



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DAVI DE LIMA CAVALCANTI

**SEQUESTRO DE CARBONO E GERAÇÃO DE ENERGIA ALTERNATIVA POR
CÉLULA A COMBUSTÍVEL FOTOSSINTÉTICA DE *Chlorella vulgaris* COM
PRODUÇÃO SECUNDÁRIA DE BIODIESEL E CAROTENÓIDES**

**Recife
2020**

DAVI DE LIMA CAVALCANTI

**SEQUESTRO DE CARBONO E GERAÇÃO DE ENERGIA ALTERNATIVA POR
CÉLULA A COMBUSTÍVEL FOTOSSINTÉTICA DE *Chlorella vulgaris* COM
PRODUÇÃO SECUNDÁRIA DE BIODIESEL E CAROTENÓIDES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Microbiologia aplicada

Linha de Pesquisa: Biotecnologia

Orientadora: Prof^ª. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

Recife

2020

Catálogo na Fonte:
Elaine C Barroso, CRB-4/1728

Cavalcanti, Davi de Lima

Sequestro de carbono e geração de energia alternativa por célula a combustível fotossintética de *Chlorella vulgaris* com produção secundária de biodiesel e carotenóides/
Davi de Lima Cavalcanti – 2020.

100 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Galba Maria de Campos Takaki

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2020.

Inclui referências.

1. Energia da biomassa 2. Sequestro de carbono 3. Microalga I. Takaki, Galba Maria de Campos (orient.) II. Título

333.9539

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2021-343

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DAVI DE LIMA CAVALCANTI

SEQUESTRO DE CARBONO E GERAÇÃO DE ENERGIA ALTERNATIVA POR
CÉLULA A COMBUSTÍVEL FOTOSSINTÉTICA DE *Chlorella vulgaris* COM
PRODUÇÃO SECUNDÁRIA DE BIODIESEL E CAROTENÓIDES

APROVADO EM 03 / 12 / 2020

Examinadores:

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto - UFRPE

Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima-UFRPE

Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão - UFPE

Profa. Dra. Daniela Sales Alviano - UFRJ

Profa.Dra. Galba Maria de Campos Takaki (Orientadora) Universidade Católica de
Pernambuco- UNICAP

Dedico a minha família por todo amor e apoio...

Gleice por fazer parte de minha vida...

A todos os meus amigos...

A Deus por me dar capacidade...

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado forças e ter me permitido chegar até o presente momento.

A meus pais, Manoel Neves Cavalcanti e Gilclécia de Lima Cavalcanti, pela dedicação e amor, me apoiando e incentivando em todos os momentos de dificuldades e de como enfrentar os desafios.

A meus queridos avós José Andrade e Doracy Maria (*In Memoria*), que sempre me ajudaram e que agora olham para mim lá do céu! Descansem em paz!

A minha namorada Gleice Paula de Araújo, por fazer parte de minha vida, por todo o seu amor, carinho, companheirismo e incentivos.

Aos meus grandes amigos Marcos Luna, Paulo Henrique da Silva, Alexandre D’Lamare, Vinícius Jacks, Antônio Vinícius, Lucas Rosendo, Nathalia Sá, Adriana Ferreira, Nadielly Andrade, Daniele Souza pelo companheirismo e todos os momentos de descontração e alegria durante estes anos. Levarei todos no coração para sempre!

A todos os amigos que formam a família NPCIAMB, por toda a ajuda oferecida durante o desenvolvimento deste trabalho, e em especial, aos técnicos e amigos André Felipe Lima Santos e Severino Humberto de Almeida.

A professora Galba Maria de Campos Takaki por ter confiado este trabalho e dado a oportunidade de crescer pessoalmente e profissionalmente na Ciência. Ao professor Sérgio Perez, pela colaboração no projeto.

A Universidade Católica de Pernambuco, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. Pe. Pedro Rubens Ferreira de Oliveira, por disponibilizar os laboratórios do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia – NPCIAMB.

A professora Maria Fátima Vieira de Queiroz Sousa, por ter me dado à primeira oportunidade de estágio em um laboratório de Microbiologia e a quem tenho um carinho enorme.

A professora Norma Buarque de Gusmão, por ter me dado à oportunidade de continuar meu trabalho no laboratório, após o afastamento da área de pesquisa da professora Fátima.

A todos os professores que fizeram parte de minha formação acadêmica tanto na UFPE, quanto aos professores de meu ensino médio, em especial o professor Raniere Gilson, que

sempre acreditou em mim, incentivando a seguir em frente, mostrando-me a forma de fazer, tendo em vista a minha dedicação.

Aos órgãos de fomento CAPES, FACEPE e CNPq, pela concessão da bolsa e suporte financeiro essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Obrigado e que Deus continue abençoando cada um!

“Inteligência não é um privilégio, é um dom que deve ser usado para o bem da humanidade.”

Octavius, O.

RESUMO

O crescimento da população mundial vem causando um aumento na demanda por energia o que poderá causar em curto prazo uma crise energética. Grande parte da energia consumida no mundo é vem do petróleo, porém sua prospecção e utilização causam grandes danos à natureza, impactando os ecossistemas e contribuindo para o aquecimento global. Portanto, novas tecnologias para geração de energia limpa vêm sendo criadas, sendo as células a combustível (CC), dispositivos que convertem energia química em elétrica, porém com algumas limitações, como deficiências na transferência de elétrons, baixa geração de potência e altos custos de implantação. Assim, uma alternativa menos onerosa são as Células a Combustível Fotossintéticas (CCF), utilizando organismos fotossintetizantes como aceptores de elétrons, em substituição dos catalizadores metálicos. Neste sentido, estudos foram realizados com a microalga *C. vulgaris* utilizada no compartimento catódico de uma célula a combustível fotossintética, com a finalidade de analisar a eficiência na geração de energia, além da capacidade de sequestrar o CO₂ da atmosfera, com produção e acúmulo de metabólitos secundários de reserva (amido e lipídios), além de pigmentos fotossintéticos e carotenoides. Na primeira parte do estudo com a microalga *Chlorella vulgaris* foi utilizado com acceptor de elétrons em um compartimento catódico de uma CCF e a capacidade de consumir CO₂ e acumular amido foram testadas apresentando um $I_{dmax} = 0,24 \text{ V/cm}^2$, consumo de 3,5 mg/L-1 de dióxido de carbono, com acúmulo de 40% de amido na biomassa. Posteriormente, esta condição foi submetida a diferentes condições de cultivo, modificando o tempo de iluminação, aeração, fontes de nitrogênio (Uréia e Nitrato de Sódio) e as concentrações de nitrogênio e fósforo no meio de cultivo, seguindo um planejamento fatorial completo 2². As condições de crescimento do ensaio A1(cultura heterotrófica ,iluminação contínua, CO₂ como fonte de Carbono e ureia como fonte de N), a microalga apresentou o maior resultado na acumulação de amido (36%), e a relação entre as concentrações limitantes de fósforo e nitrogênio influenciaram positivamente na acumulação dos lipídios, produzindo 66%. O crescimento foi aumentado, com consequente aumento na geração de energia, apresentando picos de $I_{dmax} = 0,25 \text{ V/Cm}^2$, com uma eficiência coulômbica de CE=63%. Em um segundo momento o crescimento da microalga em CCF foi realizado utilizando os melhores parâmetros obtidos anteriormente, porém, utilizando diferentes tipos de comprimento de onda 450 nm e 620nm (azul e vermelho, respectivamente) e luz branca como controle para induzir a produção de carotenoides durante o processo de geração de energia.

Ao final do processo foram detectados licopeno e betacaroteno nas seguintes concentrações: Licopeno: luz branca = 20,9 mg/100g; azul = 29,6 mg/100g; vermelha = 30,4 mg/100g. β -caroteno nas concentrações: Luz branca = 11,2 mg/100g; Azul = 39,2 mg/100g e vermelho = 40,4 mg/100g. Os resultados obtidos com os estudos realizados demonstraram a eficiência e o grande potencial do protótipo de CCF e da *C. vulgaris* como acceptor de elétrons, além da produção de biomoléculas com amplas aplicabilidades biotecnológicas.

Palavras-chave: Célula a Combustível; Sequestro de Carbono; Biocátodos; Biomassa; Bioeletricidade.

ABSTRACT

The growth of the world population has been causing an increase in the demand for energy which could cause an energy crisis in the short term. Much of the energy consumed in the world comes from oil, but its prospection and use cause great damage to nature, impacting ecosystems and contributing to global warming. Therefore, new technologies for the generation of clean energy have been created, being fuel cells (DC), devices that convert chemical energy into electricity, however with some limitations, such as deficiencies in electron transfer, low power generation and high energy costs. implantation. Thus, a less costly alternative is the Photosynthetic Fuel Cells (CCF), using photosynthetic organisms as electron acceptors, replacing the metallic catalysts. In this sense, studies were carried out with the microalgae *Chlorella vulgaris* using in the cathodic compartment of a photosynthetic fuel cell, in order to analyze the efficiency in the generation of energy, in addition to the ability to sequester CO₂ from the atmosphere, with production and accumulation of secondary reserve metabolites (starch and lipids), in addition to photosynthetic pigments and carotenoids. In the first part of the study with microalgae *C. vulgaris*, it was used with an electron acceptor in a cathode compartment of a CCF and the ability to consume CO₂ and accumulate starch were tested with an $I_{dmax} = 0.24 \text{ V/cm}^2$, consumption of 3,5 mg/L-1 of carbon dioxide, with accumulation of 40% of starch in the biomass. Subsequently, this condition was subjected to different cultivation conditions, changing the time of illumination, aeration, nitrogen sources (Urea and Sodium Nitrate) and the concentrations of nitrogen and phosphorus in the culture medium, following a complete 2² factorial design. The growth conditions of the A1 test (heterotrophic culture, continuous lighting, CO₂ as a source of carbon and urea as a source of N), the microalgae presented the highest result in the accumulation of starch (36%), and the relationship between the limiting concentrations of phosphorus and nitrogen positively influenced the accumulation of lipids, producing 66%. Growth was increased, with a consequent increase in power generation, with peaks of $I_{dmax} = 0.25 \text{ V/Cm}$, with a coulombic efficiency of $EC = 63\%$. In a second step, the growth of the microalgae in CCF was carried out using the best parameters obtained previously, however, using different types of wavelength 450 nm and 620nm (blue and red, respectively) and white light as a control to induce the production of carotenoids during the power generation process. At the end of the process, lycopene and beta-carotene were detected in the following concentrations: Lycopene: white light = 20.9 mg/100g; blue= 29.6 mg/100g; red= 30.4 mg/100g. β -carotene in concentrations:

White light= 11.2 mg/100g; Blue= 39.2 mg/100g and red = 40.4 mg/100g. The results obtained with the studies performed demonstrated the efficiency and the great potential of the prototype of CCF and *C. vulgaris* as an electron acceptor, in addition to the production of biomolecules with wide biotechnological applications.

Keywords: Fuel Cell; Carbon Hijacking; Biocathodes; Biomass; Bioelectricity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Classificação das algas de acordo com sua coloração e substâncias de reserva... | 20 |
| Figura 2 - Cultura pura da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> . | 22 |
| Figura 3 - Esquema básico da organização celular das organelas da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> . | 24 |
| Figura 4 - Fases da reprodução da <i>C. vulgaris</i> : (a) Crescimento celular precoce; (b) Crescimento celular com atraso; (c) Divisão do cloroplasto; (d) Início da divisão do protoplasto; (e) Final da divisão do protoplasto, (f) Maturação das células filhas; (g) Fase | 24 |
| Figura 5 - Esquema de uma célula a combustível: a) Célula a combustível a hidrogênio. b) Célula a combustível a metanol. | 29 |
| Figura 6 - Esquema de uma CCM simples com um ânodo anaeróbico e um cátodo aeróbico separado por uma Membrana de Troca Protônica (PEM). | 31 |
| Figura 7 - Esquema de funcionamento de uma Célula a Combustível Fotossintética (CCF) com cátodo de microalgas. | 34 |
| Figura 8 - Diferentes configurações de uma célula a combustível fotossintética CCF. a) CCF de câmara única. b) CCF de sedimentos. c) CCF híbrida. d) CCF acoplada. | 37 |
| Figura 9 - Schematic Photosynthetic Fuel Cell using microalgae <i>Chlorella vulgaris</i> . | 59 |
| Figura 10 - Declining CO ₂ amount in the Photosynthetic Fuel Cell for 10 Days. | 60 |
| Figura 11 - Cronovoltametry of the Photosynthetic Fuel Cell during 10 days. | 62 |
| Figura 12 - Acumulação de amido e lipídios em <i>Chlorella vulgaris</i> em diversas condições de cultivo. | 75 |
| Figura 13 - Consumo de dióxido de carbono pela microalga <i>C. vulgaris</i> em biocátodo de célula a combustível fotossintética. | 76 |
| Figura 14 - Diagrama de Pareto ilustrando os efeitos das interações entre as variáveis independentes, concentração de fósforo e nitrogênio sobre a variável resposta acúmulo de lipídios. | 77 |
| Figura 15 - Porcentagem de amido e lipídios em <i>C. vulgaris</i> cultivadas em diversas condições de cultivo seguindo o planejamento fatorial 2 ² | 78 |
| Figura 16 - Perfil cronoamperométrico da célula a combustível fotossintética com cátodo de <i>C. vulgaris</i> . (A) Meio base, escolhido na etapa de seleção de condições de | |

| | |
|--|----|
| cultura A1. (B) Melhor condição no planejamento fatorial 2 ² para produção de lipídios..... | 79 |
| Figura 17 - Gráficos de cronovoltametria de uma CCF sob três tipos diferentes de iluminação artificial: a) Luz branca; b) Luz Azul; c) Luz Vermelha..... | 91 |
| Figura 18 - Consumo de dióxido de carbono por <i>C. vulgaris</i> cultivadas em biocátodos de CCF sob iluminação de diferentes cores (Luz branca, azul e vermelha)..... | 92 |
| Figura 19 - Concentração de Licopeno e β -caroteno extraídos de biomassa residual de <i>C. vulgaris</i> resultante do processo de geração de eletricidade em CCF. | 94 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Composition of the mineral medium used in experiments to growth <i>Chlorella vulgaris</i> | 57 |
| Tabela 2 - Variações de condições de cultivo da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> para produção e acúmulo de lipídios. | 70 |
| Tabela 3 - Matriz experimental do planejamento fatorial 2 ² | 71 |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 | OBJETIVOS | 19 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL | 19 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 19 |
| 3 | REVISÃO DA LITERATURA | 20 |
| 3.1 | MICROALGAS | 20 |
| 3.2 | <i>CHLORELLA VULGARIS</i> | 22 |
| 3.3 | PRODUTOS DE VALOR AGREGADO DA BIOMASSA DE MICROALGAS..... | 25 |
| 3.3.1 | Carotenóides | 25 |
| 3.3.2 | Lipídios e Carboidratos | 26 |
| 3.4 | CÉLULAS A COMBUSTÍVEL | 29 |
| 3.5 | CÉLULA A COMBUSTÍVEL MICROBIANA | 31 |
| 3.6 | CÉLULAS A COMBUSTÍVEL FOTOSSINTÉTICA | 33 |
| 3.7 | SEQUESTRO DE CO ₂ | 37 |
| 4 | SEQUESTRO DE CARBONO E GERÇÃO DE BIOENERGIA POR <i>CHLORELLA VULGARIS</i> | 53 |
| 5 | GERAÇÃO DE ENERGIA FOTOSSINTÉTICA POR <i>CHLORELLA VULGARIS</i> E ACUMULAÇÃO DE LIPÍDIOS E AMIDO INDUZIDO POR CONDIÇÃO LIMITANTE DE NITROGÊNIO E FÓSFORO | 67 |
| 6 | PRODUÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS E GERAÇÃO DE BIOENERGIA EM CÉLULAS A COMBUSTÍVEL FOTOSSINTÉTICAS | 85 |
| 7 | CONCLUSÕES GERAIS | 98 |
| | REFERÊNCIAS | |

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

O mundo moderno é totalmente dependente de energia e à medida que a população mundial aumenta esta demanda também aumenta. Atualmente, 80% de toda energia utilizada é oriunda de combustíveis fósseis. Entretanto, a utilização desta fonte de energia apresenta vários problemas, pois não é uma fonte renovável e sua prospecção, refino, armazenamento e transporte causam derramamentos, impactando o meio ambiente, assim como a queima libera uma grande quantidade de gases tóxicos que podem causar diversas doenças respiratórias em seres humanos. Dentre estes gases o dióxido de carbono, o qual é o principal responsável pelo fenômeno do aquecimento global e contribui com as mudanças climáticas no planeta (MEDEIROS et al, 2015; ESPINASA et al, 2017; GENC, 2017; JIHONG CHEN et al, 2018; PAL & MITRA, 2018; AHMADI, 2020.; JACKETTI, 2020; WANG, 2021).

Devido a esses problemas, nos últimos anos várias tecnologias renováveis e eficientes vêm sendo desenvolvidas visando diminuir a dependência dos combustíveis fósseis. Dentre estas as mais conhecidas são: energia solar, eólica, hidroelétrica e os biocombustíveis. No entanto, todas as tecnologias apresentam algum tipo de problema, como por exemplo, os biocombustíveis que são combustíveis derivados de matéria viva, como plantas, animais e micro-organismos, onde para sua produção se faz necessário cultivar grandes áreas, as quais poderiam ser cultivadas com o objetivo de produzir alimentos deixam de ser utilizadas para este fim. Assim, as principais culturas como o milho, cana-de-açúcar e soja são desviadas para produção destes combustíveis ao invés de ser destinada a alimentação, gerando assim um grande problema social e econômico (ZAH et al, 2009; VELJKOVIĆ et al, 2018; SILVA et al, 2018.; BAGHERIAN, 2020.).

Assim, um dos principais objetivos das pesquisas no campo da energia é o desenvolvimento de tecnologias de conversão. Dentre estas tecnologias destacam-se as Células a Combustível (CC). Esta tecnologia converte a energia química em energia elétrica sem a necessidade de combustão, permitindo alcançar uma maior eficiência e um menor impacto ambiental (DUIC et al 2013). Porém esta tecnologia ainda é inacessível, pois seus custos são bastante elevados, por utilizarem componentes caros como catalisadores metálicos, tais como platina (Pt), ósmio (Os), ródio (Rh), baixa eficiência de conversão e problemas na transferência de elétrons (HWANYEONG OH, 2020.; YUHSIEH, C. 2021).

Neste sentido, diminuir os custos operacionais desta tecnologia Células a Combustível (CC), e torná-la mais acessível para outra configuração desta tecnologia desenvolvida, denominada de células a combustível microbianas (CCM). Este tipo de célula a combustível convertem a energia armazenada nas ligações químicas de compostos orgânicos em energia elétrica através de reações eletrocatalíticas realizadas por micro-organismos (ANTONOPOULO, et al., 2010.; SERRA, P.M.D. 2021).

Nesta categoria de CC existe uma variação que consegue diminuir ainda mais seus custos e torna esta tecnologia viável e acessível por meio do uso de vários componentes alternativos e de baixo custo, sendo testados, entre eles estão às microalgas, que são utilizadas como aceptoras de elétrons nos cátodos em uma variação das células a combustível, denominadas células a combustível fotossintéticas (CCF) (SHAIKH, 2020).

Portanto, esta tecnologia apresenta várias vantagens em relação às demais, pois utilizam a elevada capacidade fotossintética destas microalgas para produzir eletricidade com baixo custo, utilizando apenas o dióxido de carbono da atmosfera para crescerem, produzindo biomassa extremamente rica, que acumula várias biomoléculas de interesse biotecnológico e de elevado valor comercial, como o carotenoide astaxantina, luteína, betacaroteno, entre outros. Além de possuir uma grande capacidade de produzir e acumular lipídios e amido, que podem ser utilizados para produção de biocombustíveis, como o biodiesel e o etanol, reduzindo os custos desta tecnologia e ampliando as vantagens da sua utilização (VELJKOVIĆ et al, 2018; CHEN et al, 2018; ULLAH et al, 2018.; PARKHEY, 2020).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver sistemas eletroquímicos otimizados para geração de energia elétrica em uma Célula a Combustível Fotossintética de baixa temperatura, com biofixação de CO₂, associado à produção simultânea de biodiesel e pigmentos carotenoides, a partir da biomassa residual do processo de desenvolvimento de *Chlorella vulgaris*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

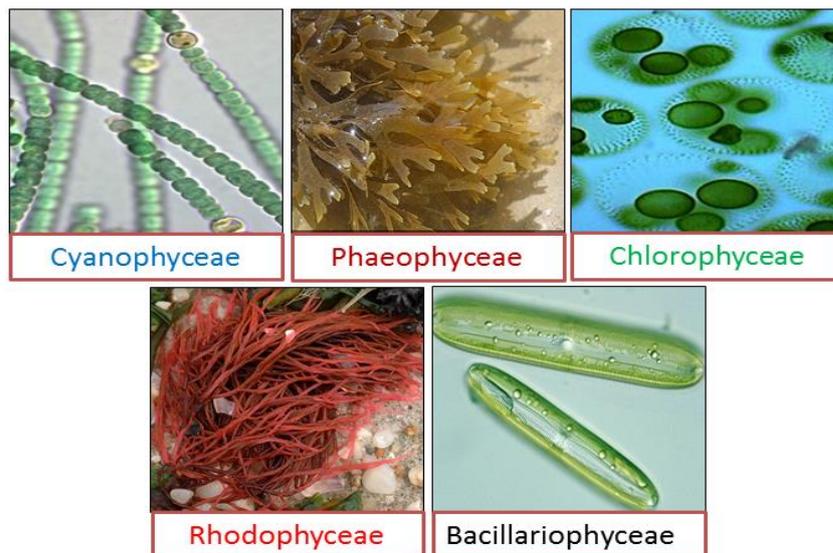
- Estudar as condições ótimas de cultivo da microalga, em função do tempo, iluminação, concentração de nitrogênio e comprimento de onda;
- Desenvolver estudos para otimizar as condições de biofixação de carbono pelo sistema de geração de energia (microalga);
- Avaliar a geração de energia elétrica a partir de dispositivos eletroquímicos otimizados;
- Extrair simultaneamente as biomoléculas lipídeos e pigmentos carotenoides, a partir da biomassa da microalga;
- Isolar, purificar e caracterizar físico-quimicamente os pigmentos carotenoides;
- Realizar a obtenção, caracterização e aplicação do biodiesel obtido através do processo de transesterificação dos lipídios previamente extraídos;
- Validar estatisticamente todos os resultados;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. MICROALGAS

As algas são classificadas de acordo com sua coloração e suas substâncias de reserva em cinco grupos principais: Cyanophyceae (Algas azuis esverdeadas), Chlorophyceae (Algas verdes), Phaeophyceae (Algas marrons), Rhodophyceae (Algas vermelhas) e Bacillariophyceae (Diatomáceas), figura 6. Também possuem uma grande diversidade de formas e tamanhos, variando de espécies unicelulares (podendo formar colônias), a formas pluricelulares com estruturas complexas.

Figure 1 - Classificação das algas de acordo com sua coloração e substâncias de reserva.



Fonte: <http://www.lookfordiagnosis.com>

Dentre esta grande diversidade biológica destacam-se as microalgas. Estes microorganismos fotossintetizantes podem ser procariotas (como as Cyanophyceae) ou eucariotas (como as Chlorophyceae), crescem rapidamente e podem viver em condições adversas, pois possuem uma estrutura celular simples. Na ficologia aplicada o termo “microalga” se refere estritamente a algas microscópicas e a bactérias fotossintéticas aeróbias (Cianobactérias) (TOMASELLI, 2004; LI et al., 2008; RAMANNA et al, 2017.; BOLGOVICS, 2019. POLIKARPOV, 2020).

As microalgas se destacam por ser um grupo de micro-organismos extremamente diverso, presentes em todos os ecossistemas da terra, não só em ambientes aquáticos, mas também, em ambientes terrestres por esta razão possuem uma grande diversidade. Estima-se que exista mais de 50.000 espécies, mas, apenas 30.000 já foram estudadas (RICHMOND, 2004).

Estes micro-organismos fotossintetizantes possuem uma grande capacidade de sequestrar Dióxido de Carbono da atmosfera (sendo responsáveis por mais da metade da fixação do CO₂ no planeta) através da fotossíntese e acumular biomassa mais rápida e eficientemente que as plantas terrestres, podendo alcançar uma produtividade por área 100 vezes maior que as plantas convencionais além de ter um crescimento rápido e a capacidade de acumular ou secretar alguns metabólitos (PIENKOS e DARZINS, 2009; MENDES et al., 2012; RAMANNA et al, 2017.; YANA, 2020).

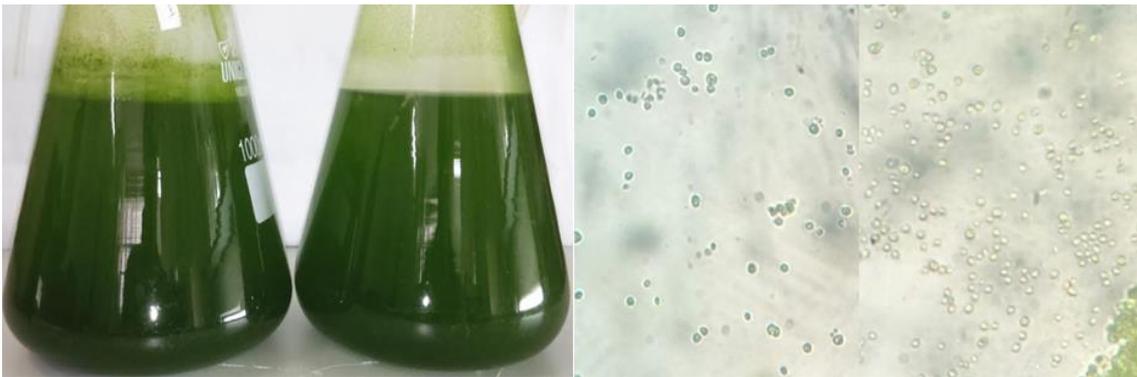
Nos últimos anos devido à necessidade de explorar fontes alternativas de geração de energia, a biomassa de microalgas tem recebido grande atenção, pois a partir dela pode ser produzidos combustíveis, como o bioetanol e o biodiesel, além de vários outros subprodutos de interesse industrial como pigmentos (Clorofilas e Carotenoides), além de poderem ser utilizadas diretamente na alimentação devido ao seu alto valor nutricional, podendo chegar até 60% de proteína, uma alta produtividade de óleo, chegando a conter de 1-70% de lipídios em sua célula, além de mais de 20 tipos de vitaminas, sais minerais e aminoácidos essenciais (FAROOQ et al 2015., PING ZHANGA et al 2017, PUGAZHENDHI, 2020).

Como qualquer matéria-prima, a utilização de microalgas possuem algumas vantagens, como: Produção durante todo o ano, permite a utilização de terrenos marginais, não compete com a produção de alimentos, permite à utilização de águas impróprias para o uso (água salobra e águas residuais), o *Scale-up* é relativamente simples, permite a utilização de resíduos e gases produzidos por sociedades industrializadas, mas também possui algumas desvantagens como, baixa densidade celular, pequeno tamanho das células, elevados custos de colheitas, baixo rendimento ao ar livre, contaminações por outras espécies, problemas na utilização de biorreatores e perdas do meio por evaporação e foto inibição quando são cultivadas ao ar livre (RUSSO, 2011., MUJTABA et al 2017).

3.2. *CHLORELLA VULGARIS*

As microalgas do gênero *Chlorella*, foram identificadas pela primeira vez pelo pesquisador holandês Martinus Willem Beijerinck em 1890 como sendo a primeira microalga com um núcleo definido em um lago nos arredores da cidade de Delft na Holanda. Em seu artigo ele descreve que as águas do lago estavam tomadas por microalgas de um verde intenso ao qual ele comparou com o verde da grama que crescia nas margens. O nome *Chlorella* vem da palavra grega *chloros* (Χλωρός) que significa verde, e o sufixo latino *ella* que se refere ao seu tamanho microscópico (SAFI et al 2014). Em 1965, Ikuko Shihira e Robert W. Krauss pesquisadores da Universidade de Maryland estudaram a fisiologia e a taxonomia de 41 isolados deste gênero de microalgas, dentre eles estava a *Chlorella vulgaris*.

Figure 2 - Cultura pura da microalga *Chlorella vulgaris*.



Fonte: Acervo Pessoal

A espécie descrita por Beijerick, *C. vulgaris* (Figura 7) pertence à seguinte classificação científica: Domínio: Eukaryota, Reino: Protista, Divisão: Chlorophyta, Classe: Trebouxiophyceae, Ordem: Chlorellales, Família: Chlorellaceae, Género: *Chlorella*, Espécie: *Chlorella vulgaris*. É uma alga verde, unicelular ou colonial, possui forma cocóidal medindo de 2-10 µm de diâmetro. Não possuem motilidade sendo encontrada em sua grande maioria em ambientes dulciaquícolas, mas também em águas salobras em praticamente todo o mundo. Possui um único cloroplasto e podem acumular pigmentos como Clorofilas *a* e *b*, β-carotenos e xantofilas. Seu carboidrato de reserva intracelular é o amido, mas possuem a capacidade de acumular lipídios quando se encontram em condições de estresse (BEIJERINCK, 1890, NURACHMAN, et al. 2015; CHEN et al, 2018; KULKARNI & NIKOLOV, 2018).

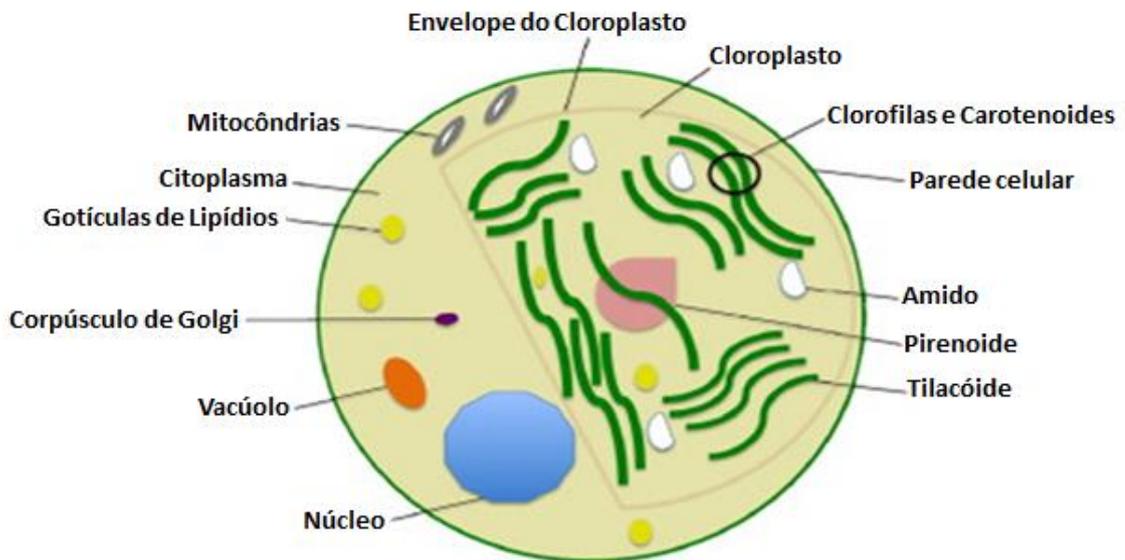
Estudos evolutivos mostraram que as microalgas do gênero *Chlorella* já estavam na terra desde o Pré-cambriano, mantendo sua integridade genética e estrutural a cerca de 2,5 bilhões de anos atrás. Em sua morfologia *C. vulgaris* possuem muitos elementos estruturais semelhantes as plantas o que sugere que estes organismos possam ter dado origem as plantas terrestres (SAFI et al 2014).

Sua célula possui uma parede celular rígida que preserva a integridade da célula, protegendo-a contra invasores e ambientes ásperos. Sua espessura e composição variam de acordo com a fase de vida, onde uma célula logo após sua divisão possui uma parede celular mais fina e uni laminar elétron-densa de aproximadamente 2 nm e em uma célula madura a espessura desta parede aumenta gradativamente até alcançar de 17-21 nm. Porém, a espessura da parede celular de uma célula madura pode variar de acordo com as condições ambientais e o crescimento. Sua rigidez é atribuída a uma camada microfibrilar composta por quitosana-glucosamina e alguns trabalhos indicam a esporopoleina como responsável por sua rigidez (YAMAMOTO et al, 2004., 2005).

Além disso, possui um citoplasma composto por proteínas e minerais solúveis em água que abriga as organelas internas como mitocôndrias, núcleo, vacúolos, corpúsculo de Golgi e cloroplasto. Suas mitocôndrias possuem parede dupla e abrigam uma parte de seu material genético. A membrana externa da mitocôndria possui a mesma proporção de proteínas e fosfolipídios, já a porção interna da membrana possui uma proporção três vezes maior de proteínas do que fosfolipídios (BURCZYK et al, 2000., HAGEN et al, 2002., LU WANG et al 2017).

Possui um único cloroplasto com membrana dupla composta por fosfolipídios, onde a membrana externa é permeável a metabólitos e íons e a membrana interna possui uma função mais específica no transporte de proteínas. Nesta organela se encontram os pigmentos fotossintéticos como clorofilas e carotenoides como a luteína dentro de estruturas denominadas de tilacóides e em condições favoráveis os grânulos de amido são formados no cloroplasto. O pirenoide possui um alta concentração de ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase-oxygenase (RuBisCO) e é o centro de fixação do dióxido de carbono nas células de *C. vulgaris* (YAMAMOTO et al, 2004., 2005., SAFI et al 2014).

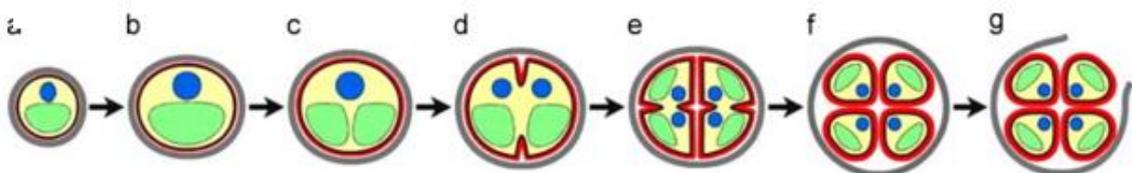
Figure 3 - Esquema básico da organização celular das organelas da microalga *Chlorella vulgaris*



Fonte: SAFI et al 2014

Sua reprodução é assexuada e rápida, assim, dentro de 24 horas uma única célula de *C. vulgaris* cultivada em condições ótimas se multiplica por autoesporulação, que é o modo mais comum de reprodução assexuada entre as algas, onde uma célula de *C. vulgaris* da origem a quatro células filhas. Deste modo, a parede celular das células filhas é formada dentro da parede celular da célula mãe. Após a maturação das células filhas, a parede celular da célula mãe se rompe, liberando as células recém-formadas e os detritos remanescentes da célula mãe são utilizados como nutrientes que vão ser absorvidos pelas células recém-formados (YAMAMOTO et al, 2004., 2005., SAFI et al 2014).

Figure 4 - Fases da reprodução da *C. vulgaris*: (a) Crescimento celular precoce; (b) Crescimento celular com atraso; (c) Divisão do cloroplasto; (d) Início da divisão do protoplasto; (e) Final da divisão do protoplasto, (f) Maturação das células filhas; (g) Fase



Fonte: SAFI et al 2014

3.3. PRODUTOS DE VALOR AGREGADO DA BIOMASSA DE MICROALGAS

Dentre todos os organismos fotossintetizantes as microalgas são uns dos mais diversificados, tanto na diversidade de formas como em cores e habitats. Toda esta diversidade é devido a sua ampla adaptabilidade ao meio natural devido a seus diversos tipos de metabolismos, acarretando diversos produtos metabólicos. Dentre estes produtos vários possuem potencial biotecnológico, tanto para a alimentação como para a utilização para a produção de biocombustíveis como os carotenoides, lipídios e amido, dentre outros.

Os alimentos a base de microalga possuem um impacto positivo na saúde humana por ajudarem na prevenção de diversas doenças. Também ajuda no combate a desnutrição sendo utilizadas como suplementação alimentar e por ser ricas em vários nutrientes como ácidos graxos poli-insaturados, proteínas, fitoeritrinas, ficocianinas, minerais importantes, vitaminas, polissacarídeos e enzimas (YONG JIN.et al 2019).

Além de sua utilização na suplementação alimentar humana e animal, as microalgas possuem uma capacidade elevada na produção e acúmulo de lipídios e carboidratos, que são dois substratos de alto interesse como fontes de energias renováveis servindo de base para a produção de biocombustíveis como o biodiesel e o bioetanol. As microalgas apresentam vantagens sobre outras fontes de biomassa destinadas a produção de biocombustíveis, pois possuem um rápido crescimento, podem ser cultivadas em águas impróprias para o consumo humano e animal, além de não competirem diretamente com a produção de alimentos (REHMAN, A. 2020.; YONG JIN.et al 2019).

3.3.1. Carotenóides

O interesse mundial por pigmentos de origem natural em substituição aos pigmentos sintéticos está cada vez maior devido a preocupação crescente das pessoas com uma alimentação saudável. Dentre esses pigmentos os carotenoides são uns dos mais utilizados e requisitados pelas industriais devido a sua alta capacidade antioxidante.

Os carotenoides são pigmentos lipofílicos responsáveis pelas cores amarelo, laranja e vermelho em plantas, micro-organismos e em alguns animais como peixes e crustáceos. Suas características e suas cores são devido a uma grande diversidade estrutural formada por um sistema de ligações duplas conjugadas localizadas no centro de sua estrutura e que recebe o

nome de cromóforo. Porém o cromóforo torna estes pigmentos suscetíveis a oxidação e isomerização, além de sua cadeia longa. A maioria dos carotenoides compartilham uma estrutura em comum C40 e são divididos em dois grupos carotenos e xantofilas. Cada carotenoide possui diferentes formas trans e cissômeros. Ao contrário dos carotenos as xantofilas possuem grupos hidroxila e grupos ceto em seus anéis terminais em sua estrutura tornando-as um caráter hidrofílicos (BEZERRA, et al.2019.; REHMAN, 2020).

Naturalmente os carotenoides servem para dar destino ao excesso de energia do processo fotossintético, porém menos de 30 destes tem papel importante no processo fotossintético. A grande maioria está relacionado ao complexo de colheita leve (LHCs). Alguns carotenoides primários possuem agem como pigmentos acessórios transferindo energia para a clorofila aumentando o espectro de absorção de luz dos organismos fotossintetizantes como algas e plantas (REHMAN, 2020).

Os carotenoides podem ser sintetizados artificialmente, porém, o consumo humano destes tipos de carotenoides é limitado devido a preocupações de segurança quanto ao produto final deste processo é composto predominantemente por estruturas trans, enquanto os carotenoides sintetizados naturalmente por organismos fotossintetizantes são uma mistura complexa de vários isômeros e que geralmente são encontrados misturados a outros compostos naturais bioativos (RODRIGUEZ-AMAYA, et al. 2019).

Os carotenoides são amplamente utilizados como corantes alimentares, cosméticos e aditivos na alimentação animal, porém, estes pigmentos desempenham um papel muito importante na saúde humana. Eles atuam de maneira semelhante ao seu papel nos organismos fotossintetizantes de onde se originam, eles possuindo ação antioxidante. Os antioxidantes impedem os efeitos nocivos dos radicais-livres, além de estar relacionado com a diminuição do risco de câncer, degeneração macular, envelhecimento prematuro, catarata, diabetes e também já foi relatado sua participação na redução dos riscos de contrair a AIDS entre outras coisas. Demonstrando assim um grande potencial de mercado e de produção a partir de fontes naturais e renováveis (GONG, .et al.2016.; RODRIGUEZ-AMAYA, et al. 2019)

3.3.2. Lipídios e Carboidratos

A demanda crescente por produtos alimentares naturais e fontes de energias renováveis vem crescendo a cada dia e as microalgas são uma fonte rica em suplementos alimentares e

produtos naturais. Dentre estes produtos destacam-se os lipídios e os carboidratos como o amido, que são produtos de reserva energética e estruturais destes organismos (MANIRUZZAMAN, A. et al.2020).

As microalgas realizam a conversão fotossintética de energia solar, dióxido de carbono e água em Carboidratos de reserva e lipídios, estes por sua vez podem ser utilizados para produzir uma variedade enorme de produtos, como aditivos alimentares, produtos farmacêuticos, cosméticos e biocombustíveis. Dentre todos os metabólitos primários produzidos pelas microalgas os lipídios têm chamado muita atenção por seu potencial na geração do biodiesel, pois possuem várias vantagens sobre outras fontes oleaginosas, pois possuem crescimento rápido e uma capacidade elevada de produção e acumulação dos lipídios (FERREIRA, G.F. et al 2019).

As microalgas podem acumular em sua biomassa entre 30 e 80% de lipídios, porém, algumas espécies que possuem um grande potencial de acumulação de lipídios possuem um crescimento lento, o que inviabiliza sua utilização comercial. Porém, existem espécies que apresentam todas estas características desejáveis como crescimento rápido aliado a grande capacidade de acumulação de lipídios como a *Botryococcus braunii*, *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris* dentre outras. O conteúdo lipídico em microalgas pode variar bastante de acordo com a fase de seu crescimento. Na fase estacionária encontra-se uma maior acumulação de lipídios neutros. Os lipídios neutros possuem função de armazenamento de energia onde os mais comumente encontrados nas microalgas são os triacilgliceróis. Estes são formados por três moléculas de ácidos graxos ligadas a uma molécula de glicerol e são armazenados no citoplasma em forma de gotículas (YONG JIN.et al 2019.; DESHMUKH, S.et al. 2019.; KATIYAR, R. et al.2020).

O entendimento da síntese dos triacilgliceróis ainda estão incompletos, porém, grandes avanços foram feitos através de estudos comparativos de análises de genoma e transcrito. A síntese lipídica requer reações complicadas em locais distintos. A síntese lipídica nas microalgas é análoga as plantas, podendo ser dividida em duas etapas a síntese de novo de ácidos graxos e a subsequente montagem dos glicolipídeos.

A síntese de ácidos graxos nas plantas é realizada no cloroplasto, onde as microalgas fixam o dióxido de carbono através da fotossíntese em glicerato-3-fosfato que é convertido em Acetil-CoA através da glicólise que é o precursor direto na síntese de ácidos graxos. A enzima acetil-CoA carboxilase converte o acetil-CoA em malonil-CoA, que por sua vez tem o grupo

malonil retirado e acoplado a proteínas transportadoras de acetil. Esta reação é catalisada pela enzima malonyl-CoA:ACP aciltransferase. Os ácidos graxos são sintetizados através de uma série de reações repetitivas de alongamento, condensação, redução e desidratação resultando em ácidos graxos de comprimento de cadeia entre 16 a 18 carbonos (RANA, et al. 2019).

Assim como os lipídios, o amido é um dos componentes de reserva de energia das células de microalga. Ele é formado através do processo de fotossíntese e sua produção e acúmulo podem variar dependendo da disponibilidade de nutrientes no meio onde as microalgas se desenvolvem (SUPARMANIAM et al 2019.; MATHIOT et al 2019).

O amido de microalgas é estruturalmente igual ao amido das plantas superiores sendo composto por moléculas de glicose polimerizada ligada por ligações α -1,4 glicosídicas e ramificado nas posições α -1,6. O amido de microalga possui grande valor agregado pois pode ser utilizado em biorrefinarias com vários propósitos como por exemplo a produção de biocombustíveis como o bioetanol, biobutanol e biohidrogênio, além de que quando sob condições controladas servem como base de produção de químicos biológicos (RANA,et al.; MATHIOT,et al 2019.).

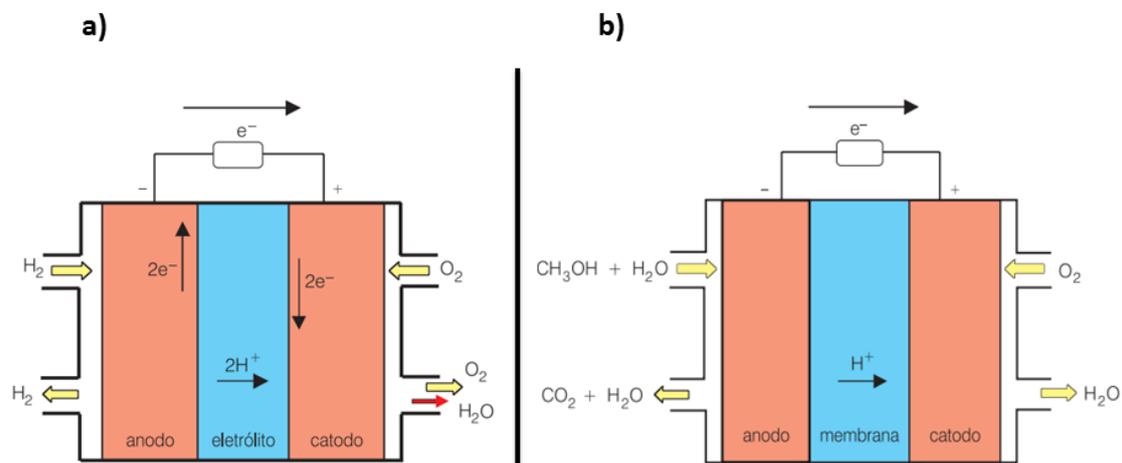
A biossíntese do amido envolve diversas reações que são controladas pelas condições ambientais. Nas microalgas verdes (Chlorophytas) o amido é sintetizado nos cloroplastos, onde o dióxido de carbono (CO_2) é fixado durante a fase escura pela enzima ribulose 1,5-bifosfato carboxilase oxigenase (Rubisco) e transformado em ácido 3-fosfoglicerílico. Utilizando ATP e NADPH o ácido 3-fosfoglicerílico é reduzido e convertido a frutose-6-fosfato, que por sua vez sofre a ação da enzima fosfoglucoose isomerase e é convertida em glicose-6-fosfato, que assim sai do Ciclo de Calvin para a biossíntese do amido. Daí, a glicose-6-fosfato é convertida em glicose-1-fosfato pela ação da enzima fosfoglucomutase. A ADP-glicose pirofosforilase catalisa a reação de conversão da glicose-1-fosfato em ADP-glicose com consumo de ATP. A ADP-glicose serve como doadora de glicose para o alongamento da cadeia glucana catalisada por amido sintetizado por grânulos (GBSS) formando amilose e a amido solúvel sintase (SSS) que forma a amilopectina (RANA,W. et al. 2019.; MATHIOT,C,et al 2019).

3.4.CÉLULAS A COMBUSTÍVEL

O desenvolvimento das primeiras células a combustível (CC) em inglês Fuel Cell (FC) para geração de energia remonta a meados do século 19 e é atribuída a Sir William Grove, porém os princípios teóricos desta tecnologia foram descobertos e propostos por Christian Friedrich Schönbein professor da Universidade da Basileia. Num entanto, nesta época as fontes primárias de energia eram baratas e abundantes, o que restringiu seu uso. Porém no início do século 20 a conversão de energia química em energia elétrica tornou-se mais importante devido ao aumento da utilização da eletricidade, pois nas últimas décadas vem ocorrendo um aumento da população mundial somado a crescente preocupação com as consequências ambientais causadas pela utilização das matrizes energéticas atuais, o que torna indispensável o uso de outros sistemas eficazes de geração de energia limpa.

Células a combustível são uma tecnologia emergente e muito promissora na geração de energia limpa. Estes equipamentos convertem energia química em energia elétrica sem a necessidade de combustão e com maior eficiência sem a emissão de poluentes, podendo chegar a uma eficiência de conversão de 85 a 90%. Devido a sua alta reatividade o hidrogênio é o combustível mais utilizado em células a combustível, mas, podem ser utilizados outros gases, como o gás natural ou mesmo o metanol. Por ter uma alta eficiência e uma grande versatilidade as CFs permitem a montagem de usinas em micro escala (< 1kW) e grande escala (> 10 MW), (HARTMUT, W et al 2000.; McPHAIL et al 2011.; TAN ZHONGFU et al, 2015.; YING et al, 2018.; WANG et al 2018, BAGHERIAN, 2020.; YUHSIEH, 2021).

Figure 5 - Esquema de uma célula a combustível: a) Célula a combustível a hidrogênio. b) Célula a combustível a metanol.



Fonte: VILLULLAS et al 2002

A estrutura básica de todas as células a combustível é semelhante, sendo compostas por dois compartimentos: um compartimento anódico e um catódico com eletrodos separados por um eletrólito (Figura 1). Nos compartimentos anódico e catódico é adicionado um fluxo de gás ou líquido para fornecer aos eletrodos combustível/oxidante (Ânodo) e oxigênio (Cátodo). Os eletrodos, em sua maioria são porosos para que sejam permeáveis ao combustível utilizado (gás ou líquido). Assim ao introduzir um combustível como o hidrogênio no compartimento anódico, ele passa por um processo de oxidação direta utilizando catalizadores de platina para acelerar a reação (Equação 1), liberando assim elétrons (Equação 2). Estes elétrons por uma diferença de potencial entre os dois compartimentos são conduzidos para o compartimento catódico através de uma resistência externa gerando assim uma corrente elétrica. No compartimento catódico estes elétrons iram reduzir o oxigênio gerando água ao final do processo (Equação 3) (YUAN et al. 2018.; USTOLIN & TACCANI, 2018).



A oxidação do hidrogênio envolve a adsorção do gás (H_{ads}) sobre a superfície do catalisador (Pt-H_{ads}) seguido de uma dissociação da molécula e reação eletroquímica a dois prótons de hidrogênio.

As células a combustível são geralmente classificadas pelo eletrólito que utilizam. Uma exceção a esta classificação são as DMFCs (Direct Methanol Fuel Cell), que é uma CC na qual o metanol alimenta diretamente o compartimento anódico. As CC também podem ser divididas segundo sua temperatura de operação em: Células a combustível de baixa temperatura e de alta temperatura, que podem chegar a temperaturas de 600 a 1000 °C.

As células a combustível possuem inúmeras vantagens em relação a outras tecnologias, como, não emitem poluentes, rápida implantação/instalação, alta eficiência, escalabilidade, pode operar em condições extremas, baixa manutenção, entre outras, mas, atualmente o principal fator que dificulta a inclusão bem sucedida desta tecnologia no mercado é seu alto custo em comparação com outras tecnologias existentes (HARDMAN et al, 2015.; CHANDRA et al, 2018). Visando diminuir os custos de operação das CC, variações delas

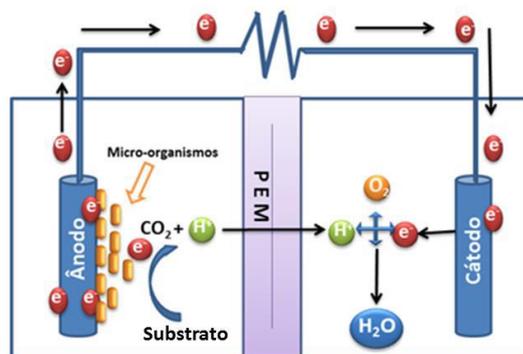
vêm sendo desenvolvidas. Dentre elas destacam-se as células a combustível microbiana (CCM), que substituem componentes de alto valor em CC convencionais por micro-organismos que através de sua maquinaria metabólica convertem a energia contida em substratos orgânicos em energia elétrica (HWANYEONG OH. 2020.; YUHSIEH, C. 2021).

3.5.CÉLULA A COMBUSTIVEL MICROBIANA

O conceito de bioeletricidade em seres vivos foi proposto pela primeira vez em meados de 1700 por Luigi Galvani (1737-1798), um médico e físico italiano que constatou eletricidade intrínseca em tecidos de rãs. Algum tempo depois em 1911 Michael C. Potter desenvolveu o primeiro protótipo de célula a combustível microbiana (CCM), onde ele utilizou uma cultura bacteriana e constatou um fluxo de elétrons entre dois eletrodos. O conceito de designe atual de CCM foi proposto em 1977 por Karube et al (1977), porém não se sabe ao certo como foi desenvolvida naquela época. E em 1999, Kim et al conseguiram gerar eletricidade com sucesso em uma CCM, sendo considerado um marco para esta tecnologia (HAI-LIANG et al 2015.; SERRA, P.M.D 2021).

A Célula a combustível microbiana é uma tecnologia promissora que tem chamado muita atenção nos últimos anos, pois ela possibilita a produção de corrente elétrica a partir da oxidação de matéria orgânica por micro-organismos ou enzimas (RAHIMNEJAD et al., 2011). Estes biorreatores convertem a energia armazenada nas ligações químicas de compostos orgânicos em energia elétrica através de reações eletrocatalíticas realizadas por micro-organismos (ANTONOPOULO, et al., 2010, SANTORO et al, 2017.; XIA et al, 2018.; PARKHEY, P. 2020.; SERRA, P.M.D 2021).

Figure 6 - Esquema de uma CCM simples com um ânodo anaeróbico e um cátodo aeróbico separado por uma Membrana de Troca Protônica (PEM).



Fonte: Autor.

A principal vantagem em utilizar a CCM em relação à célula a combustível convencional, é poder utilizar uma grande variedade de compostos que podem ser utilizados como combustíveis, como efluentes domésticos e industriais, materiais lignocelulósicos, dióxido de carbono, entre outros (LOGAN, 2008). Por esta razão as CCMs podem ser aplicadas a diversos sistemas, como por exemplo, no tratamento de águas residuais, onde ao se utilizar a matéria orgânica da água como combustível para a geração de energia pode ajudar suprir uma parte da demanda por eletricidade, diminuindo assim os custos operacionais da estação de tratamento (LU et al., 2009; LI et al, 2018). Seguindo este raciocínio, verificou-se que as CCMs podem ser utilizadas eficientemente como um biossensor para o monitoramento da quantidade de matéria orgânica em águas residuais, pois existe uma correlação entre a eficiência coulômbica, que é definida como a razão entre o número de Coulombs efetivamente transferido para o ânodo e o total de Coulombs produzido, considerando que todo o substrato oxidado produza elétrons e a quantidade de matéria orgânica em águas residuais, fornecendo assim uma ideia da quantidade de matéria orgânica (QUEK et al, 2015, HE et al, 2017, CHIN-TSAN, et al, 2018.; PARKHEY, P. 2020).

As CCMs também podem auxiliar no tratamento e descoloração de corantes que são extremamente danosos ao meio ambiente, pois são compostos tóxicos resistentes à degradação microbiana e que impedem a penetração da luz e do oxigênio na água, causando um grande dano à vida aquática (UMBUIZEIRO et al, 2005, LIANG et al, 2018). Os corantes são utilizados no compartimento anódico, onde através da oxidação em anaerobiose de substratos orgânicos, ocorre a redução dos corantes, causando assim a descoloração. A redução destes corantes também pode ocorrer por vários mecanismos, como a ação de enzimas de descoloração, mediadores redox, redução química com redutores biogênicos ou a combinação destes (PANDEY et al, 2007., SOLANKI, 2013).Elas também são utilizadas na degradação de contaminantes como o fenol, que geralmente é encontrado em efluentes industriais, petróleo e petroderivados e na remoção de pesticidas (LUOA et al, 2009., XIAN CAO et al, 2015).

O desempenho de uma CCM depende das reações eletroquímicas entre a matéria orgânica e o acceptor final de elétrons como, por exemplo, o oxigênio. No entanto, esta tecnologia ainda apresenta alguns problemas, como a geração de baixos níveis de potência, onde estes níveis são afetados por ainda existir limitações nos processos e reações que ocorrem nos compartimentos catódicos e anódico. Além de perdas por quedas ôhmicas, onde estas podem ser minimizadas diminuindo a distância entre os eletrodos, aumentando a condutividade

iônica dos eletrólitos e utilizando membranas de baixa resistência. Já em densidades de corrente muito altas, a maior perda ocorre devido a incapacidade de manter a concentração inicial do substrato no fluido e a limitação de transporte de massa (OLIVEIRA et al., 2013; SANTORO et al, 2017; MATEO et al 2018).

As CCM mais comuns são compostas por dois compartimentos: catódico e anódico separados fisicamente por uma membrana de troca protônica (PEM) ou uma ponte salina. No anodo as reações acontecem em anaerobiose, onde um biocatalizador ativo oxida a matéria orgânica liberando prótons e elétrons. Os prótons migram para o compartimento catódico através da PEM/Ponte Salina, entram no compartimento catódico onde reagem com o oxigênio formando água. Os elétrons são absorvidos no ânodo e transportados ao cátodo através de um circuito externo gerando corrente elétrica (ANTONOPOULOU et al., 2010.; GHASEMI, et al., 2012, OLIVEIRA et al., 2013.; RAHIMNEJAD, et al., 2015; YOON et al 2018.; SERRA, P.M.D 2021).

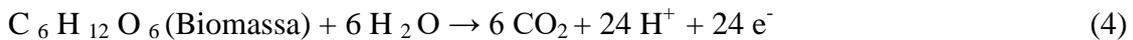
Além da configuração clássica, existem variações nas configurações dos compartimentos anódico e catódico visando o aumento da geração de eletricidade e a diminuição dos custos operacionais. Dentre essas variações destacam-se as Células a Combustível Microbiana Híbrida (CCMH) e as Células a Combustível Fotossintéticas (CCF).

3.6. CÉLULAS A COMBUSTÍVEL FOTOSSINTÉTICA

Tecnologias voltadas a utilização da energia solar estão cada vez mais ganhando importância devido a preocupação crescente com a escassez dos recursos naturais não renováveis e o meio ambiente. Nos últimos anos várias tecnologias vêm sendo desenvolvidas, dentre eles as células a combustível fotossintética (CCF).

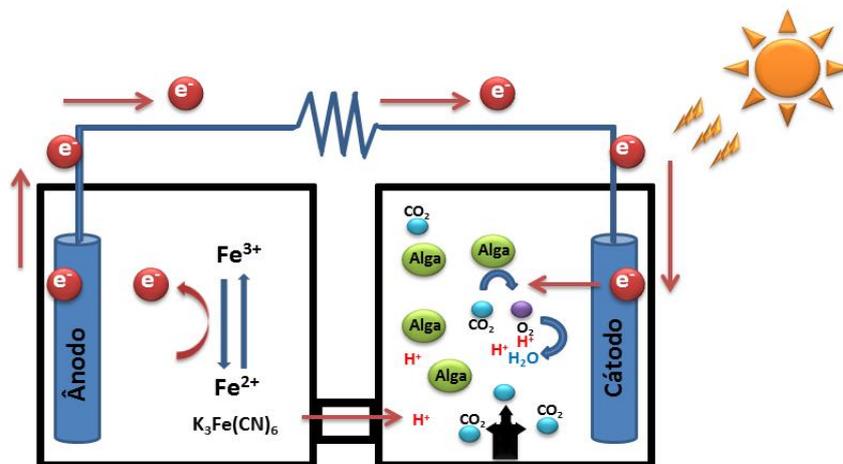
A célula a combustível fotossintética é um dispositivo onde organismos fotossintéticos atuam como biocatalizadores transformando a energia da luz em bioeletricidade utilizando CO₂ ou outro tipo de substrato orgânico. Os organismos fotossintetizantes tem a capacidade de separar, capturar e liberar elétrons durante o fluxo das reações em cadeia, por isto é possível utilizar o metabolismo fotossintético para capturar a luz solar e transformar em bioeletricidade (CHANDRA et al, 2012; EL MEKAWYA, 2014; WU et al 2018, ZHAO et al, 2018.; SHAIKH, R. 2020).

Neste tipo de CCM, os micro-organismos fotossintetizantes são utilizados como aceitador de elétrons biológico no compartimento catódico, onde simultaneamente reduz o CO_2 a biomassa e oxigênio (Equação 4). No ânodo, ocorre a oxidação do substrato liberando elétrons (Equação 5), onde estes são transportados até o cátodo por um circuito externo. No compartimento catódico os elétrons reduzem um mediador eletroquímico oxidado. Este mediador penetra nas células dos organismos fotossintetizantes onde libera sua carga de elétrons tornando-se mais uma vez oxidado. Uma vez dentro de suas células, estes organismos utilizam estes elétrons em suas vias metabólicas para transformar o CO_2 em biomassa e O_2 .



(ZHOU et al, 2012, WU et al 2018).

Figure 7 - Esquema de funcionamento de uma Célula a Combustível Fotossintética (CCF) com cátodo de microalgas.



Fonte: Autor.

Existem várias configurações de CCF, onde as microalgas podem ser cultivadas em ambos os compartimentos (catódico ou anódico). Em grande parte das CCF, as microalgas são utilizadas como biocatalizadores anódicos, onde desenvolvem um biofilme que possui a capacidade de assimilar um substrato gerando elétrons, que por sua vez são transferidos para o eletrodo de forma direta ou com o auxílio de um mediador. As microalgas são utilizadas como biocátodos a fim de substituir os sistemas convencionais de aeração, sendo assim uma alternativa mais econômica. Além disso, os cátodos de microalga contribuem com a

diminuição da concentração do dióxido de carbono na atmosfera. O dióxido de carbono capturado por estas microalgas são convertidos em biomassa e oxigênio. Biomassa esta que possui um alto valor agregado, pois são ricos em vários nutrientes essenciais como vitaminas, carboidratos, ácidos graxos, proteínas, antioxidantes, sais minerais entre outros, podendo ser utilizada para a alimentação humana e animal, além de poder ser utilizada para a produção de biocombustíveis como o biodiesel, bioetanol e biogás, agregando assim valor a biomassa e reduzindo os custos de operação. Por estes motivos este tipo de CCM vem recebendo bastante atenção nas últimas décadas (PANDIT et al, 2012.; GOUVEIA, et al, 2014; EL MEKAWY et al 2014; FISCHER, 2018.; CHAMATH, 2020.; KUMAR et al 2020).

Além da configuração mais comum utilizada neste sistema de CCF (Figura 3.), existem algumas variações, como: CCF de câmara única, CCF de sedimentos, CCF híbrida, CCF acoplada. Nas CCF de câmara única (Figura 4.a) os eletrodos do cátodo e do ânodo ficam em uma única câmara sem separação por membranas. As microalgas ficam aderidas ao eletrodo anódico enquanto o catódico fica livre. Durante o dia ocorre a fotossíntese, onde ocorre a oxidação do dióxido de carbono liberando elétrons e oxigênio. Durante a noite ocorre o processo de respiração celular. Estas reações de fotossíntese e respiração geram corrente elétrica (El MEKAWY et al, 2014; FISCHER, 2018.; KUMAR, M. et al 2020.; HAI, T.H. 2020).

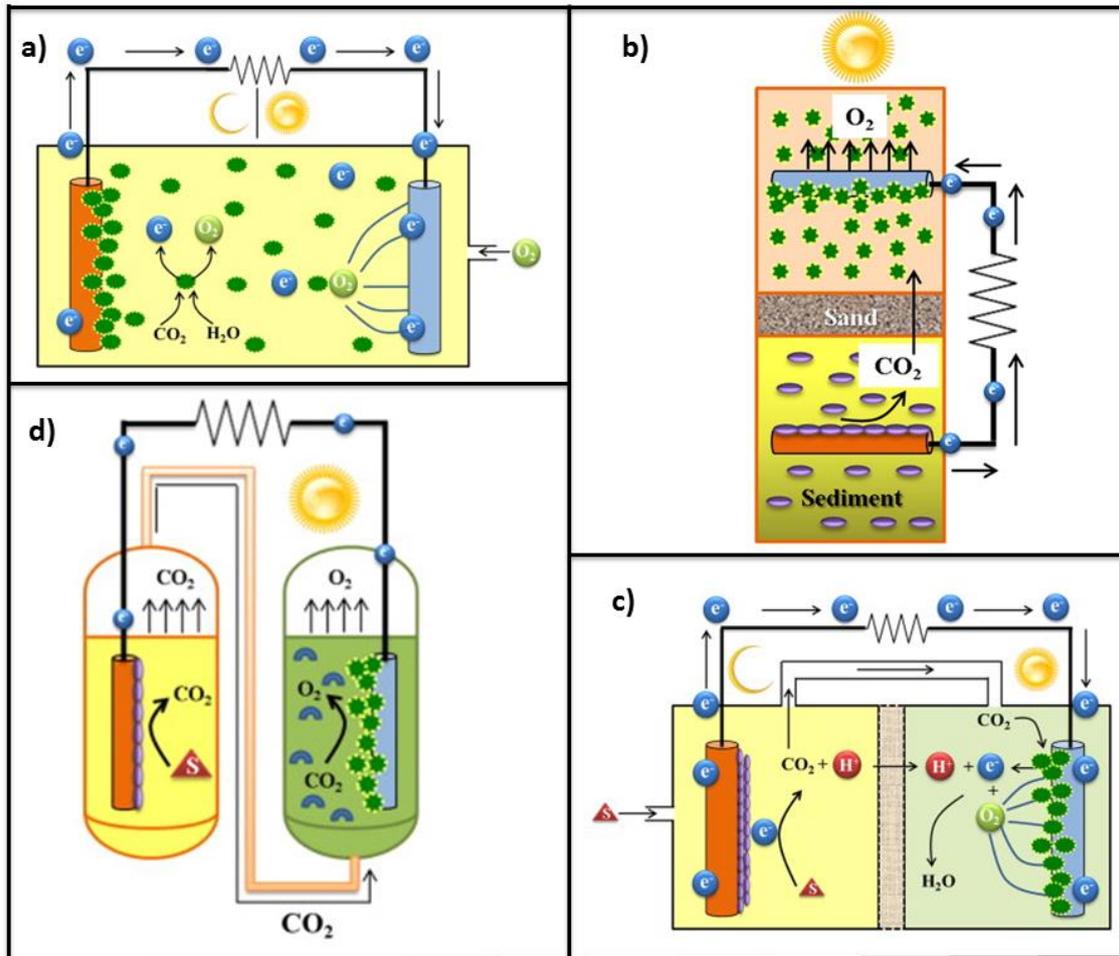
Nas CCF de sedimentos ou CCM bentônicas (Figura 4. b) a energia é gerada através da diferença de potencial elétrico natural utilizando um ânodo enterrado em uma camada de sedimentos e um cátodo submerso em água. A geração de energia se dá a partir da diferença de potencial gerada a partir da oxidação de moléculas orgânicas por micro-organismos no sedimento que irá liberar elétrons, que por sua vez irão migrar para o compartimento catódico onde as microalgas irão realizar fotossíntese liberando oxigênio que irá ser reduzido à água (De SCHAMPHELAIRE et al 2008, FISCHER, 2018).

As CCF híbridas (Figura 4. C) são compostas por dois compartimentos separados por uma membrana de troca protônica. No compartimento anódico adiciona-se algum substrato, onde geralmente se utiliza lama ativada de alguma estação de tratamento com micro-organismos. No compartimento catódico, utilizam-se culturas de microalga, geralmente iluminadas 12 horas por dia. Ambos os compartimentos são ligados por um tubo coletor de gases localizado no topo de cada compartimento. Assim, o dióxido de carbono gerado durante a fermentação no compartimento anódico é levado ao compartimento catódico onde será utilizado pelas microalgas para a realização da fotossíntese. A geração de corrente se dá através da diferença

de potencial elétrico gerado entre as câmaras anódicas e catódicas, onde no ânodo ocorre a liberação de elétrons pela oxidação do substrato. Na câmara catódica, o processo fotossintético libera oxigênio que será reduzido e formará água, gerando assim um fluxo de elétrons entre as câmaras (LOBATO et al, 2013.; KUMAR et al 2020).

Nas CCF acopladas (Figura 4.d) são fotobiorreatores que são acoplados a tanques de fermentação, onde o CO_2 é produzido por fermentação. Neste tipo de CC, não se faz necessária a utilização de membranas de troca protônica, o que possibilita sua utilização em grande escala. Este tipo de CC já foi utilizado em indústria produtora de etanol, onde este sistema foi acoplado em tanques de fermentação de levedura. Este sistema integrado é benéfico, pois a energia produzida supre parte da demanda da fábrica, além de diminuir as emissões de dióxido de carbono (POWELL e HILL 2009.; HAI, T.H. 2020).

Figure 8 - Diferentes configurações de uma célula a combustível fotossintética CCF. a) CCF de câmara única. b) CCF de sedimentos. c) CCF híbrida. d) CCF acoplada.



Fonte: El MEKAWY et al, 2014

3.7.SEQUESTRO DE CO₂

O dióxido de carbono é um gás encontrado naturalmente na atmosfera, variando de 0,03 – 0,06% v/v da sua composição natural, mas devido a grande utilização de combustíveis fósseis, sua concentração atmosférica tem aumentado drasticamente, variando de 6 – 15%, o que causa vários efeitos deletérios ao planeta, como o aquecimento global (RAHAMAN et al 2011.; WANG, 2019.; CHAFIK, 2020.; CAO, . 2020).

Um dos métodos naturais de retirada deste gás da atmosfera é o sequestro de carbono, que é um processo realizado por organismos fotossintetizantes, como plantas, algas e algumas bactérias. Estes organismos utilizam o CO₂ atmosférico como sua principal fonte de carbono,

transformando este composto em carboidratos necessários a sua nutrição através da fotossíntese. Este processo constitui a principal rota de entrada de toda energia na biosfera. Estima-se que a cada ano estes organismos fotossintetizantes produzam mais de 100 bilhões de toneladas métricas de açúcar em escala mundial.

A fotossíntese é basicamente dividida em dois estágios: dependente e independente da luz. O estágio dependente da luz é o primeiro estágio, onde os organismos absorvem a luz solar e a utilizam para converter ADP e NADP⁺ em ATP e NADPH. No segundo estágio, o independente da luz, os organismos capturam o CO₂ atmosférico e o convertem em compostos orgânicos no ciclo de Calvin-Benson, utilizando as moléculas geradas anteriormente (ZHAO e SU, 2014.; HO et al, 2014, SADEGHIZADEH et al 2017; OBEID et al 2018).

O sequestro de carbono por microalgas está sendo considerada uma alternativa promissora na mitigação dos gases causadores do efeito estufa, pois estes organismos possuem uma alta eficiência fotossintética, estima-se que para produzir 1 Kg de biomassas, as microalgas fixam cerca de 1,83 Kg de CO₂. Por esta alta eficiência a biomassa de microalgas vem sendo reconhecida como uma fonte promissora na produção de biocombustíveis (JIANG et al, 2013., CHEAH et al 2015).

As condições de cultura onde o processo de crescimento utiliza gases de combustão são mais complexas do que o crescimento realizado sob as condições atmosféricas naturais do ambiente, assim alguns fatores podem influenciar no desempenho das microalgas no processo de fixação de CO₂, como fatores biológicos (a espécie de microalga utilizada, a concentração inicial de inóculo). Fatores físicos e químicos como a concentração de substâncias tóxicas contidas nos gases de combustão utilizados no cultivo, temperatura do cultivo, luz, pH e nutrientes. Assim como alguns parâmetros hidrodinâmicos, como por exemplo, os parâmetros de fluxo, a mistura e transferência de massa, etc. (SCHENK, 2008; SADEGHIZADEH et al 2017).

4. REFERÊNCIAS

- AHMADI, M.; HOU, Q.; WANG, Y.; CHEN, Z. Interfacial and molecular interactions between fractions of heavy oil and surfactants in porous media: Comprehensive review. **Advances in Colloid and Interface Science**. v. 283, 2020.
- ANTONOPOULOU, G.; STAMATELATOU, K.; BEBELIS, et al. Electricity generation from synthetic substrates and cheese whey using a two-chamber microbial fuel cell. **Biochemical Engineering Journal**, v. 50, p. 10–15, 2010.
- BAGHERIAN, M.A.; MEHRANZAMIR, K. A comprehensive review on renewable energy integration for combined heat and power production. **Energy Conversion and Management** v. 224, 2020.
- BEYERINCK [BEIJERINCK], M.W. Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. **Botanische Zeitung**, v. 47, p. 725-739, 1890.
- BEZERRA, P.Q.M.; MATOS, M.F.R. RAMOS, I.G. et al. Innovative functional nanodispersion: Combination of carotenoid from *Spirulina* and yellow passion fruit albedo. **Food Chemistry**. v.285, p. 397-405, 2019.
- BOLGOVICS, Á.; BÉRESAB, V.; VÁRBÍRÓA, G.; KRASZNAI-K, E.A. Groups of small lakes maintain larger microalgal diversity than large ones. **Science of The Total Environment**. v. 678, p. 162-17215, 2019.
- BURCZYK, J.; HESSE, M. The ultrastructure of the outer cell wall-layer of *Chlorella* mutants with and without sporopollenin. **Plant Syst Evol**, v. 138. p. 121–137, 2000.
- CAO, Z.; DENG, J.; ZHOU,S.; HE, Y. Research on the feasibility of compressed carbon dioxide energy storage system with underground sequestration in antiquated mine goaf. **Energy Conversion and Management**. v. 211, 2020.
- CARRETTE, L.;FRIEDRICH, K.A.; STIMMING, U. Fuel Cells - Fundamentals and Applications. **Journal of Fuel Cell Science and Technology**, v.1, p. 5-39, 2002.
- CHAFIK, A.; HASSANIA, K.E.; ESSAMADI, A. Efficient sequestration of carbon dioxide into calcium carbonate using a novel carbonic anhydrase purified from liver of camel (*Camelus dromedarius*). **Journal of CO₂ Utilization**. v. 42, 2020.

CHAMATH D.Y.; DON, Y. A.; BABEL, S. Comparing the performance of microbial fuel cell with mechanical aeration and photosynthetic aeration in the cathode chamber. **International Journal of Hydrogen Energy**. V.22, 2020.

CHANDRA, R.; SUBHASH, G. V.; MOHAN, V. Mixotrophic operation of photo-bioelectrocatalytic fuel cell under anoxygenic microenvironment enhances the light dependent bioelectrogenic activity. **Bioresour Technol**, v. 109, p. 46–56. 2012.

CHANDRA, S.; LAL, S.; JANARDHANAN, V.M.; SAHU, K.C.; DEEPA, M. Ethanol based fuel cell on paper support. **Journal of Power Sources**. v. 396, p. 725-733, 2018.

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

CHEN, G.W.; CHOI, S.J.; CHA, J.H.; et al. Microbial community dynamics and electron transfer of a biocathode in microbial fuel cells. **Korean J. Chem. Eng.**,v. 27, p. 1513–1520, 2010.

CHEN, J.; LI, J.; DONG, W.; ZHANG, X.;et al. The potential of microalgae in biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 90, p. 336-346, 2018.

CHIN-TSAN, W.; SANGEETHA T.; WEI-MONYAN. et al. Application of interface material and effects of oxygen gradient on the performance of single-chamber sediment microbial fuel cells (SSMFCs). **Journal of Environmental Sciences**. v.43, 2018.

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

DANTAS, P.V.; PERES, S.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; LA ROTTA, H.C.E. Utilization of raw glycerol for pyocyanin production from *Pseudomonas Aeruginosa* in half-microbial fuel cells: evaluation of two electrochemical approaches, **J Electrochem Soc**, v.160, p. G1–G7, 2013.

De SCHAMPHELAIRE, L.; RABAEY, K.; et al. Outlook for benefits of sediment microbial fuel cells with two bio-electrodes. **Microb Biotechnol**, v.1. p. 446–462, 2008.

DEBABOV, V.G. Electricity from Microorganisms. **Microbiology**, v. 77, p. 123-131. 2008.

DESHMUKH, S.; KUMARA, R.; BALA, K. Microalgae biodiesel: A review on oil extraction, fatty acid composition, properties and effect on engine performance and emissions. **Fuel Processing Technology**. v.191, p. 232-247. 2019.

DUIC, N.; GUZOVIC, Z.; KAFAROV, V. et al. Sustainable development of energy, water and environment systems. **Applied Energy**, v.101, p. 3–5, 2013.

DUTEANU, N.; ERABLE, B.; KUMAR, S.M.S. et al. Effect of chemically modified Vulcan XC-72R on the performance of air-breathing cathode in a single-chamber microbial fuel cell. **Biores. Technol.**, v.101, p. 5250–5255, 2010.

EL MEKAWYA, A.; HEGAB, H.M.; VANBROEKHOVEN, K.; PANT, D. Techno-productive potential of photosynthetic microbial fuel cells through different configurations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 39, p. 617–627, 2014.

ESPINASA, R.; HORST, E.; REYES, S.G. et al. A micro-based model for world oil Market. **Energy Economics**, v.66, pp. 431-449, 2017.

FAROOQ, W.; WILLIAM I.; PARK, S.M.S.; JI-WON YANG. Water use and its recycling in microalgae cultivation for biofuel application. **Bioresource Technology** v. 184, p.73–81, 2015.

FERREIRA, G.F.; RÍOS, L.F.P.; FILHO, R.M. A review on lipid production from microalgae: Association between cultivation using waste streams and fatty acid profiles. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** .v. 109, p. 448-466, 2019.

FISCHER, F. Photoelectrode, photovoltaic and photosynthetic microbial fuel cells. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.90, p. 16–27, 2018.

GEBREMARIAM, S.N.; MARCHETTI, J.M. Economics of biodiesel production: Review. **Energy Conversion and Management**. v. 168, p. 74-84, 2018.

GENC, T.S. OPEC and demand response to crude oil prices. **Energy Economics**. v.66, p.238-246, 2017.

GONG, M.; BASSI, A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. **Biotechnology Advances**. v. 34, p. 1396-1412, 2016.

GOUVEIA, L.; NEVES, C.; SEBASTIÃO, D. et al. Effect of light on the production of bioelectricity and added-value microalgae biomass in a Photosynthetic Alga Microbial Fuel Cell. **Bioresource Technology**, v. 154, p.171–177, 2014.

HAGEN, C.; SIEGMUND, S.; BRAUNE, W. Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. **Eur J Phycol.** v.37, p. 217–226. 2002.

HAI, T.H.; MIN, N.B. Using multiple carbon brush cathode in a novel tubular photosynthetic microbial fuel cell for enhancing bioenergy generation and advanced wastewater treatment. **Bioresource Technology.** v. 316, 2020.

HAI-LIANG, S.; ZHU, Y.; LI, J. Electron transfer mechanisms, characteristics and applications of biological cathode microbial fuel cells – A mini review. **Arabian Journal of Chemistry.** v.18, 2015.

HARDMAN, S.; CHANDAN, A.; STEINBERGER-WILCKENS, R. Fuel cell added value for early market applications. **Journal of Power Sources.** v. 287, p. 297-306, 2015.

HARTMUT, W.; GÖTZ, M.; LINARDI, M. Tecnologia de células a combustível. **Química nova,** v.4, p.23, 2000.

HE, L.; DU, P.; CHEN, Y. et al. Advances in microbial fuel cells for wastewater treatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews.** v. 71, p. 388-403, 2017.

HO, S. H.; CHAN, M. C.; LIU, C. C. et al. Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using light-related strategies. **Bioresour Technol,** v.152, p. 275–282. 2014.

HUANGA, L.; REGANB, J.M.; QUAN, X. Electron transfer mechanisms, new applications, and performance of biocathode. **Microbial fuel cells.** v. 102, p. 316–323, 2011.

HWANYEONG OH.; LEE, W.Y.; WON, J. Residual-based fault diagnosis for thermal management systems of proton exchange membrane fuel cells. **Applied Energy.** v. 277, 2020.

JACKETTI, M.; BEEGLE-KRAUSE, C.J.; ENGLEHARDT, J.D. A review on the sinking mechanisms for oil and successful response Technologies. **Marine Pollution Bulletin.** v. 160, 2020.

JIANG, Y. L.; ZHANG, W.; WANG, J. F. et al. Utilization of simulated flue gas for cultivation of *Scenedesmus dimorphus*, **Bioresour. Technol,** v.128, p. 359–364, 2013.

JIHONG CHEN.; WEIPAN ZHANG.; SIFAN LI.; et al. Identifying critical factors of oil spill in the tanker shipping industry worldwide. **Journal of Cleaner Production**. v. 180, p.1-10, 2018.

KARUBE, I.; MATSUNAGA, T.; TSURU, S.; SUZUKI, S. Biochemical cells utilizing immobilized cells of *Clostridium butyricum*. **Biotechnol Bioeng**, v.19, p. 1727–1733, 1977.

KATIYAR, R.; ARORA, A.; et al. Health promoting functional lipids from microalgae pool: A review. **Algal Research**. v. 46, 2020.

KIM, H.J.; HYUN, M.S.; CHANG, I.S.; KIM, B.H. A microbial fuel cell type lactate biosensor using a metal-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. **J. Microbiol. Biotechnol.** v. 9, p. 365–367,1999.

KULKARNI, S.; NIKOLOV, Z. Process for selective extraction of pigments and functional proteins from *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**. v.35, p. 185-193, 2018.

KUMAR, M. DIXIT, E.R.; PALLY, A.T. Photosynthetic microorganisms (Algae) mediated bioelectricity generation in microbial fuel cell: Concise review. **Environmental Technology & Innovation**. v. 19, 2020.

LI Y, HORSMAN M, WU N, LAN CQ, DUBOIS-CALERO N. Biofuels from microalgae. **Biotechnology Progress**, v. 24, n.4, p. 815–20. 2008.(2)

LI Y, WANG B, WU N, LAN CQ. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid production of *Neochloris oleoabundans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 81,n. 4, p.629–36, 2008. (1)

LI, M.; ZHOU, M.; TIAN, X.; TANA, C.; MCDANIEL, C.T.et al. Microbial fuel cell (MFC) power performance improvement through enhanced microbial electrogenicity. **Biotechnology Advances**. v. 36, pp. 1316-1327, 2018.

LIANG, S.; ZHANG, B.; SHI, J.; et al. Improved decolorization of dye wastewater in an electrochemical system powered by microbial fuel cells and intensified by micro-electrolysis. **Bioelectrochemistry**. v 124, pp.s 112-118, 2018.

LOBATO, J.; DEL CAMPO, A.G.; FERNÁNDEZ, F.J. et al. Lagooning microbial fuel cells: a first approach by coupling electricity-producing microorganisms and algae. **Appl Energy**. v.110, pp. 220–226, 2013.

LOGAN, B. E. *Microbial Fuel Cells*. New Jersey: Wiley & Sons, 2008.

LOGAN, B.E. Scaling up microbial fuel cells and other bioelectrochemical systems *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 85, p. 1665–1671, 2010.

LOGROÑO, W.; PÉREZ, M.; URQUIZO, G. et al. Single chamber microbial fuel cell (SCMFC) with a cathodic microalgal biofilm: A preliminary assessment of the generation of bioelectricity and biodegradation of real dye textile wastewater. *Chemosphere.* v. 176, p. 378–388, 2017.

LOVLEY, D. R. Microbial fuel cells: novel microbial physiologies and engineering approaches. *Current Opinion in Biotechnology.* v.17, p. 327-332. 2006.

LU WANG.; XIURONG CHEN.; HUALIN WANG. et al. *Chlorella vulgaris* cultivation in sludge extracts from 2,4,6-TCP wastewater treatment for toxicity removal and utilization. *Journal of Environmental Management.* v. 187, p. 146–153. 2017.

LU, N., ZHOU, S.-G., ZHUANG, L., ZHANG, J.-T., NI, J.-R. Electricity generation from starch processing wastewater using microbial fuel cell technology. *Biochem. Eng. J.* v.43, p.246–251, 2009.

LUO, H.; LIU, G.; ZHANG, R.; JIN, S. Phenol degradation in microbial fuel cells. *Chemical Engineering Journal*, v.147, p. 259–264, 2009.

M. GHASEMI, W.R. WAN, W.R. ISMAIL, M. et al. Effect of pretreatment and biofouling of proton exchange membrane on microbial fuel cell performance. *Int. J. Hydrogen Energy.* v. 38, p. 5480–5484, 2012.

MA, Y.; GAO, Z.; WANG, Q.; LIU, Y. Biodiesels from microbial oils: Opportunity and challenges. *Bioresour. Technol.* v. 263, p. 631-641.

MANIRUZZAMAN, A.; ANUARKASSIM, A.; et al. Two-stage cultivation strategy for simultaneous increases in growth rate and lipid content of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* v.119, 2020.

MARSILI, E.; BARON, D.B.; SHIKHARE, I.D.; COURSOLE, D.; GRALNICK, J.A.; BOND, D.R. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *PNAS Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* v.105, p. 3968-3973, 2008.

- MATEO, S.; CAÑIZARES, P.; ANDRÉS, M. et al. Driving force behind electrochemical performance of microbial fuel cells fed with different substrates. **Chemosphere**. v. 207, p. 313-319, 2018.
- MATHIOT,C.; PONGE, P.; GALLARD,B. et al. Microalgae starch-based bioplastics: Screening of ten strains and plasticization of unfractionated microalgae by extrusion. **Carbohydrate Polymers**. v. 208, p. 142-151, 2019.
- MCPHAIL, S.J.; AARVA, A.; DEVIANTO, H. et al. Commonalities and opportunities for integrated research. **International journal of hydrogen energy**. v.36, p. 10337 e10345, 2011.
- MEDEIROS, D.L.; SALES, E. A.; KIPERSTOK, A. Energy production from microalgae biomass: carbon footprint and energy balance. **Journal of Cleaner Production** v. 96, p. 493e500., 2015.
- MENDES, M.C.Q.; GONZALEZ, A.A.C.; MENEZES, M. et al. Coleção de microalgas de ambientes dulciaquícolas naturais da Bahia, Brasil, como potencial fonte para a produção de biocombustíveis: uma abordagem taxonômica. **Acta Botanica Brasilica**. v. 26, n.3, p. 691-696, 2012.
- MORAIS, M. G. **Fixação de dióxido de carbono e produção de ácidos graxos por microalgas**. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Universidade federal do rio grande do sul, Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2006.
- MUJTABA,G.; RIZWANA, M.; LEE, K. Removal of nutrients and COD from wastewater using symbiotic co-culture of bacterium *Pseudomonas putida* and immobilized microalga *Chlorella vulgaris*. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. v. 49. p.145–151, 2017.
- NURACHMAN, Z.; HARTINI H.; RAHMANYAH, W. R. et al. Tropical marine *Chlorella* sp. PP1 as a source of photosynthetic pigments for dye-sensitized solar cells. **Algal Research**. n.10, p.25–32, 2015.
- OBEID, S.; BEAUFILS, N.; CAMY, S. et al. Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of lipids from freeze-dried microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris*. **Algal Research**. v. 34, p. 49-56, 2018.

- OLIVEIRA, V.B.; SIMÕES, M.; MELO, L.F.; PINTO, A.M.F.R. Overview on the developments of microbial fuel cells. **Biochemical Engineering Journal**. v.73, p. 53–64, 2013.
- PAL, D.; MITRA, K.S. Interdependence between crude oil and world food prices: A detrended cross correlation analysis. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**. v.492, p. 1032-1044. 2018.
- PANDEY, A.; SINGH, P.; IYENGAR, L. Descoloração e degradação bacteriana de corantes azo. **Int. Biodeterior. Biodegrade**. v.59, p. 73-84, 2007.
- PANDIT,S.; NAYAK, B.K.; DAS, D. Microbial carbon capture cell using cyanobacteria for simultaneous power generation, carbon dioxide sequestration and wastewater treatment. **Bioresource Technology**, v.107, p.97–102, 2012.
- PARKHEY, P.; SAHU, R. Microfluidic microbial fuel cells: Recent advancements and future prospects. **International Journal of Hydrogen Energy**. v.102, 2020.
- PIENKOS, P.T. & DARZINS A.; The promise and challengers of microalgal-derived biofuels. **Biofuels, Bioproducts & Biorefining**. v.3, p.431-440, 2009.
- PING ZHANGA, ZHE LI.; LUNHUI, LU.et al. Effects of stepwise nitrogen depletion on carotenoid content, fluorescence parameters and the cellular stoichiometry of *Chlorella vulgaris*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.181, p. 30–38, 2017.
- POLIKARPOV, I.; SABUROVA, M.; AL-YAMANI, F. Decadal changes in diversity and occurrence of microalgal blooms in the NW Arabian/Persian Gulf. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*. v.23, 2020.
- POTTER, M.C. Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds. **Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.** v.84, p.160–276, 1911.
- POWELL, E.E.; HILL, G.A. Economic assessment of an integrated bioethanol–biodiesel–microbial fuel cell facility utilizing yeast and photosynthetic algae. **Chem Eng Res Des**. v.87, p. 1340–1348, 2009.
- PUGAZHENDHI, A.; NAGAPPAN, S.;BHOSALE, R.R.; TSAI, P.C. Various potential techniques to reduce the water footprint of microalgal biomass production for biofuel—A review. **Science of The Total Environment**. v. 749, 2020.

- QUEK, S.B.; CHENG, L.; CORD-RUWISCH, R. Microbial fuel cell biosensor for rapid assessment of assimilable organic carbon under marine conditions. **water research**, v. 77, n. 64 e71, 2015.
- RAHAMAN, M.S.A.; CHENG, L.H.; XU, X.H. et al. A review of carbon dioxide capture and utilization by membrane integrated microalgal cultivation processes. **Renew. Sustain. Energy Rev.** v.15, n.8, p.4002–4012, 2011.
- RAHIMNEJAD, M.; ADHAMI, A.; DARVARI, S. et al. Microbial fuel cell as new technology for bioelectricity generation: A review. **Alexandria Engineering Journal.** v.12, 2015.
- RAHIMNEJAD, M.; GHOREYSHI, A. A.; NAJAFPOUR, G.; JAFARY, T. Power generation from organic substrate in batch and continuous flow microbial fuel cell operations. **Applied Energy.** n.88, p.3999–4004, 2011.
- RAMANNA, L.; RAWAT, I.; BUX, F. Light enhancement strategies improve microalgal biomass productivity. **Renewable and Sustainable Energy Reviews.** v. 80, p. 765-773, 2017.
- RANA, W.; WANG, H.; LIU, Y. et al. Storage of starch and lipids in microalgae: Biosynthesis and manipulation by nutrients. **Bioresource Technology.** V. 291, 2019.
- REHMAN, A.; TONG, Q.; JAFARI, S.M. et al. Carotenoid-loaded nanocarriers: A comprehensive review. **Advances in Colloid and Interface Science.** v. 275, 2020.
- RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. **Blackwell Science Ltd.** v. 11, 2004.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Update on natural food pigments: A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. **Food Research International** v. 124. p: 200-205. 2019.
- RUSSO, D.A.M.T. **Estudo do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual tratada, sob diferentes condições de fotoperíodo e temperature.** Dissertação (Mestrado em bioenergia), Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia. Lisboa. 2001.

SADEGHIZADEH, A.; FARHAD DAD, F.; MOGHADDASI, L. et al. CO₂ capture from air by *Chlorella vulgaris* microalgae in an airlift photobioreactor. **Bioresource Technology**. v. 243, p. 441-447, 2017.

SAFI, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O. et al. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.35, p.265–278. 2014.

SANTORO, C.; ARBIZZANI, C.; ERABLE, B.; IEROPOULOS, I. Microbial fuel cells: From fundamentals to applications. **A review. Journal of Power Sources**. v. 356, p. 225-244, 2017.

SCHENK, P.M.; THOMAS-HALL, S.R.; STEPHENS, E. et al. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. **Bioenergy Res**. v.1, p. 20–43, 2008.

SCHROUDER, U. Anodic electron transfer mechanisms in microbial fuel cells and their energy efficiency. **Phys. Chem. Chem. Phys**. v.9, p.2619–2629. 2007.

SERRA, P.M.D.; ESPÍRITO-SANTO, A. Sourcing power with microbial fuel cells: A timeline. **Journal of Power Sources**. v. 482, 2021.

SHAIKH, R.; RIZVI, A. QURAIISHI, M. Bioelectricity production using plant-microbial fuel cell: Present state of art. **South African Journal of Botany**. v. 23, 2020.

SILVA, J.O.V.; ALMEIDA, M.F.; ALVIM-FERRAZ, M.C.; DIAS, J.M. Integrated production of biodiesel and bioethanol from sweet potato. **Renewable Energy**. v.124, p. 114-120, 2018.

SOLANKI, K.; SUBRAMANIAN, S.; BASU, S. Microbial fuel cells for azo dye treatment with electricity generation: A review. **Bioresource Technology**. v.131, p.564–571, 2013.

SONG, H.L.; ZHUB, Y.; LI, J. Electron transfer mechanisms, characteristics and applications of biological cathode microbial fuel cells – A mini review. **Arabian Journal of Chemistry**. 2015.

SUPARMANIAM, U.; LAMA, M.K.; UEMURA, Y. et al. Insights into the microalgae cultivation technology and harvesting process for biofuel production: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 115, 2019.

TAN ZHONGFU, T.; CHEN, Z.; PINGKUO, L. et al. Focus on fuel cell systems in China. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v.47, p.912–923, 2015.

TOMASELLI, L. The microalgal cell, Handbook of microalgal culture: **Biotechnology and applied Phycology**, p. 3, 2004.

TORRES, C.I.; MARCUS, A.K.; LEE, H.S.; et al. A kinetic perspective on extracellular electron transfer by anode-respiring bacteria, **FEMS Microbiology Reviews**, v.34, p.3-17. 2010.

UGGETTI, E.; PUIGAGUT, J. Photosynthetic membrane-less microbial fuel cells to enhance microalgal biomass concentration. **Bioresource Technology**. v. 218, p.1016–1020, 2016.

ULLAH, Z.; KHAN, A.S.; MUHAMMAD, N. et al. A review on ionic liquids as perspective catalysts in transesterification of different feedstock oil into biodiesel. **Journal of Molecular Liquids**. v. 266, p. 673-686, 2018.

UMBUZEIRO, G.D.A.; FREEMAN, H.S.; WARREN, S.H. et al. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais river. **Chemosphere**, v.60, p.55–64, 2005.

USTOLIN, F.; TACCANI, R. Fuel cells for airborne usage: Energy storage comparison. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 43, p. 11853-11861, 2018.

VELJKOVIĆ, V.B.; BIBERDŽIĆ, M.O.; BANKOVIĆ-ILIĆ, I.B. et al. Biodiesel production from corn oil: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.91, p. 531-548. 2018.

VILLULLAS, H.M.; TICIANELLI, E.A.; GONZÁLEZ, E.R. Células a combustível: Energia limpa de fontes renováveis. **Química Nova na Escola**. v. 7, 2002.

WANG, D.; NOGUCHI, T.; NOZAKI, T. Increasing efficiency of carbon dioxide sequestration through high temperature carbonation of cement-based materials. **Journal of Cleaner Production**. v. 238, 2019.

WANG, J.; HUALIN, W.; FAN, W. Techno-Economic Challenges of Fuel Cell Commercialization. **Engineering**. v. 4, p. 352-360, 2018.

WANG, Y.; QIYANG.; LINYAO KE.; PENG, Y.; LIU, Y.; Review on the catalytic pyrolysis of waste oil for the production of renewable hydrocarbon fuels. **Fuel**. v. 283, p. 119-170, 2021.

WIJFFELS, R.H.; BARBOSA, M.J. An outlook on microalgal biofuels, **Science**, v.329 p.796–799, 2010.

WU, S.; PATIL, S.A.; CHEN, S. Auto-feeding microbial fuel cell inspired by transpiration of plants. **Applied Energy**. v. 225, p. 934-939, 2018.

XIA, C.; ZHANG, D.; PEDRYCZ, W.; ZHU, Y.; GUO, Y. Models for Microbial Fuel Cells: A critical review. **Journal of Power Sources**. v. 373, p. 119-131, 2018.

XIAN CAO, HAI-LIANG SONG, CHUN-YAN YU, XIAN-NING LI. Simultaneous degradation of toxic refractory organic pesticide and bioelectricity generation using a soil microbial fuel cell. **Bioresource Technology**. v.189, p.87–93, 2015.

XIE, S.; CHEN, Y.; LIANG, P. HUANG, X. Simultaneous electricity generation and nitrification in a microbial fuel cell with aerobic biocathode. **Environ. Sci. Technol.** v.31, p.1601–1606, 2010.

XIE, S.; LIANG, P.; CHEN, Y.; XIA, X.; HUANG, X. Simultaneous carbon and nitrogen removal using an oxic/anoxic-biocathode microalgal fuel cells coupled system **Bioresour. Technol.** v.102, p. 348–354, 2011.

YAMAMOTO, M.; FUJISHITA, M.; HIRATA, A.; KAWANO, S. Regeneration and maturation of daughter cell wall in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). **JPlat.** v.117, p.257–64. 2004.

YAMAMOTO, M.; KURIHARA, I.; KAWANO, S.; Late type of daughter cell wall synthesis in one of the Chlorellaceae, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). **Planta**; v. 221, p.766–75, 2005.

YANA, Z.; TAIMING, W.L.; WANG, S.X. Aquatic microalgal and bacterial communities in a karst wetland watershed. **Journal of Hydrology**. v. 591, 2020.

YING, Y.P.; KAMARUDIN, S.K.; MASDAR, M.S. Silica-related membranes in fuel cell applications: An overview. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 43, p. 16068-16084, 2018.

YONG JIN.; HETAO WU. et al. Comparison of fatty acid composition and positional distribution of microalgae triacylglycerols for human milk fat substitutes. **Algal Research**. v.37, p. 40-50. 2019.

YOON, J.J.; AHN, Y.; SCHRÖDER, U. Parylene C-coated PDMS-based microfluidic microbial fuel cells with low oxygen permeability. **Journal of Power Sources**. p. 398, p. 209-214, 2018.

YUAN, X.M.; GUO, H.; LIU, J.X. et al. Influence of operation parameters on mode switching from electrolysis cell mode to fuel cell mode in a unitized regenerative fuel cell. **Energy**. v. 162, p. 1041-1051, 2018.

YUHSIEH, C.; PEI, P.; BAI, Q.; SU, A.; WENG, F.; LEE, C. Results of a 200 hours lifetime test of a 7 kW Hybrid–Power fuel cell system on electric forklifts. **Energy**. v. 214, 2021.

ZAH, R.; BÖNI, H.; GAUCH, M. et al Life Cycle Assessment of Energy Products: Environmental Impact Assessment of Biofuels. Executive Summary. Empa, Technology and Society Lab, Lerchenfeldstrasse 5, CH-9014 St. **Gallen, Switzerland**, 2009.

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

ZHAO, N.; JIANG, Y.; ALVARADO-MORALES, M.et al. Electricity generation and microbial communities in microbial fuel cell powered by macroalgal biomass. **Bioelectrochemistry**. v. 123, p. 145-149, 2018.

ZHOU H.; HE, H.; JIN, T.; WANG, H. Power generation enhancement in novel microbial carbon capture cells with immobilized *Chlorella vulgaris*. **Journal of Power Sources**, v.214, p.216 e 219. 2012.

CAPÍTULO 2

Trabalho submetido do periódico

BRAZILIAN JOURNAL OF DEVELOPMENT (B2)

SEQUESTRO DE CARBONO E GERÇÃO DE BIOENERGIA POR *CHLORELLA VULGARIS*

Carbon sequestration and generation of bioenergy by *Chlorella vulgaris*

Davi de Lima Cavalcanti

Doutorando em Ciências Biológicas -UFPE, Av. Prof. Moraes Rego 1235, Recife, 50670-901 PE, Brasil. Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, 50050-900 Recife/PE, Brasil. E-mail: davicavalcanti25@gmail.com

João G. R. B. de Melo

Graduação em Engenharia Química, Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, 50050-900 Recife/PE, Brasil. E-mail: jgrbm66@gmail.com

Paulo Henrique da Silva

Doutorado em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia-Renorbio, UFRPE, 52171-900, Recife, PE, Brasil. Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, 50050-900 Recife/PE, Brasil. E-mail: phenriquedasilva@yahoo.com

Alexandre D'Lamare Maia de Medeiros

Doutorado em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia-Renorbio, UFRPE, 52171-900, Recife, PE, Brasil. Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais, Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, 526 - Boa Vista, 50050-900 Recife/PE, Brasil. E-mail: alexandreclamare@gmail.com

Lucas de Albuquerque Rosendo

Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais, Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, 526 -

Boa Vista, 50050-900 Recife/PE, Brasil. E-mail: lucas.albuosendo@gmail.com

Camilo Enrique La Rotta Hernández*

Doutor em Ciências - Bioquímica Instituto de Química da UFRJ, RJ-Brasil
Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, UNICAP, Rua do Príncipe,
526 – Boa Vista, 50050-590 Recife/PE, Brasil. *Present address: External Senior Consultant -
Colombia- E.mail: camilolarotta2015@gmail.com

Galba Maria. de Campos-Takaki

Doutora em Microbiologia e Imunologia pela UNIFESP/Newcastle, Inglaterra
Professora Titular de Engenharia Química, Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e
Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, Rua do Príncipe, 526 – Boa Vista,
50050-590 Recife/PE, Brasil. *Corresponding author: E-mail: galba_takaki@yahoo.com.br

DOI:

Recebimento dos originais:

Aceitação para publicação:

Abstract

The increasing levels of carbon dioxide in the atmosphere, due to the consumption of fossil fuels, is the main cause of man-made greenhouse effect, thus, global warming and all sort problems associated to it. To solve those questions, researchers from different countries are developing new and more sustainable technologies and products. Among these techniques, the production of biofuels using new sources is relevant. In Brazil, ethanol obtained from sugarcane it is the most produced and used biofuel by local population. To produce enough ethanol to meet the Brazilian's demand, large crop areas are required, reducing the available space for growing food crops. An option to conventional raw materials is the employment of microalgae such as *Chlorella vulgaris*, that can remove and assimilate large amounts of CO₂ from atmosphere, producing a high-starch biomass, which can be used to produce ethanol. In addition, other possible application of these microalgae is as biological catalyst Photosynthetic Fuel Cell (PFC) system in the cathode of a microbial fuel cell, designed to produce clean energy. In this paper, the microalgae *Chlorella vulgaris* was applied in an

electrochemical system to generate electricity, with maximum value of V_{\max} 244mV.cm⁻². *C. vulgaris* It's also an efficient carbon sink, absorbing 3.5 mg.L⁻¹ CO₂ after 10 days of growing. The biomass composed by 40% starch, which shows potential use of these microalgae to produce clean energy and biofuels.

Keywords: Microalgae, Bioenergy, Fuel Cells, Biocathodes.

Resumo

O aumento dos níveis de dióxido de carbono na atmosfera, devido ao consumo de combustíveis fósseis, é a principal causa do efeito estufa antrópico, portanto, o aquecimento global e todos os problemas a ele associados. Para resolver essas questões, pesquisadores de diferentes países estão desenvolvendo tecnologias e produtos novos e mais sustentáveis. Dentre essas técnicas, a produção de biocombustíveis a partir de novas fontes é relevante. No Brasil, o etanol obtido da cana-de-açúcar é o biocombustível mais produzido e utilizado pela população local. Para produzir etanol suficiente para atender a demanda brasileira, grandes áreas de cultivo são necessárias, reduzindo o espaço disponível para o cultivo de alimentos. Uma opção às matérias-primas convencionais é o emprego de microalgas como a *Chlorella vulgaris*, que pode remover e assimilar grandes quantidades de CO₂ da atmosfera, produzindo uma biomassa com alto teor de amido, que pode ser utilizada para a produção de etanol. Além disso, outra possível aplicação dessas microalgas é como catalisador biológico de célula a combustível fotossintética (PFC) no cátodo de uma célula a combustível microbiana, projetada para produzir energia limpa. Neste trabalho, a microalga *Chlorella vulgaris* foi aplicada em um sistema eletroquímico para geração de energia elétrica, com valor máximo de V_{\max} 244mV.cm⁻². *C. vulgaris* Também é um sumidouro de carbono eficiente, absorvendo 3,5 mg.L⁻¹ de CO₂ após 10 dias de crescimento. A biomassa composta por 40% de amido, o que mostra potencial de uso dessas microalgas na produção de energia limpa e biocombustíveis.

Palavra-chave: Microalgas, bioenergia, Células a combustível, Biocátodo.

1. Introduction

The world population has grown exponentially in recent decades now reaching 7.7 billion people. This increase leads to a constant and growing need for energy, and our global energy matrix are fossil fuels. One of the challenges that this type of energy entails is due to its scarcity, besides its exploitation, refining, transport and use causes great damage to the environment, releasing tons of gases that aggravate the greenhouse effect including the main one, carbon dioxide (GONZÁLEZ BARRIUSO et al. 2019)

Thus, various technologies aimed at replacing this type of energy have been created and studied, such as Fuel Cells (FC), which convert the energy of chemical transformations into electrical energy. But this technology has a high cost. In order to reduce operating costs, new configurations of this equipment have been developed, replacing high cost components such as platinum used in traditional FC with materials of biological origin as microorganisms, being this type called Microbial Fuel Cells (MFC). These microorganisms are used as electron acceptors in their compartments, reducing the costs.

2. Materials and methods

2.1 Microorganism

The green microalgae *Chlorella vulgaris* was collected in Araçá Lagoon, located at Recife city, Pernambuco, Brazil. The microorganism was maintained in photosynthetic medium.

2.2 Photosynthetic growth conditions of *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris microalgae was grown according to the methodology described by La Rotta Hernández et al. (2014) and modified by Cavalcanti et al., (2015), using mineral medium with a Carbon:Nitrogen ratio of 0.104:4.12 g.L⁻¹ (Table 1), in 500 ml Chamber until reached a density of 3x10³ cel.ml⁻¹, the suspension was centrifuged, resuspended in distilled water, centrifuged again and resuspended in the mineral Erlenmeyers flasks incubated at constant aeration at room temperature (25 °C) and photoperiod lighting of 12 h - 12h (light/dark). The cells were counted in a Neubauer.

Table 1 - Composition of the mineral medium used in experiments to growth *Chlorella vulgaris*.

| Components | Amount | Unit |
|--|-------------------------|------|
| K₂HPO₄ | 75 x 10 ⁻⁶ | g.L |
| KH₂PO₄ | 1,75 x 10 ⁻⁶ | g/L |
| MgSO₄ | 75 x 10 ⁻⁶ | g/L |
| Urea | 1,16 x 10 ⁻⁶ | g/L |
| CaCl₂ | 25 x 10 ⁻⁶ | g/L |
| NaCl | 25 x 10 ⁻⁶ | g/L |
| EDTA | 0,5 x 10 ⁻⁶ | g/L |
| KOH | 3,1 x 10 ⁻⁶ | g/L |
| FeSO₄ | 498 x 10 ⁻⁶ | g/L |
| H₃BO₃ | 0,7 x 10 ⁻⁶ | g/L |
| ZnSO₄ | 706 x 10 ⁻⁶ | g/L |
| MnCl₂ | 116 x 10 ⁻⁶ | g/L |
| CuSO₄ | 126 x 10 ⁻⁶ | g/L |
| Co(NO₃)₂ | 0,4 x 10 ⁻⁶ | g/L |
| (NH₄)₂MoO₄ | 0,96 x 10 ⁻⁶ | g/L |
| H₂SO₄ | 1 x 10 ⁻⁷ % | v/v |

2.3 Carbon Dioxide Consumption

The experiments were performed in triplicate in a 500 ml conical flask where the culture medium was saturated with air for two hours to dissolve the carbon dioxide in the culture medium and measured with the Alfakit Compact Kit© quantification kit for CO₂. Immediately after saturation, the pre-inoculum was added at a concentration of 3x10³ cel.mL⁻¹. Aeration was turned off and cultivation was done under lighting and static so that more CO₂ was added later to the measurement. The dissolved carbon dioxide in the culture medium was quantified by taking 10 mL daily aliquots of the culture medium for 10 days, obtaining the results in mg.L⁻¹ of CO₂.

2.4 Starch Analysis

The amount of starch was measured according to the methodology proposed in Appenroth et al. (2010), which is based on a colorimetric method, where 200 mg of fresh biomass is homogenized in 4mL of 18% HCl. The suspension was stirred for 1 hour at 5°C and centrifuged for 20 min at 5000 rpm. An aliquot is mixed with the same volume of lugol solution (0.5% w/v KI and 0.25% w/v I₂ in water) and the absorbance at 605 and 530 nm is measured. The amount of starch per fresh weight (S) in % w/w was calculated as follows on equation 1.

$$S = \frac{Cs \cdot Vol(ext)}{Fw} \cdot 100 \quad (1)$$

$$Cs = \frac{A605}{0.078 \cdot (P+4.463)} \quad (2)$$

$$P = \frac{7.295 \cdot \frac{A605}{A530 - 4.463}}{(7.757 - 0.729) \cdot \frac{A605}{A530}} \quad (3)$$

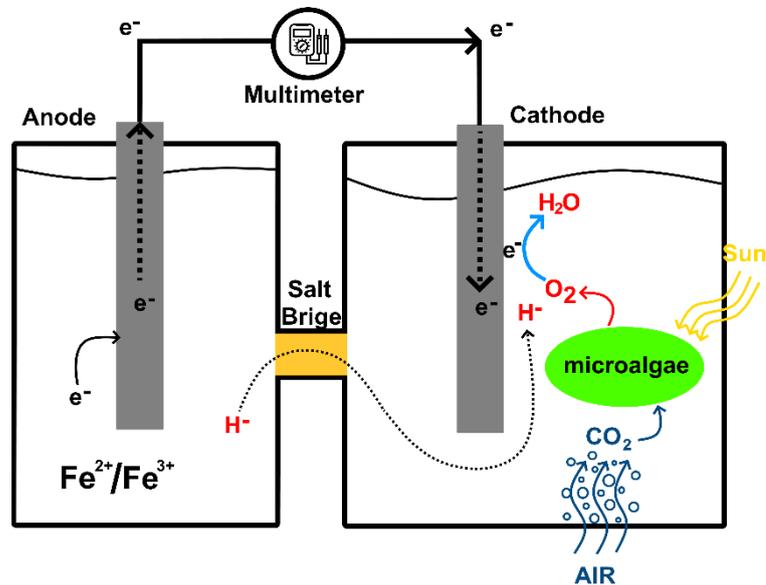
“Cs” in equations 1 and 2, is the starch concentration in (µg,mL⁻¹). “P” in equations 2 and 3, is the amylose fraction in %. “Vol(ext)” in equation 1, is the volume of the microalgae extract

after homogenization in (mL). Fw in equation 1, is the fresh weight of biomass (mg). A605 and A530 are the absorbance at 605 nm and 530 nm respectively.

2.5 Photosynthetic Fuel Cell Configuration

A two-compartment photosynthetic fuel cell was used. As shown in Figure 1, the *Chlorella vulgaris* was inoculated into a 1L cathode compartment containing an exploded graphite plate electrode with an area of 660 cm² immersed in the mineral culture medium with an initial cell density of 3x10³ cel.mL⁻¹. The 1L Anode is composed of an exploded graphite plate electrode immersed in a potassium ferrocyanide solution at 20 mmol/L. And as a cation/ion exchange system, a 5 cm salt bridge was used with 3M KCl on agar connecting the two compartments.

Figure 9 - Schematic Photosynthetic Fuel Cell using microalgae *Chlorella vulgaris*.



Source: Authors, 2020.

2.6 Chronovoltametric Analysis

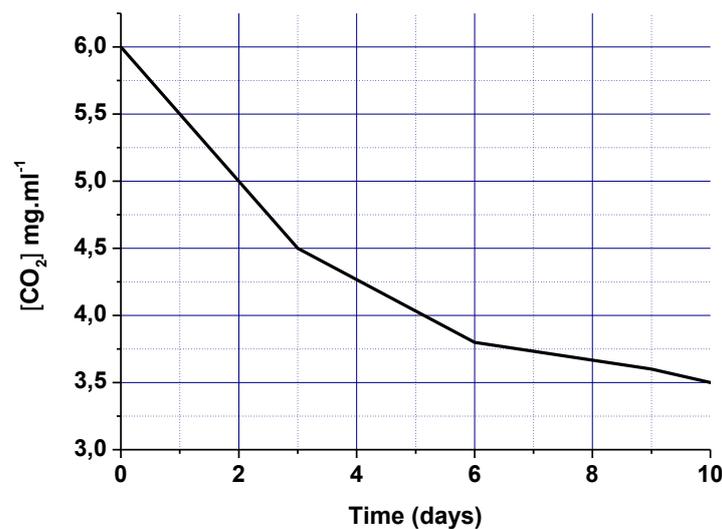
The chronovoltammetry was recorded using a Fluke 8080 multimeter with Flukeview® data acquisition software (Fluke Corporation, USA). The chronovoltammetry data were obtained as a graph of potential in $V.cm^{-2}$ by time in days.

3. Results and Discussion

3.1 CO₂ Consumption

The consumption of carbon dioxide by green microalgae *Chlorella vulgaris* was followed during ten days of experiments, where it was observed that the concentration of carbon dioxide decreased with a maximum consumption at the end of the experiment of 3.5 mg.ml^{-1} , as shown in the Figure 2, with an average daily consumption. 0.35 mg.ml^{-1} of CO₂. Microalgae are known to be responsible for the fixation of more than half of the carbon dioxide in the atmosphere, and green microalgae such as *C. vulgaris* have a high fixation capacity and are therefore very useful for use in biotechnological processes that are involve photosynthetic metabolism, as in MFCs aimed at energy generation (SINGH et al. 2014; MOTIE & ASSAREH et al. 2020)

Figure 10 - Declining CO₂ amount in the Photosynthetic Fuel Cell for 10 Days.



Source: Authors, 2020.

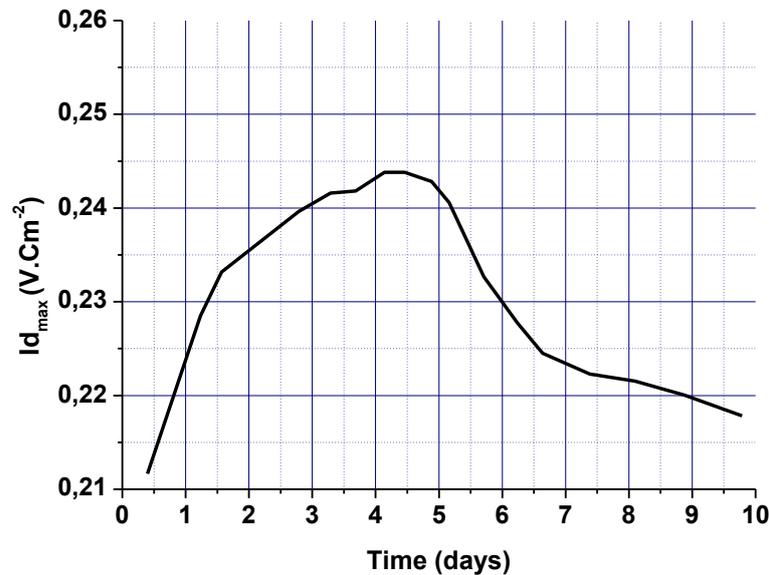
3.2 Biomass Analysis

Cell growth was quite satisfactory reaching a weight of 200 mg at the end of the experiment, showing a good adaptation of the microalgae to the culture conditions, resulting in a good starch accumulation, its reserve carbohydrate. Analyzing the microalgae biomass at the end of the experiment showed a good starch accumulation, about 40% of its dry weight. It is estimated that to produce 1 kg of microalgae biomass, it is necessary to fix about 1.83 kg of carbon dioxide. (JIANG et al, 2013., SINGH et al. 2013., CHEAH et al 2015). Starch accumulation is related to its photosynthetic capacity which is increased by the fact that *Chlorella vulgaris* has a higher concentration of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase (RuBisCO) enzyme in a cell structure called pyrenoid. (SAFI et al 2014). Due to the ability of *C. vulgaris* microalgae to accumulate carbohydrates such as starch, it also has an excellent lipid accumulation, being viable for the production of biofuels such as ethanol and biodiesel, as well as having a nutritional value because they also have a good amount of protein, vitamins and some minerals, thus considered a great food supplement (SCHENK, 2008.; CELOKA-EBOKA & AHLUWALIA, 2019).

3.3 Cronovoltametry

At the end of the ten-day experiment, the photosynthetic fuel cell had a maximum potential generation of 0.244 V.cm^{-2} . However, due to its sudden decay after the fifth day, the same approach as Cui et al. (2014) could be adopted, with the replacement of culture medium during the fifth day ensuring greater durability in the generation of electric potential. According to Baicha et al. (2016) the maximum potential of PFC was similar to that of some microalgae such as *Spirulina platensis*, but optimization conditions must be adopted so that the energy potential of this cell has a significant increase, and the author Baicha et al. (2016) also demonstrates higher potentials for PFCs with *Chlorella vulgaris*. Different anode conformations present changes in potential. Varied anodic structures should be tested to optimize the energy potential of the photosynthetic fuel cell, since models integrating a biotic anode degrading organic matter releasing ions and electrons present a large energy generation that can treat polluted effluents lowering the cost of the cell and increasing its life ecological value (LEE et al. 2015; SEDVA et al. 2019; KUSMAYADI).

Figure 11 - Cronovoltametry of the Photosynthetic Fuel Cell during 10 days.



Source: Authors, 2020.

4. Conclusions

The results obtained in this work demonstrate the great potential of Photosynthetic Fuel Cells as an ecologically viable alternative to the current energy model. Thus, proving that a microalgae cathode such as electron acceptors can effectively replace traditional materials used in traditional FCs such as platinum. It was also possible to verify that the microalgae *C. vulgaris* has a great ability to sequester carbon dioxide, fixing it and converting it into rich biomass in compounds of added commercial value such as starch, which can be used in human food and also in production. of biofuels like ethanol. However, more studies are needed to improve the power generation potential of PFCs.

5. Acknowledgments

This work was financially supported by Higher Education Personnel Improvement Coordination (CAPES), National Counsel of Technological and Scientific Development - CNPq (Nr.314422/2018-8), Support Foundation Science and Technology Pernambuco-FACEPE (Nr.IBPG-0557-2.12/17fellowship) and We are also grateful to the Nucleus of

Research in Environmental Sciences and Biotechnology (NPCIAMB), Catholic University of Pernambuco.

REFERENCES

- APPENROTH K. J., KRECH K., KERESZTES A., FISCHER W., & KOLOCZEK H. Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation, **Chemosphere**, v.78, p.216-223, 2010.
- BAICHA Z., SALAR-GARCÍA M. J., ORTIZ-MARTÍNEZ V. M., HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ F. J., DE LOS RÍOS A. P., LABJAR N., LOTFI E., ELMAHI M. A critical review on microalgae as an alternative source for bioenergy production: A promising low cost substrate for microbial fuel cells, **Fuel Processing Technology**, v.154, p.104-116, 2016.
- CAVALCANTI, D.L.; SILVA, P.H.; PERES, S.; LA ROTTA, C.H.; CAMPOA-TAKAKI, G.M. Sequester of CO₂ and power generation in Photosynthetic Fuel Cells of *Chlorella vulgaris*. **International Journal Innovative Research in Engineering & Management**, v.2, 2015.
- CELOKA-EBOKA A., WAPWA J. K., MAROA S. Biomass for CO₂ Sequestration, **Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials**, v.1, p.4252, 2019.
- CHEAH W.Y., SHOW P.L., CHANG J-S., LING T. C., JUAN J. C. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae, **Bioresource Technology**, v.184, p.190–201, 2015.
- CUI Y., RASHID N., HU N., REHMAN M. S. U., HAN J. I. Electricity generation and microalgae cultivation in microbial fuel cell using microalgae-enriched anode and biocathode, **Energy conversion and management**, v.79, p.674-680. 2014.
- DVORETSKY D., DVORETSKY S., TEMNOV M., TUGOLUKOV E., AKULININ E., GOLUBYATNIKOV O., USTINSKAYA Y., ESKOVA M. The Study of the Lipid Extraction Process for the Production of Third-Generation Biofuel from the Pre-Treated Microalgae *Chlorella Vulgaris* Biomass, **Chemical Engineering**, v.74, p.73-78, 2019.
- GONZÁLEZ BARRIUSO M., PESQUERA GONZÁLEZ C., GONZÁLEZ MARTÍNEZ F., YEDRA MARTÍNEZ Á., BLANCO DELGADO C.CO₂ capture by amino-functionalized graphene oxide, **Chemical Engineering**, v.75, p.637-342, 2019.

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

KAMYABA H., LEEB C. T., CHELLIAPANA S., KHADEMIC T., TALAIEKHOZANID A., REZANIAE S., 2019, Role of Microalgal Biotechnology in Environmental Sustainability-A Mini Review, **Chemical Engineering**, v.72, p.451-456, 2019.

KUSMAYADI, A.; LEONG, K.Y.; YEN, HONG-WEI; HUANG, CHI-YU; DONG, CHENG-DI; CHANG, JO-SHU. Microalgae-microbial fuel cell (mMFC): an integrated process for electricity generation, wastewater treatment, CO₂ sequestration and biomass production. **International journal Energy Research**, v.44, p.9254-9265, 2020.

LA ROTTA HERNÁNDEZ C. E., LEITE A. L., DANTAS P. V., RAMOS S. P., DE LOS ANGELES PEREZ M., TAKAKI G. M. C. Hybrid Microbial-Photosynthetic Biofuel Cells for Simultaneous Bacterial Glycerol Biotransformation and Algal Carbon Dioxide Capture, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.25, p. 560-571, 2014.

LEE DUU-JONG, CHANG JO-SHU, LAI JUIN-YIH. Microalgae–microbial fuel cell: a mini review, **Bioresource technology**, v.198, p.891-895, 2015.

MOTIE M., ASSAREH M. CO₂ sequestration using carbonated water injection in depleted naturally fractured reservoirs: A simulation study, **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v.93, 2020.

SAFI C., ZEBI, B., MERAH O., PIERRE-YVES P., VACA-GARCIA C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.35, p.265–278, 2014.

SCHENK P.M., THOMAS-HALL S.R., STEPHENS E., MARX U., MUSSGNUMG J.H. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production, **Bioenergy Resources**, v.1, p.20–43, 2008.

SEVDA S., GARLAPATI V. K., SHARMA S., BHATTACHARYA S., MISHRA S., SREEKRISHNAN T. R., PANT, D. Microalgae at niches of bioelectrochemical systems: A new platform for sustainable energy production coupled industrial effluent treatment, **Bioresource Technology Reports**, v.7, p.100290, 2019.

SINGH, S. P.; SINGH, PRIYANKA. Effect of CO₂ concentration on algal growth: a review, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.38, p.172-179, 2014.

SINGH, UDAY BHAN & AHLUWALIA, AMRIK. Microalgae: A promising tool for carbon sequestration, **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v.18, p.73-95, 2013.

ZHANG Y., LI, M., ZHO M., YANG H., LIANG L., GU, T. Microbial fuel cell hybrid systems for wastewater treatment and bioenergy production: synergistic effects, mechanisms and challenges, **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.103, p.13-29, 2019.

CAPÍTULO 3

Trabalho submetido do periódico

BIOMOLECULES (A1)

GERAÇÃO DE ENERGIA FOTOSSINTÉTICA POR *CHLORELLA VULGARIS* E ACUMULAÇÃO DE LIPÍDIOS E AMIDO INDUZIDO POR CONDIÇÃO LIMITANTE DE NITROGÊNIO E FÓSFORO

Davi L. Cavalcanti¹, Paulo H. da Silva², Dayana Montero Rodriguez,³ Rosileide Fontenele da Silva Andrade⁵, Camilo Enrique La Rotta Hernández^{4*}, Galba M. de Campos-Takaki⁵

¹Doutorado em Ciências Biológicas -UFPE, Recife, 50670-901 PE, Brasil. Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco. 50050-900 Recife/PE, Brasil. E-mail: davicavalcanti25@gmail.com

²Doutorado em Biotecnologia pela Rede Nordeste de Biotecnologia-Renorbio, UFRPE, 52171-900, Recife, PE, Brasil. Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-900 Recife/PE, Brasil. E-mail: phenriquedasilva@yahoo.com

⁴Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, UNICAP, , 50050-590 Recife/PE, Brasil. *Present address: External Senior Consultant -Colombia- E.mail: camilolarotta2015@gmail.com

⁵Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, , 50050-590 Recife/PE, Brasil. E-mail: galba_takaki@yahoo.com.br

RESUMO

A demanda por energia vem crescendo a cada ano devido ao aumento da população mundial. Grande parte desta energia é proveniente de fontes não renováveis como o petróleo. Por esta razão novas fontes de energias limpas e renováveis vêm sendo desenvolvidas. Entre elas destacam-se as células a combustível, que convertem energia química em eletricidade. Porém, esta tecnologia possui um alto custo. Visando diminuir os custos novas configurações destas células vêm sendo desenvolvida como a célula a combustível fotossintética, que utiliza micro-organismos fotossintéticos no compartimento catódico, substituindo catalizadores químicos e tornando essa tecnologia economicamente viável. No presente estudo a microalga

Chlorella vulgaris foi utilizada como aceptora de elétrons em um compartimento catódico de uma célula a combustível microbiana e submetida a diferentes condições de cultivo, modificando seu tempo de iluminação, aeração tipos de fontes de nitrogênio (Uréia e Nitrato de Sódio) e as concentrações de nitrogênio e fósforo meio de cultivo seguindo um planejamento fatorial completo 2^2 , durante 20 dias. Os resultados demonstraram que nas condições de crescimento A1, a microalga obteve o melhor resultado na acumulação de amido, obtendo 36% e a relação entre as concentrações limitantes de fósforo e nitrogênio influenciaram na acumulação dos lipídios, produzindo 66% o acúmulo nas células da microalga, além de proporcionar um crescimento mais acelerado o que permitiu um aumento na geração de eletricidade, alcançando picos de $I_d=250 \text{ mA/Cm}^2$ e uma eficiência coulômbica de $CE=63\%$, demonstrando a eficácia do protótipo e o potencial da biomassa residual para a fabricação de biocombustíveis.

Palavras-chave: Biocátodo, Microalgas, Energia Limpa, Lipídio, Amido.

1. Introdução

A dependência energética do mundo moderno vem crescendo exponencialmente com o aumento da população mundial que já ultrapassa os 7 bilhões de pessoas. Porém, cerca de 80% de toda a energia utilizada atualmente vem de combustíveis fósseis. Por serem vastamente utilizados, os combustíveis fósseis são uma das principais causas de poluição do meio ambiente, onde seu transporte, armazenamento causam poluição do solo e da água e sua combustão liberar gases tóxicos como o dióxido de carbono, que é um dos principais gases agravantes do aquecimento global (ESPINASA et al, 2017; GENCO, T.S, 2017; JIHONG CHEN et al, 2018; PAL, D. & MITRA, K.S. 2018).

No Brasil, além da utilização dos combustíveis fósseis, uma das principais fontes energéticas são as usinas hidroelétricas que geram eletricidade para todo o país. Este tipo de energia tem a desvantagem que para ser implantada necessita da geração de gigantescos lagos artificiais, que inundam e destrói parte da biodiversidade local. Além da matéria orgânica que se acumula e se decompõem no fundo dos lagos das usinas liberarem grandes quantidades de dióxido de carbono e metano contribuindo com a poluição atmosférica (KAUNDA et al 2012; PAGNUSSATT et al 2018).

Visando criar alternativas mais sustentáveis, pesquisadores vem desenvolvendo equipamentos capazes de gerar energia elétrica através de reações químicas. A estes

equipamentos dá-se o nome de Células a Combustível (CC) (DUIC et al 2013; SAADABADI et al 2018). Porém esta tecnologia ainda encontra-se em desenvolvimento e os insumos utilizados em sua construção ainda são caros, tornando sua implantação em larga escala bastante onerosa. Visando substituir tais insumos como, vem se desenvolvendo o modelo de Célula a Combustível Microbiana (CCM), que utiliza micro-organismos para substituir a utilização de materiais de alto custo e gerar energia através do metabolismo microbiano. Dentro desta classe das CCM existem também as Células a Combustível Fotossintéticas (CCF) que utiliza o metabolismo de organismos fotossintetizantes como a *Chlorella vulgaris* para gerar eletricidade. A grande vantagem desse modelo é que os organismos fotossintetizantes utilizam fontes de carbono inorgânicos como o CO₂ para realizar seus processos metabólicos servindo como acceptor de elétrons em biocátodos gerando assim energia (ANTONOPOULO, et al., 2010). Outra vantagem de se utilizar este modelo é que a biomassa gerada como resíduo é rica em várias substâncias de valor econômico agregado, entre elas estão os lipídios que podem servir para produção de suplementos alimentares, cosméticos ou até mesmo o biodiesel que é uma alternativa a utilização de petroderivados.

O presente estudo aprimorou um modelo de CCF com cátodo de *Chlorella vulgaris* melhorando as condições de cultivo e assim potencializando a geração de energia elétrica e utilizando a biomassa oriunda da geração de energia para produzir biodiesel de microalga (VELJKOVIĆ et al, 2018; CHEN et al, 2018).

2. Materiais e métodos

2.1. Cultura Fotossintética

A microalga *Chlorella vulgaris* foi cultivada segundo a metodologia modificada de La Rotta 2014 em meio mineral com uma relação C:N = 0,104 : 4,12 g/L⁻¹, em Erlenmeyers de 500 ml com aeração constante, onde foram cultivadas sob temperatura ambiente (25° C) e iluminação com fotoperíodo de 12 h – 12h (claro / escuro).

2.2. Seleção da Melhor Condição de Cultivo

A melhor condição de cultivo da microalga visando a sua melhor produtividade tanto em quantidade de biomassa (g/L), quanto em quantidade de lipídios armazenado (%) foi realizado testando combinações diferente de cultivo, variando o tipo de metabolismo realizado pela microalga (Autotrófico, Quimiotrófico e Heterotrófico), o tempo de iluminação (com ou sem iluminação), o tipo de aeração (contínua ou descontínua), fonte de carbono (CO₂ e Glicerol) e tipo de fonte de nitrogênio (Nitrato ou Ureia). As combinações entre as condições estão dispostas na tabela 3.

Table 2 - Variações de condições de cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* para produção e acúmulo de lipídios.

| Ensaio | Tipo de Cultura | Iluminação | Aeração | Fonte de Carbono | Fonte de Nitrogênio |
|-----------|-----------------|------------|---|------------------|---------------------|
| A | Autotrófica | Sim | Contínua | CO ₂ | Não |
| A1 | Autotrófica | Sim | Contínua | CO ₂ | Ureia |
| A2 | Autotrófica | Sim | Contínua | CO ₂ | Nitrato |
| B | Autotrófica | Sim | Descontínua (Saturação de O ₂) | CO ₂ | Não |
| B1 | Autotrófica | Sim | Descontínua (Saturação de O ₂) | CO ₂ | Ureia |
| B2 | Autotrófica | Sim | Descontínua (Saturação de O ₂) | CO ₂ | Nitrato |
| C | Quimiotrófica | Não | Contínua | CO ₂ | Não |
| C1 | Quimiotrófica | Não | Contínua | CO ₂ | Ureia |
| C2 | Quimiotrófica | Não | Contínua | CO ₂ | Nitrato |
| D | Quimiotrófica | Não | Descontínua (Saturação de O ₂) | CO ₂ | Não |
| D1 | Quimiotrófica | Não | Descontínua (Saturação de O ₂) | CO ₂ | Ureia |
| D2 | Quimiotrófica | Não | Descontínua (Saturação de O ₂) | CO ₂ | Nitrato |
| E | Heterotrófica | Sim | Não | Glicerol | Não |
| E1 | Heterotrófica | Sim | Não | Glicerol | Ureia |
| E2 | Heterotrófica | Sim | Não | Glicerol | Nitrato |

| | | | | | |
|-----------|---------------|-----|-----|----------|---------|
| F | Heterotrófica | Não | Não | Glicerol | Não |
| F1 | Heterotrófica | Não | Não | Glicerol | Ureia |
| F2 | Heterotrófica | Não | Não | Glicerol | Nitrato |

A partir da melhor condição as células foram contadas em Câmara de Neubauer até alcançarem uma densidade de 3×10^3 Cél/ml⁻¹, a suspensão foi centrifugada, ressuspensa em água destilada, centrifugada novamente e ressuspensa no meio mineral utilizado no compartimento catódico da CCF. O cátodo foi sob as mesmas condições de cultivo da melhor condição obtida.

2.3. Planejamento Fatorial Completo

Os experimentos obedeceram a um planejamento fatorial de 2^2 com 8 ensaios e 4 repetições no ponto central com o objetivo de avaliar a influência das variáveis independentes concentração de nitrogênio (g/L⁻¹) e concentração de fósforo (g/L⁻¹) sobre a variável resposta acúmulo de lipídio. As variáveis e seus níveis estão codificados da seguinte maneira: Concentração de Fosforo - Níveis Inferior (-) = 1,3g/L⁻¹ Superior (+) = 5,3g/L⁻¹, Ponto central (0) = 3,3g/L⁻¹. Concentração de Nitrogênio [N2] - Níveis Inferior (-) = 2,6 g/L-1, Superior (+) = 8,24 g/L-1, Ponto central (0) = 5,42 g/L-1. Estes dados estão de acordo com a tabela 4.

Table 3 - Matriz experimental do planejamento fatorial 2^2

| Ensaio | g/L ⁻¹ | |
|----------|-------------------------|----------------------------|
| | Concentração de Fosforo | Concentração de Nitrogênio |
| 1 | - | - |
| 2 | - | + |
| 3 | + | - |
| 4 | + | + |
| 5 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 0 |
| 8 | 0 | 0 |

2.4. Consumo de Dióxido de Carbono

O dióxido de carbono foi quantificado utilizando o kit de quantificação Compact Kit® para CO₂ da Alfakit. Utilizando 10 mL do meio de cultura durante 20 dias, obtendo os resultados em mg/L⁻¹ de CO₂.

2.5. Análise do Teor de Amido

A aferição da quantidade de amido foi realizada de acordo com a metodologia proposta no artigo de APPENROTH 2010 que é baseado num método colorimétrico, onde 200 mg da biomassa fresca é homogeneizada em 4 mL de HCl a 18%. A suspensão foi agitada durante 1 hora a 5°C e centrifugada durante 20 min a 5000 g. Retira-se uma alíquota que é misturada com o mesmo volume de solução de lugol (0,5% w / v de KI e 0,25% w / v de I₂ em água) e mede-se a absorbância em 605 e 530 nm. A quantidade de amido foi calculada de acordo com a Eq. 1.

$$S = ([C_s \times \text{Vol}_{(\text{Ext})}] \times 100) / Fw \quad (1)$$

Onde $C_s = A_{605} / ((0,07757 \times P + 4,463))$, $P = ((7,295 \times A_{605} / A_{530} - 4,463)) / ((7,757 - 0,729 \times A_{605} / A_{530})) \times 100$, o $\text{Vol}_{(\text{ext})}$ = volume do extrato da alga após a homogeneização (mL), FW = peso fresco (mg).

2.6. Análise de Lipídios Totais

Antes da realização do processo de extração e quantificação dos lipídios totais, foi realizado um pré tratamento na biomassa, utilizando o método proposto por ARCHANAA et al 2012, onde a mesma foi lavada sucessivamente com acetona para a retirada da clorofila, com intuito de diminuir a interferência do pigmento nos resultados de quantificação dos lipídios.

Para determinar a porcentagem de lipídios contido nas células de microalgas, foi utilizado o método de BLIGH and DYER 1959. Utilizando 100 mg de biomassa liofilizada, realizou-se uma extração com clorofórmio e metanol e água destilada. Ao termino deste procedimento os tubos são deixados em uma capela química de exaustão para que ocorra a evaporação dos

solventes. Para calcular a porcentagem de lipídios totais utiliza-se a Eq. 2, onde T1 é o peso do tubo antes do experimento, T2 é o peso do tubo após a evaporação do solvente e B é a biomassa seca em gramas.

$$\text{Lipídios Totais (\%)} = (T2 - T1) / B \times 100\% \quad (2)$$

2.7. Configuração da CCF

Foi utilizada uma célula a combustível bicompartimentada. Um compartimento catódico de 1L, contendo um eletrodo placa de grafite explodido com área de 660 cm² imerso no meio de cultura mineral com uma densidade celular inicial de 3x10³ Cél/mL⁻¹. Ânodo de 1L, com eletrodo de placa de grafite explodido imerso em uma solução de ferrocianeto de potássio a 20 mmol/L⁻¹ e como sistema de troca catiônica foi utilizada uma ponte salina de 5 cm em ágar com KCl a 3 M ligando os dois compartimentos.

2.8. Análise de Cronoamperometria

A cronoamperometria foi gravado utilizando um multímetro Fluke 8080 com software de aquisição de dados Flukeview® (Fluke Corporation, USA). Os dados da cronovoltametria na forma de potencial, foram convertidos em densidade de corrente (Id) usando a equação da lei de Ohm (Eq. 3), uma vez que uma resistência de carga externa de 1 kΩ foi empregada.

$$I_d = E \times R \quad (3)$$

2.9. Cálculo da Eficiência Coulômbica (CE)

A eficiência coulômbica (%) foi calculada de acordo com a Eq. 4. Onde CT é a quantidade teórica que é obtida a partir de cada substrato e CR corresponde à quantidade real obtida de cada substrato e pode ser calculado pela Eq. 5.

$$CE = CR / CT \quad (4)$$

$$CT = NZF \quad (5)$$

Onde N é o número de moles do substrato, Z é o número de moles de elétrons do substrato e F é a constante de Faraday (96,485.4 C mol⁻¹).

Para uma célula a combustível microbiana, utiliza-se um modelo integrado de Id vs. Tempo, gerando a Eq. 6. Onde M é a massa molar do substrato, A= área do eletrodo, V= volume total do compartimento catódico e ΔS a concentração final do substrato (MORANT et al 2014.; CAVALCANTI et al 2015).

$$CE=(M\int_0^{t_f} Id dt A)/(FzV_{AC/CC}\Delta S) \quad (6)$$

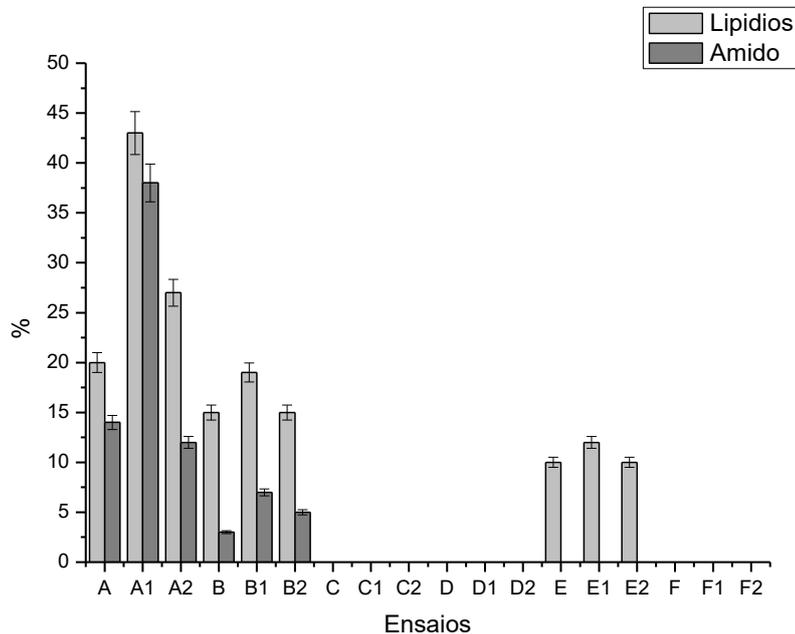
3. Resultados e discussão

3.1. Seleção da melhor condição de cultivo

A figura 13 mostra os resultados da produção de amido e lipídios obtidos após 20 dias de experimentos nas diversas condições de cultivo. Após a análise da biomassa constatou-se que o ensaio A1 se sobressaiu diante de todas as outras condições de cultivo, obtendo percentuais de acúmulo de lipídios e de amido 45% e 36% respectivamente.

Nesta condição, além das condições normais de crescimento como o CO₂ e a iluminação com fotoperíodo de 12-12h claro escuro, o meio utiliza ureia como fonte de nitrogênio, porém a mesma também é uma fonte de carbono. Assim, este acúmulo deve-se provavelmente a característica fisiológica da microalga *C. vulgaris*, que apresenta um metabolismo mixotrófico (SAFI et al 2014). Neste tipo de metabolismo a microalga além de realizar seu processo fisiológico normal que é a fotossíntese, também possui a capacidade de metabolizar outras formas de carbono como a ureia, utilizando ao máximo todos os recursos disponíveis para o crescimento e acúmulo de reservas energéticas (JIAN-MING et al 2010).

Figure 12 - Acumulação de amido e lipídios em *hlorella vulgaris* em diversas condições de cultivo.



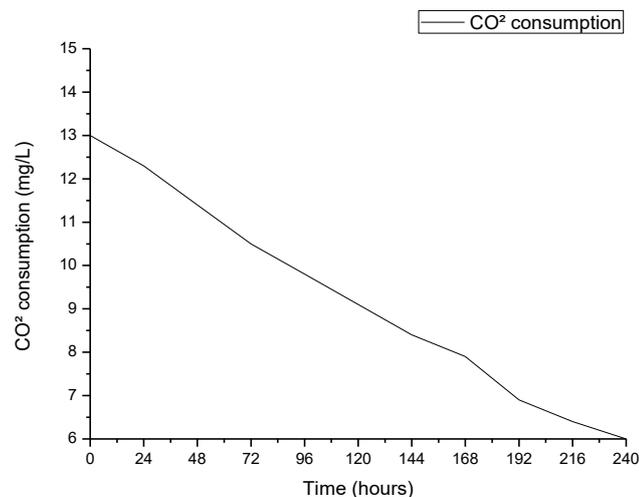
Todos os outros ensaios apresentaram acúmulo de lipídios e/ou amido, porém, suas concentrações de lipídios foram abaixo do relatado na literatura como Gifuni et al, 2018 e Lee et al 2017 em seus trabalhos de revisão sobre biorefinarias de microalgas, onde a média de acúmulo de lipídios para uma boa produção de biodiesel é de 40%. Valores abaixo deste citado, o cultivo, extração e processamento tornam-se inviáveis, pois possuem custos relativamente altos e a sua conversão em bioprodutos de interesse é baixa. Assim, o ensaio A1 foi o que apresentou condições ideais para ser utilizado em etapas de aprimoramento do acúmulo de lipídio e uso em CCF para gerar eletricidade.

3.2. Consumo de CO₂

O consumo do dióxido de carbono se manteve constante e decrescente durante os 10 de crescimento, apresentando um consumo médio diário de 0,7 mg/L/dia, alcançando um consumo total ao final do experimento de 7mg/L, demonstrando assim uma ótima capacidade de assimilação da fonte de carbono. Esta capacidade é devido a presença do pirenoide, organela citoplasmática que armazena a enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO). O pirenoide é uma organela encontrada em microalgas verdes

(chlorophitas) que armazenam grandes quantidades de da enzima RuBisCo, conferindo a estes micro-organismos uma grande capacidade de remover e fixar o CO₂ atmosférico, capacidade está bastante útil biotecnologicamente, pois propicia um grande acúmulo de materiais de reserva como o amido que é matéria prima para a produção de biocombustíveis como o bioetanol (LU WANG et al 2017., SAFI et al 2014). REHMAN, A. 2020).

Figure 13 - Consumo de dióxido de carbono pela microalga *C. vulgaris* em biocátodo de célula a combustível fotossintética.



3.3. Efeito das Condições de Cultivo No Acúmulo de Amido

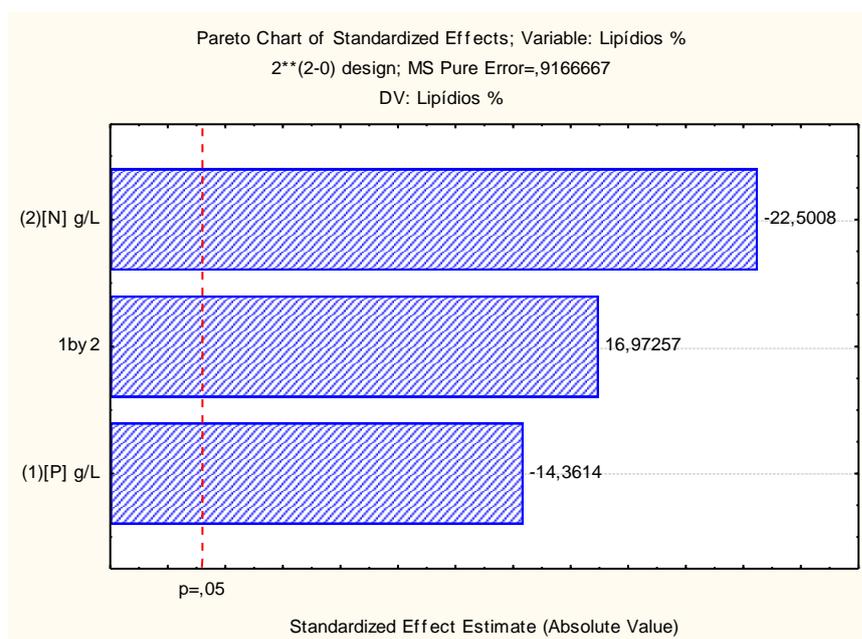
O efeito das condições de cultivo sobre o acúmulo de amido na biomassa de *Chlorella vulgaris* foi verificado utilizando a metodologia de APPENROTH 2010, onde na primeira etapa foi analisar fatores básicos para o crescimento da microalga como tempo de iluminação, tempo de aeração e fontes de carbono e nitrogênio como CO₂ e Uréia respectivamente (Tabela 3.). Constatou-se que a Condição A1 que combinava aeração contínua, iluminação com fotoperíodo 12-12h, dióxido de carbono como fonte principal de carbono e uréia como fonte de nitrogênio se mostraram bastante eficaz, permitindo um acúmulo de 35% de amido na biomassa da microalga (Figura 9.), demonstrando assim sua grande capacidade para acumular o amido como material de reserva e conseqüentemente uma fonte promissora de insumo para a produção de biocombustíveis como o etanol. Esta matéria prima de origem microalgal apresenta a grande vantagem de não competir diretamente com a produção de alimentos, além de poder ser cultivada em condições e locais inadequados para o cultivo de alimentos. (ADENLE 2013; GIFUNI et al 2018).

3.4. Efeito do Nitrogênio e Fósforo sob o Acúmulo de Lipídios

Os efeitos estimados da concentração de fósforo e nitrogênio sobre o acúmulo de lipídios totais na biomassa de *C. vulgaris* cultivadas em célula combustível fotossintética, bem como a interação entre eles, são mostrados nos diagramas de Pareto da Figura 10. Segundo Cuellar-Bermudez et al 2015, Gifune, 2018, Bekirogullari, 2020, os principais fatores que contribuem para o aumento da produção e acúmulo de materiais de reserva energética pelas microalgas são o pH, temperatura, luz e nutrientes como o fósforo e nitrogênio. Assim ao testar dois destes fatores, concentração fósforo e nitrogênio, os dois isoladamente não demonstraram estatisticamente efeito positivo no crescimento, produção e acumulação dos lipídios, ocorrendo inibição do crescimento em altas concentrações.

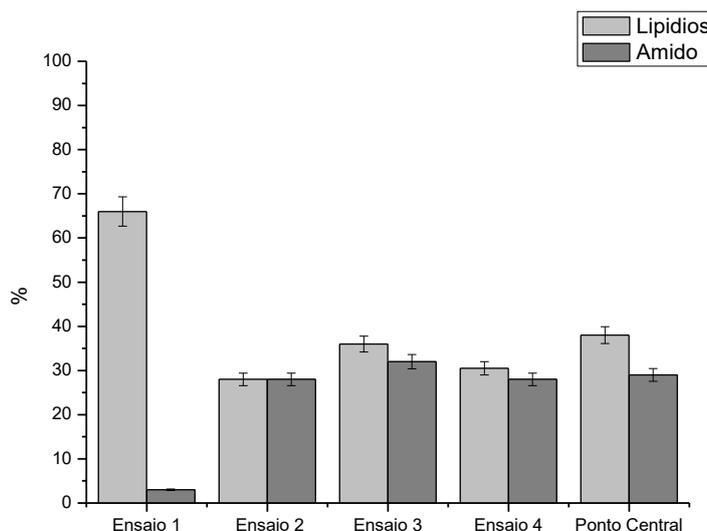
A interação entre as menores concentrações de nitrogênio e fósforo demonstrou ser ideal para a produção e acúmulo deste material de reserva, chegando a um acúmulo de 66% do peso total de sua biomassa (Figura 15), resultado este maior do que os obtidos por Huang et al 2019, que ao trabalhar em condições semelhantes de cultivo e extração de lipídios, obteve um acúmulo de lipídios totais de 44%.

Figure 14 - Diagrama de Pareto ilustrando os efeitos das interações entre as variáveis independentes, concentração de fósforo e nitrogênio sobre a variável resposta acúmulo de lipídios.



Este resultado se mostra superior aos encontrados na literatura, onde há relatos de no máximo 40% do seu peso total. Os demais ensaios apresentaram concentrações abaixo das expectativas, porém ainda assim acima dos 25%, demonstrando que o fósforo e o nitrogênio são fatores de grande importância para o crescimento da microalga e conseqüentemente na indústria, pois os nutrientes possibilitam o cultivo da mesma com maior aproveitamento deste produto na indústria dos biocombustíveis. A influência também é relatada por Sajjadi et al, 2018.; Enamala et al 2018., Gifune, 2018, Huang et al 2019., Bekirogullari, 2020 e Gouveia et al 2014, em seus estudos afirmam que dentre todos os fatores que influenciam na produção e acúmulo de substâncias de reserva como amido e lipídios, a luz junto ao fósforo e nitrogênio são os parâmetros mais importantes.

Figure 15 - Porcentagem de amido e lipídios em *C. vulgaris* cultivadas em diversas condições de cultivo seguindo o planejamento fatorial 2²



3.5. Análises Eletroquímicas

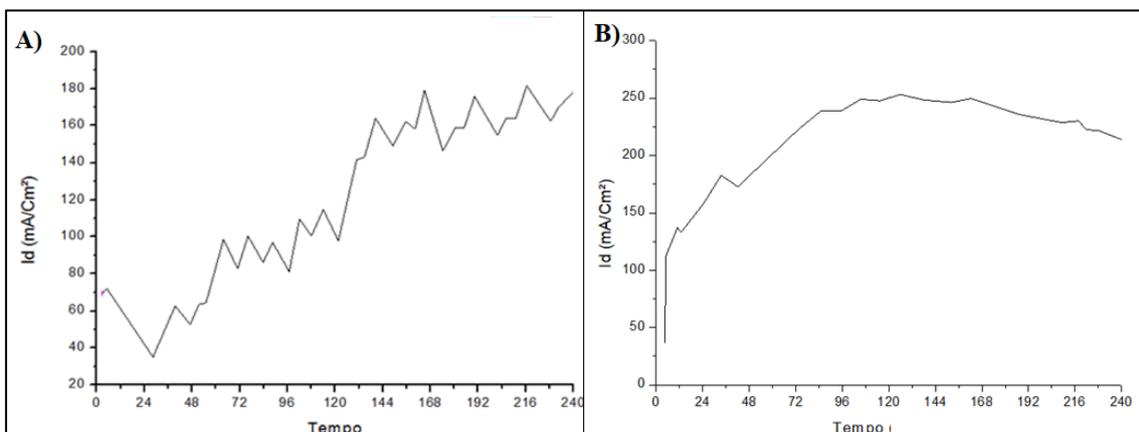
As análises de cronoamperometria foram realizadas durante dez dias de experimento na melhor condição da primeira etapa de seleção (A1) e na melhor condição do planejamento fatorial (Ensaio 1). A produção de eletricidade alcançou uma intensidade máxima de corrente (I_d) de 180 mA/Cm², enquanto a condição melhorada através do planejamento fatorial alcançou uma intensidade máxima de corrente superior, alcançando $I_d = 250$ mV/Cm². Porém, estes resultados são superiores aos obtidos por Cavalcanti et al 2015 que obteve picos de correntes de $I_d \text{ max} = 147$ mV/cm² utilizando o mesmo organismo e condições

experimentais semelhantes. Já em comparação com o trabalho realizado por Nguyen, 2020, onde o mesmo obteve intensidades de correntes de $I_d \text{ max} = 315 \text{ mV/cm}^2$, resultado este aparentemente maior, porém seu modelo de célula a combustível utilizava membrana de troca protônica que tem uma eficiência maior, porém, um custo mais elevado. Demonstrando que a configuração utilizada na célula a combustível deste trabalho é viáveis em comparações com modelos mais tradicionais e mais caros, tendo rendimentos parecidos e que ainda podem ser melhorados.

O ensaio Figura 4 (A) apresentou várias quedas ômicas durante o registro da produção de energia, porém, o ensaio Figura 4 (B) apresentou poucas quedas ômicas por ter as condições de cultivo melhoradas em relação ao ensaio Figura 4 (A). Este fenômeno deve-se a melhora na atividade fotossintética e conseqüentemente o aumento da biomassa microalgal proporcionando um melhor aproveitamento e uma constância na acepção dos elétrons no cátodo fotossintético.

No ensaio onde não houve aprimoramento nas condições de cultivo a apresentou uma eficiência coulômbica de $CE=42,5\%$, enquanto o ensaio com as condições de cultivo melhoradas alcançou $CE=63\%$, demonstrando assim possuir uma melhor aproveitamento de conversão dos componentes do meio de cultivo em elétrons.

Figure 16 - Perfil cronoamperométrico da célula a combustível fotossintética com cátodo de *C. vulgaris*. (A) Meio base, escolhido na etapa de seleção de condições de cultura A1. (B) Melhor condição no planejamento fatorial 2² para produção de lipídios.



4. Conclusões

A microalga *Chlorella vulgaris* demonstrou excelente habilidade e eficiência comoceptor final de elétrons em um protótipo de célula a combustível fotossintética, gerando níveis elevados de energia limpa, além de produzir biomassa que acumulou elevado conteúdo de lipídios, agregando valor e representando matéria-prima para a produção de biocombustíveis. A acumulação de amido pode ser empregada em outros segmentos industriais importantes, como ração animal.

5. AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Pessoal Aperfeiçoamento de Educação Superior (CAPES), Conselho Nacional de Pesquisa, Ciência e Tecnologia-CNPq (No.314422/2018-8), Fundação de Pesquisa do Estado de Pernambuco-FACEPE (No.IBPG-0557-2.12/17fellowship) e ao Núcleo de Pesquisa de em Ciências Ambientais e Biotecnologia-NPCIAMB, UNICAP.

BIBLIOGRAFIA

DENLE, A.A.; HASLAM, G.H.; LEE, L. Global assessment of research and development for algae biofuel production and its potential role for sustainable development in developing countries. **Energy Policy**. v. 61, p.182-195. 2013.

ANTONOPOULOU, G.; STAMATELATOU, K.; BEBELIS, S.; LYBERATOS, G. Electricity generation from synthetic substrates and cheese whey using a two-chamber microbial fuel cell. **Biochemical Engineering Journal**. v. 50. v. p. 10–15. 2010.

ARCHANAA, S.; MOISE, S.; SURAIHKUMAR, G.K.; Chlorophyll interference in microalgal lipid quantification through the Bligh and Dyer method. **Biomass and bioenergy**. v.46. p. 805-808. 2012.

BEKIROGULLARI, M.; FIGUEROA-TORRES, G.M.; PITTMAN, J.K.; THEODOROPOULOS, C. Models of microalgal cultivation for added-value products - A review. **Biotechnology Advances**. 2020.

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

- CAVALCANTI, D.L.; SILVA, P.H.; SÉRGIO PEREZ.; CAMILO LA ROTTA.; CAMPOSTAKAKI, G.M. Sequester of CO₂ and Power Generation in Photosynthetic Fuel Cells of *Chlorella vulgaris*. **International Journal of Inovative Research in Enginnering e Management**. v.2, 2015.
- CHEN, J.; LI, J.; DONG, W.; ZHANG, X.; TYAGI, R.D.; DROGUI, P.; SURAMPALLI, R.Y. The potential of microalgae in biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. v. 90, p. 336-346, 2018.
- DE CAPRARIIS, B., DE FILIPPIS, P., DI BATTISTA, A., DI PALMA, L., SCARSELLA, M. Exoelectrogenic Activity of a Green Microalgae, *Chlorella vulgaris*, in a Bio-Photovoltaic Cells (BPVs)” **Chemical Engineering Transactions**. v.38, p 523-528, 2014.
- DUIC, N.; GUZOVIC, Z.; KAFAROV, V.; KLEMES, J. J.; MATHIESSEN, B.V.; YAN, J. Sustainable development of energy, water and environment systems. **Applied Energy**, v.101, p. 3–5. 2013.
- ENAMALA,M.K.; ENAMALA, S.; CHAVALI,M.; DONEPUDI,J.; YADAVALLI,R.; KOLAPALLI,B.; ARADHYULA,T.V.; VELPURI,J.; KUPPAM,C. Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.94, p.49-68. 2018.
- ESPINASA, R.; HORST, E.; REYES, S.G.; MANZANO, O.; MOLINA, G.; RIGOBON, R. A micro-based model for world oil Market. **Energy Economics**. v.66, p. 431-449, 2017.
- GENC, T.S. OPEC and demand response to crude oil prices. **Energy Economics**. v.66, p.238-246, 2017.
- GIFUNI, I.; OLIVIERIA, G.; POLLIO, A.; MARZOCHELLA, A. Identification of an industrial microalgal strain for starch production in biorefinery context: The effect of nitrogen and carbon concentration on starch accumulation. **New Biotechnology**. v. 41, p. 46-54, 2018.
- GIFUNI, I.; POLLIO, A.; SAFI, C.; MARZOCHELLA, A.; OLIVIERI, G. Current Bottlenecks and Challenges of the Microalgal Biorefinery. **Trends in Biotechnology**.v.21, 2018

GOUVEIA, L.; NEVES, C.; SEBASTIÃO, D.; NOBRE, B.P.; MATOS, C.T. Effect of light on the production of bioelectricity and added-value microalgae biomass in a Photosynthetic Alga Microbial Fuel Cell. **Bioresource Technology**, v. 154, p. 171–177. 2014.

JIAN-MING; LI-HU; XIN-HUA, C.; ZHANG, X.L.; HUAN-LIN, C. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. **Bioresource Technology**. v.101, p. 6797-6804, 2010.

JIHONG CHEN.; WEIPAN ZHANG.; SIFAN LI.; FANGWEIZ HANG.; YUHUA ZHU.; XIAOLING HUANG. Identifying critical factors of oil spill in the tanker shipping industry worldwide. **Journal of Cleaner Production**. v. 180, p.1-10, 2018.

KAUNDA, S.C.; KIMAMBO, C.Z.; NIELSEN,T.K. Hydropower in the Context of Sustainable Energy Supply: **A Review of Technologies and Challenges**. v. 2012, p 15. 2012.

LU WANG.; XIURONG CHEN.; HUALIN WANG. et al. *Chlorella vulgaris* cultivation in sludge extracts from 2,4,6-TCP wastewater treatment for toxicity removal and utilization. **Journal of Environmental Management**. v. 187, p. 146–153. 2017.

NGUYEN, H. MIN, B. Using multiple carbon brush cathode in a novel tubular photosynthetic microbial fuel cell for enhancing bioenergy generation and advanced wastewater treatment. **Bioresource Technology**. v. 316, 2020.

PAGNUSSATT, D.; PETRINI, M.; SANTOS, A.C.M.Z.; SILVEIRA, L.M. What do local stakeholders think about the impacts of small hydroelectric plants? Using Q methodology to understand different perspectives. **Energy Policy**. v.112,p. 372-380. 2018.

PAL, D.; MITRA, K.S. Interdependence between crude oil and world food prices: A detrended cross correlation analysis. **Physica A: Statistical Mechanics and its Applications**. v.492, p. 1032-1044. 2018.

RAHAMAN, M.S.A.; CHENG, L.H.; XU, X.H. et al. A review of carbon dioxide capture and utilization by membrane integrated microalgal cultivation processes. *Renew. Sustain. Energy Rev.* v.15, n.8, p.4002–4012, 2011.

SAADABADI, S.A.; THATTAI,A.T.; FAN,L.; LINDEBOOM, R.E.F.; SPANJERS,H.; ARAVIND,PV. Solid Oxide Fuel Cells Fuelled with Biogas: Potential and Constraints. **Renewable Energy**. v.23, 2018.

SAFI , C.; ZEBIB, B.; MERAHA, O.; PONTALIER, P.Y.; VACA-GARCIA, V. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.v. 35, p. 265-278, 2014.

SAFI, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O. et al. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.35, p.265–278. 2014.

SAJJADI, B.; WEI-YIN CHEN; AZIZ, A.; RAMAN, A.; IBRAHIM, S. Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 94, p. 49-68, 2018.

SOO YOUN LEE; JUN MUKCHO; YONG KEUNCHANG; YOU-KWAN OH. Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. **Bioresource Technology**.v.244, p.1317-1328, 2017.

VELJKOVIĆ, V.B.; BIBERDŽIĆ, M.O.; BANKOVIĆ-ILIĆ, I.B.; DJALOVIĆ, I.G.; TASIĆ, M.B.; NJEŽIĆ, Z.B.; STAMENKOVIĆ, O.S. Biodiesel production from corn oil: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v.91, p. 531-548, 2018.

CAPÍTULO 4

Trabalho submetido do periódico

ELETRONIC JOURNAL BIOTECHNOLOGY

PRODUÇÃO DE PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS E GERAÇÃO DE BIOENERGIA EM CÉLULAS A COMBUSTÍVEL FOTOSSINTÉTICAS

Davi L. Cavalcanti^a, Paulo H. da Silva^b, Galba M. de Campos-Takaki^c

^a Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Av. prof. Moraes Rego 1235, Recife 50670-901 Pernambuco (Brasil).

^b Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rede Nordeste de Biotecnologia. Rua Dom Manuel de Medeiros s/n, Recife 52171-900 Pernambuco (Brasil).

^c Universidade Católica de Pernambuco. Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia. Rua do Príncipe 526, Recife 50050-900 Pernambuco (Brasil).

RESUMO

A demanda por energia vem aumentando a cada ano. A maior parte de nossa energia é oriunda de fontes não renováveis como o petróleo. Esse tipo de matriz energética causa grandes danos ao meio ambiente, poluindo água, solo e o ar, além de ser finita. Visando sanar estes problemas várias tecnologias de geração de energia são utilizadas, como baterias solares, energia hidroelétrica, eólica e nuclear. Porém todas estas possuem limitações quanto a altos valores de implantação ou resíduos gerados que são poluentes ambientais. Nos últimos anos uma nova tecnologia vem surgindo, as chamadas células a combustível (CC). Esta tecnologia converte a energia gerada das reações químicas em energia elétrica sem gerar resíduos poluentes. Porém, esta tecnologia também possui limitações como o alto custo de implantação. Para minimizar este problema, variações foram desenvolvidas, como as Células a combustível fotossintéticas (CCF), que utiliza organismos fotossintetizantes como *Chlorella vulgaris* em substituição de catalizadores metálicos como a platina, gerando baixos custos de implantação. Estes organismos possuem uma vantagem, que é poder utilizar o carbono inorgânico da atmosfera para crescimento e possuírem uma biomassa extremamente rica em biocompostos de valor comercial como carotenoides. No presente estudo a microalga *C. vulgaris* foi utilizada como aceptora de elétrons em uma CCF para a geração de energia e de sua biomassa residual foi extraído e analisado os carotenoides produzidos. A geração de energia de $I_{d_{max}} = 275 \text{ mV/cm}^2$, além de serem produzidos. Ao final do processo foram detectados licopeno e betacaroteno nas seguintes concentrações: Licopeno: luz branca = 20,9

mg/g; azul = 29,6 µg/g; vermelha = 30,4 µg/g. β-caroteno nas concentrações: Luz branca = 11,2 µg/g; Azul = 39,2 µg/g e vermelho = 40,4 µg/g. Todos estes resultados obtidos demonstram o grande potencial deste protótipo de CCF e da *C. vulgaris* como aceptora de elétrons.

1. INTRODUÇÃO

A degradação do meio ambiente nunca foi tão grande quanto agora. Todos esses impactos são devido a intensa atividade humana, atividades essas que vem aumentando ainda mais devido ao crescimento acelerado da população mundial. O que pode ocasionar um colapso econômico-ambiental que irá impactar diretamente a vida humana. Com isso, vem havendo uma conscientização das pessoas a nível mundial para que velhos hábitos sejam mudados. Hábitos esses como a matriz energética mundial que atualmente é baseada na exploração de combustíveis fósseis. A prospecção, transporte, refino, e utilização do petróleo causam um impacto gigantesco no ambiente causando contaminações atmosféricas, na terra e nos corpos d'água (AHMADI, M. 2020.; JACKETTI, M.2020.; WANG, Y. 2021)

Outra preocupação crescente é a questão da qualidade da alimentação humana que com a utilização de agrotóxicos vem causando várias enfermidades além de que visando substituir a atual matriz energética algumas plantas oleaginosas e com grande potencial de acúmulo de carboidratos estão sendo utilizadas para a produção de biocombustíveis como o biodiesel e o etanol, causando assim uma diminuição na quantidade de alimentos disponíveis para a população (ATHAR, M., & ZAIDI, S. 2020.; CHAMKALANI, A. et al 2020.).

Visando sanar alguns destes problemas há alguns anos vem sendo desenvolvido um sistema alternativo que utiliza organismos fotossintéticos para gerar energia limpa e de baixo custo que são as células a combustíveis fotossintéticas (CCF). Este sistema utiliza o metabolismo fotossintético de organismos fotossintetizantes como a *Chlorella vulgaris* para gerar eletricidade barata e com baixas emissões de poluentes. As vantagens deste sistema são que o custo da manutenção é baixa, tendo em vista que os organismos fotossintetizantes só necessitam de água, podendo ser utilizadas águas residuais além de sua fonte principal de carbono ser o dióxido de carbono atmosférico e a luz solar. Além disso, a biomassa residual gerada deste processo é extremamente rica em várias substâncias benéficas a saúde e que podem ser utilizadas como suplementação alimentar ou na forma de medicamentos, pois

alguns de seus componentes possuem ação antioxidante como é o caso dos carotenoides, que são pigmentos acessórios nas microalgas e possuem uma grande ação antioxidante. Todos estes produtos gerados a partir desta tecnologia possuem alto valor agregado diminuindo os custos com o equipamento e assim as CCF mostra ser uma tecnologia bastante promissora (CHAMATH D.Y. 2020.; HAI, T.H. 2020.; KUMAR, M. 2020).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cultura Fotossintética

A microalga *Chlorella vulgaris* foi cultivada segundo a metodologia modificada de La Rotta 2014 em meio mineral com uma relação C:N = 0,104 : 4,12 g/L⁻¹, em Erlenmeyers de 500 ml com aeração constante, onde foram cultivadas sob temperatura ambiente (25° C) e iluminação com fotoperíodo de 12 h – 12h (claro / escuro).

2.2. Seleção da Melhor Condição de Cultivo

A melhor condição de cultivo da microalga visando a sua melhor produtividade de pigmentos carotenoides foi realizada testando diferentes tipos de iluminação entre o padrão com luz branca (controle), vermelha ($\lambda=700$ nm) e azul ($\lambda=450$ nm), utilizando para isso lâmpadas de led frias com aeração constante.

2.3. Consumo de Dióxido de Carbono

O dióxido de carbono foi quantificado utilizando o kit de quantificação Compact Kit© para CO₂ da Alfakit. Utilizando 10 mL do meio de cultura durante 20 dias, obtendo os resultados em mg/L⁻¹ de CO₂.

2.4. Configuração da CCF

Foi utilizada uma célula a combustível bicompartimentada. Um compartimento catódico de 1L, contendo um eletrodo placa de grafite explodido com área de 660 cm² imerso no meio de cultura mineral com uma densidade celular inicial de 3x10³ Cél/mL⁻¹. Ânodo de 1L, com eletrodo de placa de grafite explodido imerso em uma solução de ferrocianeto de potássio a 20

mmol/L⁻¹ e como sistema de troca catiônica foi utilizada uma ponte salina de 5 cm em ágar com KCl a 3 M ligando os dois compartimentos.

2.5. Análise de Cronovoltametria

A cronovoltametria foi gravado utilizando um multímetro Fluke 8080 com software de aquisição de dados Flukeview® (Fluke Corporation, USA). Os dados da cronovoltametria na forma de potencial, foram convertidos em densidade de corrente (Id) usando a equação da lei de Ohm (Eq. 3), uma vez que uma resistência de carga externa de 1 kΩ foi empregada.

$$I_d = E \times R \quad (3)$$

2.6. Cálculo da Eficiência Coulômbica (CE)

A eficiência coulômbica (%) foi calculada de acordo com a Eq. 4. Onde CT é a quantidade teórica que é obtida a partir de cada substrato e CR corresponde à quantidade real obtida de cada substrato e pode ser calculado pela Eq. 5.

$$CE = CR / CT \quad (4)$$

$$CT = N Z F \quad (5)$$

Onde N é o número de moles do substrato, Z é o número de moles de elétrons do substrato e F é a constante de Faraday (96,485.4 C mol⁻¹).

Para uma célula a combustível microbiana, utiliza-se um modelo integrado de Id vs. Tempo, gerando a Eq. 6. Onde M é a massa molar do substrato, A= área do eletrodo, V= volume total do compartimento catódico e ΔS a concentração final do substrato (MORANT et al 2014.; CAVALCANTI et al 2015).

$$CE = (M \int_0^{t_f} I_d dt A) / (FzV_{AC/CC} \Delta S) \quad (6)$$

2.7. Extração dos carotenoids totais

Os carotenoids totais foram extraídos utilizando 1g de biomassa liofilizada que foi macerada em 5 mL de acetona. Depois a mistura foi centrifugada a 10.000 G por 5 minutos e ao final o sobrenadante foi recuperado (repete-se o processo até a biomassa ficar sem cor), ao final desta

etapa o líquido sobrenadante foi centrifugado a 10.000 G por 10 minutos para retirar toda partícula em suspensão. Em seguida o extrato foi lavado com solução fisiológica (NaCl a 85%) e com água destilada e em um funil de separação recupera-se o sobrenadante sem impurezas (processo repetido de 4 a 5 vezes). Após esta etapa adiciona-se ao sobrenadante 20 mL de éter de petróleo, agita-se por 5 minutos e depois se deixa repousar a mistura até a formação de fases (a fase éter de petróleo contém todos os carotenoides).

2.8. Quantificação dos carotenoides

Os carotenoides totais foram analisados utilizando espectrofotometria (espectrofotômetro modelo Biochrom Libra S32) utilizando a função WaveScan fazendo uma varredura na faixa do espectro visível da luz ($\lambda = 400$ a 750 nm) observando todos os picos presentes e determinando assim a qual pigmento corresponde. Após este procedimento, a absorbância de cada amostra foi verificada com o intuito de obter os valores das absorbâncias de cada pigmento, onde após este procedimento foi calculado a quantidade de carotenoides totais de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Teor de Carotenoides}(mg. 100g) = \frac{A \times V \times 1000.000}{A_{1cm}^{1\%} \times M \times 100}$$

Onde: A = absorbância da solução no comprimento de onda de 470 nm para o licopeno e de 450 nm para o betacaroteno; V = volume final da solução; $A_{1cm}^{1\%}$ = coeficiente de extinção ou coeficiente de absorvidade molar de um pigmento em um determinado solvente específico (3450 para o licopeno e 2592 para o betacaroteno); M = massa da amostra tomada para a análise.

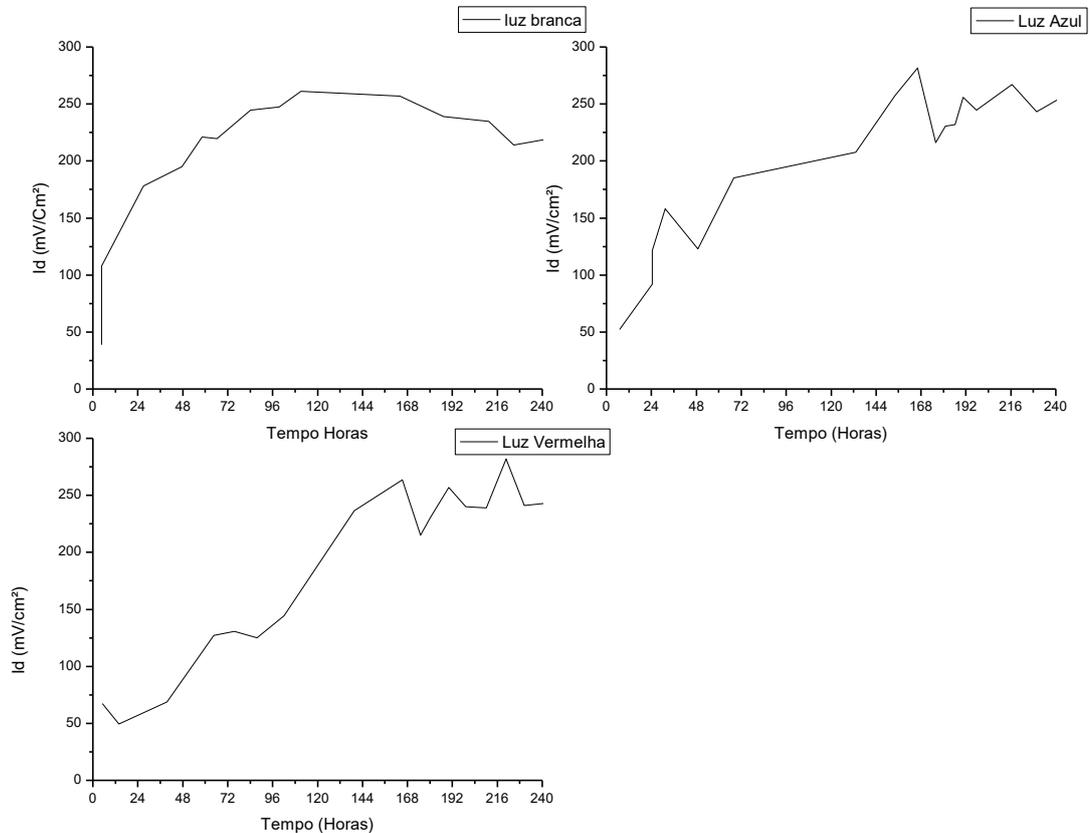
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análises eletroquímicas

No processo de geração de eletricidade na CCF utilizando iluminação de cores diferentes podemos observar uma diferença significativa na geração de corrente nos 3 ensaios. No ensaio onde foi utilizada luz branca para que a microalga realizasse seu processo fotossintético observamos uma boa geração de corrente chegando a um intensidade máxima de corrente gerada de $I_{d_{max}} = 250$ mV/cm² além de uma boa estabilidade ao longo do processo

de geração de energia, onde o potencial se mantém estável com poucas quedas ôhmicas. Os demais ensaios que utilizaram luzes azuis e vermelhas para a realização da fotossíntese demonstraram instabilidade na geração de corrente, apresentando várias quedas ôhmicas no decorrer do processo, porém, sua intensidade máxima de corrente foram parecidas com o que utilizou a luz branca, sendo $I_{d_{max}} = 255 \text{ mV/cm}^2$ na luz azul e $I_{d_{max}} = 256 \text{ mV/cm}^2$ para a luz vermelha. Esta diferença na quantidade de quedas ôhmicas deve-se ao fato da luz branca ser preferencialmente utilizada por organismos fotossintetizantes, por possuírem todo o espectro de comprimentos de ondas, possibilitando assim uma maior eficácia no processo fotossintético e assim o melhor aproveitamento na captação de elétrons pela microalga, gerando uma maior estabilidade de corrente durante todo o experimento. Os resultados obtidos são semelhantes ao obtido por BOLOGNESI, S. et al. 2020, onde o mesmo utilizou sistema de CCF bicompartimentado acoplado ao sistema de tratamento de águas residuais e utilizando *C. vulgaris* como aceptora de elétrons obtendo valores de corrente de 286 e 236 mV em seus ensaios. Nossos resultados também são superiores aos obtidos por CHRISTWARDANA, M. et al. 2020, onde o mesmo utilizando um sistema híbrido de microalgas e leveduras obtiveram uma corrente de 170 mV e LOGROÑO, W. et al. 2017 que obteve valores de corrente entre 130 e 250 mV em seus ensaios com uma CCF. Estas comparações mostram que o sistema de CC utilizado neste estudo é bastante promissor, já que o mesmo ainda não foi otimizado, deixando assim boas perspectivas quanto a esta tecnologia.

Figure 17 - Gráficos de cronovoltametria de uma CCF sob três tipos diferentes de iluminação artificial: a) Luz branca; b) Luz Azul; c) Luz Vermelha.

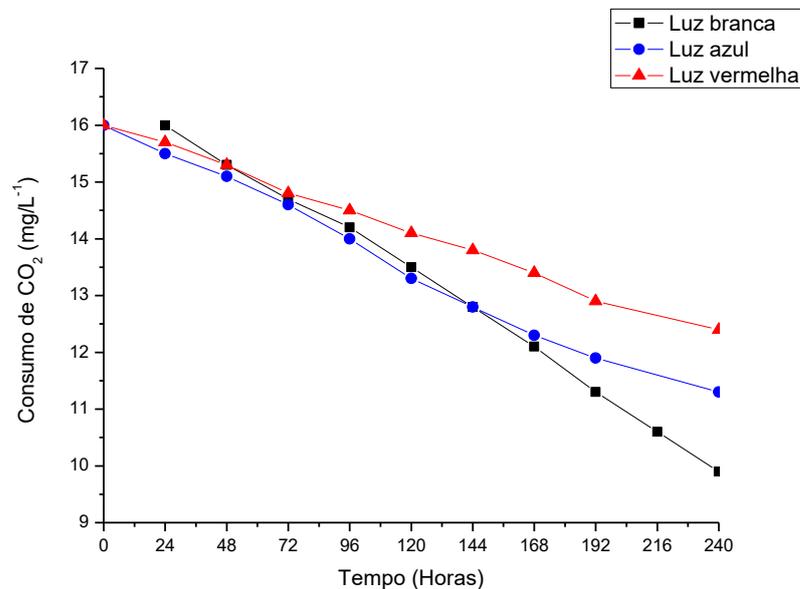


Consumo de dióxido de carbono

O consumo de dióxido de carbono nos três ensaios se manteve sempre decrescente durante os 10 dias de amostragem. O ensaio onde foi utilizada a luz branca obteve um consumo diário médio de $0,61 \text{ mg/L}^{-1}/\text{Dia}$ e ao final do experimento um consumo total de $6,1 \text{ mg/L}^{-1}$. O ensaio que utilizou a luz azul obteve um consumo médio diário de $0,47 \text{ mg/L}^{-1}/\text{Dia}$ e ao final do experimento apresentou um consumo total de $4,7 \text{ mg/L}^{-1}$. Já o ensaio que utilizou luz vermelha apresentou um consumo médio diário de $0,36 \text{ mg/L}^{-1}/\text{Dia}$ e um consumo total de $3,6 \text{ mg/L}^{-1}$. De todos os ensaios realizados o que utilizou a luz branca obteve melhores resultados na fixação do dióxido de carbono, pois o espectro de cores da luz branca é mais vasto, abrangendo todos os pigmentos fotossintéticos existentes no cloroplasto da microalga e por isso a fotossíntese é mais eficaz e conseqüentemente o volume de CO_2 transformado em biomassa é maior que nos demais ensaios. Estes resultados não estão distantes dos obtidos no trabalho de ELOKA-EBOKA, 2017, que utilizou cepas de *C.*

vulgaris cultivadas otimizando a quantidade de CO₂ e O₂ dissolvidos obtendo uma fixação de 11,73 mg/L⁻¹. Os resultados de YADAV, G. 2015 também corroboram os resultados deste estudo, onde obtiveram um consumo de 6 mg/L-1 em seus ensaios em fotobiorreator fechado usando gases de combustão. Estes resultados reforçam a utilidade das microalgas na fixação do CO₂, já que são elas as responsáveis pela fixação de mais 60% do CO₂ da atmosfera e consequentemente os produtores primários mais importantes do planeta, gerando bilhões de toneladas de biomassa rica em biocompostos de valor agregado.

Figure 18 - Consumo de dióxido de carbono por *C. vulgaris* cultivadas em biocátodos de CCF sob iluminação de diferentes cores (Luz branca, azul e vermelha).

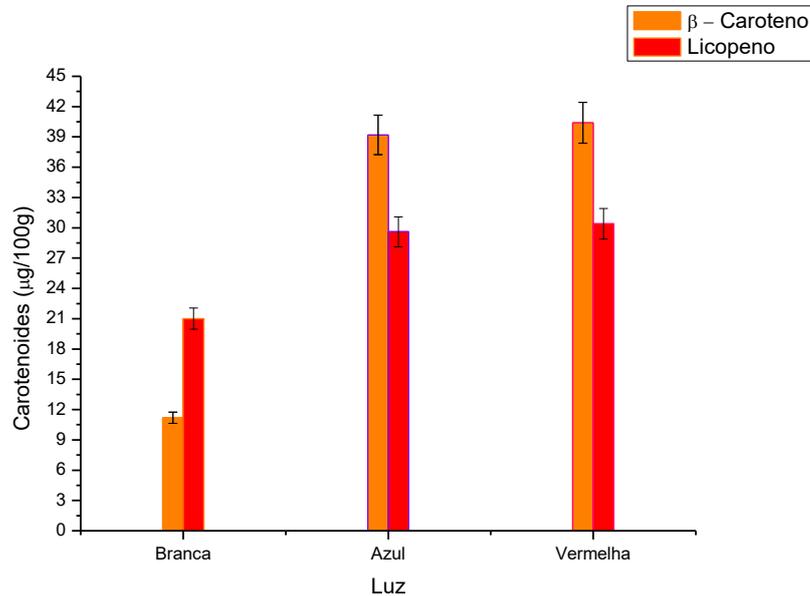


3.2. Produção e quantificação dos carotenoides totais

Ao analisar a biomassa através da espectrofotometria observou-se a presença dos carotenoides Licopeno e β -caroteno nos comprimentos de onda 450 nm (β -Caroteno) e 470 nm (Licopeno) em todos os ensaios. Porém, as concentrações encontradas variaram de acordo com o tipo de iluminação utilizada (Figura 19). Os ensaios realizados com luz branca obtiveram concentrações de 20,9 mg/100g para o licopeno e 11,2 mg/100g. Os ensaios conduzidos sob a luz azul obtiveram as seguintes concentrações: 29,6 mg/100g de licopeno e 39,2 mg/100g de β -caroteno. Já os ensaios realizados com luz vermelha como fonte luminosa obtiveram 30,4 mg/100g de licopeno e 40,4 mg/100g de β -caroteno. Os resultados evidenciam uma maior

produção do licopeno e do β -caroteno nos ensaios utilizando um comprimento de onda específico para as cores azul e vermelho do que os ensaios que foram realizados sob a luz branca. A luz branca possui uma amplitude de radiação luminosa bastante grande, o que influencia a produção de clorofila 'a' não sendo necessária a superprodução de pigmentos acessórios como os carotenoides, tendo assim uma menor produção. Já comprimentos de ondas mais curtos como a luz azul propiciam a maior produção dos carotenoides em geral, fazendo com que sua produção aumente significativamente. A luz vermelha possui um comprimento de onda maior o que não propicia tanto a sua utilização na produção dos carotenoides, porém, o organismo utilizado é uma microalga e esta possui adaptações para aproveitar todos os comprimentos de onda disponíveis, pois nem todo o espectro da luz visível consegue chegar a estes organismos, seja por competição com outros organismos ou turbidez da fonte de água onde habitam. Então possivelmente por este motivo a microalga ao entrar em contato somente com o espectro de onda vermelho estimulou a produção dos carotenoides fazendo sua concentração intracelular aumentar superando os ensaios de luz branca e se igualando aos ensaios de luz azul. (GONG, M. 2016.; POURKARIMI, S. et al 2020.; LIANG, M.H. et al 2020.). Segundo POURKARIMI, S. et al 2020, vários fatores podem influenciar na produção de carotenoides por microalgas, como temperatura, intensidade luminosa, tipo de iluminação, nutrientes, tipo de meio de cultivo entre outros. O acúmulo máximo de carotenoides totais na biomassa seca foi de pouco mais de 4%, níveis um pouco abaixo da melhor microalga *Dunaliella salina*, da qual é extraída a maior parte dos carotenoides produzidos no mundo produção de carotenoides atualmente, onde esta microalga pode acumular cerca de 14% do seu peso desses pigmentos. Porém, as condições de cultivo de *C. vulgaris* em CCF ainda não foram otimizados, sendo assim capaz de superar essa marca alcançada por POURKARIMI, S. et al 2020.

Figure 19 - Concentração de Licopeno e β -caroteno extraídos de biomassa residual de *C. vulgaris* resultante do processo de geração de eletricidade em CCF.



4. Conclusões

Os resultados comprovaram a eficiência e potencial biotecnológico da microalga *C. vulgaris* quando usada em sistemas eletroquímicos, com elevados conteúdos de biomassa residual durante o processo de geração de eletricidade. Os pigmentos fotossintéticos são produzidos de forma economicamente viáveis, com elevado valor agregado, como licopeno e β -caroteno, oferecendo a possibilidade de redução dos custos operacionais do sistema, além da agregação de valor à biomassa como ração animal.

5. Agradecimentos

Este trabalho contou com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE). Agradecemos também ao Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco.

6. Bibliografia

AHMADI, M.; HOU, Q.; WANG, Y.; CHEN, Z. Interfacial and molecular interactions between fractions of heavy oil and surfactants in porous media: Comprehensive review. **Advances in Colloid and Interface Science**. v. 283, 2020.

ATHAR, M., & ZAIDI, S. A review of the feedstocks, catalysts, and intensification techniques for sustainable biodiesel production. **Journal of Environmental Chemical Engineering** . v.8, .2020.

BOLOGNESI, S., CECCONET, D., CALLEGARI, A., & CAPODAGLIO, A. G. Combined microalgal photobioreactor/microbial fuel cell system: performance analysis under different process conditions. **Environmental Research**. v. 192, p. 110-263, 2020.

CHAMATH D.Y.; DON, Y. A.; BABEL, S. Comparing the performance of microbial fuel cell with mechanical aeration and photosynthetic aeration in the cathode chambre. **International Journal of Hydrogen Energy**. 2020.

CHAMKALANI, A., ZENDEHBOUDI, S., REZAEI, N., & HAWBOLDT, K. CHAMKALANI, A., ZENDEHBOUDI, S., REZAEI, N.; HAWBOLDT, K. A critical review on life cycle analysis of algae biodiesel: current challenges and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 134, p.110143, 2020.

CHRISTWARDANA, M., HADIYANTO, H., MOTTO, S. A., SUDARNO, S., & HARYANI, K. Performance evaluation of yeast-assisted microalgal microbial fuel cells on bioremediation of cafeteria wastewater for electricity generation and microalgae biomass production. **Biomass and Bioenergy**. v. 139, 2020.

ELOKA-EBOKA, AC E INAMBAO, FL. Efeitos do sequestro de CO₂ na produtividade de lipídios e biomassa na produção de biomassa microalgal. **Energia Aplicada**. v. 195, p. 1100-1111, 2017.

GONG, M.; BASSI, A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. **Biotechnology Advances**. v.34, p.1396-1412, 2016.

HAI, T.H.; MIN, N.B. Using multiple carbon brush cathode in a novel tubular photosynthetic microbial fuel cell for enhancing bioenergy generation and advanced wastewater treatment. **Bioresource Technology**. v. 316, 2020.

JACKETTI, M.; BEEGLE-KRAUSE, C.J.; ENGLEHARDT, J.D. A review on the sinking mechanisms for oil and successful response Technologies. **Marine Pollution Bulletin**. v. 160, 2020.

KUMAR, M. DIXIT, E.R.; PALLY, A.T. Photosynthetic microorganisms (Algae) mediated bioelectricity generation in microbial fuel cell: Concise review. **Environmental Technology & Innovation**. v. 19, 2020.

LIANG, M.H.; WU, F.C.; LIANG, Z.C.; CHEN, H.H.; GUOJIANG, J. Induction of carotenoid cleavage by salt stress and the effect of their products on cell growth and pigment accumulation in *Dunaliella* sp. FACHB-847. **Algal Research**. v.48, 2020.

LOGROÑO, W., PÉREZ, M., URQUIZO, G., KADIER, A., ECHEVERRÍA, M., RECALDE, C., & RÁKHELY, G. (2017). Single chamber microbial fuel cell (SCMFC) with a cathodic microalgal biofilm: A preliminary assessment of the generation of bioelectricity and biodegradation of real dye textile wastewater. **Chemosphere**. v.176, 2017.

POURKARIMI, S.; HALLAJISANI, A.; ALIZADEHDAKHEL, A.; NOURALISHAHI, A.; GOLZARY, A. Factors affecting production of beta-carotene from *Dunaliella salina* microalgae. **Biocatálise e Biotecnologia Agrícola**. v. 29, 2020.

WANG, Y.; QIYANG.; LINYAO KE.; PENG, Y.; LIU, Y.; Review on the catalytic pyrolysis of waste oil for the production of renewable hydrocarbon fuels. **Fuel**. v. 283, p. 119-170, 2021.

YADAV, G., KAREMORE, A., DASH, S. K., & SEN, R. Performance evaluation of a green process for microalgal CO₂ sequestration in closed photobioreactor using flue gas generated in-situ. *Bioresource Technology*, v. 191, p.399–406, 2015.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos neste trabalho comprovam a viabilidade da utilização da microalga *Chlorella vulgaris*, como uma opção viável no desenvolvimento de uma Célula a Combustível Fotossintética, pois a mesma mostra ter grande capacidade como acceptora de elétrons no compartimento catódico, comprovando:

O potencial biotecnológico das Células a Combustível Fotossintéticas (CCF) na geração de energia limpa e renovável. Demonstração de eficiência e compatibilidade do sistema de biocátodo de *Chlorella vulgaris*, em uma CCF;

A fixação do dióxido de Carbono pela microalga é realizada de forma eficiente, possibilitando a conversão em bioprodutos economicamente viável, valorizados e de ampla aplicabilidade, como amido e lipídios;

Estudos devem ser realizados para a otimização da produção de energia em uma célula a combustível fotossintética;

O potencial biotecnológico da microalga *C. vulgaris* quando usada em sistemas eletroquímicos produz elevados conteúdos de biomassa durante o processo de geração de eletricidade;

Às condições limitantes de Nitrogênio e Fósforo nas condições no meio de cultivo da microalga em um biocátodo, induz o processo de acumulação celular de amido e lipídios;

A microalga apresenta elevada habilidade na produção otimizada de matéria-prima para a fabricação de biocombustíveis, como o etanol e o biodiesel;

Os subprodutos gerados no processo de produção de energia, demonstra a valorização do processo biotecnológico, minimização dos custos operacionais, promovendo sustentabilidade na implantação do sistema de CCF em escala sem-industrial.

Os pigmentos fotossintéticos produzidos são bioprodutos promissores e oferecem elevado valor agregado, como licopeno e β -caroteno, possibilitando o seu emprego em indústrias

farmacêutica e de alimentos, como ração animal. Contudo, é necessário condições otimizadas para uma produção promissora e sustentável.