO₂ E NaCl

CULTIVO DE *Chlorella fusca* EM DUPLO ESTÁGIO COM ADIÇÃO DE CO₂ E NaCl

RESUMO

O objetivo do estudo foi verificar a influência da concentração de cloreto de sódio (NaCl) no crescimento e na produtividade de lipídios ($P_{\text{lipídios}}$) e carboidratos ($P_{\text{carboidratos}}$) de *Chlorella fusca* LEB 111 quando cultivada em modo descontínuo (único estágio- UE) e em duplo estágio (DE) com adição de dióxido de carbono (CO₂). Para isso, ensaios foram realizados em três etapas: (1) seleção da concentração de NaCl (100, 200, 300, 400, 500 e 600 mmol L⁻¹); (2) ensaios em UE com as concentrações de NaCl selecionadas, realizados em fotobiorreatores tubulares verticais (FBRTv); (3) ensaios em DE, composto por dois estágios, o 1º (1º-12º d) com o fornecimento de 15% v v⁻¹ de CO₂ e o 2º (13º-18º d) com adição de NaCl (100 e 200 mmol L⁻¹), também realizados em FBRTv. A máxima concentração de biomassa ($X_{\text{máx}}$) foi verificada com a adição de 100 mmol L⁻¹ de NaCl, enquanto que a adição de 200 mmol L⁻¹ promoveu o incremento da $P_{\text{carboidratos}}$ em 81,0% em comparação ao ensaio controle (EC) na estratégia em UE. No cultivo em DE, no 2º estágio foi verificada a $X_{\text{máx}}$ com adição de 15% de CO₂ e 100 mmol L⁻¹ de NaCl. Ademais, nesta mesma condição experimental também foi observado aumento de 33,8% da $P_{\text{lipídios}}$ em comparação ao EC. Portanto, foi possível evidenciar que o emprego de NaCl na estratégia de UE, bem como a utilização de CO₂ e NaCl em DE, contribuíram para o crescimento e para o aumento da produtividade de carboidratos e lipídios em cultivos de *C. fusca*.

Palavras-chave: Biomassa. Cloreto de sódio. Dióxido de carbono. Macromoléculas. Produtividade.

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são micro-organismos, que devido a sua capacidade de realizar fotossíntese, e, portanto, fixar CO₂ podem ser utilizadas na redução de gases de efeito estufa (ZHAO; SU, 2014). Estes micro-organismos são compostos por macromoléculas, como lipídios, proteínas e carboidratos (CHUA; SCHENK, 2017), as quais podem ser empregadas como matéria-prima para a produção de cosméticos (BUONO et al., 2012), alimentos (SANTOS et al., 2016) e biocombustíveis (CHISTI, 2007).

Os biocombustíveis a partir de microalgas, estes pertencentes a terceira geração, são considerados alternativa promissora frente aos de primeira e segunda geração. Isso é destacado, pois as microalgas apresentam rápido crescimento e capacidade de acumular compostos de reserva com valor comercial (CHUA; SCHENK, 2017), assim como podem fixar CO₂ de gases de combustão (VAZ; COSTA; MORAIS, 2016). Ademais, o cultivo microalgal pode utilizar nutrientes a partir de águas residuais (POSADAS et al., 2015) e ser realizado em terras não aráveis (BRENNAN; OWENDE, 2010), não competindo com a produção de alimentos e outras culturas (CHISTI, 2007).

Os lipídios em microalgas estão na forma de acilgliceróis, fosfolipídios e glicolipídeos (HALIM; DANQUAH; WEBLEY, 2012), enquanto que os carboidratos se acumulam na forma de polissacarídeos e componentes da parede celular (CHEN et al., 2013). Diversos estudos relataram que estas macromoléculas são sintetizadas preferencialmente em condições de estresse, como restrição de nitrogênio (MARGARITES; COSTA, 2014), modificação do pH (QIU et al., 2017), elevada concentração de CO₂ (CHEN et al., 2017; FREITAS; MORAIS; COSTA, 2017), aumento da salinidade (PANCHA et al., 2015), temperatura (CHOKSHI et al., 2015) e intensidade luminosa (FREITAS et al., 2017).

A salinidade é um dos fatores que pode afetar tanto o crescimento quanto a composição da biomassa. O estresse salino pode levar ao incremento do teor de lipídios na biomassa microalgal, devido a alterações no metabolismo dos ácidos graxos. Os carboidratos se acumulam nas células de microalgas para atuar na regulação osmótica, a fim de proteger suas biomoléculas (PANDIT; FULEKAR; KARUNA, 2017).

A maioria dos estudos avaliam os efeitos da salinidade em relação ao acúmulo de lipídios em microalgas marinhas, enquanto que poucas pesquisas são realizadas para avaliar o efeito deste parâmetro na biossíntese de carboidratos e lipídios em microalgas de água doce (PANCHA et al., 2015). As condições de estresse podem otimizar o teor de carboidratos e lipídios em microalgas, porém a aplicação destes fatores pode resultar no decréscimo do

crescimento, não permitindo assim a correlação da produtividade de biomassa e o acúmulo destas macromoléculas. Como por exemplo para os lipídios, a produtividade lipídica considera tanto o teor desta macromolécula na biomassa, quanto a concentração de biomassa produzida. Portanto, essa avaliação é uma forma mais útil para indicar os custos potenciais de produção de biocombustíveis líquidos a partir de biomassa microalgal (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Com a finalidade de aumentar a aplicação da biomassa de microalgas na produção de biocombustíveis, são propostas estratégias de cultivo para o aumento, não só do teor destes compostos de reserva, mas também da produtividade destas macromoléculas. No modo em duplo estágio, na primeira etapa as microalgas são submetidas a condições ideais, para que ocorra o incremento da produtividade de biomassa. Ao alcançar determinada concentração celular, se inicia a segunda fase, na qual ocorre o aumento dos compostos de reserva, mediante a aplicação de condições de estresse (PANCHA et al., 2015; RA et al., 2015).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi cultivar *C. fusca* LEB 111 com diferentes concentrações de cloreto de sódio e avaliar o seu efeito no crescimento e na produtividade de lipídios e carboidratos em modo descontínuo (único estágio) e em duplo estágio com adição de CO₂.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO

A microalga utilizada foi *Chlorella fusca* LEB 111 (DUARTE; FANKA; COSTA, 2016) pertencente à Coleção de Culturas do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) (Anexo I – Figura A1). A cepa foi isolada em água proveniente de lagoas de sedimentação de cinzas na Usina termelétrica Presidente Médici (UTPM), na cidade de Candiota, Brasil. O inóculo foi mantido em meio de cultivo BG-11 (Anexo I – Tabela A1) (RIPPKA et al., 1979).

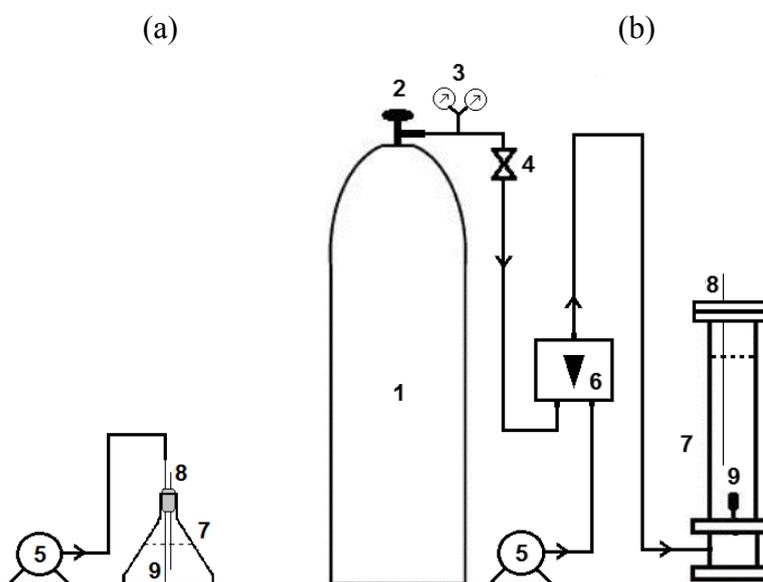
2.2 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

2.2.1 Seleção da concentração de cloreto de sódio e ensaios em único estágio

Na primeira etapa do trabalho foram realizados ensaios com o objetivo de verificar a tolerância da microalga frente a diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl). As concentrações de NaCl avaliadas nesta etapa foram 100, 200, 300, 400, 500 e 600 mmol L⁻¹.

Estes ensaios foram realizados em fotobiorreatores do tipo *Erlenmeyer* de 0,5 L com volume útil de 0,4 L (Figura 1a), durante 4 d. Os cultivos foram realizados com meio de cultivo BG-11 adicionado de $0,4 \text{ g L}^{-1}$ de NaHCO_3 e a agitação foi promovida por meio de borbulhamento de ar comprimido (Anexo I – Figura A3).

Figura 1 – Diagrama esquemático dos ensaios realizados em fotobiorreatores do tipo *Erlenmeyer* (a) e em fotobiorreatores tubulares verticais (b): (1) cilindro de CO_2 industrial; (2) válvula de abertura do cilindro; (3) manômetro e medidor de vazão; (4) válvula solenoide; (5) mini compressor de ar; (6) conjunto de controladores de vazão; (7) fotobiorreator; (8) amostrador; (9) aspersor de ar ou de CO_2



Fonte: Adaptado de Rosa (2014)

Após a realização da etapa de seleção, foram realizados ensaios em único estágio (UE), os quais foram conduzidos em fotobiorreatores tubulares verticais (FBRTv) de 1,8 L, com volume útil de 1,5 L (0,060 m de diâmetro e 0,55 m de altura) (Figura 1b). As concentrações de 100 e 200 mmol L^{-1} de NaCl foram utilizadas e o tempo de cultivo foi 15 d. O meio de cultivo utilizado foi BG-11 (Anexo I – Figura A4).

Tanto na etapa de seleção, quanto nos ensaios em UE, a concentração inicial dos cultivos utilizada foi $0,2 \text{ g L}^{-1}$ (MORAIS; COSTA, 2007). Os ensaios foram realizados em duplicata e conduzidos em modo descontínuo, mantidos a 30°C , fotoperíodo 12 h claro e 12 h escuro e iluminância de $44,8 \mu\text{mol}_{\text{fótons}} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. A agitação dos cultivos em UE foi realizada mediante ao borbulhamento de ar comprimido injetado através de aspersor (pedra sinterizada), esse localizado na parte inferior do fotobiorreator, à vazão de $0,45 \text{ L min}^{-1}$ (MORAES et al.,

2016). Ensaios controle (sem adição de NaCl) foram realizados em ambas as bateladas, a fim de comparar com o efeito da adição de NaCl nos cultivos. A evaporação diária dos cultivos foi compensada pela adição de água destilada estéril.

2.2.2 Ensaios em duplo estágio

A partir da seleção da concentração de CO₂ (Artigo 1) e de NaCl nas etapas anteriores, foram conduzidos ensaios em duplo estágio (DE). Os experimentos foram realizados em FBRTv com volume útil de 1,5 L (Figura 1b), conduzidos em duplicata, nas mesmas condições experimentais de temperatura, fotoperíodo, iluminância e aeração dos ensaios em UE (Anexo I – Figura A5). Durante o período claro, a corrente gasosa composta por ar comprimido foi enriquecida com 15% v v⁻¹ de CO₂ (CO₂ puro 99,5%), o qual foi injetado de maneira intermitente por 2 min a cada 2 h. As vazões de ar e CO₂ foram controladas por medidores de vazão (Cole Parmer, EUA). O primeiro estágio ocorreu entre o 1º e 12º d, no qual os ensaios foram cultivados em meio de cultivo BG-11 isento de carbonato de sódio (Na₂CO₃). O segundo estágio de cultivo ocorreu entre o 13º e 18º d, com a adição de NaCl aos cultivos nas concentrações de 100 e 200 mmol L⁻¹. Para comparar com o tratamento proposto, foi realizada duplicata de ensaio controle (sem adição de NaCl) com meio de cultivo BG-11 padrão. Da mesma forma como realizado na etapa anterior, os cultivos tiveram a evaporação diária compensada pela adição de água destilada estéril.

2.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

2.3.1 Concentração de biomassa

A concentração de biomassa (X_b) foi determinada por medida da densidade óptica a 670 nm em espectrofotômetro digital (Shimadzu UV/VIS UVMMini-1240, Japão) a cada 24 h (COSTA et al., 2002), utilizando curva padrão de *C. fusca* LEB 111 ($X_b = 0,2612$ absorbância - 0,0064, com $R^2 = 0,9941$).

2.3.2 pH e carbono inorgânico dissolvido

O pH dos cultivos foi determinado diariamente em pHmetro digital (Metter Toledo FiveGo™, Suíça). Nos ensaios realizados em FBRTv em duplo estágio também foi determinada a alcalinidade total por titulação potenciométrica a cada 72 h (APHA, 1998). Os valores de pH e alcalinidade total foram utilizados para calcular a concentração de carbono inorgânico

dissolvido (CID) no meio líquido, frações de carbonato (CO_3^{2-}) e bicarbonato (HCO_3^-), a partir das equações de equilíbrio químico (BRUNE; NOVAK, 1981; CAMACHO RUBIO et al., 1999), como demonstrado por Rosa et al. (2015).

2.4 RECUPERAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA

Ao final dos ensaios, a biomassa foi recuperada do meio líquido por centrifugação (Hitachi himac - CR-GIII, Japão) (15.200 g, 20°C e 10 min), ressuspensa em água destilada e novamente centrifugada nas mesmas condições para remoção dos sais. Ademais, a biomassa concentrada foi congelada a -80°C durante 48 h, liofilizada (Labconco, EUA) e armazenada a -20°C para posterior caracterização.

Para a determinação da concentração de proteínas e carboidratos na biomassa foi preparado um extrato, este composto por 10 mg de biomassa microalgal liofilizada e 20 mL de água destilada. Após preparado, o extrato foi submetido a ruptura celular em sonda ultrassônica por 10 min, com ciclos de 59 s ligado e 59 s desligado (Cole Parmer, CPX130, EUA). A concentração de proteínas foi determinada por método proposto por Lowry et al. (1951), com prévia hidrólise térmica e alcalina, utilizando curva padrão de albumina de soro bovino (pureza de 98%). O teor de carboidratos foi determinado mediante método proposto por Dubois et al. (1956), utilizando curva padrão de glicose.

Os lipídios foram extraídos da biomassa liofilizada utilizando mistura de solventes (clorofórmio e metanol) e ruptura celular com esferas de vidro e aquecimento à 60°C. A quantificação dos lipídios foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico 375 nm proposto por Marsh e Weinstein (1966), utilizando tripalmitina como padrão (HOLLAND; GABBOTT, 1971). A quantificação dos teores de umidade e cinzas na biomassa foi realizada por metodologia oficial da AOAC (2000). A biomassa liofilizada obtida nos ensaios em DE foi avaliada quanto a concentração de carbono elementar no 12º d e 18º d de cultivo, determinada em analisador elementar CHNS/O (Perkin Elmer 2400, EUA), utilizando acetanilida como padrão.

2.5 PERFIL PROTEICO

As proteínas contidas em 1,5 mL de cultivo em UE foram extraídas com adição de tampão amostra (4 x tampão amostra: Tris/HCl (80 mmol L⁻¹ - pH 6,8), dodecilsulfato de sódio-SDS (2% m v⁻¹), glicerol (15% v v⁻¹), *m*-cresol púrpura (0,006% m v⁻¹) e 2-mercaptoetanol (0,1 mol L⁻¹)), submetidas a aquecimento por 5 min a 98°C, seguido de centrifugação a 10.000 g

por 1 min. Os extratos contendo as proteínas foram submetidos à eletroforese descontínua em gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). A eletroforese foi realizada de acordo com Laemmli (1970), utilizando gel de acrilamida de concentração e separação nas concentrações de 5 e 12,5%, respectivamente. Os poços foram carregados igualmente com 15 μL de extrato.

2.6 RESPOSTAS AVALIADAS

2.6.1 Parâmetros de crescimento

A partir dos valores de concentração de biomassa da microalga foram obtidas as concentrações máximas de biomassa ($X_{\text{máx}}$, g L^{-1}) e determinadas as produtividades de biomassa. A produtividade volumétrica de biomassa (P_x , $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) dos cultivos foi calculada de acordo com a Equação 1, na qual X_t (mg L^{-1}) é a concentração de biomassa no tempo t (d) e X_0 (mg L^{-1}) é a concentração de biomassa no tempo t_0 (d). A produtividade volumétrica máxima ($P_{\text{máx}}$, $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) é o máximo valor obtido em cada ensaio e a produtividade volumétrica média ($P_{\text{média}}$, $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) é a média dos valores para um intervalo de tempo estabelecido.

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

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, d^{-1}) foi obtida pela regressão linear da fase logarítmica de crescimento da microalga ($\ln X$ versus t). O tempo de geração de biomassa (t_g , d) foi calculado de acordo com a Equação 2.

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

2.6.2 Parâmetros de fixação de CO_2

A taxa de fixação de CO_2 (T_{CO_2} , $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) foi calculada segundo a Equação 3, em que P_x ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) é a produtividade volumétrica de biomassa determinada em cada ensaio, x_{cbm} é a fração mássica de carbono determinada por análise elementar, MM_{CO_2} (g mol^{-1}) e MM_{C} (g mol^{-1}) são as massas molares de CO_2 e do carbono, respectivamente.

$$T_{\text{CO}_2} = P_x \cdot x_{\text{cbm}} \cdot \frac{MM_{\text{CO}_2}}{MM_{\text{C}}} \quad (3)$$

A eficiência de utilização do CO₂ (E_{CO_2} , % m m⁻¹) foi calculada segundo a Equação 4, em que T_{CO_2} é a taxa de fixação de CO₂ (mg L⁻¹ d⁻¹), $V_{\text{útil}}$ é o volume útil do fotobiorreator (1,5 L) e \dot{m}_{CO_2} é taxa mássica de alimentação com CO₂ (mg d⁻¹).

$$E_{CO_2} = \frac{(T_{CO_2} \cdot V_{\text{útil}})}{\dot{m}_{CO_2}} \cdot 100 \quad (4)$$

2.6.3 Produtividade das macromoléculas

A produtividade de carboidratos e lipídios (P_M , mg L⁻¹ d⁻¹) nos cultivos em único e duplo estágio foi calculada de acordo com a Equação 5, em que P_X é a produtividade volumétrica de biomassa (mg L⁻¹ d⁻¹), f_{CL} é a concentração de carboidratos ou lipídios na biomassa (mg mg_{biomassa}⁻¹).

$$P_M = P_X \cdot f_{CL} \quad (5)$$

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

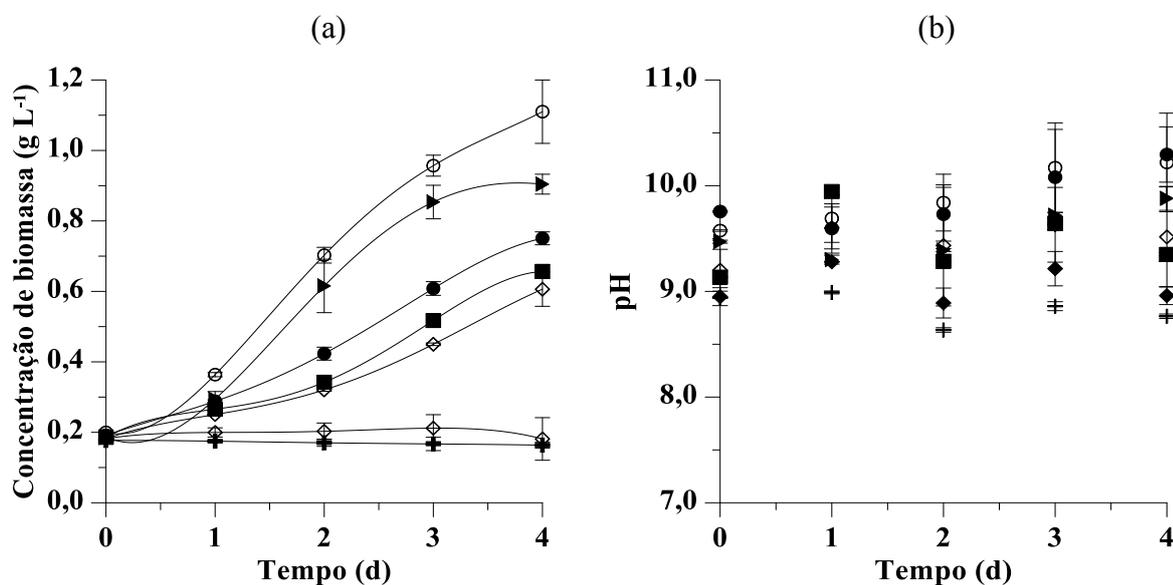
Os resultados dos ensaios foram avaliados mediante análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para comparação de médias com 95% de confiança.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SELEÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE NaCl E CULTIVO EM ÚNICO ESTÁGIO

Na etapa de seleção das concentrações de NaCl foi observado que *C. fusca* LEB 111 apresentou crescimento quando cultivada em concentrações entre 100 e 400 mmol L⁻¹, porém os maiores resultados de concentração de biomassa (X_b) foram obtidos nos ensaios com 100 e 200 mmol L⁻¹. Nos ensaios com as concentrações de 500 e 600 mmol L⁻¹ de NaCl, as células permaneceram em fase de latência todo o período de cultivo (Figura 2a), desta forma não conseguiram se adaptar a salinidade testada. Segundo Vonshak (1997a) a ocorrência de fase de latência pode estar associada a redução no teor de clorofilas nas células e do crescimento, isso causado pela inibição do sistema fotossintético e respiratório após a exposição a elevada concentração de sal.

Figura 2 – Concentração de biomassa (a) e pH (b) em função do tempo para os cultivos de *C. fusca* LEB 111 em diferentes concentrações de NaCl: (●) Controle (sem adição de NaCl), (○) 100 mmol L⁻¹, (▶) 200 mmol L⁻¹, (■) 300 mmol L⁻¹, (◊) 400 mmol L⁻¹, (◆) 500 mmol L⁻¹, (+) 600 mmol L⁻¹ de NaCl (média ± desvio padrão)

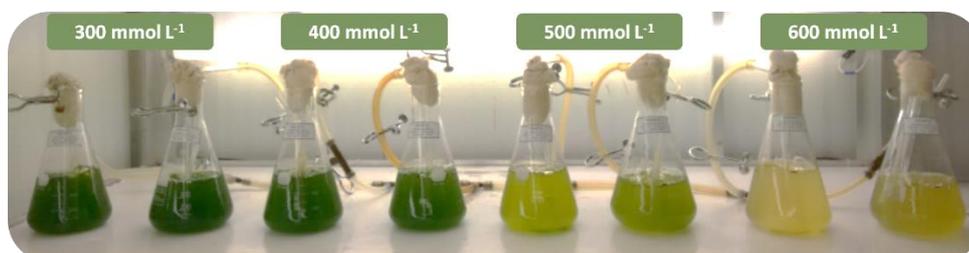


Os valores de X_b obtidos para os cultivos com adição de 100 e 200 mmol L⁻¹ de NaCl vão ao encontro dos resultados obtidos por Pandit, Fulekar e Karuna (2017). Os mencionados autores verificaram que a adição de NaCl (60 e 100 mmol L⁻¹) no cultivo favoreceu o crescimento de *Chlorella vulgaris*, enquanto que o aumento da concentração do sal para 300 e 400 mmol L⁻¹ causou o decréscimo nesta resposta. De acordo com Salama et al. (2013), a salinidade em baixas concentrações pode ser benéfica aos cultivos, pois fornece íons de sódio que são necessários para facilitar a fotossíntese das microalgas mediante a regulação do pH intracelular, absorção de nutrientes inorgânicos e tolerância à alcalinidade. Sujatha e Nagarajan (2014), cultivando a cianobactéria *Spirulina platensis* com diferentes concentrações de NaCl observaram o efeito deste composto sobre o crescimento e composição bioquímica da biomassa. Os autores verificaram que os cultivos com adição de 100 e 200 mmol L⁻¹ de NaCl apresentaram crescimento, níveis de clorofila e de proteínas semelhantes ao cultivo controle. Por outro lado, nos cultivos com 300 e 400 mmol L⁻¹ de NaCl foi verificado redução na concentração de biomassa.

Ao longo dos 4 d de cultivo, os valores de pH dos ensaios (Figura 2b) variaram entre 9,0 e 10,3, com os maiores valores verificados nos ensaios controle, 100 e 200 mmol L⁻¹ de NaCl, os quais obtiveram o maior crescimento. Ao observarmos a Figura 3, percebemos que o aumento da concentração de NaCl de 300 para 600 mmol L⁻¹ resultou na degradação dos

pigmentos fotossintéticos, o qual pode ser indicado pela mudança da coloração do cultivo de verde para amarelo, como nos ensaios com 500 e 600 mmol L⁻¹.

Figura 3 – Cultivos de *C. fusca* LEB 111 realizados em fotobiorreatores do tipo *Erlenmeyer* com diferentes concentrações de NaCl



A adição de elevada concentração de NaCl causou modificação na cor verde (natural) para amarela do cultivo de *Scenedesmus* sp. CCNM 1077, em comparação ao ensaio controle (PANCHA et al., 2015). Os autores, avaliando a concentração de pigmentos nas células, não só verificaram redução dos teores de clorofila *a* e *b*, como também no conteúdo total de carotenoides quando empregada a concentração de 400 mmol L⁻¹.

Tabela 1 - Concentração de proteínas, carboidratos e lipídios na biomassa em base seca de *Chlorella fusca* LEB 111 cultivada com diferentes concentrações de NaCl (mmol L⁻¹) em fotobiorreatores do tipo *Erlenmeyers*.

Ensaio	Proteínas (% m m ⁻¹)	Carboidratos (% m m ⁻¹)	Lipídios (% m m ⁻¹)
Controle	49,6 ^a ± <0,01	16,9 ^a ± 0,1	19,0 ^a ± 2,7
100 mmol L ⁻¹	46,2 ^{a, b} ± 0,3	23,6 ^a ± 2,0	20,2 ^a ± 0,4
200 mmol L ⁻¹	45,5 ^{a, b} ± 0,8	23,6 ^a ± 2,7	22,0 ^a ± 0,7
300 mmol L ⁻¹	45,4 ^{a, b} ± 2,2	19,0 ^a ± 0,8	22,0 ^a ± 0,1
400 mmol L ⁻¹	45,3 ^b ± 0,7	21,8 ^a ± 2,6	18,8 ^a ± 2,9
500 mmol L ⁻¹ *	-	-	-
600 mmol L ⁻¹ *	-	-	-

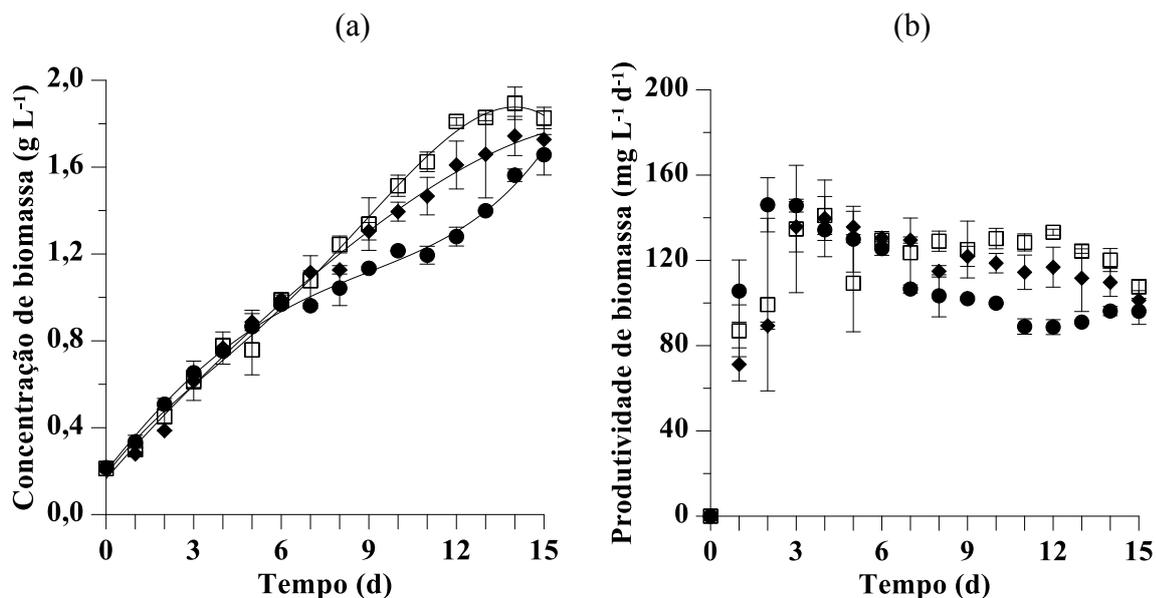
Letras sobrescritas iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferiram estatisticamente ao nível de 95% de confiança ($p > 0,05$). *Não determinada a concentração das macromoléculas devido à ausência de crescimento

As concentrações de lipídios e carboidratos não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Quanto ao conteúdo proteico, entre o ensaio controle e os cultivos com concentrações de NaCl até 300 mmol L⁻¹ não houve diferença

significativa ($p > 0,05$). No entanto, o ensaio controle apresentou concentração de proteínas estatisticamente superior ao cultivo com 400 mmol L^{-1} de NaCl. Diante dos resultados de crescimento e composição da biomassa, as concentrações de 100 e 200 mmol L^{-1} de NaCl foram selecionadas para realização dos cultivos em único e duplo estágio.

No corrente estudo, os ensaios realizados nos FBRTv em UE não apresentaram fase de adaptação (Figura 4a). Nesse sentido, a fase exponencial de crescimento ocorreu entre o início e o 3º d de cultivo para os ensaios controle e com 100 mmol L^{-1} de NaCl, enquanto que para o ensaio com 200 mmol L^{-1} a fase exponencial ocorreu até o 4º d de cultivo. Entre o 13º e 15º d foi observada tendência a fase estacionária nos cultivos com NaCl. Entretanto, os cultivos adicionados de NaCl apresentaram resultados de concentração de biomassa superiores ao ensaio controle a partir do 8º até o 14º d de cultivo. Em relação aos valores de produtividade de biomassa (Figura 4b), os maiores resultados de Px foram observadas entre o 2º e 3º d para o ensaio controle e entre o 3º e 4º d para os tratamentos com NaCl. O ensaio controle, a partir do 8º d de cultivo apresentou declínio acentuado da produtividade de biomassa, com resultado inferior aos ensaios cultivados com NaCl.

Figura 4 – Resultados de concentração de biomassa (a) e produtividade de biomassa (b) para os ensaios de *C. fusca* LEB 111 em FBRTv em UE: (●) Controle; (□) 100 mmol L^{-1} de NaCl; (◆) 200 mmol L^{-1} de NaCl (média \pm desvio padrão)



A máxima concentração de biomassa ($X_{\text{máx}}$) foi verificada no ensaio com adição de 100 mmol L^{-1} de NaCl, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) dos demais ensaios

(Tabela 2). Para as respostas $P_{\text{máx}}$, $\mu_{\text{máx}}$ e t_g não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Desta forma, ficou evidenciado que a adição de NaCl não prejudicou o crescimento da microalga *C. fusca* LEB 111 quando cultivada em fotobiorreator tubular em único estágio.

Pancha et al. (2015) avaliaram o efeito do NaCl (50 a 400 mmol L⁻¹) no cultivo de *Scenedesmus* sp. CCNM 1077 e observaram que o aumento de salinidade afetou o crescimento da microalga. Os autores verificaram redução em 30% da concentração de biomassa com a adição de 100 mmol L⁻¹ de NaCl, comparado com o ensaio controle. Vidyashankar et al. (2013) observaram que a microalga *Scenedesmus dimorphus* se mostrou tolerante até a concentração de 100 mmol L⁻¹ de NaCl, entretanto, a máxima concentração de biomassa (1,45 g L⁻¹) foi encontrada com 5 mmol L⁻¹.

Tabela 2 - Concentração máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$), produtividade máxima de biomassa ($P_{\text{máx}}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), tempo de geração (t_g), concentração de proteínas, carboidratos, lipídios, cinzas (base seca) e produtividade de carboidratos e lipídios na biomassa de *Chlorella fusca* cultivada com NaCl em único estágio (UE).

Parâmetro	Controle	100 mmol L ⁻¹ de NaCl	200 mmol L ⁻¹ de NaCl
$X_{\text{máx}}$ (g L ⁻¹)	1,67 ^b ± 0,08	1,90 ^a ± 0,07	1,76 ^b ± 0,09
$P_{\text{máx}}$ (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	150,8 ^a ± 7,5	147,5 ^a ± 15,9	143,5 ^a ± 13,9
$\mu_{\text{máx}}$ (d ⁻¹)	0,37 ^a ± 0,01	0,36 ^a ± 0,06	0,34 ^a ± 0,02
t_g (d)	1,86 ^a ± 0,06	1,98 ^a ± 0,31	2,05 ^a ± 0,12
Δt (d)*	0-3	0-3	0-4
R^{2**}	0,981 ± 0,018	0,981 ± 0,011	0,989 ± <0,001
Proteínas (% m m ⁻¹)	47,7 ^a ± 0,1	42,7 ^b ± 0,1	33,6 ^c ± 0,5
Carboidratos (% m m ⁻¹)	19,2 ^b ± 2,2	25,1 ^a ± 0,3	28,2 ^a ± 0,7
Lipídios (% m m ⁻¹)	21,2 ^b ± 0,1	24,3 ^a ± 1,0	25,2 ^a ± 0,1
Cinzas (% m m ⁻¹)	3,9 ^a ± 0,2	3,8 ^a ± 0,1	3,5 ^a ± 0,2
$P_{\text{carboidratos}}$ (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	17,4 ^c ± 1,9	27,8 ^b ± 0,4	31,5 ^a ± 0,8
$P_{\text{lipídios}}$ (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	20,4 ^b ± 1,3	25,8 ^a ± 1,6	27,7 ^a ± 0,4

Letras sobrescritas iguais na mesma linha indicam que as médias não diferiram estatisticamente ao nível de 95% de confiança ($p > 0,05$) * Δt : início-fim da fase exponencial de crescimento; **Coeficiente de determinação da regressão linear aplicada à fase logarítmica de crescimento do perfil ln x versus t.

A maior concentração de proteínas na biomassa foi obtida no ensaio controle, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) dos tratamentos adicionados de NaCl. A adição de NaCl na concentração de 200 mmol L⁻¹ no cultivo de *C. fusca* LEB 111 resultou na redução

em 29,6% no conteúdo proteico da biomassa. De acordo com Vonshak (1997b), quando as células estão expostas à estresse salino, tem sua eficiência reduzida no processo de captura de energia pela luz, bem como menor taxa de síntese proteica, tendo assim menor capacidade de reparar danos nas proteínas do fotossistema II.

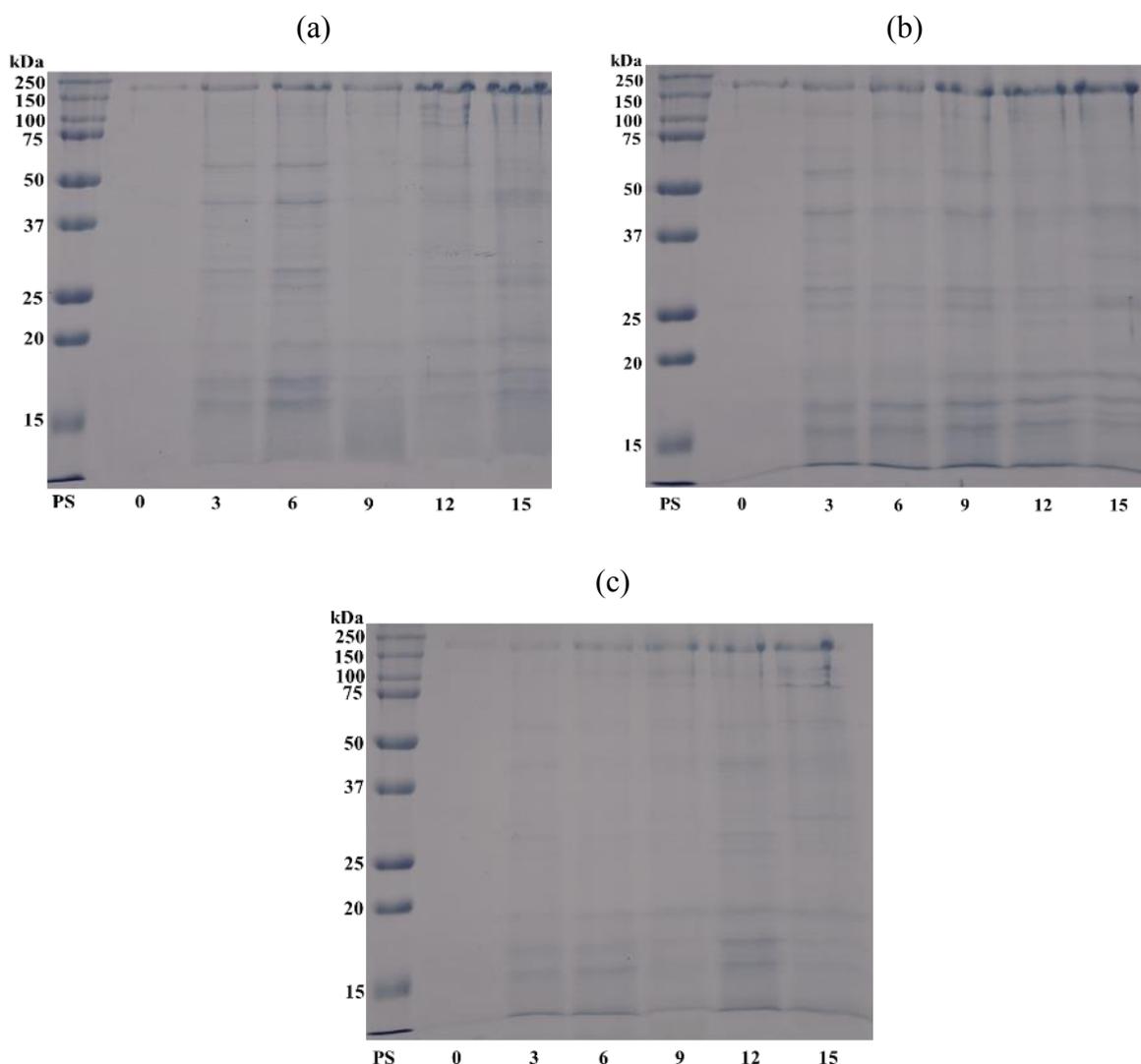
As máximas concentrações de carboidratos e lipídios na biomassa de *C. fusca* LEB 111 foram observadas nos ensaios com adição de NaCl, com diferença significativa ($p < 0,05$) do ensaio controle. As concentrações de carboidratos e lipídios no ensaio com 200 mmol L⁻¹ de NaCl foram superiores em 46,9% e 15,1%, respectivamente, em comparação ao ensaio controle. Com relação ao conteúdo de cinzas, não foi verificado diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Pancha et al. (2015) avaliaram o efeito do NaCl nos cultivos de *Scenedesmus* sp., observando redução no conteúdo proteico da biomassa, e ao mesmo tempo, aumento das concentrações de carboidratos e lipídios com o incremento da concentração de NaCl de 50 para 400 mmol L⁻¹. Shen et al. (2015), cultivando *Chlorella vulgaris* em diferentes salinidades, verificaram que a microalga supracitada apresentou concentração celular estável (1,5 g L⁻¹) entre as concentrações de 0 e 50 g L⁻¹ de sal marinho. Além disso, os autores também observaram aumento no conteúdo lipídico com o incremento da salinidade (até 50 g L⁻¹ de sal marinho).

Com relação a produtividade dos carboidratos, o máximo valor foi verificado quando *C. fusca* foi cultivada com 200 mmol L⁻¹ de NaCl, com diferença significativa dos demais tratamentos ($p < 0,05$). Segundo Tomaselli et al. (1987), o incremento da síntese e carboidratos em microalgas, frente ao estresse salino, ocorre devido ao papel desta macromolécula na manutenção da regulação osmótica das células. Martel et al. (1992) verificaram em cultivos de *Spirulina* aumento de carboidratos de baixo peso molecular quando a cepa foi exposta a estresse salino.

As maiores produtividades lipídicas foram verificadas nos ensaios com adição de NaCl, sendo essas respostas estatisticamente diferentes do ensaio controle ($p < 0,05$). Da mesma forma, Salama et al. (2014) verificaram aumento na concentração de lipídios de *Chlamydomonas mexicana*, quando cultivada com 400 mmol L⁻¹ de NaCl. No entanto, os autores observaram que as maiores produtividades lipídicas foram obtidas nos ensaios adicionados de 100 e 200 mmol L⁻¹ de NaCl.

Os ensaios de *C. fusca* LEB 111 realizados em UE, nos FBRTv também foram avaliados quanto ao perfil proteico, baseadas em eletroforese descontínua em gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) a cada 3 d de cultivo (Figura 5).

Figura 5 -Eletroforese descontínua em gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) comparativa para o perfil proteico dos cultivos controle (a) 100 mmol L⁻¹ (b) e 200 mmol L⁻¹ de NaCl (c) nos tempos de cultivo 0, 3, 6, 9, 12 e 15 d



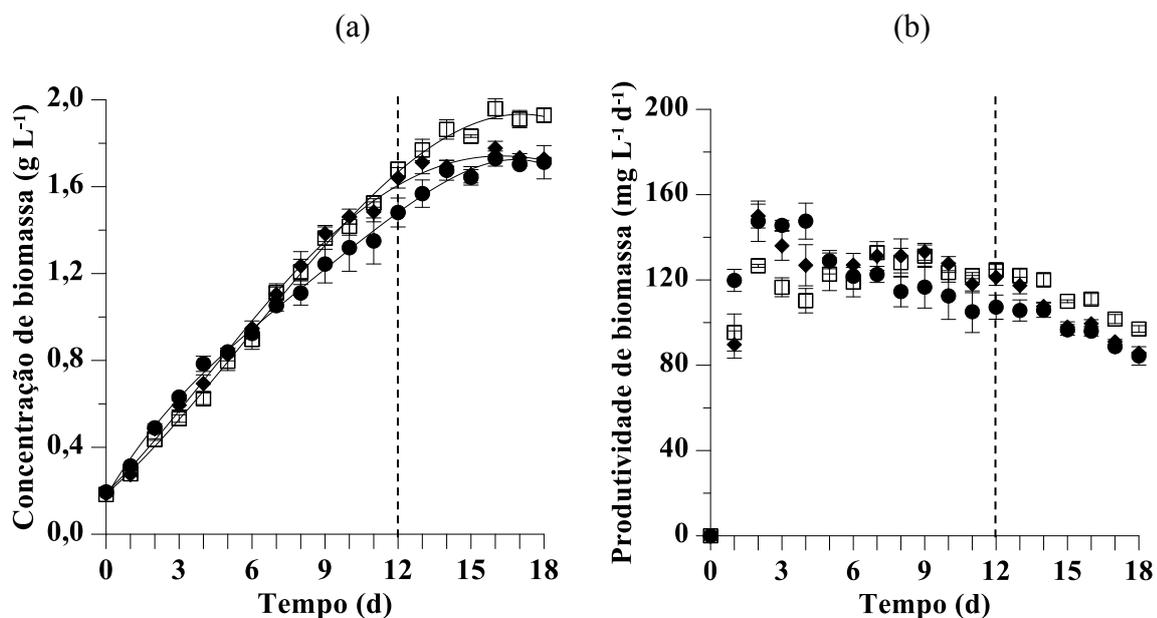
As bandas verificadas nos ensaios controle (Figura 5a) e com 100 mmol L⁻¹ de NaCl (Figura 5 b) foram comparadas ao padrão (PS), e estas podem então ser atribuídas a algumas proteínas, tais como Rubisco (subunidade 56 kDa) (ciclo de Calvin), D1 (38,9 kDa) presente no fotossistema II (FSII) e responsável pelo transporte de elétrons e LHCII (23,1-28,2 kDa), estas associadas ao FSII e responsáveis pela coleta de energia. No entanto, foi possível verificar que o emprego de 200 mmol L⁻¹ de NaCl (Figura 5c) promoveu a redução dos níveis proteicos na região de 50, 37 e acima de 25 kDa, quando comparadas ao ensaio controle. Estudos realizados por Sudhir et al. (2005) verificaram redução nos níveis da proteína D1 em *Spirulina platensis* devido ao estresse salino, resultando na inibição da atividade do FSII e no declínio nos valores da eficiência máxima do FSII (Fv/Fm) e fluorescência variável (Fv/Fo).

Segundo Nishiyama, Allakhverdiev e Murata (2006), o estresse salino (500 mmol L⁻¹ de NaCl) pode inibir o reparo dos danos no FSII, entretanto não acelera a ocorrência de mais danos a este fotossistema. De acordo com Nomura et al. (1998), o estresse causado pelo aumento da salinidade do meio pode também inativar enzimas que atuam no ciclo de Calvin, como a Rubisco, limitando assim o metabolismo de fixação de CO₂.

3.2 CULTIVOS DE *Chlorella fusca* EM DUPLO ESTÁGIO

Os ensaios de *C. fusca* não apresentaram fase de adaptação e a fase exponencial de crescimento celular ocorreu entre o ponto inicial e o 3º d em todos os tratamentos. No 13º d iniciou-se o segundo estágio com a adição de NaCl aos cultivos e a partir do 14º d foi verificada tendência de fase estacionária de crescimento, que se estendeu até o 18º d de cultivo (Figura 6a). Os ensaios com adição de CO₂ durante o primeiro estágio apresentaram perfil de crescimento semelhante, esse comportamento era esperado, pois os cultivos estavam submetidos as mesmas condições experimentais.

Figura 6 - Resultados de concentração de biomassa (a) e produtividade de biomassa (b) em função do tempo para os cultivos de *C. fusca* LEB 111 em DE: (●) Controle; (□) 15% de CO₂ e 100 mmol L⁻¹ de NaCl; (◆) 15% de CO₂ e 200 mmol L⁻¹ de NaCl (média ± desvio padrão) (linha tracejada indica fim do 1º estágio e o início do 2º estágio)



A partir dos valores de produtividade de biomassa, foi possível observar (Figura 6b) que para o ensaio com 100 mmol L⁻¹ de NaCl os valores de P_x foram mais estáveis entre o

6° e 9° d e com declínio a partir do 14° d. Para o cultivo controle e com 200 mmol L⁻¹ de NaCl, os maiores valores de P_X foram obtidos entre o 2° e 4° de cultivo, bem como decréscimo desta resposta a partir do 14° d.

O maior resultado de X_{máx} foi verificado no ensaio com 100 mmol L⁻¹ de NaCl ($p < 0,05$). Para a resposta P_{média}, em cada estágio do cultivo, não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Concentração máxima de biomassa (X_{máx}), produtividade média de biomassa (P_{média}), taxa de fixação de CO₂ (T_{CO2}), eficiência de utilização de CO₂ (E_{CO2}) e pH médio nos ensaios de *Chlorella fusca* em duplo estágio (DE).

Parâmetro	Controle	15 % CO ₂ +	
		100 mmol L ⁻¹ de NaCl	200 mmol L ⁻¹ de NaCl
X _{máx} (g L ⁻¹)	1,74 ^b ± 0,05	1,96 ^a ± 0,05	1,78 ^b ± 0,03
P _{média} 1-12° d (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	124,1 ^a ± 15,4	121,1 ^a ± 9,8	126,7 ^a ± 13,8
P _{média} 13-18° d (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	96,2 ^a ± 8,7	110,3 ^a ± 9,8	99,9 ^a ± 11,4
T _{CO2} 12° d (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	-	216,2 ^a ± 4,4	218,2 ^a ± 6,8
T _{CO2} 18° d (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	-	176,3 ^a ± 2,8	155,4 ^b ± 0,7
E _{CO2} 12° d (% m m ⁻¹)	-	20,3 ^a ± 0,4	20,5 ^a ± 0,6
E _{CO2} 18° d (% m m ⁻¹)	-	16,7 ^a ± 0,3	14,6 ^b ± 0,1
pH médio	10,07 ^a ± 0,07	9,30 ^b ± 0,02	9,27 ^b ± 0,02

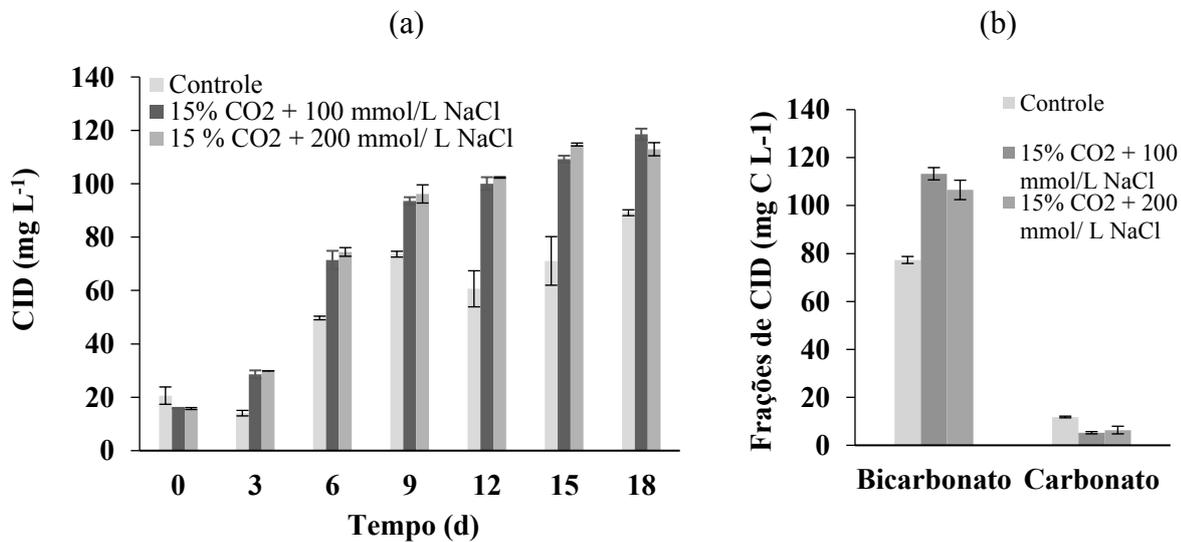
Letras sobrescritas iguais na mesma linha indicam que as médias não diferiram estatisticamente ao nível de 95% de confiança ($p > 0,05$); T_{CO2} e E_{CO2} no 12° d – (fim do 1° estágio) e P_{média}, T_{CO2} e E_{CO2} no 18° d (fim do 2° estágio).

Quanto a taxa de fixação de CO₂ (T_{CO2}) no 12° d não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$) (Tabela 3). Esse comportamento era esperado, pois ambos os ensaios foram cultivados com a mesma concentração de CO₂ (15% v v⁻¹). No entanto, no 18° d a T_{CO2} apresentou maior resultado ($p < 0,05$) no ensaio com 15% de CO₂ e 100 mmol L⁻¹ de NaCl em relação ao tratamento com 200 mmol L⁻¹ de NaCl. O efeito do DE na T_{CO2}, causou decréscimo de 18,5% no ensaio com 100 mmol L⁻¹ de NaCl, enquanto que com 200 mmol L⁻¹ de NaCl, a redução foi 28,8%, na resposta quando comparadas aos valores obtidos no 12° d (fim do 1° estágio). Neste sentido, é possível observar que a adição de 200 mmol L⁻¹ de NaCl pode ter contribuído para a redução da taxa fotossintética das células reduzindo assim a sua capacidade de assimilação do CO₂. As eficiências de utilização de CO₂ no 12° d foram estatisticamente iguais ($p > 0,05$). Ao empregarmos o modo de cultivo em DE, foi possível observar que, embora a E_{CO2} no ensaio com adição de 100 mmol L⁻¹ NaCl tenha sido superior

ao ensaio com maior concentração de NaCl (200 mmol L⁻¹), ambas as condições experimentais apresentaram redução de E_{CO2} em 17,7% (100 mmol L⁻¹) e 28,8% (200 mmol L⁻¹) quando comparadas ao resultado obtido no fim do 1º estágio (12º d). Os parâmetros de fixação de CO₂ são calculados em função da produtividade de biomassa (Px). Nesse sentido, como foi verificada redução da Px no ponto final do segundo estágio (18º d), os resultados de T_{CO2} e E_{CO2} também podem ter sido influenciados.

Ao longo dos 18 d de cultivo, os ensaios com adição de CO₂ apresentaram as maiores concentrações de CID no meio líquido em comparação ao ensaio controle (Figura 7a). O bicarbonato (HCO₃⁻) foi a espécie de carbono presente em maior concentração em todos tratamentos, sendo as maiores frações verificadas nos ensaios com 15% de CO₂ e 100 mmol L⁻¹ NaCl (Figura 7b). Neste sentido, podemos observar que a adição de NaCl nos cultivos não limitou a dissolução da fonte de carbono para os cultivos no segundo estágio.

Figura 7 – Resultados de concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID) em função do tempo (a) e frações de CID (HCO₃⁻, CO₃²⁻) (b) no meio líquido dos ensaios cultivados em duplo estágio no 18º d (média ± desvio padrão)



Quanto ao pH médio, nos ensaios com adição de CO₂ foram verificados menores valores em comparação ao ensaio controle, apresentando diferença significativa desse tratamento ($p < 0,05$) (Tabela 3). A injeção de CO₂ no cultivo de microalgas desloca o equilíbrio para a formação do ácido carbônico (H₂CO₃), o qual se dissocia em íons H⁺ no meio líquido, causando a redução do pH. Conforme relatado por Tang et al. (2011), o emprego de maior concentração de CO₂ poderia resultar em maior concentração de CID no meio de cultivo e com isso a fonte de carbono estaria disponível para ser utilizado pelas microalgas. Contudo, a injeção

de alta concentração de CO₂ pode resultar no decréscimo do pH. Os autores verificaram redução do pH de 8,7 para 5,2 com o aumento da concentração de CO₂ de 0,03% (ar) para 50% na corrente gasosa, injetada de forma contínua nos cultivos de *Chlorella pyrenoidosa*.

A redução do pH ao utilizar CO₂, em relação ao ensaio controle não foi acentuada (em média, de 10,07 para 9,30 para ambos tratamentos). Isso ocorreu, provavelmente, porque a injeção de CO₂ foi realizada de forma intermitente, durante o período de luz. Neste sentido, os valores de pH verificados para os ensaios com adição de CO₂, foram favoráveis a formação de íons HCO₃⁻, a qual foi a espécie em maior concentração nestes ensaios (Figura 7b).

Com relação a concentração de proteínas e carboidratos na biomassa no 12º d (1º estágio), não foi verificada diferença significativa ($p > 0,05$) dos tratamentos com fornecimento de 15% de CO₂ em relação ao ensaio controle. As maiores concentrações de lipídios foram verificadas no ensaio controle e com 15% de CO₂, que posteriormente foi adicionado 100 mmol L⁻¹ de NaCl no segundo estágio ($p < 0,05$). No 18º d, fim do segundo estágio, a concentração de proteínas na biomassa foi superior no ensaio controle ($p < 0,05$), o qual não foi exposto a condições de estresse (Tabela 4). Ambos os ensaios adicionados com CO₂ e NaCl apresentaram redução no conteúdo proteico em 8,3% quando comparado ao ensaio controle. Da mesma forma, como observado nos cultivos em único estágio, o teor proteico na biomassa de *C. fusca* foi menor nos ensaios com adição de NaCl. Ravelonandro et al. (2011) observaram redução da concentração de proteínas na biomassa de *Arthrospira (Spirulina) platensis*, quando a microalga foi cultivada com diferentes concentrações de NaCl. Vonshak (1997b) avaliando o efeito do estresse salino no cultivo de duas cepas de *Spirulina*, evidenciou modificação da composição da biomassa, com o aumento no teor de carboidratos e redução no conteúdo proteico.

No segundo estágio, o teor de carboidratos no cultivo controle foi estatisticamente ($p < 0,05$) superior aos ensaios com NaCl e CO₂. Por outro lado, o conteúdo lipídico encontrado nos ensaios com NaCl foram maiores e com diferença significativa do controle ($p < 0,05$) (Tabela 4). A utilização de 200 mmol L⁻¹ de NaCl no meio de cultivo favoreceu o acúmulo de lipídios, representando incremento de 29,8% em comparação ao ensaio controle. Vidyashankar et al. (2013) observaram que o emprego do cultivo em duplo estágio com a adição de NaCl e restrição de nitrogênio resultou no incremento da concentração de lipídios na biomassa de *Scenedesmus dimorphus*.

Tabela 4 – Concentração de proteínas, carboidratos, lipídios, cinzas (base seca) e produtividade de carboidratos e lipídios para os cultivos de *Chlorella fusca* em DE.

Período	Macromolécula	Controle	15 % CO ₂ + 100 mmol L ⁻¹	15 % CO ₂ + 200 mmol L ⁻¹
1º Estágio (1º - 12º d)	Proteínas (% m m ⁻¹)	49,9 ^{a, A} ± 0,3	48,2 ^{a, A} ± 0,6	49,0 ^{a, A} ± 1,4
	Carboidratos (% m m ⁻¹)	22,2 ^{b, A} ± <0,1	22,7 ^{a, b, A} ± 0,4	23,3 ^{a, A} ± 0,1
	Lipídios (% m m ⁻¹)	21,1 ^{a, A} ± 0,7	19,9 ^{a, A} ± 0,5	18,0 ^{b, A} ± 0,5
2º Estágio (13º - 18º d)	Proteínas (% m m ⁻¹)	49,2 ^{a, A} ± 0,9	45,1 ^{b, A} ± 1,5	45,1 ^{b, A} ± 1,5
	Carboidratos (% m m ⁻¹)	24,7 ^{a, B} ± 0,8	21,8 ^{c, A} ± 0,7	23,3 ^{b, A} ± 1,1
	Lipídios (% m m ⁻¹)	17,8 ^{b, B} ± 0,8	21,8 ^{a, B} ± 0,6	23,1 ^{a, B} ± 0,4
	Cinzas (% m m ⁻¹)	3,3 ^a ± 0,1	3,0 ^a ± 0,1	3,0 ^a ± 0,2
	P _{carboidratos} (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	20,9 ^a ± 1,1	21,2 ^a ± 0,7	20,0 ^a ± 1,0
	P _{lipídios} (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	15,7 ^b ± 0,7	20,8 ^a ± 0,7	19,8 ^a ± 0,4

Letras sobrescritas minúsculas iguais na mesma linha para a mesma macromolécula e letras sobrescritas maiúsculas iguais na mesma coluna para a mesma macromolécula em diferentes estágios indicam que as médias não diferiram estatisticamente ao nível de 95% de confiança ($p > 0,05$), 12º d (fim do 1º estágio) e 18º d (fim do 2º estágio).

Para a mesma condição experimental, foi possível observar que a adição de 100 mmol L⁻¹ de NaCl no segundo estágio no ensaio com 15% de CO₂ promoveu o incremento do conteúdo lipídico da biomassa em 9,5%, apresentando diferença significativa do 1º estágio ($p < 0,05$). O mesmo foi observado para o ensaio com 15% de CO₂ e 200 mmol L⁻¹ de NaCl, sendo verificado aumento de 28,3% no teor de lipídios quando adicionado o cloreto de sódio, com diferença significativa do 1º estágio ($p < 0,05$). Apesar da adição de NaCl nos cultivos, não foi verificada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os ensaios em relação ao conteúdo de cinzas. A produtividade de carboidratos não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos no duplo estágio. Entretanto, a produtividade lipídica dos cultivos adicionados de NaCl foram estatisticamente superiores ao ensaio controle (Tabela 4). A adição de NaCl na concentração de 100 mmol L⁻¹ no segundo estágio de cultivo resultou no aumento de 33,8% na produtividade lipídica.

Desta forma, foi possível observar que o modo de cultivo em duplo estágio não somente pode aumentar os compostos de reserva na biomassa de microalgas, como também a produtividade destas macromoléculas, o que permite aumentar a aplicação biotecnológica de microalgas como matéria-prima para a produção de produtos de alto valor agregado e biocombustíveis.

4. CONCLUSÃO

Nos cultivos de *C. fusca* LEB 111 em único estágio (UE), a máxima concentração de biomassa ($X_{\text{máx}}$) ($1,90 \text{ g L}^{-1}$) foi verificada no ensaio com a adição de 100 mmol L^{-1} de NaCl, enquanto que na estratégia de cultivo em duplo estágio (DE) a $X_{\text{máx}}$ foi obtida com a adição de 15% de CO_2 e 100 mmol L^{-1} de NaCl ($1,96 \text{ g L}^{-1}$). Quanto a produtividade das macromoléculas, a adição de 200 mmol L^{-1} de NaCl em UE favoreceu a produtividade de carboidratos, sendo esta resposta 81,0% superior ao resultado verificado no ensaio controle. A aplicação da estratégia em duplo estágio com a adição de 15% de CO_2 e 100 mmol L^{-1} de NaCl no cultivo de *C. fusca* LEB 111 resultou no incremento de 33,8% na produtividade lipídica. Diante disso, foi possível concluir que o emprego de estratégias de UE e DE favoreceram o crescimento e a produtividade de macromoléculas por *C. fusca*, aumentando a aplicabilidade biotecnológica da biomassa na produção de bioenergia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, G. A. De; PAGANO, D. J.; GUZMAN, J. L.; BERENGUEL, M.; FERNANDEZ, I.; ACIEN, F. G. Distributed Sliding Mode Control of pH in Tubular Photobioreactors. **IEEE Transactions on Control Systems Technology**, v. 24, n. 4, p. 1160–1173, 2016.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. **Association of Official Analysis Chemists International**, 2000.
- APHA. **American Public Health Association (APHA). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed.** Washington DC., 1998.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.
- BRUNE, D. E.; NOVAK, J. T. The use of carbonate equilibrium chemistry in quantifying algal carbon uptake kinetics. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 71–76, 1981.
- BUONO, S.; LANGELLOTTI, A. L.; MARTELLO, A.; BIMONTE, M.; TITO, A.; CAROLA, A.; APONE, F.; COLUCCI, G.; FOGLIANO, V. Biological activities of dermatological interest by the water extract of the microalga *Botryococcus braunii*. **Archives of Dermatological Research**, v. 304, n. 9, p. 755–764, 2012.
- CAMACHO RUBIO, F.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; SÁNCHEZ PÉREZ, J. A.; GARCÍA CAMACHO, F.; MOLINA GRIMA, E. Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide

concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, n. 1, p. 71–86, 1999.

CHEN, B.; WAN, C.; MEHMOOD, M. A.; CHANG, J. S.; BAI, F.; ZHAO, X. Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products—A review. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1198–1206, 2017.

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

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

CHOKSHI, K.; PANCHAL, I.; TRIVEDI, K.; GEORGE, B.; MAURYA, R.; GHOSH, A.; MISHRA, S. Biofuel potential of the newly isolated microalgae *Acutodesmus dimorphus* under temperature induced oxidative stress conditions. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 162–171, 2015.

CHUA, E. T.; SCHENK, P. M. A biorefinery for *Nannochloropsis*: Induction, harvesting, and extraction of EPA-rich oil and high-value protein. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1416–1424, 2017.

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

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

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

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

FREITAS, B. C. B.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. *Chlorella minutissima* cultivation with CO₂ and pentoses: Effects on kinetic and nutritional parameters. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 338–344, 2017.

HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 709–732, 2012.

HOLLAND, D. L.; GABBOTT, P. A. A Micro-Analytical Scheme for the Determination of Protein, Carbohydrate, Lipid and RNA Levels in Marine Invertebrate Larvae. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 51, n. 3, p. 659–668, 1971.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.
- MARGARITES, A. C. F.; COSTA, J. A. V. Increment of carbohydrate concentration of *Chlorella minutissima* microalgae for bioethanol production. **Journal of Engineering Research and Applications**, v. 4, n. 3, p. 2248–962280, 2014.
- MARSH, J. B.; WEINSTEIN, D. B. Simple charring method for determination of lipids. **Journal of lipid research**, v. 7, n. 4, p. 574–576, 1966.
- MARTEL, A.; YU, S.; GARCIA REINA, G.; LINDBLAD, P.; PEDERSEN, M. Osmotic-Adjustment in the Cyanobacterium *Spirulina platensis*: Presence of an Alpha-Glucosidase. **Plant Physiology and Biochemistry (France)**, v. 30, p. 573–578, 1992.
- MORAES, L.; ROSA, G. M.; CARDIAS, B. B.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A. V. Microalgal biotechnology for greenhouse gas control : Carbon dioxide fixation by *Spirulina* sp. at different diffusers. **Ecological Engineering**, v. 91, p. 426–431, 2016.
- MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 9, p. 1349–1352, 2007.
- NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S. I.; MURATA, N. A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1757, n. 7, p. 742–749, 2006.
- NOMURA, M.; HIBINO, T.; TAKABE, T.; SUGIYAMA, T.; YOKOTA, A.; MIYAKE, H.; TAKABE, T. Transgenically Produced Glycinebetaine Protects Ribulose 1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase from Inactivation in *Synechococcus* sp. PCC7942 under Salt Stress. **Plant Cell Physiology**, v. 39, n. 4, p. 425–432, 1998.
- PANCHA, I.; CHOKSHI, K.; MAURYA, R.; TRIVEDI, K. Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp . CCNM 1077. **Bioresource Technology**, v. 189, p. 341–348, 2015.
- PANDIT, P. R.; FULEKAR, M. H.; KARUNA, M. S. L. Effect of salinity stress on growth, lipid productivity, fatty acid composition, and biodiesel properties in *Acutodesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 15, p. 13437–13451, 2017.
- POSADAS, E.; MORALES, M. D. M.; GOMEZ, C.; ACIÉN, F. G.; MUÑOZ, R. Influence of pH and CO₂ source on the performance of microalgae-based secondary domestic wastewater treatment in outdoors pilot raceways. **Chemical Engineering Journal**, v. 265, p. 239–248, 2015.
- QIU, R.; GAO, S.; LOPEZ, P. A.; OGDEN, K. L. Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. **Algal Research**, v. 28, n. November, p. 192–199, 2017.
- RA, C. H.; KANG, C-H.; KIM, N. K.; LEE, C-G.; KIM, S-K. Cultivation of four microalgae for biomass and oil production using a two-stage culture strategy with salt stress. **Renewable**

Energy, v. 80, p. 117–122, 2015.

RAVELONANDRO, P. H.; RATIANARIVO, D. H.; JOANNIS-CASSAN, C.; ISAMBERT, A.; RAHERIMANDIMBY, M. Improvement of the growth of *Arthrospira (Spirulina) platensis* from Toliara (Madagascar): Effect of agitation, salinity and CO₂ addition. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 3, p. 209–216, 2011.

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

ROSA, G. M. **Fixação química e biológica de CO₂ utilizadas no cultivo de *Spirulina***. 2014. 91f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

ROSA, G. M.; MORAES, L.; CARDIAS, B. B.; SOUZA, M. da R. A. Z.; COSTA, J. A. V. Chemical Absorption and CO₂ Biofixation via the Cultivation of *Spirulina* in Semicontinuous Mode with Nutrient Recycle. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 321–327, 2015.

SALAMA, E-S.; ABOU-SHANAB, R. A. I.; KIM, J. R.; LEE, S.; KIM, S. H.; OH, S. E.; KIM, H. C.; ROH, H. S.; JEON, B. H. The effects of salinity on the growth and biochemical properties of *Chlamydomonas mexicana* GU732420 cultivated in municipal wastewater. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 35, n. 12, p. 1491–1498, 2014.

SALAMA, E-S.; KIM, H-C.; ABOU-SHANAB, R. A. I.; JI, M-K.; OH, Y.-K.; KIM, S-H.; JEON, B-H. Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 6, p. 827–833, 15 jun. 2013.

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

SHEN, Q. H.; GONG, Y. P.; FANG, W. Z.; BI, Z. C.; CHENG, L. H.; XU, X. H.; CHEN, H. L. Saline wastewater treatment by *Chlorella vulgaris* with simultaneous algal lipid accumulation triggered by nitrate deficiency. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 68–75, 2015.

SUDHIR, P.-R.; POGORYELOV, D.; KOVACS, 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, n. 4, p. 481–485, 2005.

SUJATHA, K.; NAGARAJAN, P. Effect of salinity on biomass and biochemical constituents of *Spirulina platensis* (Geitler). **International Journal of Plant Protection**, v. 7, n. 1, p. 71–73, 2014.

TANG, D.; HAN, W.; LI, P.; MIAO, X.; ZHONG, J. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3071–3076, 2011.

TOMASELLI, L.; TORZILLO, G.; GIOVANNETTI, L.; PUSHPARAJ, B.; BOCCI, F.; TREDICI, M.; PAPUZZO, T.; BALLONI, W.; MATERASSI, R. Recent research on *Spirulina* in Italy. **Hydrobiologia**, v. 151–152, n. 1, p. 79–82, 1987.

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

VIDYASHANKAR, S.; DEVIPRASAD, K.; CHAUHAN, V. S.; RAVISHANKAR, G. A.; SARADA, R. Selection and evaluation of CO₂ tolerant indigenous microalga *Scenedesmus dimorphus* for unsaturated fatty acid rich lipid production under different culture conditions. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 28–37, 2013.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis Arthrospira: Physiology, Cell-Biology And Biotechnology*. London: Taylor and Francis, 1997a.

VONSHAK, A. *Spirulina: Growth, Physiology and Biochemistry*. In: VONSHAK, A. (Ed.). *Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor & Francis, 1997b. p. 43–65.

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

ARTIGO 3

PRODUÇÃO DE *Nannochloropsis gaditana* EM FOTOBIORREATORES TUBULARES EM ESCALA PILOTO: INFLUÊNCIA DA VAZÃO DE CO₂ NO CONTROLE DO pH E NO FORNECIMENTO DE CARBONO

**PRODUÇÃO DE *Nannochloropsis gaditana* EM FOTOBIORREATORES
TUBULARES EM ESCALA PILOTO: INFLUÊNCIA DA VAZÃO DE CO₂ NO
CONTROLE DO pH E NO FORNECIMENTO DE CARBONO**

RESUMO

O dióxido de carbono (CO₂) fornecido para o cultivo de microalgas, não só é utilizado para o controle de pH, mas também como fonte de carbono para esses micro-organismos fotossintéticos. Para que esse processo ocorra de maneira eficiente, se faz necessário o estudo de parâmetros hidrodinâmicos, como a vazão de CO₂. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da vazão de CO₂ no controle do pH, na eficiência de utilização de CO₂, produtividades de biomassa e lipídica nos cultivos de *Nannochloropsis gaditana*. Os experimentos foram realizados em fotobiorreatores tubulares de 2.600 L, condições *outdoor* em estufa de filme transparente. O controle do pH no valor de ajuste (8,0), bem como o fornecimento de carbono foi realizado mediante injeção de CO₂ puro nas vazões de 1, 3, 5, 8 e 20 L min⁻¹. O emprego das vazões de CO₂ entre 1 e 8 L min⁻¹ promoveram melhor controle do pH próximo ao valor de ajuste. Quando utilizada a vazão de 5 L min⁻¹ foi verificada eficiência de utilização de CO₂ de aproximadamente 70% (m m⁻¹), produtividade lipídica de 36,7 mg L⁻¹ d⁻¹ e a máxima produtividade de biomassa (0,24 g L⁻¹ d⁻¹). Neste sentido, o presente estudo permitiu a seleção de parâmetro hidrodinâmico para que o controle do pH por demanda de CO₂ fosse adequado e para que maiores eficiências de utilização de carbono pudessem ser alcançadas, contribuindo assim com a produção de biomassa e com a redução de custos com o processo.

Palavras-chave: Biomassa. Dióxido de carbono. Fotobiorreator. Lipídios. Microalga. *Outdoor*.

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são micro-organismos que, por meio da fotossíntese, produzem biomassa que pode ser empregada na alimentação humana e animal, fármacos (TRIVEDI et al., 2015), na extração de biocompostos de alto valor agregado (MORAIS et al., 2014), bem como na produção de biocombustíveis (ACIÉN et al., 2012b; MORAIS et al., 2016). Ademais, esses micro-organismos podem ser aplicados no tratamento de águas residuais (ARBIB et al., 2013) e gases de combustão (DUARTE; FANKA; COSTA, 2016; DUARTE et al., 2017; GODOS et al., 2014), dos quais utilizam nutrientes como nitrogênio, fósforo e carbono para o seu crescimento.

O cultivo de microalgas tem sido realizado tanto em reatores abertos (*Raceway*), quanto em fechados (fotobiorreatores) (ACIÉN et al., 2017). Os reatores abertos são comumente utilizados na produção de microalgas em escala comercial, principalmente de cepas como *Spirulina* e *Dunaliella* (ZITTELLI et al., 2013). O emprego mais difundido desse tipo de sistema ocorre principalmente devido a sua simplicidade, relativo baixo custo de construção e de operação (WANG; LAN; HORSMAN, 2012), há ainda a facilidade de aumento de escala (MENDOZA et al., 2013). Normalmente os reatores abertos possuem controle mínimo das condições de operação, sendo mais suscetíveis a contaminação (FERNÁNDEZ et al., 2012). Todavia, quando se busca produzir biomassa rica em compostos de alto valor agregado, os sistemas fechados são considerados os mais indicados (MOLINA GRIMA et al., 1999). Entre os sistemas fechados, os fotobiorreatores tubulares são os mais empregados (ACIÉN et al., 2017). Embora os fotobiorreatores apresentem custo mais elevado de construção, quando comparados aos sistemas abertos, tal configuração de reator é considerada mais promissora por possuir maior controle dos parâmetros do cultivo, resultando em maiores produtividades de biomassa e menores riscos de contaminação (ACIÉN et al., 2017; IPPOLITI et al., 2016).

Em se tratando de fotobiorreatores tubulares, o CO₂ geralmente é fornecido como fonte de carbono e para o controle do pH, podendo ser injetado puro ou a partir de gases de combustão. Caso a forma pura de CO₂ for utilizada, a fonte de carbono pode representar até 30% dos custos de produção (ACIÉN et al., 2012a). Outro aspecto primordial que deve ser considerado quando se utiliza este tipo de sistema para o cultivo de microalgas é a eficiência de utilização de CO₂. Muitos estudos revelaram que as perdas podem chegar até 50%, mas com a melhoria nas questões de projeto e condições de operação, essas podem ser minimizadas (ACIÉN et al., 1998; CAMACHO RUBIO et al., 1999).

Nannochloropsis gaditana é uma cepa marinha que tem demonstrando potencial como matéria-prima para a produção de biodiesel devido ao teor de lipídios e perfil de ácidos graxos (SAN PEDRO et al., 2013). Estudos realizados relataram que *N. gaditana* pode ser cultivada em condições *outdoor* em biorreatores *raceway* (SAN PEDRO et al., 2015), fotobiorreatores do tipo tubulares (SAN PEDRO et al., 2014) e painel plano (SAN PEDRO et al., 2016). Além das configurações dos fotobiorreatores, fatores como o fornecimento de CO₂ para o controle do pH e suprimento de carbono para o crescimento das microalgas necessitam ser avaliados. Neste sentido, é de grande importância a avaliação dos efeitos das condições operacionais (como por exemplo, a vazão de CO₂) no cultivo de microalgas em condições *outdoor*. Com isso é possível determinar parâmetros que maximizem a eficiência da bioconversão de CO₂ em biomassa e a redução do custo de produção.

Diante do exposto, o objetivo do estudo foi determinar a influência de diferentes vazões de CO₂ no controle de pH, na eficiência de utilização de CO₂ e nas produtividades de biomassa e lipídica de *Nannochloropsis gaditana* cultivada em fotobiorreatores tubulares sob condições *outdoor*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO

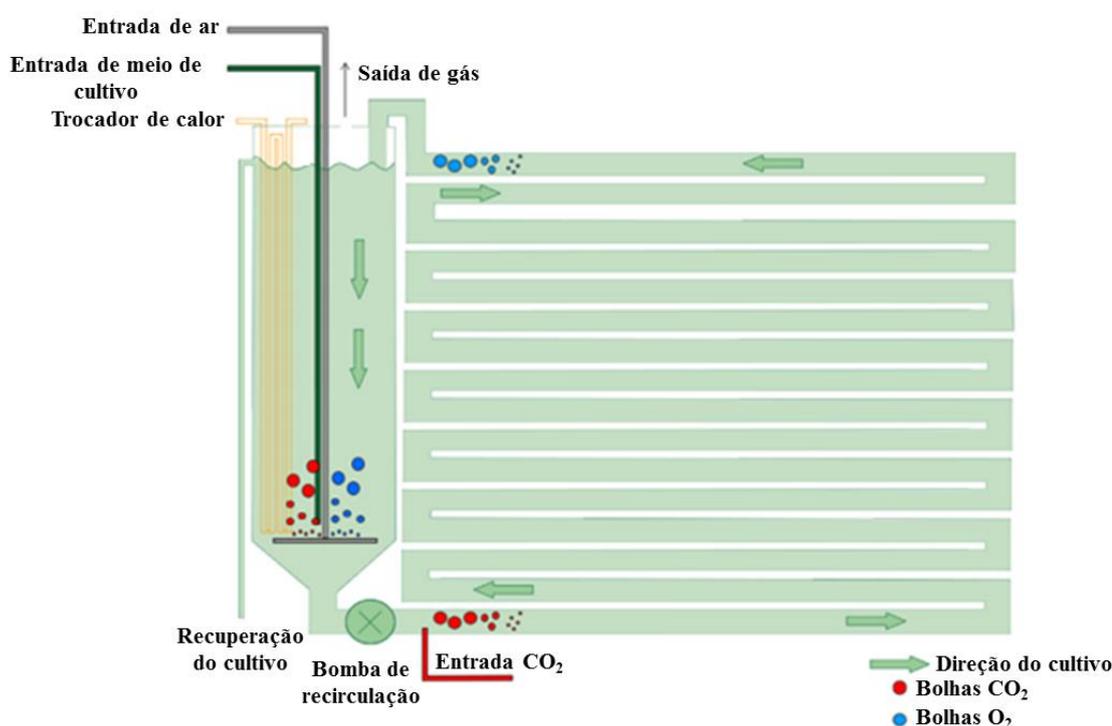
A microalga utilizada foi *Nannochloropsis gaditana*, pertencente a coleção de culturas do grupo de pesquisa “Biotecnologia de Microalgas Marinhas da Universidad de Almería (Espanha)” (Anexo I – Figura A6). O meio de cultivo utilizado era composto por água do mar artificial (30 g L⁻¹ de NaCl) e fertilizantes agrícolas, tais como: nitrato de cálcio (Ca(NO₃)₂, 0,8 g L⁻¹), fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄, 0,25 g L⁻¹), sulfato de magnésio (MgSO₄, 0,3 g L⁻¹) e micronutrientes (Welgro hidroponic, 0,02 mL L⁻¹ e Karentol, 0,02 g L⁻¹) (Anexo I – Tabela A2) (CAMACHO-RODRÍGUEZ et al. 2013). Os componentes do meio de cultivo foram dissolvidos em água potável e filtrados através de sistema de ultrafiltração composto por membrana com 0,2 µm de poro (SFP 2860, China).

O inóculo de *N. gaditana* foi propagado em escala laboratorial e posteriormente em escala piloto (condições *outdoor*) no período entre os meses de abril e maio. Em condições *outdoor* a propagação e a manutenção do inóculo foi realizada em fotobiorreatores do tipo colunas de bolhas (volume total de 100 L), com aeração constante e fornecimento de CO₂ sob demanda para o controle do pH (7,8-8,0).

2.2 FOTOBIORREATOR TUBULAR

Os experimentos foram realizados em fotobiorreatores tubulares em escala piloto, localizados em estufa de filme transparente, na Estação Experimental *Las Palmerillas*, pertencente a Fundação CAJAMAR (Almería, Espanha) (Anexo I – Figura A7). Os fotobiorreatores tubulares eram compostos por receptores de radiação solar e coluna de bolhas (Figura 1).

Figura 1 – Diagrama do fotobiorreator tubular com vista lateral



Fonte: Adaptado de Fernández et al. (2014)

Os receptores de radiação solar eram compostos por tubulações com comprimento de 19 m, diâmetro de 0,09 m, unidos em configuração de *loop*, totalizando comprimento horizontal de 400 m, com volume total de 3.000 L e volume útil de 2.600 L. A coluna de bolhas possuía 3,25 m de altura, 0,5 m de diâmetro, com volume útil de 450 L. Esta coluna tem por finalidade a eliminação de gases acumulados no sistema, entrada de meio de cultivo e controle de temperatura. Para manutenção da temperatura, água à temperatura ambiente foi recirculada a uma vazão de 1.500 L h⁻¹ em trocadores de calor de aço inox, localizados no interior da coluna de bolhas. Na parte inferior da coluna estava localizada uma bomba centrífuga que promoveu a recirculação contínua do cultivo (com velocidade de 0,9 m s⁻¹) entre a coluna e os receptores de radiação solar. Os fotobiorreatores empregados eram equipados com sondas de oxigênio

dissolvido (OD5120 Crison, Espanha), pH e temperatura (pH5083T Crison, Espanha), as quais estavam localizadas no final do *loop* dos receptores de luz e conectadas a um multímetro (MM44, Crison, Espanha). A radiação solar absorvida foi mensurada por piranômetro termoeletrico conectado a um adaptador AC-420 (LP-02, Geónica S.A., Espanha). Ademais, todas as sondas estavam conectados a um transmissor (Labjack U12) e este a um *software* de aquisição de dados (Daqfactory, Azeotech, Arizona, EUA) (ANDRADE et al., 2016; IPPOLITI et al., 2016).

2.3 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Os tratamentos propostos no corrente estudo consistiram em variar as vazões de injeção de CO₂ nos cultivos de *N. gaditana* em 1, 3, 5, 8 e 20 L min⁻¹ para realizar o controle do pH e o fornecimento de carbono. O pH dos cultivos foi controlado no valor de ajuste de 8,0 por meio de injeção de CO₂ puro nas vazões supracitadas. As vazões foram controladas por medidores de vazão no valor correspondente a cada tratamento (FR4500, Key Instruments, EUA) e o gás foi injetado nos cultivos a uma pressão manométrica de trabalho de 0,2 kgf cm⁻². Como o CO₂ foi fornecido por demanda, a injeção do gás nos cultivos foi regulada por válvulas solenoides *on/off*, estas acionadas automaticamente pelo sistema de controle durante a fase clara (radiação solar >30 W m⁻²) para controlar o pH no valor do *setpoint* (8,0).

Os cultivos foram realizados no mês de junho (primavera-verão) em fotobiorreatores tubulares descritos no item 2.2, os quais foram operados em modo de batelada até atingir concentração superior a 1,0 g L⁻¹. Logo após os fotobiorreatores foram operados em modo semicontínuo, com taxa de diluição de 0,16 d⁻¹, a qual foi calculada a partir de três remoções semanais de cultivo. Em cada remoção, parte da biomassa foi recuperada do meio de cultivo, o qual foi recirculado e armazenado para posterior suplementação com nutrientes e reutilização na próxima diluição. A temperatura média do cultivo foi resultado do controle de temperatura empregado no fotobiorreator (como descrito no item 2.2), influenciado apenas pela radiação solar incidente e pelo calor retido no interior da estufa de filme transparente. Em cada fotobiorreator foi injetado ar com vazão de 200 L min⁻¹ para dessorção de gases acumulados no meio líquido.

2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

A concentração de biomassa (X_b) foi determinada mediante filtração a vácuo de 50 mL de cultivo em filtro de microfibras de vidro, com tamanho de poro de 0,7 µm (WhatmanTM).

Posteriormente a biomassa foi lavada com 50 mL da solução de formiato de amônio na concentração de 1,25% (m v⁻¹) para remoção dos sais aderidos às células e seca em estufa a 80°C por 24 h.

A fluorescência da clorofila (Fv/Fm) das células microalgais foi verificada a partir da relação entre a fluorescência variável (Fv) e a máxima (Fm). Para a realização dessa análise uma alíquota de 3,5 mL de cultivo foi mantida no escuro por 15 min e posteriormente mensurado o valor da relação Fv/Fm em fluorímetro (AquaPen AP 100, Photon Systems Instruments, República Checa) (IPPOLITI et al., 2016).

O cultivo foi avaliado diariamente por observação microscópica (Laica, ICC50 HD, Alemanha), a fim de garantir que a cepa utilizada fosse o micro-organismo dominante ao longo de todo o período de ensaio. Ademais, foram determinadas utilizando kit de análise (Hach-Lange LKC 381, Alemanha) e fotômetro (Dr Lange LASA 50, Alemanha) as concentrações de carbono inorgânico total (CIT, g L⁻¹) no meio de cultivo de entrada e de saída.

2.5 RECUPERAÇÃO E COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA

A biomassa de cada experimento foi recuperada do meio líquido por centrifugação (GEA, Alemanha), seca por liofilização (FD80, Cuddon Freeze Dry, Nova Zelândia) e armazenada a -20°C. Os lipídios foram extraídos mediante a combinação dos solventes clorofórmio: metanol e quantificados conforme método colorimétrico proposto por Marsh e Weinstein (1966), o qual utiliza curva padrão de tripalmitina (HOLLAND; GABBOTT, 1971). O teor de umidade na biomassa foi determinado por metodologia oficial (AOAC, 2000) e os resultados de concentração de lipídios (% m m⁻¹) foram expressos em base seca.

2.6 RESPOSTAS AVALIADAS

Os experimentos foram monitorados 24 h d⁻¹, durante 18 d. A fim de melhor representar os efeitos dos tratamentos, foi selecionado um dia de cada ensaio, o qual apresentava condições de temperatura e radiação solar semelhante entre os experimentos. Os dados de radiação solar, temperatura e pH foram coletados ao longo de 24 h (1440 dados). A partir desta aquisição de dados foi possível determinar os perfis de radiação solar, temperatura, oxigênio dissolvido (O.D.) e pH, bem como o número de atuações da válvula (abertura) para a injeção de CO₂ e a taxa mássica de carbono injetado por dia nos cultivos.

2.6.1 Produtividade de biomassa

A produtividade volumétrica de biomassa (P_x , g L⁻¹ d⁻¹) foi calculada a partir da concentração de biomassa (X_b , g L⁻¹) e da taxa de diluição (D , d⁻¹), conforme a Equação 1 (MOLINA GRIMA et al., 1999).

$$P_x = X_b \cdot D \quad (1)$$

2.6.2 Demanda de CO₂

A demanda de CO₂ pelo cultivo (D_{CO_2} , g d⁻¹) foi calculada segundo a Equação 2, em que P_x (g L⁻¹ d⁻¹) é a produtividade volumétrica de biomassa determinada em cada ensaio, $V_{\text{útil}}$ (L) é o volume útil do fotobiorreator, x_{cbm} é a fração mássica de carbono na biomassa (considerada 0,5 g_{carbono} g_{biomassa}⁻¹), MM_{CO_2} (g mol⁻¹) e MM_C (g mol⁻¹) são as massas molares de CO₂ e do carbono, respectivamente.

$$D_{CO_2} = P_x \cdot V_{\text{útil}} \cdot x_{cbm} \cdot \frac{MM_{CO_2}}{MM_C} \quad (2)$$

2.6.3 Eficiência de utilização de CO₂

A eficiência de utilização de CO₂ (E_{CO_2} , % m⁻¹) foi calculada segundo a Equação 3, a partir da razão entre a demanda de CO₂ (D_{CO_2} , g d⁻¹) e a taxa mássica de CO₂ (\dot{m}_{CO_2} , g d⁻¹) fornecida aos cultivos.

$$E_{CO_2} = \frac{D_{CO_2}}{\dot{m}_{CO_2}} \cdot 100 \quad (3)$$

2.6.4 Razão entre o fornecimento de CO₂ e a produção de biomassa

A razão entre o fornecimento de CO₂ e a produção de biomassa ($R_{CO_2/biomassa}$, g_{CO₂} g_{biomassa}⁻¹) foi calculada segundo a Equação 4, em que \dot{m}_{CO_2} (g d⁻¹) é a taxa mássica de CO₂ injetada, P_x (g L⁻¹ d⁻¹) é a produtividade volumétrica de biomassa e $V_{\text{útil}}$ (L) é o volume útil do fotobiorreator.

$$R_{CO_2/biomassa} = \frac{\dot{m}_{CO_2}}{P_x \cdot V_{\text{útil}}} \quad (4)$$

2.6.5 Concentração e produtividade lipídica

A concentração de lipídios foi avaliada na biomassa liofilizada de cada experimento, enquanto que a produtividade lipídica ($P_{lipídica}$, $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) foi determinada de acordo com a Equação 5, na qual P_x é produtividade de biomassa e $f_{lipídica}$ é a fração da macromolécula presente na biomassa. Os resultados de concentração de lipídios e produtividade lipídica foram avaliados por análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey para comparação entre médias ao nível de 95% de confiança.

$$P_{lipídica} = P_x \cdot f_{lipídica} \quad (5)$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

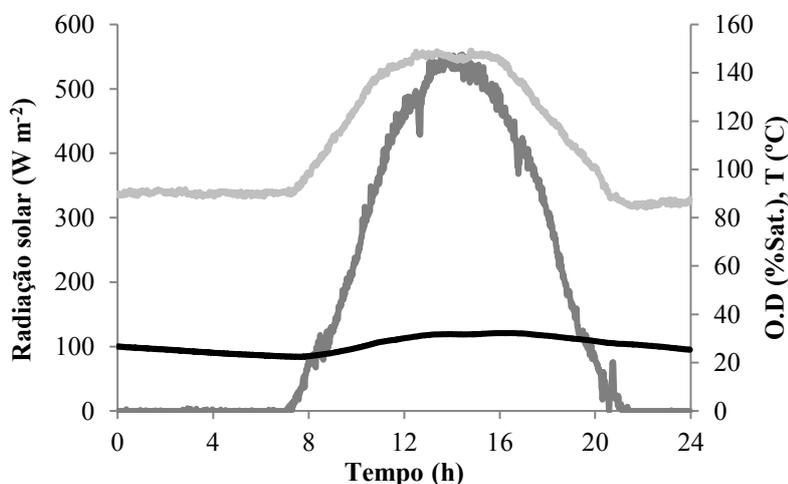
Todos os ensaios foram realizados durante o mês de junho (primavera-verão), a fim de garantir que as culturas fossem expostas a condições de radiação solar e temperatura semelhantes. Os valores mínimos e máximos verificados para a radiação solar na fase clara foram 31,2 e 564,8 W m^{-2} , respectivamente. Para a temperatura, o valor mínimo foi de 24,2 e máximo de 33,9°C, respectivamente. A temperatura média observada no período claro foi 30,7°C, enquanto que na fase escura o valor médio foi 26,6°C. Neste aspecto foi possível verificar que o emprego do sistema de resfriamento evitou que temperaturas acima de 35°C fossem atingidas, as quais poderiam inibir o crescimento da microalga. O aumento da temperatura em cultivos *outdoor* ocorre devido a absorção de calor em decorrência do aumento da radiação solar no período claro. Este incremento da temperatura pode causar o superaquecimento da cultura, resultando em inibição do crescimento e até mesmo morte celular (IPPOLITI et al., 2016). Zitteli et al. (1999), realizando cultivos em fotobiorreatores tubulares em condições *outdoor* verificaram maiores produtividades para *Nannochloropsis* sp. (0,7 e 0,8 $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$) em temperaturas entre 28,1 e 28,9°C, observadas durante a primavera. Da mesma forma, San Pedro et al. (2015) observaram maior produtividade de biomassa (0,19 $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$) nos cultivos de *Nannochloropsis gaditana*, em reatores tipo *Raceway*, sob condições *outdoor*, com temperatura de $29,0 \pm 2,5^\circ\text{C}$.

A concentração de oxigênio dissolvido (O.D.) para o ensaio com fornecimento de 1 L min^{-1} de CO_2 , apresentou comportamento característico ao longo do dia (Figura 2), aumentando a concentração de O_2 no meio líquido com o incremento da radiação solar. Na fase escura a concentração de O.D. observada foi em média 89,2% da saturação do ar (% Sat.). Logo

após, à medida que a radiação solar aumentou, ocorreu o incremento na concentração de O.D., atingindo valor máximo de 149,2% entre 12 e 16 h. A partir das 18 h, com o decréscimo da radiação solar, a concentração de O.D. também diminuiu gradativamente. De acordo com os dados obtidos, não foi verificado elevado acúmulo de O.D. no cultivo, sendo o sistema capaz de promover a dessorção deste gás por meio de aeração contínua dos experimentos. Segundo Ippoliti et al. (2016), o acúmulo de O.D. acima de 300% ao meio dia (12 h), pico de maior radiação solar, podem indicar que a fotobiorreator possui capacidade de transferência de massa insuficiente para remover o acúmulo de oxigênio produzido ao meio dia. Este acúmulo de O.D. pode favorecer a ocorrência do fenômeno de fotorrespiração, o qual pode reduzir a produtividade de biomassa do cultivo.

Segundo Molina et al. (2001), a concentração de O.D. nos cultivos apresenta variação ao longo do período de luz, devido a atividade fotossintética das células. Estes mesmos autores, cultivando *Phaeodactylum tricorutum*, no verão, em condições *outdoor*, observaram que a concentração de O.D. aumentou rapidamente entre 4 e 9 h, atingindo valores de 200% de saturação do ar com o incremento da radiação solar. Contudo, quando a radiação solar excedia a $1500 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (valor atingido às 12 h), a concentração de O.D. diminuiu, devido a ocorrência da fotoinibição. Os cultivos realizados na primavera, por outro lado, apresentaram declínio menos acentuado. Esse fato foi atribuído a menor fotoinibição durante a primavera quando a radiação solar é geralmente menor com relação ao verão.

Figura 2 – Perfis de radiação solar (cinza escuro), oxigênio dissolvido (O.D., cinza claro) e temperatura (preto) para ensaio com vazão de CO_2 de 1 L min^{-1} ao longo de 24 h de cultivo de *N. gaditana*



O cultivo de microalgas em biorreatores fechados, sob condições *outdoor*, pode resultar em elevado acúmulo de O.D. no meio líquido (CARVALHO; MEIRELES; MALCATA, 2006). Em consequência disso, pode ocorrer a inibição da fotossíntese e favorecer o processo de fotorrespiração (FERNÁNDEZ et al., 2012). Quando ocorre este fenômeno, a enzima Rubisco, modifica seu metabolismo e atua como oxigenase, utilizando o oxigênio para formar fosfoglicolato (MASOJÍDEK; TORZILLO; KOBLÍŽEK, 2013). A ocorrência da fotorrespiração não permite a fixação de carbono pelas células e por fim consome quantidades significativas de energia, liberando CO₂ previamente fixado (NELSON; COX, 2014).

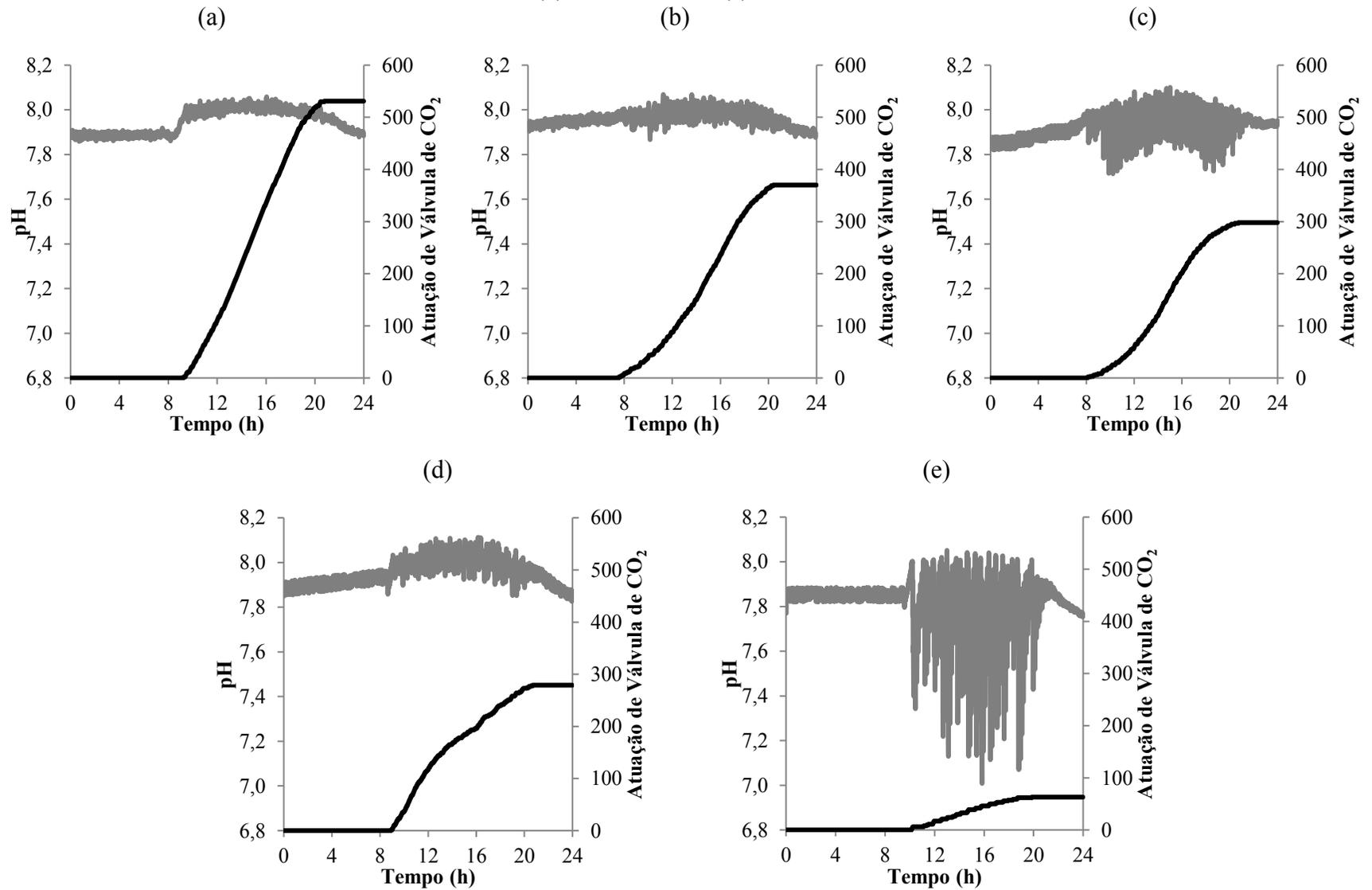
Acién Fernández, Fernández Sevilla e Molina Grima (2013), relataram que além do acúmulo de oxigênio do interior do fotobiorreator ser um problema, outros aspectos como a limitação de carbono e variações de pH ao longo da tubulação podem influenciar a eficiência do processo. Tendo em vista que estes aspectos podem influenciar a bioconversão de CO₂ pelas microalgas, é necessário realizar análise do efeito de parâmetros de projeto e de operação como, comprimento e diâmetro da tubulação, vazão, perfis de concentração de oxigênio dissolvido e CO₂, bem como a transferência de massa gás-líquido.

No presente estudo foi empregado o controle do pH por demanda dos cultivos de *N. gaditana* utilizando injeção de CO₂ nas vazões entre 1 e 20 L min⁻¹. De acordo com Acién et al. (2012b), a injeção de CO₂ sob demanda tem se mostrado uma técnica promissora para efetuar o controle do pH e ao mesmo tempo fornecer a fonte de carbono.

Nos experimentos com vazões de CO₂ de 1, 3, 5 e 8 L min⁻¹ foram verificados menores gradientes de pH (Figura 3a - d). Durante a fase clara, nos ensaios com vazões de 1 (7,99), 3 (7,98), 5 (7,94) e 8 (7,97) L min⁻¹ de CO₂, os valores médios de pH dos cultivos de *N. gaditana* foram próximos ao valor de ajuste (8,0) (Tabela 1). Entretanto, o ensaio com vazão de 20 L min⁻¹ apresentou maiores variações nos valores de pH durante a fase clara (Figura 3e), sendo verificado pH médio de 7,77 e mínimo de 7,01. Conforme relatado por Rubio et al. (1999) e Duarte-Santos et al. (2016) quando o CO₂ é injetado em elevadas concentrações podem ocorrer gradientes de pH no interior do reator, os quais podem afetar o cultivo.

No período de luz, todos os experimentos apresentaram aumento gradual de pH até atingirem valores próximos ao valor de ajuste (8,0), devido ao consumo de CO₂ pela microalga na fotossíntese. Com o fornecimento de CO₂ para o controle do pH, os valores máximos verificados foram em torno de 8,1 para os ensaios com injeção de 5 e 8 L min⁻¹ (Tabela 1). De acordo com Grobbelaar (2013), o consumo de CO₂ pelas microalgas resulta no acúmulo de íons OH⁻ no meio e, conseqüentemente, no incremento do pH.

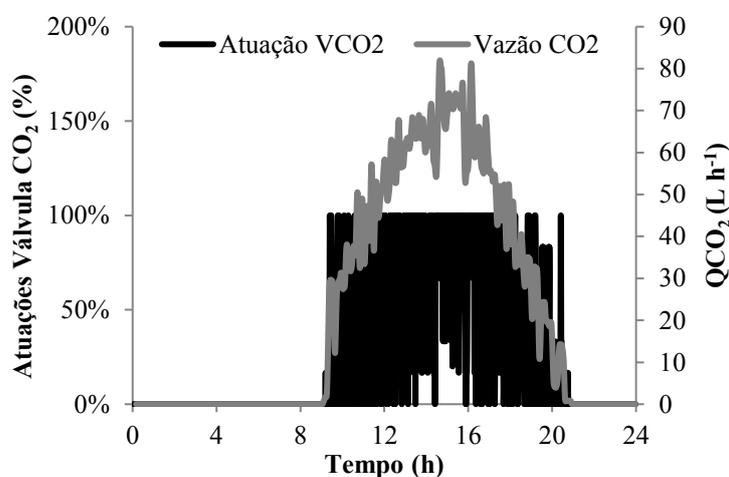
Figura 3 - Valores de pH (cinza) e de abertura de válvula de CO₂ (preto) para os cultivos de *N. gaditana* com vazão de CO₂ de 1,0 (a), 3,0 (b), 5,0 (c), 8,0 (d) e 20,0 L min⁻¹ (e)



Conforme Pawlowski et al. (2014b), o pH do cultivo é influenciado principalmente por dois fenômenos: fornecimento de CO₂ e absorção do mesmo em função da disponibilidade de luz. O CO₂ fornecido, contribui para a formação de ácido carbônico (H₂CO₃), causando redução do pH da cultura. Por outro lado, as microalgas na presença de luz realizam fotossíntese, consumindo o CO₂ e produzindo O₂, causando assim o aumento do pH do cultivo.

Com relação ao fornecimento (\dot{m}_{CO_2}) e a demanda de CO₂ (D_{CO_2}), foi possível verificar que, ao utilizar a vazão de 1 L min⁻¹ a massa de carbono requerida pelo cultivo foi maior do que a alimentada ao sistema (Tabela 1). Nessa condição experimental, também foi observado que o sistema estava no limite para o controle do pH, haja vista que foi contabilizado elevado número de vezes (531) que a válvula de CO₂ foi acionada para manutenção do pH no valor do *setpoint* (Figura 3a). Diante disso, foi obtido percentual médio de abertura de válvula de 57% no período claro (9 e 20 h), atingindo valores máximos de 100% entre 14 e 16 h (Figura 4).

Figura 4 – Porcentagem de abertura de válvula de CO₂ (preto) e fornecimento de CO₂ por hora (Q_{CO_2}) (cinza) no cultivo de *N. gaditana* com injeção de CO₂ na vazão de 1,0 L min⁻¹



Como pode-se observar pela Figura 4, a demanda de CO₂ pelas microalgas foi maior (Q_{CO_2} média de 70,0 L h⁻¹) nas horas centrais do dia, período de maiores índices de radiação solar (entre 14 e 16 h). Conforme relatado por Arbib et al. (2013), é possível relacionar os intervalos das injeções de gases de combustão no cultivo com a atividade fotossintética das células microalgais. Desta forma, ficou evidenciado que a radiação solar é um dos parâmetros ambientais que influencia diretamente o pH do cultivo. Os resultados encontrados por Godos

et al. (2014) indicaram que a maior frequência de adição de gás de combustão contendo 10% de CO₂ no cultivo de *Scenedesmus* sp. foi verificada com o aumento da radiação solar.

Ao avaliar a influência das vazões de 3, 5 e 8 L min⁻¹, foi possível constatar que a massa de entrada de CO₂ foi maior que a demandada pelo cultivo (Tabela 1), demonstrando assim, que mesmo com excesso do gás, o sistema se manteve estável. O aumento da vazão de CO₂ resultou no decréscimo do número de vezes que a válvula foi acionada para o controle do pH (Figura 3-d). Neste sentido, o incremento da vazão de CO₂ de 1 para 3, 5 e 8 L min⁻¹ contribuiu para a redução de 43,5%, 78,2% e 90,3% no número de atuações da válvula de injeção de CO₂. O fornecimento de carbono no experimento com injeção de 20 L min⁻¹, também foi suficiente para suprir a demanda de *N. gaditana* (Tabela 1). Neste experimento foi verificado o menor número de atuações da válvula de CO₂ (Figura 3e), representando redução de 742,9% de abertura de válvula comparado ao ensaio com menor vazão de CO₂ (1 L min⁻¹). A redução de atuações das válvulas é interessante porque contribui com a economia de energia, aumento da vida útil do equipamento, bem como com a redução do tempo de injeção de CO₂ (PAWLOWSKI et al., 2014a, 2014b). No entanto, o aumento da vazão pode resultar em gradientes de pH, os quais influenciam a eficiência de utilização de CO₂ e a produtividade de biomassa. Conforme observado por Duarte-Santos et al. (2016), quando são injetadas grandes quantidades de CO₂, seja por elevada fração molar ou vazão de injeção, pode ocorrer atraso entre a medição do pH no reator e a abertura de válvula para a alimentação de CO₂. Neste sentido, mais carbono seria fornecido do que o requerido pelo sistema, o que poderia prejudicar o desempenho do cultivo.

As microalgas possuem em média 50% de carbono em sua composição (GROBBELAAR, 2013). Logo, é necessário fornecer quantidade mínima de 1,8 kg de CO₂ para produzir 1 kg de biomassa (ACIÉN et al., 2012a). Esta quantidade de carbono pode ser fornecida por meio de correntes gasosas, as quais contenham CO₂ concentrado em baixa vazão ou, baixa concentração de CO₂ em alta vazão. Neste sentido, além do supracitado, a confiabilidade do sistema também varia em função da capacidade de utilizar eficientemente o CO₂ fornecido para a produção de biomassa, minimizando as perdas de carbono para a atmosfera (DUARTE-SANTOS et al., 2016).

O experimento com vazão de 5 L min⁻¹ de CO₂ apresentou maior resultado de produtividade de biomassa (0,24 g L⁻¹ d⁻¹), sendo este valor 50% e 100% superior aos verificados nos ensaios com injeção de 8 e 20 L min⁻¹ de CO₂, respectivamente (Tabela 1). No ensaio com injeção de 1 L min⁻¹ a produtividade de biomassa verificada foi 0,22 g L⁻¹ d⁻¹, mesmo a quantidade injetada não suprimindo a demanda de carbono. Os resultados demonstraram

que a modificação da vazão de CO₂ influenciou a produtividade da biomassa, e com isso foi possível determinar que o uso da vazão de 5 L min⁻¹, além de manter o pH no valor ajustado, também foi capaz de fornecer quantidade de carbono suficiente para o crescimento da microalga. Ademais, nessa condição experimental foi verificado número de atuação de válvulas intermediário, não prejudicando o desempenho do equipamento.

Tabela 1 - Resultados obtidos para os cultivos de *N. gaditana*, concentração e produtividade de lipídios na biomassa da microalga em diferentes vazões de CO₂.

Parâmetro	Vazão de CO ₂ (L min ⁻¹)				
	1	3	5	8	20
pH mínimo	7,86	7,87	7,71	7,77	7,01
pH máximo	8,06	8,07	8,10	8,10	8,05
pH médio	7,99±0,04	7,98±0,03	7,94±0,07	7,97±0,09	7,76±0,18
Fv/Fm	0,69	0,70	0,70	0,68	0,71
P _x (g L ⁻¹ d ⁻¹)	0,22	0,21	0,24	0,16	0,12
CIT entrada (g L ⁻¹)	0,119	0,119	0,119	0,119	0,119
CIT saída (g L ⁻¹)	0,147	0,151	0,157	0,137	0,139
ṁCO ₂ (g d ⁻¹)	956,3	1262,1	1648,0	1495,2	1326,6
D _{CO₂} (g d ⁻¹)	1029,6	982,8	1123,2	748,8	561,6
E _{CO₂} (% m m ⁻¹)	108	78	68	50	42
R _{CO₂/biomassa} (g g ⁻¹)	1,67	2,31	2,64	3,59	4,25
Lipídios (% m m ⁻¹)	18,8 ^c ± 0,3	14,6 ^d ± 0,4	14,6 ^d ± 1,4	21,1 ^b ± 0,6	23,1 ^a ± 0,6
P _{lipídios} (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	41,2 ^a ± 0,9	31,2 ^{c, d} ± 0,1	36,7 ^b ± 2,0	33,2 ^{c, b} ± 0,3	28,0 ^d ± 0,8

pH mínimo, pH máximo e pH médio na fase clara; Fv/Fm – fluorescência da clorofila; P_x – produtividade de biomassa; CIT – carbono inorgânico total; ṁCO₂ – taxa mássica de CO₂ fornecido; D_{CO₂} – demanda de CO₂; E_{CO₂} – eficiência de utilização de CO₂; R_{CO₂/biomassa} – Razão entre o fornecimento de CO₂ e a produção de biomassa; Lipídios (% m m⁻¹) – concentração de lipídios na biomassa; P_{lipídios} (mg L⁻¹ d⁻¹) – produtividade lipídica.

Com relação a razão de fornecimento de CO₂ para a produção de biomassa, esse variou entre 1,67 e 4,25 g_{CO₂} g_{biomassa}⁻¹. Os ensaios com injeção de 3 e 5 L min⁻¹ de CO₂ apresentaram valores de 2,31 e 2,64 g_{CO₂} g_{biomassa}⁻¹, respectivamente. Os resultados obtidos estão próximos ao valor de 2,34 g_{CO₂} g_{biomassa}⁻¹, descrito por Acién et al. (2012a) em cultivos de *Scenedesmus almeriensis* com eficiência de utilização de CO₂ de 74,5%.

Os resultados observados para a fluorescência da clorofila (Fv/Fm) permaneceram constantes entre 0,68 e 0,71, independente da vazão empregada. Tal fato, indicou que o aumento

da vazão, mesmo causando redução da produtividade de biomassa, não afetou o rendimento do aparelho fotossintético (Tabela 1).

A concentração de carbono inorgânico total no meio líquido (CIT, g L⁻¹) de entrada foi a mesma para todos experimentos (0,119 g L⁻¹). Este valor é atribuído ao carbono inorgânico presente na água utilizada no preparo do meio de cultivo. A concentração de CIT presente na fase líquida de saída apresentou aumento de 0,147 para 0,157 g L⁻¹ com o incremento da vazão de CO₂ de 1 para 5 L min⁻¹. Conforme relatado por Ación et al. (2012a), quando a concentração de CIT é elevada no meio de saída, indica que parte do CO₂ adicionado para o controle do pH permaneceu na fase líquida, sendo perdido com o meio de cultivo quando realizada a diluição. Neste sentido, podemos relacionar os valores de CIT com a massa de carbono fornecida aos cultivos (Tabela 1), sendo verificado que o aumento da vazão de CO₂ influenciou no incremento da concentração de carbono inorgânico na fase líquida.

Nesse estudo foi possível observar decréscimo na eficiência de utilização de CO₂ quando a vazão aumentou de 1 para 20 L min⁻¹. A utilização das vazões de 3 e 5 L min⁻¹ resultaram em eficiências de utilização de CO₂ por *N. gaditana* de 78% e 68%, respectivamente. Entretanto, no ensaio com 20 L min⁻¹ a eficiência foi 42%, representando redução de 85,7% e 61,9% desta resposta com relação aos ensaios com 3 e 5 L min⁻¹, respectivamente. Chai e Zhao (2012) verificaram redução da eficiência de remoção de CO₂ com o aumento da vazão, de 20 para 120 mL min⁻¹, em cultivos de *Chlorococum* sp. Os autores atribuíram este resultado a redução da área interfacial entre gás e o líquido, e estes sugerem que isto pode ser melhorado minimizando o tamanho de bolhas e com menores vazões de CO₂.

Duarte-Santos et al. (2016) e Godos et al. (2014) avaliando a transferência de CO₂ e o balanço de carbono em reatores do tipo *Raceway*, observaram que o aumento da vazão de CO₂ resultou no fornecimento de maior quantidade de carbono do que o requerido pelo cultivo, contribuindo assim para o maior acúmulo deste gás no meio líquido e conseqüentemente em maiores perdas para atmosfera. Da mesma forma, Moraes et al. (2016) avaliando o efeito da vazão de mistura gasosa contendo CO₂ no cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18, observaram redução na produtividade de biomassa e na E_{CO2} com o aumento da vazão de 0,085 para 0,510 L min⁻¹.

No presente trabalho, o teor de lipídios na biomassa de *N. gaditana* variou entre 14,6% e 23,1% (Tabela 1). A maior concentração de lipídios ($p < 0,05$) foi verificada no experimento com injeção de 20 L min⁻¹ de CO₂. Desta forma, foi possível observar que o emprego de elevada vazão de CO₂ e a ocorrência de gradientes de pH, podem ter causado condição de estresse para o cultivo, contribuindo para aumento do conteúdo lipídico de *N. gaditana*. Porém, ao analisarmos a produtividade lipídica, foi possível verificar que o maior

resultado ($41,2 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) ($p < 0,05$) foi encontrado no experimento com injeção de 1 L min^{-1} de CO_2 , seguido do ensaio com vazão de 5 L min^{-1} ($36,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). O aumento da vazão de CO_2 de 1 para 20 L min^{-1} , resultou na redução em 47,1% do valor de produtividade lipídica no cultivo de *N. gaditana*. Segundo Acién et al. (2012b), quando microalgas são submetidas à condições de estresse, estas podem desencadear o acúmulo de lipídios na biomassa. Porém, estas condições não contribuem para o crescimento celular. Neste sentido, além de avaliar o conteúdo lipídico produzido, deve-se levar em consideração a produtividade lipídica. Segundo Chen et al. (2017), a produtividade lipídica é um fator importante e necessita ser avaliado, pois está permite verificar o potencial de aplicação da biomassa microalgal como matéria-prima para a produção de biodiesel.

4 CONCLUSÃO

Portanto, com esse estudo foi possível verificar que o emprego de vazões de CO_2 entre 1 e 8 L min^{-1} permitiram o melhor controle do pH. Entre as vazões avaliadas, quando empregada a vazão de 5 L min^{-1} foi verificada eficiência de utilização de CO_2 por *N. gaditana* de aproximadamente 70% (m m^{-1}), produtividade lipídica de $36,7 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e o maior resultado de produtividade de biomassa ($0,24 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Desta forma, está vazão foi selecionada para o fornecimento de carbono e controle de pH nos cultivos de *Nannochloropsis gaditana* em fotobiorreatores tubulares. Diante disso, para se conseguir conversão eficiente de CO_2 em biomassa e a redução de custos com o processo, o conhecimento e o controle de parâmetros é fundamental para o desenvolvimento do cultivo de microalgas em grande escala.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACIÉN, F. G.; FERNÁNDEZ, J. M.; MAGÁN, J. J.; MOLINA, E. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1344–1353, 2012a.
- ACIÉN, F. G.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J. M.; MOLINA GRIMA, E. Photobioreactors for the production of microalgae. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 131–151, 8 jun. 2013.
- ACIÉN, F. G.; GARCIA CAMACHO, F.; SANCHEZ PEREZ, J. A.; FERNANDEZ SEVILLA, J. M.; MOLINA GRIMA, E. Modeling of Biomass Productivity in Tubular Photobioreactors for Microalgal Cultures: Effects of Dilution Rate, Tube Diameter, and Solar Irradiance. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, p. 605–616, 1998.

ACIÉN, F. G.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C. V.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J. M.; MOLINA GRIMA, E. Conversion of CO₂ into biomass by microalgae: How realistic a contribution may it be to significant CO₂ removal? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 3, p. 577–586, 2012b.

ACIÉN, F. G.; MOLINA, E.; REIS, A.; TORZILLO, G.; ZITTELLI, G. C.; SEPÚLVEDA, C.; MASOJÍDEK, J. 1 - Photobioreactors for the production of microalgae A2 - Gonzalez-Fernandez, Cristina. In: MUÑOZ, R. B. T.-M.-B. B. AND B. (Ed.). **Woodhead Publishing Series in Energy**. [s.l.] Woodhead Publishing, 2017. p. 1–44.

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

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. **Association of Official Analysis Chemists International**, 2000.

ARBIB, Z.; RUIZ, J.; ÁLVAREZ-DÍAZ, P.; GARRIDO-PÉREZ, C.; BARRAGAN, J.; PERALES, J. A. Effect of pH control by means of flue gas addition on three different photobioreactors treating urban wastewater in long-term operation. **Ecological Engineering**, v. 57, p. 226–235, 2013.

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

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

CARVALHO, A. P.; MEIRELES, L. A.; MALCATA, F. X. Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 6, p. 1490–1506, 2006.

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

CHEN, B.; WAN, C.; MEHMOOD, M. A.; CHANG, J. S.; BAI, F.; ZHAO, X. Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products—A review. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1198–1206, 2017.

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

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

v. 214, p. 159–165, 2016.

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

FERNÁNDEZ, I.; ACIÉN, F. G. F.; BERENGUEL, M.; GUZMÁN, J. L.; ANDRADE, G. A.; PAGANO, D. J. A lumped parameter chemical-physical model for tubular photobioreactors. **Chemical Engineering Science**, v. 112, p. 116–129, 2014.

FERNÁNDEZ, I.; ACIÉN, F. G.; FERNÁNDEZ, J. M.; GUZMÁN, J. L.; MAGÁN, J. J.; BERENGUEL, M. Dynamic model of microalgal production in tubular photobioreactors. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 172–181, 2012.

GODOS, I. de; MENDOZA, J. L.; ACIÉN, F. G.; MOLINA, E.; BANKS, C. J.; HEAVEN, S.; ROGALLA, F. Evaluation of carbon dioxide mass transfer in raceway reactors for microalgae culture using flue gases. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 307–314, 2014.

GROBBELAAR, J. U. Inorganic Algal Nutrition. In: RICHMOND, A.; QIANG, H. (Ed.). **Handbook of microalgal culture : applied phycology and biotechnology**. Second ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2013. p. 123–133.

HOLLAND, D. L.; GABBOTT, P. A. A Micro-Analytical Scheme for the Determination of Protein, Carbohydrate, Lipid and RNA Levels in Marine Invertebrate Larvae. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 51, n. 3, p. 659–668, 1971.

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

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

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

MENDOZA, J. L.; GRANADOS, M. R.; DE GODOS, I.; ACIÉN, F. G.; MOLINA, E.; BANKS, C.; HEAVEN, S. Fluid-dynamic characterization of real-scale raceway reactors for microalgae production. **Biomass and Bioenergy**, v. 54, p. 267–275, 2013.

MOLINA, E.; FERNÁNDEZ, J.; ACIÉN, F. G.; CHISTI, Y. Tubular photobioreactor design for algal cultures. **Journal of Biotechnology**, v. 92, n. 2, p. 113–131, 2001.

MOLINA GRIMA, E.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; GARCÍA CAMACHO, F.; CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. **Journal of Biotechnology**, v. 70, n. 1, p. 231–247, 1999.

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

MORAIS, M. G.; VAZ, B. da S.; MORAIS, E. G.; COSTA, J. A. V. Biologically Active

Metabolites Synthesized by Microalgae. **BioMed Research International**, p. 1–16, 2014.

MORAIS, E. G.; MORAES, L.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Biodiesel and Bioethanol from Microalgae. In: SOCCOL, C. R.; BRAR, S. K.; FAULDS, C.; RAMOS, L. P. (Ed.). **Green Fuels Technology**. Green Energy and Technology. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 359–386.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Fosforilação Oxidativa e Fotofosforilação. In: NELSON, D. L.; COX, M. M. (Ed.). **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6^a ed. ed. Porto Alegre: ARTMED EDITORA LTDA, 2014. p. 731–789.

PAWLOWSKI, A.; FERNÁNDEZ, I.; GUZMÁN, J. L.; BERENGUEL, M.; ACIÉN, F. G.; NORMEY-RICO, J. E. Event-based predictive control of pH in tubular photobioreactors. **Computers and Chemical Engineering**, v. 65, p. 28–39, 2014a.

PAWLOWSKI, A.; MENDOZA, J. L.; GUZMÁN, J. L.; BERENGUEL, M.; ACIÉN, F. G.; DORMIDO, S. Effective utilization of flue gases in raceway reactor with event-based pH control for microalgae culture. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 1–9, 2014b.

SAN PEDRO, A.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C. V.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; MOLINA-GRIMA, E. Outdoor pilot-scale production of *Nannochloropsis gaditana*: Influence of culture parameters and lipid production rates in tubular photobioreactors. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 667–676, 2014.

SAN PEDRO, A.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C. V.; ACIÉN, F. G.; MOLINA-GRIMA, E. Outdoor pilot production of *Nannochloropsis gaditana*: Influence of culture parameters and lipid production rates in raceway ponds. **Algal Research**, v. 18, p. 205–213, 2015.

SAN PEDRO, A.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C. V.; ACIÉN, F. G.; MOLINA-GRIMA, E. Outdoor pilot production of *Nannochloropsis gaditana*: Influence of culture parameters and lipid production rates in flat-panel photobioreactors. **Algal Research**, v. 18, p. 156–165, 2016.

SAN PEDRO, A.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C. V.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; MOLINA-GRIMA, E. Marine microalgae selection and culture conditions optimization for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 353–361, 2013.

TRIVEDI, J.; AILA, M.; BANGWAL, D. P.; KAUL, S.; GARG, M. O. Algae based biorefinery—How to make sense? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 47, p. 295–307, 2015.

WANG, B.; LAN, C. Q.; HORSMAN, M. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 4, p. 904–912, 2012.

ZITTELI, G. C.; LAVISTA, F.; BASTIANINI, A.; RODOLFI, L.; VINCENZINI, M.; TREDICI, M. R. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. **Journal of biotechnology**, v. 70, p. 299–312, 1999.

ZITTELLI, G. C.; BIONDI, N.; RODOLFI, L.; TREDICI, M. R. Photobioreactors for Mass Production of Microalgae. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). **Handbook of microalgal culture : applied phycology and biotechnology**. Second ed. Oxford: Wiley Blackwell, 2013. p. 225–266.

ARTIGO 4

AVALIAÇÃO DO EFEITO pH NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Nannochloropsis gaditana* E NO FORNECIMENTO DE CO₂ EM FOTOBIORREACTORES TUBULARES

**AValiação DO EFEITO DO pH NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE
Nannochloropsis gaditana E NO FORNECIMENTO DE CO₂ EM
FOTOBIOREACTORES TUBULARES**

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi verificar a influência do pH na produtividade de biomassa e na eficiência de utilização de CO₂ por *Nannochloropsis gaditana*, bem como no fornecimento de carbono para o cultivo. Os experimentos foram realizados em fotobiorreatores tubulares de 2.600 L de volume útil em escala piloto, mantidos em estufa de filme transparente em condições *outdoor*. Os valores de pH avaliados foram 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0. O controle do pH foi realizado mediante a injeção de CO₂ puro sob demanda, na vazão de 5 L min⁻¹, sendo também utilizado como fonte de carbono pelo cultivo. Com os resultados obtidos verificou-se que o pH ideal para o crescimento da microalga foi 8,0, apresentando maiores valores de eficiência de utilização de CO₂ (79% m m⁻¹) e produtividade de biomassa (0,17 g L⁻¹ d⁻¹). Nesta condição, a válvula de injeção de CO₂ foi acionada 158 vezes, permanecendo aberta 14,1% no período claro, sendo capaz de fornecer a quantidade de CO₂ demandada pelo cultivo. Diante disso, foi possível verificar que a manutenção do cultivo em pH ótimo permite que se atinjam maiores conversões de CO₂ em biomassa, contribuindo para eficiência e a redução de custos com o processo.

Palavras-chave: Dióxido de carbono. Demanda de carbono. Microalga. pH. Produtividade de biomassa.

1 INTRODUÇÃO

A aplicação biotecnológica de microalgas tem se ampliado em diversos campos (ACIÉN et al., 2017), devido a capacidade desses micro-organismos de produzir biomassa rica em compostos, como proteínas (MORAIS et al., 2009), lipídios, pigmentos (BAUER et al., 2017), carboidratos (FREITAS et al., 2017), biopolímeros (MARTINS et al., 2014), entre outros. A respeito da aplicação da biomassa, essa pode ser empregada na elaboração de alimentos, fármacos, cosméticos (SPOLAORE et al., 2006) e na produção de biocombustíveis (BRENNAN; OWENDE, 2010).

As microalgas necessitam de alguns requisitos para que o seu crescimento ocorra de forma eficiente. Os cultivos podem ser influenciados por parâmetros nutricionais (carbono, nitrogênio e fósforo), bem como por parâmetros físico-químicos, tais como temperatura, luz e pH (ACIÉN et al., 2017). Entre os parâmetros de cultivo supracitados, o pH é considerado um dos principais fatores que pode influenciar o crescimento das microalgas. A ocorrência de variações de pH podem afetar a eficiência fotossintética, produtividade e composição da biomassa (ACIÉN et al., 2017; KHATOON et al., 2014; SÁNCHEZ et al., 2008).

Cada espécie de microalga possui intervalo adequado de pH (BARTLEY et al., 2014; QIU et al., 2017; SÁNCHEZ et al., 2008). Santos (2015) avaliou a atividade fotossintética de *Scenedesmus almeriensis* e *Spirulina platensis* em diferentes valores de pH. Este autor constatou que entre 8 e 10 foi o intervalo ideal de pH para *S. almeriensis*, enquanto para *S. platensis* a máxima taxa fotossintética foi obtida em pH 8,9.

O controle do pH em cultivos microalgais pode ser realizado mediante a adição de tampões, injeção de CO₂ e ajuste com ácido e base (BARTLEY et al., 2014; QIU et al., 2017). A injeção de CO₂ tem sido considerada um dos métodos mais adequados para o controle do pH, porque ao mesmo tempo fornece a fonte de carbono para o cultivo, mantendo elevada a produção em grande escala de biomassa microalgal (GROBBELAAR, 2013).

O fornecimento de CO₂ representa uma das maiores parcelas dos custos com a produção (ACIÉN et al., 2012a). Neste sentido, a injeção de CO₂ deve ocorrer de maneira eficiente, a fim de manter o pH no intervalo ideal, e ao mesmo tempo fornecer as quantidades necessárias de carbono para o crescimento, minimizando perdas e custos com o processo (ACIÉN et al., 2017).

No presente estudo, o efeito do pH foi verificado em cultivos de *Nannochloropsis gaditana* realizados em modo semicontínuo em fotobiorreatores tubulares sob condições *outdoor*. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi verificar a influência do pH na

produtividade de biomassa, eficiência de utilização de CO₂ por *Nannochloropsis gaditana*, bem como avaliar o desempenho do sistema no controle do pH e fornecimento de CO₂ para o cultivo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO

O micro-organismo utilizado foi a microalga *Nannochloropsis gaditana*, pertencente a coleção de culturas do grupo de pesquisa “Biotecnologia de Microalgas Marinhas da Universidad de Almería (Espanha)” (Anexo I – Figura A6). O meio de cultivo utilizado para a propagação do inóculo e para realização dos experimentos foi preparado e filtrado através de um sistema de ultrafiltração (membrana com 0,2 µm de poro) (SFP 2860, China). Este meio de cultivo era composto por sal marinho (30 g L⁻¹ de NaCl) e fertilizantes agrícolas, tais como: nitrato de cálcio (Ca(NO₃)₂, 0,8 g L⁻¹), fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄, 0,25 g L⁻¹), sulfato de magnésio (MgSO₄, 0,3 g L⁻¹) e micronutrientes (Welgro hidropônico, 0,02 mL L⁻¹ e Karentol, 0,02 g L⁻¹) (ANEXO I – Tabela A2) (CAMACHO-RODRÍGUEZ et al. 2013).

2.2. PROPAGAÇÃO DO INÓCULO

Para a realização dos experimentos, primeiramente o inóculo foi propagado em escala laboratorial e posteriormente em escala piloto (condições *outdoor*) em fotobiorreatores do tipo colunas de bolhas (volume total de 100 L), com controle de pH e temperatura. O controle do pH do inóculo foi realizado por meio do fornecimento de CO₂ por demanda, sendo mantido entre 7,8 e 8,0.

2.3 FOTOBIORREATOR TUBULAR E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

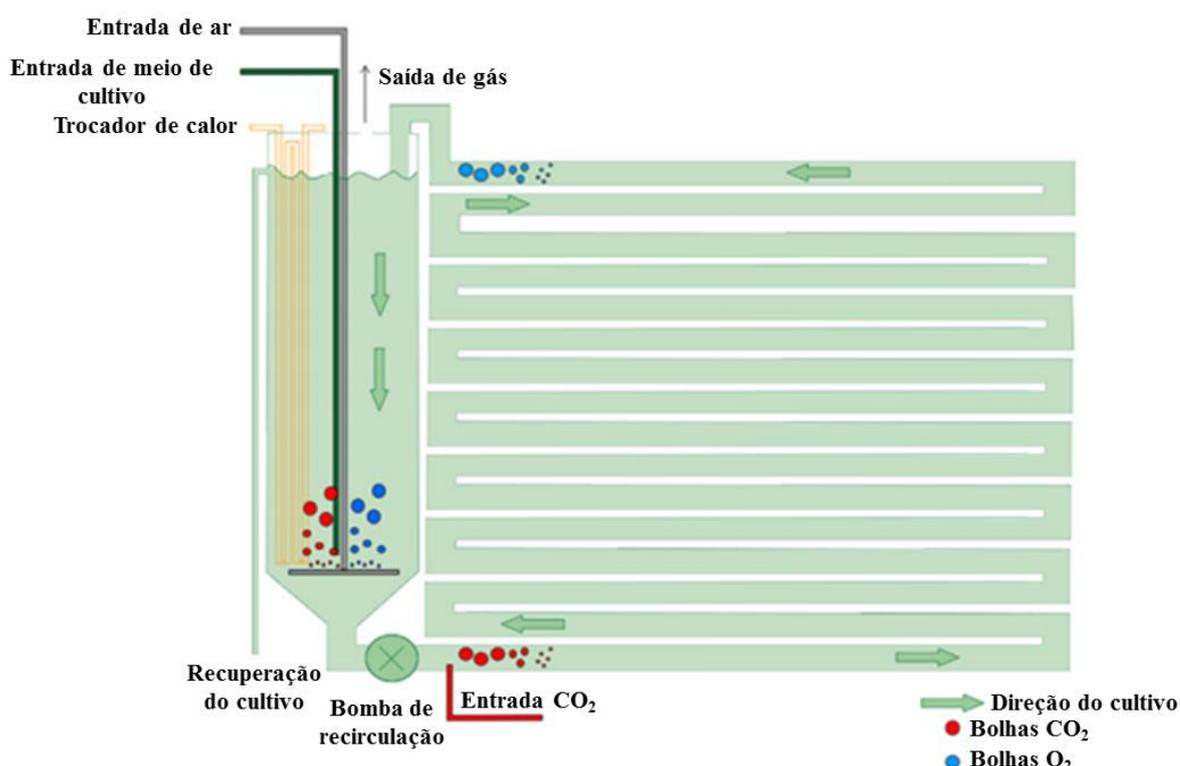
Os experimentos foram realizados em fotobiorreatores tubulares de 2.600 L em escala piloto, localizados em estufa de filme transparente na Estação Experimental *Las Palmerillas*, pertencente a Fundação CAJAMAR (Almería, Espanha) (Anexo I – Figura A7). Os fotobiorreatores eram compostos por receptores de radiação solar e coluna de bolhas (Figura 1), conforme descrito por Andrade et al. (2016a) e Fernández et al. (2012).

A manutenção da temperatura foi realizada mediante a circulação de água a temperatura ambiente em trocadores de calor de aço inox, com vazão de 1.500 L h⁻¹, estes localizados no interior da coluna de bolhas. Para promover a recirculação contínua (0,9 m s⁻¹)

do cultivo entre a coluna e os receptores de luz, foi utilizada bomba centrífuga localizada na parte inferior da coluna. Para eliminar os gases acumulados no interior do fotobiorreator, ar comprimido foi injetado na coluna de bolhas a uma vazão de 200 L min^{-1} (IPPOLITI et al., 2016).

Os fotobiorreatores eram equipados com sondas de oxigênio dissolvido (OD5120 Crison, Espanha), pH e temperatura (pH5083T Crison, Espanha), as quais estavam localizadas no final do *loop* e conectadas a um multímetro (MM44, Crison, Espanha). A radiação solar absorvida foi mensurada por piranômetro termoeletrico conectado a um adaptador AC-420 (LP-02, Geónica S.A., Espanha). As sondas estavam conectadas a um transmissor (Labjack U12) e este a um *software* de aquisição de dados (Daqfactory, Azeotech, Arizona, EUA) (ANDRADE et al., 2016a; FERNÁNDEZ et al., 2012).

Figura 1 - Diagrama do fotobiorreator tubular com vista lateral



Fonte: Adaptado de Fernández et al. (2014)

Os tratamentos propostos no corrente estudo consistiram em variar o pH dos cultivos em 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 e 10,0. O controle do pH dos cultivos foi realizado mediante a injeção de CO_2 puro sob demanda na vazão de 5 L min^{-1} , mensurada por medidores de vazão (FR4500, Key Instruments, EUA) e com pressão manométrica de trabalho de $0,2 \text{ kgf cm}^{-2}$.

Como o CO₂ foi fornecido por demanda, a injeção nos cultivos foi regulada por válvulas solenoides *on/off*, acionadas automaticamente pelo sistema de controle quando o pH atingia o valor do *setpoint* no período de luz ($> 30 \text{ W m}^{-2}$).

Os ensaios foram realizados entre os meses de agosto e setembro (verão). Primeiramente os cultivos foram iniciados em modo batelada e quando a concentração de biomassa atingiu valores superiores a $1,0 \text{ g L}^{-1}$, estes foram operados em modo semicontínuo, com taxa de diluição de $0,16 \text{ d}^{-1}$. A cada remoção, a biomassa foi recuperada do meio líquido por centrifugação e o meio de cultivo foi recirculado e armazenado para posterior suplementação com nutrientes para ser reutilizado na próxima diluição. Os ensaios foram mantidos no mínimo 7 d em cada condição experimental, com exceção do ensaio em pH 6,0, o qual foi avaliado por 1 d, pois com a vazão utilizada não foi possível atingir o pH de *setpoint*, resultando em gasto excessivo de CO₂. Deste período de 7 d, foi selecionado um dia que representasse o efeito de cada tratamento. A seleção foi baseada na semelhança de fatores ambientais, como temperatura e radiação solar, entre os tratamentos. O monitoramento dos ensaios foi realizado durante 24 h d^{-1} , consistindo em uma amostragem de 1440 dados diários.

2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

A concentração de biomassa (X_b) foi determinada mediante filtração a vácuo de 50 mL de cultivo em filtro de microfibras de vidro, com tamanho de poro de $0,7 \mu\text{m}$ (WhatmanTM). Após a biomassa foi lavada com 50 mL da solução de formiato de amônio ($1,25\% \text{ m v}^{-1}$) para remoção dos sais aderidos às células, seca em estufa a 80°C por 24 h e pesada para a determinação da biomassa seca.

A fluorescência da clorofila (F_v/F_m) foi determinada por meio da relação entre fluorescência variável (F_v) e máxima (F_m), utilizando fluorímetro (AquaPen AP 100, Photon Systems Instruments, República Checa) (IPPOLITI et al., 2016).

Diariamente foram realizadas observações microscópicas dos cultivos (Laica, ICC50 HD, Alemanha), a fim de garantir que a cepa *N. gaditana* fosse o micro-organismo dominante ao longo de todo o período de ensaio, mesmo em condições *outdoor*.

No meio de cultivo de entrada e de saída (parcela retirada na diluição) foi determinada a concentração de carbono inorgânico total (CIT, g L^{-1}), utilizando kit de análise (Hach-Lange LKC 381, Alemanha) e fotômetro (Dr Lange LASA 50, Alemanha).

2.5 RESPOSTAS AVALIADAS

A partir da aquisição de dados foi possível determinar os perfis de radiação solar, temperatura, oxigênio dissolvido (O.D.) e pH, bem como o número de atuações da válvula para a injeção de gás e a taxa mássica de CO₂ injetado por dia nos cultivos.

A produtividade volumétrica de biomassa (P_X, g L⁻¹ d⁻¹) foi calculada a partir da concentração de biomassa (X_b, g L⁻¹) e da taxa de diluição (D, d⁻¹), conforme a Equação 1 (MOLINA GRIMA et al., 1999).

$$P_X = X_b \cdot D \quad (1)$$

A demanda de CO₂ pelo cultivo (D_{CO₂}, g d⁻¹) foi calculada segundo a Equação 2, em que P_X (g L⁻¹ d⁻¹) é a produtividade volumétrica de biomassa determinada em cada ensaio, V_{útil} (L) é o volume útil do fotobiorreator, x_{cbm} é a fração mássica de carbono (considerada 50% m m⁻¹ para biomassa microalgal), MM_{CO₂} (g mol⁻¹) e MM_C (g mol⁻¹) são as massas molares de CO₂ e do carbono, respectivamente.

$$D_{CO_2} = P_X \cdot V_{\text{útil}} \cdot x_{cbm} \cdot \frac{MM_{CO_2}}{MM_C} \quad (2)$$

A eficiência de utilização do CO₂ (E_{CO₂}, % m m⁻¹) foi calculada segundo a Equação 3, a partir da razão entre a demanda de carbono (D_{CO₂}, g d⁻¹) e a taxa mássica de CO₂ fornecida aos cultivos (ḡ_{CO₂}, g d⁻¹).

$$E_{CO_2} = \frac{D_{CO_2}}{\dot{m}_{CO_2}} \cdot 100 \quad (3)$$

A razão entre o fornecimento de CO₂ e a produção de biomassa (R_{CO₂/biomassa}, g_{CO₂} g_{biomassa}⁻¹) foi calculada segundo a Equação 4, em que ḡ_{CO₂} (g d⁻¹) é a taxa mássica de CO₂ injetada, P_X (g L⁻¹ d⁻¹) é a produtividade volumétrica de biomassa e V_{útil} (L) é o volume útil do fotobiorreator.

$$R_{CO_2/biomassa} = \frac{\dot{m}_{CO_2}}{P_X \cdot V_{\text{útil}}} \quad (4)$$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios foram realizados durante os meses de agosto e setembro (verão). Nesse período, na fase de luz foram verificadas radiações solares máximas variando entre 451,0 e 558,4 W m⁻² e temperaturas mínimas e máximas entre valores de 25,0 e 27,2°C e 33,8 e 34,3°C, respectivamente. De acordo com Arbib et al. (2013), fatores como temperatura e luz apresentam elevada influência sobre o desempenho dos cultivos microalgais, sendo necessário realizar o monitoramento destes parâmetros quando os cultivos são realizados em condições *outdoor*. Camacho-Rodríguez et al. (2015) verificaram que tanto a radiação incidente, quanto a temperatura influenciaram a produtividade de biomassa dos cultivos de *N. gaditana*. Os maiores resultados de Px neste estudo foram obtidos a 25°C e radiação incidente de 218 W m⁻². Todavia, as menores produtividades foram encontradas quando a microalga foi exposta a temperaturas e radiação incidente acima de 30°C e 348,8 W m⁻², respectivamente. *N. gaditana* é uma cepa encontrada naturalmente no Mar Mediterrâneo, sendo considerada muito sensível a altas temperaturas, tolerando entre 22 e 28°C.

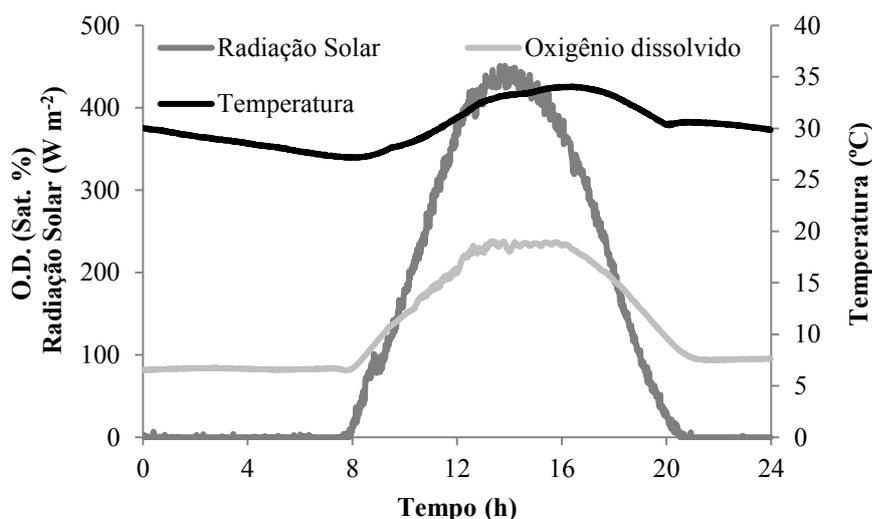
Estudos realizados por Figueroa et al. (1997), relataram que a exposição de *N. gaditana* a temperatura de 40°C, causou danos irreversíveis ao aparelho fotossintético das células. Por outro lado, quando a cepa foi mantida entre 25°C e 35°C e incidência luminosa de 30 e 300 W m⁻², esta foi capaz de recuperar a eficiência fotoquímica (Fv/Fm), após permanecer um período no escuro a 25°C. Arbib et al. (2013) também observaram redução na produtividade de biomassa e inibição da fotossíntese quando os cultivos de *Scenedesmus obliquus* foram expostos a temperaturas acima de 35°C.

Os fotobiorreatores utilizados possuíam controle de temperatura, o que é imprescindível em cultivos *outdoor* em estações como o verão. Nesta época do ano, a temperatura ambiente pode atingir valores acima de 40°C, e no interior da estufa de filme transparente acima de 50°C. Como podemos observar na Figura 2, o sistema de trocadores de calor permitiu que a temperatura do cultivo fosse mantida abaixo de 35°C.

Quanto ao perfil de oxigênio dissolvido (O.D.) foi possível verificar que esse apresentou aumento gradual com o incremento da radiação solar. Os valores médios verificados entre 0 e 8 h foram 82,9% sat., seguido de aumento até alcançar concentração de 230,6% sat. entre 12 e 16 h. No corrente trabalho não foi verificado acúmulo de elevadas concentrações de O.D. no interior do fotobiorreator. Isto foi atribuído a aeração contínua dos cultivos na coluna de bolhas, a qual tem por objetivo auxiliar a liberação de gases acumulados no meio líquido. Arbib et al. (2013), avaliando o perfil de O.D. em cultivos de *Scenedesmus obliquus* em

fotobiorreatores tubulares em condições *outdoor*, também verificaram comportamento semelhante ao presente estudo. Os autores observaram valores de O.D. entre 65-70% sat. nas primeiras horas do dia, seguido de aumento deste parâmetro com o incremento de radiação solar, atingindo valor máximo de 150% sat. às 15 h, e redução a partir deste ponto, a medida que a radiação solar declinava. Os autores também relataram que o aumento da temperatura (acima de 35°C) causa inibição do cultivo, e com isso redução da concentração de O.D., mesmo com o aumento da radiação solar. Ippoliti et al. (2016) em cultivos de *Tisochrysis lutea* em fotobiorreatores tubulares em condições *outdoor*, verificaram valor máximo de O.D. de 300%. Os autores relataram que o acúmulo de O₂ no interior do fotobiorreator pode contribuir para a ocorrência do fenômeno de fotorrespiração, esse que pode diminuir a produtividade da biomassa.

Figura 2 - Perfis de radiação solar (cinza escuro), oxigênio dissolvido (O.D., cinza claro) e temperatura (preto) para ensaio com pH 8,0 ao longo de 24 h de cultivo de *N. gaditana*



Segundo Acién et al. (2017), reações que envolvem o consumo de nutrientes, como carbono e nitrogênio, podem causar variações no pH do cultivo. Tendo em vista a importância de manter este parâmetro na faixa adequada, busca-se empregar métodos eficientes para o melhor acompanhamento do processo. Um dos métodos mais empregados e que ao mesmo tempo apresenta bons resultados é a injeção de CO₂ sob demanda. O fornecimento de CO₂, além de manter o pH no valor ótimo, também desempenha o papel de fornecer a fonte de carbono para o cultivo de microalgas. Para isso, pode ser empregado o CO₂ puro ou misturas com ar, bem como gases de combustão. Independente da forma utilizada, o fornecimento de carbono aos cultivos deve ser adequadamente projetado, a fim de maximizar a eficiência de

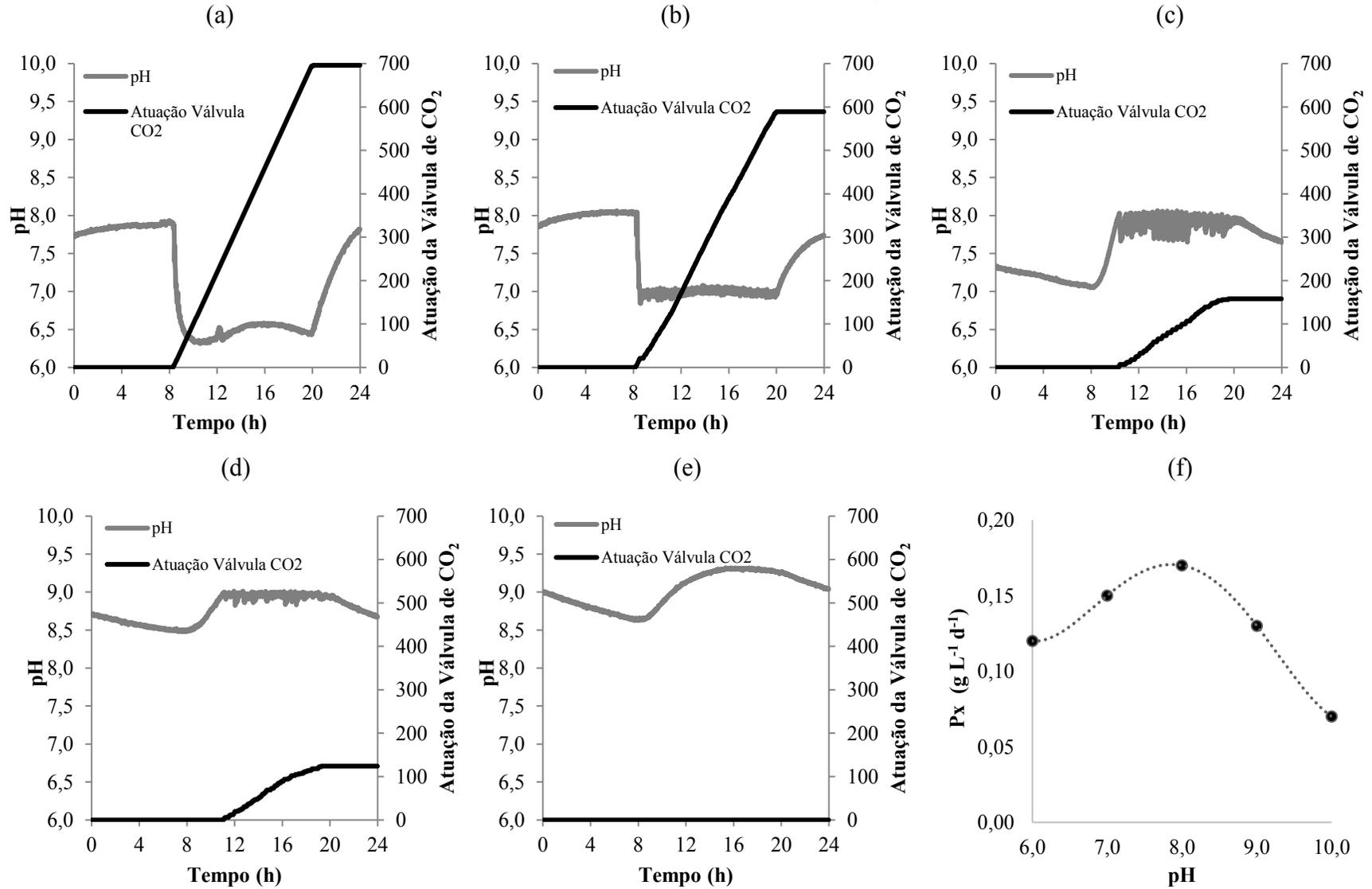
utilização de CO₂ pelas microalgas e minimizar os gradientes de pH no interior do fotobiorreator. Conforme resultados verificados por Jiang et al. (2013), Godos et al. (2014) e Duarte-Santos et al. (2016), o fornecimento de CO₂ sob demanda é considerado um método adequado, o qual contribui tanto para o controle do pH, quanto para maiores eficiências de conversão de carbono em biomassa e menores perdas para a atmosfera.

O controle de pH dos cultivos foi realizado mediante injeção de CO₂ sob demanda, sendo modificado o *setpoint* na faixa entre 6,0 e 10,0, no qual o CO₂ foi injetado automaticamente para a realização do controle. Nos ensaios com pH 7,0, 8,0 e 9,0 (Figura 3b-d) o sistema foi capaz de controlar o pH. Entretanto, com *setpoint* em 6,0, o sistema permaneceu no limite da capacidade durante todo o período de luz, não sendo possível manter o pH no valor ajustado. Os valores de pH médio e mínimo deste ensaio na fase clara foram 6,51 e 6,31, respectivamente. Nesta condição experimental foi observado o número máximo de atuações da válvula de CO₂ (698) (Figura 3a), permanecendo aberta aproximadamente 100% do tempo no período claro (Tabela 1). No ensaio com pH 10,0, o valor de *setpoint* não foi atingido (pH médio 9,15) (Tabela 1), desta forma nenhuma atuação da válvula de CO₂ foi verificada (Figura 3e).

A relação entre o pH e a produtividade de biomassa está apresentada na Figura 3f. O maior resultado de Px (0,17 g L⁻¹ d⁻¹) foi verificado em pH 8,0. Quando a microalga foi cultivada em pH mais baixos (6,0 e 7,0) ou superiores a 8,0 (9,0 e 10,0), os resultados obtidos indicaram redução na produtividade de biomassa. Sánchez et al. (2008) avaliando a influência do pH no cultivo de *Scenedesmus almeriensis*, também verificaram maior produtividade de biomassa em pH 8,0, sendo este considerado o ótimo para o crescimento desta cepa. Khatoon et al. (2014) observaram que as maiores densidades celulares em cultivos de *Nannochloropsis* sp. foram verificadas na faixa de pH de 7,5 e 8,5, acima destes valores ocorreu decréscimo no crescimento. Segundo Kosourov, Seibert e Ghirardi (2003), estas condições podem promover redução da atividade fotossintética, afetando os processos metabólicos das células microalgais.

Ao observarmos o percentual médio de abertura da válvula de CO₂, foi possível verificar que no ensaio em pH 6,0, está permaneceu aberta 99,6% do tempo no período claro (8:00 – 20:00 h) (Tabela 1). Por outro lado, nos cultivos em pH 8,0 o sistema se mostrou mais estável, com número reduzido de atuações de válvula (158) (Figura 3c), permanecendo está aberta em média 14,1% do tempo no período de luz (Tabela 1).

Figura 3 – Valores de pH (cinza) e de abertura de válvula de CO₂ (preto) para os cultivos de *N. gaditana* com pH 6,0 (a), 7,0 (b), 8,0 (c), 9,0 (d), 10 (e) e produtividade de biomassa em função do pH (f)



Desta forma, podemos constatar que o aumento do pH de 6,0 para 8,0, representou redução de 85,3% na atuação média diária da válvula de CO₂. Também cabe ressaltar que ocorreu redução de 77,4% do número de vezes que válvula foi acionada para realizar o controle do pH e conseguiu-se o maior valor de Px. Conforme relatado por Pawlowski et al. (2014a, 2014b), o número de atuação da válvula de CO₂ para o controle do pH é um parâmetro que necessita ser avaliado, a fim de promover a redução de custos com energia, manutenção do equipamento e fornecimento da fonte de carbono para o cultivo.

Em relação aos resultados de Fv/Fm, esses variaram entre 0,62 e 0,65 para os ensaios com faixa de pH entre 6,0 e 9,0. O menor valor para este parâmetro (0,59) foi verificado no cultivo mantido a pH de ajuste de 10,0, demonstrando que a condição experimental a qual foi submetida o cultivo causou redução da eficiência fotossintética das células. Da mesma forma, Sánchez et al. (2008) atribuíram a redução do valor de Fv/Fm ao estresse das células de *Scenedesmus almeriensis* quando cultivadas em pH 10,0 (acima do valor ótimo).

Tabela 1 - Resultados obtidos para os ensaios com *N. gaditana* cultivada com diferentes valores de pH.

Parâmetro	pH				
	6	7	8	9	10
pH médio	6,51±0,18	7,01±0,16	7,81±0,25	8,89±0,13	9,14±0,20
Fv/Fm	0,64	0,65	0,62	0,64	0,59
CIT Entrada (g L ⁻¹)	0,118	0,118	0,118	0,122	0,122
CIT Saída (g L ⁻¹)	0,110	0,118	0,106	0,116	0,095
m _{CO2} (g d ⁻¹)	6822,3	3036,5	1000,8	132,8	0,00
D _{CO2} (g d ⁻¹)	561,6	702,0	795,6	608,4	327,6
AT _{média} V _{CO2} (%)	99,6	43,9	14,6	2,0	0,0
E _{CO2} (% m m ⁻¹)	8	23	79	-	-
R _{CO2/biomassa} (g g ⁻¹)	21,8	7,8	2,3	0,4	0,00

pH médio na fase clara; Fv/Fm – fluorescência da clorofila; CIT -carbono inorgânico total; m_{CO2} – taxa mássica de CO₂ fornecido; D_{CO2} – demanda de CO₂; AT_{média} V_{CO2}: atuação média da válvula de CO₂ - E_{CO2} – eficiência de utilização de CO₂; R_{CO2/biomassa} – Razão entre o fornecimento de CO₂ e a produção de biomassa

Com relação a taxa mássica de CO₂ fornecida (m_{CO2}) e demanda de CO₂ (D_{CO2}) pelos cultivos, podemos observar que para os ensaios com *setpoint* em pH 6,0 e 7,0, foram fornecidas as maiores m_{CO2} para efetuar o controle do pH. Ao correlacionarmos esses parâmetros com a eficiência de utilização de CO₂ (E_{CO2}) pela microalga, foi possível verificar

que nos experimentos com pH 6,0 e 7,0 os resultados de E_{CO_2} foram de 8 e 23% ($m\ m^{-1}$), respectivamente. Diante disso, é possível constatar que nas condições experimentais supracitadas grande parte do CO_2 fornecido não foi assimilado pelas células, sendo perdido por exaustão para a atmosfera. Para o ensaio com pH 8,0, a quantidade de carbono fornecida foi suficiente para manter o crescimento da microalga e ao mesmo tempo controlar o pH no valor de ajuste. O valor de E_{CO_2} para este ensaio foi 79% ($m\ m^{-1}$). Neste sentido, podemos constatar que o pH 8,0 foi considerado o ideal para promover o crescimento e a conversão eficiente de CO_2 em biomassa. Todavia, nos ensaios com pH mais elevados (9,0 e 10,0), a massa de CO_2 injetada não supriu a demanda de carbono pelo cultivo.

Quanto a razão de fornecimento de CO_2 para a produção de biomassa ($R_{CO_2/biomassa}$), foi verificado que para produzir 1 g de biomassa de *N. gaditana* foram necessários 21,8 e 7,8 g de CO_2 nos cultivos com pH 6,0 e 7,0, respectivamente. Entretanto, quando o pH foi ajustado a 8,0, o valor de $R_{CO_2/biomassa}$ encontrado ($2,31\ g_{CO_2}\ g_{biomassa}^{-1}$) foi próximo ao valor teórico de $1,8\ g_{CO_2}\ g_{biomassa}^{-1}$ reportado por Acién et al. (2012). Segundo a avaliação de custos realizada por Acién et al. (2012), entre os nutrientes fornecidos ao cultivo de microalgas, o CO_2 é considerado o principal, representando 30% dos custos de produção. Os autores relataram, que quando o valor de $R_{CO_2/biomassa}$ é próximo ao valor teórico, isso indica elevada eficiência de utilização de CO_2 e, portanto, que o fornecimento de CO_2 está sendo realizado de forma adequada. Qiu et al. (2017) avaliaram diferentes valores de pH (6,5, 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5) a fim de verificar o valor ideal para o cultivo de *Chlorella sorokiniana* DOE1412. Os autores observaram que o pH ideal para o crescimento da cepa foi 6,5. Nesta condição o CO_2 injetado em excesso resultou em maior produtividade de biomassa, porém não estava sendo utilizado de forma eficiente, sendo necessário 13,3 g_{CO_2} para produzir 1 g de biomassa. No entanto, em pH 8,0 foi verificado $R_{CO_2/biomassa}$ de $2,01\ g_{CO_2}\ g_{biomassa}^{-1}$, sendo esta condição experimental considerada mais rentável para o cultivo de *C. sorokiniana* em relação ao fornecimento de CO_2 .

A respeito do carbono inorgânico total (CIT, $g\ L^{-1}$), foi observado que o meio de cultivo utilizado em cada diluição apresentou concentração entre 0,118 e 0,122 $g\ L^{-1}$. Esse meio não era suplementado com bicarbonato, sendo o CIT proveniente da água utilizada no preparo, bem como do carbono acumulado no meio recirculado. Com relação a concentração presente no meio de saída, para os ensaios em pH 6,0, 8,0, 9,0 e 10,0, as concentrações foram inferiores as verificadas no meio de entrada. Desta forma, ficou evidenciado que parte do carbono presente no meio líquido pode ter sido consumido pela microalga durante a fotossíntese, ou perdido para a atmosfera por exaustão. Para o ensaio em pH 7,0, a concentração de CIT de entrada foi igual ao verificada na fração de saída.

Segundo Tebbani et al. (2014), o valor de CIT é composto principalmente pelas frações de CO₂, bicarbonato (HCO₃⁻) e carbonato (CO₃²⁻). Conforme relatado por Andrade et al. (2016b), quando o CO₂ é fornecido aos cultivos, pode ser consumido durante a fotossíntese ou perdido para a atmosfera, podendo ocorrer perturbações no equilíbrio químico, o qual irá buscar se reestabelecer mediante ao deslocamento das reações químicas. Quando o CO₂ é injetado ocorre a redução do pH, devido a produção do H₂CO₃. Por outro lado, quando o CO₂ é consumido pelas microalgas ou perdido por exaustão, o pH aumenta e ocorre o deslocamento do equilíbrio químico para a formação de íons CO₃²⁻. Entre a faixa de pH 6,5 e 10,5, a espécie química predominante é o HCO₃⁻, acima desta faixa a forma predominante é o CO₃²⁻ e abaixo, o CO₂. No presente estudo, a espécie química predominante foi o HCO₃⁻, o qual segundo Kassim e Meng (2017), pode ser desidratado pela enzima anidrase carbônica ou transportado para o interior da célula e metabolizado no ciclo de Calvin pelas microalgas.

A determinação do pH ideal para cada espécie de microalga e o controle desse parâmetro em cultivos em condições *outdoor*, permite que sejam atingidas maiores produtividades de biomassa e eficiências de utilização de CO₂, reduzindo assim as perdas de carbono para a atmosfera e os custos com o processo.

4 CONCLUSÃO

Os maiores resultados de eficiência de utilização de CO₂ (79% m m⁻¹) e produtividade de biomassa (0,17 g L⁻¹ d⁻¹) foram verificados quando a microalga *N. gaditana* foi cultivada em pH 8,0. Nesta condição experimental a válvula de CO₂ foi acionada 158 vezes, permanecendo aberta em média 14,1% no período claro, sendo o sistema capaz de fornecer a fonte de carbono demandada pelo cultivo. Portanto, o pH 8,0 foi considerado ideal para o desenvolvimento de cultivos *N. gaditana* em escala piloto em fotobiorreatores tubulares sob condições *outdoor*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ACIÉN, F. G.; MOLINA, E.; REIS, A.; TORZILLO, G.; ZITTELLI, G. C.; SEPÚLVEDA, C.; MASOJÍDEK, J. 1 - Photobioreactors for the production of microalgae A2 - Gonzalez-

Fernandez, Cristina. In: MUÑOZ, R. B. T.-M.-B. B. AND B. (Ed.). **Woodhead Publishing Series in Energy**. [s.l.] Woodhead Publishing, 2017. p. 1–44.

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

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

ARBIB, Z.; RUIZ, J.; ÁLVAREZ-DÍAZ, P.; GARRIDO-PÉREZ, C.; BARRAGAN, J.; PERALES, J. A. Effect of pH control by means of flue gas addition on three different photobioreactors treating urban wastewater in long-term operation. **Ecological Engineering**, v. 57, p. 226–235, 2013.

BARTLEY, M. L.; BOEING, W. J.; DUNGAN, B. N.; HOLGUIN, F. O.; SCHAUB, T. pH effects on growth and lipid accumulation of the biofuel microalgae *Nannochloropsis salina* and invading organisms. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 3, p. 1431–1437, 2014.

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

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.

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

CAMACHO-RODRÍGUEZ, J.; CERÓN-GARCÍA, M. C.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; MOLINA-GRIMA, E. The influence of culture conditions on biomass and high value product generation by *Nannochloropsis gaditana* in aquaculture. **Algal Research**, v. 11, p. 63–73, 2015.

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

FERNÁNDEZ, I.; ACIÉN, F. G. F.; BERENGUEL, M.; GUZMÁN, J. L.; ANDRADE, G. A.; PAGANO, D. J. A lumped parameter chemical-physical model for tubular photobioreactors. **Chemical Engineering Science**, v. 112, p. 116–129, 2014.

FERNÁNDEZ, I.; ACIÉN, F. G.; FERNÁNDEZ, J. M.; GUZMÁN, J. L.; MAGÁN, J. J.; BERENGUEL, M. Dynamic model of microalgal production in tubular photobioreactors. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 172–181, 2012.

FIGUEROA, F. L.; JIMENEZ, C.; LUBIAN, L. M.; MONTERO, O.; LEBERT, M.; HADER, D. P. Effects of high irradiance and temperature on photosynthesis and photoinhibition in *Nannochloropsis gaditana lubian* (eustigmatophyceae). **Journal of Plant Physiology**, v. 151, n. 1, p. 6–15, 1997.

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

GODOS, I. de; MENDOZA, J. L.; ACIÉN, F. G.; MOLINA, E.; BANKS, C. J.; HEAVEN, S.; ROGALLA, F. Evaluation of carbon dioxide mass transfer in raceway reactors for microalgae culture using flue gases. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 307–314, 2014.

GROBBELAAR, J. U. Inorganic Algal Nutrition. In: RICHMOND, A.; QIANG, H. (Ed.). **Handbook of microalgal culture : applied phycology and biotechnology**. Second ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2013. p. 123–133.

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

JIANG, Y.; ZHANG, W.; WANG, J.; CHEN, Y.; SHEN, S.; LIU, T. Utilization of simulated flue gas for cultivation of *Scenedesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 359–364, 2013.

KASSIM, M. A.; MENG, T. K. Carbon dioxide (CO₂) biofixation by microalgae and its potential for biorefinery and biofuel production. **Science of the Total Environment**, v. 584–585, p. 1121–1129, 2017.

KHATOON, H.; ABDU RAHMAN, N.; BANERJEE, S.; HARUN, N.; SULEIMAN, S. S.; ZAKARIA, N. H.; LANANAN, F.; ABDUL HAMID, S. H.; ENDUT, A. Effects of different salinities and pH on the growth and proximate composition of *Nannochloropsis* sp. and *Tetraselmis* sp. isolated from South China Sea cultured under control and natural condition. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 95, n. PA, p. 11–18, 2014.

KOSOUROV, S.; SEIBERT, M.; GHIRARDI, M. L. Effects of extracellular pH on the metabolic pathways in sulfur-deprived H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* under different growth conditions. **Plant Cell Physiology**, v. 44, n. 2, p. 145–155, 2003.

MARTINS, R. G.; SEVERO GONÇALVES, I.; MORAIS, M. G. de; COSTA, J. A. V. Bioprocess engineering aspects of biopolymer production by the cyanobacterium *Spirulina* strain LEB 18. **International Journal of Polymer Science**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

MOLINA GRIMA, E.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; GARCÍA CAMACHO, F.; CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. **Journal of Biotechnology**, v. 70, n. 1, p. 231–247, 1999.

MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R.; TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, n. 1–2, p. 60–64, 2009.

PAWLOWSKI, A.; FERNÁNDEZ, I.; GUZMÁN, J. L.; BERENGUEL, M.; ACIÉN, F. G.;

NORMEY-RICO, J. E. Event-based predictive control of pH in tubular photobioreactors. **Computers and Chemical Engineering**, v. 65, p. 28–39, 2014a.

PAWLOWSKI, A.; MENDOZA, J. L.; GUZMÁN, J. L.; BERENGUEL, M.; ACIÉN, F. G.; DORMIDO, S. Effective utilization of flue gases in raceway reactor with event-based pH control for microalgae culture. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 1–9, 2014b.

QIU, R.; GAO, S.; LOPEZ, P. A.; OGDEN, K. L. Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. **Algal Research**, v. 28, n. November, p. 192–199, 2017.

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

SANTOS, T. D. **Engenharia de microalgas na fixação de CO₂ em diferentes biorreatores**. 2015. 127f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, fev. 2006.

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

CAPÍTULO IV

5 CONCLUSÃO GERAL

A microalga *Chlorella fusca* LEB 111 apresentou os maiores resultados de produtividade de biomassa ($194,3 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e taxa de fixação de CO_2 ($390,9 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) quando cultivada com 15% de CO_2 . Alterações no perfil proteico da presente cepa foram verificadas, como o aumento nos níveis de Rubisco no ensaio com 15% de CO_2 . Quanto à composição da biomassa, a maior concentração de carboidratos (31,9% m m^{-1}) foi obtida quando *C. fusca* foi cultivada com 10% de CO_2 , condição esta que propiciou produção teórica de etanol de 14,5 mL por 100 g de biomassa.

O emprego de estratégia de cultivo em único estágio, com adição de 100 mmol L^{-1} de NaCl resultou na concentração máxima de biomassa ($1,90 \text{ g L}^{-1}$) de *C. fusca* LEB 111. Com relação a produtividade das macromoléculas, a adição de 200 mmol L^{-1} NaCl acarretou no incremento de 81% da produtividade de carboidratos em comparação ao cultivo controle (sem adição de NaCl). Na estratégia de cultivo em duplo estágio foram verificadas as máximas concentração de biomassa ($1,96 \text{ g L}^{-1}$) e taxa de fixação de CO_2 ($176,3 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) por *C. fusca* LEB 111 quando cultivada com 15% de CO_2 e 100 mmol L^{-1} de NaCl. O emprego desta estratégia de cultivo resultou em aumento de 33,8% na produtividade lipídica da microalga.

A vazão de $5,0 \text{ L min}^{-1}$ de CO_2 foi selecionada como condição ideal para o controle do pH e produção de biomassa de *Nannochloropsis gaditana* em cultivos em fotobiorreatores tubulares em escala piloto sob condições *outdoor*. Ademais, esta condição experimental foi capaz de fornecer a quantidade de CO_2 demandada pelo cultivo, resultando em eficiência de utilização de CO_2 pela microalga de aproximadamente 70% (m m^{-1}).

O pH 8,0 foi considerado o ideal para o cultivo de *N. gaditana* em fotobiorreatores tubulares em escala piloto sob condições *outdoor*. Nesta condição experimental, a microalga supracitada apresentou a maior produtividade de biomassa ($0,17 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e eficiência de utilização de CO_2 (79% m m^{-1}).

Diante disso, ficou evidenciado que a seleção de parâmetros físico-químicos e hidrodinâmicos contribuíram para o aumento da produtividade de biomassa, de macromoléculas e fixação de CO_2 pelas microalgas. Além disso, foi constatado que o emprego de estratégias de cultivo, juntamente com utilização de CO_2 e NaCl, pode aumentar o potencial de aplicação de microalgas na produção de bioenergia, bem como contribuir com a redução de gases de efeito estufa.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Implementar o sistema de controle de pH por demanda de CO₂ em cultivos em escala de bancada e piloto desenvolvidos no Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB/FURG);
- Estudar estratégias de cultivo em duplo estágio aplicando diferentes condições de estresse para o aumento da produtividade macromoléculas na biomassa microalgal;
- Avaliar o efeito do tempo de cultivo na estratégia em duplo estágio a fim de favorecer o aumento do conteúdo de macromoléculas na biomassa das microalgas;
- Avaliar o perfil lipídico da biomassa de microalgas cultivadas com cloreto de sódio em diferentes estratégias de cultivo;
- Avaliar a influência e determinar faixas de pH ideais para o aumento da fixação de CO₂ e produtividade de biomassa por outras cepas de microalgas.

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACIÉN, F. G.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J. M.; MOLINA GRIMA, E. Photobioreactors for the production of microalgae. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 131–151, 8 jun. 2013.
- ACIÉN, F. G.; FERNÁNDEZ, J. M.; MAGÁN, J. J.; MOLINA, E. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1344–1353, 2012a.
- ACIÉN, F. G.; GARCIA CAMACHO, F.; SANCHEZ PEREZ, J. A.; FERNANDEZ SEVILLA, J. M.; MOLINA GRIMA, E. Modeling of Biomass Productivity in Tubular Photobioreactors for Microalgal Cultures: Effects of Dilution Rate, Tube Diameter, and Solar Irradiance. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, p. 605–616, 1998.
- ACIÉN, F. G.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C. V.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J. M.; MOLINA GRIMA, E. Conversion of CO₂ into biomass by microalgae: How realistic a contribution may it be to significant CO₂ removal? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 3, p. 577–586, 2012b.
- ACIÉN, F. G.; MOLINA, E.; REIS, A.; TORZILLO, G.; ZITTELLI, G. C.; SEPÚLVEDA, C.; MASOJÍDEK, J. 1 - Photobioreactors for the production of microalgae A2 - Gonzalez-Fernandez, Cristina. In: MUÑOZ, R. B. T.-M.-B. B. AND B. (Ed.). **Woodhead Publishing Series in Energy**. [s.l.] Woodhead Publishing, 2017. p. 1–44.
- AIKAWA, S.; NISHIDA, A.; HO, S. H.; CHANG, J. S.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Glycogen production for biofuels by the euryhaline cyanobacteria *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 from an oceanic environment. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 3–5, 2014.
- ANDRADE, G. A. De; BERENGUEL, M.; GUZMÁN, J. L.; PAGANO, D. J.; ACIÉN, F. G. Optimization of biomass production in outdoor tubular photobioreactors. **Journal of Process Control**, v. 37, p. 58–69, 2016a.
- ANDRADE, G. A. De; PAGANO, D. J.; GUZMAN, J. L.; BERENGUEL, M.; FERNANDEZ, I.; ACIEN, F. G. Distributed Sliding Mode Control of pH in Tubular Photobioreactors. **IEEE Transactions on Control Systems Technology**, v. 24, n. 4, p. 1160–1173, 2016b.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. **Association of Official Analysis Chemists International**, 2000.
- APHA. **American Public Health Association (APHA). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed.** Washington DC., 1998.
- ARBIB, Z.; RUIZ, J.; ÁLVAREZ-DÍAZ, P.; GARRIDO-PÉREZ, C.; BARRAGAN, J.; PERALES, J. A. Effect of pH control by means of flue gas addition on three different photobioreactors treating urban wastewater in long-term operation. **Ecological Engineering**, v. 57, p. 226–235, 2013.
- BARTLEY, M. L.; BOEING, W. J.; DUNGAN, B. N.; HOLGUIN, F. O.; SCHAUB, T. pH effects on growth and lipid accumulation of the biofuel microalgae *Nannochloropsis salina*

and invading organisms. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 3, p. 1431–1437, 2014.

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

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

BECKER, W. Microalgae in Human and Animal Nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2004. p. 312–351.

BERENGUEL, M.; RODRÍGUEZ, F.; ACIÉN, F. G.; GARCÍA, J. L. Model predictive control of pH in tubular photobioreactors. **Journal of Process Control**, v. 14, n. 4, p. 377–387, 2004.

BOSMA, R.; VAN ZESSEN, E.; REITH, J. H.; TRAMPER, J.; WIJFFELS, R. H. Prediction of volumetric productivity of an outdoor photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 5, p. 1108–1120, 2007.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, 2010.

BRUNE, D. E.; NOVAK, J. T. The use of carbonate equilibrium chemistry in quantifying algal carbon uptake kinetics. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 71–76, 1981.

BUONO, S.; LANGELLOTTI, A. L.; MARTELLO, A.; BIMONTE, M.; TITO, A.; CAROLA, A.; APONE, F.; COLUCCI, G.; FOGLIANO, V. Biological activities of dermatological interest by the water extract of the microalga *Botryococcus braunii*. **Archives of Dermatological Research**, v. 304, n. 9, p. 755–764, 2012.

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

CAMACHO-RODRÍGUEZ, J.; CERÓN-GARCÍA, M. C.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; MOLINA-GRIMA, E. The influence of culture conditions on biomass and high value product generation by *Nannochloropsis gaditana* in aquaculture. **Algal Research**, v. 11, p. 63–73, 2015.

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

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. Fotossíntese. In: CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. (Ed.). **Bioquímica - Volume 1 Bioquímica Básica**. 5ª ed. São Paulo: Cengage Learning,

2011. p. 717–741.

CARVALHO, A. P.; MEIRELES, L. A.; MALCATA, F. X. Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 6, p. 1490–1506, 2006.

CÉSPEDES, A. M. G. **Cultivo de Microalgas a gran escala: sistemas de producción** Almería- FUNDACIÓN CAJAMAR - GRUPO COOPERATIVO CAJAMAR, 2016.

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

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

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

CHEN, B.; WAN, C.; MEHMOOD, M. A.; CHANG, J. S.; BAI, F.; ZHAO, X. Manipulating environmental stresses and stress tolerance of microalgae for enhanced production of lipids and value-added products—A review. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1198–1206, 2017.

CHEN, C. Y.; DURBIN, E. G. Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton. **Marine Ecology Progress Series**, v. 109, p. 83–94, 1994.

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

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

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

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

CHIU, S. Y.; KAO, C. Y.; TSAI, M. T.; ONG, S. C.; CHEN, C. H.; LIN, C. S. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 833–838, 2009.

CHOKSHI, K.; PANCHAL, I.; TRIVEDI, K.; GEORGE, B.; MAURYA, R.; GHOSH, A.; MISHRA, S. Biofuel potential of the newly isolated microalgae *Acutodesmus dimorphus* under temperature induced oxidative stress conditions. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 162–171, 2015.

CHUA, E. T.; SCHENK, P. M. A biorefinery for *Nannochloropsis*: Induction, harvesting, and

extraction of EPA-rich oil and high-value protein. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1416–1424, 2017.

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

COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 2–9, 2011.

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

DLUGOKENCKY, E.; TANS, P. **Recent Monthly Average Mauna Loa CO₂**. Disponível em: <www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/>. Acesso em: 11 jan. 2018.

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

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

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

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

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

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

FERNÁNDEZ, I.; ACIÉN, F. G. F.; BERENGUEL, M.; GUZMÁN, J. L.; ANDRADE, G. A.; PAGANO, D. J. A lumped parameter chemical-physical model for tubular photobioreactors. **Chemical Engineering Science**, v. 112, p. 116–129, 2014.

FERNÁNDEZ, I.; ACIÉN, F. G.; FERNÁNDEZ, J. M.; GUZMÁN, J. L.; MAGÁN, J. J.; BERENGUEL, M. Dynamic model of microalgal production in tubular photobioreactors. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 172–181, 2012.

- FIGUEROA, F. L.; JIMENEZ, C.; LUBIAN, L. M.; MONTERO, O.; LEBERT, M.; HADER, D. P. Effects of high irradiance and temperature on photosynthesis and photoinhibition in *Nannochloropsis gaditana lubian* (eustigmatophyceae). **Journal of Plant Physiology**, v. 151, n. 1, p. 6–15, 1997.
- FREITAS, B. C. B.; CASSURIAGA, A. P. A.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Pentoses and light intensity increase the growth and carbohydrate production and alter the protein profile of *Chlorella minutissima*. **Bioresource Technology**, v. 238, p. 248–253, 2017.
- FREITAS, B. C. B.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. *Chlorella minutissima* cultivation with CO₂ and pentoses: Effects on kinetic and nutritional parameters. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 338–344, 2017.
- GHYSELS, B.; FRANCK, F. Hydrogen photo-evolution upon S deprivation stepwise: an illustration of microalgal photosynthetic and metabolic flexibility and a step stone for future biotechnological methods of renewable H₂ production. **Photosynthesis Research**, v. 106, n. 1–2, p. 145–154, 2010.
- GODOS, I. de; MENDOZA, J. L.; ACIÉN, F. G.; MOLINA, E.; BANKS, C. J.; HEAVEN, S.; ROGALLA, F. Evaluation of carbon dioxide mass transfer in raceway reactors for microalgae culture using flue gases. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 307–314, 2014.
- GROBBELAAR, J. U. Inorganic Algal Nutrition. In: RICHMOND, A.; QIANG, H. (Ed.). **Handbook of microalgal culture : applied phycology and biotechnology**. Second ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2013. p. 123–133.
- GU, N.; LIN, Q.; LI, G.; TAN, Y.; HUANG, L.; LIN, J. Effect of salinity on growth, biochemical composition, and lipid productivity of *Nannochloropsis oculata* CS 179. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 6, p. 631–637, nov. 2012.
- HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 709–732, 2012.
- HAYES, M.; SKOMEDAL, H.; SKJÅNES, K.; MAZUR-MARZEC, H.; TORUŃSKA-SITARZ, A.; CATALA, M.; ISLETEN HOSOGLU, M.; GARCÍA-VAQUERO, M. 15 - Microalgal proteins for feed, food and health A2 - Gonzalez-Fernandez, Cristina. In: MUÑOZ, R. B. T.-M.-B. B. AND B. (Ed.). **Woodhead Publishing Series in Energy**. [s.l.] Woodhead Publishing, 2017. p. 347–368.
- HENDE, S. VAN DEN; VERVAEREN, H.; BOON, N. Flue gas compounds and microalgae : (Bio-) chemical interactions leading to biotechnological opportunities. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1405–1424, 2012.
- HO, S. H.; LI, P. J.; LIU, C. C.; CHANG, J. S. Bioprocess development on microalgae-based CO₂ fixation and bioethanol production using *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 142–149, 2013.
- HO, S.; CHEN, C.; LEE, D.; CHANG, J. Perspectives on microalgal CO₂ -emission mitigation systems — A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 2, p. 189–198, 2011.
- HOLLAND, D. L.; GABBOTT, P. A. A Micro-Analytical Scheme for the Determination of Protein, Carbohydrate, Lipid and RNA Levels in Marine Invertebrate Larvae. **Journal of the**

Marine Biological Association of the United Kingdom, v. 51, n. 3, p. 659–668, 1971.

HU, Q. Environmental Effects on Cell Composition. In: RICHMOND, A.; QIANG, H. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture**. Second ed. Oxford, UK: Wiley Blackwell, 2013. p. 114–122.

IEA, I. E. A. **CO₂ Emissions from Fuel Combustion 2017 - Highlights**. 2017. Disponível em: <<https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/CO2EmissionsfromFuelCombustionHighlights2017.pdf>>.

IPCC, **CLIMATE CHANGE 2014 Synthesis Report - Intergovernmental Panel on Climate Change**, 2014. Disponível em: http://www.ipcc.ch/news_and_events/docs/ar5/ar5_syr_headlines_en.pdf>.

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

JIANG, Y.; ZHANG, W.; WANG, J.; CHEN, Y.; SHEN, S.; LIU, T. Utilization of simulated flue gas for cultivation of *Scenedesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 359–364, 2013.

KASSIM, M. A.; MENG, T. K. Carbon dioxide (CO₂) biofixation by microalgae and its potential for biorefinery and biofuel production. **Science of the Total Environment**, v. 584–585, p. 1121–1129, 2017.

KHATOON, H.; ABDU RAHMAN, N.; BANERJEE, S.; HARUN, N.; SULEIMAN, S. S.; ZAKARIA, N. H.; LANANAN, F.; ABDUL HAMID, S. H.; ENDUT, A. Effects of different salinities and pH on the growth and proximate composition of *Nannochloropsis* sp. and *Tetraselmis* sp. isolated from South China Sea cultured under control and natural condition. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 95, n. PA, p. 11–18, 2014.

KIRROLIA, A.; BISHNOI, N. R.; SINGH, R. Microalgae as a boon for sustainable energy production and its future research & development aspects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 20, p. 642–656, 2013.

KOSOUROV, S.; SEIBERT, M.; GHIRARDI, M. L. Effects of extracellular pH on the metabolic pathways in sulfur-deprived H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* under different growth conditions. **Plant Cell Physiology**, v. 44, n. 2, p. 145–155, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LARI, Z.; MORADI-KHEIBARI, N.; AHMADZADEH, H.; ABRISHAMCHI, P.; MOHEIMANI, N. R.; MURRY, M. A. Bioprocess engineering of microalgae to optimize lipid production through nutrient management. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 6, p. 3235–3250, 2016.

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

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. São Carlos:

RiMa, 2006.

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

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

MANSOUR, M. M. F. Plasma membrane permeability as an indicator of salt tolerance in plants. **Biologia Plantarum**, v. 57, n. 1, p. 1–10, 2013.

MANSOUR, M. M. F.; SALAMA, K. H. A.; ALLAM, H. Y. H. Role of the Plasma Membrane in Saline Conditions: Lipids and Proteins. **The Botanical Review**, v. 81, n. 4, p. 416–451, 21 dez. 2015.

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

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

MARTEL, A.; YU, S.; GARCIA REINA, G.; LINDBLAD, P.; PEDERSEN, M. Osmotic-Adjustment in the Cyanobacterium *Spirulina platensis*: Presence of an Alpha-Glucosidase. **Plant Physiology and Biochemistry (France)**, v. 30, p. 573–578, 1992.

MARTINS, R. G.; SEVERO GONÇALVES, I.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Bioprocess engineering aspects of biopolymer production by the cyanobacterium *Spirulina* strain LEB 18. **International Journal of Polymer Science**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

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

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.

MCNEIL, S. D.; NUCCIO, M. L.; HANSON, A. D. Betaines and Related Osmoprotectants. Targets for Metabolic Engineering of Stress Resistance. **Plant physiology**, v. 120, n. 4, p. 945–949, 1999.

MENDOZA, J. L.; GRANADOS, M. R.; DE GODOS, I.; ACIÉN, F. G.; MOLINA, E.; BANKS, C.; HEAVEN, S. Fluid-dynamic characterization of real-scale raceway reactors for microalgae production. **Biomass and Bioenergy**, v. 54, p. 267–275, 2013.

MOLINA GRIMA, E.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; GARCÍA CAMACHO, F.; CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. **Journal of Biotechnology**, v. 70, n. 1, p. 231–247, 1999.

MOLINA, E.; FERNÁNDEZ, J.; ACIÉN, F. G.; CHISTI, Y. Tubular photobioreactor design

for algal cultures. **Journal of Biotechnology**, v. 92, n. 2, p. 113–131, 2001.

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

MORAIS, E. G.; MORAES, L.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Biodiesel and Bioethanol from Microalgae. In: SOCCOL, C. R.; BRAR, S. K.; FAULDS, C.; RAMOS, L. P. (Ed.). **Green Fuels Technology**. Green Energy and Technology. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 359–386.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 129, n. 3, p. 439–445, 2007b.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Bioprocesses for removal of carbon dioxide and nitrogen oxide by microalgae for the utilization of gas generated during coal burning. **Quimica Nova**, v. 31, n. 5, p. 1038–1042, 2008a.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 9, p. 1349–1352, 2007c.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Fatty acids profile of microalgae cultivated with carbon dioxide. **Science and Agrotechnology**, v. 32, n. 4, p. 1245–1251, 2008b.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. **Energy Conversion and Management**, v. 48, n. 7, p. 2169–2173, 2007a.

MORAIS, M. G.; KLASENER, C.; HENRARD, A. A.; COSTA, J. A. V.; Carbon dioxide mitigation by microalga in a vertical tubular reactor with recycling of the culture medium. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 33, p. 1935–1940, 2015.

MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R.; TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, n. 1–2, p. 60–64, 2009.

MORAIS, M. G.; VAZ, B. S.; MORAIS, E. G.; COSTA, J. A. V. Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. **BioMed Research International**, p. 1–16, 2014.

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

NELSON, D. L.; COX, M. M. Fosforilação Oxidativa e Fotofosforilação. In: NELSON, D. L.; COX, M. M. (Ed.). **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6^a ed. ed. Porto Alegre: ARTMED EDITORA LTDA, 2014. p. 731–789.

NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S. I.; MURATA, N. A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1757, n. 7, p. 742–749, 2006.

- NOMURA, M.; HIBINO, T.; TAKABE, T.; SUGIYAMA, T.; YOKOTA, A.; MIYAKE, H.; TAKABE, T. Transgenically Produced Glycinebetaine Protects Ribulose 1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase from Inactivation in *Synechococcus* sp. PCC7942 under Salt Stress. **Plant Cell Physiology**, v. 39, n. 4, p. 425–432, 1998.
- PALIWAL, C.; MITRA, M.; BHAYANI, K.; BHARADWAJ, S. V. V.; GHOSH, T.; DUBEY, S.; MISHRA, S. Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1216–1226, 2017.
- PANCHA, I.; CHOKSHI, K.; GEORGE, B.; GHOSH, T.; PALIWAL, C.; MAURYA, R.; MISHRA, S. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 146–154, 2014.
- PANCHA, I.; CHOKSHI, K.; MAURYA, R.; TRIVEDI, K. Salinity induced oxidative stress enhanced biofuel production potential of microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, v. 189, p. 341–348, 2015.
- PANDIT, P. R.; FULEKAR, M. H.; KARUNA, M. S. L. Effect of salinity stress on growth, lipid productivity, fatty acid composition, and biodiesel properties in *Acutodesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 15, p. 13437–13451, 2017.
- PAWLOWSKI, A.; FERNÁNDEZ, I.; GUZMÁN, J. L.; BERENGUEL, M.; ACIÉN, F. G.; NORMEY-RICO, J. E. Event-based predictive control of pH in tubular photobioreactors. **Computers and Chemical Engineering**, v. 65, p. 28–39, 2014a.
- PAWLOWSKI, A.; MENDOZA, J. L.; GUZMÁN, J. L.; BERENGUEL, M.; ACIÉN, F. G.; DORMIDO, S. Effective utilization of flue gases in raceway reactor with event-based pH control for microalgae culture. **Bioresource Technology**, v. 170, p. 1–9, 2014b.
- PINTO, T. S.; MALCATA, F. X.; ARRABAÇA, J. D.; SILVA, J. M.; SPREITZER, R. J.; ESQUÍVEL, M. G. Rubisco mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* enhance photosynthetic hydrogen production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 12, p. 5635–5643, 2013.
- PIRES, J. C. M.; MARTINS, F. G.; SIMÕES, M.; ALVIM-FERRAZ, M. C. M.; MARTINS, F. G.; SIMÕES, M. Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 5, p. 3043–3053, 2012.
- POSADAS, E.; MORALES, M. D. M.; GOMEZ, C.; ACIÉN, F. G.; MUÑOZ, R. Influence of pH and CO₂ source on the performance of microalgae-based secondary domestic wastewater treatment in outdoors pilot raceways. **Chemical Engineering Journal**, v. 265, p. 239–248, 2015.
- QIU, R.; GAO, S.; LOPEZ, P. A.; OGDEN, K. L. Effects of pH on cell growth, lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. **Algal Research**, v. 28, n. November, p. 192–199, 2017.
- RA, C. H.; KANG, C-H.; KIM, N. K.; LEE, C-G.; KIM, S-K. Cultivation of four microalgae for biomass and oil production using a two-stage culture strategy with salt stress. **Renewable**

Energy, v. 80, p. 117–122, 2015.

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

RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Lipid content and fatty acids composition variation of microalgae exposed to CO₂, SO₂ and NO. **Quimica Nova**, v. 31, n. 7, p. 1609–1612, 2008.

RAVELONANDRO, P. H.; RATIANARIVO, D. H.; JOANNIS-CASSAN, C.; ISAMBERT, A.; RAHERIMANDIMBY, M. Improvement of the growth of *Arthrospira (Spirulina) platensis* from Toliara (Madagascar): Effect of agitation, salinity and CO₂ addition. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 3, p. 209–216, 2011.

RAZZAK, S. A.; HOSSAIN, M. M.; LUCKY, R. A.; BASSI, A. S.; DE LASA, H. Integrated CO₂ capture, wastewater treatment and biofuel production by microalgae culturing - A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 622–653, 2013.

REIS, A.; GOUVEIA, L. Biorefinarias de microalgas. **Boletim de Biotecnologia**, n. Abril, p. 28–29, 2013.

RICHMOND, A. Biological Principles of Mass Cultivation of Photoautotrophic Microalgae. In: **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 169–204.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, n. 1, 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, n. 8–9, p. 3071–3073, 2011.

ROSA, G. M. **Fixação química e biológica de CO₂ utilizadas no cultivo de *Spirulina***. 2014. 91f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

ROSA, G. M.; MORAES, L.; CARDIAS, B. B.; SOUZA, M. da R. A. Z.; COSTA, J. A. V. Chemical Absorption and CO₂ Biofixation via the Cultivation of *Spirulina* in Semicontinuous Mode with Nutrient Recycle. **Bioresource Technology**, v. 192, p. 321–327, 2015.

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

SALAMA, E-S.; ABOU-SHANAB, R. A. I.; KIM, J. R.; LEE, S.; KIM, S. H.; OH, S. E.; KIM, H. C.; ROH, H. S.; JEON, B. H. The effects of salinity on the growth and biochemical properties of *Chlamydomonas mexicana* GU732420 cultivated in municipal wastewater. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 35, n. 12, p. 1491–1498, 2014.

SALAMA, E-S.; KIM, H-C.; ABOU-SHANAB, R. A. I.; JI, M-K.; OH, Y.-K.; KIM, S-H.;

- JEON, B-H. Biomass, lipid content, and fatty acid composition of freshwater *Chlamydomonas mexicana* and *Scenedesmus obliquus* grown under salt stress. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 6, p. 827–833, 15 jun. 2013.
- SAN PEDRO, A.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C. V.; ACIÉN FERNANDÉZ, F. G.; MOLINA-GRIMA, E. Outdoor pilot-scale production of *Nannochloropsis gaditana*: Influence of culture parameters and lipid production rates in tubular photobioreactors. **Bioresource Technology**, v. 169, p. 667–676, 2014.
- SAN PEDRO, A.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C. V.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; MOLINA-GRIMA, E. Marine microalgae selection and culture conditions optimization for biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 353–361, 2013.
- SAN PEDRO, A.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C. V.; ACIÉN, F. G.; MOLINA-GRIMA, E. Outdoor pilot production of *Nannochloropsis gaditana*: Influence of culture parameters and lipid production rates in raceway ponds. **Algal Research**, v. 18, p. 205–213, 2015.
- SAN PEDRO, A.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, C. V.; ACIÉN, F. G.; MOLINA-GRIMA, E. Outdoor pilot production of *Nannochloropsis gaditana*: Influence of culture parameters and lipid production rates in flat-panel photobioreactors. **Algal Research**, v. 18, p. 156–165, 2016.
- SÁNCHEZ, J. F.; FERNÁNDEZ, J. M.; ACIÉN, F. G.; RUEDA, A.; PÉREZ-PARRA, J.; MOLINA, E. Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 398–405, 2008.
- SANTOS, T. D. **Engenharia de microalgas na fixação de CO₂ em diferentes biorreatores**. 2015. 127f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2015.
- SANTOS, T. D.; FREITAS, B. C. B.; MOREIRA, J. B.; ZANFONATO, K.; COSTA, J. A. V. Development of powdered food with the addition of *Spirulina* for food supplementation of the elderly population. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 37, p. 216–220, 2016.
- SHEEHAN, J.; DUNAHAY, T.; BENEMANN, J.; ROESSLER, P. **A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae**. [s.l: s.n.].
- SHEN, Q. H.; GONG, Y. P.; FANG, W. Z.; BI, Z. C.; CHENG, L. H.; XU, X. H.; CHEN, H. L. Saline wastewater treatment by *Chlorella vulgaris* with simultaneous algal lipid accumulation triggered by nitrate deficiency. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 68–75, 2015.
- SINGH, S. P.; SINGH, P. Effect of CO₂ concentration on algal growth : A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 38, p. 172–179, 2014.
- SLADE, R.; BAUEN, A. Micro-algae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. **Biomass and Bioenergy**, v. 53, n. 0, p. 29–38, 2013.
- SOLOVCHENKO, A.; KHOZIN-GOLDBERG, I. High-CO₂ tolerance in microalgae: Possible mechanisms and implications for biotechnology and bioremediation. **Biotechnology**

Letters, v. 35, n. 11, p. 1745–1752, 2013.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, fev. 2006.

SPREITZER, R. J.; SALVUCCI, M. E. RUBISCO: Structure, Regulatory Interactions, and Possibilities for a Better Enzyme. **Annual Review of Plant Biology**, v. 53, n. 1, p. 449–475, 2002.

SUDHIR, P.-R.; POGORYELOV, D.; KOVACS, 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, n. 4, p. 481–485, 2005.

SUJATHA, K.; NAGARAJAN, P. Effect of salinity on biomass and biochemical constituents of *Spirulina platensis* (Geitler). **International Journal of Plant Protection**, v. 7, n. 1, p. 71–73, 2014.

SUNG, K.; LEE, J.; SHIN, C.; PARK, S.; CHOI, M.-J. CO₂ fixation by *Chlorella* sp. KR-1 and its cultural characteristics. **Bioresource Technology**, v. 68, p. 269–273, 1999.

TALEBI, A. F.; MOHTASHAMI, S. K.; TABATABAEI, M.; TOHIDFAR, M.; BAGHERI, A.; ZEINALABEDINI, M.; HADAVAND MIRZAEI, H.; MIRZAJANZADEH, M.; MALEKZADEH SHAFAROUZI, S.; BAKHTIARI, S. Fatty acids profiling: A selective criterion for screening microalgae strains for biodiesel production. **Algal Research**, v. 2, n. 3, p. 258–267, 2013.

TANG, D.; HAN, W.; LI, P.; MIAO, X.; ZHONG, J. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3071–3076, 2011.

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

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

TOMASELLI, L.; TORZILLO, G.; GIOVANNETTI, L.; PUSHPARAJ, B.; BOCCI, F.; TREDICI, M.; PAPUZZO, T.; BALLONI, W.; MATERASSI, R. Recent research on *Spirulina* in Italy. **Hydrobiologia**, v. 151–152, n. 1, p. 79–82, 1987.

TORZILLO, G.; VONSHAK, A. Environmental Stress Physiology with Reference to Mass Cultures. In: **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 90–113.

TREDICI, M. R. Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2004. p. 178–214.

TRIVEDI, J.; AILA, M.; BANGWAL, D. P.; KAUL, S.; GARG, M. O. Algae based

biorefinery—How to make sense? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 47, p. 295–307, 2015.

US DOE. **National Algal Biofuels Technology Roadmap** U.S. Department of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, 2010.

VANTHOOR-KOOPMANS, M.; WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M. J.; EPPINK, M. H. M. Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 142–149, 2013.

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

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

VIDYASHANKAR, S.; DEVIPRASAD, K.; CHAUHAN, V. S.; RAVISHANKAR, G. A.; SARADA, R. Selection and evaluation of CO₂ tolerant indigenous microalga *Scenedesmus dimorphus* for unsaturated fatty acid rich lipid production under different culture conditions. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 28–37, 2013.

VONSHAK, A. ***Spirulina platensis Arthrospira: Physiology, Cell-Biology And Biotechnology***. London: Taylor and Francis, 1997a.

VONSHAK, A. *Spirulina: Growth, Physiology and Biochemistry*. In: VONSHAK, A. (Ed.). ***Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology***. London: Taylor & Francis, 1997b. p. 43–65.

WANG, B.; LAN, C. Q.; HORSMAN, M. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 4, p. 904–912, 2012.

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

WANG, T.; TIAN, X.; LIU, T.; WANG, Z.; GUAN, W.; GUO, M.; CHU, J.; ZHUANG, Y. Enhancement of lipid productivity with a novel two-stage heterotrophic fed-batch culture of *Chlorella protothecoides* and a trial of CO₂ recycling by coupling with autotrophic process. **Biomass and Bioenergy**, v. 95, p. 235–243, 2016.

XIA, L.; RONG, J.; YANG, H.; HE, Q.; ZHANG, D.; HU, C. NaCl as an effective inducer for lipid accumulation in freshwater microalgae *Desmodesmus abundans*. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 402–409, jun. 2014.

YADAV, G.; SEN, R. Microalgal green refinery concept for biosequestration of carbon-dioxide vis-à-vis wastewater remediation and bioenergy production: Recent technological advances in climate research. **Journal of CO₂ Utilization**, v. 17, p. 188–206, 2017.

ZHANG, K.; KURANO, N.; MIYACHI, S. Optimized aeration by carbon dioxide gas for microalgal production and mass transfer characterization in a vertical flat-plate

photobioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 25, n. 2, p. 97–101, 2002.

ZHANG, L.; HAPPE, T.; MELIS, A. Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). **Planta**, v. 214, n. 4, p. 552–561, 2002.

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

ZHOU, W.; WANG, J.; CHEN, P.; JI, C.; KANG, Q.; LU, B.; LI, K.; LIU, J.; RUAN, R. Bio-mitigation of carbon dioxide using microalgal systems: Advances and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, n. April 2016, p. 1163–1175, 2017.

ZHU, B.; CHEN, G.; CAO, X.; WEI, D. Molecular characterization of CO₂ sequestration and assimilation in microalgae and its biotechnological applications. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1207–1215, 2017.

ZITTELI, G. C.; LAVISTA, F.; BASTIANINI, A.; RODOLFI, L.; VINCENZINI, M.; TREDICI, M. R. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 299–312, 1999.

ZITTELLI, G. C.; BIONDI, N.; RODOLFI, L.; TREDICI, M. R. Photobioreactors for Mass Production of Microalgae. In: RICHMOND, A.; HU, Q. (Ed.). **Handbook of microalgal culture : applied phycology and biotechnology**. Second ed. Oxford: Wiley Blackwell, 2013. p. 225–266.

ANEXOS

Figura A1 – Micrografia da microalga *Chlorella fusca* LEB 111: (aumento de 1000x)

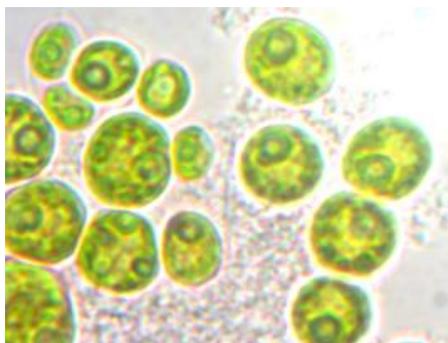


Figura A2 – Cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111 em fotobiorreatores tubulares verticais com injeção de CO₂



Figura A3 – Cultivos para seleção da concentração de cloreto de sódio em fotobiorreatores *Erlenmeyers* na condição controle, com adição de 100, 200 mmol L⁻¹ de NaCl (a), 300, 400, 500 e 600 mmol L⁻¹ de NaCl (b)

(a)



(b)



Figura A4 – Cultivo em único estágio (UE) em fotobiorreatores tubulares verticais, ensaio controle e com adição 100 e 200 mmol L⁻¹ de cloreto de sódio

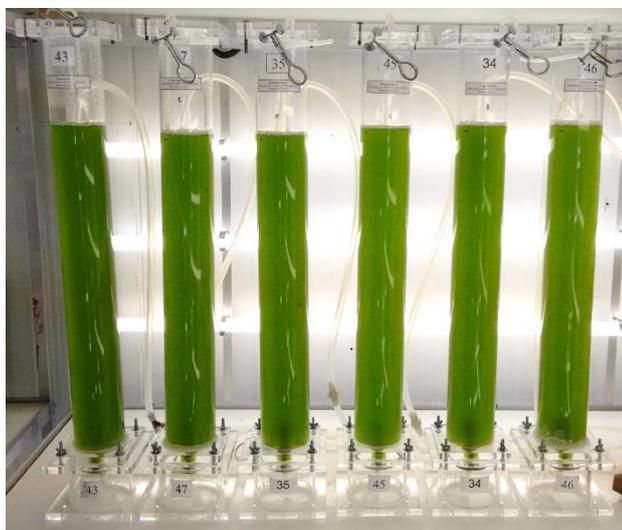


Figura A5 – Cultivos em duplo estágio (DE) em fotobiorreatores tubulares verticais, ensaios controle, com adição de 15% CO₂ e 100 mmol L⁻¹ de NaCl e 15% CO₂ e 200 mmol L⁻¹ de NaCl

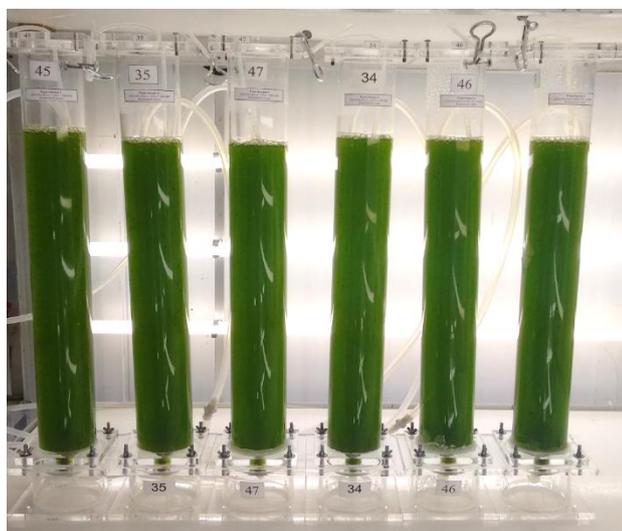
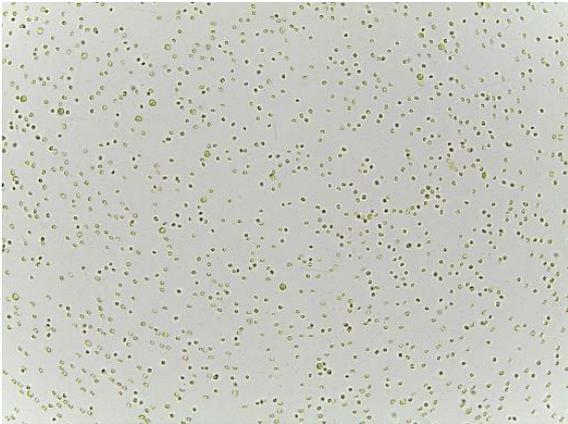


Figura A6 – Micrografias da microalga *Nannochloropsis gaditana*: aumento de 400x (a) e de 1000 x (b)

(a)



(b)

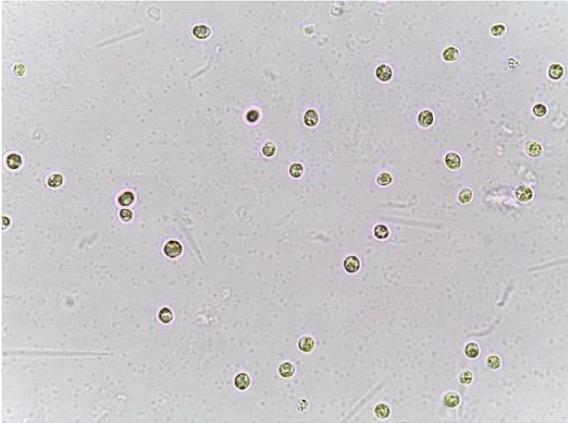


Figura A7 – Fotobiorreatores tubulares em estufa de filme transparente



Fonte: Estação experimental *Las Palmerillas* – Almería, Espanha

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

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

Fonte: Adaptado de RIPPKA et al. (1979) *Solução A5+Co (g.L⁻¹): H₃BO₃ (2,86), MnCl₂.4H₂O (1,81), ZnSO₄.7H₂O (0,222), NaMoO₄ (0,015), CuSO₄. 5H₂O (0,079), Co(NO₃).6H₂O (0,0494).

Tabela A2 – Meio de cultivo composto por água do mar artificial e fertilizantes agrícolas.

Principais componentes		g L⁻¹
NaCl	Cloreto de sódio	30,0
Ca(NO ₃) ₂	Nitrato de cálcio	0,80
KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potássio	0,25
MgSO ₄	Sulfato de magnésio	0,30
Oligoelementos		mg L⁻¹
B	Boro	0,23
Cu	Cobre	0,09
Fe	Ferro	2,10
Mn	Manganês	1,17
Mo	Molibdênio	0,07
Zn	Zinco	0,35

Fonte: Adaptado de Camacho-Rodríguez et al. (2013)