



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

**NANOFIBRAS NO CULTIVO MICROALGAL PARA INCREMENTO NA FIXAÇÃO
DE CO₂ E TECNOLOGIA PIONEIRA DE PRESERVAÇÃO DE MICROALGAS**

Eng. Allana Arcos Comitre

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

Dr^a. Bruna da Silva Vaz
Coorientadora

Rio Grande, RS
2021



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

**NANOFIBRAS NO CULTIVO MICROALGAL PARA INCREMENTO NA FIXAÇÃO
DE CO₂ E TECNOLOGIA PIONEIRA DE PRESERVAÇÃO DE MICROALGAS**

Eng. Allana Arcos Comitre

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

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

Dr^a. Bruna da Silva Vaz
Coorientadora

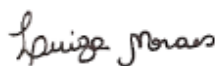
Rio Grande, RS
2021

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Allana Arcos Comitre, com orientação da Profa. Dra. Michele Greque de Moraes, aprovada em 30 de junho de 2021, pela Comissão Examinadora constituída pelos membros:



Profa. Dra. Michele Greque de Moraes – FURG



Profa. Dra. Luiza Moraes - FURG



Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa – FURG



Dr. Vitor Badiale Furlong – Aston University

C733n Comitre, Allana Arcos.

Nanofibras no cultivo microalgal para incremento na fixação de CO₂ e tecnologia pioneira de preservação de microalgas / Allana Arcos Comitre. – 2021.

97f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2021.

Orientadora: Prof^a. Dra. Michele Greque de Moraes

Coorientadora: Dr^a. Bruna da Silva Vaz

1. Nanotecnologia. 2. Microalgas. 3. *Electrospinning*
I. Moraes, Michele Greque de. II. Vaz, Bruna da Silva. III.
Título.

CDU 664

Por todo apoio, amor e compreensão, dedico esse trabalho ao meu namorado
Raí, à família Arcos Comitre, minha família de sangue, e à família
Mendes, minha família do coração.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar o dom da vida, inteligência e determinação para seguir meus sonhos e alcançar meus objetivos.

À minha mãe Adriana e meu pai Jair, obrigada pela educação, pelo apoio, pelo suporte nas dificuldades, por acreditarem em mim e não soltarem a minha mão. Por todo amor, carinho e admiração que sinto por vocês. Obrigada.

Às minhas irmãs Hellen, Jeniffer e meu sobrinho Rodrigo, obrigada por vibrarem comigo minhas conquistas e chorarem minhas derrotas, por todo apoio, amor e amizade que temos, que seja assim pro resto da vida!

Ao meu namorado Raí, por ter me transformado de dentro pra fora, por ser o meu maior admirador, por me dar forças, ser a minha base, me desafogar em momentos de desespero. Obrigada pela paciência, pela dedicação e pelo amor por nós.

À minha segunda mãe Regina e o meu segundo pai Dilson, por serem pessoas exemplares e admiráveis, por me acolherem, me amarem e me ampararem independente de qualquer coisa. Eu não estaria aqui se não fosse pela ajuda de vocês também. Gratidão eterna.

À minha orientadora Prof. Dra. Michele e ao Prof. Dr. Jorge Alberto, obrigada pela paciência, pelas oportunidades, pelos ensinamentos, mas principalmente por acreditarem na ciência e se dedicarem tanto pela educação de qualidade.

À minha co-orientadora Bruna Vaz, por toda dedicação com esse trabalho, por todos os ensinamentos, pelo carinho, amizade e pela pessoa maravilhosa que tu é. Te admiro muito.

Aos colegas do MIBI - Roberta, Suelen, Bruna, Adriano, Liliane, Cléber, Ana Cláudia e Gabriele, pelos momentos compartilhados, as risadas, as parcerias diárias, e por toda ajuda. **Em especial à Ana Luiza e Juliana**, por sempre se preocuparem comigo, por me acolherem, pela amizade, e por serem pessoas maravilhosas, admiro muito vocês! Sentirei saudades.

À minha iniciante científica Bruna Campagnucci, pela dedicação e comprometimento com esse trabalho, pela competência e pela amizade construída. Conte comigo.

Aos colegas do LEB, obrigada pelo suporte e pela ajuda daqueles que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho.

Aos amigos que conheci durante essa jornada e que me ajudaram a chegar até aqui.

Ao Programa de Pós-Graduação e os laboratórios da Escola de Química e Alimentos, pelo ensino de qualidade, pela estrutura e recursos disponibilizados.

Aos membros da Banca Examinadora, pela disponibilidade e contribuições para melhoria do trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal do Rio Grande, por ter realizado meu sonho da graduação e ser a minha casa durante 7 anos. Eu amo essa universidade.

Muito obrigada!

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”
(Albert Einstein)

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Parâmetros que afetam as características das nanofibras.....	27
Tabela 2 – Taxas de fixação de CO ₂ , vazão e período de alimentação de diferentes concentrações de CO ₂ no cultivo de microalgas	30

CAPÍTULO III

ARTIGO 1 – RENOVAÇÃO DE NANOFIBRAS NO CULTIVO MICROALGAL PARA INCREMENTO NA FIXAÇÃO DE CO₂

Tabela 1 – Concentração celular final (X_{final} , g L ⁻¹), produtividade final (P_{final} , mg L ⁻¹ d ⁻¹), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, d ⁻¹), tempo de geração (t_g , d), taxa de biofixação de CO ₂ (TB, mg L ⁻¹ d ⁻¹) e eficiência de utilização do CO ₂ (E, %) obtidos nos cultivos de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 com injeção de 15% de CO ₂ com e sem renovação de nanofibras 10% PAN contendo 4% NPsFe ₂ O ₃	51
Tabela 2 – Composição da biomassa de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 cultivada com injeção de 15% de CO ₂ com e sem renovação de nanofibras 10% PAN contendo 4% NPsFe ₂ O ₃	55

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1 - Esquema ilustrativo da técnica de <i>electrospinning</i>	26
Figura 2 – Processo de fotossíntese em micro-organismos fotoautotróficos	28

CAPÍTULO III

ARTIGO 1 – RENOVAÇÃO DE NANOFIBRAS NO CULTIVO MICROALGAL PARA INCREMENTO NA FIXAÇÃO DE CO₂

Figura 1 – Diagrama esquemáticos dos ensaios	46
Figura 2 – <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 cultivada com injeção de 15% de CO ₂ com e sem renovação de nanofibras 10% PAN contendo 4% NPsFe ₂ O ₃ : (●) sem nanofibras, (○) sem renovação, (■) renovação no 7º dia, (□) renovação no 15º dia e (▲) renovação dupla.	50
Figura 3 – Perfis de pH (a) e carbono inorgânico dissolvido (CID) (b) em função do tempo nos cultivos de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 com injeção de 15% de CO ₂ com e sem renovação de nanofibras 10% PAN contendo 4% NPsFe ₂ O ₃ onde: (●) sem nanofibras, (○) sem renovação, (■) renovação no 7º dia, (□) renovação no 15º dia e (▲) renovação dupla.	53
Figura 4 – Frações das espécies de carbono (HCO ₃ ⁻ e CO ₃ ²⁻) nos cultivos de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 com injeção de 15% de CO ₂ com e sem renovação de nanofibras 10% PAN contendo 4% NPsFe ₂ O ₃	54

ARTIGO 2 - TECNOLOGIA INOVADORA PARA PRESERVAÇÃO DE CÉLULAS MICROALGAIS UTILIZANDO NANOFIBRAS POLIMÉRICAS

Figura 1 – Cultivo com células de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 aderida às nanofibras	67
Figura 2 – Cultivo com células de <i>Chlorella Fusca</i> LEB 111 removidas das nanofibras	68
Figura 3 – (a) Concentração celular e (b) pH do cultivo de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 inicialmente aderida em nanofibras poliméricas	70
Figura 4 – Nanofibras obtidas durante 30 dias no cultivo de <i>Chlorella fusca</i> LEB 111 onde (a) nanofibras com células aderidas e (b) nanofibras após remoção manual das células microalgais	71

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	13
RESUMO GERAL	15
ABSTRACT GERAL	17
1 INTRODUÇÃO GERAL	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
 CAPÍTULO II	 23
3 REVISÃO DA LITERATURA	25
3.1 NANOFIBRAS POLIMÉRICAS	25
3.2 PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS PELA TÉCNICA DE <i>ELECTROSPINNING</i>	25
3.3 NANOFIBRAS ADSORVENTES DE CO ₂	26
3.4 MICROALGAS E FIXAÇÃO DE CO ₂	28
3.4.1 Condições para o cultivo microalgal	29
3.5 PRESERVAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS	31
3.5.1 Subcultura ou transferência direta	31
3.5.2 Imersão em óleo	32
3.5.3 Baixas temperaturas	33
3.5.4 Liofilização	33
3.5.5 Preservação de micro-organismos utilizando nanofibras poliméricas	34
3.6 HISTÓRICO DA LINHA DE PESQUISA	35
 CAPÍTULO III	 37
4 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	39
 ARTIGO 1	 41
RESUMO	43
1 INTRODUÇÃO	43
2 MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1 PRODUÇÃO DAS NANOFIBRAS POLIMÉRICAS	44
2.2 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO	45
2.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO	45
2.3.1 Aplicação das nanofibras no cultivo microalgal	46
2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	46
2.4.1 Concentração de biomassa, temperatura e luminosidade	46
2.4.2 Alcalinidade, pH, carbono inorgânico dissolvido	47
2.5 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL	47
2.6 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL	47
2.7 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO	48
2.8 BIOFIXAÇÃO E EFICIÊNCIA DE UTILIZAÇÃO DE CO ₂	48
2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4 CONCLUSÃO	56
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

ARTIGO 2	61
RESUMO	63
1 INTRODUÇÃO	63
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	65
2.1 PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS POLIMÉRICAS POR <i>ELECTROSPINNING</i>	65
2.2 MICRO-ORGANISMO E CONDIÇÕES DE CULTIVO	66
2.2.1 Incorporação das células de <i>Chlorella</i> às nanofibras	66
2.2.2 Potencial de crescimento das células de <i>Chlorella</i> aderidas às nanofibras.....	66
2.2.3 Remoção das células de <i>Chlorella</i> das nanofibras e potencial de crescimento.	67
2.3 CONCENTRAÇÃO CELULAR E pH	68
2.4 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO	69
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4 CONCLUSÃO	73
5 REFERÊNCIAS.....	73
 CAPÍTULO IV	 77
CONCLUSÃO GERAL.....	79
 CAPÍTULO V.....	 81
CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
RESÍDUOS GERADOS E DESTINO.....	83
SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS.....	83
 CAPÍTULO VI.....	 83
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

CAPÍTULO I

RESUMO GERAL

O efeito estufa tem se intensificado durante as últimas décadas e um dos principais fatores que contribuem para isso é a constante emissão de dióxido de carbono (CO_2) na atmosfera. As microalgas apresentam capacidade de fixação de CO_2 em sua biomassa, de forma que diversos estudos vêm sendo conduzidos a fim de aprimorar sua taxa de consumo para mitigar maiores concentrações deste gás. Nanofibras poliméricas adsorventes de CO_2 já se mostraram eficientes quando inseridas em cultivos microalgais de forma que adsorvem o gás em sua estrutura e os liberam gradualmente para consumo pelas microalgas. Entretanto, além de incorporarem biomassa do meio, as nanofibras possuem limitação da capacidade de adsorção de CO_2 . Dessa forma, o objetivo deste estudo foi promover o incremento da fixação de CO_2 por meio da renovação de nanofibras poliméricas no cultivo da microalga *Chlorella fusca* LEB 111, bem como estabelecer um novo potencial tecnológico para preservação de células microalgais por meio da aplicação de nanofibras poliméricas. A renovação das nanoestruturas nos cultivos foi realizada no 7º dia e no 15º dia isoladamente, bem como com renovação dupla nos 7º e 15º dia. Os maiores valores de concentração de biomassa ($2,53 \text{ g L}^{-1}$) e taxa de biofixação de CO_2 ($141,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) foram obtidos no cultivo com dupla renovação, sendo 21,6% e 23% superiores quando comparado aos cultivos sem renovação de nanofibras poliméricas. Para o estudo da preservação das células microalgais, dois métodos foram empregados: inoculação das células microalgais aderidas às nanofibras em novo cultivo e remoção das células das nanofibras com posterior inoculação em novo cultivo. Para isso, as nanofibras foram inseridas no cultivo microalgal a fim de adsorverem biomassa e após 30 dias foram retiradas do cultivo para serem utilizadas no método. Os resultados desse estudo comprovaram que tanto as células microalgais aderidas às nanofibras quanto as removidas foram capazes de crescer e se desenvolver quando inoculadas em novo cultivo sem sofrerem injúria. A concentração de biomassa do cultivo com células aderidas às nanofibras foi $1,67 \text{ g L}^{-1}$ ao final do 30º dia e a concentração do cultivo com células removidas foi $1,10 \text{ g L}^{-1}$ ao final do 5º dia. Dessa forma, constatou-se que a renovação de nanofibras no cultivo favoreceu o incremento da taxa de biofixação de CO_2 , sendo esse um processo importante para amenizar a intensificação do efeito estufa. Além disso, ao serem retiradas dos cultivos, as nanofibras ainda demonstram valor devido ao potencial de utilização como método de preservação de células microalgais, abrindo um novo ramo de estudo necessário para a microbiologia.

Palavras-chave: Adsorção. Dióxido de carbono. *Electrospinning*. Nanotecnologia. Preservação de microalgas. Armazenamento.

NANOFIBERS IN MICROALGAL CULTIVATION TO INCREASE CO₂ FIXATION AND PIONEERING MICROALGAE PRESERVATION TECHNOLOGY

ABSTRACT GERAL

The greenhouse effect has intensified over the last decades and one of the main factors contributing to this is the constant emission of carbon dioxide (CO₂) into the atmosphere. Microalgae can fix CO₂ in their biomass, so several studies have been conducted to improve their consumption rate to mitigate higher concentrations of the gas. Polymeric nanofibers that adsorb CO₂ have already shown to be efficient when inserted in microalgal cultures in a way that they adsorb the gas in its structure and gradually release it for microalgae consumption. However, in addition to incorporating biomass from the medium, nanofibers have maximum CO₂ adsorption capacity. Thus, the objective of this study was to promote the increase of CO₂ fixation by microalgae through the renewal of polymeric nanofibers in the cultivation of the microalgae *Chlorella fusca* LEB 111, as well as to establish a new technological potential for the preservation of microalgal cells through polymeric nanofibers. The renewal of nanostructures in cultures was carried out on the 7th and 15th days separately, as well as with double renewal on the 7th and 15th days. The highest values of biomass concentration and CO₂ biofixation rate (2.53 g L⁻¹ and 141.5 mg L⁻¹ d⁻¹) were obtained in cultivation with double renewal, being 21.6% and 23% higher than cultivation without renewal. To study the preservation of microalgal cells, two methods were used: inoculation of microalgal cells adhered to the nanofibers in a new culture and removal of the cells from the nanofibers with subsequent inoculation in a new culture. For this, the nanofibers were inserted in the microalgal culture to adsorb biomass and were removed on the 30th day of culture to implement the method. The results of this study proved that both the microalgal cells adhered to the nanofibers and those removed were able to grow and develop when inoculated into a new culture without suffering an injury. The biomass concentration of the culture with cells adhered to the nanofibers was 1.67 g L⁻¹ at the end of the 30th day of cultivation and the concentration of the culture with cells removed was 1.10 g L⁻¹ at the end of the 5th day of cultivation. Thus, it was found that the renewal of nanofibers in cultivation favored the increase in the rate of CO₂ biofixation, which is an important process to mitigate the intensification of the greenhouse effect. In addition, when removed from cultures, nanofibers still show value due to their potential use as a method of preserving microalgal cells, opening a new branch of study necessary for microbiology.

Keywords: Adsorption. Carbon dioxide. *Electrospinning*. Nanotechnology. Preservation of microalgae. Storage.

1 INTRODUÇÃO GERAL

As microalgas apresentam elevada capacidade de fixação biológica de dióxido de carbono (CO₂) e, por esse motivo, tem se destacado dentre as técnicas utilizadas para reduzir a concentração desse gás na atmosfera (BRAGA et al., 2019; COSTA; MORAIS, 2011; YUSUF et al., 2020). O CO₂ emitido para a atmosfera contribui para o agravamento de diversos problemas ambientais, principalmente no setor agrícola devido a mudança no clima terrestre (IPCC, 2018; WIEBE; ROBINSON; CATTANEO, 2019). Sendo assim, é necessário o desenvolvimento de novas tecnologias que visam a redução da concentração de CO₂ na atmosfera. Vaz et al. (2019), obtiveram maiores taxas de fixação de CO₂ no cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111 após inserirem nanofibras poliméricas adsorventes do gás no cultivo. Os autores explicam que a composição polimérica das nanofibras, bem como algumas de suas características como a alta porosidade e elevada área superficial, contribuem para obtenção de caráter adsorvente. Dessa forma, ao serem inseridas nos cultivos, as nanofibras adsorvem o CO₂ em sua estrutura e liberam gradualmente, aumentando assim, a fixação do gás pelas microalgas (DING; YU, 2014; HEO et al. 2019; LUOH; HAHN, 2006; VAZ; COSTA; MORAIS, 2019). Entretanto, as nanofibras inseridas no cultivo apresentam taxa máxima de adsorção do gás, além de adsorverem também biomassa e compostos do meio (VAZ; COSTA; MORAIS, 2019a). Nesse caso, pensando em aumentar a disponibilidade de CO₂ para consumo pelas microalgas, este trabalho visa a renovação das nanofibras no cultivo. Dessa forma, as nanofibras saturadas presentes no cultivo podem ser substituídas por novas nanofibras.

Entretanto, as células microalgais aderidas às nanofibras não haviam sido estudadas e poderiam apresentar potencial de crescimento quando inseridas em novo cultivo, contribuindo para a redução de resíduos e para o desenvolvimento de uma técnica pioneira de preservação de microalgas. A preservação de micro-organismos é uma prática rotineira nos laboratórios de microbiologia, que vem sendo pouco explorada e limitados trabalhos abordam protocolos inovadores de conservação de células (SOLA et al., 2012). As nanofibras poliméricas possuem características que facilitam sua utilização como agente de preservação de micro-organismos. Dentre essas características, destaca-se a proteção física contra agentes de frio, calor e ressecamento que as nanofibras podem proporcionar às células microbianas, a funcionalidade ajustável, a alta área superficial em relação ao volume e a elevada porosidade que conferem poder adsorvente e encapsulante às nanofibras (DING; YU, 2014; LIU; WANG; ZHANG, 2017). Assim, a utilização de nanomateriais na preservação de micro-organismos pode apresentar diversas vantagens frente aos métodos tradicionais. Dentre as vantagens destaca-se

a manutenção metabólica das células, a qual favorecida pela adsorção de biocompostos do meio de cultivo, bem como a utilização de pequenos espaços para armazenamento e redução de custos.

Neste contexto, visando incrementar o conhecimento científico na área de biofixação microalgal de CO₂, o presente trabalho complementa o que vem sendo estudado em projetos do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) e Microbiologia e Bioquímica (MIBI). Além disso, esse estudo pode contribuir como solução para amenizar o efeito estufa e suas consequências ao mundo. O estudo da preservação de microalgas pelas nanofibras agrega uma nova linha de pesquisa aos laboratórios LEB e MIBI e contribui para o desenvolvimento de novas tecnologias inovadoras de armazenamento de células.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi promover o incremento da fixação de CO₂ por meio da renovação de nanofibras poliméricas no cultivo da microalga *Chlorella fusca* LEB 111, bem como estabelecer um novo potencial tecnológico para preservação de células microalgais por meio da aplicação de nanofibras poliméricas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência da renovação das nanofibras ao longo do cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111 quanto a taxa e eficiência de fixação de CO₂, produção de biomassa e produção de macromoléculas;
- Estudar o potencial da viabilidade das células aderidas às nanofibras em novo cultivo microalgal a fim de observar se apresentam capacidade de crescimento e desenvolvimento.

CAPÍTULO II

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 NANOFIBRAS POLIMÉRICAS

Nanofibras poliméricas são estruturas com diâmetro em escala nanométrica, que possuem diversas aplicações tais como em dispositivos de filtração, em desenvolvimento de sensores e de embalagens e aplicações eletrônicas (KUNTZLER et al., 2018a; RAMAKRISHNA et al., 2005). Essas nanoestruturas têm sido estudadas por apresentarem propriedades como elevada elasticidade, alta porosidade e resistência mecânica (HUANG et al., 2003; KUNTZLER et al., 2018a; RAMAKRISHNA et al., 2006). Outra característica importante que as nanofibras apresentam é a elevada área superficial relativa ao volume que permite maior superfície de contato e reatividade do material (KUNTZLER et al., 2018a). Kuntzler et al. (2018a) exemplificam que 1g de nanofibras poliméricas com diâmetro de 100 nm podem apresentar cerca de 10 m² de área superficial.

As nanofibras podem ser produzidas com diferentes polímeros que podem ser naturais, tais como a quitosana (KUNTZLER; COSTA; MORAIS, 2018), quitina (SONG et al., 2019), ácido hialurônico (SÉON-LUTZ et al., 2019), fibrina (BACAKOVA et al., 2018), celulose (SETHI et al., 2018), colágeno (JHA et al., 2011) e poli (hidroxibutirato) (KUNTZLER et al., 2018b), bem como polímeros sintéticos como o óxido de polietileno (PEO) (LIU; ZUO, 2018), poliamida (PA) (KOLSKÁ et al., 2018), poliacrilonitrila (PAN) (VAZ; COSTA; MORAIS, 2019), ácido polivinílico (PVA) (OJAGHI et al., 2019), poli (ácido láctico) (PLA) (KOOSHKI et al., 2019) e policaprolactona (PCL) (ANDRADY, 2008; HU; LIN; HONG, 2019).

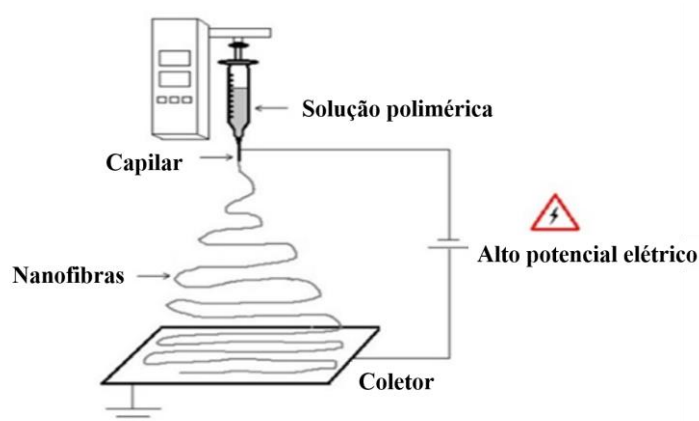
3.2 PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS PELA TÉCNICA DE *ELECTROSPINNING*

A técnica mais estabelecida para a produção das nanofibras é o *electrospinning*, devido a elevada reprodutibilidade, bem como possibilidade de aumento de escala do processo (RAMAKRISHNA et al., 2005). Além disso, esse método também manipular as condições do processo de forma a controlar a dimensão e morfologia das nanofibras (NAYAK et al., 2012). A Figura 1 apresenta o desenho esquemático que ilustra a técnica de *electrospinning*, cujo equipamento é composto por um recipiente, o capilar, dois eletrodos e o coletor condutor aterrado (KUNTZLER et al., 2018a; RAMAKRISHNA et al., 2005).

No processo de produção das nanofibras, o recipiente que contém a solução polimérica é submetido a bomba de deslocamento positivo, que o comprime, fazendo com que

seu conteúdo seja escoado pelo capilar em taxa constante (Figura 1). Esse processo contribui para a formação de pequenas gotas na ponta do capilar, que possuem valor crítico de tensão superficial. Quando o campo elétrico gerado pelos eletrodos supera esse valor, obtém-se um jato polimérico que se ajusta em estrutura denominada cone de Taylor (DOSHI; RENEKER, 1995). Dessa forma, o jato é ejetado em forma de hélice, fazendo com que a fibra seja alongada e, conseqüentemente, o diâmetro diminuído até que atinja o coletor (DOSHI; RENEKER, 1995; RAMAKRISHNA et al., 2005).

Figura 1 - Esquema ilustrativo da técnica de *electrospinning*



O *electrospinning* é uma técnica que tem sido amplamente estudada e, por isso equipamentos que permitem a produção de nanofibras em larga escala vem sendo desenvolvidos. Exemplos mais relatados na literatura são os equipamentos com multi-bocais (*multi-nozzle*), que possuem numerosos capilares (KIM et al., 2015; KIRICHENKO et al., 2010), bem como os *free liquid surface*, o qual origina múltiplos jatos gerados a partir do líquido eletrizado (BAZBOUZ; RUSSELL, 2018; PETRÍK, 2011). O maior diâmetro, presença de grânulos e defeitos na superfície das nanofibras são algumas características que podem ocorrer caso as condições do processo de *electrospinning* tais como as propriedades da solução, variáveis do processo e as condições ambientais não forem corretamente controladas. A Tabela 1 apresenta os principais parâmetros que afetam a produção de nanofibras.

3.3 NANOFIBRAS ADSORVENTES DE CO₂

Técnicas que visam realizar a captação de CO₂ como a absorção química, destilação criogênica, adsorção e separação por membrana já foram propostas (BRUNETTI et al., 2010;

CHOI; DRESE; JONES, 2009). Entretanto, a captura do CO₂ por adsorção apresenta vantagens frente aos outros processos, como o baixo consumo de energia, fácil regeneração do adsorvente, bem como não produz subprodutos poluentes (HONG et al., 2014). As características ideais para os adsorventes de CO₂ são: elevada área superficial com locais ativos na superfície, microporos e mesoporos bem definidos, excelente resistência química e estabilidade térmica (GRACIA-ESPINO et al., 2012; HONG et al., 2014). Dessa forma, as nanofibras de carbono vêm sendo consideradas promissoras para aplicação como adsorventes de CO₂, uma vez que esses nanomateriais apresentam essas características (HONG et al., 2014).

Tabela 1– Parâmetros que afetam as características das nanofibras

Parâmetros	Propriedades
Solução	Viscosidade
	Condutividade
	Tensão superficial
	Massa molar do polímero
	Concentração do polímero
Variáveis do processo	Distância do capilar ao coletor
	Taxa de alimentação
	Potencial elétrico
	Geometria do coletor
	Composição do coletor
	Diâmetro do capilar
Ambiente	Umidade relativa
	Temperatura

Fonte: Adaptado de KUNTZLER et al. (2018)

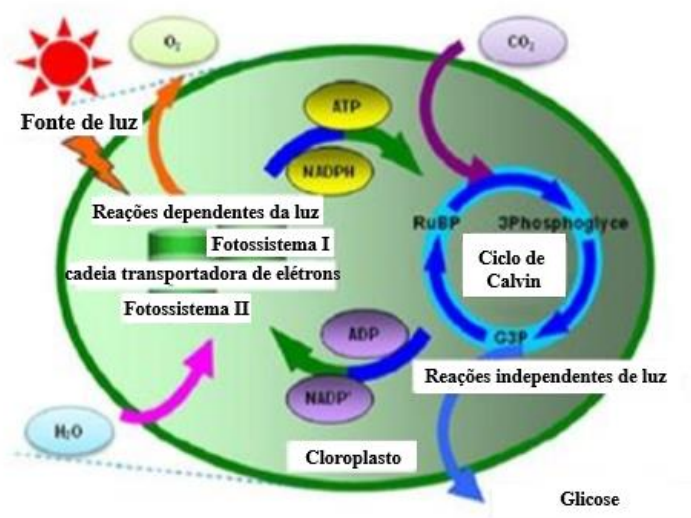
Meng e Park (2010) avaliaram o efeito do tratamento térmico na ativação de nanofibras de grafite com hidróxido de potássio (KOH) na adsorção de CO₂. Ao realizar as isotermas de adsorção de CO₂, os autores observaram que as nanofibras expostas ao aquecimento de 900 °C apresentaram melhor capacidade de adsorção de CO₂ com valores de 1,35 mmol g⁻¹ a 25 °C e 1 bar. Zainab et al. (2018) estudaram nanofibras de poliestireno (PS)/ poliuretano (PU) funcionalizadas com amina, no qual as nanofibras apresentaram resultados de adsorção de CO₂ de 1,64 mmol g⁻¹ a 40 °C. Em outro estudo, Heo et al. (2019) sintetizaram nanofibras compósitas de PAN/ fluoreto de polivinilideno (PVDF) para aplicação na adsorção

de CO₂. Os autores realizaram processo de carbonização das nanofibras a 900 °C e posterior ativação a vapor e obtiveram desempenho de captação de CO₂ na ordem de 2,21 mmol g⁻¹, quando submetidas a 1 bar e 25 °C. Vaz, Costa e Moraes (2019a) desenvolveram nanofibras de PAN contendo 4% de nanopartículas de ferro. Ao determinar a isoterma de adsorção de CO₂ pelas nanofibras, os autores obtiveram capacidade de 26,12 mmol g⁻¹ de adsorção máxima desse gás a 20 °C e 1 bar.

3.4 MICROALGAS E FIXAÇÃO DE CO₂

As microalgas são as maiores contribuintes para redução do CO₂ na atmosfera, pois são responsáveis por aproximadamente 40% da fotossíntese global (JOHANSEN, 2012). O processo de fotossíntese (Figura 2) ocorre em duas fases distintas dentro dos cloroplastos, denominadas fotoquímica e química (CHEAH et al., 2015).

Figura 2 – Processo de fotossíntese em micro-organismos fotoautotróficos



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

A fase fotoquímica é a primeira fase da fotossíntese e é responsável pela captura da energia luminosa pelos fotossistemas I e II. Além disso, nesta fase ocorre a geração de elétrons energizados pela quebra de moléculas de água (H₂O) produzindo energia química na forma de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), adenosina trifosfato (ATP) e oxigênio (O₂) como subproduto. A fase química utiliza a energia gerada na fase anterior para converter o carbono inorgânico proveniente do CO₂ em moléculas orgânicas. Esse processo ocorre com auxílio da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBisCo) no ciclo de Calvin

Benson (NABORS, 2012), de maneira que o CO_2 é convertido à glicose (CAMPBELL; FARRELL, 2007). Dessa forma, devido a combustão ser o inverso da fotossíntese, pois consome O_2 , produz H_2O e libera CO_2 em excesso para a atmosfera, a mitigação deste gás gera processo cíclico pois requer contínuo processo de fotossíntese (COSTA et al., 2019).

Diferentes fontes de CO_2 podem ser utilizadas no cultivo de microalgas tais como: CO_2 atmosférico, de exaustão industrial (KIM; OTIM, 2019) e na forma de carbonatos solúveis (ARANA; GUDE, 2018). Para isso, apesar de ser utilizado ar atmosférico nos cultivos, a baixa concentração de CO_2 em sua composição (cerca de 0,03 a 0,06% de CO_2), limita o crescimento das microalgas. Neste contexto, como o carbono representa a maior parcela de custos em nutrientes e é fonte essencial ao crescimento de microalgas, os cultivos realizados com injeção de gases de combustão visando a mitigação de carbono merecem destaque (SYDNEY et al., 2019; VAZ et al., 2019; YADAV; SEM, 2017).

A Tabela 2 apresenta resultados das taxas máximas de biofixação de CO_2 (TB CO_2 máx) por microalgas, obtidas em alguns estudos, bem como a concentração do gás utilizada, período de injeção e vazão específica de alimentação nos reatores.

3.4.1 Condições para o cultivo microalgal

Um dos fatores limitantes para o crescimento e composição da biomassa microalgal é a fonte de carbono a ser fornecida durante o cultivo, pois cerca de 50% da composição das microalgas correspondem a esse elemento (BILAD; ARAFAT; VANKELECOM, 2014; MORAIS et al., 2019). Nesse contexto, o pH nos cultivos é outro fator importante, pois determina a concentração relativa das espécies de carbono disponíveis no meio (LAYCOCK et al., 2013). Quando o pH do cultivo se encontra abaixo de 6,5, o consumo de carbono na forma de CO_2 é favorecido. O pH entre 6,5 e 10,5, mais encontrado em cultivo microalgal, favorece a disponibilidade da molécula de bicarbonato e acima deste valor de pH, o carbonato prevalece (GROBBELAAR, 2013).

Outro parâmetro importante a ser considerado no cultivo de microalgas é a intensidade luminosa. Quando não há limitação de nutrientes no cultivo, conforme a intensidade luminosa aumenta, a fotossíntese aumenta até que a taxa de crescimento específica máxima da microalga seja atingida. Entretanto, a alta incidência luminosa pode gerar sobrecarga de elétrons que, quando em excesso, reage com a água originando compostos tóxicos às células que causam a fotoinibição (CHAUTON et al., 2013).

Tabela 2 – Taxas de fixação de CO₂, vazão e período de alimentação de diferentes concentrações de CO₂ no cultivo de microalgas

Microalga	Injeção de CO ₂ (mLCO ₂ / mL _{meio} d)	Modo de injeção	TB CO ₂ max (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Referência
<i>Euglena gracilis</i>	432	Contínuo	382	Chae, Hwang e Shin (2006)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	432	15 min / 2 h	263	Morais e Costa (2007a)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	4,32	Contínuo	379,3	Ho et al. (2011)
<i>Spirulina</i> sp.	0,14	2 min / h	209,6	Moraes et al. (2016)
<i>Chlorella fusca</i>	0,36	1 min / h	227,3	Rosa, Morais e Costa (2018)
<i>Chlorella fusca</i> LEB 111	0,36	1 min / h	275,8	Rosa, Morais e Costa (2019)

Fonte: Modificado de Morais et al. (2019)

O metabolismo das células também sofre influência da temperatura, principalmente na fase escura da fotossíntese, onde a taxa de respiração aumenta de acordo com o aumento da temperatura (RICHMOND; HU, 2013). Dessa forma, conforme a temperatura do cultivo aumenta até o ponto ótimo, a produção de biomassa pelas microalgas eleva-se de forma exponencial. Após a temperatura ultrapassar o ponto ótimo, ideal para o cultivo e dependente de cada espécie microalgal, a concentração da cultura entra em declínio devido a morte celular (RAS; STEYER; BERNARD, 2013).

Para a realização dos cultivos microalgais, tanto sistemas abertos quanto fechados podem ser utilizados, de forma que ambos podem ser alocados *indoor* ou *outdoor* (KIM; OTIM, 2019). O cultivo *outdoor* está predisposto às alterações do clima, luz e temperatura do ambiente, enquanto os sistemas alocados *indoor* possuem como benefício o controle sobre as condições físico-químicas durante os cultivos, podendo otimizar sua produtividade. Nos cultivos abertos são necessários os controles da temperatura no meio líquido, da contaminação por outros micro-organismos e da evaporação da água. Dessa forma, apesar do cultivo aberto ser mais fácil de construir e operar, os cultivos fechados permitem melhor resistência à contaminação, facilidade

na coleta de amostras, menor perda por evaporação e maior controle das trocas gasosas (JOHANSEN, 2012; MORAIS et al., 2015).

3.5 PRESERVAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS

Os micro-organismos apresentam grande diversidade metabólica, tornando-se importantes em aplicações industriais e para o desenvolvimento de produtos. Dentre a variedade de micro-organismos utilizados comercialmente, as microalgas vêm sendo utilizadas em indústrias de alimentos e nas áreas da saúde humana e animal. O interesse na utilização industrial de microalgas é devido aos biocompostos presentes em sua estrutura como os lipídios, as proteínas, as enzimas, os polissacarídeos, os esteróis, as vitaminas, as ficobilinas, os carotenoides e os ácidos graxos (BHATTACHARJEE, 2016). Além disso, estudos destacam a importância da atuação das microalgas na mitigação de CO₂ atmosférico ao mesmo tempo que contribuem para o tratamento de águas residuais, e posterior produção de bioetanol e biodiesel a partir de sua biomassa (D'ELIA et al., 2018).

O processo de coleta de amostras biológicas, seguida pelo tratamento e armazenamento de longo prazo é denominado biobanking e é frequentemente realizado em laboratórios de microbiologia (PAOLI, 2005). O principal objetivo da preservação de culturas de micro-organismos é manter o organismo vivo, sem variação genotípica e fenotípica, e não contaminado. A preservação destas cepas é importante pois cataloga os perfis fenotípicos de cada micro-organismo e fornecem base para caracterização e conhecimento genotípico desses e outros micro-organismos. Além disso, as cepas em estoque podem ser utilizadas em pesquisas, investigações epidemiológicas, nas indústrias e na educação (PETTI; CARROL, 2011; PAOLI, 2005). Diversos métodos de preservação são utilizados em laboratórios de microbiologia, contudo os mais comumente utilizados são os de subcultura, imersão em óleo, baixas temperaturas e liofilização. Entretanto, ainda é necessário que a aplicação do método seja estudada para cada micro-organismo, uma vez que podem apresentar resultados variáveis dependendo da espécie.

3.5.1 Subcultura ou transferência direta

O método de subcultura ou transferência é o método mais simples e tradicionalmente utilizado para preservação de culturas a curto prazo para bactérias, microalgas e cianobactérias. Neste método são realizadas transferências periódicas do micro-organismo em

armazenamento para meio de cultivo fresco (KUMAR et al., 2013; PETTI; CARROLL, 2011). As condições a serem avaliadas ao utilizar esse método de preservação é a temperatura de armazenamento, meio de cultivo adequado e frequência entre as transferências. Os fatores a serem empregados para preservação de micro-organismos por subcultura devem garantir baixa taxa de crescimento de forma que seja necessário menor frequência de transferência (KUMAR et al., 2013). Dessa forma, o meio de cultivo a ser empregado neste método deve conter a quantidade mínima de nutrientes necessários, a fim de garantir a sobrevivência do micro-organismo, apesar de minimizar seus processos metabólicos. Neste caso, a taxa de crescimento dos micro-organismos será reduzida, diminuindo a frequência de transferências e garantindo menor probabilidade de mutação genética e mudanças fenotípicas no micro-organismo (GHERNA, 2010; PETTI; CARROLL, 2011). Além do método de subcultura ser precário, demorado e caro, ele apresenta ainda outras limitações como a necessidade de espaços para armazenamento, riscos de contaminação e variações físicas e genéticas (GHERNA; REDDY, 2007; PETTI; CARROLL, 2011).

3.5.2 Imersão em óleo

A utilização do método de imersão em óleo é frequentemente utilizada em conjunto com o método de subcultura, como alternativa para diminuir a taxa de crescimento do micro-organismo e sua frequência de transferências. Os óleos a serem utilizados neste método devem ser minerais, de grau medicinal como a parafina e a vaselina. Para sua aplicação, é necessário que a cultura esteja previamente inoculada em meio de cultivo apropriado, para posterior adição do óleo mineral ao meio com 1 a 2 cm de profundidade (GHERNA; REDDY, 2007; KUMAR et al., 2013). Este método possui como objetivo a limitação do acesso ao oxigênio pelos micro-organismos, reduzindo seu metabolismo e crescimento e prevenindo a desidratação. Bactérias e fungos podem ser armazenados por períodos de 2 a 3 anos com a utilização deste método (KUMAR et al., 2013). O óleo mineral deve ser esterilizado previamente à sua utilização em estufa a 180° C por 2h (GHERNA; REDDY, 2007). Apesar deste método apresentar vantagens quanto a frequência de transferência dos micro-organismos, a contaminação das culturas é uma limitação e ocorre com frequência devido ao óleo não estar totalmente estéril. Neste caso, cada lote de óleo submetido à esterilização deve ser testado em meios de cultivo apropriados para assegurar sua esterilidade. Outra limitação a ser considerada na utilização deste método é a ocupação de espaços de armazenamento, necessidade de testes de viabilidade para garantir a

sobrevivência das culturas e ocorrência de mutações genéticas (GHERNA; REDDY, 2007; KANNOJIA et al.,2020).

3.5.3 Baixas temperaturas

A utilização de baixas temperaturas na preservação de micro-organismos possui o objetivo de reduzir a atividade metabólica do micro-organismo ao tempo em que mantém sua integridade genética (BRAND; ANDERSEN; NOBLES, 2013). Esse método pode ser empregado utilizando freezers, que alcançam temperaturas de até -20 °C, ultrafreezers a -80 °C e nitrogênio líquido a temperaturas de -196 °C. A preservação em freezers (até -20 °C) pode manter micro-organismos armazenados por períodos de 1 a 2 anos, mas não é recomendada para utilização por longos períodos de tempo. Por outro lado, quando o congelamento ocorre a temperaturas de -80 °C, as células permanecem viáveis por aproximadamente 30 anos (GHERNA; REDDY, 2007).

No congelamento a -20 °C, a taxa lenta de resfriamento favorece a formação de cristais de gelo na água líquida extracelular. O congelamento desta água faz com que aumente a concentração de soluto externa e, a fim de equilibrar a pressão osmótica, a água interna da célula migra para fora, provocando sua desidratação e a crio injúria. O congelamento rápido, com temperaturas a -80 °C, diminui a formação de cristais de gelo e seus efeitos danosos às células. Entretanto, a taxa rápida de resfriamento excede o calor latente do meio favorecendo a cristalização intracelular, levando ao aumento de gelo intracelular (MAZUR, 1967). Neste caso, a fim de proteger as células contra as crio injúrias, se faz necessário a utilização de agentes crioprotetores como o glicerol ou o dimetilsulfóxido (DMSO). Os agentes crioprotetores se ligam a água intracelular, evitando a desidratação e a formação de gelo, bem como reduz a concentração de sais intracelulares (GHERNA; REDDY, 2007).

3.5.4 Liofilização

Dentre os métodos de preservação existentes, a liofilização é um dos métodos considerados mais eficaz para o armazenamento a longo prazo de micro-organismos como as bactérias, leveduras, fungos. A liofilização tem como objetivo a retirada da água de suspensões microbianas por ação da sublimação (GHERNA; REDDY, 2007). Para isso, as amostras são submetidas ao congelamento, de forma que toda a água seja convertida em gelo. Em seguida,

as amostras são submetidas ao liofilizador, equipamento que fará a sublimação da água aplicando pressão reduzida e temperaturas amenas. Ao final, a água remanescente adsorvida na amostra é evaporada e o material é selado a vácuo sob gás inerte a fim de impedir a entrada de gases atmosféricos e ar úmido (ADAMS, COOK, WARD, 2015; GHERNA; REDDY, 2007). A utilização da liofilização como método de preservação pode garantir que micro-organismos permaneçam viáveis por até 30 anos. Os micro-organismos secos requerem espaço limitado de armazenamento e podem ser transportados por longas distâncias a temperatura ambiente. Entretanto, esse método pode causar um dano às células de micro-organismos denominado lioinjúria. Após o processo de retirada de toda água, as proteínas intracelulares que se ligavam ao hidrogênio da água compensam a perda dessa ligação por meio de interações proteína-proteína. Essas novas ligações entre as proteínas podem levar à sua desnaturação e perda de atividade, causando injúria da célula. Além disso, a liofilização é um processo caro e demorado, não tolerado por todos os tipos de células microbianas e que requer protocolos específicos para cada espécie individualmente (PAOLI, 2005).

3.5.5 Preservação de micro-organismos utilizando nanofibras poliméricas

As nanofibras poliméricas apresentam funcionalidade ajustável, elevada área superficial em relação ao volume e alta porosidade, características que as conferem poder adsorvente e encapsulante (DING; YU, 2014; LIU; WANG; ZHANG, 2017). Essas propriedades favorecem a potencial utilização de nanomateriais na área da preservação de micro-organismos e abre um campo inexplorado de aplicação. Neste caso, as células de micro-organismos podem ser incorporadas às nanofibras pelo processo de adsorção ou podem ser encapsuladas durante a produção das fibras, armazenando o micro-organismo e preservando sua viabilidade metabólica. Devido a sua capacidade adsorvente, as nanofibras podem adsorver nutrientes do meio de cultivo, além das células de micro-organismos, favorecendo a atividade metabólica das células adsorvidas ou encapsuladas. Fan et al. (2021) encapsularam células de levedura utilizando o polímero poliacrilamida solúvel em água e observou que as células se mantiveram ativas mesmo após 7 dias de armazenamento. Esse resultado foi possível pois, segundo Liu et al. (2020), os nutrientes do meio podem ser absorvidos pelos micro-organismos retidos em estruturas nanofibrosas. Em outro estudo, Sarioglu et al. (2017) encapsularam células de bactérias em nanofibras de álcool polivinílico (PVA) e nanofibras de óxido de polietileno (PEO) para utilização na biorremediação de corantes. Ao realizar o teste de armazenamento, os autores notaram que as células encapsuladas podem ser armazenadas por 3

meses a 4 °C e por 10 dias em condições secas. Entretanto, não há estudos na literatura que relatem que as nanofibras tenham sido utilizadas para o armazenamento de microalgas por meio da adsorção de células em sua matriz.

A utilização das nanofibras para a preservação de micro-organismos, pode reduzir a quantidade necessária de espaço para armazenamento, que muitas vezes são realizados em câmaras frias e consomem energia elétrica. Outra vantagem é que as nanofibras não requerem grandes volumes de meio de cultivo que é o principal custo dos cultivos microalgais, por exemplo. Dessa forma, menos energia seria gasta também para esterilizar os meios, diminuindo os custos de operação. Sendo assim, observando as inúmeras limitações que os métodos comumente utilizados apresentam, e as vantagens da utilização de nanofibras, fica evidente a importância do desenvolvimento de novos métodos de preservação de micro-organismos.

3.6 HISTÓRICO DA LINHA DE PESQUISA

O Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) pesquisa, desde 1996, diversas tecnologias para cultivos microalgais (COSTA et al., 2000; FREITAS et al., 2017; VAZ; COSTA; MORAIS, 2019). Em 2004, iniciou-se convênio do laboratório com a ELETROBRÁS (Centrais Elétricas Brasileiras S. A.) e a CGTEE (Companhia de geração Térmica de Energia Elétrica). Desse convênio, foi construída a Planta Piloto de Fixação de CO₂ por microalgas, de forma que diferentes cepas foram isoladas de lagoas próximas à CGTEE a fim de obter microalgas que possuísem alta tolerância aos gases emitidos (DUARTE et al. 2017; MORAIS; COSTA, 2007b; MORAIS et al., 2008). Duarte e Moraes (2012), por exemplo, identificaram microalgas do gênero *Chlorella* ao realizar isolamento de microalgas da lagoa de decantação de cinzas da Usina Termoeletrica Presidente Médici, situada na cidade de Candiota (RS). Este gênero microalgal vem sendo estudado até atualmente (BRAGA et al., 2019; ROSA; MORAIS; COSTA, 2019).

A linha de pesquisa relacionada ao desenvolvimento de nanofibras se iniciou em 2007 no LEB por meio de uma parceria com a universidade alemã Philipps University Marburg. Em 2014 iniciaram-se os estudos em parceria com o Laboratório de Microbiologia e Bioquímica (MIBI) para aplicação destas nanoestruturas na área de alimentos. Neste contexto, foram desenvolvidas nanofibras como indicadores de pH para embalagens ativas (MOREIRA et al., 2018) e inteligentes (MOREIRA et al., 2019), nanofibras com adição de compostos bioativos e *scaffolds* (FIGUEIRA et al., 2016; SCHMATZ et al., 2016), bem como nanofibras com atividades antimicrobianas (KUNTZLER et al., 2018a; KUNTZLER et al., 2018b).

Atualmente, estudos que combinam as linhas de pesquisa de Biotecnologia de Microalgas e Engenharia de Nanofibras do LEB e MIBI vêm sendo consolidadas, no qual Vaz, Costa e Moraes (2019a; 2019b) e Vaz et al. (2019) desenvolveram nanofibras adsorventes de CO₂ e as aplicaram no cultivo microalgal de *Chlorella fusca* visando aumentar o potencial de biofixação desse gás. Dessa forma, o trabalho do presente estudo contribui para esta nova e promissora tecnologia que visa diminuir a concentração de CO₂ na atmosfera e, com isso reduzir o fenômeno do efeito estufa.

CAPÍTULO III

4 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

O trabalho foi dividido em duas etapas, as quais originaram dois artigos:

ARTIGO 1 – RENOVAÇÃO DE NANOFIBRAS NO CULTIVO MICROALGAL PARA INCREMENTO NA FIXAÇÃO DE CO₂

ARTIGO 2 - TECNOLOGIA INOVADORA PARA PRESERVAÇÃO DE CÉLULAS MICROALGAIS UTILIZANDO NANOFIBRAS POLIMÉRICAS

Na primeira etapa foi avaliada a influência da renovação de nanofibras de PAN/DMF com 4% de NPFe₂O₃, produzidas pela técnica de *electrospinning*, no cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111 quanto a biofixação de CO₂. Para isso, foi realizado cultivo sem renovação de nanofibras e com a renovação nos 7º dia e 15º dia de cultivo, e apenas no 7º dia para fins de comparação. A concentração de nanofibras utilizada durante todo o experimento foi de 0,1 g L⁻¹. Dessa forma, no tempo de renovação as nanofibras foram retiradas do meio, e nova quantidade de nanofibras foram adicionadas. Nesta etapa foram avaliados parâmetros diários de concentração de biomassa e pH, e a cada 3 dias analisada a alcalinidade do meio. Após o tempo de cultivo, a biomassa foi submetida a secagem e a concentração de macromoléculas foi determinada. Na segunda etapa do trabalho, as células microalgais aderidas às nanofibras e retiradas no 30º dia de cultivo foram avaliadas quanto a capacidade de crescimento e desenvolvimento. Para isso, dois cultivos foram realizados, sendo que no primeiro cultivo as nanofibras com células aderidas foram transferidas para novo biorreator contendo meio de cultivo. No segundo cultivo foi realizado processo manual de remoção das células microalgais das nanofibras e posteriormente foi realizada a incorporação das células em biorreator contendo meio de cultivo. Esse estudo foi realizado com o intuito de avaliar o potencial das nanofibras atuarem como agente de preservação de microalgas, uma vez que os métodos de preservação relatados na literatura são ultrapassados e apresentam diversas limitações para aplicação.

ARTIGO 1
RENOVAÇÃO DE NANOFIBRAS NO CULTIVO MICROALGAL PARA
INCREMENTO NA FIXAÇÃO DE CO₂

COMITRE, A. A.; VAZ, B. S; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Renewal of nanofibers in *Chlorella fusca* microalgae cultivation to increase CO₂ fixation. **Bioresource Technology**, v. 321, p. 124452, 2021.

RENOVAÇÃO DE NANOFIBRAS NO CULTIVO MICROALGAL PARA INCREMENTO NA FIXAÇÃO DE CO₂

RESUMO

O objetivo deste estudo foi promover o incremento da fixação de CO₂ por meio da renovação de nanofibras poliméricas no cultivo da microalga *Chlorella fusca* LEB 111. Nanofibras com 10% (m v⁻¹) de poliacrilonitrila (PAN) / dimetilformamida (DMF) contendo 4% (m v⁻¹) de nanopartículas de óxido de ferro (NPsFe₂O₃) foram incorporadas nos fotobiorreatores. A renovação do nanomaterial foi realizada de forma única, apenas no 7º dia e apenas no 15º dia, bem como com renovação dupla, no 7º e 15º dia. A maior concentração de biomassa (2,53 g L⁻¹) e taxa de biofixação de CO₂ (141,5 mg L⁻¹ d⁻¹) foram obtidos no cultivo com dupla renovação, valores 21,6% e 23% superiores, respectivamente, em relação ao cultivo sem renovação de nanofibras. A renovação das nanofibras no cultivo de *C. fusca* LEB 111 demonstrou potencial para o incremento da biofixação de CO₂, o que pode contribuir para a redução do principal gás intensificador do efeito estufa.

Palavras-chave: Adsorção. Dióxido de carbono. *Electrospinning*. Mitigação. Nanotecnologia.

1 INTRODUÇÃO

A queima de combustíveis fósseis produz gases intensificadores do efeito estufa, sendo que o gás em maior concentração é o dióxido de carbono (CO₂) (CHEAH et al., 2016; IPCC, 2018). O Relatório Especial publicado pela Avaliação do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC, 2018) menciona que até 2040 será registrado o aumento de 1,5 °C na temperatura média global. Estudos preveem que essas mudanças no clima causem impacto no setor agrícola, de forma que afetem sua produtividade e coloque em risco a segurança alimentar (ADAMS et al., 1998; IPCC, 2018; WIEBE; ROBINSON; CATTANEO, 2019). Assim, tecnologias que objetivam a captura de CO₂ vêm sendo desenvolvidas, no qual se tem relatado a eficiência da fixação biológica (COSTA et al., 2019; NAYAK; KAREMORE; SEM, 2016; QI et al., 2016).

Apesar das plantas terrestres possuírem capacidade de fixação de CO₂ por intermédio da fotossíntese, a capacidade do mesmo processo pelas microalgas é cerca de 10 a 50 vezes maior. Neste sentido, estudos que visam a mitigação de carbono utilizando microalgas vem se destacando (BRAGA et al., 2019; COSTA; MORAIS, 2011; PATEL et al., 2017). A *Chlorella* é uma das microalgas mais estudadas para essa finalidade, devido a eficiência na utilização do CO₂ em relação a outros gêneros de microalgas (ZHAO; SU, 2014). Vaz et al.

(2019) avaliaram o aumento da biofixação de CO₂ no cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111, e os autores relataram que em virtude do gás não se dissolver completamente em meio líquido, ele permeia rapidamente para a atmosfera, dificultando assim sua assimilação pelas microalgas. Na busca de alternativas para aumentar o tempo de residência do gás no meio de cultivo, os autores desenvolveram nanofibras de poliacrilonitrila (PAN) contendo nanopartículas de óxido de ferro (NPsFe₂O₃) com potencial para adsorver fisicamente o CO₂ presente no meio líquido e, de forma pioneira, as incorporaram no cultivo microalgal. Com isso, os autores observaram incremento de 57% na biofixação de CO₂ pela microalga em relação ao cultivo sem nanofibras.

O polímero PAN tem se mostrado promissor para produção de nanofibras adsorventes de CO₂, devido sua estrutura molecular apresentar maior afinidade e atração com as moléculas do gás (HEO et al. 2019; LUOH; HAHN, 2006; VAZ; COSTA; MORAIS, 2019). Além disso, a adição das NPsFe₂O₃ causa a funcionalização dos compostos estruturais, melhorando a interação e difusão das moléculas de CO₂, bem como melhora a eficiência de adsorção desse gás em consequência do aumento da porosidade do material (LUOH; HAHN, 2006; SUNDARAMURTHY et al., 2014; VAZ; COSTA; MORAIS, 2019).

Vaz, Costa e Moraes (2019) estudaram a adição das nanoestruturas no cultivo entretanto, os autores relatam que o potencial de adsorção-dessorção do CO₂ nas nanofibras é de apenas três ciclos consecutivos. Além disso, após a inserção das nanofibras no meio de cultivo, além do gás CO₂, elas adsorvem biomassa microalgal e subprodutos do meio, o que provavelmente leva a saturação dos poros das fibras diminuindo a capacidade de adsorção do gás. Com base nisso, este trabalho visa avaliar a renovação das nanoestruturas no cultivo microalgal, de forma a substituir as nanofibras saturadas do cultivo por novas nanofibras, que fornecerão novamente o potencial total de adsorção e dessorção do gás. Esse processo dificultará ainda mais a exaustão do gás à atmosfera, aumentando o tempo de residência no meio líquido e sua consequente assimilação pelas microalgas. Nesse contexto, sabendo que não há relatos na literatura que referenciem o potencial da renovação de nanofibras adsorventes de CO₂ em cultivos microalgais, este estudo demonstra inovação na pesquisa científica. Assim, o objetivo deste estudo é promover o incremento da fixação de CO₂ por meio da renovação de nanofibras poliméricas no cultivo da microalga *Chlorella fusca* LEB 111.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PRODUÇÃO DAS NANOFIBRAS POLIMÉRICAS

O polímero poliacrilonitrila (PAN, PM 150.000 g mol^{-1}), as nanopartículas de óxido de ferro (NPsFe_2O_3 , aproximadamente 50 nm de diâmetro) e o solvente N, N-dimetilformamida (DMF) P.A, foram adquiridos pela Sigma-Aldrich® (EUA). As soluções poliméricas foram preparadas em concentrações de 10% (m v^{-1}) de PAN/ DMF e a mistura foi homogeneizada em agitador magnético (FISATOM 753A, Brasil) durante 16 h. Após, 4% (m v^{-1}) de NPsFe_2O_3 foram acrescentadas às soluções e homogeneizadas por 40 minutos em banho ultrassônico (QUIMISQ3350, Brasil). As nanofibras foram produzidas pela técnica de *electrospinning*, onde a solução polimérica foi injetada por capilar com diâmetro de 0,70 mm, potencial elétrico aplicado de 25 kV, distância entre o coletor e o capilar de 140 mm e taxa de alimentação da solução polimérica de 500 $\mu\text{L h}^{-1}$. O processo de produção das nanofibras foi conduzido a 20 - 23 °C, com umidade relativa entre 50-58% (VAZ; COSTA; MORAIS, 2019).

2.2 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO

A microalga cultivada foi a *Chlorella fusca* LEB 111, pertencente à coleção de cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG). O cultivo foi realizado em meio BG 11 (RIPPKA et al., 1979) modificado, onde o carbonato de sódio (Na_2CO_3) foi substituído por 15% (v v^{-1}) de CO_2 (White Martins, Brasil). Para isso, os fluxos de entrada de ar e CO_2 foram controlados a partir de medidores de vazão (Cole-Parmer, USA). Para realizar a adaptação da microalga ao CO_2 , o inóculo foi mantido em meio BG 11 sem carbono e foi realizada injeção de 2% de CO_2 (v v^{-1}) a cada 1 min h^{-1} na fase clara durante 7 dias (VAZ; COSTA; MORAIS, 2019).

2.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

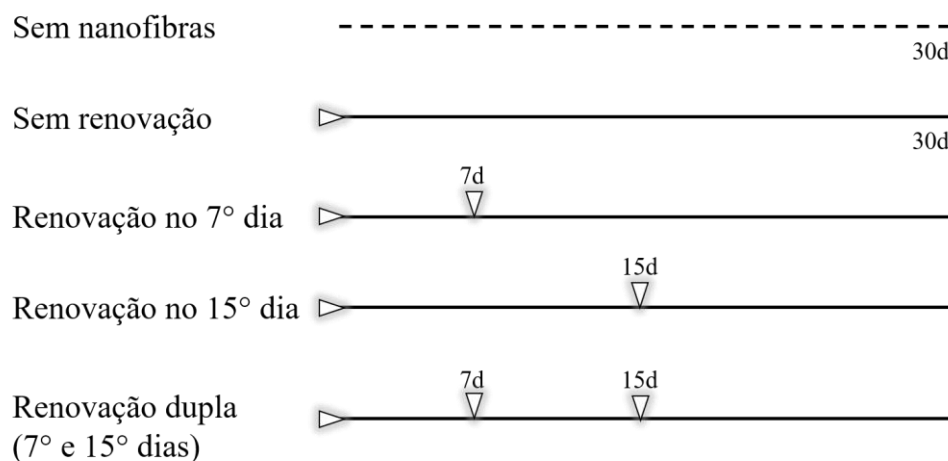
Os cultivos foram realizados em modo descontínuo em fotobiorreatores tubulares verticais (FBRTv) de 1,8 L, com volume útil de 1,5 L (VAZ; COSTA; MORAIS, 2020). O volume de trabalho foi mantido constante durante o cultivo através da adição de água estéril ao FBRTv de forma que as perdas por evaporação fossem compensadas. A concentração inicial de biomassa foi 0,2 g L^{-1} (MORAIS; COSTA, 2007). Os ensaios foram conduzidos em câmara termostatzada, com temperatura de 30 °C e fotoperíodo de 12h claro/ 12h escuro (REICHERT; REINEHER; COSTA, 2006) em duplicata com duração de 30 dias. A luminosidade de 41,6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40 W.

A aeração diária foi fornecida pela injeção de ar comprimido estéril, com vazão de 0,3 vvm ($\text{mL}_{\text{mistura}} \text{mL}_{\text{meio}}^{-1} \text{min}^{-1}$), utilizando aspersor de pedra porosa (VAZ et al., 2019). A alimentação com CO_2 foi realizada na fase clara do cultivo durante 1 min a cada 1 h (ROSA; MORAIS; COSTA, 2018). A fim de aumentar o tempo de residência do gás no meio líquido a aeração foi interrompida 1 min antes e 1 min após a adição do gás aos cultivos (ROSA et al., 2015).

2.3.1 Aplicação das nanofibras no cultivo microalgal

A concentração de nanofibras utilizadas no início dos experimentos, bem como a cada renovação foi $0,1 \text{ g L}^{-1}$ (VAZ et al., 2020). No processo de renovação, as nanofibras adicionadas inicialmente no cultivo foram removidas com auxílio de pinça e substituídas por nanofibras novas. Os ensaios foram conduzidos conforme a Figura 1, onde houve renovação de nanofibras no 7º dia de cultivo, no 15º dia, bem como foi realizada renovação dupla (7º dia e 15º dia). Cultivos controle sem renovação de nanofibras e sem nanofibras foram conduzidos paralelamente.

Figura 1 – Diagrama esquemáticos dos ensaios



2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

2.4.1 Concentração de biomassa, temperatura e luminosidade

A concentração de biomassa de *C. fusca* LEB 111 foi acompanhada diariamente mediante curva padrão que relaciona absorbância à biomassa seca por meio da leitura da

densidade óptica a 670 nm em espectrofotômetro digital (UVmini-1240, Shimadzu, Japão). A biomassa adsorvida nas nanoestruturas ($M_{\text{biomassa adsorvida}}$, g) foi determinada conforme Equação 1, onde $M_{\text{nanofibra + biomassa adsorvida}}$ é a massa da nanofibra (g) que foi retirada do cultivo e submetida à secagem à 50 °C durante 48 h e $M_{\text{nanofibra}}$ é a massa de nanofibras (0,1g) adicionada no 1º dia do cultivo.

$$M_{\text{biomassa adsorvida}} = M_{\text{nanofibra + biomassa adsorvida}} - M_{\text{nanofibra}} \quad (1)$$

2.4.2 Alcalinidade, pH, carbono inorgânico dissolvido

A alcalinidade foi determinada a cada 72 h por titulação potenciométrica (APHA, 1998) e o pH monitorado diariamente em pHmetro digital (Mettler Toledo FiveGo™, Suíça). Conforme demonstrado por Rosa et al. (2015), a concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID) foi calculada relacionando a alcalinidade e o pH com as equações de equilíbrio das espécies químicas descritas por Brune e Novak (1981) e Rubio et al. (1999).

2.5 RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL

Para a recuperação da biomassa microalgal foi realizado o processo de centrifugação (Hitachi CRHIMAC GIII, Tóquio, Japão) a 9000g por 20 min a 20 °C, com prévia retirada das nanofibras do meio de cultivo. A biomassa concentrada foi ressuspensa em água destilada e centrifugada novamente para que os sais presentes no meio de cultivo fossem removidos (ROSA et al., 2015). O procedimento de lavagem foi realizado duas vezes, e a biomassa final foi congelada a -80 °C, liofilizada por 48h e armazenada para posterior caracterização.

2.6 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL

A caracterização da biomassa foi realizada pela determinação de proteínas, carboidratos e lipídeos. A concentração de proteína foi avaliada pelo método colorimétrico (LOWRY et al., 1951) utilizando curva padrão de albumina, para isso, as amostras foram submetidas a tratamento térmico e alcalino a fim de solubilizar as proteínas insolúveis. A concentração de carboidratos foi determinada através de curva padrão de glicose pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Para determinação da concentração lipídica foi utilizado

o método colorimétrico demonstrado por Marsh e Weinstein (1966), baseado na curva padrão de tripalmitina.

2.7 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO

A partir da concentração de biomassa determinada ao longo dos cultivos foram obtidos os valores de concentração de biomassa final (X_{final} , mg L^{-1}), produtividade volumétrica final (P_{final} , $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, d^{-1}) e o tempo de geração de biomassa (t_g , d). A X_{final} dos ensaios foi calculada mediante o somatório da concentração de biomassa determinada por densidade óptica no 30º dia do cultivo com a quantidade de biomassa retida nas nanofibras (Equação 1). A produtividade volumétrica final foi calculada conforme Equação 2, onde X_t é a concentração de biomassa (mg L^{-1}) no tempo t (d) e X_0 é a concentração de biomassa (mg L^{-1}) no tempo t_0 (d). A velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, d^{-1}) foi obtida pela regressão linear da fase de logarítmica de crescimento que relaciona o perfil semi-logarítmico da concentração de biomassa ($\ln x$) com o tempo (d). O tempo de geração de biomassa (t_g , d) foi calculado pela Equação 3.

$$P_{\text{total}} = \frac{X_t - X_0}{t - t_0} \quad (2)$$

$$t_g = \frac{\ln(2)}{\mu_{\text{máx}}} \quad (3)$$

2.8 BIOFIXAÇÃO E EFICIÊNCIA DE UTILIZAÇÃO DE CO_2

A taxa de biofixação final de CO_2 (TB, $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) foi calculada de acordo com a Equação 4 (TOLEDO-CERVANTES et al., 2013), que utiliza valores de P_{final} ($\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), massas molares do CO_2 (M_{CO_2} , g mol^{-1}) e do carbono (Mc, g mol^{-1}), e considera que a biomassa microalgal contém 50% de carbono (m m^{-1}) (CHANG; TSAI; LI, 2015).

$$TB = \frac{P_{\text{final}} X_{\text{cbm}} M_{\text{CO}_2}}{Mc} \quad (4)$$

A eficiência de utilização do CO_2 (E, % m m^{-1}) foi calculada conforme Equação 5 onde TB ($\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) é a taxa de biofixação final de CO_2 , V_{trabalho} (L) é o volume de trabalho

dos FBRTv e $\dot{m}$ (mg d^{-1}) a taxa mássica diária de alimentação de CO_2 (ZHANG; KURANO; MIYACHI, 2002).

$$E = \frac{TB V_{\text{trabalho}}}{\dot{m} 100} \quad (5)$$

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios foram realizados em duplicata, e as médias de todos os resultados foram comparadas através da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com 95% de confiança.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

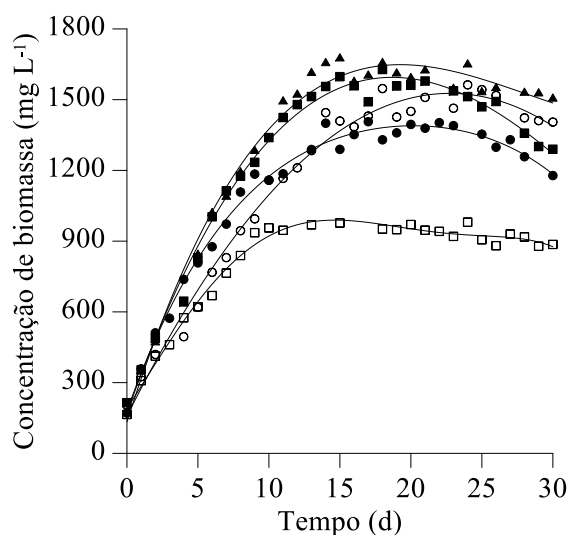
As curvas de crescimento dos cultivos (Figura 2) não apresentaram fase *lag* em nenhuma das condições estudadas, isto porque a microalga *Chlorella fusca* LEB 111 foi pré-adaptada a baixas concentrações de CO_2 (2%, v v^{-1}). O mesmo resultado foi observado por Vaz et al. (2019) e Moraes, Santos e Costa (2019), que cultivaram *C. fusca* LEB 111 com injeção de CO_2 , após prévia adaptação da microalga a baixas concentrações de CO_2 , e também observaram ausência da fase *lag* pela microalga. Além da prévia adaptação dos inóculos ao CO_2 , Duarte, Fanka e Costa (2016) explicam que essa cepa de microalga foi isolada de lagoa próxima a uma usina termoeletrica, local com elevada emissão de CO_2 . Os autores relataram que esse fato contribui para o aumento da resistência da cepa a condição adversa, fazendo com que não apresente fase de adaptação mesmo quando exposta à altas concentrações de CO_2 .

Os ensaios sem nanofibras e com a renovação das nanoestruturas no 15º dia, apresentaram crescimento exponencial entre o 1º e o 4º dia e fase estacionária aproximadamente a partir do 10º dia de cultivo (Figura 2, Tabela 1). Os ensaios sem renovação de nanofibras, com renovação no 7º dia, bem como com renovação dupla (no 7º e 15º dias), apresentaram crescimento exponencial do 1º ao 6º dia de cultivo. As curvas que representaram maior concentração de biomassa correspondem aos ensaios com renovação dupla das nanoestruturas, e com renovação apenas no 7º dia. Além disso, com exceção do ensaio com renovação no 15º dia, após a fase exponencial, os ensaios que continham nanofibras apresentaram crescimento linear até o 15º dia de cultivo.

Os cultivos com renovação no 7º dia e com renovação dupla apresentaram perfil de crescimento semelhante até aproximadamente o 15º dia de cultivo. Após esse período, as curvas

começaram a diferir de modo que no 17º dia de cultivo, o ensaio com renovação apenas no 7º dia apresentou tendência acentuada à fase de declínio. Comparado ao ensaio com renovação no 7º dia, os cultivos que contaram com renovação dupla das nanoestruturas e apenas no 15º dia apresentaram fase estacionária com tendência ao declínio próximo ao 23º dia.

Figura 2 – *Chlorella fusca* LEB 111 cultivada com injeção de 15% de CO₂ com e sem renovação de nanofibras 10% PAN contendo 4% NPsFe₂O₃: (●) sem nanofibras, (○) sem renovação, (■) renovação no 7º dia, (□) renovação no 15º dia e (▲) renovação dupla.



A concentração celular final (X_{final}) dos cultivos contendo nanofibras foram maiores e diferiram estatisticamente do cultivo sem nanofibras ($p < 0,05$) (Tabela 1). Esse fato indica que a inserção das nanofibras nos cultivos favoreceu o crescimento da microalga, devido a maior disponibilidade do CO₂ no meio, conforme já relatado por Vaz, Costa e Moraes (2019) e Vaz, Costa e Moraes (2020). Além disso, o ensaio com renovação dupla das nanofibras apresentou maiores resultados de X_{final} e produtividade final (P_{final}). O X_{final} do cultivo com renovação dupla foi aproximadamente 86%, 21,6% e 22,2% superior aos cultivos sem nanofibras, sem renovação de nanofibras e com renovação no 7º dia, respectivamente. Isso indica que a renovação dupla das nanoestruturas apresentou efeito positivo para maior produção de biomassa. A X_{final} obtida no ensaio com renovação dupla foi 25,9% superior ao obtido por Rosa, Moraes e Costa (2019), que cultivaram *C. fusca* LEB 111 com o absorvente químico de CO₂ monoetanolamina (MEA). O MEA adicionado aos cultivos pode contribuir para o aumento de intermediários reativos

como o carbamato. Segundo Ruffod et al. (2012), essa molécula pode ser tóxica as células de microalgas e causar inibição de seu crescimento.

Tabela 1 – Concentração celular final (X_{final} , g L⁻¹), produtividade final (P_{final} , mg L⁻¹ d⁻¹), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, d⁻¹), tempo de geração (t_g , d), taxa de biofixação de CO₂ (TB, mg L⁻¹ d⁻¹) e eficiência de utilização do CO₂ (E, %) obtidos nos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 com injeção de 15% de CO₂ com e sem renovação de nanofibras 10% PAN contendo 4% NPsFe₂O₃.

Parâmetro	Sem nanofibras	Sem renovação de nanofibras	Renovação 7º dia	Renovação 15º dia	Renovação Dupla
X_{final}	1,36 ^d ± 0,02	2,08 ^b ± 0,08	2,07 ^b ± 0,03	1,67 ^c ± 0,05	2,53 ^a ± 0,09
P_{final}	39,7 ^d ± 1,2	62,4 ^b ± 2,7	62,0 ^b ± 0,9	50,1 ^c ± 2,0	77,2 ^a ± 3,0
$\mu_{\text{máx}}$	0,23 ^a +< 0,01	0,16 ^c ± 0,01	0,19 ^b < 0,01	0,20 ^b ± 0,01	0,21 ^{ab} ± 0,01
t_g	3,04 ^a ± 0,03	4,40 ^b ± 0,30	3,64 ^a ± 0,06	3,50 ^a ± 0,12	3,37 ^a ± 0,15
Δt (d)*	1 - 4	1 - 6	1 - 6	1 - 4	1 - 6
R^{2**}	0,96 +< 0,01	0,96 ± 0,03	0,98 +< 0,01	0,97 ± 0,02	0,98 +< 0,01
TB	72,7 ^d ± 2,2	114,4 ^b ± 5,0	113,5 ^b ± 1,6	91,9 ^c ± 3,7	141,5 ^a ± 5,4
E	7,6 ^d ± 0,2	12,0 ^b ± 0,5	11,9 ^b ± 0,2	9,6 ^c ± 0,4	14,8 ^a ± 0,6

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 .

Vaz, Costa e Moraes (2019) observaram que a capacidade de adsorção máxima de CO₂ pelas nanofibras compostas de 10% PAN/DMF com 4% de NPsFe₂O₃ foi de 1146,3 mg g⁻¹. Os autores observaram que essas nanofibras apresentam potencial de adsorção-dessorção de três ciclos consecutivos, uma vez que no quarto ciclo foi observada redução de 81,8% na capacidade de adsorção do gás. Esse fato pode explicar os maiores valores de X_{final} e P_{final} obtidos neste estudo, quando realizada a renovação dupla das nanofibras. Isso porque ao realizar a renovação das nanoestruturas, as nanofibras saturadas com biomassa microalgal são retiradas do meio e é adicionada nova quantidade de nanofibras com todo potencial de adsorção disponível.

Dessa maneira, maior concentração de CO₂ pode ser adsorvida e dessorvida pelas nanoestruturas, fazendo com que aumente a permanência do gás no fotobiorreator e,

consequentemente, incrementa a assimilação do carbono pelas microalgas. Isso foi confirmado pelos resultados de X_{final} e P_{final} obtidos no presente estudo que foram, respectivamente, 104% e 16% maiores em comparação aos obtidos por Vaz, Costa e Moraes (2020) ao cultivarem *C. fusca* LEB 111 em fotobiorreatores tubulares por 15 dias com injeção de 15% de CO_2 e com a mesma concentração de nanofibras. O mesmo resultado não foi observado quando a renovação ocorreu apenas no 7° ou no 15° dia, assim como no cultivo sem renovação das nanofibras. Nos ensaios sem renovação de nanofibras e com renovação no 7° dia isso pode ser atribuído à disposição das nanofibras no fotobiorreator, que após terem adsorvido grande quantidade de biomassa impediram as trocas gasosas do cultivo com a atmosfera. Esse processo pode ter levado ao aumento do oxigênio no cultivo que, conforme Chisti (2007), pode inibir a fotossíntese, bem como gerar espécies reativas que causam danos à estrutura celular. Por outro lado, o X_{final} no cultivo com renovação no 15° dia indica que o processo não foi eficiente. Isso pode ter ocorrido devido ao esgotamento dos nutrientes do meio, uma vez que o cultivo atingiu a concentração máxima de biomassa no 10° dia de ensaio.

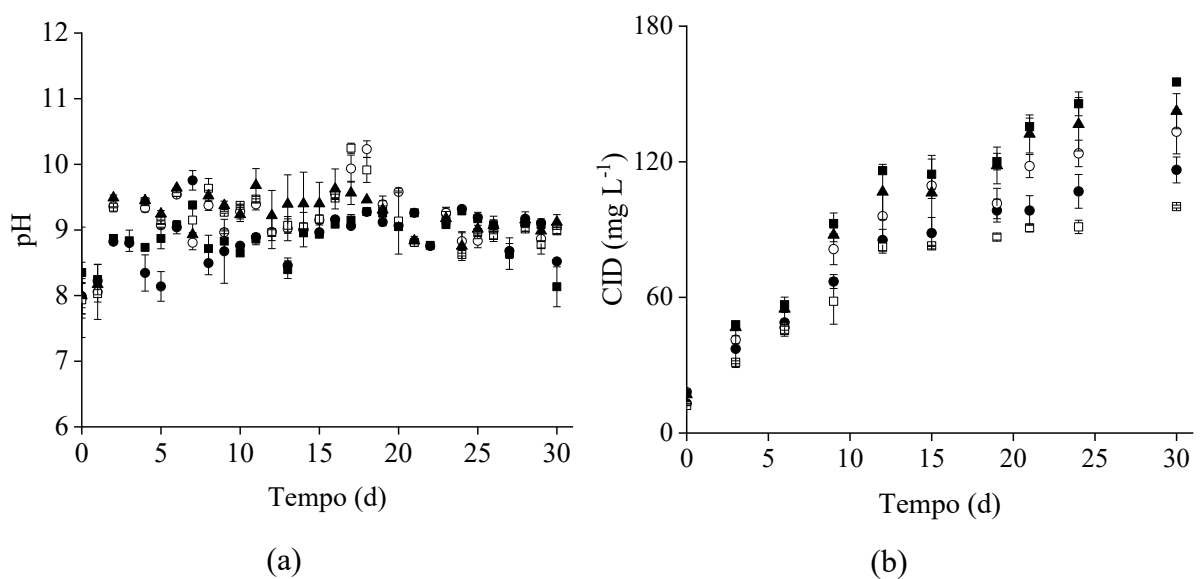
Os valores de velocidade específica máxima ($\mu_{\text{máx}}$) e tempo de geração (t_g) (Tabela 1) demonstram que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os cultivos com renovação de nanofibras. No entanto, o valor de $\mu_{\text{máx}}$ do cultivo sem renovação de nanofibras foi menor comparado aos obtidos pelos cultivos com renovação das nanoestruturas. Assim como o t_g do cultivo sem renovação de nanofibras, que foi o maior valor obtido entre os ensaios. Contudo, conforme relatado por Vaz, Costa e Moraes (2020), deve ser considerado que nos ensaios com adição de nanofibras os valores de concentração de biomassa são subestimados. Isso se deve, porque parte da biomassa microalgal é adsorvida nas nanofibras, diminuindo sua detecção por densidade óptica do cultivo. Neste caso, é correto afirmar que os valores de $\mu_{\text{máx}}$ e t_g dos cultivos com nanofibras também são valores subestimados, uma vez que para sua obtenção são utilizados dados de concentração de biomassa.

Os resultados da taxa de biofixação de CO_2 (TB) (Tabela 1) também confirmam a hipótese do aumento da utilização do carbono pelas microalgas, conforme ocorre a renovação das nanofibras no meio de cultivo. Os maiores valores de TB foram observados no cultivo com renovação dupla indicando que possivelmente haveria maior disponibilidade de CO_2 nesse cultivo. Em conformidade com a biofixação de CO_2 , a eficiência da utilização do carbono (E) também foi maior nesse cultivo. Nessa condição houve aumento do E em 94,7%, comparando com o cultivo sem nanofibras e, 23% em comparação com o cultivo sem renovação. Vaz et al. (2019), realizaram o primeiro estudo relacionado ao incremento da mitigação do CO_2 adicionando nanofibras nos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111. Os autores observaram que

ao adicionar as nanofibras 10% PAN/ DMF com 4% de NPsFe_2O_3 no cultivo microalgal foi possível obter TB de $89,2 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Dessa forma, a renovação dupla de nanofibras no presente estudo incrementou em 58,6% a fixação de CO_2 em relação a TB obtida no estudo de Vaz et al. (2019).

O pH médio dos cultivos foi 8,9, 9,1, 9,1, 8,9 e 9,2 para os ensaios sem nanofibras, sem renovação de nanofibras, renovação no 7º dia, renovação no 15º dia e renovação dupla, respectivamente (Figura 3a). Rippka et al. (1979) relataram que o pH do meio BG 11 estéril se encontra em torno de 7,4, entretanto, ao longo do cultivo é esperado aumento do pH em função da produção de biomassa. Esse fato ocorre devido a liberação de íons hidroxila no meio pelo processo fotossintético das microalgas (GROBBELAAR, 2013). Para a maior parte das microalgas, o pH ideal situa-se entre 7,0 e 9,0 (BARSANTI; GUALTIERI, 2014), sendo que as do gênero *Chlorella* apresentam pH ótimo em torno de 7,0 e 8,0 (DUARTE et al., 2017). Entretanto, o pH mais alcalino é favorável para o cultivo de *C. fusca* LEB 111, devido essa cepa ter sido isolada de lagoa de estabilização de cinzas de usina termelétrica, que possuem pH em torno de 9,0 (DUARTE et al., 2017).

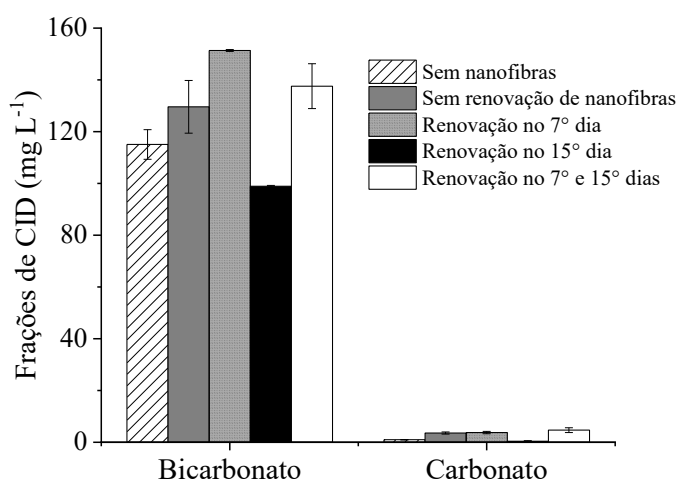
Figura 3 – Perfis de pH (a) e carbono inorgânico dissolvido (CID) (b) em função do tempo nos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 com injeção de 15% de CO_2 com e sem renovação de nanofibras 10% PAN contendo 4% NPsFe_2O_3 onde: (●) sem nanofibras, (○) sem renovação, (■) renovação no 7º dia, (□) renovação no 15º dia e (▲) renovação dupla.



Observou-se aumento gradual da concentração de CID no decorrer do tempo de cultivo (Figura 3b), sendo que o maior valor foi obtido no cultivo com renovação apenas no 7º dia ($155,6 \text{ mg L}^{-1}$). A concentração de CID obtida nos cultivos não diferiram significativamente ($p>0,05$) entre si. Esse resultado já era esperado, pois conforme relatado por Vaz et al. (2019), ao utilizar nanofibras no cultivo de microalgas, o CO_2 é adsorvido na nanoestrutura havendo menos gás dissolvido no meio líquido. Os autores explicam que ao adicionar nanofibras no meio de cultivo há maior disponibilidade do CO_2 , devido a adsorção do gás e sua gradual dessorção.

A espécie de carbono predominante em todos os cultivos foi o bicarbonato (HCO_3^-) (Figura 4). Conforme demonstrado por Andrade et al. (2015), o acúmulo de carbono inorgânico no cultivo é afetado pelo pH do meio de cultivo. Conforme o pH, as espécies de carbono são distribuídas em CO_2 , HCO_3^- e carbonato (CO_3^{2-}) (MANGAN et al., 2016). Segundo Grobbelaar (2013), quando o pH dos cultivos encontra-se na faixa entre 6,5 a 10,5, a espécie predominante é o HCO_3^- . No presente estudo foi observado pH entre 8,8 e 9,2, faixa esta que segundo Grobbelaar (2013) favorece a conversão das moléculas de carbono em HCO_3^- , que é a molécula que as células microalgais tem preferência para assimilação.

Figura 4 – Frações das espécies de carbono (HCO_3^- e CO_3^{2-}) nos cultivos de *Chlorella fusca* LEB 111 com injeção de 15% de CO_2 com e sem renovação de nanofibras 10% PAN contendo 4% NPsFe_2O_3 .



O crescimento, metabolismo e a composição bioquímica da biomassa de microalgas podem sofrer alterações quando esse micro-organismo é cultivado com injeção de CO_2 no meio (KASSIM; MENG, 2017). A concentração máxima de proteínas (Tabela 2), foi obtida no ensaio sem renovação e com renovação dupla ($p < 0,5$). Os maiores resultados de carboidratos e lipídeos também foram obtidos no cultivo com renovação dupla ($p < 0,5$). O aumento na

concentração de carboidratos deste ensaio com relação ao sem nanofibras foi de 30,2%, enquanto comparando com o ensaio sem renovação, o aumento foi de 37,8%. Isso pode ter ocorrido devido ao efeito da adsorção e dessorção do CO₂ das nanofibras com renovação dupla, que gerou aumento do CID. Segundo Chen et al. (2013), o acúmulo de carboidratos na biomassa microalgal pode ser causado principalmente pela adequada suplementação de CO₂.

Vaz et al. (2020) relataram que as nanofibras poliméricas podem causar estresse no cultivo microalgal, pois elas contribuem para o acréscimo acentuado de CID do meio. O estresse causado pela incorporação das nanofibras ao cultivo pode ter ocorrido no presente estudo, uma vez que a maior concentração de carboidratos foi observada no ensaio com renovação dupla das nanoestruturas, o que pode ter intensificado esse efeito. Dessa maneira, o aumento do CID pode ter elevado a disponibilidade de carbono para assimilação pelas microalgas, fazendo com que a enzima rubisco atuasse sobre o CO₂ a partir do metabolismo de fixação de carbono, transformando-o em precursores de carboidratos acumulados (HO et al., 2011; ZHAO; SU, 2014).

Tabela 2 – Composição da biomassa de *Chlorella fusca* LEB 111 cultivada com injeção de 15% de CO₂ com e sem renovação de nanofibras 10% PAN contendo 4% NPsFe₂O₃.

Experimento	Proteínas (%, p p⁻¹)	Carboidratos (%, p p⁻¹)	Lipídios (%, p p⁻¹)
Sem nanofibras	36,6 ^a ± 0,4	25,2 ^b ± 0,2	23,1 ^c ± 1,4
Sem renovação de nanofibras	33,3 ^b ± 0,0	23,8 ^b ± 0,1	29,6 ^b ± 1,7
Renovação no 7º dia	29,0 ^c ± 1,2	26,5 ^b ± 0,8	26,5 ^{bc} ± 1,7
Renovação no 15º dia	31,1 ^{bc} ± 0,9	27,3 ^b ± 1,8	30,6 ^b ± 0,6
Renovação dupla	38,3 ^a ± 0,9	32,8 ^a ± 1,3	37,6 ^a ± 2,6

Letras sobrescritas iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferiram estatisticamente ao nível de 95% de confiança (p>0,05)

O aumento na concentração lipídica da biomassa microalgal pode estar associada a fatores como a limitação de nutrientes, adição de fatores externos aos cultivos, ou então a estresses ambientais como luz, temperatura, pH e concentração de CO₂ (MORAES et al., 2016; PARK; NGUYEN; JIN, 2019). No presente estudo, a elevada concentração de carbono dissolvido no cultivo causado pela incorporação e renovação das nanofibras, pode ter contribuído para o aumento da concentração lipídica da biomassa microalgal. Isso se deve, pois todos os ensaios que continham nanofibras, em comparação àquele sem nanofibras,

apresentaram aumento na concentração lipídica na biomassa. A maior concentração de lipídeos foi obtida no ensaio com renovação dupla, de forma que seu valor foi 62,8% superior ao cultivo sem nanofibras e 27% superior ao cultivo sem renovação das nanoestruturas. Vaz, Morais e Costa (2020) também observaram aumento na produção de lipídeos no cultivo com nanofibras (41,9% p p⁻¹) em relação ao cultivo sem nanofibras (31,0% p p⁻¹). Os autores realizaram cultivo de *C. fusca* LEB 111 com nanofibras em condições *outdoor*, o que pode ter acentuado ainda mais a concentração lipídica devido as condições de temperatura e luminosidade serem mais elevadas.

Dessa forma, a utilização de nanofibras poliméricas no cultivo microalgal com renovação dupla, favorece a produção de biomassa de alto valor agregado devido sua composição em carboidratos, lipídeos e proteínas. Os carboidratos presentes na biomassa podem ser utilizados para conversão em bioetanol e as proteínas podem ser empregadas como fonte de aminoácidos. Os lipídeos podem ser extraídos da biomassa para produção de biodiesel, e a biomassa residual pode ser transformada em biogás por meio da digestão anaeróbica. Segundo Hempel, Petrick e Behrendt (2012), a produtividade lipídica das microalgas pode ser até 300 vezes superior que culturas tradicionais, devido possuírem alta taxa de crescimento. Sendo assim, além de reduzirem as emissões de enxofre em relação aos combustíveis fósseis, os biocombustíveis são alternativa promissora por serem ecológicos, renováveis e não apresentarem toxicidade (DEMIRBAS et al., 2016).

4 CONCLUSÃO

A renovação das nanoestruturas no cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111 mostrou-se promissora para incrementar a fixação de CO₂. O ensaio com dupla renovação das nanofibras apresentou maiores resultados de concentração celular final (2,53 g L⁻¹) e taxa de biofixação de CO₂ (141,5 mg L⁻¹ d⁻¹). A eficiência de utilização do carbono neste ensaio aumentou cerca de 94,7% em relação ao ensaio sem nanofibras e 23% em relação ao ensaio sem renovação. Além disso, no cultivo com dupla renovação das nanoestruturas houve aumento da concentração de carboidratos (32,8% p p⁻¹) e lipídios (37,6% p p⁻¹) na biomassa microalgal.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. M.; HURD, B. H.; LENHART, S.; LEARY, N. Effects of global climate change on agriculture: an interpretative review. **Climate research**, v. 11, n. 1, p. 19-30, 1998.

ANDRADE, G. A.; PAGANO, D. J.; GUZMÁN, J. L.; BERENGUEL, M.; FERNÁNDEZ, I.; ACIÉN, F. G. Distributed sliding mode control of pH in tubular photobioreactors. **IEEE Transactions on Control Systems Technology**, v. 24, n. 4, p. 1160-1173, 2015.

APHA, **American Public Health Association, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20th ed. APHA-AWWAWPCF, Washington, 1998.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17. ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2000. v. 2. cap 30, met. 968.11, p. 4.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. CRC press, 2014.

BRAGA, V. S.; MOREIRA, J. B.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Potential of *Chlorella fusca* LEB 111 cultivated with thermoelectric fly ashes, carbon dioxide and reduced supply of nitrogen to produce macromolecules. **Bioresource technology**, v. 227, p. 55-61, 2019.

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.

CHANG, Y.; TSAI, W.; LI, M. Characterization of activated carbon prepared from *chlorella*-based algal residue. **Bioresource technology**, v. 184, p. 344-348, 2015.

CHEAH, W. Y.; LING, T. C.; JUAN, J. C.; 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.

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

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

COSTA, J. A. V.; FREITAS, B. C. B.; LISBOA, C. R.; SANTOS, T. D.; FRAGA BRUSCH, L. R.; MORAIS, M. G. Microalgal biorefinery from CO₂ and the effects under the Blue Economy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 99, p. 58-65, 2019.

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.

DEMIRBAS, A.; BAFAIL, A.; AHMAD, W.; SHEIKH, M. Biodiesel production from non-edible plant oils. **Energy Exploration & Exploitation**, v. 34, n. 2, p. 290-318, 2016.

DING, B.; YU, J. **Electrospun nanofibers for energy and environmental applications**. Springer: Berlin Heidelberg, 2014.

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

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

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

GROBBELAAR, J. U. Inorganic Algal Nutrition. In: **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition**. [s.l.] wiley, 2013. p. 123–133

HEMPEL, N.; PETRICK, I.; BEHRENDT, F. Biomass productivity and productivity of fatty acids and amino acids of microalgae strains as key characteristics of suitability for biodiesel production. **Journal of applied phycology**, v. 24, n. 6, p. 1407-1418, 2012.

HEO, Y. J.; ZHANG, Y.; RHEE, K. Y.; PARK, S. J. Synthesis of PAN/PVDF nanofiber composites-based carbon adsorbents for CO₂ capture. **Composites Part B: Engineering**, v. 156, p. 95-99, 2019.

HO, S. H.; CHEN, C. Y.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems - a review. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 2, p. 189-198, 2011.

IPCC, 2018: Summary for Policymakers. In: **Global Warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty** [Masson-Delmotte, V., P. Zhai, H.-O. Pörtner, D. Roberts, J. Skea, P.R. Shukla, A. Pirani, W. Moufouma-Okia, C. Péan, R. Pidcock, S. Connors, J.B.R. Matthews, Y. Chen, X. Zhou, M.I. Gomis, E. Lonnoy, T. Maycock, M. Tignor, and T. Waterfield (eds.)]. In Press

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, p. 1121-1129, 2017.

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

LUOH, R.; HAHN, H. T. Electrospun nanocomposite fiber mats as gas sensors. **Composites science and technology**, v. 66, n. 14, p. 2436-2441, 2006.

MANGAN, N. M.; FLAMHOLZ, A.; HOOD, R. D.; MILO, R.; SAVAGE, D. F. pH determines the energetic efficiency of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 36, p. E5354-E5362, 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.

MORAES, L.; DA ROSA, G. M.; CARDIAS, B. B.; DOS 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.

MORAES, L.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A. V. Bioprocess strategies for enhancing biomolecules productivity in *Chlorella fusca* LEB 111 using CO₂ a carbon source. **Biotechnology Progress**, p. e2909, 2019.

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.

NAYAK, M.; KAREMORE, A.; SEN, R. Performance evaluation of microalgae for concomitant wastewater bioremediation, CO₂ biofixation and lipid biosynthesis for biodiesel application. **Algal Research**, v. 16, p. 216-223, 2016.

PARK, S.; NGUYEN, T. H. T.; JIN, E. S. Improving lipid production by strain development in microalgae: strategies, challenges and perspectives. **Bioresource technology**, v. 292, p. 121953, 2019.

PATEL, A.; GAMI, B.; PATEL, P.; PATEL, B. Microalgae: Antiquity to era of integrated technology. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, p. 535-547, 2017.

QI, F.; PEI, H.; HU, W.; MU, R.; ZHANG, S. Characterization of a microalgal mutant for CO₂ biofixation and biofuel production. **Energy conversion and management**, v. 122, p. 344-349, 2016.

REICHERT, C. C.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 1, p. 23-28, 2006.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1-61, 1979.

ROSA, G. M.; MORAES, L.; CARDIAS, B. B.; 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.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Fed-batch cultivation with CO₂ and monoethanolamine: Influence on *Chlorella fusca* LEB 111 cultivation, carbon biofixation and biomolecules production. **Bioresource technology**, v. 273, p. 627-633, 2019.

ROSA, G. M.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Green alga cultivation with monoethanolamine: Evaluation of CO₂ fixation and macromolecule production. **Bioresource technology**, v. 261, p. 206-212, 2018.

RUBIO, F. C.; FERNANDÉZ, F. G. A.; PÉREZ, J. A. S.; CAMACHO, F. G.; GRIMA, E. M. Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture. **Biotechnology Bioengineering**, v. 62, p. 71-86, 1999.

SUNDARAMURTHY, J.; LI, N.; KUMAR, P. S.; RAMAKRISHNA, S. Perspective of electrospun nanofibers in energy and environment. **Biofuel Research Journal**, v. 1, n. 2, p. 44-54, 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.

VAZ, B. S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Innovative nanofiber technology to improve carbon dioxide biofixation in microalgae cultivation. **Bioresource technology**, v. 273, p. 592-598, 2019.

VAZ, B. S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Physical and biological fixation of CO₂ with polymeric nanofibers in outdoor cultivations of *Chlorella fusca* LEB 111. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 151, p. 1332 – 1339, 2020.

VAZ, B. S.; MASTRANTONIO, D. J. S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Green alga cultivation with nanofibers as physical adsorbents of carbon dioxide: Evaluation of gas biofixation and macromolecule production. **Bioresource technology**, v. 287, p. 121406, 2019.

WIEBE, K.; ROBINSON, S.; CATTANEO, A. Climate Change, Agriculture and Food Security: Impacts and the Potential for Adaptation and Mitigation. In: **Sustainable Food and Agriculture**. Academic Press, 2019. p. 55-74.

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

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

ARTIGO 2

TECNOLOGIA INOVADORA PARA PRESERVAÇÃO DE CÉLULAS MICROALGAIS UTILIZANDO NANOFIBRAS POLIMÉRICAS

TECNOLOGIA INOVADORA PARA PRESERVAÇÃO DE CÉLULAS MICROALGAIS UTILIZANDO NANOFIBRAS POLIMÉRICAS

RESUMO

O objetivo desse estudo foi estabelecer um novo potencial tecnológico para preservação de células microalgais por meio de nanofibras poliméricas. Nanofibras com 10% (m v⁻¹) de poliacrilonitrila (PAN) / dimetilformamida (DMF) contendo 4% (m v⁻¹) de nanopartículas de óxido de ferro (NPsFe₂O₃) foram adicionadas à fotobiorreatores para a incorporação de células em sua estrutura durante 30 dias. Após esse período, as nanofibras foram retiradas do cultivo e as células microalgais foram utilizadas como inóculo em novos cultivos de duas formas, removidas e incorporadas nas nanofibras. As concentrações finais de biomassa dos cultivos foram 1,10 g L⁻¹ ao final do 5º dia de cultivo com utilização de células removidas, e 1,67 g L⁻¹ ao final do 30º dia de cultivo com utilização de nanofibras com células incorporadas. Os resultados de concentração celular confirmaram que mesmo após estarem incorporadas nas nanoestruturas, as células não apresentaram injúria e foram capazes de crescer e se desenvolver em novo cultivo. Dessa forma, as nanofibras apresentam potencial para serem utilizadas como método inovador e pioneiro na preservação de células microalgais.

Palavras-chave: Método de conservação. Preservação de microalgas. Estoque de micro-organismo. Nanomaterial.

1 INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos promissores para as indústrias biotecnológica devido aos compostos que acumulam em suas células e por apresentarem vantagens frente as plantas terrestres tais como alta taxa de crescimento, elevada produtividade celular e a capacidade de crescer em água salobra, águas residuais e terras não agrícolas (HEMANTKUMAR; RAHIMBHAI, 2019; MATOS, 2017). Além disso, a alta conversão de CO₂ por meio da fotossíntese é uma das características que confere destaque às microalgas em relação a mitigação desse gás (MATOS, 2017).

A preservação de coleções de culturas de micro-organismos, incluindo as microalgas é uma prática comum em microbiologia, pois cataloga a diversidade e evolução microbiana possibilitando o conhecimento das características das espécies mais profundamente. Dessa forma, as cepas de micro-organismos armazenadas podem ser utilizadas para fins de pesquisa, investigações epidemiológicas, nas indústrias e também na educação (PETTI; CARROL, 2011; PAOLI, 2005). Os métodos mais comumente utilizados para a realização da manutenção de cepas microalgais são de subcultura ou criopreservação (ANDRADE;

COLOZZI FILHO, 2014). Entretanto, ambos métodos apresentam desvantagens quando utilizados para preservação de culturas a longo prazo.

O método de subcultura requer a utilização de amplo espaço para armazenamento das culturas e utiliza grande quantidade de meios de crescimento, que muitas vezes são específicos para cada espécie. A preservação por método de subcultura exige que os profissionais sejam treinados e qualificados, aumentando os custos com mão de obra. Além disso, o método de subcultura apresenta alto risco de contaminação cruzada das espécies durante seu manuseio, bem como a mutação genética é frequentemente observada nas cepas subcultivadas durante longos períodos de tempo. Dessa forma, o método de subcultura é um método oneroso que não garante a integridade genética dos micro-organismos a longo prazo (CHELLAPPAN et al., 2020; RASTOLL et al., 2013).

A criopreservação é um dos métodos que mais vem ganhando destaque para preservação de micro-organismos, entretanto esse método ainda vem sendo estudado para viabilizar sua aplicação em diferentes espécies conforme suas características (CHELLAPPAN et al., 2020; LOURENÇO, 2020; RASTOLL et al., 2013). Outro problema enfrentado pelo método de criopreservação é a necessidade da utilização de agentes crioprotetores para proteger as células dos efeitos do congelamento. Além disso, a criopreservação requer investimentos em equipamentos especializados e duplicados para aumentar a confiabilidade caso ocorra algum tipo de descongelamento. Dessa forma, a criopreservação é um método extremamente oneroso, muitas vezes inacessível e requer pessoal treinado para manuseio das culturas (ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014; COSTA et al., 2009; LOURENÇO, 2020). As publicações científicas que abordam outros protocolos tecnológicos para a preservação de micro-organismos são escassas (SOLA et al., 2012). Neste contexto, é necessário que tecnologias inovadoras focadas na preservação de células microalgais sejam desenvolvidas.

Em estudo com o objetivo de incrementar o potencial de mitigação de CO₂ pela *C. fusca* LEB 111, Comitre et al. (2021) realizaram a renovação de nanofibras poliméricas no cultivo. Neste estudo, os autores observaram que a renovação das nanofibras intensificou a permanência do CO₂ no meio líquido e, consequentemente, aumentou a disponibilidade do gás para consumo pelas microalgas, resultando em aumento de 23% na biofixação de CO₂ por esses micro-organismos. Neste contexto, as nanofibras poliméricas adsorventes de CO₂ demonstram eficiência no cultivo microalgal para incremento no potencial de biofixação desse gás. Entretanto, quando inseridas no cultivo, as nanofibras além de adsorverem o gás CO₂, também sofrem a incorporação de biomassa proveniente do meio (COMITRE et al. 2021). Até o momento, o comportamento das células microalgais que são incorporadas às nanofibras ao

longo dos cultivos não havia sido estudado. A possibilidade dessas células incorporadas às nanofibras apresentarem crescimento quando levadas a uma nova condição experimental abre um novo campo de aplicação desses nanomateriais para preservação de células. Neste caso, as nanofibras poliméricas funcionariam como uma espécie de armazenamento das microalgas, preservando sua viabilidade metabólica.

As nanofibras poliméricas possuem elevado poder adsorvente e encapsulante de materiais e compostos do meio devido sua funcionalidade ajustável, elevada área superficial em relação ao volume e alta porosidade (DING; YU, 2014; LIU; WANG; ZHANG, 2017). Essas características conferem às nanoestruturas potencial utilização para preservação de células microalgais. As nanofibras podem atuar na proteção física das células microalgais contra agentes de frio e calor.

Os nutrientes do meio de cultivo também podem se aderir às nanoestruturas favorecendo a manutenção metabólica das células. O contato com a água presente no meio de cultivo também pode fornecer proteção contra o ressecamento. Além disso, reforçando a ideia do potencial dessa tecnologia pioneira, as nanofibras apresentam diversas vantagens quando comparado aos métodos comumente utilizados na preservação de microalgas. Dentre essas vantagens, destaca-se a necessidade de menor espaço de armazenamento, não utilização de grandes volumes de meio de cultivo, menor consumo de energia diminuindo os custos de operação e o potencial de produção em grande escala. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi estabelecer um novo potencial tecnológico para preservação de células microalgais através de nanofibras poliméricas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PRODUÇÃO DE NANOFIBRAS POLIMÉRICAS POR *ELECTROSPINNING*

O solvente N,N-dimetilformamida (DMF) P.A., o polímero poliacrilonitrila (PAN, PM 150.000 g mol^{-1}), e as nanopartículas de óxido de ferro (NPsFe_2O_3 , aproximadamente 50 nm de diâmetro) foram adquiridos pela Sigma-Aldrich® (EUA). As nanofibras foram produzidas pela técnica de *electrospinning*. Para isso, as soluções poliméricas de 10% (m v^{-1}) de PAN/DMF foram homogeneizadas em agitador magnético (FISATOM 753A, Brasil) durante 16 h. Após esse processo, 4% (m v^{-1}) de NPsFe_2O_3 foram acrescentadas às soluções e homogeneizadas por 40 minutos em banho ultrassônico (QUIMISQ3350, Brasil). No *electrospinning* foi realizada a injeção da solução polimérica por capilar com diâmetro de 0,70 mm, potencial elétrico aplicado de 25 kV, distância entre o coletor e o capilar de 140 mm e taxa

de alimentação da solução polimérica de $500 \mu\text{L h}^{-1}$. O processo de produção das nanofibras foi conduzido a $20\text{--}23^\circ\text{C}$, com umidade relativa entre 50-58% (VAZ; COSTA; MORAIS, 2019).

2.2 MICRO-ORGANISMO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

2.2.1 Incorporação das células de *Chlorella* às nanofibras

Para incorporar as células às nanofibras poliméricas foi realizado prévio cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111 em fotobiorreator tubular vertical (FBRTv) de 1,8 L, com volume útil de 1,5 L (VAZ; COSTA; MORAIS, 2020) contendo $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de nanofibras poliméricas (COMITRE et al., 2021). O cultivo foi realizado em meio BG 11 (RIPPKA et al., 1979) modificado, onde o carbonato de sódio (Na_2CO_3) foi substituído por 15% (v v^{-1}) de dióxido de carbono (CO_2) (White Martins, Brasil) (VAZ; COSTA; MORAIS, 2019). As perdas de água por evaporação durante o cultivo foram compensadas por meio da adição de água estéril aos FBRTv.

O cultivo foi realizado em câmara termostatzada, com temperatura de 30°C e fotoperíodo de 12 h claro/ 12h escuro (REICHERT; REINEHER; COSTA, 2006) com duração de 30 dias. A luminosidade de $41,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ foi fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40 W. Ar comprimido estéril forneceu aeração diária para os cultivos, na vazão de $0,3 \text{ vvm}$ ($\text{mL}_{\text{mistura}} \text{ mL}_{\text{meio}}^{-1} \text{ min}^{-1}$) utilizando aspersor de pedra porosa (VAZ et al., 2019). A alimentação com CO_2 aconteceu na fase clara do cultivo durante 1 min a cada 1 h (ROSA; MORAIS; COSTA, 2018). A fim de aumentar o tempo de residência do gás no meio líquido a aeração foi interrompida 1 min antes e 1 min após a adição do gás aos cultivos (ROSA et al., 2015). Medidores de vazão controlaram os fluxos de entrada de ar e CO_2 (Cole-Parmer, USA).

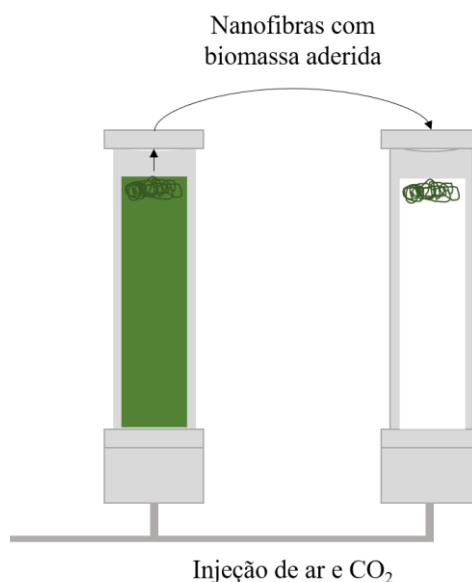
Após os 30d de cultivo, as nanofibras com as células aderidas foram transferidas para outro fotobiorreator visando avaliar o potencial de crescimento do micro-organismo. Paralelamente foi conduzido outro teste, em que as células microalgais foram removidas manualmente das nanofibras e transferidas para o reator com meio de cultivo.

2.2.2 Potencial de crescimento das células de *Chlorella* aderidas às nanofibras

As nanofibras contendo células de *Chlorella* aderidas foram removidas do meio e transferidas para FBRTv com 500 mL de volume útil de trabalho, contendo apenas meio nutriente sem adição de Na_2CO_3 (Figura 1). O FBRTv com meio nutriente e as nanofibras com

células aderidas foram submetidas a novo cultivo em ambiente termostatzado a 30°C durante 30 dias. Fotoperíodos de 12h claro/ 12h escuro foram utilizados, onde lâmpadas de 40W forneceram luminosidade de $41,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A agitação diária utilizando aspersor de pedra porosa que permitia a passagem de ar comprimido estéril na vazão de 0,3 vvm ($\text{mL}_{\text{mistura}} \text{mL}_{\text{meio}}^{-1} \text{min}^{-1}$) foi realizada (VAZ et al., 2019). O gás CO_2 foi injetado durante a fase clara do cultivo por 1 min a cada 1 h (ROSA; MORAIS; COSTA, 2018). A aeração do cultivo foi interrompida 1 min antes e 1 min após a injeção do gás CO_2 , a fim de aumentar o tempo de residência do gás no meio líquido (ROSA et al., 2015). Medidores de vazão controlaram os fluxos de entrada de ar e CO_2 (Cole-Parmer, USA).

Figura 1 – Cultivo com células de *Chlorella fusca* LEB 111 aderida às nanofibras

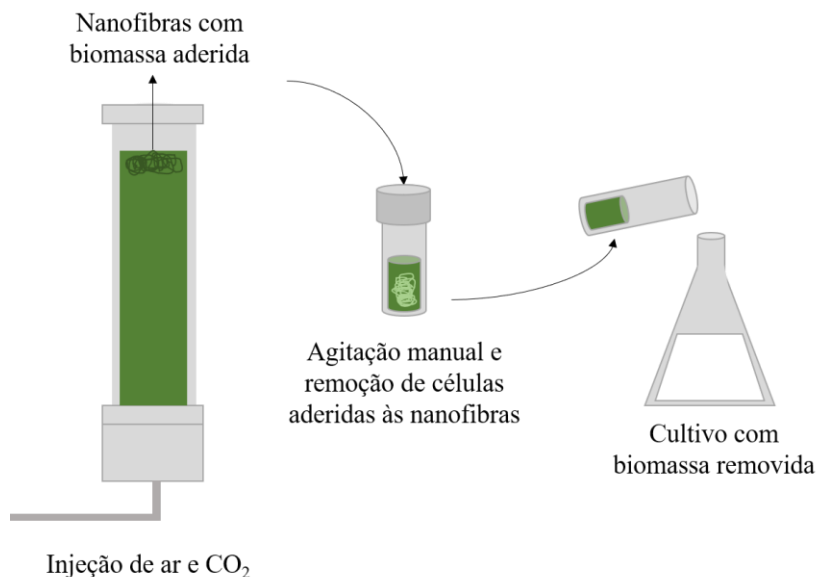


2.2.3 Remoção das células de *Chlorella* das nanofibras e potencial de crescimento

As nanofibras foram removidas do meio de cultivo e colocadas em recipiente estéril com 500 mL de água destilada e após foram agitadas manualmente para remoção das células aderidas nas nanoestruturas. A agitação manual foi escolhida como método a fim de evitar injúria e agressividade às células microalgais. A determinação da concentração das células removidas foi realizada em espectrofotômetro digital (UVmini-1240, Shimadzu, Japão). As células foram transferidas para erlenmeyer de 500 mL de volume útil, contendo meio de cultivo BG 11 (Figura 2). O cultivo foi realizado em câmara termostatzada, com temperatura de 30 °C e fotoperíodo de 12 h claro/12h escuro (REICHERT; REINEHER; COSTA, 2006) sem

agitação, com duração de 5 dias. A luminosidade de $41,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi fornecida por lâmpadas fluorescentes de 40 W.

Figura 2 – Cultivo com células de *Chlorella Fusca* LEB 111 removidas das nanofibras



2.3 CONCENTRAÇÃO CELULAR E pH

A curva padrão que relaciona absorbância e biomassa seca foi determinada para obter a concentração celular de *C. fusca* LEB 111. A concentração celular dos cultivos foi avaliada diariamente por meio da leitura da densidade óptica a 670 nm em espectrofotômetro digital (UVmini-1240, Shimadzu, Japão). A concentração de biomassa aderida às nanofibras ao final dos cultivos foi avaliada após secagem do nanomaterial em estufa à 50°C durante 48 h. Após a secagem, a massa de biomassa contida nas nanofibras ($M_{\text{biomassa adsorvida}}$, g) foi calculada conforme Equação 1 (COMITRE et al., 2021) onde $M_{\text{nanofibra + biomassa adsorvida}}$ é a massa da nanofibra com biomassa aderida (g) após retirada do cultivo e $M_{\text{nanofibra}}$ é a massa de nanofibra (0,1 g) adicionada no 1º dia do cultivo.

$$M_{\text{biomassa adsorvida}} = M_{\text{nanofibra + biomassa adsorvida}} - M_{\text{nanofibra}} \quad (1)$$

O pH do cultivo com células aderidas foi monitorado diariamente utilizando pHmetro digital (Mettler Toledo FiveGo™, Suíça).

2.4 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO

A partir da concentração celular, obtida no cultivo com células microalgais aderidas às nanofibras, foram determinados os parâmetros velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, d^{-1}) e o tempo de geração de biomassa (t_g , d). A velocidade específica de crescimento foi obtida pela regressão linear da fase de logarítmica de crescimento que relaciona o perfil semi-logarítmico da concentração celular ($\ln x$) com o tempo (d). O tempo de geração de biomassa (t_g , d) foi calculado pela Equação 2.

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

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

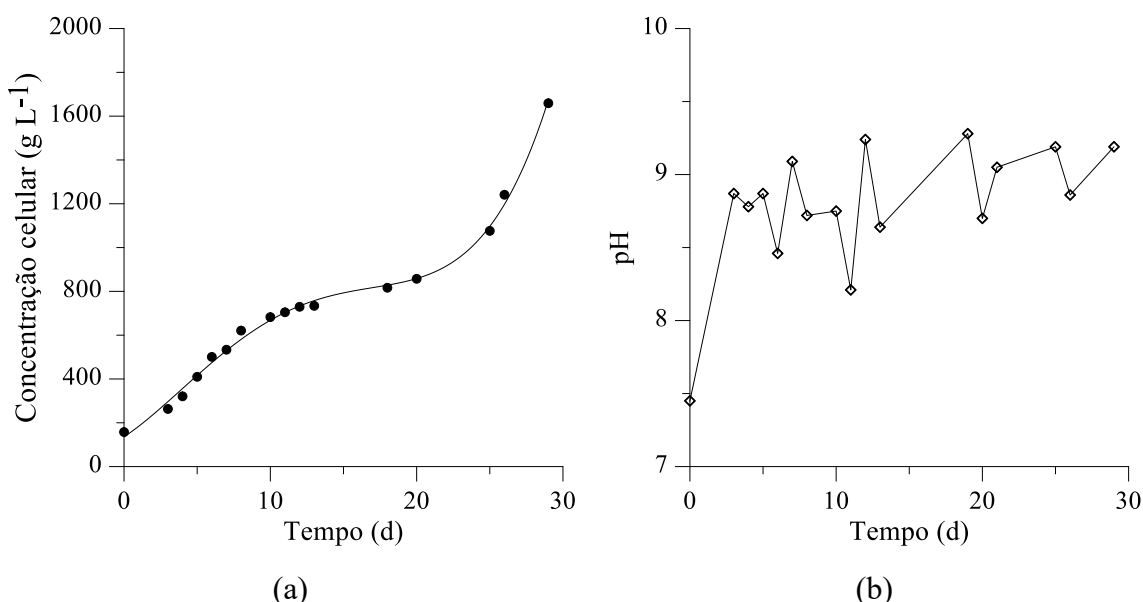
O cultivo realizado com a adição das nanofibras com biomassa aderida apresentou crescimento sem ocorrência da fase lag de crescimento (Figura 3a). Ao transferir as nanofibras com biomassa aderida para outro reator contendo meio nutriente, e submetê-las ao processo de agitação através da aeração do cultivo, parte das células saíram das nanoestruturas e migraram para o meio. Esse processo foi suficiente para favorecer o crescimento e desenvolvimento da microalga, sem que fosse necessária etapa prévia de agitação e dessorção das células microalgais. O fato de o cultivo não ter apresentado fase lag de crescimento indica que as células microalgais não sofreram injúria quando transferidas de reator. Isso pode ter ocorrido possivelmente devido as fibras do nanomaterial que estavam ao redor das células terem proporcionado proteção física contra agentes externos.

Nesse experimento, a concentração celular final livre no meio, sem considerar a biomassa aderida nas nanofibras, foi $1,7 \text{ g L}^{-1}$ e a concentração de células aderida à nanofibra ao final do experimento foi $0,31 \text{ g L}^{-1}$. A velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) da biomassa adsorvida nas nanofibras, bem como o tempo de geração (t_g) foram respectivamente $0,18 \text{ d}^{-1}$ e 3,93 d. Comitre et al. (2021), ao cultivarem *Chlorella fusca* LEB 111 com nanofibras poliméricas de PAN/DMF e injeção de 15% de CO_2 obtiveram valores de $\mu_{\text{máx}}$ de $0,16 \text{ d}^{-1}$ e t_g de 4,40 d.

Segundo Doran (1995), o crescimento do micro-organismo pode ser desacelerado devido à falta de nutrientes. Vale et al. (2020), mencionam em seu estudo que a quantidade e qualidade dos nutrientes fornecidos durante o cultivo é um dos principais fatores que afetam o crescimento das microalgas. Entretanto, o $\mu_{\text{máx}}$ e t_g do presente estudo apresentaram-se

semelhantes ao obtido no estudo de Comitre et al. (2021). Esse resultado indica que as células microalgais aderidas às nanofibras não tiveram seu consumo de nutrientes prejudicados.

Figura 3 – (a) Concentração celular e (b) pH do cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111 inicialmente aderida em nanofibras poliméricas



Além disso, é possível que os próprios nutrientes do meio tenham se aderido às nanofibras, juntamente com as células microalgais, facilitando sua disponibilização e consumo. A possível aderência dos nutrientes às nanofibras ressalta a potencialidade das nanofibras como método de preservação de microalgas caso sejam armazenadas por maiores períodos de tempo. Nesse caso, as células conseguiriam manter sua condição metabólica enquanto armazenadas conforme a disponibilidade de nutrientes aderidos às nanofibras, enquanto o líquido também poderia funcionar como uma espécie de umidificante, evitando a desidratação.

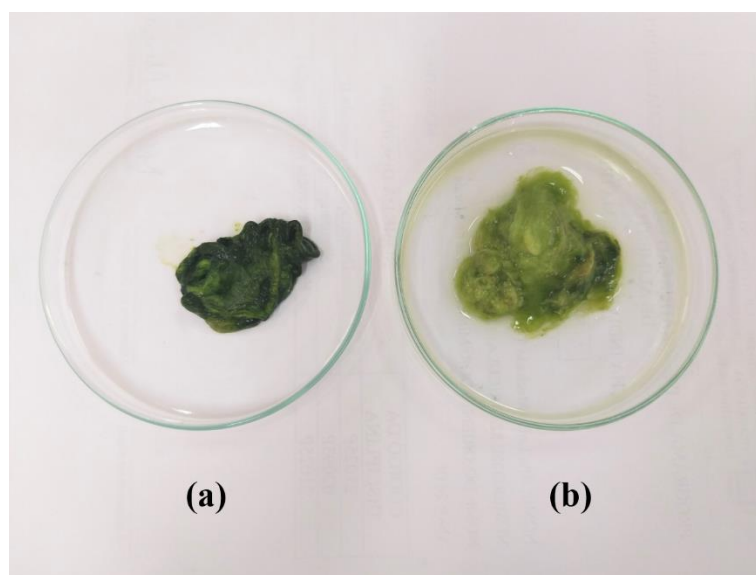
Os cultivos microalgais normalmente apresentam pH em torno de 7,0 e 9,0 (BARSANTI; GUALTIERI, 2014). O pH do cultivo com biomassa adsorvida nas nanofibras (Figura 3b) se manteve entre 8,2 e 9,3, que é a faixa de pH ideal para a *Chlorella fusca* LEB 111, devido a cepa ter sido isolada da lagoa de estabilização de cinzas de usina termelétrica, que possui pH em torno de 9,0 (DUARTE et al., 2017). Apesar do meio de cultivo BG 11 estéril apresentar pH em torno de 7,4 (RIPPKA et al., 1979), o pH durante o cultivo aumentou devido a produção de íons hidroxila que são liberados no processo fotossintético das microalgas (GROBBELAAR, 2013).

A concentração de células removidas das nanofibras pelo processo manual de agitação foi 0,63 g L⁻¹. Na Figura 4a é possível observar o aspecto das nanofibras após a retirada

do cultivo microalgal, de forma que toda a coloração esverdeada são as células da microalga que se fixaram durante os 30 dias de cultivo em FBRTv. A Figura 4b apresenta as nanofibras após o procedimento de agitação manual para remoção das células microalgais. Ao comparar as imagens é possível observar que a coloração das nanofibras da Figura 4b está mais clara do que na Figura 4a. Isso significa que, embora as nanofibras ainda possuam células de microalgas aderidas (Figura 4b), o processo de agitação manual foi satisfatório para a remoção de células em quantidade suficiente para iniciar novo cultivo.

Esse fato é comprovado pela elevada concentração celular obtida após processo de remoção. Após a remoção das nanofibras e inserção das células em novo cultivo, a microalga apresentou crescimento e a maior concentração de células foi $1,1 \text{ g L}^{-1}$. No 5º dia de cultivo, o comportamento de crescimento das microalgas se mostrava estável. Sendo assim, é provável que caso o cultivo tivesse sido mantido por maior mais tempo, as microalgas provavelmente teriam continuado a crescer e se desenvolver. Entretanto, é importante ressaltar que as microalgas foram capazes de crescer mesmo após vigoroso processo de agitação, que poderia ter causado injúria nas células e prejudicado seu desenvolvimento.

Figura 4 – Nanofibras obtidas durante 30 dias no cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111 onde (a) nanofibras com células aderidas e (b) nanofibras após remoção manual das células microalgais



Materiais nanoporosos apresentam alta rugosidade e porosidade o que as confere elevada capacidade de adsorção de compostos (GARGIULO et al., 2014). As nanofibras são materiais que possuem elevada área superficial em relação ao volume e alta porosidade (DING,

YU, 2014). Essas características podem ter proporcionado a aderência das células microalgais em seu interior e favorecido a chegada de nutrientes do meio para que permanecessem integras e viáveis.

Liu et al. (2020) confirmam em seu estudo que os micro-organismos retidos em estruturas nanofibrosas conseguem absorver nutrientes do meio, mantendo sua atividade metabólica. Sendo assim, conforme observado no presente estudo, as nanofibras poliméricas não causaram interrupção no crescimento e produção de biomassa microalgal quando aderida em sua nanoestrutura e inseridas posteriormente em novo cultivo. Fan et al. (2021) encapsularam leveduras em nanofibras de poliacrilamida solúvel em água (PAAm) e observaram que as leveduras imobilizadas pelo encapsulamento permaneceram ativas mesmo após 7 dias de armazenamento revelando que as nanofibras não apresentaram efeito negativo sobre a atividade das células. Sarioglu et al. (2017) encapsularam células bacterianas em nanofibras de álcool polivinílico (PVA) e nanofibras de óxido de polietileno (PEO) e observaram que as bactérias se mantiveram ativas e viáveis para aplicação no processo de biorremediação. Os resultados de viabilidade celular obtidos nos estudos de Fan et al. (2021) e Sarioglu et al. (2017) reforçam a teoria de que as células microalgais podem continuar viáveis após sua incorporação na estrutura das nanofibras.

No presente estudo, para as células microalgais aderidas, as nanofibras funcionaram conforme a premissa da preservação de culturas e manteve o organismo vivo (ABREU; TUTUNJI, 2008). Essa informação indica que as nanofibras poliméricas apresentam potencial como tecnologia inovadora para atuar na preservação de células microalgais.

Ao considerar as técnicas convencionais de preservação de micro-organismos, as nanofibras apresentam vantagens como utilização de pequena quantidade de meios de cultivo, já que os nutrientes virão junto com as células durante o processo de fixação celular nas nanofibras. Outra vantagem a ser considerada é o menor contato das células com o calor ou frio devido a proteção proporcionada pelas nanofibras poliméricas às células aderidas entre os interstícios do nanomaterial. A hidrofobicidade do polímero utilizado no cultivo faz com que o líquido remanescente também permaneça entre os interstícios das nanoestruturas e não seja absorvido por ela, contribuindo para o contato entre célula e nutriente e mantendo-a úmida evitando seu ressecamento. A utilização de nanofibras para preservação de microalgas resultará em menor consumo de energia e reatores aerados acarretando na redução de custos. Além disso, esse método requer menos espaço de armazenamento, uma vez que seria possível controlar a quantidade de células aderidas nas nanoestruturas de acordo com o tempo de permanência das

nanofibras no processo de adesão das células. Sendo assim, o presente estudo demonstra o potencial das nanofibras para serem utilizadas como agentes de preservação de microalgas.

4 CONCLUSÃO

As células de *Chlorella fusca* LEB 111 aderidas e removidas nas nanofibras poliméricas foram capazes de crescer e se desenvolver nos cultivos. A concentração final do cultivo com biomassa aderida foi 1,67 g L⁻¹ ao final do 30º dia de cultivo e os parâmetros de crescimento se mostraram igualitários aos obtidos em cultivo tradicional, onde o inóculo é adicionado ao meio, sem a reutilização da nanofibra. O processo de remoção das células microalgais das nanofibras se demonstrou eficiente, não injuriou e não prejudicou seu posterior desenvolvimento em novo cultivo. Esses resultados demonstram que as nanofibras apresentam potencial para serem utilizadas como método inovador de conservação das células microalgais, uma vez que mantém sua integridade, protege fisicamente as células, não contribui para variação do material genético e reduz o custo de operação frente aos métodos convencionais.

5 REFERÊNCIAS

- ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. *Universitas: Ciências da Saúde*, Brasília, v.2 n.2, p. 236-25, 2008.
- ANDRADE, D. S., COLOZZI FILHO, A. Microalgas de águas continentais - Produção de Biomassa e Coprodutos. Londrina, p. 21-24, IAPAR, 2014.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. CRC press, 2014.
- CHELLAPPAN, Ajan et al. Long-term Preservation of Micro-algal Stock for Fish Hatcheries. **Aquaculture Reports**, v. 17, p. 100329, 2020.
- COMITRE, Allana Arcos et al. Renewal of nanofibers in *Chlorella fusca* microalgae cultivation to increase CO₂ fixation. **Bioresource Technology**, v. 321, p. 124452, 2021.
- COSTA, E. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M.; MELO, V. S. P.; ARAUJO, S. A. C.; ROLIM, B. N. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. *Ciência Animal*, v. 19, n. 2, p.111-122, Goiânia, 2009.
- DE PAOLI, Paolo. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **FEMS microbiology reviews**, v. 29, n. 5, p. 897-910, 2005.

DING, B.; YU, J. Electrospun Nanofibers for Energy and Environmental Applications. [S.I.]. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2014.

DORAN, Pauline M. **Bioprocess engineering principles**. Elsevier, 1995.

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

FAN, Yansheng et al. Yeast encapsulation in nanofiber via electrospinning: Shape transformation, cell activity and immobilized efficiency. *Materials Science and Engineering: C*, v. 120, p. 111747, 2021.

GARGIULO, Nicola; PEPE, Francesco; CAPUTO, Domenico. CO₂ adsorption by functionalized nanoporous materials: a review. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 14, n. 2, p. 1811-1822, 2014.

GROBBELAAR, J. U. Inorganic Algal Nutrition. In: **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition**. [s.l.] wiley, 2013. p. 123–133

HEMANTKUMAR, J. N., RAHIMBHAI, M. I. Microalgae and Its Use in Nutraceuticals and Food Supplements, In: *Microalgae - From Physiology to Application*, Intech Open, 19 th ed., p.1-11, 2019.

LIU, Y. HAO, M.; CHEN, Z.; LIU, L.; LIU, Y.; YANG, W.; RAMAKRISHNA, S. A review on recent advances in application of electrospun nanofiber materials as biosensors. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, v. 13, p. 174–189, 2020.

LIU, Y.; WANG, S.; ZHANG, R. Composite poly(lactic acid)/chitosan nanofibrous scaffolds for cardiac tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 103, p. 1130–1137, 2017.

LOURENÇO, S. O. Microalgae culture collections, strain maintenance, and propagation. In: **Handbook of Microalgae-Based Processes and Products**. Academic Press, 2020. p. 49-84.

MATOS, Ângelo Paggi. The impact of microalgae in food science and technology. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 94, n. 11, p. 1333-1350, 2017.

PETTI, Cathy A.; CARROLL, Karen C. Procedures for the Storage of Microorganisms. In: **Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition**. American Society of Microbiology, 2011. p. 124-131.

RASTOLL, M. J. et al. The development of a cryopreservation method suitable for a large cyanobacteria collection. **Journal of applied phycology**, v. 25, n. 5, p. 1483-1493, 2013.

REICHERT, C. C.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 1, p. 23-28, 2006.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1-61, 1979.

ROSA, G. M.; MORAES, L.; CARDIAS, B. B.; 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.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Green alga cultivation with monoethanolamine: Evaluation of CO₂ fixation and macromolecule production. **Bioresource technology**, v. 261, p. 206-212, 2018.

SARIOGLU, Omer Faruk et al. Bacteria encapsulated electrospun nanofibrous webs for remediation of methylene blue dye in water. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 152, p. 245-251, 2017.

SOLA, M. C.; OLIVEIRA, A. P. DE.; FEISTEL, J. C.; REZENDE, C. S. M. Maintenance of microorganisms: Storage and viability. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia*, v.8, n.14, 2012.

VALE, M. A.; FERREIRA, A.; PIRES, J. C.; GONÇALVES, A. L. CO₂ capture using microalgae. In: *Advances in Carbon Capture*. Woodhead Publishing, p. 381-405, 2020.

VAZ, B. S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Innovative nanofiber technology to improve carbon dioxide biofixation in microalgae cultivation. **Bioresource technology**, v. 273, p. 592-598, 2019.

VAZ, B. S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Physical and biological fixation of CO₂ with polymeric nanofibers in outdoor cultivations of *Chlorella fusca* LEB 111. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 151, p. 1332 – 1339, 2020.

VAZ, B. S.; MASTRANTONIO, D. J. S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Green alga cultivation with nanofibers as physical adsorbents of carbon dioxide: Evaluation of gas biofixation and macromolecule production. **Bioresource technology**, v. 287, p. 121406, 2019.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÃO GERAL

A renovação de nanofibras poliméricas de PAN/ DMF com 4% de NPsFe₂O₃ no cultivo de *Chlorella fusca* LEB 111 foi realizada e demonstrou potencial no incremento da fixação de CO₂. Os maiores valores de concentração de biomassa final, e taxa de biofixação de CO₂ foram obtidos no cultivo com dupla renovação, sendo 2,53 g L⁻¹ e 141,5 mg L⁻¹ d⁻¹, respectivamente. A renovação dupla das nanofibras foi capaz de manter o carbono por período maior de tempo no meio líquido, de forma que seu consumo aumentou cerca de 94,7% em relação ao ensaio sem nanofibras. Além disso, conforme a disponibilidade de carbono aumentou no meio, a composição microalgal sofreu alteração em termos de carboidratos e lipídeos. A concentração desses biocompostos também foi superior no cultivo com dupla renovação das nanofibras, sendo 32,8% p p⁻¹ de carboidratos e 37,6% p p⁻¹ de lipídeos.

Para o estudo da utilização de nanofibras na preservação de células microalgais, as nanofibras foram retiradas do meio ao 30º dia de cultivo, e as células microalgais aderidas e removidas das nanofibras foram capazes de crescer e se desenvolver quando inseridas em novo cultivo. O processo de agitação manual das nanofibras para remoção das células microalgais de sua estrutura foi eficiente pois removeu cerca de 0,6 g L⁻¹ de células adsorvidas nas nanoestruturas. As nanofibras ofereceram proteção física as células microalgais, não causando injúria durante sua remoção. A concentração final do cultivo com biomassa aderida foi 1,67 g L⁻¹ ao final do 30º dia de cultivo. Os parâmetros de crescimento do cultivo com células aderidas às nanofibras não apresentaram diferença quando comparados aos obtidos em cultivo tradicional, que não contou com a utilização de nanofibras. Esses resultados demonstraram o potencial das nanofibras para serem utilizadas como método de preservação de células, uma vez que manteve a integridade das células microalgais e favoreceram seu posterior crescimento e desenvolvimento em novo cultivo.

O estudo da preservação de microalgas utilizando nanofibras abre uma linha de pesquisa pioneira de desenvolvimento, que pode fornecer diversos benefícios e vantagens quando comparada aos métodos já utilizados de armazenamento. Além disso, os resultados obtidos no estudo de biofixação de CO₂, reforçam a importância de investimento em pesquisa envolvendo microalgas com relação a mitigação do gás emitido na atmosfera. A utilização de CO₂ pelas microalgas pode ajudar a amenizar a consequência que esse gás apresenta no efeito estufa e com isso, agir contra a mudança global do clima, um dos objetivos fixados pela Organização das Nações Unidas (ONU).

CAPÍTULO V

CONSIDERAÇÕES FINAIS

RESÍDUOS GERADOS E DESTINO

Todos os resíduos gerados durante o procedimento deste trabalho foram devidamente armazenados em recipientes específicos para o correto descarte, rotulados conforme as regras definidas pela comissão de resíduos da FURG pra posterior recolhimento e descarte por empresas especializadas.

SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar o processo de incorporação das células microalgais e compostos do meio de cultivo nas nanofibras poliméricas, a concentração máxima de células incorporadas, bem como se esse fator varia conforme o tempo de exposição.
- Avaliar o potencial das nanofibras atuarem na preservação de células microalgais durante longos períodos de tempo e sob diferentes temperaturas e umidades.
- Seguindo as premissas da preservação de micro-organismos, avaliar se as células microalgais apresentam diferença morfológica quando inoculadas após a remoção das nanofibras ou aderidas às nanofibras, e se o cultivo permanece sem contaminação.
- Avaliar a viabilidade celular das células microalgais após serem incorporadas às nanofibras e inseridas em novo cultivo.

CAPÍTULO VI

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. *Universitas: Ciências da Saúde*, Brasília, v.2 n.2, p. 236-25, 2008.
- ADAMS, R. M.; HURD, B. H.; LENHART, S.; LEARY, N. Effects of global climate change on agriculture: an interpretative review. **Climate research**, v. 11, n. 1, p. 19-30, 1998.
- ANDRADE, D. S., COLOZZI FILHO, A. Microalgas de águas continentais - Produção de Biomassa e Coprodutos. Londrina, p. 21-24, IAPAR, 2014.
- ANDRADE, G. A.; PAGANO, D. J.; GUZMÁN, J. L.; BERENGUEL, M.; FERNÁNDEZ, I.; ACIÉN, F. G. Distributed sliding mode control of pH in tubular photobioreactors. **IEEE Transactions on Control Systems Technology**, v. 24, n. 4, p. 1160-1173, 2015.
- ANDRADY, A. L. **Science and technology of polymer nanofibers**. New Jersey: Jonh Wiley and Sons, 2008.
- APHA, **American Public Health Association, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20th ed. APHA-AWWAWPCF, Washington, 1998.
- ARANA, T. J.; GUDE, V. G. A microbial desalination process with microalgae biocathode using sodium bicarbonate as an inorganic carbon source. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 130, p. 91-97, 2018.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 17. ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2000. v. 2. cap 30, met. 968.11, p. 4.
- BACAKOVA, M.; PAJOROVA, J.; SOPUCH, T.; BACAKOVA, L. Fibrin-modified cellulose as a promising dressing for accelerated wound healing. **Materials**, v. 11, n. 11, p. 2314, 2018.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. CRC press, 2014.
- BAZBOUZ, M. B.; RUSSELL, S. J. Cellulose acetate/sodium-activated natural bentonite clay nanofibres produced by free surface electrospinning. **Journal of materials science**, v. 53, n. 15, p. 10891-10909, 2018.
- BILAD, M. R.; ARAFAT, H. A.; VANKELECOM, I. F. J. Membrane technology in microalgae cultivation and harvesting: a review. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 7, p. 1283-1300, 2014.
- BRAGA, V. S.; MOREIRA, J. B; COSTA, J. A. V; MORAIS, M. G. Potential of *Chlorella fusca* LEB 111 cultivated with thermoelectric fly ashes, carbon dioxide and reduced supply of nitrogen to produce macromolecules. **Bioresource technology**, v. 227, p. 55-61, 2019.

- 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.
- BRUNETTI, A.; SCURA, F.; BARBIERI, G.; DRIOLI, E. Membrane technologies for CO₂ separation. **Journal of Membrane Science**, v. 359, n. 1-2, p. 115-125, 2010.
- CHEN, C. Y.; KAO, P. C.; TSAI, C. J.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Engineering strategies for simultaneous enhancement of C-phycocyanin production and CO₂ fixation with *Spirulina platensis*. **Bioresource technology**, v. 145, p. 307-312, 2013.
- CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica: Bioquímica Básica**. 5ª Edição, São Paulo: Thomson Learning. 2007.
- CHAE, S. R.; HWANG, E. J.; SHIN, H. Single cell protein production of *Euglena gracilis* and carbon dioxide fixation in an innovative photo-bioreactor. **Bioresource technology**, v. 97, n. 2, p. 322-329, 2006.
- CHANG, Y.; TSAI, W.; LI, M. Characterization of activated carbon prepared from *Chlorella*-based algal residue. **Bioresource technology**, v. 184, p. 344-348, 2015.
- CHEAH, W. Y.; LING, T. C.; JUAN, J. C.; 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.
- CHELLAPPAN, Ajan et al. Long-term Preservation of Micro-algal Stock for Fish Hatcheries. **Aquaculture Reports**, v. 17, p. 100329, 2020.
- CHEN, C. Y.; ZHAO, X. Q.; YEN, H. W.; HO, S. H.; CHENG, C. L.; LEE, D. J.; 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.
- CHOI, S.; DRESE, J. H.; JONES, C. W. Adsorbent materials for carbon dioxide capture from large anthropogenic point sources. **ChemSusChem: Chemistry & Sustainability Energy & Materials**, v. 2, n. 9, p. 796-854, 2009.
- COMITRE, A. A.; VAZ, B. S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Renewal of nanofibers in *Chlorella fusca* microalgae cultivation to increase CO₂ fixation. **Bioresource Technology**, v. 321, p. 124452, 2021.
- COSTA, E. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M.; MELO, V. S. P.; ARAUJO, S. A. C.; ROLIM, B. N. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. *Ciência Animal*, v. 19, n. 2, p.111-122, Goiânia, 2009.
- COSTA, J. A. V.; FREITAS, B. C. B.; LISBOA, C. R.; SANTOS, T. D.; FRAGA BRUSCH, L. R.; MORAIS, M. G. Microalgal biorefinery from CO₂ and the effects under the Blue Economy. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 99, p. 58-65, 2019.

COSTA, J. A. V.; LINDE, G. A.; ATALA, D. I. P.; MIBIELLI, G. M.; KRÖGER, R. T. Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 15-18, 2000.

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.

DEMIRBAS, A.; BAFAIL, A.; AHMAD, W.; SHEIKH, M. Biodiesel production from non-edible plant oils. **Energy Exploration & Exploitation**, v. 34, n. 2, p. 290-318, 2016.

DING, B.; YU, J. **Electrospun nanofibers for energy and environmental applications**. Springer: Berlin Heidelberg, 2014.

DORAN, P. M. **Bioprocess engineering principles**. Elsevier, 1995.

DOSHI, J.; RENEKER, D. H. Electrospinning process and applications of electrospun fibers. **Journal of Electrostatics**, v. 35, n. 2 e 3, 1995.

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

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

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

FAN, Y.; TIAN, X.; ZHENG, L.; JIN, X.; ZHANG, Q.; XU, S.; WANG, H. Yeast encapsulation in nanofiber via electrospinning: Shape transformation, cell activity and immobilized efficiency. **Materials Science and Engineering: C**, v. 120, p. 111747, 2021.

FIGUEIRA, F. S.; GETTENS, J. G.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G.; MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Production of Nanofibers Containing the Bioactive Compound C-Phycocyanin. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 16, p. 944-949, 2016.

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

GARGIULO, Nicola; PEPE, Francesco; CAPUTO, Domenico. CO₂ adsorption by functionalized nanoporous materials: a review. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 14, n. 2, p. 1811-1822, 2014.

GRACIA-ESPINO, E.; LÓPEZ-URÍAS, F.; TERRONES, H.; TERRONES, M. Novel nanocarbons for adsorption. In: **Novel Carbon Adsorbents**. Elsevier Ltd, p. 3-34, 2012.

GROBBELAAR, J. U. Inorganic Algal Nutrition. In: **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition**. [s.l.] wiley, p. 123–133, 2013.

HEMANTKUMAR, J. N.; RAHIMBHAI, M. I. Microalgae and Its Use in Nutraceuticals and Food Supplements, In: *Microalgae - From Physiology to Application*, Intech Open, 19 th ed., p.1-11, 2019.

HEMPEL, N.; PETRICK, I.; BEHRENDT, F. Biomass productivity and productivity of fatty acids and amino acids of microalgae strains as key characteristics of suitability for biodiesel production. **Journal of applied phycology**, v. 24, n. 6, p. 1407-1418, 2012.

HEO, Y. J.; ZHANG, Y.; RHEE, K. Y.; PARK, S. J. Synthesis of PAN/PVDF nanofiber composites-based carbon adsorbents for CO₂ capture. **Composites Part B: Engineering**, v. 156, p. 95-99, 2019.

HO, S. H.; CHEN, C. Y.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Perspectives on microalgal CO₂ - emission mitigation systems — a review. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 2, p. 189-198, 2011.

HONG, S. M.; KIM, S. H.; JEONG, B. G.; JO, S. M.; LEE, K. B. Development of porous carbon nanofibers from electrospun polyvinylidene fluoride for CO₂ capture. **RSC Advances**, v. 4, n. 103, p. 58956-58963, 2014.

HU, W.; LIN, C.; HONG, Z. The enrichment of cancer stem cells using composite alginate/polycaprolactone nanofibers. **Carbohydrate polymers**, v. 206, p. 70-79, 2019.

HUANG, Z. M.; ZHANG, Y. Z.; KOTAKI, M.; RAMAKRISHNA, S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. **Composites science and technology**, v. 63, n. 15, p. 2223-2253, 2003.

IPCC, 2018: Summary for Policymakers. In: **Global Warming of 1.5°C. An IPCC Special Report on the impacts of global warming of 1.5°C above pre-industrial levels and related global greenhouse gas emission pathways, in the context of strengthening the global response to the threat of climate change, sustainable development, and efforts to eradicate poverty** [Masson-Delmotte, V., P. Zhai, H.-O. Pörtner, D. Roberts, J. Skea, P.R. Shukla, A. Pirani, W. Moufouma-Okia, C. Péan, R. Pidcock, S. Connors, J.B.R. Matthews, Y. Chen, X. Zhou, M.I. Gomis, E. Lonnoy, T. Maycock, M. Tignor, and T. Waterfield (eds.)]. In Press

IVERSON, T. M. **Evolution and unique bioenergetic mechanisms in oxygenic photosynthesis**. *Current opinion in chemical biology*, v. 10, n. 2, p. 91-100, 2006.

JHA, B. S.; AYRES, C. E.; BOWMAN, J. R.; TELEMCO, T. A.; SELL, S. A.; BOWLIN, G. L.; SIMPSON, D. G. Electrospun collagen: a tissue engineering scaffold with unique functional properties in a wide variety of applications. **Journal of Nanomaterials**, v. 2011, p. 7, 2011.

JOHANSEN, M. N. **Microalgae: biotechnology, microbiology, and energy**. Nova Science Publisher's, Inc, New York, 2012.

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, p. 1121-1129, 2017.

KIM, I. G.; LEE, J. H.; UNNITHAN, A. R.; PARK, C. H.; KIM, C. S. A comprehensive electric field analysis of cylinder-type multi-nozzle electrospinning system for mass production of nanofibers. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 31, p. 251-256, 2015.

KIM, P.; OTIM, O. Optimizing a Municipal Wastewater-based *Chlorella vulgaris* Photobioreactor for Sequestering Atmospheric CO₂. **Bulletin, Southern California Academy of Sciences**, v. 118, n. 1, p. 42-57, 2019.

KIRICHENKO, V.; FILATOV, Y.; BUDYKA, A. Electrospinning of micro-and nanofibers: fundamentals in separation and filtration processes. **International Journal for Multiscale Computational Engineering**, v. 8, n. 4, 2010.

KOLSKÁ, Z.; POLANSKÝ, R.; PROSR, P.; ZEMANOVÁ, M.; RYŠÁNEK, P.; SLEPIČKA, P.; ŠVORČÍK, V. Properties of polyamide nanofibers treated by UV-A radiation. **Materials Letters**, v. 214, p. 264-267, 2018.

KOOSHKI, H.; GHOLLASI, M.; HALABIAN, R.; KAZEMI, N. M. Osteogenic differentiation of preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells with lipopolysaccharide on modified poly-l-lactic-acid nanofibers. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 5, p. 5343-5353, 2019.

KUNTZLER, S. G.; ALMEIDA, A. C. A.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Polyhydroxybutyrate and phenolic compounds microalgae electrospun nanofibers: A novel nanomaterial with antibacterial activity. **International journal of biological macromolecules**, v. 113, p. 1008-1014, 2018b.

KUNTZLER, S. G.; UEBEL, L. S.; SCHMATZ, D. A.; BARCIA, M. T.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Nanofibers and their applications. Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology. 10ed.Valencia: **American Scientific Publishers**, v. 28, p. 387-414, 2018a.

LAYCOCK, B.; HALLEY, P.; PRATT, S.; WERKER, A.; LANT, P. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. **Progress in Polymer Science**, v. 38, n. 3-4, p. 536-583, 2013.

LIU, H.; ZUO, B. Structure and sound absorption properties of spiral vane electrospun PVA/PEO nanofiber membranes. **Applied Sciences**, v. 8, n. 2, p. 296, 2018.

LIU, Y. HAO, M.; CHEN, Z.; LIU, L.; LIU, Y.; YANG, W.; RAMAKRISHNA, S. A review on recent advances in application of electrospun nanofiber materials as biosensors. **Current Opinion in Biomedical Engineering**, v. 13, p. 174–189, 2020.

LIU, Y.; WANG, S.; ZHANG, R. Composite poly(lactic acid)/chitosan nanofibrous scaffolds for cardiac tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 1130–1137, 2017.

LOURENÇO, S. O. Microalgae culture collections, strain maintenance, and propagation. In: **Handbook of Microalgae-Based Processes and Products**. Academic Press, p. 49-84, 2020.

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

LUOH, R.; HAHN, H. T. Electrospun nanocomposite fiber mats as gas sensors. **Composites science and technology**, v. 66, n. 14, p. 2436-2441, 2006.

MANGAN, N. M.; FLAMHOLZ, A.; HOOD, R. D.; MILO, R.; SAVAGE, D. F. pH determines the energetic efficiency of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 36, p. E5354-E5362, 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.

MATOS, Â. P. The impact of microalgae in food science and technology. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 94, n. 11, p. 1333-1350, 2017.

MENG, L.; PARK, S. Effect of heat treatment on CO₂ adsorption of KOH-activated graphite nanofibers. **Journal of colloid and interface science**, v. 352, n. 2, p. 498-503, 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.

MORAES, L.; SANTOS, L. O.; COSTA, J. A. V. Bioprocess strategies for enhancing biomolecules productivity in *Chlorella fusca* LEB 111 using CO₂ a carbon source. **Biotechnology Progress**, p. e2909, 2019.

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

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

MORAIS, M. G.; MORAIS, E. G.; DUARTE, J. H.; DEAMICI, K. M.; MITCHELL, B. G.; COSTA, J. A. V. Biological CO₂ mitigation by microalgae: technological trends, future prospects and challenges. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 78, 2019.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; MARINS, L. F. F.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 63, n. 1-2, p. 144-150, 2008.

MORAIS, M. G.; VAZ, B. S.; MORAIS, E. G.; COSTA, J. A. V. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. **Biomed research international**, v. 2015, p. 1-15, 2015.

MOREIRA, J. B.; LIM, L.; ZAVAREZE, E. R.; DIAS, A. R. G; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Antioxidant ultrafine fibers developed with microalga compounds using a free surface electrospinning. **Food hydrocolloids**, v. 93, p. 131-136, 2019.

MOREIRA, J. B.; TERRA, A. L. M.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Development of pH indicator from PLA/PEO ultrafine fibers containing pigment of microalgae origin. **International journal of biological macromolecules**, v. 1, p. 1, 2018.

NABORS, M. W. **Introdução à botânica**. São Paulo: Roca, v. 646, 2012.

NAYAK, M.; KAREMORE, A.; SEN, R. Performance evaluation of microalgae for concomitant wastewater bioremediation, CO₂ biofixation and lipid biosynthesis for biodiesel application. **Algal Research**, v. 16, p. 216-223, 2016.

NAYAK, R.; PADHYE, R.; KYRATZIS, I. L.; TRUONG, Y. B.; ARNOLD, L. Recent advances in nanofibre fabrication techniques. **Textile Research Journal**, v. 82, n. 2, p. 129-147, 2012.

PAOLI, P. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **FEMS microbiology reviews**, v. 29, n. 5, p. 897-910, 2005.

PARK, S.; NGUYEN, T. H. T.; JIN, E. S. Improving lipid production by strain development in microalgae: strategies, challenges and perspectives. **Bioresource technology**, v. 292, p. 121953, 2019.

PATEL, A.; GAMI, B.; PATEL, P.; PATEL, B. Microalgae: Antiquity to era of integrated technology. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, p. 535-547, 2017.
PETRÍK, S. Industrial production technology for nanofibers. **Nanofibers—production, properties and functional applications**, p. 3-16, 2011.

PETTI, Cathy A.; CARROLL, Karen C. Procedures for the Storage of Microorganisms. In: **Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition**. American Society of Microbiology, 2011. p. 124-131.

QI, F.; PEI, H.; HU, W.; MU, R.; ZHANG, S. Characterization of a microalgal mutant for CO₂ biofixation and biofuel production. **Energy conversion and management**, v. 122, p. 344-349, 2016.

RAMAKRISHNA, S.; FUJIHARA, K.; TEO, W. E.; YONG, T.; MA, Z.; RAMASESHAN, R. Electrospun nanofibers: solving global issues. **Materials today**, v. 9, n. 3, p. 40-50, 2006.

RASTOLL, M. J. et al. The development of a cryopreservation method suitable for a large cyanobacteria collection. **Journal of applied phycology**, v. 25, n. 5, p. 1483-1493, 2013.

REICHERT, C. C.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 1, p. 23-28, 2006.

RICHMOND, A.; HU, Q. **Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology**. London: John Wiley & Sons, 2013.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1-61, 1979.

ROSA, G. M.; MORAES, L.; CARDIAS, B. B.; 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.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Fed-batch cultivation with CO₂ and monoethanolamine: Influence on *Chlorella fusca* LEB 111 cultivation, carbon biofixation and biomolecules production. **Bioresource technology**, v. 273, p. 627-633, 2019.

ROSA, G. M.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Green alga cultivation with monoethanolamine: Evaluation of CO₂ fixation and macromolecule production. **Bioresource technology**, v. 261, p. 206-212, 2018.

RUBIO, F. C.; FERNANDÉZ, F. G. A.; PÉREZ, J. A. S.; CAMACHO, F. G.; GRIMA, E. M. Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture. **Biotechnology Bioengineering**, v. 62, p. 71-86, 1999.

SARIOGLU, O. F.; SAN KESKIN, N. O.; CELEBIOGLU, A.; TEKINAY, T.; UYAR, T. Bacteria encapsulated electrospun nanofibrous webs for remediation of methylene blue dye in water. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 152, p. 245-251, 2017.

SÉON-LUTZ, M.; COUFFIN, A. C.; VIGNOUD, S.; SCHLATTER, G.; HÉBRAUD, A. Electrospinning in water and in situ crosslinking of hyaluronic acid/cyclodextrin nanofibers: Towards wound dressing with controlled drug release. **Carbohydrate polymers**, v. 207, p. 276-287, 2019.

SETHI, J.; FAROOQ, M.; SAIN, S.; SAIN, M.; SIRVIÖ, J. A.; ILLIKAINEN, M.; OKSMAN, K. Water resistant nanopapers prepared by lactic acid modified cellulose nanofibers. **Cellulose**, v. 25, n. 1, p. 259-268, 2018.

SOLA, M. C.; OLIVEIRA, A. P. DE.; FEISTEL, J. C.; REZENDE, C. S. M. Maintenance of microorganisms: Storage and viability. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, n.14, 2012.

SONG, S.; ZHAO, Y.; YUAN, X.; ZHANG, J. β -Chitin nanofiber hydrogel as a scaffold to in situ fabricate monodispersed ultra-small silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 574, p. 36-43, 2019.

SUNDARAMURTHY, J.; LI, N.; KUMAR, P. S.; RAMAKRISHNA, S. Perspective of electrospun nanofibers in energy and environment. **Biofuel Research Journal**, v. 1, n. 2, p. 44-54, 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.

VALE, M. A.; FERREIRA, A.; PIRES, J. C.; GONÇALVES, A. L. CO₂ capture using microalgae. In: *Advances in Carbon Capture*. Woodhead Publishing, p. 381-405, 2020.

VAZ, B. S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Innovative nanofiber technology to improve carbon dioxide biofixation in microalgae cultivation. **Bioresource technology**, v. 273, p. 592-598, 2019a.

VAZ, B. S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Physical and biological fixation of CO₂ with polymeric nanofibers in outdoor cultivations of *Chlorella fusca* LEB 111. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019b.

VAZ, B. S.; MASTRANTONIO, D. J. S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Green alga cultivation with nanofibers as physical adsorbents of carbon dioxide: Evaluation of gas biofixation and macromolecule production. **Bioresource technology**, v. 287, p. 121406, 2019.

WIEBE, K.; ROBINSON, S.; CATTANEO, A. Climate Change, Agriculture and Food Security: Impacts and the Potential for Adaptation and Mitigation. In: **Sustainable Food and Agriculture**. Academic Press, p. 55-74, 2019.

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.

YUSUF, H. A.; HOSSAIN, S. Z.; KHAMIS, A. A.; RADHI, H. T.; JAAFAR, A. S. Optimization of CO₂ biofixation rate by microalgae in a hybrid microfluidic differential carbonator using response surface methodology and desirability function. **Journal of CO₂ Utilization**, v. 42, p. 101291, 2020.

ZAINAB, G.; BABAR, A. A.; IQBAL, N.; WANG, X.; YU, J.; DING, B. Amine-impregnated porous nanofiber membranes for CO₂ capture. **Composites Communications**, v. 10, p. 45-51, 2018.

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

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