



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

MÔNICA REGINA PIOVANI

Balço de carbono em fotobiorreator com cultivo de *Chlorella vulgaris* em excesso de CO₂

Campinas

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

MÔNICA REGINA PIOVANI

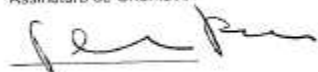
Balanço de carbono em fotobiorreator com cultivo de *Chlorella vulgaris* em excesso de CO₂

Orientadora: Profa. Dra. Telma Teixeira Franco

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA MÔNICA REGINA PIOVANI
E ORIENTADA PELA PROFA.DRA. TELMA TEIXEIRA FRANCO**

Assinatura do Orientador



Campinas

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE -
UNICAMP

P659b Piovani, Mônica Regina
Balanço de carbono em fotobiorreator com
cultivo de *Chlorella vulgaris* em excesso de CO₂ /
Mônica Regina Piovani. --Campinas, SP: [s.n.],
2012.

Orientador: Telma Teixeira Franco.
Tese de Doutorado - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Microalga. 2. Compostos orgânicos voláteis.
3. Dioxido de carbono. 4. Lipídios. I. Franco,
Telma Teixeira, 1957-. II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Engenharia Química.
III. Título.

Título em Inglês: Carbon mass balance in photobioreactor with *Chlorella
vulgaris* culture in high concentration of CO₂

Palavras-chave em Inglês: Microalgae, Volatile organic compounds,
Carbon dioxide, Lipids

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora: Telma Teixeira Franco, Leonardo Brantes Bacellar
Mendes, João Carlos Monteiro de Carvalho, Fábio
Augusto, Ana Teresa Lombardi

Data da defesa: 18-12-12

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Balanço de carbono em fotobiorreator com cultivo de *Chlorella vulgaris* em excesso de CO₂

Tese de Doutorado defendida por MÔNICA REGINA PIOVANI e aprovada em 18 de dezembro de 2012 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



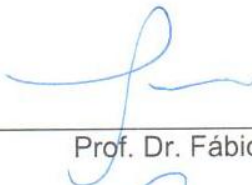
Prof. Dr. Telma Teixeira Franco




Dr. Leonardo Brantes Bacellar Mendes



Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho



Prof. Dr. Fábio Augusto



Prof. Dr. Ana Teresa Lombardi

Campinas

2012

*Dedico este trabalho aos meus pais
Cláudio e Osvaldira, à minha irmã Camila
e ao meu noivo Mauricio por estarem
sempre presentes em minha vida!*

Agradecimentos

À Deus!

A professora Telma Teixeira Franco pela orientação e oportunidade.

Aos professores Gustavo Paim Valença e Fábio Augusto pela colaboração;

A toda minha família: avós, tios e primos.

Às minhas amigas Marieta, Thais e Renata por me ouvirem nos momentos difíceis.

Aos amigos do laboratório: Lucy e Edison pelos debates, desabafos, apoio e amizade.

Aos colegas do laboratório

A Petrobras pelo financiamento do projeto.

A CNPq, FAPESP e CAPES pelo auxílio.

RESUMO

As microalgas são microrganismos que vem sendo utilizados na bioconversão de carbono em produtos com interesse comercial como, por exemplo, biocombustíveis, corantes, suplementos alimentares e cosméticos. Elas podem ser cultivadas em sistemas autotróficos e heterotróficos sendo que as fontes de carbono, gasosas ou líquidas, podem ser provenientes de resíduos industriais reduzindo os custos de sua produção. Para identificar quais os possíveis produtos gerados durante o cultivo o objetivo deste trabalho foi avaliar a bioconversão de dióxido de carbono em fotobiorreatores identificando os principais bioprodutos gerados nas fases sólida, líquida e gasosa do sistema. Os experimentos foram conduzidos em fotobiorreatores de coluna de bolhas, alimentados com meio de cultivo sintético, com microalga *C. vulgaris* em fase exponencial de crescimento. Foi utilizado reator isotérmico, intensidades luminosas de $150\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, e injeção de ar com dióxido de carbono na vazão de 1Lmin^{-1} . Além da conversão de carbono foram avaliados métodos de extração de lipídeos baseados no método de Bligh & Dyer e métodos gravimétricos para determinação do teor de umidade. A conversão de CO_2 nos sistemas utilizados foi avaliada nas fases sólida, líquida e gasosa e foi expressa em termos de produção de biomassa (6%), em compostos solúveis na fase líquida, e compostos orgânicos voláteis (88%) liberados para fase gasosa do sistema. O teor de umidade da biomassa das microalgas foi de 85% para os métodos avaliados e para os métodos para extração de lipídeos foi possível observar a influência do teor de umidade na biomassa na porcentagem de lipídeos que teve variação de 3% a 24%.

ABSTRACT

Microalgae are microorganisms that have been used for bioconversion of carbon into products of commercial interest such as, biofuels, pigments, food supplements and cosmetics. They can be grown in autotrophic and heterotrophic systems and the carbon sources, gaseous or liquid, can be derived from industrial wastes, reducing the costs of production. To identify the possible products generated during the culture the objective of this study was to evaluate the bioconversion of carbon dioxide in photobioreactors identifying key byproducts in solid, liquid and gaseous phases the generated in system. The experiments were conducted in bubble column photobioreactors, fed synthetic growth medium, and *C. vulgaris* cultures in exponential growth phase. The reactor was operated isothermally with $150\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ of light intensities and injection of air with carbon dioxide in the flow 1Lmin^{-1} . Besides the carbon conversion, were evaluated lipid extraction methods based on the Bligh & Dyer's method and gravimetric methods for determination of moisture content. The conversion of CO_2 systems will be evaluated in phases solid, liquid and gaseous systems, expressed in terms of biomass (6%), production in soluble compounds in the liquid phase and volatiles organic compounds released into the gaseous phase. The moisture content of microalgae biomass was 85% for the evaluated methods and for the extraction of lipids methods was possible to observe the influence of moisture content in the percentage of lipids that ranged from 3% to 24%.

Sumário

Agradecimentos	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT.....	ix
INDICE FIGURAS.....	xiv
INDICE TABELAS	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Biorrefinarias	5
2.2 Sistemas de Cultivo.....	13
2.3 Bioconversão de Carbono.....	16
2.4 Produtos gerados por microalgas	17
3 - OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo geral	22
3.2 Objetivos específicos	22
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Microrganismo.....	24
4.2 Fotobiorreator.....	24
4.3 Determinação de pH	27
4.4 Biomassa	27

4.5	Determinações de carbono nas fases líquida e gasosa	29
4.5.1	Carbono total dissolvido no meio de cultivo	29
4.5.2	Carbono Inorgânico dissolvido no meio de cultivo	30
4.5.3	Carbono Orgânico dissolvido no meio de cultivo	31
4.5.4	Carbono total na entrada e na saída do reator	32
4.5.5	Carbono Inorgânico na entrada e na saída do reator	32
4.5.6	Carbono orgânico na entrada e na saída do reator	33
4.6	Determinação de CO ₂ e O ₂ na fase gasosa de entrada e de saída do reator ...	33
4.7	Balanço de massa de carbono (BMC).....	35
4.8	Análise de Compostos Orgânicos Voláteis (VOC)	36
4.9	- Determinação do teor de umidade	38
4.9.1	Aplicação	38
4.9.2	Amostragem e preparação da amostra	39
4.10	Extração e quantificação de lipídios de microalgas	40
4.10.1	Aplicação	40
4.10.2	Amostragem e Preparação da Amostra	41
4.11	- Extração de lipídios	41
4.11.1	Digestão ácida da amostra	42
4.11.2	Extração dos lipídeos	42
4.11.3	Métodos físicos de rompimento celular	46

4.12	- Transesterificação de lipídios microalgais	49
4.12.1	Aplicação	49
4.12.2	Reagentes	49
4.12.3	Amostragem e Preparação da Amostra	49
4.12.4	Transesterificação	50
4.13	-Determinação do perfil de ácidos graxos	51
4.13.1	Aplicação	51
4.13.2	Método cromatográfico para determinação do perfil de ésteres.....	51
	Exemplo de utilização do método.	52
5	– RESULTADOS	53
5.1	Padronização de método para cálculo de balanço de carbono simples.....	54
5.1.1	Cálculo da quantidade de CO ₂ presente na vazão utilizada	55
5.2	Padronização de método para determinação do teor de umidade	62
5.2.1	Resultados e discussão.....	63
5.3	Padronização de métodos para extração de lipídios.....	65
5.3.1	Resultados e discussão	66
5.4	Carbon destination in photobiorreactors.....	72
5.4.1	Introduction	74
5.4.2	Material and methods	76
5.4.3	Results and discussion	81

5.4.4	Acknowledgements.....	92
6	- CONCLUSÕES.....	93
7	- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	96
8	- REFÊNCIAS.....	98
9	-APÊNDICE.....	114

INDICE FIGURAS

Figura 2-1 – Biorrefinaria para geração de combustível e biomateriais.	6
Figura 2-2 – Substâncias produzidas pelo fracionamento de materiais lignocelulósicos para desenvolvimento de produtos comerciais.	7
Figura 2-3 - Exemplo geral de uma biorrefinaria aplicada a microalgas.....	9
Figura 2-4 - Foto de: <i>Chlorella vulgaris</i> . (http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/strainDetailAction.do?strainId=26594)	10
Figura 2-5 – Reações CO ₂ em água considerando o pH.	11
Figura 2-6 – Exemplos de fotobiorreatores utilizados em cultivos de microalgas com sistema aberto (open ponds). (SAVAGE, 2011).....	14
Figura 2-7 – Exemplos de fotobiorreatores utilizados em cultivos fechados. (http://www.bae.uky.edu/Biofuels/Algae/photo_gallery/photo_gallery.htm)	15
Figura 2-8 – Produtos possíveis de serem obtidos com cultivos microalgais. (POSTEN e SCHAUB, 2009)	18
Figura 4-1 - Diagrama do Diagrama experimental: 1:Câmara de fotoperíodo; 2: Analisador de pH, temperatura e CO ₂ ; 3: Sensores de pH, temperatura e CO ₂ ; 4: Fotobiorreator; 5: Sistema para controle da vazão e mistura de gases; 6: Difusor de gases; 7, 8, 9, 10 controladores dos gases. Todas as dimensões em mm. Obtenção dos dados cinéticos.....	25
Figura 4-2 – Aparato experimental utilizado para realização dos experimentos.	26
Figura 4-3 - Analisador de carbono TOC-VCSN (Shimadzu, Kyoto, Japão)	29
Figura 4-4 - Cromatógrafo a gás modelo 2014 Shimadzu.....	34

Figura 4-5 – Fibras SPME utilizadas: fibra colocada em holder utilizado nas amostragens.....	36
Figura 4-6 - (a) aparato experimental utilizado para a coleta de VOC; (b) injeção dos VOC coletados por SPME em cromatógrafo.	37
Figura 4-7 - Cromatógrafo à gás acoplado à espectrômetro de massas GC/MS - QP 2010 Plus	38
Figura 4-8 - Fluxograma para extração de lipídeos	45
Figura 4-9 - Fluxograma para determinação de lipídeos pelo método Bligh & Dyer com métodos de rompimento celular.	48
Figura 5-1 - Curva calibração para determinação da massa de CO ₂ em amostras gasosas de entrada e saída do fotobiorreator.	56
Figura 5-2 - Diagrama do fotobiorreator. 1: Câmara de fotoperíodo; 2: Analisador de pH, CO ₂ e temperatura; 3: Ponto de amostragem da saída dos gases; 4: sensor de pH, temperatura e CO ₂ ; 5: fotobiorreator; 6: difusor de gases; 7: sistema de controle de fluxo e mistura dos gases; 8: Ponto de amostragem da entrada dos gases; 9: Medidor do fluxo de ar; 10: Medidor do fluxo de CO ₂ . Todas as dimensões em mm.....	58
Figura 5-3 - Comparação da porcentagem de lipídeos entre biomassa úmida e seca para os métodos de rompimento celular utilizados	70
Figure 5-4 - Photobioreactor diagram - 1: photoperiod chamber; 2: pH, temperature and CO ₂ analyser; 3: gas exit sampler; 4: pH, temperature and CO ₂ sensor; 5: photobioreactor; 6: gas diffuser; 7: system controlling the flow rate and mixture of the gases; 8: Gas entrance sampler; 9: Air flow meter; 10: CO ₂ flow meter. All dimensions in mm.	77

Figure 5-5 - Conversion of $\text{CO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ during 72h with maximum value obtained in 36h ($18.31 \text{ mgCO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	84
Figure 5-6 - Biomass growth curve and pH dynamic during the microalgal culture.	86
Figure 5-7 – Conversion of carbon dioxide bioconverted from <i>C. vulgaris</i>	87
Figure 5-8 Chromatogram of the blank.....	89
Figure 5-9 Chromatogram of the sample for 48h of cell residence time.	89
Figure 5-10 Carbon mass fractions in the photobioreactor for 36h of cell residence time.	91

INDICE TABELAS

Tabela 4-1: Composição BBM (Bolds Basal Medium) (pH 6,8).....	24
Tabela 5.1 – Dados para construção da curva de calibração para CO ₂	56
Tabela 5.2 - Dados pra calibração da injeção (valores em mg de CO ₂).....	57
Tabela 5.3 - Resultados análise cromatográfica	59
Tabela 5.4 – Valores médios para três análises de Carbono Total na entrada e nas duas saídas do fotobiorreator	61
Tabela 5.5 - Valores médios para três análises de Carbono Inorgânico na entrada e nas duas saídas do fotobiorreator.....	61
Tabela 5.6 – Resultados de concentração celular para 1L de meio de cultivo.....	63
Tabela 5.7 – Resultados para determinação do teor de umidade em amostras de biomassa de microalgas centrifugadas.	64
Tabela 5.8 – Métodos utilizados para determinação do teor de lipídeos.....	66
Tabela 5.9 – Porcentagem lipídica em biomassa de <i>C. vulgaris</i> liofilizada e liofilizada ressuspensa em água.	68
Tabela 5.10 – Porcentagem lipídica em biomassa úmida para método B&D com modificação na sequência de adição dos solventes.....	69
Tabela 5.11 – Comparação de valores de massa, tempo de resposta e resultados para os métodos estudados.	71
Table 5.12 – Comparison of the results for kinetic parameters during the <i>C. vulgaris</i> culture with 5%, 10%, 15%, 20% and 45% of carbon dioxide in the inlet flow.....	82
Table 5.13 - Results of carbon mass fractions for gaseous phase (IC inlet flow, IC exit and OC exit) and for solid and liquid phase C (IC _{liquid} , C _{biomass} and OC _{liquid}).	85

Table 5.14 - Volatile Organic Compounds produced by *Chlorella vulgaris* identified for 24h of cell residence time in a photobioreactor fed with 10% of carbon dioxide.....90

NOMENCLATURA

Abreviaturas

BMC	Balanço de Massa de Carbono	
CI	Carbono Inorgânico (fase gasosa)	mgL ⁻¹
CID	Carbono Inorgânico Dissolvido	mgL ⁻¹
CO	Carbono Orgânico (fase gasosa)	mgL ⁻¹
COD	Carbono Orgânico Dissolvido	mgL ⁻¹
CT	Carbono Total (fase gasosa)	mgL ⁻¹
CTD	Carbono Total Dissolvido	mgL ⁻¹
PQ	Coeficiente fotossintético	

Siglas

C_0, C_i	Concentração de O ₂ e CO ₂ na entrada e na saída do reator	
C_b	Carbono da biomassa	
P_X	Produtividade de Biomassa	
Q	Vazão	
r_{CO_2}	Taxa de consumo de CO ₂	
r_{O_2}	Taxa de produção de O ₂	
t_0	Tempo inicial	h
t_i	Tempo de residência no ponto i	
t_{i-1}	Tempo de residência no tempo i - 1	
t_g	Tempo de geração	h
V_r	Volume do reator	
X_0	Concentração Celular Inicial	mg.L ⁻¹
X_i	Concentração celular no tempo i	
X_{i-1}	Concentração celular no tempo i-1	

Símbolos Gregos

μ	Velocidade específica de crescimento	h ⁻¹
μ_{max}	Velocidade máxima específica de crescimento	h ⁻¹
ϑ	Vazão do gás	

1 INTRODUÇÃO

O aumento da demanda de fontes energéticas provenientes de combustíveis fósseis requer respostas ambientais inovadoras para o constante aumento da emissão de poluentes (LARKUM *et al.*, 2012), (AMARO *et al.*, 2012).

O dióxido de carbono, por exemplo, é considerado um dos maiores poluentes atmosféricos assim como compostos SO_x e NO_x. Tecnologias para a captação e estocagem de carbono visam à estabilização da emissão deste poluente.

Novos métodos para conversão de dióxido de carbono como fixação em oceanos, conversão por micro-organismos, estão sendo desenvolvidos para aplicação futura. A escolha destas metodologias irá depender de fatores como custo, capacidade de captura, impacto ambiental, velocidade em que a tecnologia possa ser introduzida; estando também relacionadas à fatores sociais como a aceitação pública (IPCC, 2007), (CHIU, S. Y. *et al.*, 2008).

Neste sentido, o uso de processos biotecnológicos para a conversão de dióxido de carbono é uma possibilidade viável para abater as emissões deste poluente. Esses processos podem ser baseados em reatores onde microalgas são utilizadas como biocatalisadores de uma série de reações bioquímicas dos produtos do metabolismo fotossintético, tais como formação de biopolímeros extracelulares (ex: proteínas e carboidratos) e a formação de compostos orgânicos voláteis (ONO e CUELLO, 2006), (HEMSCHMEIER *et al.*, 2009).

A substituição gradativa da plataforma petroquímica por plataformas tecnológicas de origem renovável vem aumentando nesta última década. Em termos de energia, os EUA hoje já substituem quase 10% de sua gasolina por bioetanol de milho, no Brasil

este teor é 20% de etanol de cana de açúcar. Em diversos países europeus o diesel fóssil já é substituído por concentrações entre 5 a 10% de biodiesel, no Brasil esta a porcentagem de substituição do diesel por biodiesel de soja é de 5% e será de 20%. Diversos plásticos de origem fóssil já foram parcialmente substituídos por plásticos de origem microbiana (fermentação a partir de açúcares), e polietileno de origem de etanol de cana de açúcar já pode ser encontrado comercialmente no Brasil.

As microalgas tornaram se uma alternativa para mitigar a alta concentração de CO₂ na atmosfera (ZENG *et al.*, 2011). Estudos nestas áreas trazem avanços significativos para melhorias no cultivo aumentando assim a quantidade de dióxido de carbono convertido e (LAM *et al.*, 2012). Assim, deseja-se neste projeto desenvolver o conceito de biorrefinaria de microalgas, identificando os diversos produtos de alto valor agregado ou de elevado teor energético.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biorrefinarias

O desenvolvimento urbano, agrícola e industrial estabelece a demanda por insumos, energia e combustíveis fósseis, de baixa sustentabilidade (SCHIRMER e GAUER, 2012). Neste sentido, novas tecnologias para produção de consumíveis a partir de matérias primas renováveis vêm sendo consideradas essenciais (SCRAGG, 2006).

Uma das mais aceitas definições de desenvolvimento sustentável conceitua o termo como “o atendimento das necessidades do presente, sem comprometer as futuras gerações”, para isso deve-se considerar os quatro princípios da sustentabilidade: i) utilizar fonte de energia renovável; ii) reciclar a matéria prima; iii) evitar o excesso de consumo; iv) manter a biodiversidade. (BRUNDTLAND, 1987). Alternativamente, LIVERMAN *et al.* (1988), definem sustentabilidade como “a sobrevivência indeterminada da espécie humana, considerando não somente os aspectos biológicos, como também, a qualidade de vida, através da manutenção de sistemas básicos de suporte biológico (ar, água, terra e biota)”. Recentemente, os critérios econômicos, sociais e ambientais perfazem a base para a promoção da sustentabilidade em nível industrial (GARCÍA-SERNA *et al.*, 2007).

As biorrefinarias estão dentro deste conceito e são sistemas integrados de tecnologia sustentável para a utilização e exploração de materiais biológicos, os quais são convertidos em diversos produtos de interesse comercial (KAMM, 2007). Podem também ser definidas como local para fabricação e refino de biomassa para produção

de matérias primas e moléculas sendo a conversão feita com uso de processos biológicos, químicos ou termoquímicos (Figura 2-1).

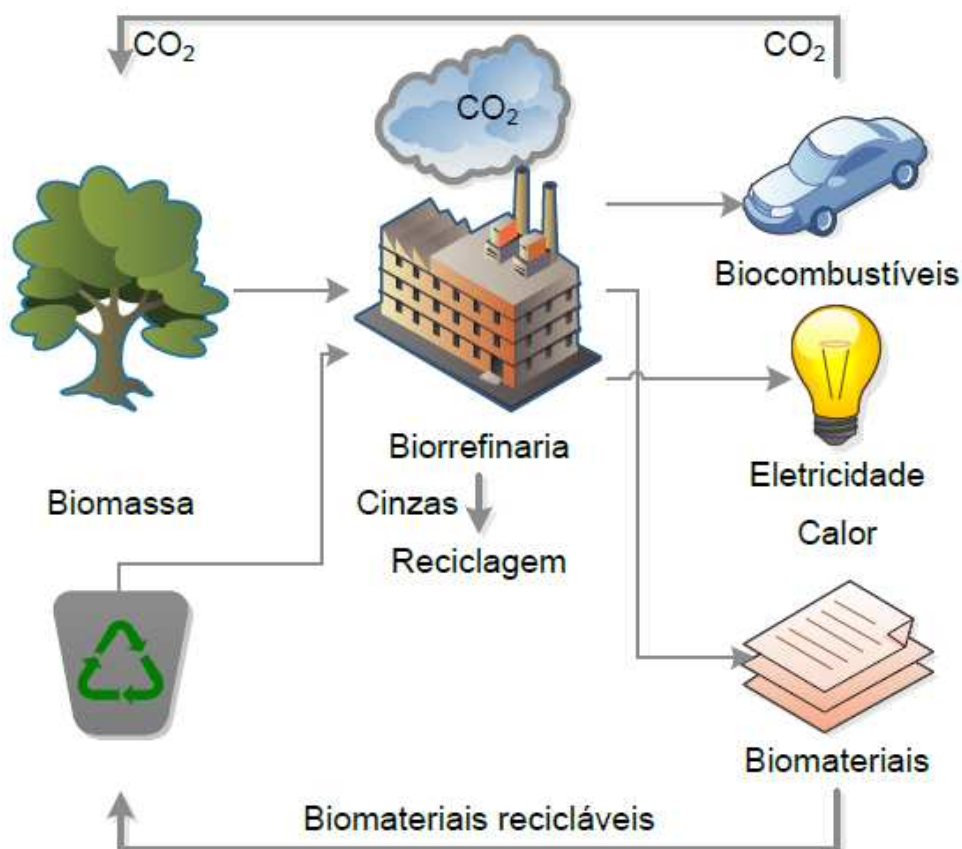


Figura 2-1 – Biorrefinaria para geração de combustível e biomateriais.

Adaptado de RAGAUSKAS *et al.* (2006)

Este conceito foi desenvolvido baseado na substituição de moléculas orgânicas provenientes de material fóssil por material de origem renovável. Este é processado em produtos de maior interesse comercial como combustíveis, proteínas, carboidratos e pigmentos (Figura 2-2) (KAMM e KAMM, 2004).

Atualmente, três tipos de biorrefinaria vêm sendo pesquisadas e desenvolvidas; i) a biorrefinaria de grãos, onde são utilizados grãos como matéria prima, ii) a biorrefinaria verde, baseada no uso de biomassa verde, e iii) a biorrefinaria que utiliza materiais lignocelulósicos (KAMM e KAMM, 2004).

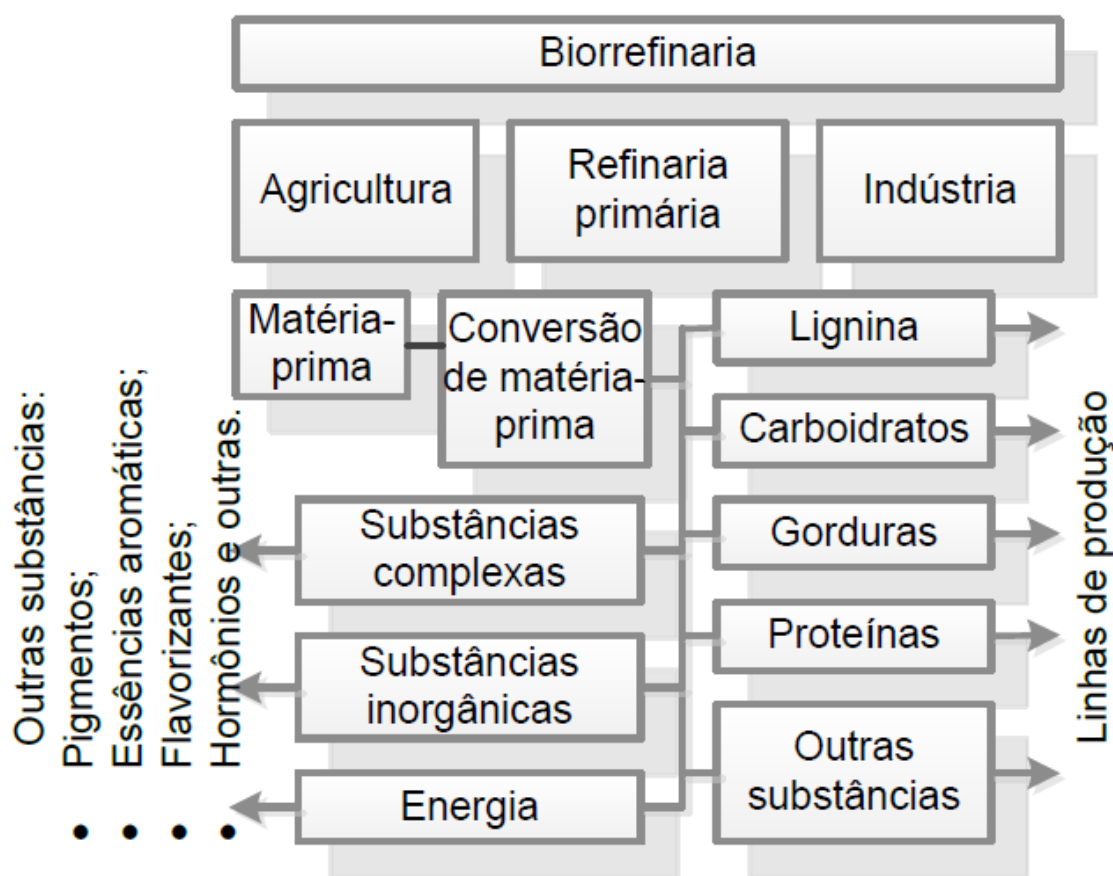


Figura 2-2 – Substâncias produzidas pelo fracionamento de materiais lignocelulósicos para desenvolvimento de produtos comerciais.

Adaptado de KAMM e KAMM (2007a)

As matérias – primas utilizadas pela biorrefinaria de grãos podem ser cereais tais como trigo, centeio e milho. Estes são processados e separados da palha e, a seguir,

utilizados na alimentação, ou sofrem modificações químicas, ou convertidos biotecnologicamente em energia, plásticos, adesivos etc (KAMM e KAMM, 2007b).

Na biorrefinaria verde, os materiais utilizados são biomassas verdes como cana de açúcar, estes materiais são separados em uma massa prensada e um líquido verde rico em nutrientes que podem ser utilizados para produção de corantes, pigmentos, proteínas, amino ácidos além de outras substâncias orgânicas etc (KAMM e KAMM, 2004).

Na biorrefinaria de materiais lignocelulósicos são utilizados como matérias – primas palha, bagaço de cana, capim, madeira entre outros. O material lignocelulósico é composto de três principais precursores químicos: hemicelulose (composta de polímeros de pentoses), celulose (polímero de glicose) e lignina (polímero de fenóis) (KAMM *et al.*, 2008).

As microalgas cultivadas em fotobiorreatores (Figura 2-3 e 2-4) convertem dióxido de carbono em produtos do metabolismo fotossintético tais como biomassa celular e produtos excretados. Ambos podem ser utilizados para gerar biodiesel, biogás e ração animal, carboidratos livres e extratos protéicos; compostos orgânicos voláteis e hidrogênio (CHISTI, 2007), (YEN e BRUNE, 2007), (ISHIDA *et al.*, 1997), (MUÑOZ *et al.*, 2004), (YOON *et al.*, 2002). Também podem ser utilizadas para produção e bioprodutos utilizados na área farmacêutica (SCHIRMER e GAUER, 2012).

As microalgas englobam os protistas fotossintetisantes (LARKUM *et al.*, 2012). São capazes de realizar fotossíntese sob a incidência de luz solar e na presença de dióxido de carbono, contribuindo assim com a produção primária do planeta. Esta

capacidade de utilizar carbono na forma de CO₂ faz com tenham um papel importante na participação dos ciclos biogeoquímicos (BLACKBURN e VOLKMAN, 2012). A biorrefinaria de microalgas pode explorar o sistema fotossintético, pois gera produtos celulares passíveis de serem convertidos em outros com maior valor agregado (LOURENÇO, 2007).

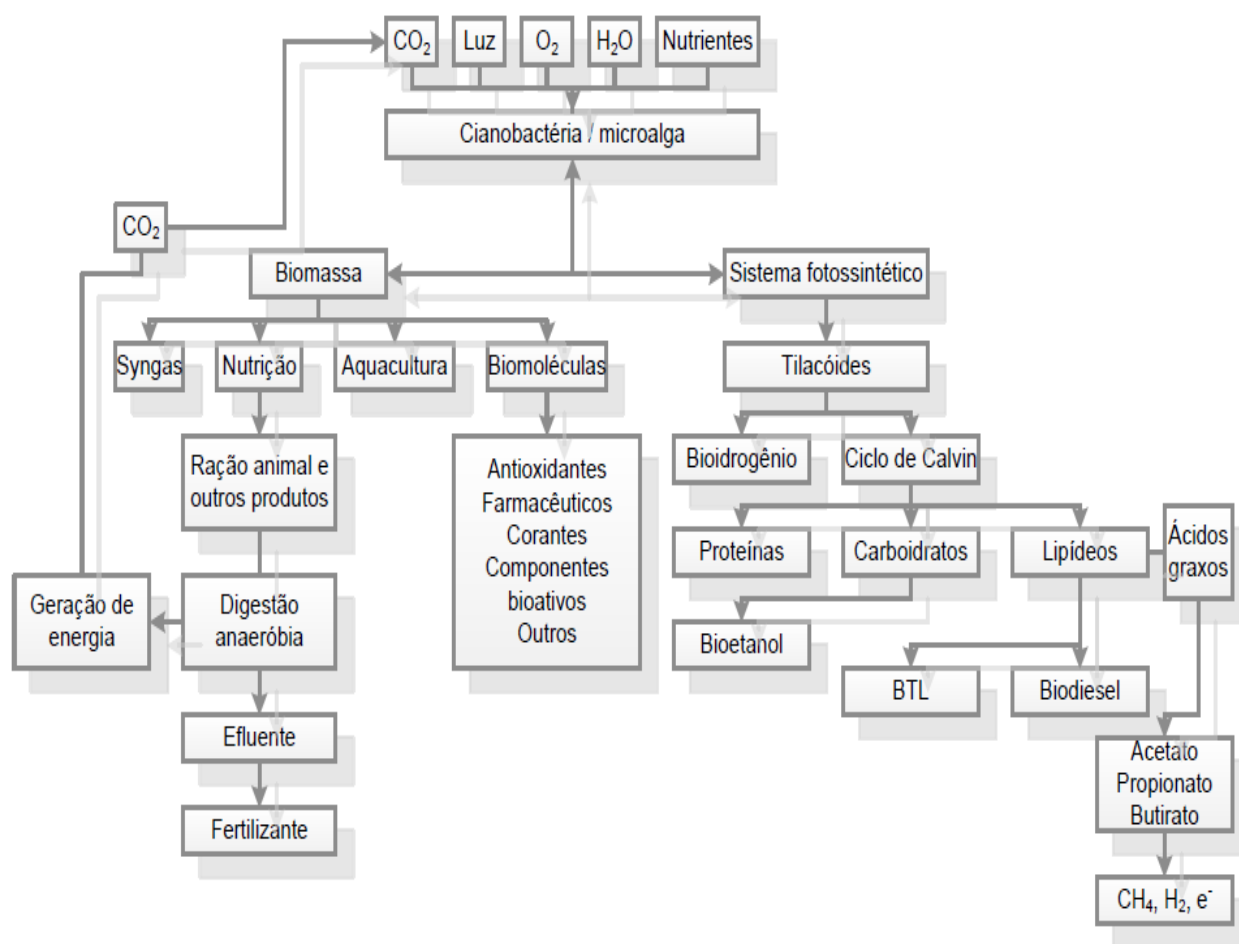


Figura 2-3 - Exemplo geral de uma biorrefinaria aplicada a microalgas

Adaptado de PARMAR *et al.* (2011)

Características metabólicas das microalgas fazem com que estas sejam importante recurso a ser explorado. As rotas metabólicas utilizadas em processos biotecnológicos estão associadas ao metabolismo fotossintético, à respiração e a fixação de nitrogênio (SUBRAMANIAN e THAJUDDIN, 2005).

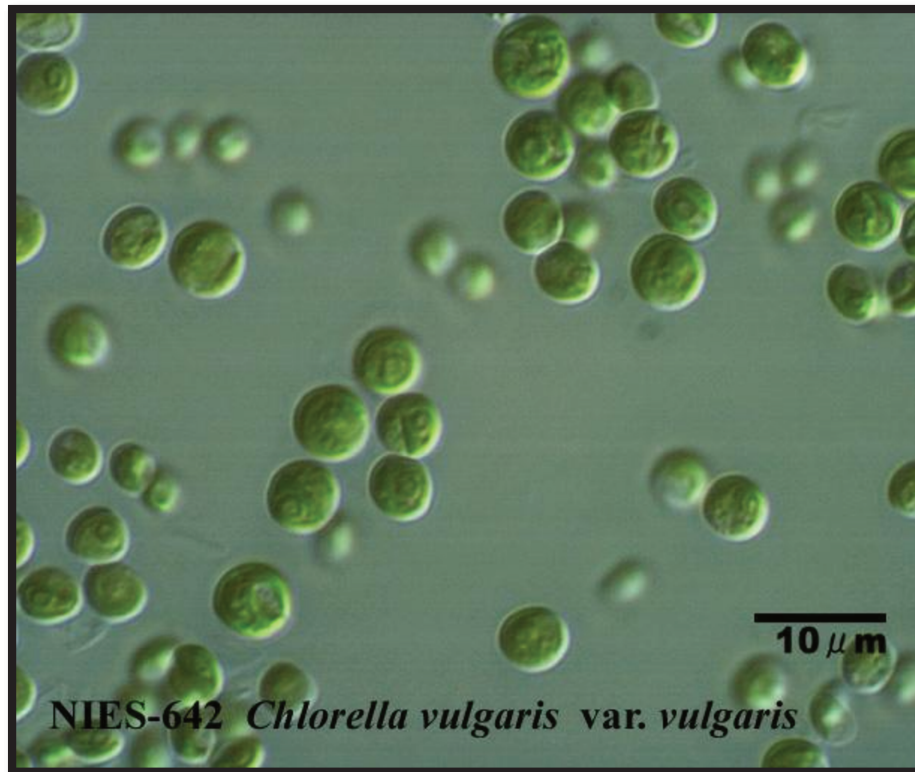


Figura 2-4 - Foto de: *Chlorella vulgaris*.

(<http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/strainDetailAction.do?strainId=26594>)

As microalgas apresentam como principal modelo metabólico a fotossíntese, processo que durante a evolução da biosfera atual, teve o papel central na elevação do nível de oxigênio da atmosfera terrestre (SCHMETTERER, 2004; JEON *et al.*, 2005). Alguns destes microrganismos possuem são versáteis no que se refere à manutenção

de suas estruturas, usufruindo dos diferentes metabolismos energéticos (DEMEYER *et al.*, 1982; GROSSMAN *et al.*, 2004).

Alguns gêneros de microalgas apresentam alta concentração de pigmentos, tais como a clorofila a, essencial para a fotossíntese. Outras duas classes de pigmentos envolvidos na captação de energia luminosa são os carotenóides e as ficolibinas. Os carotenóides são pigmentos lipossolúveis de cor vermelha, alaranjada ou amarela, encontrados em associação com a clorofila a. A terceira classe de pigmentos acessórios são as ficolibinas, a ficocianina, pigmento azul e a ficoeritrina de cor vermelha (FAY, 1983; LOURENÇO, 2007).

As microalgas são capazes de utilizar CO₂ dissolvido, íons bicarbonato e carbonato como fonte de carbono. A forma do carbono inorgânico disponível para os micro-organismos irá depender do pH do meio de cultivo Figura 2-5 . Estes são transportados através da fina membrana plasmática, e acumulados no interior da célula em reservatório de carbono inorgânico disponível para a fotossíntese. O bicarbonato é convertido a CO₂ pela ação da enzima anidrase carbônica (ZAK *et al.*, 2001; BADGER e PRICE, 2003).

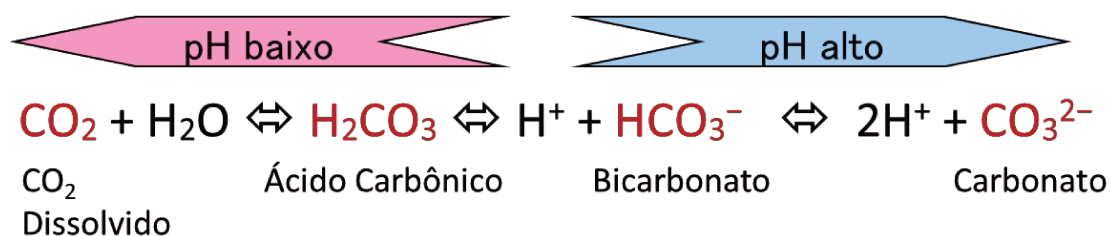


Figura 2-5 – Reações CO₂ em água considerando o pH. .

A principal característica da fotossíntese, originalmente elucidada para algas verdes e plantas superiores, pode também se aplicar para microalgas. A característica espectral da absorção da luz pelas microalgas é diferente dos outros organismos fotossintéticos, já que altas taxas de atividade fotossintética são medidas não somente na região espectral entre 665-680nm de comprimento de onda, onde a luz é melhor absorvida pela clorofila, mas também em torno de 620 nm a 560 nm, onde a ficocianina e ficoeritrina respectivamente (para o caso de cianobactérias), absorvem luz. Isto mostra que a luz absorvida pelas ficobiliproteínas é usada tão eficientemente quanto à luz absorvida pela clorofila, sugerindo elevada capacidade fotossintética destes microrganismos (CAMPBELL *et al.*, 1998; LOURENÇO, 2007; MELIS, 2009).

Além de realizarem a fotossíntese algumas microalgas têm a capacidade de utilizar carbono proveniente de fontes orgânicas (sistema heterotrófico) e desta forma crescerem sem a necessidade de uma fonte de luz (LEE, 2004). Nesta forma de cultivo podem ser utilizados resíduos agroindustriais como fonte nutricional de carbono, minimizando assim os custos do processo.

As microalgas se tornaram uma alternativa para mitigar a alta concentração de CO₂ na atmosfera como alternativa de neutralização de carbono (ZENG *et al.*, 2011). Ademais, estudos nestas áreas irão trazer avanços significativos para seu entendimento (LAM *et al.*, 2012).

2.2 Sistemas de Cultivo

Os processos biotecnológicos são conduzidos após avaliação dos fenômenos de transferência de massa e energia, do dimensionamento e na construção dos equipamentos onde se processam as reações bioquímicas bem como da operação dos sistemas de controle e instrumentação, que permitem o acompanhamento da cinética das biotransformações (WU e MERCHUK, 2004).

Fotobiorreatores utilizando microalgas para o tratamento de compostos poluentes e produção de biomassa são baseados em cinco critérios básicos: elevada eficiência de utilização da energia luminosa, adequado sistema de mistura, facilidade de controle das condições de cultivo como temperatura, quantidade de CO₂ injetada no sistema, agitação etc; reduzido estresse hidrodinâmico das células e facilidade para o aumento de escala (MUNOZ e GUIEYSSE, 2006).

Microrganismos fotossintéticos podem ser cultivados em fotobiorreatores abertos (Figura 2-6) ou fechados (Figura 2-7). Os sistemas fechados são caracterizados por elevadas eficiências fotossintéticas associadas a um preciso controle das variáveis operacionais, com menor risco de contaminação. Por outro lado, a construção dos sistemas fechados é mais cara, pois necessitam de material transparente, sendo mais complexos operacionalmente e de difícil escalonamento. A razão entre o volume por unidade de área do fotobiorreator é um critério a ser considerado na escolha dos sistemas, uma vez que sistemas abertos requerem grandes áreas disponíveis para elevados volumes reacionais (BOROWITZKA, 1999; MOLINA GRIMA *et al.*, 1999; JACOB-LOPES *et al.*, 2009).

GARCÍA-GONZÁLEZ *et al.* (2005) citam que a otimização dos sistemas operacionais para cultivo de microalgas depende particularmente da espécie do microrganismo, uma vez que as características fisiológicas e de crescimento irão determinar o desempenho dos sistemas. A microalga *Chlorella vulgaris* é um exemplo de microalga que se adapta facilmente as condições ambientais que a cercam e apresentam alta taxa de sobrevivência facilitando seu cultivo (LAM e LEE, 2012).



Figura 2-6 – Exemplos de fotobiorreatores utilizados em cultivos de microalgas com sistema aberto (open ponds). (SAVAGE, 2011)



Figura 2-7 – Exemplos de fotobiorreatores utilizados em cultivos fechados.

(http://www.bae.uky.edu/Biofuels/Algae/photo_gallery/photo_gallery.htm)

Neste sentido, variadas configurações de fotobiorreatores são propostas, considerando diferentes geometrias (STEWART e HESSAMI, 2005; ISSARAPAYUP *et al.*, 2011; PRUVOST *et al.*, 2011; SLEGERS *et al.*, 2011). Estes autores relatam que a etapa inicial do desenvolvimento destes processos em larga escala é definida como o

levantamento cinético em fotobiorreatores em escala de bancada. O requerimento energético do reator depende primariamente da geometria do mesmo, já que uma configuração adequada é considerada fundamental na dispersão de luminosidade na superfície do equipamento.

2.3 Bioconversão de Carbono

As microalgas são microrganismos que utilizam dióxido de carbono atmosférico na presença de energia luminosa. Podem ser utilizadas no tratamento de efluentes gasosos contendo elevadas concentrações de CO₂ gerados por descargas industriais (HSUEH *et al.*, 2007). Seu uso na remoção de matéria orgânica e demanda química de oxigênio (DQO) de efluentes tem também a vantagem de possibilitar a destinação da biomassa para ração animal ou uso em aquicultura, devido à composição química rica em proteínas, ácidos graxos poliinsaturados e vitaminas (SCHMITZ *et al.*, 2012).

As microalgas são capazes de fixar mais dióxido de carbono que o cultivo de plantas (SCHMITZ *et al.*, 2012). Sendo assim, numerosas pesquisas foram desenvolvidas especialmente no Japão, na década de 90, para conversão de dióxido de carbono em biomassa microalgal. Estes estudos foram intensificados, visando projetar sistemas operacionais eficientes e econômicos (WATANABE e HALL, 1996; WATANABE e SAIKI, 1997; CHENG *et al.*, 2006; ONO e CUELLO, 2006).

As microalgas fixam o dióxido de carbono por diferentes mecanismos. Em uma primeira etapa, o dióxido de carbono é dissolvido na fase aquosa do sistema (YEHOUDA, 1997; LEE *et al.*, 2006). A fixação de carbono relacionada com o ciclo de Calvin-Benson, onde enzimas especializadas presentes nestes organismos catalisam

reações de incorporação de átomos de carbono, esta envolvida na fotossíntese (FALKOWSKI, 1997). A conversão biológica do dióxido de carbono resulta em produtos do metabolismo fotossintético como células, oxigênio e biopolímeros solúveis no meio de cultivo (REBOLLOSO FUENTES *et al.*, 1999; ACIEN FERNANDEZ *et al.*, 2005). Adicionalmente, a formação de compostos orgânicos voláteis, como hidrocarbonetos, organoalogenados e aldeídos vêm sendo considerada importante nestes processos naturais (MUÑOZ *et al.*, 2004; JACOB-LOPES *et al.*, 2010; LINDBERG *et al.*, 2010) assim como a produção de hidrogênio (HEMSCHEMEIER *et al.*, 2009).

Diversas espécies de microalgas foram avaliadas quanto ao potencial de aplicação em processos de fixação de carbono nas melhores condições operacionais dos fotobiorreatores; bem como na avaliação da cinética de consumo de dióxido de carbono, formação de células e produtos do metabolismo fotossintético (Figura 2-8) (STEWART e HESSAMI, 2005; MUNOZ e GUIEYSSE, 2006; LINDBERG *et al.*, 2010; EROGLU *et al.*, 2011).

2.4 Produtos gerados por microalgas

Os trabalhos iniciais descrevendo a conversão de dióxido de carbono em fotobiorreatores baseavam-se na análise elementar da biomassa de microalgas, análises estequiométricas e a fração de CO₂ fixado. Foi sugerido que a fixação do elemento carbono ocorria predominantemente nas células microbianas (SACHIO, 1995; KAJIWARA *et al.*, 1997). Porém, posteriormente, alguns autores usando outros recursos instrumentais, como sensores polarográficos, cromatografia gasosa, espectrometria de massas e analisadores de carbono total concluíram em seus

estudos, que apenas uma pequena fração do dióxido de carbono alimentado nos fotobiorreatores é efetivamente convertida em biomassa (ERIKSEN *et al.*, 2007; CHIU, S.-Y. *et al.*, 2008; JACOB-LOPES *et al.*, 2008). Segundo os dados de CHIU, S.-Y. *et al.* (2008), percentual médio de 3,9% do CO₂ alimentado é fixado nas células da microalga *Chlorella sp.*, o qual varia com a concentração do gás de alimentação.

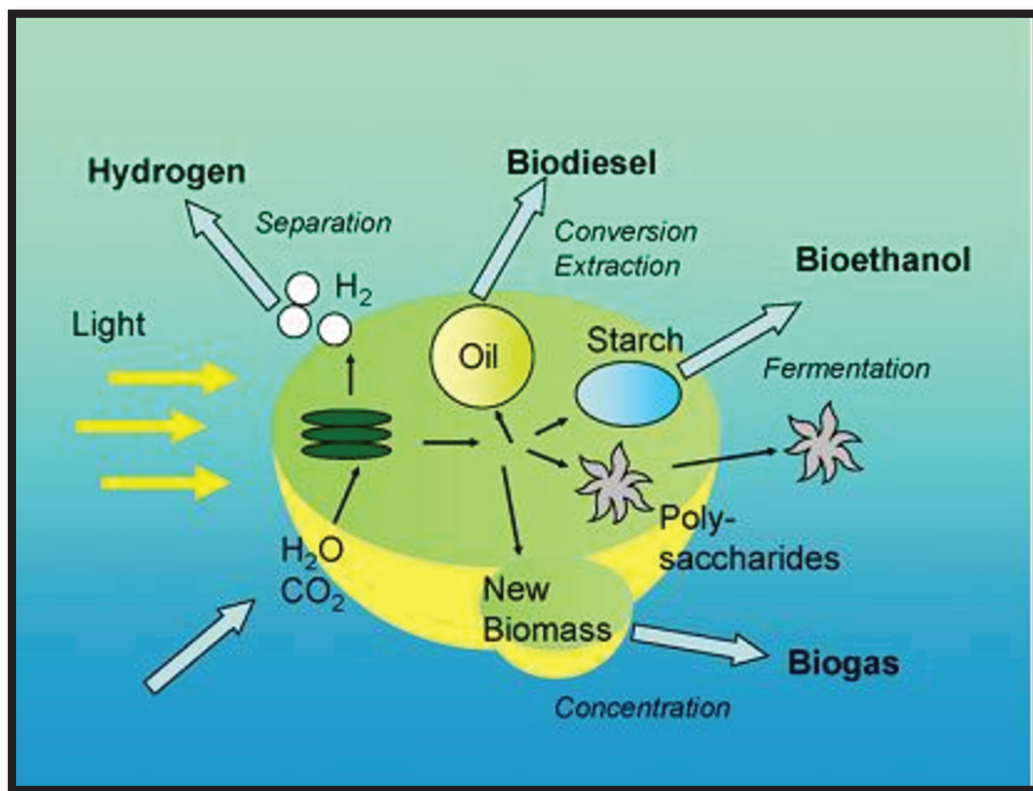


Figura 2-8 – Produtos possíveis de serem obtidos com cultivos microalgais. (POSTEN e SCHAUB, 2009)

DE PHILIPPIS e VINCENZINI (1998); YOU e BARNETT (2004); EROGLU e MELIS (2009); 2010) relatam que espécies de microalgas produzem consideráveis quantidades de carboidratos extracelulares excretados em cultivos fotossintéticos. Segundo estes autores, as concentrações de exocarbohidratos superam a concentração celular em determinadas condições de cultivo, como resultado de estresse ambiental,

tal como elevada concentração de CO₂. Estes compostos podem ser utilizados como bioemulsificantes, agentes de clarificação de líquidos (biofloculantes) e substitutos de agar, na indústria farmacêutica e cosmética (agentes para clareamento de pele e ação antiviral) (VAN BEILEN, 2010).

Adicionalmente, a produção de hidrocarbonetos voláteis (etano, eteno, propano, propeno, butano, isobutano, pentano, hexano, isopreno e etileno) (SCHOBERT e ELSTNER, 1980; SHAW *et al.*, 2003), organohalogêneos (clorofórmio, percloroetileno, tricloroetileno, clorometano e bromometano, iodometano) (SCARRATT e MOORE, 1996) e aldeídos (propanal, hexanal, n-heptanal, formaldeído, acetaldeído, furfural e valeraldeído) (SCHOBERT e ELSTNER, 1980; NUCCIO *et al.*, 1995; EROGLU e MELIS, 2010), foi descrita em cultivos fotossintéticos de microalgas. Estes compostos são formados e desprendidos da fase líquida dos sistemas. Recentemente, as indústrias petroquímicas demonstram interesse no uso de fontes naturais de monômeros para a produção de polímeros, como por exemplo, eteno, propeno e isopreno, além da possibilidade do uso do propano e butano como combustível (SHAO *et al.*, 2008).

Finalmente, deve-se considerar que embora a formação de biomassa não corresponda a mais significativa fração da conversão de dióxido de carbono, a mesma é considerada comercialmente relevante nestes processos, já que muitas espécies de microalgas são capazes de acumular até 80% de lipídeos em peso seco. Neste sentido, o uso da biomassa microalgal para a fabricação de biodiesel é considerada, sob o ponto de vista científico, uma alternativa viável para a manufatura de biocombustíveis de terceira geração (CHISTI, 2008; CHISTI e YAN, 2011). Segundo estes autores, se a

produção da biomassa de microalgas em fotobiorreatores puder ser ampliada em escala industrial, seriam necessários menos de 6 milhões de hectares para suprir a demanda atual de combustíveis, o que equivalem a menos de 0,4% da área arável disponível.

3 - OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

Avaliar a bioconversão de dióxido de carbono em fotobiorreatores por microalgas, visando padronizar os métodos a serem utilizados e para caracterização dos bioprodutos formados.

3.2 *Objetivos específicos*

1. Padronizar método para determinação do teor de umidade
2. Padronizar método para extração de lipídeos.
3. Avaliar os parâmetros cinéticos de crescimento do microrganismo;
4. Definir a capacidade de eliminação e eficiência de remoção de CO₂;
5. Determinar os perfis de concentração de carbono inorgânico e orgânico nas fases líquida e gasosa dos sistemas;
6. Padronizar método para cálculo de balanço de carbono simples para o sistema
7. Estabelecer as possíveis rotas de conversão nas fases sólida e gasosa do sistema
8. Avaliar os compostos orgânicos voláteis produzidos;

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

Chlorella vulgaris (CPCC 90) foi adquirida do Canadian Phycological Culture Centre em 08/2009 em tubo contendo meio de cultura. Esta cultura foi mantida e repicada para outros tubos contendo meio padrão BBM sólido. Após sete dias estes foram colocados, propagadas e mantidas em meio padrão BBM líquido (Tabela 4-1), nas condições de 20 °C, $15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luminosidade durante e 24 h e agitação constante.

Tabela 4-1: Composição BBM (Bolds Basal Medium) (pH 6,8).

Composto	Solução Estoque (g·L ⁻¹)	ml·L ⁻¹ _{meio}	Composto	Solução Estoque (g·L ⁻¹)	ml·L ⁻¹ _{meio}
EDTA anidro	50,00	1	Fe ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	4,98	1
KOH	31,00		H ₂ SO ₄	1 (ml)	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,50	10	H ₃ BO ₃	11,42	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,50	10	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,82	1
K ₂ HPO ₄	7,50	10	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,44	
KH ₂ PO ₄	17,50	10	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,57	
NaCl	2,50	10	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,49	
NaNO ₃	25,00	10	MoO ₃	0,71	

STEIN, J. Handbook of Phycological methods: Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press, 1973.

4.2 Fotobiorreator

Os experimentos foram realizados em um fotobiorreator do tipo coluna de bolhas construído em vidro tipo pirex com 5 mm de espessura, 7,0 cm de diâmetro interno e 70,0 cm de altura, mostrando volume de trabalho de 2,0 L. O sistema de dispersão de

ar consistiu em um difusor de pedra porosa de 1,5 cm de diâmetro localizado no centro da coluna. A câmara de fotoperíodo em que o reator se localiza contém 16 lâmpadas fluorescentes de 40 W conectadas em paralelo (General Eletric). A injeção da mistura de ar com dióxido de carbono no fotobiorreator foi provida com ar comprimido e dióxido de carbono industrial obtido por meio de um cilindro de gás (White Martins). A vazão de ar, CO₂ e a mistura entre os gases foi controlada por 2 rotômetros (Key Instruments) mantendo a concentração de 10%. A Figura 4-1e a Figura 4-2 apresentam o esquema do fotobiorreator utilizado nos experimentos.

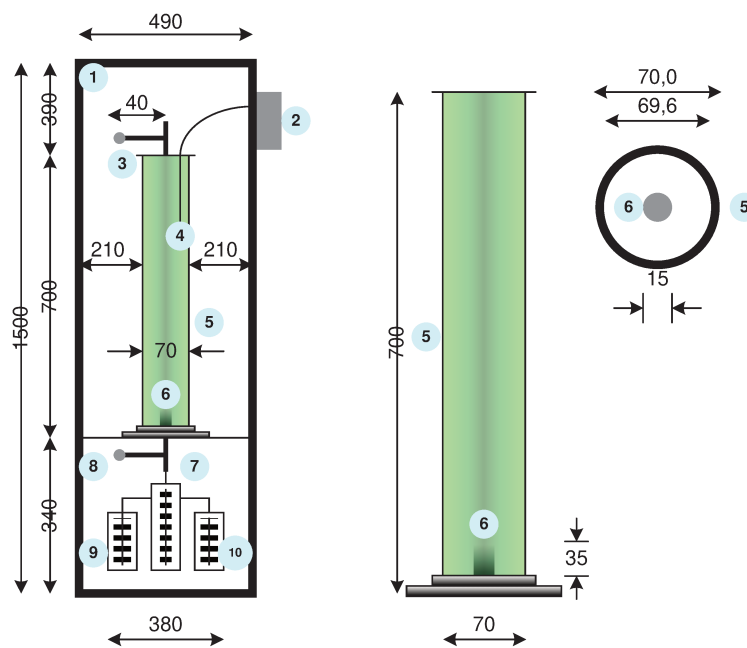


Figura 4-1 - Diagrama do Diagrama experimental: 1:Câmara de fotoperíodo; 2: Analisador de pH, temperatura e CO₂; 3: Sensores de pH, temperatura e CO₂; 4: Fotobiorreator; 5: Sistema para controle da vazão e mistura de gases; 6: Difusor de gases; 7, 8, 9, 10 controladores dos gases. Todas as dimensões em mm. Obtenção dos dados cinéticos

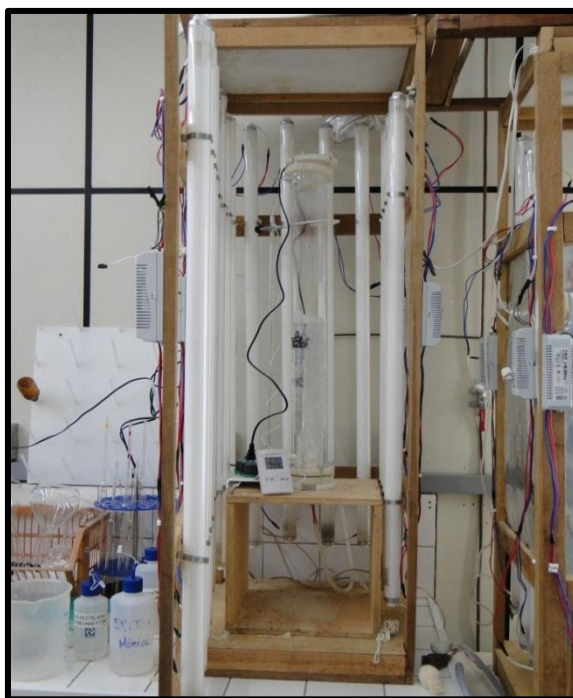


Figura 4-2 – Aparato experimental utilizado para realização dos experimentos.

Durante o cultivo foram coletadas amostras de meio de cultivo e do fluxo de gás da entrada e saída do reator para análises de:

- pH;
- Biomassa;
- Carbono inorgânico dissolvido no meio;
- Carbono total dissolvido no meio;
- Carbono total na fase gasosa: entrada e saída do reator;
- Carbono inorgânico na fase gasosa: entrada e saída do reator;
- Concentração de CO_2 : entrada e saída do reator
- Concentração de O_2 entrada e saída do reator;
- Amostragem de meio de cultivo para análises de VOC;
- Amostragem de gás da saída do reator para análises de VOC;

- Biomassa final do cultivo para determinação do teor de lipídeos e caracterização dos ácidos graxos.

Determinações Analíticas

4.3 Determinação de pH

Uma amostra de meio de cultivo foi coletada e agitada com auxílio de agitador magnético durante 15 min para completa remoção do dióxido de carbono dissolvido e analisada com potenciômetro a cada 12 h de cultivo.

4.4 Biomassa

A concentração celular foi avaliada gravimetricamente, através da filtração de um volume conhecido de meio de cultura em filtro de diâmetro 0,22 µm, seco a 60 °C por 24 h. Os resultados de biomassa foram utilizados para os cálculos de:

- Velocidade específica máxima de crescimento, obtida na fase linear da concentração celular versus tempo.

$$\mu_{max}t = \frac{\ln X}{X_0} \quad 4.1$$

- Produtividade

$$P_X = \left(\frac{X_i - X_{i-1}}{t_i - t_{i-1}} \right) \quad 4.2$$

- Tempo de geração

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{max}} \quad 4.3$$

- Taxa de incorporação de carbono na biomassa

Este resultado foi utilizado para o cálculo do balanço de carbono do sistema de cultivo e, para este fim, é necessário calcular a taxa de produção deste em cada ponto do cultivo. O cálculo é feito em três etapas:

1ª etapa: o valor de concentração medido deve ser multiplicado pelo volume do reator (V_R)

$$Biomassa(mg) = Biomassa(mg \cdot L^{-1}) \times V_R(L) \quad 4.4$$

2ª etapa: o resultado deve ser multiplicado pela porcentagem de carbono presente na biomassa. Este valor é obtido pela determinação da composição elementar (49% de carbono na biomassa de *C. vulgaris*, resultado obtido por análise elementar da biomassa)

$$C_b(mg) = Biomassa(mg) \times 0,49 \quad 4.5$$

3ª etapa: calcular a variação na concentração de C_b com o tempo

$$C_b(mg \cdot h^{-1}) = \frac{C_{b_i} - C_{b_{i-1}}(mg)}{t_i - t_{i-1}(h)} \quad 4.6$$

Desta forma, os resultados em $mg \cdot h^{-1}$ de C_b para cada um dos tempos de cultivo são obtidos.

4.5 Determinações de carbono nas fases líquida e gasosa

Carbono total nas fases líquida e gasosa do sistema foram realizadas em um analisador de carbono TOC-VCSN (Shimadzu, Kyoto, Japão) (Figura 4-3) com catalisador (Platina sobre 1/8" pellet alumina) de sensibilidade normal. O equipamento mede a quantidade de carbono total (CT) e carbono inorgânico (CI) da amostra nas fases líquida e gasosa do sistema. A medida do carbono orgânico total (COT) é dada pela diferença entre CT e CI.



Figura 4-3 - Analisador de carbono TOC-VCSN (Shimadzu, Kyoto, Japão)

4.5.1 Carbono total dissolvido no meio de cultivo

Para a determinação de carbono total, a amostra injetada foi carregada para um tubo de combustão a 680 °C, no qual ocorre a oxidação catalítica a CO₂. As concentrações são obtidas por interpolação utilizando curvas analíticas (área do pico × concentração) realizadas previamente por injeção de padrões (biftalato de potássio).

Estes resultados de concentração de CT são utilizados para o cálculo da concentração de carbono orgânico dissolvido no meio de cultivo.

$$COD(mg \cdot L^{-1}) = CTD(mg \cdot L^{-1}) - CID(mg \cdot L^{-1}) \quad 4.7$$

4.5.2 Carbono Inorgânico dissolvido no meio de cultivo

Para a determinação de carbono inorgânico, a amostra injetada reage com o ácido clorídrico $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, sendo que todo carbono inorgânico é convertido a CO_2 . O CO_2 produzido é quantificado por absorção no infravermelho não dispersivo. As concentrações foram obtidas por interpolação utilizando curvas analíticas (área do pico \times concentração) realizadas previamente por injeção de padrões (Carbonato de sódio e bicarbonato de sódio).

Este resultado foi utilizado para o cálculo do balanço de carbono do sistema de cultivo. Para este fim é necessário calcular a taxa de consumo deste em cada ponto do cultivo. O cálculo é feito em duas etapas:

1ª etapa: o valor de concentração medido deve ser multiplicado pelo volume do reator (V_R)

$$CID(mg) = CID(mg \cdot L^{-1}) \times V_R(L) \quad 4.8$$

2ª etapa: calcular a variação na concentração de CI com o tempo

$$CID_{t_i}(mg \cdot h^{-1}) = \frac{CID_i - CID_{i-1}(mg)}{t_i - t_{i-1}(h)} \quad 4.9$$

Desta forma, os resultados em $mg \cdot h^{-1}$ de CID para cada um dos tempos de cultivo são obtidos.

4.5.3 Carbono Orgânico dissolvido no meio de cultivo

O COD foi calculado pela diferença entre o CTD e o CID, este cálculo foi feito pelo equipamento considerando a média entre 3 injeções para cada análise.

Este resultado foi utilizado para o cálculo do balanço de carbono do sistema de cultivo e, para este fim, foi necessário calcular a taxa de consumo deste em cada ponto do cultivo, o calculo foi feito em duas etapas:

1ª etapa: o valor de concentração medido deve ser multiplicado pelo volume do reator (V_R)

$$COD(mg) = COD(mg \cdot L^{-1}) \times V_R(L) \quad 4.10$$

2ª etapa: calcular a variação na concentração de CI com o tempo

$$COD_{t_i}(mg \cdot h^{-1}) = \frac{COD_i - COD_{i-1}(mg)}{t_i - t_{i-1}(h)} \quad 4.11$$

Desta forma os resultados em $mg \cdot h^{-1}$ de COD para cada um dos tempos de cultivo são obtidos.

4.5.4 Carbono total na entrada e na saída do reator

Para a determinação da concentração de CT, amostras de 50 µL de gás coletadas no fluxo de entrada e saída do reator foram injetadas no tubo de combustão do equipamento onde ocorre a oxidação catalítica a CO₂. Este foi analisado por detector de infravermelho não dispersivo. As concentrações são obtidas por interpolação utilizando curvas analíticas (área do pico × concentração) realizadas previamente por injeção de padrão (CO₂ puro) gasoso para analisador de carbono.

Estes resultados foram utilizados para o cálculo da concentração de CO na fase gasosa na entrada e na saída do reator.

$$CO(mg \cdot L^{-1}) = CT(mg \cdot L^{-1}) - CI(mg \cdot L^{-1}) \quad 4.12$$

4.5.5 Carbono Inorgânico na entrada e na saída do reator

As determinações de CI nas amostras gasosas foram feitas com injeção de 40 µL de gás coletado no fluxo de entrada e saída do reator. As amostras foram injetadas diretamente no detector de absorção no infravermelho não dispersivo para quantificação do CO₂ presente na amostra. As concentrações foram obtidas por interpolação utilizando curvas analíticas (área do pico × concentração) realizadas previamente por injeção de padrões.

Os resultados de CI foram utilizados para o cálculo do BMC, porém, para isso devem ser convertidos para mgC·h⁻¹. Isso foi feito com a multiplicação pela vazão de gás utilizada.

$$CI(mg \cdot h^{-1}) = CI(mg \cdot L^{-1}) \times \vartheta(L \cdot min^{-1}) \quad 4.13$$

Desta forma, para cada tempo de amostragem foi obtido um valor do fluxo de carbono inorgânico presente na entrada e na saída do reator. No caso da entrada é desejável que todos os valores sejam iguais ou próximos.

4.5.6 Carbono orgânico na entrada e na saída do reator

O CO é calculado pela diferença entre o CT e o CI, este cálculo é feito considerando a média entre 3 injeções para cada análise.

Este resultado é utilizado para o cálculo do balanço de carbono do sistema de cultivo verificando assim quanto foi produzido de VOC, porém, para isso devem ser convertidos para $mgC \cdot h^{-1}$. Isso é feito com a multiplicação pela vazão de gás utilizada

$$CO(mg \cdot h^{-1}) = CO(mg \cdot L^{-1}) \times \vartheta(L \cdot min^{-1}) \quad 4.14$$

Desta forma, são obtidos os resultados em $mg \cdot h^{-1}$ de CO para cada um dos tempos de cultivo.

4.6 Determinação de CO_2 e O_2 na fase gasosa de entrada e de saída do reator

As determinações de CO_2 e O_2 em fase gasosa na entrada e na saída do reator foram feitas em cromatógrafo a gás 2014 (Shimadzu Kyoto, Japão) (Figura 4-4) com detector de condutividade térmica (TCD) e coluna recheada 60/80 Carboxen-1000, 15' x

1/8" SS (2.1mm D.I.). As condições de análise utilizadas foram: 35 °C (5 min) e aumento de 20 °C·min⁻¹ até 225 °C utilizando hélio 30 mL·min⁻¹ como gás de arraste.



Figura 4-4 - Cromatógrafo a gás modelo 2014 Shimadzu.

As determinações foram feitas injetando-se 0,5 mL do fluxo da mistura gasosa da entrada e saída do reator no equipamento. As quantificações são feitas por comparação com curva analítica construída com variações no volume de injeção dos compostos (CO₂: cilindro do tipo industrial; O₂: oxigênio analítico 6.0).

Estes resultados são utilizados no cálculo da taxa de consumo de CO₂ (Equação 4.15) e taxa de produção de O₂ (Equação 4.16).

$$r_{CO_2} (mg \cdot L^{-1} \cdot min^{-1}) = \frac{(C_{CO_2o} - C_{CO_2i}) \times Q}{V_R} \quad 4.15$$

$$r_{O_2} (mg \cdot L^{-1} \cdot min^{-1}) = \frac{(C_{O_2i} - C_{O_2o}) \times Q}{V_R} \quad 4.16$$

Com os dados obtidos pelas Equações 4.15 a 4.16, é possível construir gráficos das taxas de consumo de dióxido de carbono e produção de oxigênio, que possibilitam uma visualização mais clara dos resultados identificando em qual tempo de cultivo foram obtidos melhores conversões de CO₂.

4.7 Balanço de massa de carbono (BMC)

O BMC deve ser feito considerando todas as frações de carbono presentes no sistema de cultivo.

$$CI_{entrada} = CI_{saída} + CID + COD + C_B + CO_{saída} \quad 4.17$$

Como é sistema trifásico com fases sólida (biomassa) e líquida (CID e COD) e com fase gasosa (CO e CI) em fluxo, para estabelecer o balanço de massa todas as frações devem estar na mesma unidade (mg·h⁻¹) que correspondente aos fluxos de para cada uma delas.

Os valores correspondentes são calculados a partir dos dados obtidos segundo as Equações 4.4 a 4.14 para todos os tempos de cultivo, de forma a construir uma tabela com todos os dados para cada uma das frações podendo, assim, calcular o BMC. Assim, foram utilizados os dados onde a bioconversão de carbono foi próxima e um fluxograma foi construído onde todos os fluxos de entrada e saída do sistema são considerados facilitando, assim, a visualização dos resultados.

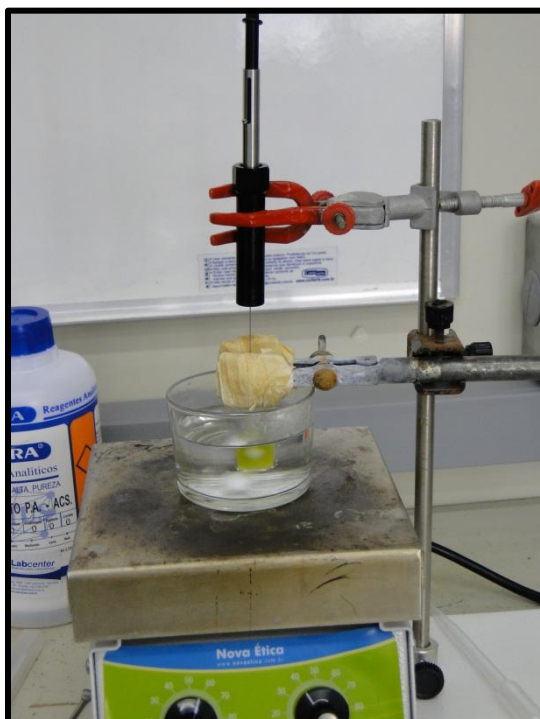
4.8 Análise de Compostos Orgânicos Voláteis (VOC)

Para a determinação dos Compostos Orgânicos Voláteis produzidos foi feita utilizando a técnica de microextração em fase sólida (SPME), para extração e pré-concentração das amostras foram utilizadas fibras de divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) 50/30 μm de espessura (Supelco - Bellefonte, PA, USA) (Figura 4-5).



Figura 4-5 – Fibras SPME utilizadas: fibra colocada em holder utilizado nas amostragens.

Para amostragem a fibra foi exposta ao “headspace” de uma amostra de 1 mL do conteúdo do reator saturada com NaCl durante 30 min (Figura 4-6).



(a)



(a)

Figura 4-6 - (a) aparato experimental utilizado para a coleta de VOC; (b) injeção dos VOC coletados por SPME em cromatógrafo.

Após coletadas, as amostras foram diretamente analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetria de massas com analisador tipo quadrupolo modelo QP2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japão) (Figura 4-7) utilizando coluna Rtx5 – MS (Restek) (30 m, 0.25 mm ID e 0.25 μm df). Para dessorção dos analitos, a fibra foi colocada no injetor à temperatura de 250 °C durante 15 min.



Figura 4-7 - Cromatógrafo à gás acoplado à espectrômetro de massas GC/MS - QP 2010 Plus

A programação de temperatura utilizada foi 31 °C durante 4 min, de 31 °C a 100 °C a 5 °C·min⁻¹, de 100 °C a 190 °C a 2 °C·min⁻¹ e de 190 °C a 250 °C a 10 °C·min⁻¹; o fluxo de gás utilizado é de 31,6 mL·min⁻¹ com hélio como gás de arraste. O multiplicador de elétrons é utilizado em 0,75 kV operando em modo scan de 35 a 500 Th. A identificação foi feita por comparação dos espectros de massas obtidos com biblioteca NIST 8 e NIST 8.1.

4.9 - Determinação do teor de umidade

4.9.1 Aplicação

O método para determinação do teor de umidade foi desenvolvido a partir de procedimentos descritos por AOAC e NREL (AOAC, 2000), (SLUITER *et al.*, 2008).

4.9.2 Amostragem e preparação da amostra

4.9.2.1 Preparação da biomassa

A biomassa utilizada para extração foi gerada durante o cultivo de microalgas foi obtida por centrifugação a 8000 rpm durante 10 min, lavada duas vezes com água destilada para remover resíduos. Após a centrifugação as amostras devem ser transferidas para placas de Petri previamente aferidas, porém, o frasco deverá ser adequado à quantidade de amostra para redução de perdas.

4.9.2.2 Aferição placas de Petri

Para aferir a massa das placas de Petri ou de qualquer outro frasco que possa ser utilizado o material deve ser colocado em estufa a 105 °C durante 4 h, após este tempo o material deve ser colocado em dessecador para que atinja a temperatura ambiente. Após atingir a temperatura os frascos são pesados em balança analítica e os valores anotados.

4.9.2.3 Liofilização da amostra

Após a centrifugação, 1 g de biomassa foi colocado em frascos previamente aferidos e congelado a -80 °C durante 24 h antes de serem liofilizadas. Em seguida, as amostras foram colocadas em placas de Petri, pesadas e mantidas em estufa a 60 °C antes de serem aferidas até peso constante.

4.9.2.4 Secagem com estufa

Após a centrifugação, foram pesadas amostras de aproximadamente 1 g para minimizar o erro e foram colocadas em placas de Petri previamente aferidas e posteriormente colocadas em estufa a 105 °C durante 4 h. Para a determinação do

peso da biomassa restante, o material deve ser retirado da estufa e colocado em dessecador até atingir a temperatura ambiente, e, logo após pesado, deve voltar à estufa por 15 min, resfriado em dessecador, este processo foi repetido até peso constante.

4.10 Extração e quantificação de lipídios de microalgas

4.10.1 Aplicação

O método para extração de lipídeos foi desenvolvido baseado no método de BLIGH e DYER (1959) (B&D) para extração utilizando uma mistura de solventes (metanol e clorofórmio) e quantificação por gravimetria. Este método é amplamente utilizado para extração de lipídeos totais porém não é um padrão de conduta para este tipo de extrações. Outro método que pode ser utilizado para as extrações de lipídeos é o Soxlet com hexano como solvente.

O método B&D pode ser utilizado em biomassa de microalgas úmida ou liofilizada, sendo que para a biomassa úmida o teor de umidade deve ser medido para posterior correlação. A extração foi feita em etapas, na primeira, a amostra é digerida com ácido clorídrico para romper as paredes celulares e depois os lipídeos foram extraídos com a mistura de solventes. Após a extração o excesso de solvente foi removido e a quantificação feita por gravimetria.

4.10.2 Amostragem e Preparação da Amostra

4.10.2.1 Preparação da biomassa liofilizada e úmida

A biomassa utilizada para extração, gerada no cultivo das microalgas, foi centrifugada a 8000 rpm durante 10 min, lavada duas vezes com água destilada para remover resíduos. No caso da biomassa úmida, os lipídios foram extraídos logo após a centrifugação, não sendo adequado guardar a biomassa. Quando a extração for realizada com biomassa úmida deverá ser feito a determinação da umidade presente na amostra seguindo o procedimento descrito no Item 4.9.2.1. Para as amostras liofilizadas, após a centrifugação a biomassa foi colocada em frasco com grande superfície como, por exemplo, placa de Petri, (dependendo da quantidade de amostra e do equipamento) e liofilizada segundo o processo do equipamento que será utilizado.

4.11 - Extração de lipídios

O método de B&D é um dos métodos mais utilizados para extração e quantificação de lipídeos por ser relativamente simples e apresentar reprodutibilidade. A extração é feita com uma mistura de solventes orgânicos (metanol e clorofórmio) visando criar um sistema trifásico onde os lipídeos ficam dissolvidos em clorofórmio podendo ser separados da biomassa. Neste método clássico o metanol e o clorofórmio são adicionados antes da água. Pela literatura é possível observar que existem algumas modificações do método B&D descritas, visando melhor desempenho na extração de lipídeos. Desta forma para avaliar qual seria o método mais adequado para

as extrações, foram utilizados os Métodos B&D sem modificações na amostra, com digestão ácida e com tratamento por métodos físicos de rompimento celular.

4.11.1 Digestão ácida da amostra.

- Foram pesados 400 mg de biomassa liofilizada em balança analítica ou biomassa úmida centrifugada e transferidas para tubos de ensaio de vidro com tampa de rosca.
- Foram adicionados 5 mL de HCl 2 mol·L⁻¹ à biomassa, a mistura foi homogeneizada com auxílio do vortex e tubo bem fechado.
- Os tubos foram colocados em banho termostatizado a 80 °C durante 1 h para a digestão da amostra;
- Após este tempo os tubos foram resfriados em água à temperatura ambiente;
- A mistura foi centrifugada a 2000 rpm durante 15 min para separar a biomassa e o resíduo de ácido;

O pellet de biomassa poderá ficar no fundo do tubo ou na superfície do líquido, dependendo do conteúdo de lipídeos presente na amostra;

- O resíduo de ácido foi removido utilizando a seringa de vidro com agulha longa ou pipeta de Pasteur e descartado em frasco adequado para resíduos.

4.11.2 Extração dos lipídeos

- Foram adicionados 4 mL de metanol ao tubo de vidro contendo biomassa digerida. Os mesmos foram agitados com o auxílio de vortex e a suspensão foi transferida para tubo tipo “falcon” de 15 mL (esta transferência deve ser feita de forma gradativa para evitar perdas);

Deve-se usar uma fita de teflon veda-rosca ou “parafilm” para evitar vazamentos durante a agitação.

- Foram adicionados 2 mL de clorofórmio à suspensão e a mistura agitada com auxílio de vortex durante 2 min;
- Após a agitação foram adicionados mais 2 mL de clorofórmio e a mistura agitada novamente com auxílio de vortex durante 2 min;
- Foram adicionados 3,6 mL de água destilada e a mistura foi agitada com auxílio de vortex durante 2 min;
- A mistura foi centrifugada em centrífuga de tubos a aproximadamente 2000 rpm durante 15 min;

Após a centrifugação, foi obtido um sistema trifásico composto de fase inferior (clorofórmica onde estão dissolvidos os lipídeos), sólido interfacial (biomassa) e uma fase líquida superior composta por metanol e água.

- A fase inferior contendo lipídeos foi retirada utilizando a seringa de vidro com agulha longa (pode-se utilizar pipeta de Pasteur) e transferida para um balão de fundo redondo com boca esmerilhada já aferido e aferido;

A seringa e a agulha foram limpas com metanol e água deionizada todas as vezes que se removeu a fase inferior.

- Para a re-extração dos lipídeos que ainda estavam na biomassa foram adicionados 4 mL da solução 10% v/v de Metanol em Clorofórmio às fases que restavam no tubo tipo falcon de centrifuga (biomassa+metanol+água) e a mistura foi agitada com auxílio de vortex durante 2 min;

- A mistura foi centrifugada a aproximadamente 2000 rpm durante 15 min; A fase inferior onde estão os lipídeos foi retirada e colocada no balão de fundo redondo juntamente com o primeiro extrato;
- O procedimento de re-extração foi repetido mais uma vez;
- O metanol foi descartado em frasco de resíduo adequado.
- Evaporação do clorofórmio; a evaporação do excesso de clorofórmio deve ser feita evaporador rotatório a 75 °C sob vácuo de até 30 polegadas de Hg ou a 85 °C a pressão ambiente.
- Para determinar o teor de lipídeos o balão deve ser seco em estufa até obter peso constante à aprox. 60 °C durante 24 h ou 105 °C durante 8 h e depois pesado em balança analítica até peso constante.

Na Figura 4-8 está apresentado um fluxograma deste procedimento para auxiliar durante a extração.

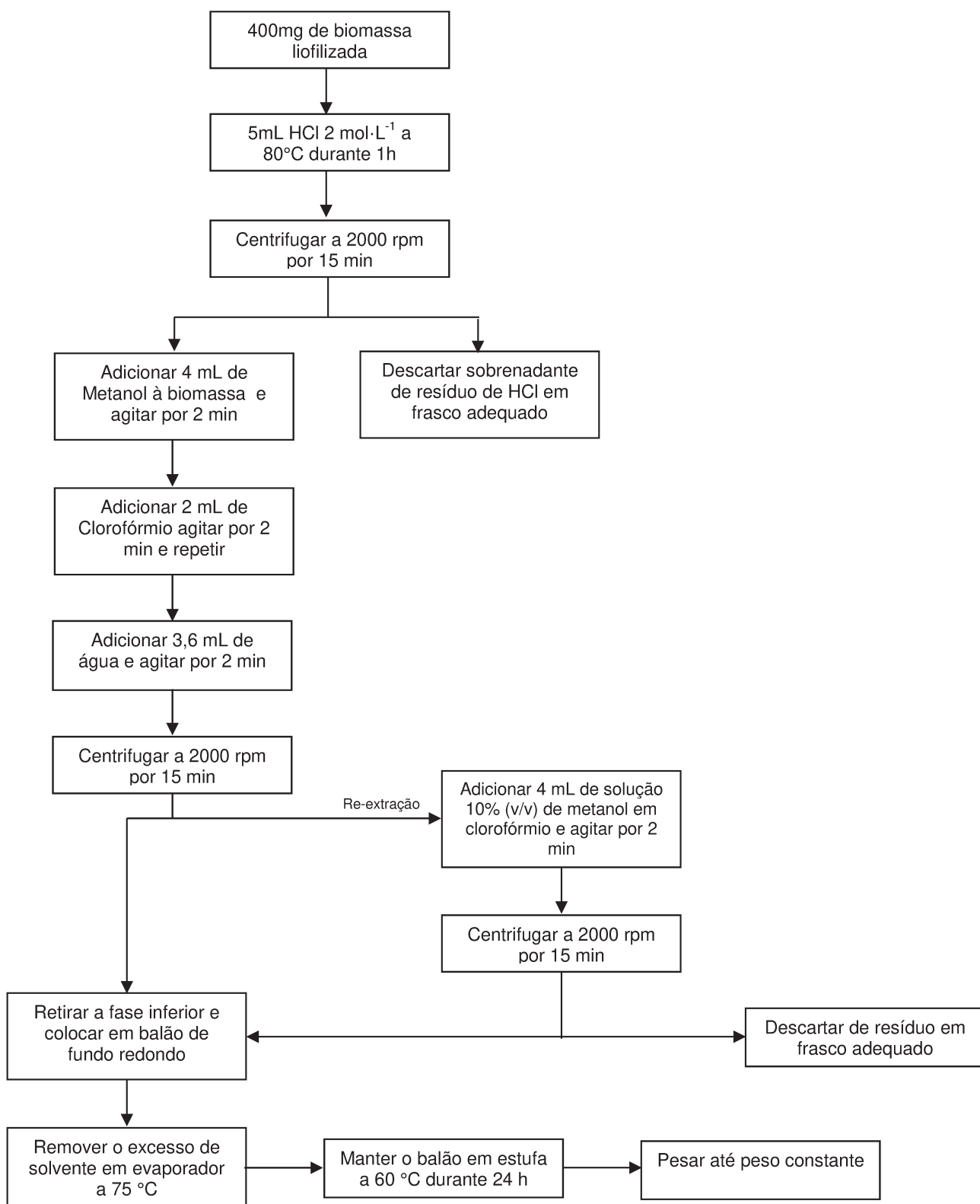


Figura 4-8 - Fluxograma para extração de lipídeos

4.11.3 *Métodos físicos de rompimento celular*

Para avaliar a extração de lipídeos com métodos físicos de rompimento celular foi necessário que a biomassa liofilizada fosse diluída primeiramente em água e os solventes foram adicionados posteriormente.

Para que as amostras fossem submetidas aos métodos de rompimento celular 250 mg de biomassa liofilizada ou biomassa úmida foram dissolvidos em 50 mL de água destilada. **Assim, foram testados três diferentes métodos de rompimento celular:**

- Autoclave vertical (PHOENIX AV30) a 121 °C durante 5 min,
- Ultrassom (Sonics vibra cell VCX130) com ressonância de 10 kHz durante 5 min continuamente;
- Micro-ondas (Eletrolux MEF33) em potência máxima durante 5 min.
- Desta forma, os solventes foram adicionados à 5 mL da solução de biomassa com concentração celular de $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, na proporção de 1:1 (v/v) da amostra com mistura 1:1 (v/v) de clorofórmio e metanol, ou seja, a 5mL de solução foram adicionados 2,5 mL de metanol e 2,5 mL clorofórmio.
- A mistura foi agitada com auxílio de vortex durante 2 min
- Centrifugada a 8000 rpm durante 15 min e o extrato foi transferido para balão de fundo redondo previamente aferido com auxílio de seringa de vidro.
 - A re-extração foi feita adicionando 4 mL de uma solução 10% (v/v) de metanol em clorofórmio ao resíduo

A mistura foi agitada por 2 min e centrifugada novamente e o novo extrato adicionado ao balão. O excesso de solvente foi removido em evaporador rotatório a 75 °C sob vácuo. O balão foi seco em estufa a 60 °C durante 24 h (Figura 4-9)

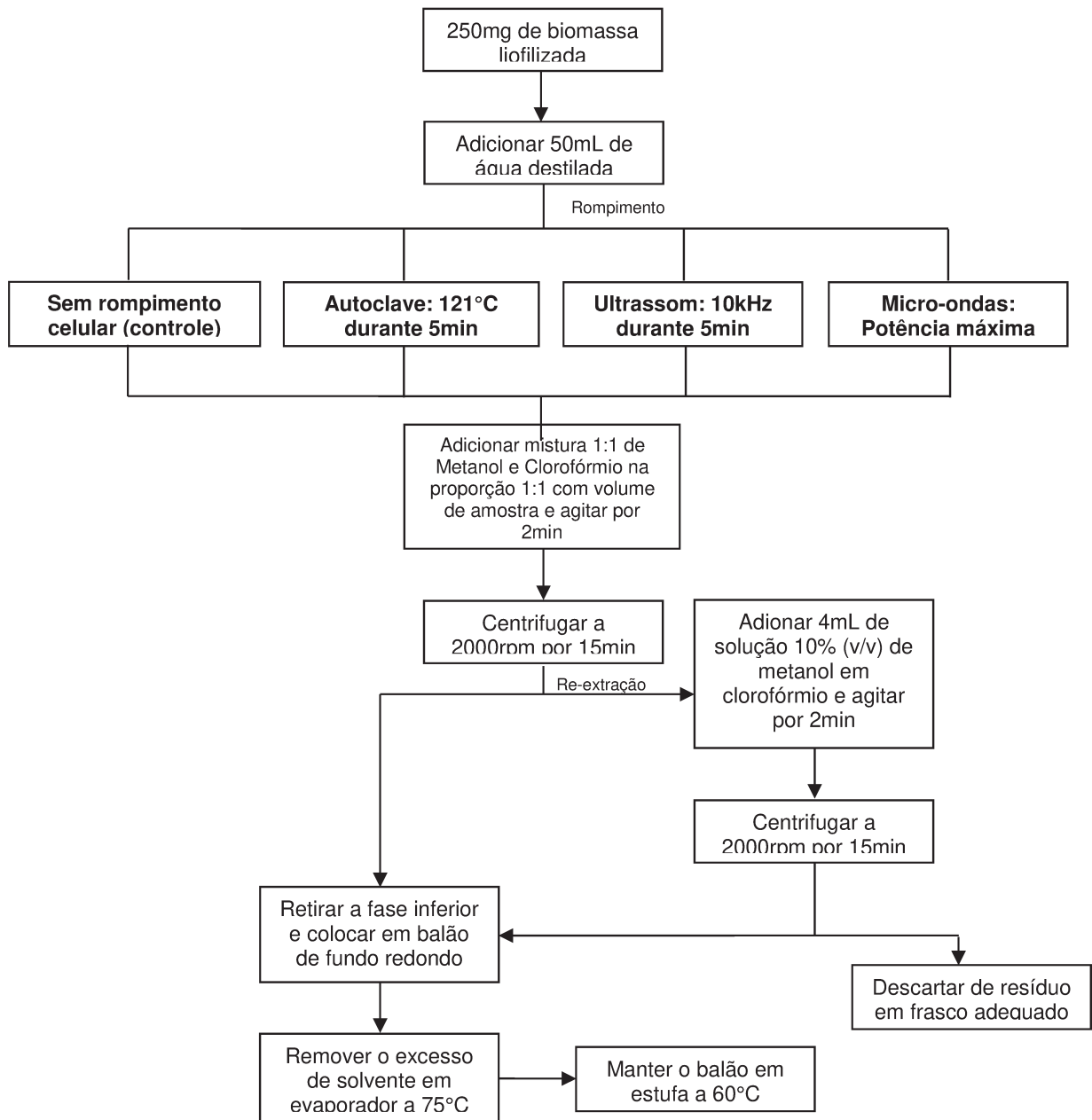


Figura 4-9 -Fluxograma para determinação de lipídeos pelo método Bligh & Dyer com métodos de rompimento celular.

4.12 - Transesterificação de lipídios microalgais

4.12.1 Aplicação

O método para transesterificação de lipídeos foi desenvolvido baseado no método de LEWIS *et al.* (2000) podendo ser aplicado diretamente à biomassa microalgal ou então aos lipídeos extraídos segundo o método descrito no anteriormente.

4.12.2 Reagentes

- Ácido Clorídrico (HCl) grau PA para preparação dos reagentes
- Hexano grau PA para preparação dos reagentes
- Metanol (CH₃OH) grau PA para extração de lipídios;
- REAGENTE 1: Metanol: Ácido Clorídrico: Clorofórmio nas proporções 10:1:1.
- REAGENTE 2: Hexano: Clorofórmio nas proporções 4:1.
- Água deionizada.

4.12.3 Amostragem e Preparação da Amostra

4.12.3.1 Preparação da biomassa liofilizada

A biomassa utilizada para extração gerada no cultivo de *C. vulgaris* foi centrifugada a 8000 rpm durante 10min, lavada duas vezes com água destilada para poder ser utilizada. Após a centrifugação a biomassa foicolocada em frasco com grande superfície como, por exemplo, placa de Petri, (dependendo da quantidade de amostra e do equipamento) e liofilizada segundo o processo do equipamento utilizado.

4.12.4 Transesterificação

4.12.4.1 Transesterificação direta

- Na transesterificação direta, o procedimento foi realizado com 20mg de biomassa microalgal liofilizada colocados em tubos para centrífuga;
- Foram adicionados às amostras 3 mL do REAGENTE 1 recém preparado e o tubo foi agitado com auxílio de vortex durante 1 min. O reagente foi preparado pouco antes de ser utilizado para evitar a volatilização do solvente;
- As amostras foram colocadas em banho à 90 °C durante 1 h;
- As amostras foram resfriadas à temperatura ambiente;
- Foram adicionados 2 mL de REAGENTE 2 fresco, 1 mL de água deionizada e a mistura foi agitada com auxílio de vortex.
- A amostra foi centrifugada a 200 rpm durante 10 min;
- Coletou-se a fase superior composta pelo hexano e pelos ácidos graxos e adicionou-se a um tubo de ensaio separado e identificado com as características da amostra;
- Este processo foi repetido por mais 2 vezes para completa remoção dos ácidos graxos.
- A análise dos ácidos graxos foi feita por cromatografia gasosa segundo método descrito no Item 4.13.

4.12.4.2 Transesterificação indireta

Para a transesterificação indireta dos lipídeos gerados à partir da biomassa das microalgas (segundo o procedimento descrito no Item 4.1), deve-se seguir o mesmo

procedimento de transesterificação direta, porém os volumes de reagentes utilizados devem ser duplicado, por exemplo, quando utilizamos 3 mL de REAGENTE 1 deveremos utilizar 6 mL. A análise e quantificação dos ácidos graxos devem ser feita por cromatografia gasosa segundo o procedimento descrito no Item 4.13.

4.13-Determinação do perfil de ácidos graxos

4.13.1 Aplicação

O método utilizado para a identificação e quantificação dos ésteres de ácidos graxos presentes nas amostras de biomassa das microalgas previamente transesterificadas pelo método descrito no Item 4.12, é a cromatografia gasosa acoplada com detector de massas. A quantificação é feita por comparação de tempo de retenção dos compostos das amostras com padrões cromatográficos.

4.13.2 Método cromatográfico para determinação do perfil de ésteres

4.13.2.1 Curvas de calibração

As curvas de calibração devem ser construídas fazendo as injeções do padrão 100% e injeções de diluições do padrão em hexano. Para exemplificar foram feitas curvas de calibração utilizando as diluições para 90%, 80%, 60%, 50%, 40% e 20% do padrão cromatográfico Supelco 37 comp. FAME Mix $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em CH_2Cl_2 (47885-U). As diluições devem ser feitas em hexano, pois, as amostras de ésteres de ácidos graxos transesterificadas estão diluídas no mesmo, minimizando assim os erros. Para a construção das curvas deve-se calcular qual a concentração de cada analito nas soluções utilizadas e com as áreas de cada um construir cada uma.

4.13.2.2 Análise das amostras

Para determinar os ésteres de ácidos graxos, foram injetados 1 µL de amostra no cromatógrafo e após o final da corrida os tempos de retenção de cada pico da amostra devem ser comparados com os componentes dos padrões. A concentração é calculada pela equação da curva de calibração. Algumas amostras podem conter compostos não identificados pelos padrões injetados. Assim, é necessário que novos padrões sejam injetados para posterior identificação ou GCMS.

Exemplo de utilização do método.

Para exemplificar o método, foi utilizado um cromatógrafo gasoso sistema GCMS QP2010 Ultra com detector de ionização de chama (FID) e coluna Stabilwax, 30 m x 0.32 mm Restek. Como fase móvel usou-se hélio (15 psi, split 1/100) com temperaturas no injetor e no detector de 250°C e 300°C. A programação da rampa de temperatura para a coluna foi: temperatura inicial de 50°C durante 2 min, gradiente de 10°C/min até 180°C com um tempo de espera de 5 min, gradiente de 5°C/min até atingir uma temperatura final de 240°C, totalizando 32 min de corrida cromatográfica. O volume de injeção foi de 1 µL. A identificação dos ésteres metílicos foi feita mediante comparação do tempo de retenção com padrões previamente injetados (Supelco 37 FAME mix).

5 – RESULTADOS

5.1 Padronização de método para cálculo de balanço de carbono simples

Esta primeira etapa do projeto teve o objetivo foi desenvolver um método que possibilitasse o cálculo do balanço de carbono considerando as fases sólida, líquida e gasosa de fotobiorreator com microalgas. Antes de iniciar o cultivo com o microrganismo, foi necessário avaliar se seria possível quantificar as frações orgânicas e inorgânicas de carbono que entravam, eram fixadas e saiam do reator.

Para isso, foi utilizado um analisador de carbono para quantificar as frações de carbono orgânico e inorgânico nas fases líquida e gasosa. Para a fase sólida o carbono foi quantificado utilizando equipamento de análise elementar.

Antes de das análises em experimento com microrganismo, foi necessário avaliar se as análises realizadas apresentariam resultados de concentração de carbono correspondentes às concentrações das vazões de gás utilizadas e dissolvidas na fase líquida obtendo assim valores considerados como “branco” do sistema. Estas concentrações devem ser iguais na ausência e na presença de microalgas (apenas meio de cultivo) e sem o meio de cultivo (reator vazio).

Além do analisador de carbono, as concentrações de carbono de CO₂ que entravam e saiam do reator, foram também determinadas por cromatografia gasosa para comparação dos resultados e implantação do método.

5.1.1 Cálculo da quantidade de CO₂ presente na vazão utilizada

CO₂ fornecido pela White Martins, com massa específica de 1,833 kg·m⁻³ (1833 mg·L⁻¹).foi utilizado como padrão para a curva de calibração cromatográfica.

O reator foi alimentado com uma vazão de 1VVM (1L·min⁻¹), portanto para o reator de 2 L a vazão foi de 2L·min⁻¹. A concentração de CO₂ presente na corrente de entrada do reator é de 15% que nos dá uma vazão de CO₂ de 0,3 L·min⁻¹.

2L ----- 100%

XL----- 15% portanto: 30/100 = 0,3 L de CO₂/ min na entrada do reator.

Para o cálculo da quantidade de massa de CO₂ na entrada do reator utiliza-se a Equação 5.1:

$$d = \frac{m}{V} \Rightarrow 1833 \frac{mg}{L} \times 0,3 \frac{L}{min} = m \Rightarrow m = 549,90 \frac{mgCO_2}{min} \quad 5.1$$

Também utilizando a densidade se calcula a quantidade em massa de CO₂ para cada volume de injeção, estes valores estão apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Dados para construção da curva de calibração para CO₂.

<i>Volume injetado (mL)</i>	<i>Área média</i>	<i>Massa (mg)</i>
1,0	2564,457	1,812
0,9	2330,883	1,633
0,8	2064,661	1,455
0,7	1779,487	1,267
0,6	1562,987	1,089
0,5	1326,479	0,906
0,4	1060,447	0,725
0,3	795,246	0,543
0,2	547,764	0,362
0,1	280,295	0,181

N=3

Com estes valores construiu - se a curva de calibração (Figura 5-1).

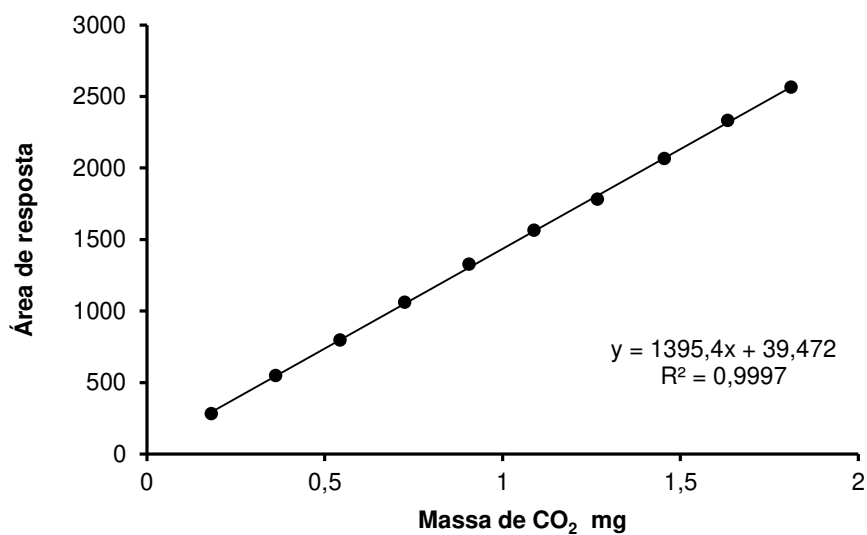


Figura 5-1 - Curva calibração para determinação da massa de CO₂ em amostras gasosas de entrada e saída do fotobiorreator.

Após a calibração, foram injetadas amostras de 0,5 mL de dióxido de carbono 99% com vazão de 0,3 L·min⁻¹ com reator vazio e amostras de amostras de 0,4 mL da mistura de 0,3 L·min⁻¹ de CO₂ e 1,7 L·min⁻¹ de ar comprimido perfazendo uma vazão total de 2 L·min com o reator vazio após 6 horas de estabilização e com reator vazio e com 2L de meio de cultivo. Portanto considerando o valor obtido na Equação 5.1 tem-se as massas teóricas para o dióxido de carbono:

Quando se injeta 0,5 mL de CO₂

$$\frac{549mgCO_2 \times 0,5mL}{300mL} = 0,915mgCO_2 \quad 5.2$$

Quando se injeta 0,4mL de mistura 15% CO₂

$$\frac{549mgCO_2 \times 0,4mL}{300mL} \times 0,15 = 0,1098mgCO_2 \quad 5.3$$

Para verificar se a massa de CO₂ injetada no reator corresponde a massa esperada, foram feitas três análises (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Dados pra calibração da injeção (valores em mg de CO₂)

	<i>Entrada CO₂ puro Sem meio de cultivo</i>	<i>Entrada CO₂+Ar Sem meio de cultivo</i>	<i>Entrada CO₂ +Ar com meio de cultivo</i>
	0,914	0,117	0,118
	0,910	0,110	0,114
	0,905	0,106	0,113
<i>Média</i>	0,9096 ± 0,004	0,111 ± 0,005	0,115 ± 0,002

Analisando os resultados é possível observar que os valores obtidos para a massa de CO₂ na entrada do reator são próximos aos valores teóricos (0,915 mg para CO₂ puro e 0,101 para 15% de CO₂).

Para a saída do reator as amostragens foram realizadas em dois pontos de para se verificar qual o melhor local para coleta de amostra. Os dois pontos de amostragem estão representados na Figura 5-2.

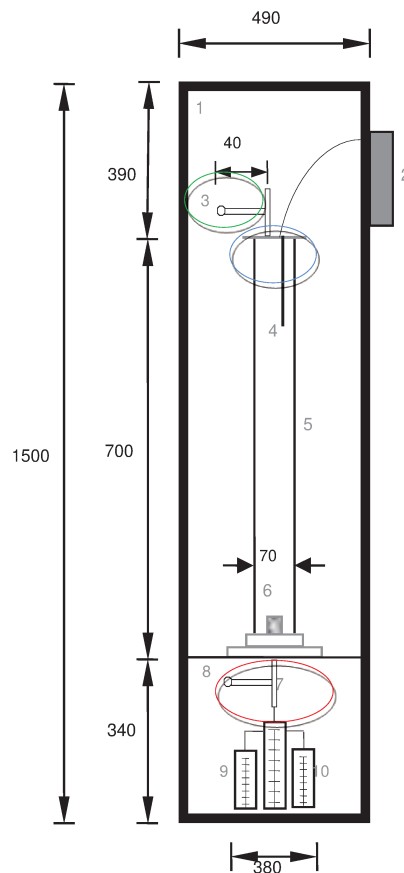


Figura 5-2 - Diagrama do fotobiorreator. 1: Câmara de fotoperíodo; 2: Analisador de pH, CO₂ e temperatura; 3: Ponto de amostragem da saída dos gases; 4: sensor de pH, temperatura e CO₂; 5: fotobiorreator; 6: difusor de gases; 7: sistema de controle de fluxo e mistura dos gases; 8: Ponto de amostragem da entrada dos gases; 9: Medidor do fluxo de ar; 10: Medidor do fluxo de CO₂. Todas as dimensões em mm.

A coleta foi feita no ponto de coloração azul diretamente na saída do reator e no ponto de coloração verde, no final de uma mangueira. Para cálculo correto do balanço de massa na ausência do microrganismo, os valores da concentração de CO₂ na entrada e na saída do reator devem ser iguais, visto que não houve consumo de CO₂.

$$CO_2(\text{entra}) = CO_2(\text{sai}) + CO_2(\text{biomassa}) + CO_2(\text{líquido}) + CO_2(\text{voláteis}) \quad 5.4$$

Os resultados médios para todos os pontos de amostragem para as análises cromatográficas estão apresentados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Resultados análise cromatográfica

	<i>Entrada (mg)</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Saída (septo) (mg)</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Entrada (mg)</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Saída (mangueira) (mg)</i>	<i>Desvio padrão</i>
<i>Somente CO₂</i>	0,909	0,012	0,897	0,063	0,909	0,012	0,805	0,05
<i>Mistura CO₂ + Ar Reator</i>	0,111	0,005	0,108	0,001	0,111	0,005	0,101	0,003
<i>com meio de cultivo</i>	0,115	0,002	0,108	0,003	0,115	0,002	0,108	0,007

Analisando os resultados da massa de CO₂ obtidos por cromatografia gasosa, pode-se observar que os valores obtidos são equivalentes ao valor teórico esperado (0,915 mg para CO₂ puro e 0,101 para 15% de CO₂), as variações existentes ocorrem devido a diferenças de ajuste do rotâmetro. Além disso, comparando-se os dois pontos de amostragem na saída do reator pode-se dizer que a amostra no septo é o que apresenta menor variação entre a entrada e a saída, sendo assim o melhor ponto de coleta de amostra para a saída do reator.

Para os resultados de concentração de carbono medidos no TOC a quantidade em massa de carbono esperada é:

$$\frac{549\text{mg} \times 1000\text{mL}}{300\text{mL}} = 1830\text{mgCO}_2 \quad 5.5$$

Mas como o TOC mede somente carbono e sabendo que a porcentagem de carbono no CO₂ é 27,273% temos:

$$\frac{1830\text{mgCO}_2}{L} \times 0,27273 = \frac{499,10\text{mgC}}{L} \quad 5.6$$

O valor em mg/L da entrada deve ser multiplicado por 15% que é a porcentagem de CO₂ na corrente quando utilizamos a mistura.

$$1830\text{mgCO}_2 \times 0,15 = 274,5 \frac{\text{mg}}{L} \quad 5.7$$

$$274,5 \frac{\text{mg}}{L} \text{CO}_2 \times 0,27273 = 74,86 \frac{\text{mg}}{L} \text{C} \quad 5.8$$

Os resultados para análise de carbono Total estão apresentados Tabela 5.4 e os de carbono inorgânico na Tabela 5.5.

Tabela 5.4 – Valores médios para três análises de Carbono Total na entrada e nas duas saídas do fotobiorreator

	<i>Entrada (mg/L)</i>	<i>Saída (septo) (mg/L)</i>	<i>Entrada (mg/L)</i>	<i>Saída (mangueira) (mg/L)</i>
<i>Somente CO₂</i>	575,36 ± 3,12	561,75 ± 2,05	-	-
<i>Mistura CO₂ + Ar sem meio de cultivo</i>	79,90 ± 1,74	80,26 ± 2,62	79,90 ± 1,74	81,2 ± 1,13
<i>Mistura CO₂ + Ar com meio de cultivo</i>	74,93 ± 0,42	72,50 ± 1,63	74,93 ± 0,42	73,33 ± 0,72

Tabela 5.5 - Valores médios para três análises de Carbono Inorgânico na entrada e nas duas saídas do fotobiorreator

	<i>Entrada</i>	<i>Saída (Azul)</i>	<i>Entrada</i>	<i>Saída (Verde)</i>
<i>Somente CO₂</i>	534,4 ± 3,00	514,6 ± 3,13	-	-
<i>Mistura CO₂ + Ar sem meio de cultivo</i>	72,84 ± 1,23	70,60 ± 1,8	72,84 ± 1,23	65,76 ± 0,71
<i>Mistura CO₂ + Ar com meio de cultivo</i>	77,29 ± 0,39	73,26 ± 0,71	77,29 ± 0,39	67,49 ± 1,73

Analisando os resultados de concentração de carbono nas correntes gasosas do reator, é possível visualizar que há variações inferiores a 5% nos resultados, isso ocorre, pois o controle da vazão de ar fornecido pelo compressor varia quando ele é ligado ou desligado, isso ocorre mesmo com a presença de um controlador de pressão.

Com relação aos resultados para os pontos de amostragem, o ponto mais próximo da saída do reator foi o que apresentou menor variação nos valores de concentração de CO₂ em relação às concentrações na entrada do reator, indicando ser este o melhor ponto para coleta de amostras.

5.2 Padronização de método para determinação do teor de umidade

A produção em larga escala de biomassa de microalgas vem sendo estudada por vários pesquisadores com finalidades diferentes: para produção de ração animal, complementos alimentares e produtos de alto valor agregado como corantes, proteínas e também o biodiesel (DERNER *et al.*, 2006; CHISTI, 2007; BERTOLDI *et al.*, 2008). Neste sentido a formação de biomassa de microalgas tem sido considerada comercialmente relevante, já que muitas espécies são capazes de acumular entre 20 a 70% de lipídeos em peso seco possibilitando o uso dessa biomassa como alternativa viável para a manufatura de biocombustíveis de terceira geração (GRESSEL, 2008). Segundo os dados deste autor, se a produção da biomassa de microalgas autotrófica puder ser escalonada em nível industrial. Porém, para que esta produção seja economicamente viável há a necessidade de técnicas de separação e concentração da biomassa no meio de cultivo (BECKER, 1994; LEWIS *et al.*, 2000). A determinação do teor de umidade, descrito por padrões internacionais como AOAC, Standart methods e NREL, é um método gravimétrico simples onde a biomassa microalgal é colocada em frascos previamente aferidos, pesada e colocada em estufa a 105°C durante 4h e depois pesada até peso constante (Item 4.10 Materiais e Métodos).

5.2.1 Resultados e discussão.

O teor de umidade residual foi avaliado com utilização de três métodos gravimétricos com o objetivo de compará-los. Estes métodos foram i) secagem em estufa; ii) filtração; iii) liofilização.

Em uma primeira etapa, os valores das biomassas de microalgas secas por liofilização e estufa a 105°C foram comparados com os valores obtidos pela filtração de 10mL de amostra e secagem em estufa a 60°C (método utilizado em nosso laboratório). Desta forma, foi possível determinar a diferença entre os métodos uma vez que, na determinação por filtração e secagem a 60°C, o volume desejado do cultivo foi filtrado e a correspondência para 1L foi feita e, para a secagem em estufa e por liofilização. O volume desejado do cultivo foi centrifugado e depois submetido aos métodos.

Os resultados de biomassa obtidos para 1L de meio de cultivo por filtração, liofilização e secagem em estufa estão apresentados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 – Resultados de concentração celular para 1L de meio de cultivo.

<i>Método</i>	<i>Biomassa (gL⁻¹)</i>
<i>Filtração 10mL</i>	1,260±0,019
<i>Estufa 105°C</i>	1,158±0,017
<i>Liofilização</i>	1,147±0,017
N=4	

Analisando os resultados foi possível verificar que as concentrações celulares obtidas pelos três métodos foram próximas, porém as concentrações obtidas pelo método de liofilização e de secagem a 105°C foram menores.

No caso da secagem em estufa a 105°C, como a temperatura é mais alta que a utilizada para a filtragem (60°C), pode ter ocorrido degradação da biomassa gerando menores valores de biomassa. Já a liofilização, remove toda a umidade da amostra. Desta forma foi verificada variação de 8 a 9% entre os métodos.

Para a determinação do teor de umidade utilizando liofilização e estufa a 105°C, a biomassa centrifugada foi pesada antes e depois da secagem, os resultados estão apresentados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7 – Resultados para determinação do teor de umidade em amostras de biomassa de microalgas centrifugadas.

<i>Método</i>	<i>Biomassa Inicial (g)</i>	<i>Biomassa Final (g)</i>	<i>% água</i>
<i>Estufa 105°C</i>	7,5787	1,158	84,72
<i>Liofilização</i>	7,5102	1,147	84,74
N=4			

Analisando os resultados é possível observar que a porcentagem de água presente na biomassa após a centrifugação é alta, aproximadamente 85% para os dois métodos avaliados indicando que ambos podem ser utilizados para esta determinação.

A determinação do teor de umidade na biomassa das microalgas é uma análise importante, pois o teor de água pode interferir em análises posteriores como a extração de lipídeos modificando a ordem de adição dos solventes e interferindo na eficiência da extração (Lewis *et al*, 2000).

5.3 Padronização de métodos para extração de lipídios

A mensuração do conteúdo de lipídeos totais em microalgas é importante para estudo da mesma como matéria prima para biodiesel. Diversos métodos de quantificação podem ser empregados, dependendo de alguns parâmetros da análise, tais como quantidade de amostra necessária, manipulação da amostra, facilidade e tempo de implementação, custo e reprodutibilidade.

O método de BLIGH e DYER (1959) é uma técnica clássica amplamente modificada para ser utilizada com matérias-primas diferentes de sua matriz biológica original e tem por base a extração e quantificação dos lipídeos por uma mistura de solventes. Este método é considerado uma modificação do método de FOLCH *et al.* (1957), uma vez está baseado na redução da relação solvente/amostra, refletindo em menor custo e tempo de análise. Mesmo com essas características, o método de BLIGH e DYER (1959) é, em muitas circunstâncias, inadequado para estudos em escala laboratorial de cultivos de microalgas, onde o tempo de análise e principalmente a quantidade de amostra são fatores limitantes. Neste sentido, outras metodologias já foram descritas pela literatura e adaptadas com o intuito de minimizar essas limitações. A extração de lipídeos requer significativa quantidade de amostra inicial, é parcialmente seletiva e aumenta o tempo de análise. Em face disto, o objetivo desta etapa foi comparar o uso de extrações pelo método B&D para quantificação de lipídeos de *C. vulgaris* liofilizada e ressuspensa em água e *C. vulgaris* úmida e ressuspensa em água. Um resumo de todos os métodos utilizados está apresentado na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 – Métodos utilizados para determinação do teor de lipídeos.

<i>Biomassa liofilizada</i>	<i>Método</i>
<i>B&D normal</i>	Bligh & Dyer convencional
<i>B&D com digestão</i>	Bligh & Dyer com prévia digestão ácida da amostra
<i>B&D^{*a}</i>	Bligh & Dyer após biomassa liofilizada ser ressuspensa em água
<i>B&D^{*a} Ultrassom</i>	Bligh & Dyer após biomassa liofilizada ser ressuspensa em água e com rompimento celular por ultrassom
<i>B&D^{*a} micro ondas</i>	Bligh & Dyer após biomassa liofilizada ser ressuspensa em água e com rompimento celular por micro ondas
<i>B&D^{*a} autoclave</i>	Bligh & Dyer após biomassa liofilizada ser ressuspensa em água e com rompimento celular por autoclave
<i>Biomassa úmida</i>	<i>Método</i>
<i>B&D^{*b}</i>	Bligh & Dyer após biomassa úmida ser ressuspensa em água
<i>B&D^{*b} Ultrassom</i>	Bligh & Dyer após biomassa úmida ser ressuspensa em água e com rompimento celular por ultrassom
<i>B&D^{*b} micro ondas</i>	Bligh & Dyer após biomassa úmida ser ressuspensa em água e com rompimento celular por micro ondas
<i>B&D^{*b} Autoclave</i>	Bligh & Dyer após biomassa úmida ser ressuspensa em água e com rompimento celular por autoclave

*método com modificação na sequência de adição dos solventes, ^afeito com biomassa liofilizada, ^b feito com biomassa úmida.

5.3.1 Resultados e discussão

Para a viabilização da produção de biodiesel de microalgas além do se estabelecer as ótimas condições de cultivo para o micro-organismo depende do aprimoramento de algumas etapas importantes, como o método de extração e a transesterificação dos lipídeos (LEE *et al.*, 2010). Também para fins analíticos, a

extração dos lipídeos pode ser feita diretamente na biomassa com a adição dos solventes ou utilizando métodos prévios para rompimento celular e liberação dos lipídeos (SMEDES e THOMASEN, 1996).

Neste estudo, a determinação de lipídeos foi realizada por doze maneiras diferentes, utilizando o método de BLIGH e DYER (1959) sem prévio rompimento celular e utilizando método BLIGH e DYER (1959) com prévia digestão ácida da amostra, bem como pelo método Bligh & Dyer modificado utilizando diferentes seqüências de adição de reagentes e diluente (biomassa ressuspensa em água destilada e comparação do rompimento celular por 3 diferentes métodos: micro-ondas, autoclave e ultrassom). Os lipídeos foram posteriormente extraídos com os solventes orgânicos (Tabela 5.9).

Para a biomassa de *C. vulgaris* liofilizada a porcentagem lipídica encontrada após a digestão ácida (Francisco et al, 2010) foi de 20%. Diversos autores reportaram o teor de lipídeos de *C. vulgaris* pode variar entre 20 – 70% dependendo de fatores que influenciam no cultivo celular tais como: temperatura, salinidade do meio de cultivo, luminosidade, concentração de CO₂, a deficiência de nutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio e, também, o estágio de crescimento celular (LIANG *et al*, 2009; PEREZ-GARCIA *et al*, 2011; LV *et al*, 2010). Para a heterotrofia onde a fonte de carbono é orgânica, o tipo de açúcar, o tamanho da cadeia e a razão C/N utilizada podem influenciar (PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011).

Tabela 5.9 – Porcentagem lipídica em biomassa de *C. vulgaris* liofilizada e liofilizada ressuspensa em água.

	<i>Biomassa Liofilizada (g)</i>	<i>CV</i>	<i>% de Lipídeos</i>	<i>CV</i>
<i>B&D</i>	0,5034±0,0047	0,95	11,45±0,6010	5,24
<i>B&D – Digestão ácida</i>	0,4044±0,0037	0,91	20,00±0,2855	1,43
<i>B&D*</i>	0,0259±0,0002	0,60	10,60±0,5229	5,93
<i>B&D* - Ultrassom</i>	0,0258±0,0002	0,69	24,75±0,7439	3,01
<i>B&D* - Micro-ondas</i>	0,0252±0,0001	0,39	24,26±1,1188	4,61
<i>B&D* - Autoclave</i>	0,0256±0,0007	2,79	17,26±0,4565	2,64

*método com modificação na sequência de adição dos solventes, n=4

Avaliando os resultados com a utilização de rompimento celular, é possível observar que os maiores teores de lipídeos extraídos foram de 24,75 e 24,26%, após rompimento celular com ultrassom e micro-ondas. Estes valores são maiores que os 11,45% obtidos pelo mesmo método, porém sem rompimento celular, e maiores que os 17,26% obtidos para o rompimento celular em autoclave.

Visando eliminar a etapa da secagem da biomassa por liofilização a biomassa úmida foi analisada (Tabela 5.10). O teor de lipídeos extraído foi inferior àqueles determinados com biomassa seca. Biomassa extraída sem rompimento celular alcançou valores de 3,31% e para aquelas extraídas com micro-ondas, ultrassom e autoclave foram 5,18; 4,91 e 7,11% respectivamente, sendo a extração por autoclavagem a de melhor desempenho.

Para os coeficientes de variação os melhores valores foram obtidos nas extrações com biomassa liofilizada.

Tabela 5.10 – Porcentagem lipídica em biomassa úmida para método B&D com modificação na sequência de adição dos solventes.

	<i>Biomassa Úmida (g)</i>	<i>CV</i>	<i>% de Lipídeos</i>	<i>CV</i>
<i>B&D*</i>	0,2496±0,0000	4,69	3,31±0,2003	6,06
<i>B&D* - Ultrassom</i>	0,2496±0,0000	2,68	4,91±0,3835	7,82
<i>B&D* - Micro-ondas</i>	0,2496±0,0000	4,29	5,18±0,2003	3,92
<i>B&D* - Autoclave</i>	0,2496±0,0000	2,16	7,11±0,3835	5,39

N=4

Comparando-se os resultados para biomassa úmida e liofilizada (Figura 5-3), verifica-se que as maiores teores de lipídeos foram obtidos quando a extração foi feita utilizando a biomassa liofilizada. A liofilização é um processo comumente utilizado para secagem e preservação de material biológico, porém, é constituído de três etapas sendo a primeira o congelamento seguido de secagem primária (onde a água é retirada por sublimação) e secundária (dessorção). O objetivo do congelamento é interromper a atividade biológica e esta é uma das etapas onde podem ocorrer problemas pois dependendo da taxa de congelamento as células podem ser rompidas (TATTINI JR. *et al.*, 2006).

Melhores resultados nos processos de extração lipídica podem ser obtidos aprimorando os métodos de rompimento celular, variando as proporções entre solventes utilizados e testando novos métodos de extração como, por exemplo, a

extração com hexano. Além disso, o aprimoramento dos métodos de rompimento celular com biomassa úmida irão proporcionar

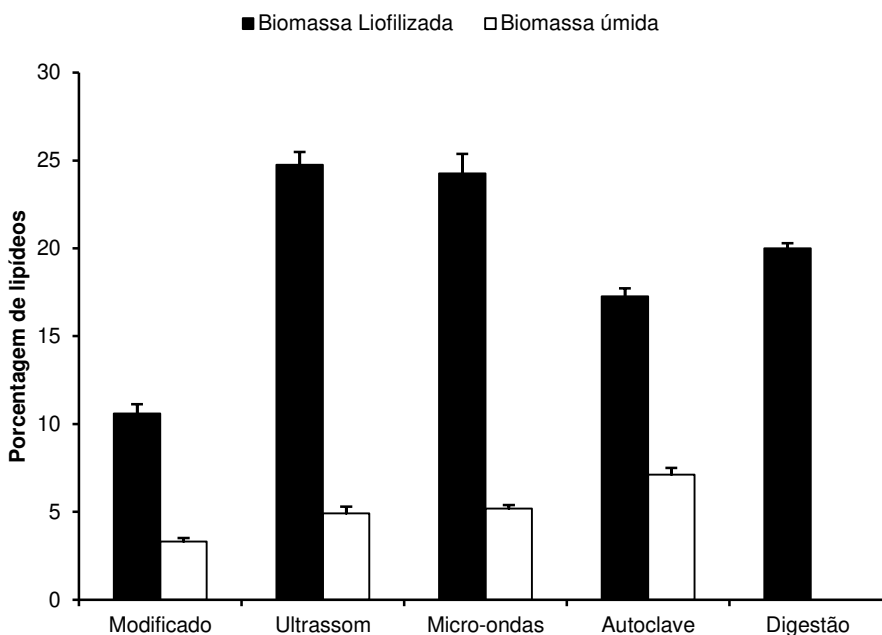


Figura 5-3 - Comparação da porcentagem de lipídeos entre biomassa úmida e seca para os métodos de rompimento celular utilizados

Além das proporções dos solventes utilizados, é possível analisar as variações da sequência de adição dos solventes, pois isso pode influenciar no teor e composição dos lipídeos extraídos. Segundo LEWIS *et al.* (2000), a adição dos solventes na sequência clorofórmio – metanol – água, resulta em aumento na eficiência de extração quando comparada com a adição na ordem reversa. Assim, para proporcionar resultados mais precisos, os métodos devem ser simples, reprodutíveis e com a mínima co-extração de contaminantes. Portanto para verificar a precisão das análises foram utilizados os valores de CV (%) apresentados nas Tabela 5.9 e Tabela 5.10. Os valores de CV obtidos para as análises realizadas são inferiores a 12,6%, que foi o resultado

obtido por BAILEY e WELLS (1994) apresentado para extração de lipídios pelo método B&D obtidos por 33 laboratórios participantes do QUASIMEME Lipid Workshop em Dublin.

Outro ponto a ser considerado é a quantidade de biomassa necessária para a determinação analítica e a disponível nos cultivos laboratoriais. Para o método B&D onde os solventes são diretamente adicionados à biomassa 400 - 500 mg de biomassa são necessários, dificultando esta determinação longo do cultivo celular, controle interessante para acompanhar o acúmulo de lipídios.

Tabela 5.11 – Comparação de valores de massa, tempo de resposta e resultados para os métodos estudados.

	Massa de amostra (mg)	Volume de Clorofórmio (mL)	Volume de Metanol (mL)	Volume de Água (mL)	Volume de H ₂ SO ₄ (mL)	Tempo aproximado de resposta	% de Lipídeos
<i>B&D normal</i>	500	4,4	7,6	3,6	-	95min + 24h	11,45
<i>B&D com digestão</i>	400	4,4	7,6	3,6	-	95min + 24h	20,00
<i>B&D^{*a}</i>	25	6,1	2,9	5	-	40min + 24h	10,60
<i>B&D^{*a}</i>	25	6,1	2,9	5	-	40min + 24h	24,75
<i>Ultrassom B&D^{*a}</i>	25	6,1	2,9	5	-	40min + 24h	24,26
<i>microondas B&D^{*a}</i>	25	6,1	2,9	5	-	40min + 24h	17,26
<i>autoclave B&D^{*b}</i>	25	6,1	2,9	5	-	40min + 24h	3,31
<i>B&D^{*b}</i>	25	6,1	2,9	5	-	40min + 24h	4,91
<i>Ultrassom B&D^{*b}</i>	25	6,1	2,9	5	-	40min + 24h	5,18
<i>microondas B&D^{*b}</i>	25	6,1	2,9	5	-	40min + 24h	7,11
<i>Autoclave</i>	25	6,1	2,9	5	-	40min + 24h	7,11

*método com modificação na sequência de adição dos solventes, ^afeito com biomassa liofilizada, ^b feito com biomassa úmida.

5.4 Carbon destination in photobiorreactors

Esta etapa apresenta o método desenvolvido para o cálculo do balanço de carbono em sistema de fotobiorreator utilizando como micro-organismo a microalga *C. vulgaris*.

O principal objetivo desta etapa foi estabelecer o balanço de carbono para o fotobiorreator e identificar os possíveis produtos formados com potencial comercial. Para isso, os experimentos foram conduzidos com inoculo inicial de 100mgL^{-1} com alimentação de ar comprimido com 5% de CO_2 operando isotermicamente e com amostragens a cada 12h até o final da batelada. Foram avaliadas as concentrações de carbono orgânico e inorgânico nas fases líquida e gasosa, carbono na biomassa, concentração de CO_2 , concentração celular e produção de compostos orgânicos voláteis.

Diferente de muitos trabalhos, o CO_2 foi considerado como substrato para o cultivo de microalgas, sendo seu consumo estudado com enfoque na bioconversão em produtos do metabolismo fotossintético como biomassa para produção de biocombustíveis, pigmentos, carboidratos, proteínas; compostos dissolvidos na fase líquida do sistema e compostos orgânicos voláteis que são eliminados na fase gasosa do sistema.

CARBON DESTINATION IN PHOTOBIOREACTORS

M. R. Piovani*, E. Jacob-Lopes**, L. W. Hantao***, G. P. Valença*, F. Augusto***, T. T. Franco*.

* School of Chemical Engineering, State University of Campinas, UNICAMP, 500 Albert Einstein Av., Barão Geraldo CEP - 13083-852 - Campinas – SP-BR. (E-mail: franco@feq.unicamp.br)

** Food Science and Technology Department, Federal University of Santa Maria, UFSM, 97105-900, Santa Maria-RS, BR.

*** Institute of Chemistry, State University of Campinas, UNICAMP, 13084-971, Campinas-SP-BR

Abstract

Recently, the study of the carbon cycle has attracted attention of many scientists, due to the impact amount of carbon dioxide in the atmosphere. The establishment of the carbon footprint is an important tool for evaluating and validating new technologies to enable calculation of the emissions of greenhouse gases. In presented results the conversion of carbon dioxide by microalgae *C. vulgaris* was studied and some of the bioproducts were identified in solid, liquid and gaseous phases. As results, it was possible to observe the conversion of CO₂ into carbonates, bicarbonates and extracellular polymers in the liquid phase, cell biomass in the solid phase and volatile organic compounds in gaseous phase.

Keywords: (carbon mass balance, photobioreactor, microalgae e VOC)

5.4.1 Introduction

With increasing concentration of carbon dioxide in the atmosphere and the impact on global climate, the understanding of its destination became a serious scientific issue. Evaluation of the simultaneous carbon fluxes in terrestrial ecosystems is also crucial to verify the possibility of capturing potential by-products of carbon dioxide. Similarly, the knowledge is also desirable for photobioreactors and open-ponds for cultures of microalgae and cyanobacteria, which transform carbon dioxide into biomass and other chemicals (NAGY *et al.*, 2006), (PRENTICE *et al.*, 2001).

Processes for photoconversion of carbon dioxide have been considered as a viable possibility for reducing emissions of this pollutant. They consist of biochemical reactions from CO₂ into products of photosynthetic metabolism (ONO e CUELLO, 2007; HO *et al.*, 2011). Two main products from microalgae metabolism excreted into the output of photobioreactors: have been described extracellular biopolymers (i.e. proteins and carbohydrates) and volatile organic compounds (VOC) (EROGLU e MELIS, 2010; JACOB-LOPES *et al.*, 2010). Besides these major products, according to the pH, the carbon dioxide dissolved in the media could precipitate as carbonate and bicarbonate after reacting with other components of the culture medium (i.e. calcium and magnesium (LEE *et al.*, 2006)). Considerable amounts of extracellular carbohydrates excreted into photosynthetic cultures have been also observed by several authors (DE PHILIPPIS e VINCENZINI, 1998), (YOU e BARNETT, 2004), (EROGLU e MELIS, 2009) and additionally, volatile organic compounds (VOC) as ethane, ethylene, propane, propylene, butane, isobutane, pentane, hexane, isoprene and ethylene, organochlorinated

(chloroform, perchloroethylene, trichlorethylene, chloromethane and bromomethane, iodomethane) and aldehydes (propanal, hexanal, n-heptanal, formaldehyde, acetaldehyde, furfural and valeraldehyde) have been identified in cultures of photosynthetic microalgae (BROADGATE *et al.*, 2004), (NUCCIO *et al.*, 1995b), (SCHOBERT e ELSTNER, 1980), SCARRATT e MOORE, 1996). According to BENTLEY e MELIS (2012) the generation of fuels and chemicals from cyanobacteria and microalgae happens after sunlight absorption and utilization, as well as CO₂ assimilation and conversion into product.

The chemical industrial sector is gradually targeting a partial replacement of fossil sources by natural and more sustainable in order to produce their main commodities, fine chemicals and fuels from renewables. (Poly) ethylene, (poly) propylene, lactic acid, farnesene, isoprene, butanol, and other molecules have been produced from natural sources in pilot or plant scale (SHAW *et al.*, 2003) (SCARRATT e MOORE, 1996), (NUCCIO *et al.*, 1995b). BENTLEY e MELIS (2012) and LINDBERG *et al.* (2010) have developed a process to extract volatile isoprene from a photobioreactor produced by a recombinant organism.

This present work has investigated the main destination of carbon dioxide fed into a photobioreactor and determined a simplified carbon mass balance, in the solid (biomass), liquid and gas phases. Volatile molecules from non-recombinant *C.vulgaris* were formed in the photosynthetic system in larger rates than biomass, and molecules from C5 to C10 were predominantly identified by gas chromatography-MS.

5.4.2 Material and methods

5.4.2.1 Microorganism and culture medium

The experiments were conducted with *Chlorella vulgaris* (CPCC90), obtained from the Canadian Phycological Culture Centre. Stock cultures were propagated and maintained in synthetic medium BBM at pH = 6.8, 25 ° C light intensity 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

5.4.2.2 Photobioreactor and experimental condition

The experiments were carried out in a 2L bubble column photobioreactor fed with synthetic BBM medium. Lighting was provided by sixteen 20 W fluorescent lamps, located in the photoperiod chamber and the gas flow was controlled by three rotameters that measured the carbon dioxide, air and mixture of gases flow rates (Figure 5-4). Initial cell concentration was 0.1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and the reactor was operated isothermally at 30 °C with photon flux density 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ and continuous aeration of 1 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ with a mixture of air and 5, 10, 15, 20 and 45% of carbon dioxide. A complete experiment without *C.vulgaris* was followed in order to measure the amount of carbon that enters and leaves the reactor to ensure the carbon bioconversion when the cells are present.

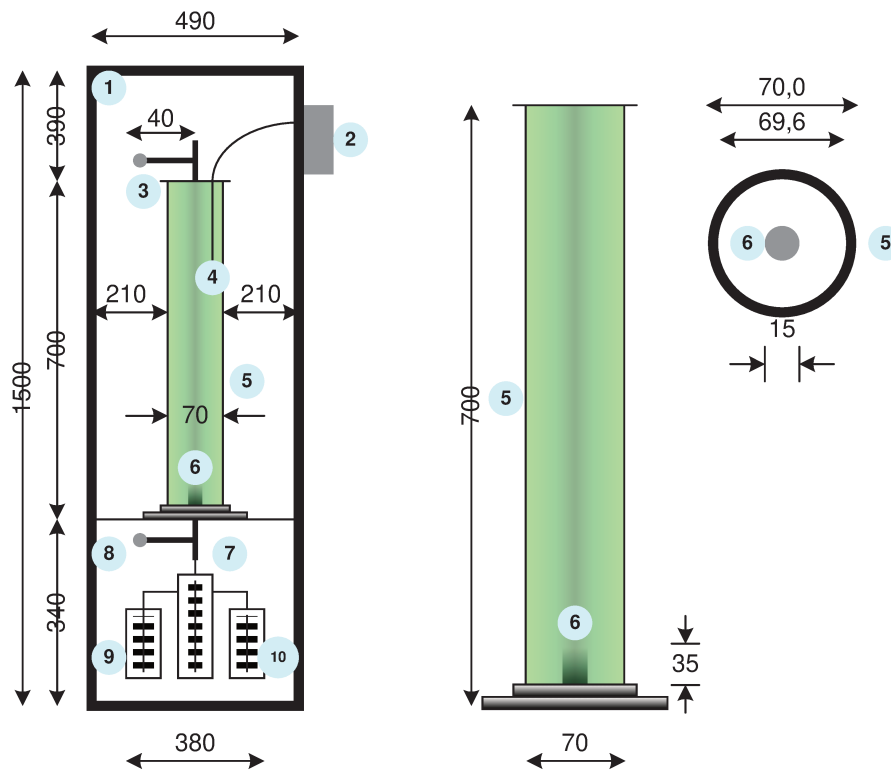


Figure 5-4 - Photobioreactor diagram - 1: photoperiod chamber; 2: pH, temperature and CO₂ analyser; 3: gas exit sampler; 4: pH, temperature and CO₂ sensor; 5: photobioreactor; 6: gas diffuser; 7: system controlling the flow rate and mixture of the gases; 8: Gas entrance sampler; 9: Air flow meter; 10: CO₂ flow meter. All dimensions in mm.

5.4.2.3 Analytical methods

Measures of cell concentration, pH, dissolved carbon dioxide in the liquid phase, organic carbon, total carbon and inorganic carbon for liquid and gaseous phases, were monitored every 12 h during the microalgae growth, always in triplicate.

Light intensity incident on the photobioreactor was measured on the outer surface using digital light meter (MLM Minipa 1010) and the temperature was controlled by a thermostat. Cell concentration was determined gravimetrically by filtering a known volume of culture medium in 0.22 µm membrane drying at 60 ° C for 24 h; dynamic pH during culture was evaluated using a pH meter (Hanna, model 8417).

Measurements of total carbon in the liquid and gas phases were conducted in a carbon analyzer TOC-VCSN (Shimadzu, Kyoto, Japan) with normal sensitivity catalyst. The device measures the amount of total carbon (TC) and inorganic carbon (IC) of the sample in the liquid and gaseous system. Total organic carbon (TOC) is calculated by the difference between Total carbon (TC) and Inorganic carbon (IC).

In order to determine TC, headspace samples were injected into the combustion tube at 680°C, where the catalytic oxidation to CO₂ occurs. For the determination of IC, the injected sample reacts with hydrochloric acid 2 mol·L⁻¹, and that all inorganic carbon is converted to CO₂. The CO₂ produced in both catalytic oxidation from IC and TC, is quantified by non-dispersive infrared absorption. The concentrations of TC and IC are obtained by interpolation using calibration curves (peak area x concentration) previously constructed by injection of standards.

The elemental composition of cells of *C. vulgaris* was determined by an elemental analyzer CHNS / O (2400-Perkin Elmer, Boston, MA, USA). Two milligrams of biomass samples were oxidized at 1000 °C, and the resulting gases are determined by a thermal conductivity sensor for carbon. The standard used was acetanilide with composition of 71.09% carbon, 11.84% oxygen, 6.71% hydrogen and 10.36% nitrogen.

5.4.2.4 VOC Analysis

The commercial Solid Phase Microextraction (SPME) fibers and extraction apparatus were purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA). The SPME coating used throughout the study was the divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) 50/30 µm. Chromatographic analyses were carried out in a Gas

Chromatography coupled to a Mass Spectrometer with a quadrupolar analyzer (GC-MS) model QP2010 Plus (Shimadzu, JPN).

The DVB/CAR/PDMS fiber was exposed for 30min to the headspace of a 1mL sample withdrew from the bioreactor. The analytes concentrated on the fiber were immediately analyzed in Rtx5 – MS (Restek) column (30 m, 0.25 mm ID and 0.25 μm df). The temperature programming was set to: 60 °C at 3 °C·min⁻¹ until 250 °C. The instrument was operated in splitless mode with 3 min sampling time. The scan range was set to: 40 – 400 Th. The electron multiplier was set to 0.75 kV. The identification was performed by the combination between mass spectral similarity searches and linear temperature programmed retention index (LTPRI). As described by ADAMS (1995); AUGUSTO *et al.* (2003).

Maximum specific growth rate (μ_{max} h⁻¹) of *C. vulgaris* was calculated by the graph of the equation:

$$\mu_{\text{max}}t = \frac{\ln X}{X_0} \quad 5.9$$

Where t is time in hours, X is the biomass concentration in mgL⁻¹h and X₀ is the initial biomass concentration in mg·L⁻¹.

Maximum biomass productivity (mg·L⁻¹·h⁻¹) was determined by the equation:

$$P_{X_{\text{max}}} = \left(\frac{X_i - X_{i-1}}{t_i - t_{i-1}} \right) \quad 5.10$$

Where X_i is the biomass concentration in $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ at the time t_i in hours and X_{i-1} is the biomass concentration in mg at the time t_{i-1} in hours.

The Carbon Dioxide conversion rate (C_{CO_2}) is the mass of CO_2 eliminated per unit reactor volume per unit time and was used to describe the performance of photobioreactors. In this case, it corresponds to the amount of carbon dioxide converted by *C. vulgaris*, according to JACOB-LOPES, EDUARDO *et al.* (2009); TOLEDO-CERVANTES *et al.* (2010). Here, carbon dioxide is considered a substrate to generate bioproducts by the microalgae.

$$C_{CO_2} = \frac{(C_i - C_0)Q}{V_R} \quad 5.11$$

Where C_0 is the concentration of CO_2 in the output of the reactor ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), C_i is the concentration of CO_2 in the inlet of the reactor ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), Q is the flow of gas ($\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) and V_R is the reactor volume (L)

Results of the carbon analyzes by TOC - VSCn are given in ppm, which were converted into milligrams of carbon per hour and the mass balance is calculated according Equation 5.12

$$F_{CO_2 \text{ inlet flow}} = F_{CO_2 \text{ exit flow}} + F_{IC \text{ liquid}} + F_{OC \text{ liquid}} + F_{Biomass} + F_{OC \text{ exit flow}} \quad 5.12$$

5.4.3 Results and discussion

The fraction of anthropogenic CO₂ that is taken up by the ocean declines with increasing atmospheric CO₂ concentration, due to reduced buffer capacity of the carbonate system and the rate of mixing between deep water with CO₂ uptake. Therefore, maximization of the conversion of CO₂ by photosynthetic microorganisms into products with high added value (i. e., food supplements for human and animal, pigments, pharmaceuticals and biofuels such as biodiesel and others would be very attractive for both reasons, environmental and economic (IWAMOTO, 2004; PULZ e GROSS, 2004; CHISTI, 2007; WIJFFELS e BARBOSA, 2010). Photosynthesis can also be directed towards the generation of industrially useful bio-products, as polymers, carbonates and bicarbonates all dissolved in the liquid phase and volatile organic compounds, and bio hydrogen in the gaseous phase (ISHIDA *et al.*, 1997; YOON *et al.*, 2002; MUÑOZ *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2006; YEN e BRUNE, 2007; HEMSCHEMEIER *et al.*, 2009).

The production of biomass in photobioreactors depends on the culture conditions, such as light intensity, temperature and amounts of nutrients in the medium (RICHMOND, 2004), and, especially, of the concentration of carbon dioxide in the gaseous phase. This concentration is important because almost 50% of the microalgae biomass is composed of carbon (BECKER, 1994). Lower CO₂ concentrations cannot be sufficient for the microalgae growth and maintenance metabolism, and higher concentrations the CO₂ can't be utilized because inhibit microalgae growth (CHENG *et al.*, 2006). Besides that, SERGEENKO *et al.* (2000) suggested that experiments with elevated concentrations of CO₂ can be used to produce microalgal biomass with higher

concentration of fatty acids because these conditions are considered as stress for the cells.

Values for μ_{\max} for these experiments (Table 5.12) were similar that those obtained by CHIU *et al.* (2008), 0.58-0.66 d⁻¹ with *Chlorella sp* and using 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ of light intensity and 2%, 5%, 10% and 15% of CO₂ concentration and higher than those obtained by SCRAGG *et al.* (2002) who used growth mediums with different concentrations of nitrogen and 76 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ light intensity. Comparing results of this work, experiments with 10% of carbon dioxide had higher μ_{\max} and higher $P_{X_{\max}}$ indicating that this condition is the better one considering biomass production.

Table 5.12 – Comparison of the results for kinetic parameters during the *C. vulgaris* culture with 5%, 10%, 15%, 20% and 45% of carbon dioxide in the inlet flow..

	5%	10%	15%	20%	45%
μ_{\max} (d ⁻¹)	0.792	0.936	0.6696	0.5448	0.4944
X_{\max} (mg·L ⁻¹)	1310	920	710	650	375
tg (h)	21.00	17.77	24.84	30.54	33.65
$P_{X_{\max}}$ (mg·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	21.67	39.58	28.08	25.42	11.67

Maximum specific growth rate (μ_{\max} h⁻¹) was calculated by the graph $\ln(X)$ x t; Maximum cell concentration X_{\max} , (gL⁻¹); generation time: $tg = \ln(2)/\mu_{\max}$ (h⁻¹); Maximum cell productivity: $P_{x_{\max}} = \Delta X/\Delta t$ (mgL⁻¹·h⁻¹).

But, besides biomass, PIOVANI *et al.* (2010) indicated that the conversion of CO₂ in photobioreactors generates different kinds of bioproducts, some in the liquid phase and some in the gaseous phase. In the liquid phase products can be extracellular polysaccharides (DE PHILIPPIS AND VICENZINI, 2008; OTERO AND VICENZINI, 2003), carbonates and bicarbonates (LEE *et al.*, 2006). The OC is a product in the

gaseous phase and it corresponds to VOC produced during the process (MCKAY *et al.*, 1996 and NUCCIO *et al.*, 1995).

To evaluate the VOC produced, the condition with 10% of CO₂ was chosen, because besides the greatest conversion of CO₂ into VOC there was the production of biomass. A high final concentration of biomass is important because products made from it can have high added value, an important example is the biodiesel (CHIST, 2007 and CHIST, 2008).

Therefore, measurements of all carbon flow rates in the photobioreactor with *C.vulgaris*, are important to identify the amount of carbon converted into cells and into extracellular products, since most of the studies on the literature have not quantified them. So, in order to calculate the carbon mass balance the photobioreactor, the conversion of carbon dioxide during the culture was investigated and the maximum value of CO₂ EC for the experiment with 10% of CO₂.

Analysing the conversion results (**Figure 5-5**), it was observed that the maximum value for conversion rate was 18.31 mg·L⁻¹·min⁻¹ achieved for 36 h of cell residence time in the 2 L reactor.

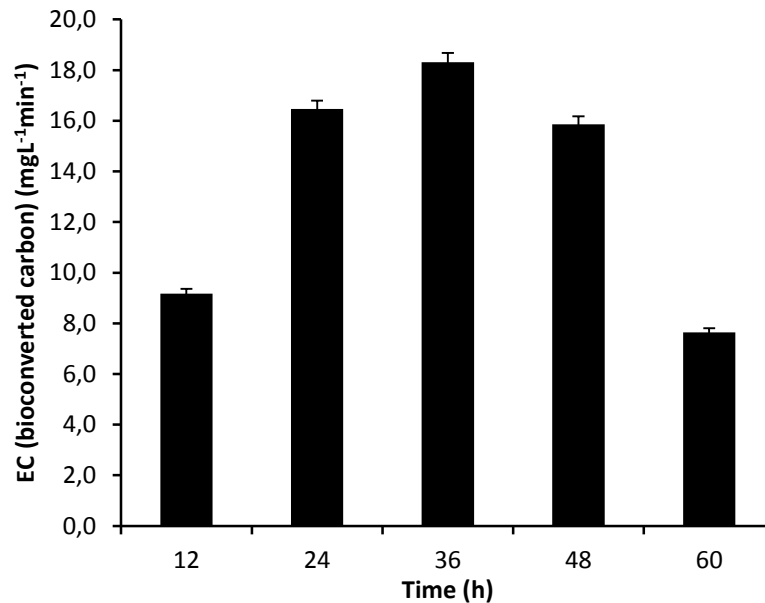


Figure 5-5 - Conversion of $\text{CO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ during 72h with maximum value obtained in 36h ($18.31 \text{ mgCO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)

Similar results of conversion were obtained by FRANCISCO *et al.* (2010) of $17.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ for *C. vulgaris* fed with 15% of carbon dioxide. JACOB-LOPES *et al.* (2008) reported values varying from 1.50 to $108.56 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ for the cyanobacteria *Aphanothece Microscopica Nāgeli* in different culture conditions, 3, 5, 25, 50 and 62% of CO_2 concentration, 960, 3000, 6000, 9000, 11 0000 Lux of light intensity and 21,5, 25, 30, 35, and $38.5 \text{ }^\circ\text{C}$.

After verifying the amount of carbon dioxide bioconverted, it is necessary to evaluate the carbon mass fractions that enter and leave the reactor. Liquid (IC and OC), solid (Carbon from biomass) and gaseous phases (IC entrance, IC exit and OC exit), were analysed (Table 5.13).

Table 5.13 - Results of carbon mass fractions for gaseous phase (IC inlet flow, IC exit and OC exit) and for solid and liquid phase C (IC_{liquid}, C_{biomass} and OC_{liquid}).

Carbon mass fractions (mg·h ⁻¹)							
Time (h)	IC _{inlet flow}	IC _{exit flow}	IC _(inlet flow- exit flow)	C _{Biomass}	OC _{liquid}	IC _{Liquid}	OC _{exit flow}
12	5872.20	5575.00	297.2	7.76	0.14	3.53	278.40
24	5857.20	5158.00	699.2	6.94	0.18	0.51	673.20
36	6257.40	5664.00	593.4	38.79	0.04	5.56	523.20
48	6427.80	5914.00	513.8	5.72	2.01	0.13	483.60
60	6037.80	5790.00	247.8	1.63	1.35	0.56	226.80

IC_{inlet flow}= Inorganic Carbon in the inlet flow; IC_{exit flow}= Inorganic Carbon in the exit flow; IC<sub>(inlet flow-
exit flow)</sub>= Inorganic Carbon of inlet flow minus exit flow; C_{Biomass}= Carbon from biomass; OC_{liquid} = Organic Carbon dissolved in the culture medium; IC_{Liquid}= Inorganic Carbon dissolved in the culture medium and OC_{exit flow}= Organic Carbon in the exit flow.

For 36h of cell residence time, where the conversion of CO₂ was the highest one (**Figure 5-5**), our results of IC also indicated that when 6257.40 mg·h⁻¹ were injected, almost 5664.00 mg·h⁻¹ were not converted (90.51%) The amount of non-converted carbon could potentially be reduced by selecting an optimized configuration of photobioreactor to improve CO₂ utilization by, as suggested by JACOB-LOPES, E. *et al.* (2009). However, the converted fraction, calculated by the difference between IC_{inlet flow} and IC_{exit flow} is 593.4 mg·h⁻¹, and was converted into bioproducts of photosynthetic metabolism like biomass and VOC. Considering the importance of microalgal biomass for the production of biofuels (SAVAGE, 2011), the amount of carbon transformed into cells was initially calculated. Maximum biomass concentration (920 mg·L⁻¹) was achieved after 72 h of cell residence time and with a maximum pH of 8.32 (Figure 5-6).

$P_{X_{max}}$ was $39.58 \text{ mgL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ and μ_{max} was 0.0399 h^{-1} ($0,936 \text{ d}^{-1}$), similarly to those obtained by CHIU *et al.* (2008), 0.58 to 0.66 d^{-1} with *Chlorella sp* and using $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ of light intensity and 2%, 5%, 10% and 15% of CO_2 .

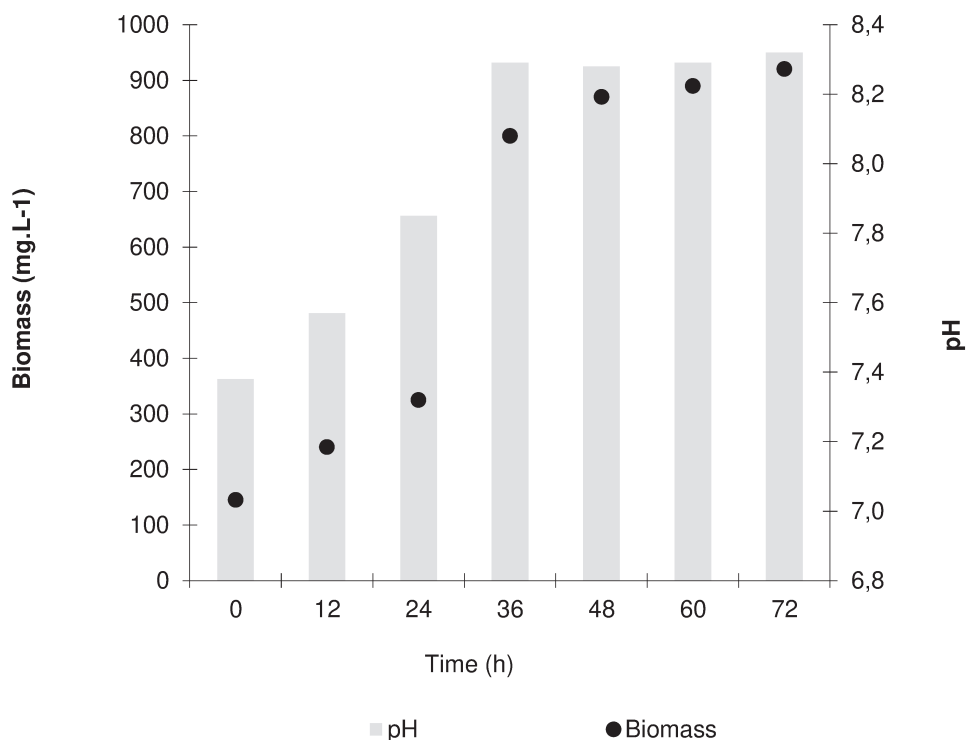


Figure 5-6 - Biomass growth curve and pH dynamic during the microalgal culture.

By using the elemental composition results of *C. vulgaris*, which was 49% of carbon, 2.6% of nitrogen and 7.9% of hydrogen, it was possible to quantify the amount of carbon incorporated into biomass during the culture growth (Table 5.13). So, for 36 h of residence time, the carbon mass fraction incorporated into biomass is $38.79 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}$, corresponding to 6.54% of total carbon bioconverted. JACOB-LOPES *et al.* (2010) investigated the cyanobacteria *Aphanothece microscopica Nageli* fed with 15% of

carbon dioxide and found that only 3% of carbon was converted into biomass. Another research group CHENG *et al.* (2006) obtained better results feeding the reactor with 1% of carbon dioxide. They suggested that the conversion of carbon into biomass depends on the concentration of CO₂ in the inlet flow rate: lower the concentration of CO₂ higher is the bioconversion into biomass.

In our case, the highest bioconversion was found in the gaseous phase where 523.20 mg·h⁻¹ of OC was found, corresponding to 88.17% of the difference (Figure 5-7) of the converted carbon fraction. According to the literature, those compounds could be (VOC) released from the reactor (JACOB-LOPES *et al.*, 2008; PIOVANI *et al.*, 2010). Our results were unexpected indicating that the volatiles are formed in much larger proportion than the microalgae cells. Intensive experiments were proceeded (without cells, blank experiments) to exam possible contaminants from the reactor or from the whole system.

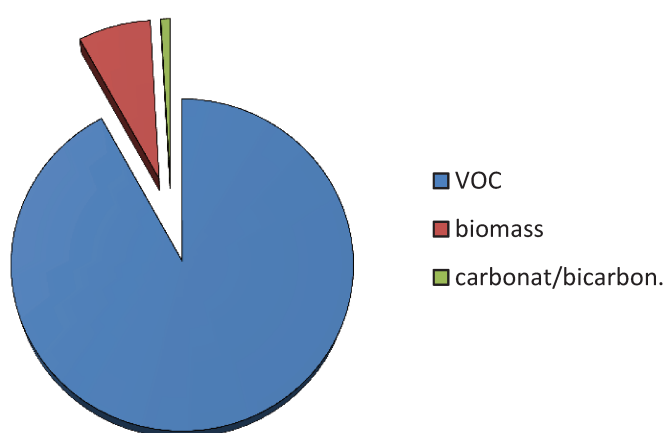


Figure 5-7 – Conversion of carbon dioxide bioconverted from *C. vulgaris*.

Several compounds have been previously identified in the headspace of cultures of microalgae, but not meticulously quantified (i.e. formaldehyde, acetaldehyde, glyoxal and propanal (NUCCIO *et al.*, 1995a), ethane, ethene, acetylene (ethyne), propane, propene, i-butane and n-butane (MCKAY *et al.*, 1996), non-methane hydrocarbons and isoprene (BROADGATE *et al.*, 2004) and organohalogens (SCARRATT e MOORE, 1996). Recently, TOLEDO-CERVANTES *et al.* (2010), identified 2-pentene, 1-hexene, propane, propylene, butane and isobutene.

Our initial results of VOC analysis by GC-MS indicate that the *C. vulgaris* was able to produce aldehydes, hydrocarbons and ketones.

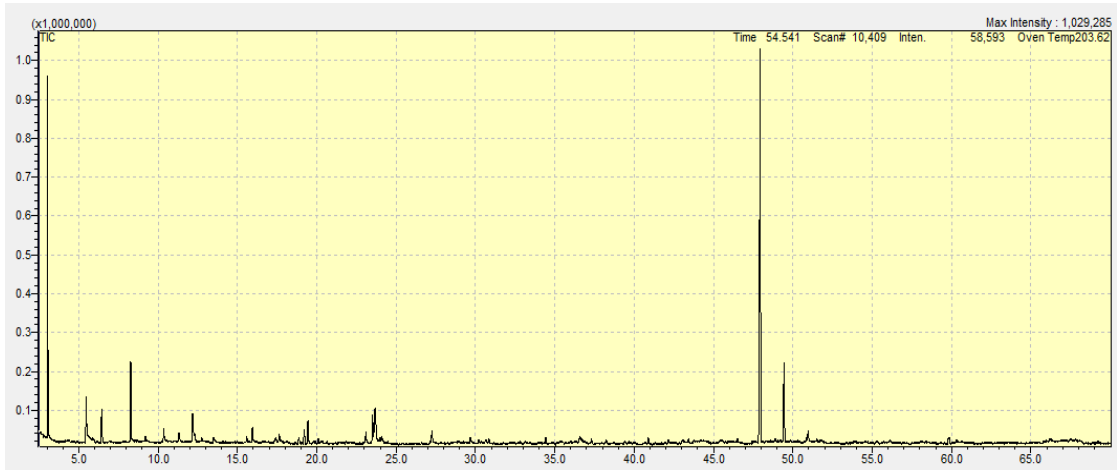


Figure 5-8 Chromatogram of the blank

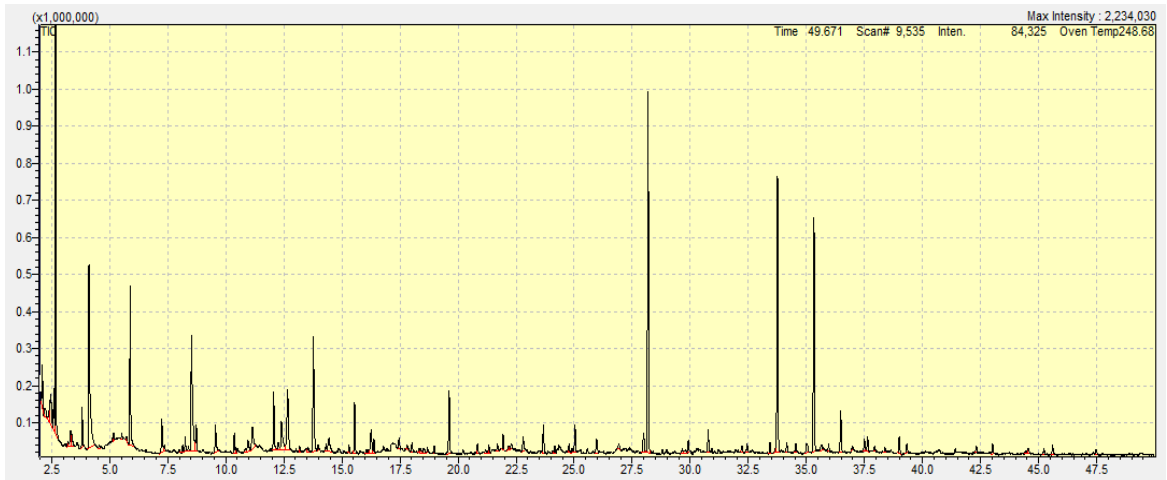


Figure 5-9 Chromatogram of the sample for 48h of cell residence time.

Table 5.14 - Volatile Organic Compounds produced by *Chlorella vulgaris* identified for 24h of cell residence time in a photobioreactor fed with 10% of carbon dioxide.

	Compound Name	Molecular Formula	% Area from the total
5 Carbons	1-Penten-3-ol	C ₅ H ₁₀ O	1.35
	Pentanal	C ₅ H ₁₀ O	1.01
	2-Pentenal	C ₅ H ₈ O	0.12
	1-Pentanol	C ₅ H ₁₂ O	0.65
6 Carbons	Hexanal	C ₆ H ₁₂ O	0.93
	1-Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	0.97
7 Carbons	Toluene	C ₇ H ₈	0.36
	2-Heptenal	C ₇ H ₁₂ O ₂	0.14
8 Carbons	5 Hepten-2-one	C ₈ H ₁₄ O	0.35
	2,3-Octadione	C ₈ H ₁₄ O ₂	0.13
	Octanal	C ₈ H ₁₆ O	0.75
	2-Octene	C ₈ H ₁₆	0.51
	1-Octanol	C ₈ H ₁₈	0.54
9 Carbons	Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	1.64
10 Carbons	Decanal	C ₁₀ H ₂₀ O	1.38
	2-Decenal	C ₁₀ H ₁₈ O	0.33
11 Carbons	2-Undecenal	C ₁₁ H ₂₀ O	0.26
12 Carbons	Dodecane	C ₁₂ H ₂₆	0.22
	Dodecanal	C ₁₂ H ₂₄ O	0.23
13 Carbons	Tridecane	C ₁₃ H ₂₈	0.15
14 Carbons	Tetradecane	C ₁₄ H ₃₀	0.38
17 Carbons	Heptadecane	C ₁₇ H ₃₆	0.64
18 Carbons	Octadecane	C ₁₈ H ₃₈	0.29
			14.43

ZUO *et al.* (2012) investigated the *Chlamydomonas reinhardtii* under salt stress conditions and suggested that the produced VOC are able to communicate stress between the cells. Also TOLEDO-CERVANTES *et al.* (2010) and MCKAY *et al.* (1996) suggested that those compounds are result of the oxidation of polyunsaturated lipids that can be in the culture medium and were produced during the autolysis of the cells.

A summary of the carbon mass balance for 36h of cell residence time in the photobioreactor, is presented in Figure 5-10.

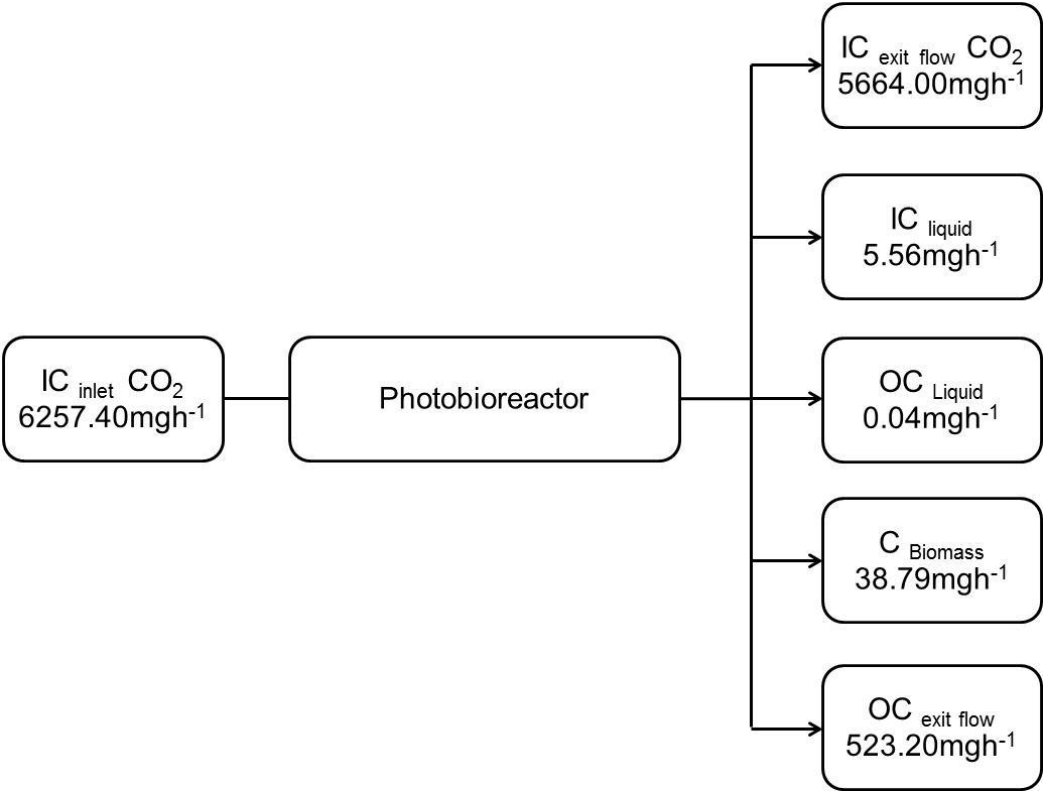


Figure 5-10 Carbon mass fractions in the photobioreactor for 36h of cell residence time.

BENTLEY e MELIS (2012) suggested a system to extract volatiles from a culture of microalgae *Botryococcus braunii* var. *Showa*, indicating that is possible to produce compounds like isoprene that can be used industrially.

Besides natural production, LINDBERG et al. (2010), using genetic engineering, could confer the ability to produce such hydrocarbon by the cyanobacterium *Synechocystis*, indicating that the production of volatiles from microalgae could be developed and increased the biofuels made from microalgae.

Predominantly, chains of C5 to C10 were so far identified (Figures 5.8 and 5.9 and Table 5.14). However, the carbon fraction corresponding to IC in the liquid phase was $5.56 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}$ (0.94%), considering the alkaline pH of the culture medium. HUIJGEN *et al.* (2007) suggested that carbonates or bicarbonates could be industrially recovered since they are widely used by pharmaceutical and food industry. OC compounds in the liquid phase were $0.04 \text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}$ representing 0.007% of the carbon bioconverted, and commonly are extracellular polymers which could potentially be commercialized as bioemulsificant agents, biofloculants, replacements of agar and in the pharmaceutical and cosmetic industries (DE PHILIPPIS e VINCENZINI, 1998; YOU e BARNETT, 2004).

5.4.4 Acknowledgements

Funding for this research was provided by Petróleo Brasileiro S/A – Petrobras and Fapesp, Capes and CNPq (Brazil).

6 – CONCLUSÕES

Conclusões

As análises para determinação das concentrações de carbono na entrada e saída do reator possibilitaram verificar que os métodos cromatográficos e analisador de carbono total podem ser utilizados para geração de dados para posterior estabelecimento de balanço de carbono simplificado em sistema de fotobiorreator com cultivo de microalgas em meio sintético,.

Para a determinação da concentração celular foram avaliados três métodos comumente utilizados em laboratórios a filtragem e secagem em estufa, secagem em estufa a 105°C e liofilização. Os resultados apresentaram variações inferiores a 10% indicando e podem ser utilizados nesta determinação.

Com relação ao teor de umidade os dois métodos utilizados, a secagem em estufa á 105 °C e liofilização apresentaram resultados em torno de 85%, indicando que os dois podem ser utilizados na determinação do teor de umidade presente na biomassa das microalgas. A determinação da porcentagem de água na biomassa deve ser feita antes de se iniciar outra determinação analítica, pois pode interferir nos resultados obtidos.

Para os métodos de determinação do teor de lipídeos baseados no método Bligh & Dyer avaliados neste trabalho, foi possível identificar variações nos valores das porcentagens de lipídeos obtidos de 3% a 25% dependendo do método utilizado. Além disso, pode-se observar que a presença de umidade na biomassa influencia nos resultados uma vez que as porcentagens de lipídeos obtidas com essa biomassa foram de 3 a 7% e para biomassa liofilizada 11 a 25%. Portanto, para a utilização de biomassa

úmida nas extrações de lipídeos será necessário o aprimoramento dos métodos de extração para esta biomassa e que possa ser utilizado em escala industrial.

Para a determinação do balance de carbono simplificado em fotobiorreatores, o crescimento da microalga *C. vulgaris* foi avaliado com 5, 10, 15, 20 e 45% de dióxido de carbono na entrada do fluxo gasoso do reator. Desta forma foi possível identificar a melhor velocidade máxima específica de crescimento nos experimento com 10% de CO₂ e assim avaliar as frações de carbono presentes no sistema.

Para os experimentos de 10%, a quantidade de carbono bioconvertida no sistema foi maior em 36h de cultivo, correspondendo a 9% do CO₂ injetado no sistema. Esta porcentagem pode ser aumentada utilizando melhorias na transferência de massa do sistema e parâmetros experimentais, ou seja, melhorando a geometria do reator, modo de distribuição dos gases, temperatura e luminosidade.

Para este tempo de cultivo, os principais produtos identificados foram a biomassa celular correspondente a 6% do carbono bioconvertido e os compostos orgânicos voláteis correspondentes a 88% do carbono bioconvertido. Além destes principais produtos pode-se observar a formação de compostos orgânicos extracelulares.

Uma identificação preliminar dos compostos orgânicos voláteis produzidos durante o cultivo indica a formação de hidrocarbonetos, aldeídos e cetonas que são compostos com interesse comercial que após sua separação podem intensificar o uso da biorrefinaria de microalgas.

7 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugestões para trabalhos futuros

- Aplicação do método desenvolvido para caracterização das frações de carbono em sistemas heterotróficos de cultivo com objetivo de identificar os produtos gerados pela bioconversão das diferentes fontes de carbono utilizadas.
- Identificação dos compostos orgânicos voláteis (VOC) produzidos de acordo com as fases de crescimento do microrganismo.

8 - REFÊNCIAS

ACIEN FERNANDEZ, F. G.; FERNANDEZ SEVILLA, J. M.; EGOROVA-ZACHERNYUK, T. A.; MOLINA GRIMA, E. Cost-effective production of ¹³C, ¹⁵N stable isotope-labelled biomass from phototrophic microalgae for various biotechnological applications. *Biomol Eng*, v. 22, n. 5-6, p. 193-200, 2005.

ADAMS, R. P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry*. Fourth Illinois: Allured Publishing Corporation, 1995.

AMARO, H. M.; MACEDO, Â. C.; MALCATA, F. X. Microalgae: An alternative as sustainable source of biofuels? *Energy*, v. 44, n. 1, p. 158-166, 2012.

AOAC. *Official Methods of Analysis of AOAC International: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS 2000*.

AUGUSTO, F.; LEITE E LOPES, A.; ZINI, C. A. Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, n. 3, p. 160-169, 2003.

BADGER, M. R.; PRICE, G. D. CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *Journal of Experimental Botany*, v. 54, n. 383, p. 609-622, 2003.

BAILEY, S. K. E.; WELLS, D. E. The measurement of lipids as a cofactor for organic contaminants in biota. *Proceedings of the QUASIMEME lipid workshop, 1994*. Dublin. p.13 – 16.

BECKER, E. W. *Microalgae Biotechnology and Microbiology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.

BENTLEY, F. K.; MELIS, A. Diffusion-based process for carbon dioxide uptake and isoprene emission in gaseous/aqueous two-phase photobioreactors by photosynthetic microorganisms. *Biotechnol Bioeng*, v. 109, n. 1, p. 100-109, 2012.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Chlorophyll content and minerals profile in the microalgae *Chlorella vulgaris* cultivated in hydroponic wastewater. *Ciencia Rural*, v. 38, n. 1, p. 54-58, Jan-Feb 2008.

BLACKBURN, S. I.; VOLKMAN, J. K. Microalgae: A renewable source of bioproducts. In: DUNFORD, N. T. (Ed.). *Food and industrial bioproducts and bioprocessing*: John Wiley & Sons, 2012.

BLIGH, E. G.; DYER, J. W. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry Physiology*, v. 37, p. 911 - 917 1959.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. In: R. OSINGA, J. T. J. G. B. e WIJFFELS, R. H. (Ed.). *Progress in Industrial Microbiology*: Elsevier, v. Volume 35, 1999. p.313-321.

BROADGATE, W. J.; MALIN, G.; KÜPPER, F. C.; THOMPSON, A.; LISS, P. S. Isoprene and other non-methane hydrocarbons from seaweeds: a source of reactive hydrocarbons to the atmosphere. *Marine Chemistry*, v. 88, n. 1-2, p. 61-73, 2004.

BRUNDTLAND, G. H. *Our common future* / World Commission on Environment and Development. Oxford University Press, 1987.

CAMPBELL, D.; HURRY, V.; CLARKE, A. K.; GUSTAFSSON, P.; OQUIST, G. Chlorophyll Fluorescence Analysis of Cyanobacterial Photosynthesis and Acclimation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 62, n. 3, p. 667-683, September 1, 1998 1998.

CHENG, L.; ZHANG, L.; CHEN, H.; GAO, C. Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. *Separation and Purification Technology*, v. 50, n. 3, p. 324-329, 2006.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol*, v. 26, n. 3, p. 126-31, 2008.

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

CHISTI, Y.; YAN, J. Energy from algae: Current status and future trends Algal biofuels - A status report. *Applied Energy*, v. 88, n. 10, p. 3277-3279, 2011.

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

DE PHILIPPIS, R.; VINCENZINI, M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 22, n. 3, p. 151-175, 1998.

DEMEYER, A.; JACOB, F., D, M.; MENGUY, G.; PERRIER, J. La Conversion Bioenergetique-Durayonnement Solaire. In: (Ed.). *le Biotechnologies*. Paris: Ed. Lavoisier, 1982. cap. 2, p.276-301.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. . *Ciência Rural*, v. 36, n. 6, p.1959-1967, 2006.

ERIKSEN, N.; RIISGÅRD, F.; GUNTHER, W.; LØNSMANN IVERSEN, J. On-line estimation of O₂ production, CO₂ uptake,

and growth kinetics of microalgal cultures in a gas-tight photobioreactor. *Journal of Applied Phycology*, v. 19, n. 2, p. 161-174, 2007.

EROGLU, E.; MELIS, A. "Density Equilibrium" Method for the Quantitative and Rapid In Situ Determination of Lipid, Hydrocarbon, or Biopolymer Content in Microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 102, n. 5, p. 1406-1415, 2009.

EROGLU, E.; MELIS, A. Extracellular terpenoid hydrocarbon extraction and quantitation from the green microalgae *Botryococcus braunii* var. *Showa*. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 7, p. 2359-2366, 2010.

EROGLU, E.; OKADA, S.; MELIS, A. Hydrocarbon productivities in different *Botryococcus* strains: comparative methods in product quantification. *J Appl Phycol*, v. 23, n. 4, p. 763-775, 2011.

FALKOWSKI, P. G. Photosynthesis: The paradox of carbon dioxide efflux. *Current Biology*, v. 7, n. 10, p. R637-R639, 1997.

FAY, P. The blue greens (cyanophyta – cyanobacteria). 5^o. London: Ed. Edward Arnold, 1983.

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

FRANCISCO, É. C.; NEVES, D. B.; JACOB-LOPES, E.; FRANCO, T. T. Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 85, n. 3, p. 395-403, 2010.

GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; MORENO, J.; MANZANO, J. C.; FLORENCIO, F. J.; GUERRERO, M. G. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, v. 115, n. 1, p. 81-90, 2005.

GARCÍA-SERNA, J.; PÉREZ-BARRIGÓN, L.; COCERO, M. J. New trends for design towards sustainability in chemical engineering: Green engineering. *Chemical Engineering Journal*, v. 133, n. 1-3, p. 7-30, 2007.

GRESSEL, J. Transgenics are imperative for biofuel crops. *Plant Science*, v. 174, p. p. 246–263, 2008.

GROSSMAN, A. R.; SCHAEFER, M. R.; CHIANG, G. G.; COLLIER, J. L. The Responses of Cyanobacteria to Environmental Conditions: Light and Nutrients

HEMSCHEMEIER, A.; MELIS, A.; HAPPE, T. Analytical approaches to photobiological hydrogen production in unicellular green algae. *Photosynthesis Research*, v. 102, n. 2, p. 523-540, 2009.

HO, S. H.; CHEN, C. Y.; LEE, D. J.; CHANG, J. S. Perspectives on microalgal CO₂-emission mitigation systems--a review. *Biotechnol Adv*, v. 29, n. 2, p. 189-98, Mar-Apr 2011.

HSUEH, H. T.; CHU, H.; YU, S. T. A batch study on the bio-fixation of carbon dioxide in the absorbed solution from a chemical wet scrubber by hot spring and marine algae. *Chemosphere*, v. 66, n. 5, p. 878-886, 2007.

http://www.bae.uky.edu/Biofuels/Algae/photo_gallery/photo_gallery.htm. Acesso em: 18/02.

<http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/strainDetailAction.do?strainId=26594>. Acesso em: 18/02.

HUIJGEN, W. J. J.; COMANS, R. N. J.; WITKAMP, G.-J. Cost evaluation of CO₂ sequestration by aqueous mineral carbonation. *Energy Conversion and Management*, v. 48, n. 7, p. 1923-1935, 2007.

IPCC. Carbon dioxide capture and storage. CHANGE, I. P. O. C. 2007.

ISHIDA, T.; HASEGAWA, N.; HAYASHI, N. R.; PEERAPORNPISAL, Y.; ISHII, M.; IGARASHI, Y.; KODAMA, T. Growth characteristics and dense culture of a thermophilic cyanobacterium, *Chroococcidiopsis sp. strain TS-821*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 83, n. 6, p. 571-576, 1997.

ISSARAPAYUP, K.; POWTONGSOOK, S.; PAVASANT, P. Economical review of *Haematococcus pluvialis* culture in flat-panel airlift photobioreactors. *Aquacultural Engineering*, v. 44, n. 3, p. 65-71, 2011.

IWAMOTO, H. Industrial Production of Microalgal Cell-mass and Secondary Products - Major Industrial species. In: RICHMOND, A. (Ed.). *Handbook of Microalgal Culture*: Blackwell Science, 2004. cap. 11,

IZARD, J.; LIMBERGER, R. J. Rapid screening method for quantitation of bacterial cell lipids from whole cells. *Journal of Microbiological Methods*, v. 55, p. 411 – 418, 2003.

JACOB-LOPES, E.; CACIA FERREIRA LACERDA, L. M.; FRANCO, T. T. Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica Nægeli* in a bubble column photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 40, n. 1, p. 27-34, 2008.

JACOB-LOPES, E.; GIMENES SCOPARO, C. H.; QUEIROZ, M. I.; FRANCO, T. T. Biotransformations of carbon dioxide in photobioreactors. *Energy Conversion and Management*, v. 51, n. 5, p. 894-900, 2010.

JACOB-LOPES, E.; REVAH, S.; HERNANDEZ, S.; SHIRAI, K.; FRANCO, T. T. Development of operational strategies to remove carbon dioxide in photobioreactors. *Chemical Engineering Journal*, v. 153, n. 1-3, p. 120-126, 2009.

JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C.; FRANCO, T. Rates of CO₂ removal by *Aphanothece microscopica Nägeli* in tubular photobioreactors. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v. 47, n. 8, p. 1365-1373, 2008.

JEON, Y.-C.; CHO, C.-W.; YUN, Y.-S. Measurement of microalgal photosynthetic activity depending on light intensity and quality. *Biochemical Engineering Journal*, v. 27, n. 2, p. 127-131, 2005.

KAJIWARA, S.; YAMADA, H.; OHKUNI, N.; OHTAGUCHI, K. Design of the bioreactor for carbon dioxide fixation by *Synechococcus PCC7942*. *Energy Conversion and Management*, v. 38, Supplement, n. 0, p. S529-S532, 1997.

KAMM, B. Production of Platform Chemicals and Synthesis Gas from Biomass. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 46, n. 27, p. 5056-5058, 2007.

KAMM, B.; KAMM, M. Biorefineries--multi product processes. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, v. 105, p. 175-204, 2007a.

KAMM, B.; KAMM, M. International biorefinery systems. *Pure and Applied Chemistry*, v. 79, n. 11, p. 1983-1997, 2007b.

KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 64, n. 2, p. 137-145, 2004.

KAMM, B.; KAMM, M.; GRUBER, P. R.; KROMUS, S. Biorefinery Systems – An Overview. In: (Ed.). *Biorefineries-Industrial Processes and Products*: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008. p.1-40..

LAM, M. K.; LEE, K. T. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnol Adv*, 2012.

LAM, M. K.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Current status and challenges on microalgae-based carbon capture. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, v. 10, n. 0, p. 456-469, 2012.

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

LEE, B. D.; APEL, W. A.; WALTON, M. R. Calcium carbonate formation by *Synechococcus sp.* strain PCC 8806 and *Synechococcus sp.* strain PCC 8807. *Bioresource Technology*, v. 97, n. 18, p. 2427-2434, 2006.

LEE, J.; YOO, C.; JUN, S.; AHN, C.; OH, H. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 575 – 577, 2010.

LEE, Y.-K. Heterotrophic carbon nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed.). *Handbook of microalgal culture - Biotechnology and applied phycology*. Oxford UK: Blackwell Science, 2004. cap. 7,

LEWIS, T.; NICHOLS, P. D.; MCMEEKIN, T. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs *Journal of Microbiological Methods*, v. 43, p. p.107–116, 2000.

LINDBERG, P.; PARK, S.; MELIS, A. Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using *Synechocystis* as the model organism. *Metab Eng*, v. 12, n. 1, p. 70-9, 2010.

LIVERMAN, D. M.; HANSON, M. E.; BROWN, B. J.; MERIDETH, R. W. Global sustainability: Toward measurement. *Environ Manage*, v. 12, n. 2, p. 133-143, 1988.

LOURENÇO, S. O. *Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações*. São Carlos: Rima Editora, 2007.

MCKAY, W. A.; TURNER, M. F.; JONES, B. M. R.; HALLIWELL, C. M. Emissions of hydrocarbons from marine phytoplankton—Some results from controlled laboratory experiments. *Atmospheric Environment*, v. 30, n. 14, p. 2583-2593, 1996.

MELIS, A. Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: Minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Science*, v. 177, n. 4, p. 272-280, 2009.

MOLINA GRIMA, E.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; GARCÍA CAMACHO, F.; CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *J Biotechnol*, v. 70, n. 1-3, p. 231-247, 1999.

MUÑOZ, J.; MUDGE, S. M.; SANDOVAL, A. Effects of ionic strength on the production of short chain volatile hydrocarbons by *Dunaliella salina* (Teodoresco). *Chemosphere*, v. 54, n. 8, p. 1267-1271, 2004.

MUNOZ, R.; GUIEYSSE, B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Res*, v. 40, n. 15, p. 2799-815, Aug 2006.

NAGY, M. T.; JANSSENS, I. A.; CURIEL YUSTE, J.; CARRARA, A.; CEULEMANS, R. Footprint-adjusted net ecosystem CO₂ exchange and carbon balance components of a temperate forest. *Agricultural and Forest Meteorology*, v. 139, n. 3-4, p. 344-360, 2006.

NUCCIO, J.; SEATON, P. J.; KIEBER, R. J. Biological production of formaldehyde in the marine environment. *Limnology and Oceanography*, v. 40, n. 3, p. 521-527, 1995.

ONO, E.; CUELLO, J. Feasibility Assessment of Microalgal Carbon Dioxide Sequestration Technology with Photobioreactor and Solar Collector. *Biosystems Engineering*, v. 95, n. 4, p. 597-606, 2006.

ONO, E.; CUELLO, J. L. Carbon Dioxide Mitigation using Thermophilic Cyanobacteria. *Biosystems Engineering*, v. 96, n. 1, p. 129-134, 2007.

PARMAR, A.; SINGH, N. K.; PANDEY, A.; GNANSOUNOU, E.; MADAMWAR, D. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. *Bioresour Technol*, v. 102, n. 22, p. 10163-10172, 2011.

PEREZ-GARCIA, O.; BASHAN, Y.; PUENTE, M. E. Organic Carbon Supplementation of Sterilized Municipal Wastewater Is Essential for Heterotrophic Growth and Removing Ammonium by the Microalga *Chlorella Vulgaris*. *Journal of Phycology*, v. 47, n. 1, p. 190-199, Feb 2011.

PIOVANI, M. R.; JACOB-LOPES, E.; HANTAO, L. W.; AUGUSTO, F.; FRANCO, T. T. Carbon Footprint in Photobioreactors. Conference on Biofiltration for Air Pollution Control, 2010. Washington D.C., USA.

POSTEN, C.; SCHAUB, G. Microalgae and terrestrial biomass as source for fuels--a process view. *J Biotechnol*, v. 142, n. 1, p. 64-9, 2009.

PRENTICE, I. C.; FARQUHAR, G. D.; FASHAM, M. J. R.; GOULDEN, M. L.; HEIMANN, M.; JARAMILLO, V. J.; KHESHGI, H. S.; LE QUÉRÉ, C.; SCHOLLES, R. J.; WALLACE, D. W. R.; ARCHER, D.; ASHMORE, M. R.; AUMONT, O.; BAKER, D.; BATTLE, M.; BENDER, M.; BOPP, L. P.; BOUSQUET, P.; CALDEIRA, K.; CIAIS, P.; COX, P. M.; CRAMER, W.; DENTENER, F.; ENTING, I. G.; FIELD, C. B.; FRIEDLINGSTEIN, P.; HOLLAND, E. A.; HOUGHTON, R. A.; HOUSE, J. I.; ISHIDA, A.; JAIN, A. K.; JANSSENS, I. A.; JOOS, F.; KAMINSKI, T.; KEELING, C. D.; KEELING, R. F.; KICKLIGHTER, D. W.; KOHFELD, K. E.; KNORR, W.; LAW, R.; LENTON, T.; LINDSAY, K.; MAIER-REIMER, E.; MANNING, A. C.; MATEAR, R. J.; MCGUIRE, A. D.; MELILLO, J. M.; MEYER, R.; MUND, M.; ORR, J. C.; PIPER, S.; PLATTNER, K.; RAYNER, P. J.; SITCH, S.; SLATER, R.; TAGUCHI, S.; TANS, P. P.; TIAN, H. Q.; WEIRIG, M. F.; WHORF, T.; YOOL, A. The Carbon Cycle and Atmospheric Carbon Dioxide - Climate Change 2001. The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. . Cambridge University Press. Cambridge, p.183-237. 2001

PRUVOST, J.; CORNET, J. F.; GOETZ, V.; LEGRAND, J. Modeling Dynamic Functioning of Rectangular Photobioreactors in Solar Conditions. *Aiche Journal*, v. 57, n. 7, p. 1947-1960, 2011.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 65, n. 6, p. 635-48, Nov 2004.

RAGAUSKAS, A. J.; WILLIAMS, C. K.; DAVISON, B. H.; BRITOVSEK, G.; CAIRNEY, J.; ECKERT, C. A.; FREDERICK, W. J.; HALLETT, J. P.; LEAK, D. J.; LIOTTA, C. L.; MIELENZ, J. R.; MURPHY, R.; TEMPLER, R.; TSCHAPLINSKI, T. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. *Science*, v. 311, n. 5760, p. 484-489, 2006.

REBOLLOSO FUENTES, M. M.; GARCIA SÁNCHEZ, J. L.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J. M.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; SÁNCHEZ PÉREZ, J. A.; MOLINA GRIMA, E. Outdoor continuous culture of *Porphyridium cruentum* in a tubular photobioreactor: quantitative

analysis of the daily cyclic variation of culture parameters. In: R. OSINGA, J. T. J. G. B. e WIJFFELS, R. H. (Ed.). Progress in Industrial Microbiology: Elsevier, v. Volume 35, 1999. p.271-288.

SACHIO, M. CO₂ assimilation in a thermophilic cyanobacterium. Energy Conversion and Management, v. 36, n. 6-9, p. 763-766, 1995.

SAVAGE, N. Algae: The scum solution. Nature, v. 474, n. 7352, p. S15-S16, 2011.

SCARRATT, M. G.; MOORE, R. M. Production of methyl chloride and methyl bromide in laboratory cultures of marine phytoplankton. Marine Chemistry, v. 54, n. 3-4, p. 263-272, 1996.

SCHIRMER, W. N.; GAUER, M. A. Os biocombustíveis no Brasil: panorama atual, emissões gasosas e os métodos analíticos de monitoramento da qualidade do ar referente a gases de natureza orgânica Biofuels in Brazil: the current scene, gaseous emissions and analytical methods on air. 2012, v. 8, n. 1, 2012.

SCHMITZ, R.; DAL MAGRO, C.; COLLA, L. M. Aplicações ambientais de microalgas. Revista CIATEC – UPF. 4 48-60 p. 2012.

SCHOBERT, B.; ELSTNER, E. F. Production of Hexanal and Ethane by *Phaeodactylum triconutum* and its correlation to fatty acid oxidation and bleaching of photosynthetic pigments. Plant Physiology, v. 66, p. 215-219, 1980.

SCRAGG, A. H. The effect of phenol on the growth of *Chlorella vulgaris* and *Chlorella VT-1*. Enzyme and Microbial Technology, v. 39, n. 4, p. 796-799, 2006.

SHAO, H.; HUANG, B.; YAO, W.; LI, H. Synthesis and characterization of low relative molecular weight trans-1,4-poly(isoprene). *Journal of Applied Polymer Science*, v. 107, n. 6, p. 3734-3738, 2008.

SHAW, S. L.; CHISHOLM, S. W.; PRINN, R. G. Isoprene production by *Prochlorococcus*, a marine cyanobacterium, and other phytoplankton. *Marine Chemistry*, v. 80, n. 4, p. 227-245, 2003.

SLEGGERS, P. M.; WIJFFELS, R. H.; VAN STRATEN, G.; VAN BOXTEL, A. J. B. Design scenarios for flat panel photobioreactors. *Applied Energy*, v. 88, n. 10, p. 3342-3353, Oct 2011.

SLUITER, A.; HAMES, B.; HYMAN, D.; PAYNE, C.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; WOLFE, J. Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples Laboratory Analytical Procedure (LAP) 2008

SMEDES, F.; THOMASEN, T. K. Evaluation of the Bligh & Dyer Lipid determination method. *Marine Pollution Bulletin*, v. 32, n. 8/9, p. 618 – 688, 1996.

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

SUBRAMANIAN, G.; THAJUDDIN, N. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current science*, v. 89, p. 47-57, 2005.

TATTINI JR., V.; PARRA, D. F.; PITOMBO, R. N. M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 1, p. 127-136, 2006.

The Molecular Biology of Cyanobacteria. In: BRYANT, D. A. (Ed.): Springer Netherlands, v.1, 2004. p.641-675. (Advances in Photosynthesis and Respiration)..

TOLEDO-CERVANTES, A.; MORALES, M.; REVAH, S. Carbon Dioxide Sequestration in Photobioreactors Using Indigenous microalgae. Conference on Biofiltration for Air Pollution Control, 2010. Washing D.C., USA.

VAN BEILEN, J. B. Why microalgal biofuels won't save the internal combustion machine. Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr, v. 4, n. 1, p. 41-52, 2010.

WATANABE, Y.; HALL, D. O. Photosynthetic CO₂ conversion technologies using a photobioreactor incorporating microalgae - energy and material balances. Energy Conversion and Management, v. 37, n. 6-8, p. 1321-1326, 1996.

WATANABE, Y.; SAIKI, H. Development of a photobioreactor incorporating Chlorella sp. for removal of CO₂ in stack gas. Energy Conversion and Management, v. 38, Supplement, n. 0, p. S499-S503, 1997.

WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M. J. An Outlook on Microalgal Biofuels. Science, v. 329, n. 5993, p. 796-799, August 13, 2010.

WU, X.; MERCHUK, J. C. Simulation of algae growth in a bench scale internal loop airlift reactor. Chemical Engineering Science, v. 59, n. 14, p. 2899-2912, 2004.

YEHOUDA, M. Distribution of Inorganic Carbon Among its Component Species in Cyanobacteria: Do Cyanobacteria in fact Actively Accumulate Inorganic Carbon? Journal of Theoretical Biology, v. 185, n. 1, p. 31-45, 1997.

YEN, H.-W.; BRUNE, D. E. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. Bioresource Technology, v. 98, n. 1, p. 130-134, 2007.

YOON, J. H.; SIM, S. J.; KIM, M.-S.; PARK, T. H. High cell density culture of *Anabaena variabilis* using repeated injections of carbon dioxide for the production of hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 27, n. 11-12, p. 1265-1270, 2002.

YOU, T.; BARNETT, S. M. Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 19, n. 3, p. 251-258, 2004.

ZAK, E.; NORLING, B.; MAINTRA, R.; HUANG, F.; ANDERSSON, B.; PAKRASI, B. The initial steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occurs in plasma membranes. *Plant Biology*, v. 32, p. 13443- 13448, 2001.

ZENG, X.; DANQUAH, M. K.; CHEN, X. D.; LU, Y. Microalgae bioengineering: From CO₂ fixation to biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 15, n. 6, p. 3252-3260, 2011.

ZUO, Z.-J.; ZHU, Y.-R.; BAI, Y.-L.; WANG, Y. Volatile communication between *Chlamydomonas reinhardtii* cells under salt stress. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 40, n. 0, p. 19-24, 2012.

9 -APÊNDICE



WASHINGTON DC
METRO AREA / HISTORIC ALEXANDRIA

OCTOBER 28-29TH

Carbon footprint in photobioreactors

M. R. Piovani*, E. Jacob-Lopes**, L. W. Hantao***, F. Augusto*** and T. T. Franco*.

* School of Chemical Engineering, State University of Campinas, UNICAMP, 500 Albert Einstein Av., Barão Geraldo CEP - 13083-852 - Campinas - SP-BR.

(E-mail: franco@feq.unicamp.br, piovani@feq.unicamp.br)

** Food Science and Technology Department, Federal University of Santa Maria, UFSM, 97105-900, Santa Maria-RS, BR.

(E-mail: jacoblopes@pq.cnpq.br)

*** Institute of Chemistry, State University of Campinas, UNICAMP, 13084-971, Campinas-SP-BR.

(E-mail: augusto@iqm.unicamp.br)

Abstract

Recently the study of carbon cycle has attracted large attention of many scientists due to the impact of CO₂ in the global climate. The establishment of carbon footprint is an important tool for evaluation and validation of new technologies in order to allow the calculation of emissions of greenhouse gases. Our results show that CO₂ was converted into carbonates, bicarbonates and exocellular polymers in liquid phase; it was converted to cellular biomass in the solid phase and in the gaseous phase into volatile organic compounds.

Keywords: (carbon footprint, photobioreactor, microalgae and VOC)

INTRODUCTION

With the increasing of carbon dioxide concentration in the atmosphere and its impact on the global climate, many scientists turned their attention to the carbon cycle considering all carbon fluxes that act simultaneously in the modification of terrestrial ecosystems thus obtaining the carbon mass balance (Nagy et. al, 2006); (Prentice et. al, 2000); (Goulden et. al, 1996).

On this way, the definition of the carbon footprint is being considered fundamental in the establishment, evaluation and validation of technologies to control greenhouse gases. The term carbon footprint is defined as a measure of the impact of an activity on the environment, expressed in terms of the amount of greenhouse gases (GHG) produced, measured in units of carbon dioxide equivalent. This parameter is valid for analyzing the impact of an individual, a process or an ecosystem in global warming (Wiedmann et. al, 2007).

Biotechnological processes for the conversion of carbon dioxide have been considered as a viable possibility to abate emissions of this pollutant. These processes are based on photobioreactors or in open ponds commonly used for the development of photosynthetic reactions, in which microalgae are used as biocatalysts in a series of biochemical reactions responsible for conversion of CO₂ into products of photosynthetic metabolism (Ono & Cuello, 2007).

The study of the carbon cycle and determining the carbon footprint in photobioreactors could clear up some uncertainties about the true potential to reduce GHG. Many compounds are likely to be formed from conversion of CO₂ by microalgae (Jacob-Lopes et. al, 2008), in this regards, the objective of this work was to establish the carbon footprint in a photobioreactor and evaluate its potential in the mitigation of CO₂.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism and culture medium

The experiments were made using *Chlorella vulgaris* (CPCC90), which was obtained from the Canadian Phycological Culture Centre; and the stock cultures were propagated and maintained on synthetic BBM medium (Ripka et. al, 1979) pH= 6.8. The incubation conditions were 25°C, photon flux density of $15\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ and a photoperiod of 24h.

Photobioreactor and experimental conditions

The experiments were carried out in a 2L bubble column photobioreactor fed with synthetic BBM medium. Lighting was provide by sixteen 20W fluorescent lamps, located in the photoperiod chamber and the gas flow was controlled by three rotameters that measured the carbon dioxide, air and mixture of gases flow rates, the diagram of the experiment apparatus is shown on Fig. 1. Initial cell concentration was $0.1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and the reactor was operated isothermally at 30°C with photon flux density $150\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ and continuous aeration of $1\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ with air contaminated with 5% of carbon dioxide.

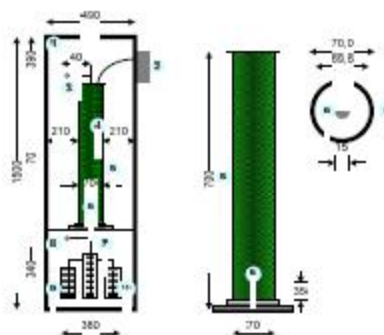


Figure 1. Photobioreactor diagram. 1: photoperiod chamber; 2: pH, temperature and CO₂ analyser; 3: gas exit sampler; 4: pH, temperature and CO₂ sensor; 5: photobioreactor; 6: gas diffuser; 7: system controlling the flow rate and mixture of the gases; 8: Gas entrance sampler; 9: Air flow meter; 10: CO₂ flow meter. All dimensions in mm.

Analytical methods

Measurements of cell concentration, pH, dissolved carbon dioxide for the liquid phase; organic carbon, inorganic carbon and total carbon for the liquid and gaseous phases; were monitored every 12 h during the microorganism growth phase and was made in triplicate.

The intensity of the light incident on the photobioreactor was measured on the external column surface using a digital luximeter (Minipa MLM 1010) and the temperature was controlled using a thermostat. Cell concentration was determined gravimetrically by filtering a known volume of the medium through a $0.45\mu\text{m}$ filter and drying at 60°C for 24h; pH dynamics during the culture, was evaluated using a pH meter (Hanna, model 8417).

Elemental composition of the microorganism was determined using a CHNS/O elemental analyzer (2400-Perkin Elmer, Boston, MA, USA), on those analysis, 2.0mg samples of biomass were oxidized with a temperature of 1000°C and a thermal conductivity probe for carbon, nitrogen and hydrogen, determined the resulting gases. Acetanilide, with the composition: 71.09% carbon, 11.84% oxygen, 6.71% hydrogen and 10.36% nitrogen, was used as standard.

Total carbon in the liquid and gas phases were carried out on a carbon analyzer TOC-VCSN (Shimadzu, Kyoto, Japan). For the liquid phase measurements, 20mL of the medium was filtered in a 0.45µm filter and used for the analysis. In total carbon analysis, 27µL samples were carried to the combustion tube at 680°C where occurred the catalytic oxidization to CO₂. To inorganic carbon analysis, samples of 27µL reacted with hydrochloric acid 2mol.L⁻¹ to convert all the inorganic carbon into CO₂. In both cases, the carbon dioxide was quantified by non dispersive infrared absorption and the concentrations were calculated through analytical curves (pick area \times concentration mg.L⁻¹) previously made with standards solutions.

For gas samples measurements of total carbon, 50µL samples were injected and carried over an airflow provided by an analytical O₂ cylinder into the combustion tube which was at 680°C and were catalytic oxidized to CO₂, to analyzed inorganic carbon, 40µL samples were injected and carried directly to the detector. They were quantified by non dispersive infrared detector and the concentrations achieved with analytical curves of pick area \times concentration (mg.L⁻¹) made using the same conditions with pure CO₂. Gaseous phase was analyzed dynamically and liquid and solid phases in intermittent mode.

For the initial analysis of VOC produced by microalgae, compounds were pre concentrated using (DVB/CAR/PDMS-50/30µm) (Supelco) SPME fiber, and determined by GCMS-QP2010 (Shimadzu) as described by (Augusto et. al, 2003) and (Adams, 1995).

Results analysis

Elimination capacity (EC) Eq. (1) is the mass of CO₂ removed per unit volume of reactor per unit time and was used to describe the performance of the photobioreactor and corresponds to the amount of carbon dioxide converted by the microorganism.

$$EC = \frac{(C_o - C_i)Q}{V_R} \quad (1)$$

Where C_o is outlet CO₂ concentration (mg.L⁻¹), C_i is inlet CO₂ concentration (mg.L⁻¹), Q is the gas flow (L.min⁻¹) and V_R is the volume of the reactor (L)

The simplified reaction produced by the algae in the synthesis of new cells and products of photosynthetic metabolism is illustrated in Eq. (2). In this reaction, C₆H₁₀O₃N was considered as *Chlorella*'s cell molecular formula (McKinney, 2004), *E.P.* represents the production of exocellular polymers and *VOC* volatile organic compounds produced and $a < e$ because we had cellular production.



RESULTS

According to several authors the culture of microalgae in photobioreactors converts carbon dioxide in products of photosynthetic metabolism, as biomass, exocellular polymers, carbonates and bicarbonates, volatile organic compounds and biohydrogen (Jacob-Lopes et. al, 2010), (Chisti, 2007); (Yen & Brune, 2007), (Ishida et. al, 1997), (Lee et. al, 2006), (Muñoz et. al, 2004), (Yoon, 2002).

Fig. 2 presents the microorganism growth curve and pH dynamic. An analysis on the growth curve shows an adaption phase of 12h, a maximum biomass concentration of 1310 mg.L⁻¹ in 72h of cell

residence time and a maximum pH=8.2. The maximum growth rate was 0.792 d^{-1} .

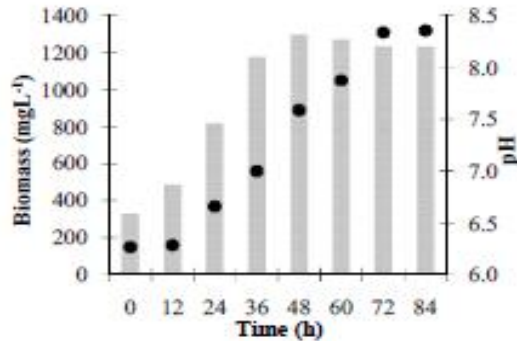


Figure 2. Biomass growth curve (black dot) and pH dynamic (bars).

In order to establish the carbon footprint in the photobioreactor the first step was to verify in what cell residence time was the maximum elimination capacity (EC), which is the maximum carbon dioxide conversion. Analysing the EC results EC (Fig. 3) was observed that the maximum value was $15.11 \text{ mg.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ was achieved for 36h. This was similar to the value obtained by Francisco et. al, (2009) of $17.8 \text{ mg.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ for *Chlorella vulgaris* fed with 15% of carbon dioxide. However Jacob-Lopes et al (2008) reported EC values varying from 1.50 to $108.56 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ for the cyanobacteria *Aphanotheca Microscopica Nägeli* in different culture conditions, 3, 5, 25, 50 and 62% of CO_2 concentration, 960, 3000, 6000, 9000, 11 0000 Lux of light intensity and 21,5, 25, 30, 35, and $38,5^\circ\text{C}$ of temperature.

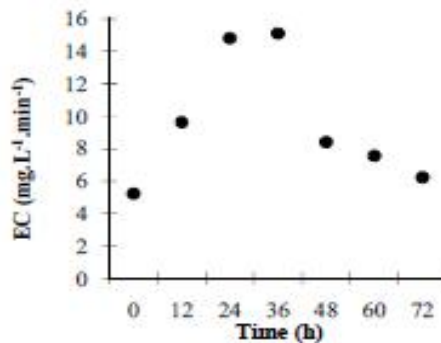


Figure 3. Data of Elimination Capacity in $\text{mg CO}_2.\text{L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ during 72h.

The carbon mass fractions in the liquid and solid phases for 36h of residence time (Fig. 4) indicate that almost 90% of the carbon injected in the system was not converted, exiting the reactor as CO_2 . This figure could be reduced by improving the performance of the CO_2 utilization by selecting optimized configurations of the photobioreactor, as suggested by Jacob-Lopes et. al, (2009).

From the converted fraction, only 0.57% represented carbonates and bicarbonates in the liquid

phase, a recovery of these compounds could have commercial significance, since they are widely used by pharmaceutical and food industry (Huijgen et. al, 2007). Also in the liquid phase, the carbon fraction corresponding to exocellular polymers was 0.11%. These compounds are usually employed as bioemulsificant agents, biofloculantes, replacements of agar and in the pharmaceutical and cosmetic industries (De Philippis & Vicenzini, 1998) and (You & Barnett , 2004).

Cell composition analysis indicated that 50% of the cell is made out of carbon; our results indicate that, considering only the solid phase, the carbon fraction incorporated into biomass was 3.2%. This result is similar than those obtained by Jacob-Lopes et. al, (2010) for the cyanobacteria *Aphanotece microscopica Nageli* and smaller than that obtained by Cheng et. al, (2006), fed with 1% of carbon dioxide. This microalgae behaviour in photobioreactors indicates that the conversion of carbon into biomass depends on the concentration of CO₂ in the inlet flow rate: lower the concentration of CO₂ higher is the bioconversion into biomass.

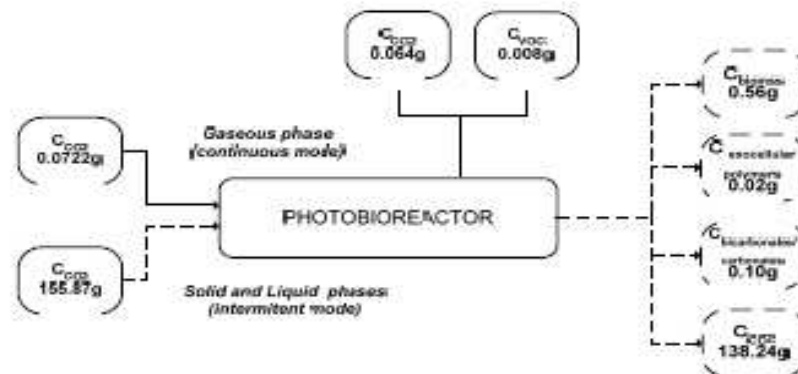


Figure 4. Carbon mass fractions in the photobioreactor for 36h of cell residence time. (---) line corresponds to intermittent mode (liquid and solid phases), (□ □ □ □ □ □) corresponds to continuous mode (gaseous phase).

Similar behaviour was observed in the gaseous phase, where 89% of the total carbon dioxide injected was not converted. It was found that 97.6% correspond to VOCs, considering only the bioconverted fraction.

According to the literature, different VOC produced by microalgae have been identified as formaldehyde, acetaldehyde, glyoxal and propanal (Nuccio et. al, 1995), ethane, ethene, acetylene (ethyne), propane, propene, i-butane and n-butane (McKay et. al, 1995), non-methane hydrocarbons and isoprene (Broadgate et. al, 2004) and organohalogens (Scarratt & Moore, 1996). Our initial results on the analysis of the VOC produced in photobioreactor indicate that the *Chlorella vulgaris* under experimental tested conditions was able to produce aldehydes and hydrocarbons.

CONCLUSION

The establishment of carbon footprint in photobioreactors provides the identification of all carbon fluxes in the system, indicating the conversion of CO₂ into biomass, exocellular polymers, and VOC. The amount of carbon dioxide converted corresponds to almost 11% of the injected in the system, that percentage could be increased with increments in mass transfer and analyze influence of experimental parameters in the production of those compounds. Also, is important to identify and

quantify the VOC produced to verify which compounds could be industrially useful.

ACKNOWLEDGEMENTS

Funding for this research was provided by Petróleo Brasileiro S/A – Petrobras and Fapesp, Capes and CNPq (Brazil).

REFERENCES

- Nagy, M.T.; Janssens, I.A.; Yuste, J.C.; Carrara, A.; Ceulemans, (2006) R. Footprint - Adjusted Net Ecosystem CO₂ Exchange and Carbon Balance Components of a Temperate Forest. *Agric. For. Meteorol.*, 139: 344-360.
- Prentice, I.C. et. al. The Carbon Cycle and Atmospheric Carbon Dioxide. In: houghton, J.T., Ding, Y., Griggs, D.J., Noguera, M., van der Linden, P.J., Xiaosu, D. (Eds.), Climate Change 2001. The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 183-237 Goulden et al., 1996)
- Goulden, M.L., Minger, J.W., Fan, S.M., Daube, B.C., Wofsy, S.C., (1996) Measurements of Carbon Storage by Long - Term Eddy Correlation: Methods and a Critical Assessment of Accuracy. *Global Change Biol.*, 2: 169-182.
- Wiedmann, T.; Minx, J. *A Definition of "Carbon Footprint"*. ISA UK Research Report 07-01, June 2007. Centre for Integrated Sustainability Analysis, Durham, UK.
- Ono, E., Cuello, J.L. (2007) Carbon dioxide mitigation using thermophilic cyanobacteria. *BioSystems Eng.*, 96: 129-134.
- Jacob-Lopes, E.; Scoparo, C.H.G.; Franco, T.T. (2008) Rates of CO₂ removal by *Aphanotece microscopica* Nägeli in tubular photobioreactors. *Chem. Eng. Process.* 47: 1365-1373.
- Rippka, R.; Deruelles, J.; Waterbury, J.B.; Herdman, M.; Stanier, R.Y. (1979) Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111:1-61.
- Augusto, F.; Lopes, A. L.; Zini, C. A. (2003) Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances. *Trends Anal. Chem.* 22 (3): 160-169.
- Adams, R.P. (1995) *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry, fourth ed.*, Allured Publishing Corporation, Illinois.
- McKinney, R. E. (2004) *Environmental Pollution Control Microbiology*. CRC Press, United States of America, 447p.
- Jacob-Lopes, E.; Scoparo, C. H. G.; Queiroz, M. I.; Franco, T. T. (2010) Biotransformation of carbon dioxide in photobioreactors. *Energy Convers. Manage.*, 51: 894-900.
- Chisti, Y. (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25 :294-306.
- Yen, H.W.; Brune, D.E. (2007) Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresour. Technol.* 98 : 130-134.
- Ishida, T.; Hasegawa, N.; Hayashi, N.R.; Peerapornpisal, Y.; Ishii, M.; Igarashi, Y.; Kodama, T. (1997) Growth characteristics and dense culture of a thermophilic cyanobacterium *Chroococcidiopsis* sp. strain TS-821. *J. Ferment. Bioeng.* 83 (6): 571-576.
- Lee, B.D.; Apel, W.A.; Walton, M.R. (2006) Calcium carbonate formation by *Synechococcus* sp. strain PCC 8806 and *Synechococcus* sp. strain PCC 8807. *Bioresour. Technol.* 97 : 2427-2434.
- Muñoz, J.; Mudge, S.M.; Sandoval, A. (2004) Effects of ionic strength on the production of short chain volatile hydrocarbons by *Dunaliella salina* (Teodoresco). *Chemosphere.* 54: 1267-1271.

- Yoon, J.H. (2002) High cell density culture of *Anabaena variabilis* using repeated injections of carbon dioxide for the production of hydrogen. *Int. J. Hydrogen Energ.* 27: 1265-1270.
- Francisco, É. C.; Neves, D. B.; Jacob-Lopes, E.; Franco, T. T. (2010) Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *J Chem Technol Biotechnol.* 85 (3): 395-403
- Jacob-Lopes, E.; Revalh, S.; Hernández, S.; Shirai, K.; Franco, T. T. (2009) Development of operational strategies to remove carbon dioxide in photobioreactors, *Chem. Eng. J.*, 153: 120-126
- Hiujgen, W.J.J; Comans, R.N.J.; Witkamp, G.J. (2007) Cost Evaluation of CO₂ sequestration by Aqueous Mineral Carbonation. *Energy Convers. Manage.* 48: 1923-1935.
- De Philippis, R.; Vincenzini, M. (1998) Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews.* 22: 151-175.
- You, T.; Barnett, S.M. (2004) Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. *Biochem. Eng. J.* 19: 251-258.
- You, T.; Barnett, S.M. (2004) Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. *Biochem. Eng. J.* 19, 251-258.
- Cheng, L.; Zhang, L.; Chen, H.; Gao, C. (2006) Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in membrane – photobioreactor. *Sep. Purif. Technol.* 50: 324-329.
- Nuccio, J.; Seaton, P.J.; Kieber, R.J. (1995) Biological production of formaldehyde in the marine environment. *Limnol. Oceanogr.* 40 (3): 521-527.
- McKay, W. A.; Turner, M. F.; Jones, B. M. R; Halliwell, C. M. (1996) Emissions of hydrocarbons from marine phytoplankton- some results from controlled laboratory experiments. *Atmos. Environ.* 30 (14): 2583-2593.
- Broadgate, W. J.; Malin, G.; Küpper, F. C.; Thompson, A.; Liss, P. S. (2004) Isoprene and other non-methane hydrocarbons from seaweeds: a source of relatives hydrocarbons to the atmosphere. *Mar. Chem.* 88: 61-73.
- Scarratt, M.G.; Moore, R.M. (1996) Production of methyl chloride and methyl bromide in laboratory cultures of marine phytoplankton. *Mar. Chem.*, 54: 263-272.

Notificação de Invenção: Relatório Detalhado

[Nova Busca](#) | [Voltar para Listagem](#) | [Imprimir](#) | [Encerrar](#)

Notificação : 1 de 1

NI#:	09/053 - DEPOSITADO							
Título:	EM SIGILO							
Inventor(es):	Nome		Lotação		Vínculo			
	TELMA TEIXEIRA FRANCO		UNICAMP		OUTROS			
	LUIZ TADEU FURLAN		AB-RE/REPLAN/SMS		EMPREGADO			
	KELERSON MODENESI		RH/UC/TRAINEE		EMPREGADO			
	EDUARDO JACOB LOPES		UNICAMP		OUTROS			
MONICA PIOVANI		UNICAMP		OUTROS				
Área(s) de aplicação:	ENERGIAS ALTERNATIVAS MEIO AMBIENTE							
Tipo de invenção:	PROCESSO							
DIP:	Nº do DIP: GE-DEN/EFEN 78/2009 Órgão(s): GE-PGI/GPI/AREE Data de envio: 09/09/2009 Data de recebimento: 09/09/2009							
Comentário:								
Avaliação Interna:	Priorização: B3 Data de envio: 09/09/2009							
Andamento da NI:	Responsável atual: BERNADETE DE MORAES RULFF Distribuição: 02/10/2009 Busca: Viabilidade: Redação: Revisão:							
	Etapa	Detalhe			Início	Fim		
Título do Pedido de Patente:	EM SIGILO							
Titular(es):	PETRÓLEO BRASILEIRO S.A. - PETROBRAS							
Países de depósito	Pedido	Pais Depósito	Data Depósito	Patente	Referência	Concessão	Validade	Situação
	PI 1002329-1	BRASIL	01/07/2010					ATIVO

Notificação : 1 de 1