



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

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Chlorella vulgaris*:
APLICAÇÃO EM BIOCELULAS A COMBUSTÍVEL
FOTOSSINTÉTICA, PRODUÇÃO DE ENERGIA E
SEQUESTRO DE CO₂

DAVI DE LIMA CAVALCANTI

Recife, 2016

DAVI DE LIMA CAVALCANTI

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Chlorella vulgaris*:
APLICAÇÃO EM BIOCELULAS A COMBUSTÍVEL
FOTOSSINTÉTICA, PRODUÇÃO DE ENERGIA E
SEQUESTRO DE CO₂**

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

Área de Concentração: Microbiologia aplicada

Linha de Pesquisa: Biotecnologia

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

Co-orientador: Dr. Camilo Enrique. La Rotta Hernandez

Recife, 2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Cavalcanti, Davi de Lima

Potencial biotecnológico de *Chlorella vulgaris*: aplicação em biocélulas a combustível fotossintética, produção de energia e sequestro de CO₂/ Davi de Lima Cavalcanti– Recife: O Autor, 2016.

67 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Galba Maria de Campos Takaki

Coorientador: Camilo Henrique la Rotta Hernandez

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Biotecnologia, 2016.

Inclui bibliografia

- 1. Energia 2. *Chlorella* 3. Biotecnologia I. Takaki, Galba Maria de Campos (orientadora) II. Rotta Hernandez, Camilo Henrique la (coorientador) III. Título**

333.79

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-204

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

DAVI DE LIMA CAVALCANTI

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Chlorella vulgaris*:
APLICAÇÃO EM BIOCELULAS A COMBUSTÍVEL
FOTOSSINTÉTICA, PRODUÇÃO DE ENERGIA E
SEQUESTRO DE CO₂

APROVADO EM: 23/02/2016

Examinadores:

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

Dra. Celuta Sales Alviano
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Suplentes:

Dra. Ana Lucia Figueiredo Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Dra. Luciana Oliveira Franco
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

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

A Débora por fazer parte de minha vida...

A todos os meus amigos...

A Deus por me dar capacidade...

*“Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até
onde os outros já foram”*

Graham Bell, A.

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, por terem me apoiado e me ajudado por toda minha vida, incentivando-me nos momentos de dificuldades e sempre me dando os melhores exemplos de honestidade e dignidade, além de todo amor.

A minha namorada Débora Sousa Pereira Silva, por fazer parte de minha vida, por todo o seu amor, carinho, companheirismo, incentivos, compreensão e ensinamentos científicos, além de sempre acreditar em mim.

Aos meus grandes amigos Daylin Rubio, Marcos Luna, Hamilton Nobrega, Carlos Vilar e Paulo Henrique da Silva, pelo companheirismo e todos os momentos de descontração e alegria durante estes dois anos.

A todos os amigos do NPCIAMB, por toda a ajuda oferecida durante o desenvolvimento deste trabalho, e em especial, aos técnicos e amigos André e Humberto.

A professora Galba Maria de Campos Takaki e Camilo La Rotta por ter confiado este trabalho e dado a oportunidade de crescer pessoalmente e profissionalmente na Ciência. Ao professor Sérgio Perez, pela colaboração em todos os momentos.

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 e que a considero minha “Mãe na Ciência”.

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!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
CAPÍTULO 1	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. OBJETIVO GERAL	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1. CÉLULAS A COMBUSTÍVEL.....	17
3.2. CÉLULA A COMBUSTÍVEL MICROBIANAS	19
3.3. CÉLULAS A COMBUSTÍVEL FOTOSSINTÉTICA	21
3.4. CÁTODO MICROBIANO	24
3.5. MICRO-ORGANISMOS EXOELETROGÊNICOS	26
3.6. MICROALGAS	27
3.7. <i>Chlorella vulgaris</i>	29
3.8. SEQUESTRO DE CO ₂	32
4. BIBLIOGRAFIA.....	33
CAPÍTULO 2	39
ARTIGO I - Sequester of CO₂ and Power Generation in Photosynthetic Fuel Cells of <i>Chlorella vulgaris</i>	40
ABSTRACT	40
1. INTRODUCTION	40
2. MATERIALS AND METHODS.....	41
2.1 Configuration of the PFC	41
2.2 Photosynthetic Culture	41
2.3 Chronoamperometric Analysis	42
2.4 Coulombic Efficiency Calculation (CE)	42
2.5 Measurement of CO ₂ Dissolved.....	42
2.6 Starch Content.....	42

2.7	Extraction of Total Lipids	42
3.	RESULTS AND DISCUSSION.....	43
3.1	CO ₂ Consumption	43
3.2	Biomass Analysis	43
3.3	Electrochemical Analysis.....	44
4.	CONCLUSION.....	44
5.	ACKNOWLEDGMENTS	44
6.	REFERENCES	45
	CAPÍTULO 3.....	47
	ARTIGO II - Otimização das Condições de Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> para a Geração de Energia, Acumulação de Amido e Lipídios em Célula a Combustível Fotossintética.....	47
	RESUMO	48
1.	Introdução.....	48
2.	Materiais e Métodos	49
2.1.	Configuração da CCF	49
2.2.	Cultura Fotossintética.....	50
2.3.	Análise de Cronoamperometria	50
2.4.	Cálculo da eficiência coulômbica (CE).....	50
2.5.	Análise do teor de amido	51
2.6.	Análise de lipídios totais	51
2.7.	Planejamento fatorial.....	51
3.	Resultados e discussão	52
3.1.	Análises eletroquímicas.....	52
3.2.	Análise da biomassa	52
4.	Conclusões.....	53
5.	Agradecimentos	53
6.	Bibliografia	54
	CONCLUSÕES GERAIS	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de uma célula a combustível: a) Célula a combustível a hidrogênio. b) Célula a combustível a metanol.	17
Figura 2: Esquema de uma CCM simples com um ânodo anaeróbico e um cátodo aeróbico separado por uma Membrana de Troca Protônica (PEM).	20
Figura 3: Esquema de funcionamento de uma Célula a Combustível Fotossintética (CCF) com cátodo de microalgas.	22
Figura 4: Diferentes configurações de uma célula a combustível fotossintética CCF. a) CCF de câmara única. b) CCF de sedimentos. c) CCF híbrida. d) CCF acoplada.	24
Figura 5: Formas de transferência de elétrons por micro-organismos: a) Transferência direta. b) Transferência feita através de nanofios.	26
Figura 6: Classificação das algas de acordo com sua coloração e substâncias de reserva.	28
Figura 7: Cultura pura da microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	29
Figura 8: Esquema básico da organização celular das organelas da microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	31
Figura 9: 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 de incubação.	31
Figura 10: Perfil cronoamperométrico de uma CCF com cátodo de microalga <i>C. vulgaris</i> em diversas condições de cultivo. a) Ensaios 1 e 2: Sem iluminação b) Ponto central: Fotoperíodo de 12 horas e $[N]=5,42g/L$. c) Ensaio 3: iluminação 24 horas e $[N]=2,6g/L$. d) Ensaio 3 com iluminação 24 horas e $[N]=8,24g/L$	56
Figura 11: Porcentagem de amido e lipídios em <i>C. vulgaris</i> cultivadas em diversas condições de cultivo seguindo o planejamento fatorial 2^2	56
Figura 12: Diagrama de Pareto ilustrando os efeitos das interações entre as variáveis independente intensidade luminosa e concentração de nitrogênio sobre a variável resposta acúmulo de amido (a) e lipídios (b).	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diferentes tipos células a combustível	19
Tabela 2: Composition of mineral medium used in the experiments with <i>C. vulgaris</i>	41
Tabela 3: Composição do meio mineral utilizado no cultivo da microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	557
Tabela 4: Matriz do planejamento fatorial completo 2 ²	557

RESUMO

O crescimento da população mundial vem causando um aumento substancial na demanda por energia o que poderá causar em curto prazo uma crise energética, pois grande parte da energia consumida em todo mundo é proveniente de fontes não renováveis como o petróleo, já que sua prospecção e utilização tem causado grandes danos a natureza, impactando vários ecossistemas e colaborando com o aquecimento global. Por estes motivos, novas tecnologias para geração de energia limpa vêm sendo criadas. Um exemplo destas são as células a combustível, que são dispositivos que convertem energia química em elétrica. Porém esta tecnologia apresenta algumas limitações, como deficiências na transferência de elétrons, baixa geração de potência e altos custos associados a utilização de catalizadores metálicos, os quais aumentam os custos de implantação e dificultam sua utilização em larga escala. Visando superar estas limitações uma variação desta tecnologia foi desenvolvida, a chamada célula a combustível fotossintética. Neste tipo de célula a combustível, microalgas como a *Chlorella vulgaris* são utilizadas no compartimento catódico substituindo catalizadores químicos melhorando sua sustentabilidade e reduzindo os custos de implantação. As utilizações de cátodos de microalgas também colaboram com o sequestro de carbono da atmosfera, o convertendo em oxigênio e biomassa rica em metabólitos de grande valor comercial como amido e lipídios. No presente estudo a microalga *C. vulgaris* foi utilizada no compartimento catódico de uma célula a combustível fotossintética a fim de se analisar sua eficiência na produção de energia, sua capacidade de sequestrar o dióxido de carbono da atmosfera e seu acúmulo de materiais de reserva como amido e lipídios totais. Na primeira parte deste estudo a microalga *C. vulgaris* foi utilizada como aceptora de elétrons em um compartimento catódico, onde durante 10 dias de experimento foram avaliados a quantidade de CO₂ capturada pelas células de algas (7mg/L de CO₂), a composição da biomassa, Amido (3%) e Lipídios (70%) e parâmetros eletroquímicos como a Eficiência Coulômbica ($C_E = 33,1\%$) e densidade de corrente máxima ($I_{d_{max}} = 147 \text{ mA cm}^{-2}$). Em seguida esta condição foi submetida a um planejamento fatorial completo 2², onde as variáveis independentes, tempo de iluminação e a concentração de nitrogênio foram testadas sobre a produção de eletricidade e acúmulo de amido e lipídios. Durante os experimentos foi constatado que a iluminação é o fator que mais influi na geração de energia, onde foram obtidos valores de densidade de corrente máxima $I_{d_{max}} = 178 \text{ mA/cm}^2$ com uma eficiência coulômbica de 42,5%, além de uma acumulação máxima de amido de 38% e 77% de lipídios, demonstrando que a utilização de um cátodo fotossintético para produção de energia é viável e eficiente na produção de metabólitos com elevado valor comercial.

Palavras-chave: *Chlorella vulgaris*, célula a combustível, sequestro de carbono, produção de energia, produção de metabólitos.

ABSTRACT

The global population growth has caused a substantial increase in demand for energy, which in short-term may cause an energy crisis, since much of the energy consumed throughout the world comes from non-renewable sources like oil. Besides its exploration and use cause great damage to the environment, affecting diverse ecosystems and contributing to global warming. For those reasons, are being created new technologies for clean energy generation. An example of these technologies is Fuel Cells, which are devices that convert chemical energy into electric. However, this technology has some limitations, such as defects in electron transfer, low power output and high costs associated with the use of metal catalysts, which increase deployment costs and hamper its use on a large scale. Aiming to overcome these limitations, a variation of this technology was developed, the so-called photosynthetic fuel cell. In this type of fuel cell, microalgae such as *Chlorella vulgaris* are used in the cathode compartment replacing chemical catalysts improving their sustainability and reducing deployment costs. The uses of microalgae cathodes also collaborate with carbon capture from the atmosphere, turning it into oxygen and biomass rich in metabolites of great commercial value as starch and lipids. In the current study the microalgae *C. vulgaris* was used in the cathode compartment of a photosynthetic fuel cell in order to analyze its energy production efficiency, their ability to sequester atmospheric carbon dioxide and its accumulation of reserve materials such as starch and total lipids. The first part of this study microalga *C. vulgaris* was utilized as an electron acceptor in a cathode compartment, which were analyzed during 10 days of experiment the amount of CO₂ captured by the algae cells (7mg/L⁻¹ of CO₂), the composition of the biomass starch (3%) and lipids (70%) and electrochemical parameter as coulombic efficiency (C_E = 33.1%) and the maximum current density (mA Id_{max} = 147 cm²). Then this condition was subjected to a complete factorial design 2² where the independent variables, illumination time and the concentration of nitrogen were tested on the production of electricity and accumulation of starch and lipids. During the experiments it was evidenced that enlightenment is the factor that most affects the power generation, which were obtained maximum current density values Id_{max} = 178 mA/cm² with a coulombic efficiency of 42.5%, and a maximum accumulation of 38% of starch and 77% of lipid, demonstrating that the use of a photosynthetic cathode for energy generation is feasible, and also in the production of metabolites with a high commercial value.

Key words: *Chlorella vulgaris* , fuel cell, carbon sequestration, energy production.

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 sua queima libera uma grande quantidade de gases tóxicos que podem causar diversas doenças respiratórias em seres humanos. Dentre estes gases o dióxido de carbono é o principal responsável pelo fenômeno do aquecimento global contribuindo assim com as mudanças climáticas no planeta (MEDEIROS et al, 2015).

Por todos estes 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. Porém todas elas 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. Logo as principais culturas como o milho, cana-de-açúcar e soja são desviadas para produção destes combustíveis ao invés de serem destinadas a alimentação, gerando assim um grande problema social e econômico (ZAH et al, 2009).

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.

Visando diminuir os custos operacionais desta tecnologia e torna-la mais acessível outra configuração desta tecnologia foi desenvolvida, as chamadas 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).

Ainda dentro desta 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 vem 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). Este tipo de tecnologia apresenta várias vantagens em relação as demais, pois utilizam a alta capacidade fotossintética destas microalgas para produzir eletricidade com baixo custo, utilizando apenas o dióxido de carbono da atmosfera para crescerem, produzindo uma biomassa extremamente rica e que pode ser utilizadas para extração de vários produtos de valor comercial, reduzindo os custos de sua utilização.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver sistemas eletroquímicos otimizados para a geração de energia elétrica em uma célula a combustível fotossintética de baixa temperatura (25°C) somada a geração de produtos de interesse industrial como carboidratos e lipídios.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

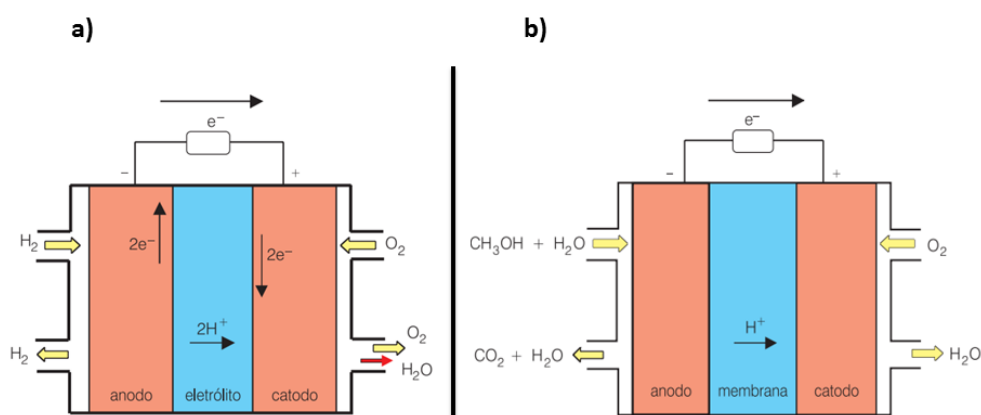
- Otimizar as condições de cultura: Tempo de Iluminação e concentração de nitrogênio.
- Avaliar os subprodutos de interesse: amido e lipídios
- Induzir a acumulação de amido e lipídios através da otimização das condições de cultivo.
- Gerar energia elétrica a partir de dispositivos eletroquímicos otimizados acoplados a sistemas biológicos de sequestro de CO₂.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. 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% (TAN ZHONGFU et al, 2015). 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 (HARTMUT, W et al 2000). 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), (McPHAIL et al 2011).



Fonte: VILLULLAS et al 2002

Figure 1: Esquema de uma célula a combustível: a) Célula a combustível a hidrogênio. b) Célula a combustível a metanol.

A estrutura básica de todas as células a combustível são semelhantes, 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, o mesmo 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).



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. Uma visão mais geral sobre os tipos de CC é mostrada na tabela 1.

Tabela 1: Diferentes tipos de células a combustível

	AFC (Alkaline)	PEMFC (Polymer Electrolyte Membrane)	DMFC (Direct Methanol)	PAFC (Phosphoric Acid)	MCFC (Molten Carbonate)	SOFC (Solid Oxide)
Temperatura de Operação °C	<100	60-120	60-120	160-220	600-800	800-1000, também pode operar em temperaturas mais baixas (500-600)
Reação Anódica	$H_2 + 2OH^- \rightarrow 2H_2O + 2e^-$	$H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$	$CH_3OH + H_2O \rightarrow$ $CO_2 + 6H^+ + 6e^-$	$H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$	$H_2 + CO_3^{2-} \rightarrow$ $H_2O + CO_2 + 2e^-$	$H_2 + O^{2-} \rightarrow$ $H_2O + 2e^-$
Reação Catódica	$1/2O_2 + H_2O + 2e^- \rightarrow$ $2OH^-$	$1/2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow$ H_2O	$3/2 O_2 + 6H^+ + 6e^- \rightarrow$ $3H_2O$	$1/2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow$ H_2O	$1/2O_2 + CO_2 + 2e^- \rightarrow$ CO_3^{2-}	$1/2O_2 + 2e^- \rightarrow O^{2-}$
Geração de Energia	5-150 kW	5-250 kW	5 kW	50 kW – 11 MW	100 kW-2 MW	100-250 kW
Transportador de carga noo eletrólito	OH^-	H^+	H^+	H^+	CO_3^{2-}	O^{2-}
Aplicações	Sistema de armazenamento de energia para transporte espacial e militar			Produção simultânea de energia e calor para residências	Produção simultânea de calor e energia para sistemas de transporte	

Fonte: CARRETTE, et al 2002.

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). Visando diminuir os custos de operação das CC, variações das mesmas 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.

3.2. 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 também 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).

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).

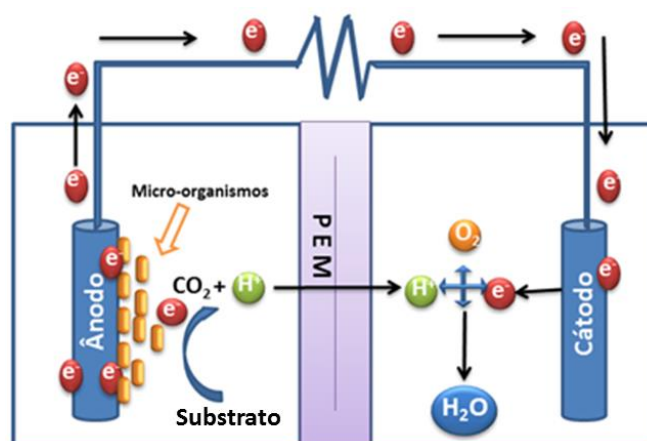


Figure 2: Esquema de uma CCM simples com um ânodo anaeróbico e um cátodo aeróbico separado por uma Membrana de Troca Protônica (PEM).

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). 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).

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 (UMBUZEIRO et al, 2005). 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 aceptor 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 à incapacidade de manter a concentração inicial do substrato no fluido e a limitação de transporte de massa (OLIVEIRA et al., 2013).

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).

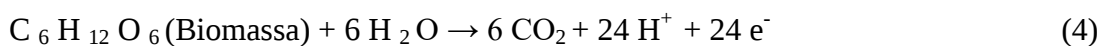
Além da configuração clássica, existem variações nas configurações dos compartimentos anódico e catódico visando o aumento da geração de eletricidade e a diminuição dos custos operacionais. Dentre essas variações destacam-se as Células a Combustível Microbiana Híbrida (CCMH) e as Células a Combustível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

3.3. CÉLULAS A COMBUSTÍVEL FOTOSSINTÉTICA

Tecnologias voltadas à utilização da energia solar estão cada vez mais ganhando importância devido à preocupação crescente com a escassez dos recursos naturais não renováveis e o meio ambiente. Nos últimos anos várias tecnologias vêm sendo desenvolvidas, dentre elas 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 CO_2 ou outro tipo de substrato orgânico (CHANDRA et al, 2012). 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 (EL MEKAWYA, 2014).

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).

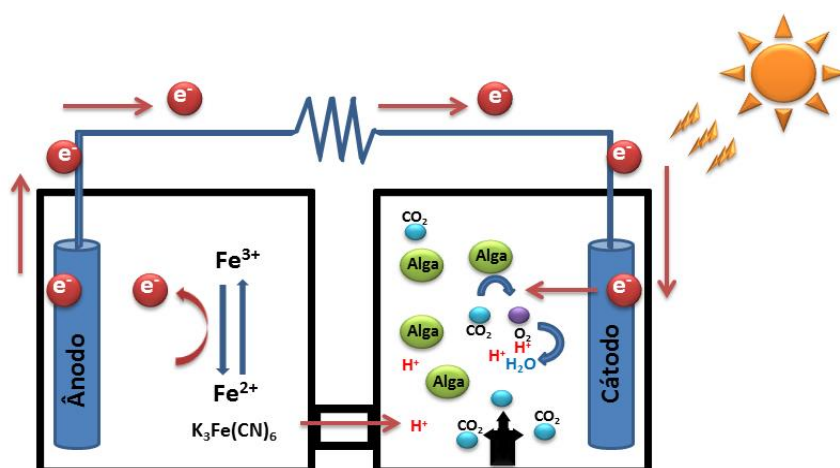


Figure 3: Esquema de funcionamento de uma Célula a Combustível Fotossintética (CCF) com cátodo de microalgas.

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 (EL MEKAWY et al 2014). 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).

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).

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).

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).

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).

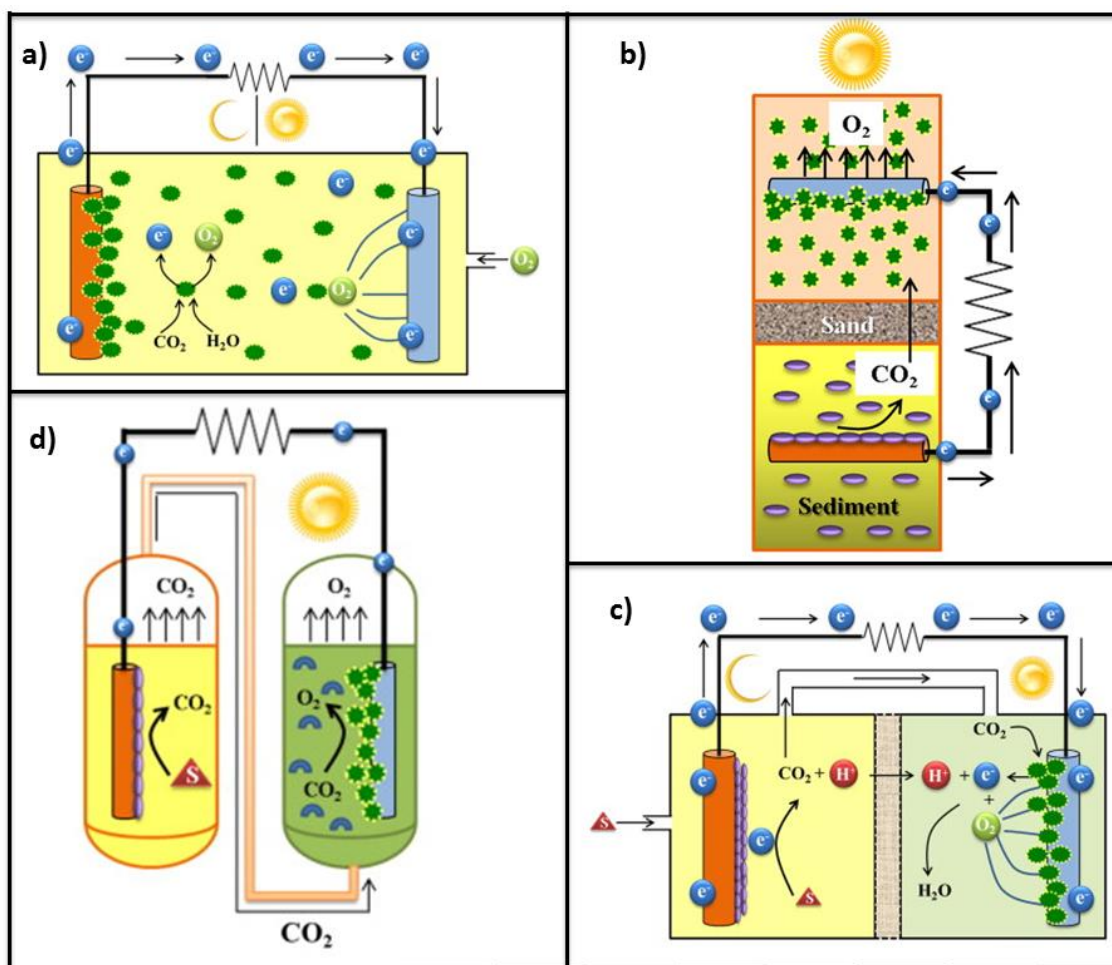


Figure 4: Diferentes configurações de uma célula a combustível fotossintética CCF. a) CCF de câmara única. b) CCF de sedimentos. c) CCF híbrida. d) CCF acoplada.

Fonte: El MEKAWY et al, 2014

3.4. CÁTODO MICROBIANO

Um dos principais atrativos nas células a combustível microbianas é a possibilidade da utilização de substratos de baixo custo para a geração de eletricidade. Durante a última

década vários avanços cruciais na compreensão das reações biológicas destes sistemas vêm sendo desenvolvidos, além de melhorias na sua arquitetura, materiais e soluções químicas utilizadas neste processo, obtendo assim bons desempenhos. Porém, mesmo com todas estas inovações em seu desenvolvimento, sua utilização em larga escala é comprometida, pois os custos com os materiais utilizados no compartimento catódico como a platina é bastante elevado. Embora vários catalizadores químicos mais baratos venham sendo testados, a densidade de potência gerada ainda é baixa e precisa ser melhorada (DUTEANU et al 2010., HUANGA et al 2011).

Os cátodos microbianos utilizam micro-organismos (bactérias, fungos, microalgas) como biocatalizadores e receptores de elétrons, oferecendo uma alternativa a utilização de metais preciosos e catalizadores químicos para a redução do oxigênio nos compartimentos catódicos aumentando a viabilidade econômica e ambiental das CCM. Além disso, os biocátodos permitem a utilização de receptores de elétrons alternativos que podem ampliar a utilidade das CCM utilizando a catálise microbiana para gerar produtos com valor comercial agregado e simultaneamente gerar eletricidade (LOGAN 2010., SONG et al 2015).

Com o desenvolvimento dos cátodos microbianos, várias substâncias vêm sendo utilizadas como aceptor final de elétrons como o oxigênio, sais inorgânicos, dióxido de carbono e alguns metais de transição. Embora o mecanismo de transferência de elétrons biológico não esteja totalmente elucidado, sabe-se que os micro-organismos desempenham um papel importante neste processo (XIE et al 2010., CHEN et al 2010).

Os cátodos mais comuns utilizam o oxigênio como aceptor de final de elétrons, pois, devido a seu elevado potencial redox (1,229 V) e baixo custo, o O₂ é o mais utilizado nas CCM. Neste tipo de cátodo, os micro-organismos podem transferir os elétrons diretamente para o oxigênio ou ajudam a oxidação de metais de transição para a entrega de elétrons para o oxigênio (XIE et al 2010., CHEN et al 2010).

Outros tipos de compostos também podem ser utilizados como receptores finais de elétrons, como alguns sais inorgânicos. Este tipo de receptor final de elétrons só é eficaz em condições anaeróbicas, fazendo com que o nitrato e sulfato ajam como receptores finais de elétrons, pois com um baixo teor de oxigênio ocorre a diminuição da dispersão dos elétrons no cátodo, reduzindo assim o transporte de elétrons e consequentemente a redução da eficiência (XIE et al 2010., SONG et al 2015).

Os sistemas de biocátodos apresentam várias vantagens em relação aos sistemas convencionais como um menor custo de implantação e uma maior sustentabilidade, pois os tipos mais comuns de materiais utilizados nos cátodos são muito caros como a platina e o ferrocianeto, além de danosos ao ambiente. Eles também podem ser facilmente melhorados, com modificações na estrutura, tamanho, espaçamento, por exemplo, consegue-se aumentar consideravelmente a geração de energia. Por apresentar estas características, os sistemas de biocátodos podem ser utilizados no tratamento de águas residuais, onde o processo de nitrificação é realizado simultaneamente com a geração de energia, ajudando no processo de remoção das impurezas da água e assim

podendo suprir parte da demanda por energia do local (XIE et al 2011., SONG et al 2015).

3.5. MICRO-ORGANISMOS EXOELETROGÊNICOS

O primeiro registro da produção de eletricidade por um micro-organismo foi em 1911 por Potter, onde verificou efeitos elétricos decorrente da decomposição de matéria orgânica por bactérias. Logan em 2006 define micro-organismos exoeletrogênicos como aquele com habilidade de estabelecer contato eletroquímico com eletrodos insolúveis, sem necessitar do auxílio de compostos artificiais. Este contato é estabelecido por diferentes mecanismos de transferência eletrônica extracelular, através do contato direto, ou de forma indireta.

Para que ocorra a transferência de forma direta, o micro-organismo precisa estar em contato com o eletrodo. Esta transferência é realizada por um conjunto de proteínas associadas à membrana celular identificada como citocromos, principalmente a do tipo *C* que possuem a capacidade de transportar os elétrons do interior dos micro-organismos para o meio extracelular (SCHRODER, 2007).

Este contato pode ser feito por estruturas condutoras produzidas por micro-organismos conhecidas como nano fios, que são estruturas parecidas com o pili, que conectam eletricamente a célula bacteriana a superfície do eletrodo. Este segundo mecanismo de transferência de elétrons foi observado em bactérias metal redutoras. Isto possibilita a utilização de biofilmes mais espessos sobre a superfície do eletrodo, pois ao contrario do que se pensava, os micro-organismos que estão mais afastado da superfície do eletrodo também podem participar da transferência de elétrons, pois as bactérias não eletroativas podem doar seus elétrons a uma outra célula eletroativa, ajudando assim na geração de energia (DEBABOV, 2008., SCHRODER, 2007).

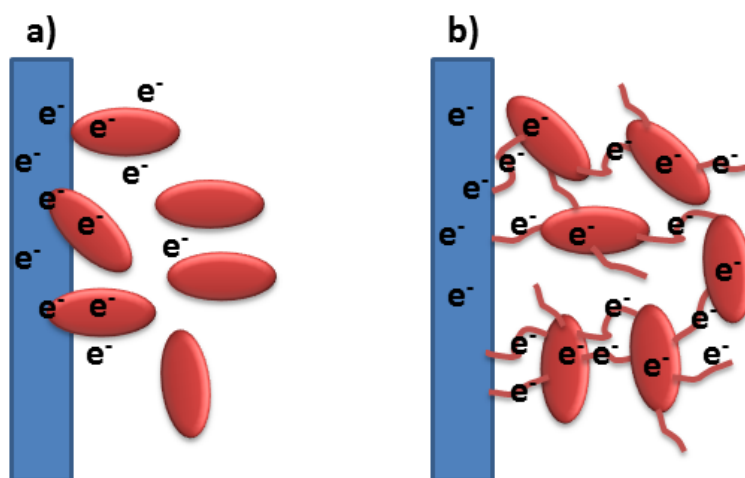


Figure 5: Formas de transferência de elétrons por micro-organismos: a) Transferência direta. b) Transferência feita através de nanofios.

Fonte: Acervo Pessoal

O mecanismo de transferência indireta se dá com a utilização de mediadores eletroquímicos, pois, alguns micro-organismos não possuem as estruturas necessárias para a transferência de elétrons (citocromos e nano fios), sendo assim incapazes de transferir elétrons até os eletrodos. Os mediadores eletroquímicos são compostos capazes de realizar reações de oxidação e redução reversivelmente, sendo assim capazes de transportar elétrons entre dois sítios de reações eletroquímicos diferentes. O mediador oxidado se difunde para o interior do micro-organismo, onde é reduzido. Em seguida o mediador já em sua forma reduzida, se difunde para fora da célula, onde libera seus elétrons voltando ao seu estado oxidado. Este processo se repete até todo substrato se exaurir (LOVLEY, 2006.; SCHRODER, 2007.; DANTAS et al 2013).

Existe uma grande variedade de compostos que tem a capacidade de serem utilizados como mediadores eletroquímicos, como alguns corantes como o azul de metileno e o vermelho de tolúeno e também alguns compostos como o EDTA e a Tionina. Porém alguns micro-organismos possuem a capacidade de utilizar alguns de seus metabólitos como um mediador. Também há evidências de que alguns micro-organismos podem utilizar mais de um mecanismo de transferência eletrônica extracelular, como foi evidenciado em *S. oneidensis* que são capazes de produzir nano fios e mediadores. Por estes motivos é de fundamental importância identificar o sistema de transporte de uma FC, a fim de melhorar sua eficiência na geração de energia (MARSILI et al., 2008., TORRES et al., 2010).

3.6. MICROALGAS

As algas são classificadas de acordo com sua coloração e suas substâncias de reserva em cinco grupos principais: Cyanophyceae (Algas azul 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.

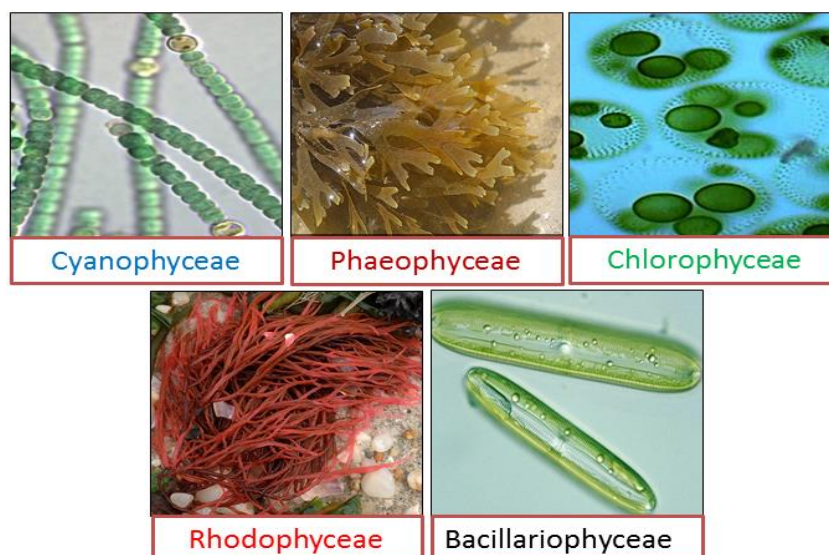


Figure 6: Classificação das algas de acordo com sua coloração e substâncias de reserva.

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

Dentre esta grande diversidade biológica destacam-se as microalgas. Estes micro-organismos 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 (LI et al., 2008.) Na ficologia aplicada o termo “microalga” se refere estritamente a algas microscópicas e a bactérias fotossintéticas aeróbias (Cianobactérias) (TOMASELLI, 2004).

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).

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 Carotenóides), 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 (MORAES, 2006.; CHISTI, 2007.; WIJFFELS e BARBOSA, 2010; FAROOQ et al 2015).).

Como qualquer matéria-prima, a utilização de microalgas possuem algumas vantagens, como: Produção durante todo o ano, permitem a utilização de terrenos marginais, não compete com a produção de alimentos, permite a 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 (CHISTI, 2007.; RUSSO, 2011).

3.7. *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*.

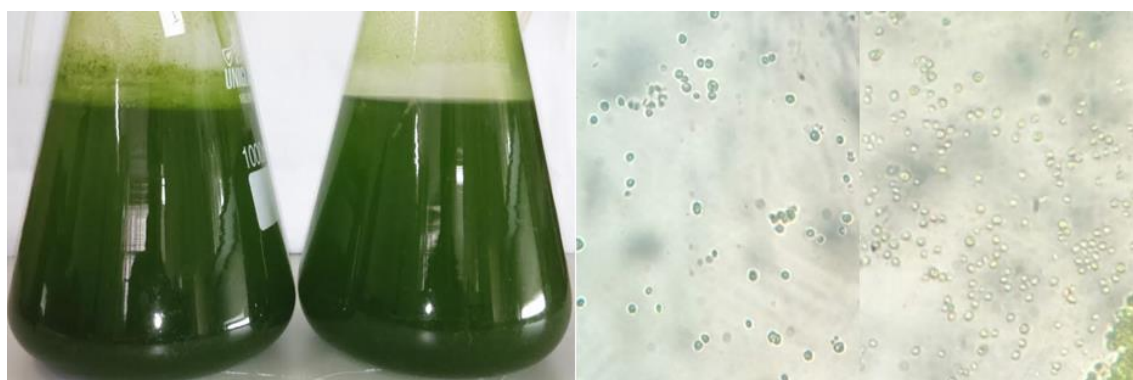


Figure 7: Cultura pura da microalga *Chlorella vulgaris*.

Fonte: Acervo Pessoal

A espécie descrita por Beijerinck, *C. vulgaris* (Figura 7) pertence à seguinte classificação científica: Domínio: Eukaryota, Reino: Protista, Divisão: Chlorophyta, Classe: Trebouxiophyceae, Ordem: Chlorellales, Família: Chlorellaceae, Gênero: *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, SHIHIRA e KRAUSS, 1965, NURACHMAN, et al. 2015).

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 unilaminar eletrônica-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 esporopoleína 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).

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-oxigenase (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).

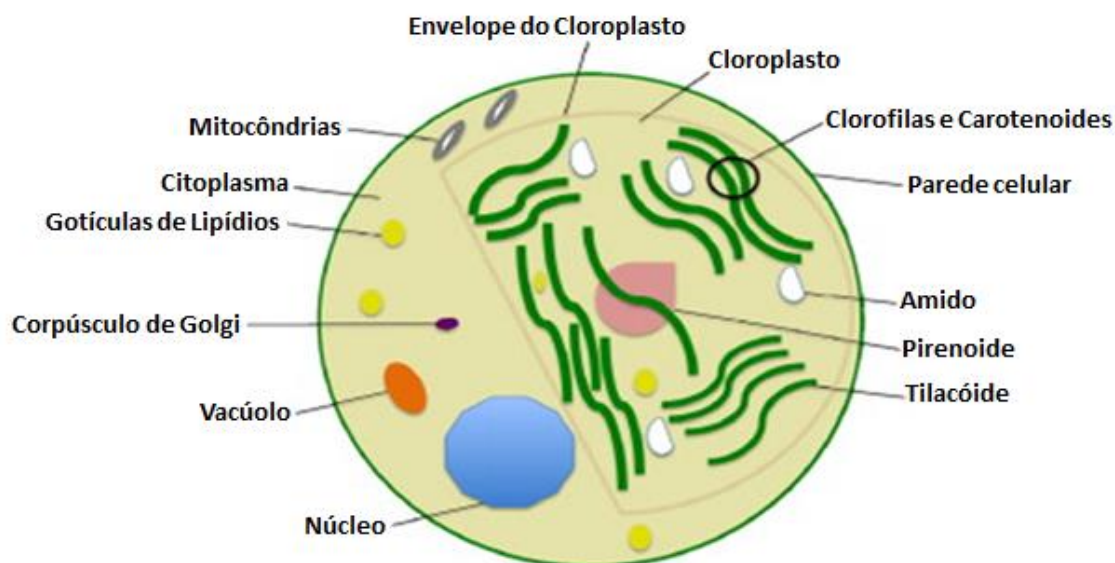


Figure 8: Esquema básico da organização celular das organelas da microalga *Chlorella vulgaris*.

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* dá 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-formadas (YAMAMOTO et al, 2004., 2005., SAFI et al 2014).

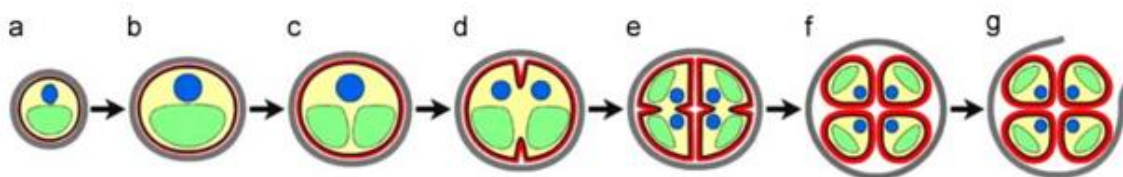


Figure 9: Fases da reprodução da *C. vulgaris*: (a) Crescimento celular precoce; (b) Crescimento celular com atraso; (c) Divisão do cloroplasto; (d) Início da divisão do protoplasto; (e) Final da divisão do protoplasto, (f) Maturação das células filhas; (g) Fase de incubação.

Fonte: SAFI et al 2014

3.8. 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).

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).

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).

4. BIBLIOGRAFIA

- 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, p. 10–15. 2010.
- BEYERINCK [BEIJERINCK], M.W. Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. **Botanische Zeitung**, v. 47, p. 725-739. 1890.
- BURCZYK, J.; HESSE, M. The ultrastructure of the outer cell wall-layer of *Chlorella* mutants with and without sporopollenin. **Plant Syst Evol**, v. 138, pp. 121–137. 2000.
- 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.
- 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, pp. 46–56. 2012.
- CHEAH, W. Y.; SHOW, P.L.; CHANG, J-S. LING, T. C.; JUAN, J. C. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. **Bioresource Technology**, v.184, p.190–201, 2015.
- CHEN, G.W.; CHOI, S.J.; CHA, J.H.; LEE, T.H.; KIM, C.W. Microbial community dynamics and electron transfer of a biocathode in microbial fuel cells. **Korean J. Chem. Eng.**, v. 27, pp. 1513–1520, 2010.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae, **Biotechnology Advances**, v. 25, pp. 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**, 160, pp. G1–G7, 2013.
- De SCHAMPHELAIRE, L.; RABAEY, K.; BOECKX, P.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. Outlook for benefits of sediment microbial fuel cells with two bio-electrodes. **Microb Biotechnol**, v.1, pp. 446–462, 2008.
- DEBABOV, V.G. Electricity from Microorganisms. **Microbiology**, v. 77, p. 123-131. 2008.
- 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.

DUTEANU, N.; ERABLE, B.; KUMAR, S.M.S. GHANGREKAR, M.M.; SCOTT, K. 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, pp. 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.

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.

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.

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, pp. 217–226. 2002.

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**, 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.

HO, S. H.; CHAN, M. C.; LIU, C. C.; CHEN, C.Y.; LEE, W. L.; LEE, D. J.; CHANG, J. 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.

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*, **Bioresour. Technol**, v.128, p. 359–364, 2013.

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

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, pp. 365–367, 1999.

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)

LOBATO, J.; DEL CAMPO, A.G.; FERNÁNDEZ, F.J.; CAÑIZARES, P.; RODRIGO, M.A. 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, pp. 1665–1671, 2010.

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

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.

LUOA, H.; LIUA, G.; ZHANGA, 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. RAHIMNEJAD, A.F. ISMAIL, J.X. LEONG, M. MISKAN, K. BEN LIEW, Effect of pretreatment and biofouling of proton exchange membrane on microbial fuel cell performance, **Int. J. Hydrogen Energy**, v. 38, p. 5480–5484, 2012.

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.

MCPHAIL, S.J.; AARVA, A.; DEVIANTO, H.; BOVE, R.; MORENO, A. SOFC and MCFC: 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.; NUNES, J.M.C.; PEREIRA, S.; NASCIMENTO, I.A. 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**. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos na sub-área de Bioprocessos em Alimentos. Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2006.

NURACHMAN, Z.; HARTINI H.; RAHMANYAH, W. R.; KURNIA, D.; HIDAYAT, R.; PRIJAMBOEDI, B.; SUENDOC, V.; RATNANINGSIH, E.; PANGGABEAN, L.M.G.; NURBAITI, S. Tropical marine *Chlorella* sp. PP1 as a source of photosynthetic pigments for dye-sensitized solar cells. **Algal Research**, n.10, p.25–32, 2015.

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.

PANDEY, A.; SINGH, P.; IYENGAR, L. Descoloração e degradação bacteriana de corantes azo. **Int. Biodeterior. biodegrad**, v.59, pp. 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.

PIENKOS, P.T. & DARZINS A.; The promise and challengers of microalgal-derived biofuels. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining* v.3, p.431-440, 2009.

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.

QUEK, S.B.;CHENG , L.;CORD-RUWISCH, R. Microbial fuel cell biosensor for rapid assessment of assimilable organic carbon under marine conditions. **water r e search**, v. 77, n. 64 e71, 2015.

RAHAMAN, M.S.A.; CHENG, L.H.; XU, X.H.; ZHANG, L.; CHEN, H. L. 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.; ALIREZA ZIREPOUR, A.; SANG-EUN OH. Microbial fuel cell as new technology for bioelectricity generation: A review. **Alexandria Engineering Journal** 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.

RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. **Blackwell Science Ltd**; 2004.

RUSSO, D.A.M.T. **Estudo do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual tratada, sob diferentes condições de fotoperíodo e temperature.** Dissertação apresentada à Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, para a obtenção do grau de Mestre em Energia e Bioenergia. 2001.

SAFI, C.; ZEBIB, 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.; MUSSGNUG, J.H. 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.

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.

TAN ZHONGFU, T.; CHEN, Z.; PINGKUO, L.; REED, B.; JIAYAO, Z. 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.; PARAMESWARAN, P.; KRAJMALNIK-BROWN, R.; RITTMANN, B.E. A kinetic perspective on extracellular electron transfer by anode-respiring bacteria, **FEMS Microbiology Reviews**, V.34, p.3-17. 2010.

UMBUZEIRO, G.D.A.; FREEMAN, H.S.; WARREN, S.H.; OLIVEIRA, D.P.; TERAQ, Y.; WATANABE, T.; CLAXTON, L.D. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais river. **Chemosphere**, v.60, p.55–64, 2005.

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

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

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 microal 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 sinthe autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta,Trebouxiophyceae). **JPlant**, 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,Trebouxio-phyceae). *Planta*; 221:766–75.2005.

ZAH, R.; BÖNI, H.; GAUCH, M.; HISCHIER, R.; LEHMANN, M.; WÄGER, P. **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.

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

ARTIGO I

Sequester of CO₂ and Power Generation in
Photosynthetic Fuel Cells of *Chlorella vulgaris*

* Manuscrito publicado no periódico **International Journal of Innovative Research in Engineering & Management (IJIREM)** ISSN: 2350-0557, Volume-2, Issue-5, September- 2015

Sequester of CO₂ and Power Generation in Photosynthetic Fuel Cells of *Chlorella vulgaris*

Davi de L. Cavalcanti Biologist, Postgraduate in Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Brazil;	Paulo H. da Silva Chemical Engineering Student, Catholic University of Pernambuco, Recife, Brazil,	Dr.Sérgio P. Ramos Polytechnic School of Pernambuco, University of Pernambuco, Brazil;	Dr.Camilo E. La Rotta H. Laboratory of Bioelectrochemistry, Catholic University of Pernambuco, Brazil;	Dra. Galba M.C.Takaki Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Catholic University of Pernambuco, Brazil;
---	--	---	---	--

ABSTRACT

The Photosynthetic Fuel Cell (PFC) is considered a promising new technology. This kind of Microbial Fuel Cell (MFC) uses microalgae as electron acceptors attached to the cathode compartment to decrease the operational costs with conventional MFC generating energy. Besides generate energy the microalgae have the ability to sequester atmospheric carbon dioxide by photosynthesis, and turn it into value-added biomass where the most valuable by-products are currently starch and lipids, which are the basis of the manufacture of biofuels such as bioethanol and biodiesel. In the present study the microalgae *Chlorella vulgaris* was used as an electron acceptor in a cathode compartment, where during ten days of experiments showed the amount of CO₂ captured by the algae cells (7mg L of CO₂). At the same time, the composition of the biomass was produced starch (3%) and lipids (70%), and electrochemical parameters such as coulombic efficiency (CE = 33.1%) and

the maximum current density (Id max = 147 mA cm²). The results confirmed the high potential of *C. vulgaris* in power generation PFC, and in the generation of products of industrial interest.

Keywords: Photosynthetic cathode, Biofuel cell, Microalgae.

1. INTRODUCTION

The modern world is totally dependent on fossil fuels; around 80% of all energy consumed in the world comes from this non-renewable energy source. Their use through the combustion process releases million tons of carbon dioxide into the atmosphere each day, aggravating the global warming process (Medeiros et al 2015).

Aiming to reduce the consumption of these fuels, several alternative technologies have been developed, among which we highlight the microbial fuel cell (MFC), which utilize the oxidation process of organic matter

by micro-organisms to generate electricity (Rahimnejad et al., 2011).

However, in recent years, a range of MFCs has been drawing considerable attention from researchers, calls the Photosynthetic Fuel Cells (PFC), which are photo bioreactors that utilize photosynthetic microorganisms as microalgae for the production of electricity. In this type of MFC, microalgae are used as electron acceptors in the cathode compartment where simultaneously atmospheric CO₂ is converted into biomass and O₂, helping to reduce the excessive amount of this gas into the atmosphere (Zhou et al, 2012).

The aim of the present study with microalgae *Chlorella vulgaris* was utilized in the cathode compartment of a photosynthetic fuel cell using atmospheric CO₂, as a single source of carbon for energy production and analysis of the biomass by-products such as polysaccharide starch and total lipids.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Configuration of the PFC

A bi-compartmentalized fuel cell was used as: a cathode compartment of 1L, an exploded carbon plate electrode with an area of 660 cm² immersed in the mineral culture medium, and the initial cell density of 3x10³ cell/mL-1 and exploded carbon electrode. Anode of 1L, with a exploded carbon electrode immersed in a potassium ferricyanide solution 20 mmol/L-1 and as a cation exchange system was used a salt bridge

of 5 cm on agar with KCl 3 M connecting the two compartments.

2.2 Photosynthetic Culture

The microalgae *C. vulgaris* was grown according to the modified method of Hernández 2014 in mineral medium with a relation C:N = 0,104 : 4,12 g/L-1 (Table 1), in 500 ml Erlenmeyer flasks with constant aeration, which were grown at room temperature (25° C) and illumination with photoperiod of 12 h – 12h (light / dark).

Cells were counted in a Neubauer chamber until they reached a density of 3 x 10⁻³ Cell/ml-1. The suspension was centrifuged, resuspended in distilled water, centrifuged again, and resuspended in mineral medium used in the cathode compartment of the PFC. The cathode was maintained at room temperature, continuous illumination and constant aeration.

Tabela 2: Composition of mineral medium used in the experiments with *C. vulgaris*.

Components	g/L
K ₂ HPO ₄	75.00 x 10 ⁻³
KH ₂ PO ₄	1.75 x 10 ⁻³
MgSO ₄	75.00 x 10 ⁻³
Urea	1.16 x 10 ⁻³
CaCl ₂	25.00 x 10 ⁻³
NaCl	25.00 x 10 ⁻³
EDTA	0.50 x 10 ⁻³
KOH	3.10 x 10 ⁻³
FeSO ₄	498.00 x 10 ⁻³
H ₂ SO ₄	1x 10 ⁻³ (mL)
Boric Acid	0.70 x 10 ⁻³
ZnSO ₄	706.00 x 10 ⁻³
MnCl ₂	116.00 x 10 ⁻³
CuSO ₄	126.00 x 10 ⁻³
Co(NO ₃) ₂	0.40 x 10 ⁻³
(NH ₄) ₂ MoO ₄	0.96 x 10 ⁻³

2.3 Chronoamperometric Analysis

The potential (E) vs. time (hours) It was recorded using a Fluke 8080 multimeter with data acquisition software FlukeView® (Fluke Corporation, USA). The data of the chronovoltammetry as potential were converted to current density (Id) using Ohm's Law equation (Equation 1), since an external load resistor of 1 kΩ was used.

$$Id = E \times R \quad (1)$$

2.4 Coulombic Efficiency Calculation (CE)

The coulombic efficiency (%) was calculated according to Equation 2, where CT is the theoretical amount that is obtained from each substrate and CR correspond to the actual amount obtained from each substrate and can be calculated by equation 3.

$$CE = CR/CT \quad (2)$$

$$CT = NZF \quad (3)$$

Where N is the number of moles of substrate, Z is the number of moles of electrons from the substrate and F is the Faraday constant (96.485.4 C mol⁻¹).

For a microbial fuel cell, it uses an integrated model Id vs. Time, generating Equation 4. Where M is the molar mass of the substrate, A = electrode area, V = total volume of the cathode compartment and ΔS the final concentration of the substrate (Morant et al 2014).

$$CE = (M \int_0^{tf} Id dt A) / (FZV_{AC/CC} \Delta S) \quad (4)$$

2.5 Measurement of CO₂ Dissolved

Carbon dioxide was quantified with Compact Kit® for CO₂ quantification of Alfakit, using 10 mL of the cultured medium every day for 10 days, obtaining the results in mg L⁻¹ CO₂.

2.6 Starch Content

The measurement of the amount of starch was carried out according to the proposed method in the article Appenroth 2010 which is based on a colorimetric method, where 200 mg of fresh biomass is homogenized in 4 mL of HCl at 18%. The suspension was stirred for 1 hour at 5 ° C and centrifuged for 20 min at 5000 g. Withdraw an aliquot which is mixed with the same volume of Lugol's solution (0,5% w / v of KI and 0,25% w / v of I₂ in water) and measure the absorbance at 605 and 530 nm. The amount of starch was calculated according to Equation 5.

$$S = ([Cs \times Vol_{(Ext)}] \times 100) / Fw \quad (5)$$

Where = A₆₀₅ / (0.07757 × P + 4.463) , P = (7.295 × A₆₀₅ / A₅₃₀ - 4.463) / (7.757 - 0.729 × A₆₀₅ / A₅₃₀) × 100, the V(ext) = Seaweed extract volume after homogenization (mL), FW = fresh weight (mg).

2.7 Extraction of Total Lipids

To determine the percentage of lipids contained in microalgae cells, we used

the method of Deven and Manocha (1980). Lyophilized biomass (100mg) was used for extraction total lipids using as solvents chloroform and methanol respectively in the following proportions, 2:1; 1:1 and 1:2 v/v. The extracts were evaporated using liquid nitrogen until total evaporation. The total lipids were calculated using the Equation 6, where T1 is the weight of the flask, and T2 is the weight of the flask after evaporation of the solvents, and B is the deep freeze lyophilize biomass until constant weight expressed in g/L.

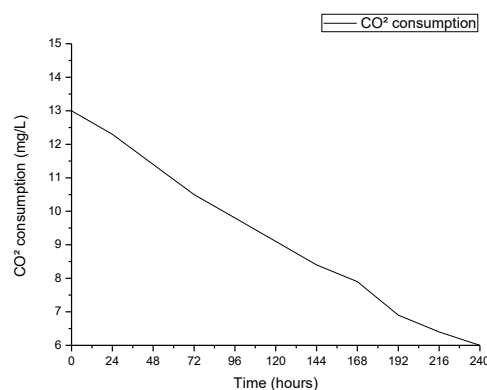
$$\text{Total Lipids (\%)} = (T2 - T1) / B \times 100\% \quad (6)$$

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 CO₂ Consumption

The consumption of CO₂ by the microalga *C. vulgaris* was accompanied by the end of the experiment showing an average daily consumption of 0.7 mg/L, consuming in the end of ten days of the experiment a total of 7 mg / L of CO₂ (Figure 1) which can be considered a good result taking into account of the volume and time of the experiment. Because is already a scientific knowledge that microalgae are responsible for the attachment of more than 50% of these gas in nature, as it have a photosynthetic efficiency 100 times higher than terrestrial plants (Pienkos and Darzins, 2009; Mendes et al., 2012).

Figura 1: CO₂ consumption by *C. vulgaris* during ten days of experiments in PFC.



3.2 Biomass Analysis

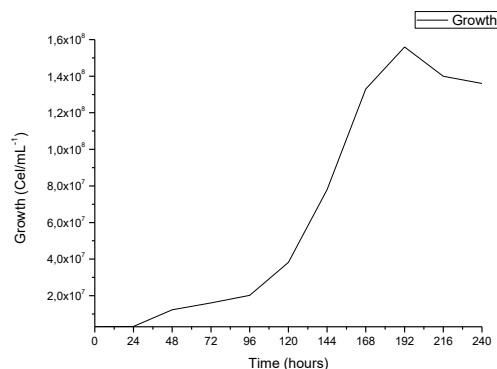
Cell growth was quite high throughout the experiment, growing exponentially until it reaches a maximum cell density of 156×10^6 Cell/mL⁻¹ (Figure 2), which shows a good adaptation to culture conditions and therefore a good accumulation of reserve material.

By analyzing, the composition of the biomass there was a small amount of starch, only 3%. However, the total lipid analysis revealed that the accumulation of this kind of storage material reached 70% of the total cellular. It is estimated that to produce 1kg of microalgae biomass, the fixing of about 1.83 kg of carbon dioxide is required (Jiang et al, 2013, Cheah et al 2015).

The accumulation of lipids may be influenced by various factors such as the initial amount of inoculum, lighting, pH, temperature and especially the C: N: P relations. For this ability to produce and accumulate lipids, *C. vulgaris* has been the target of several studies, as its fatty acids are good for

the production of biodiesel as well as its biomass is rich in other components such as proteins which leads to a food highly nutritious (Schenk, 2008).

Figura 2: *C. vulgaris* growth profile in PFC bioanode.

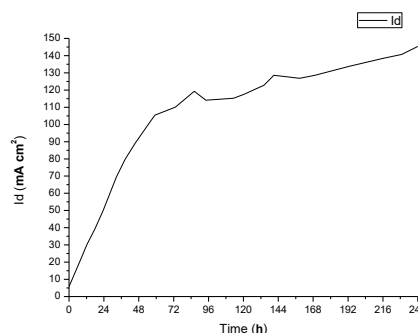


3.3 Electrochemical Analysis

The results of chronoamperometry (Figure 3) show an increasing power generation during the 10-day experiment, with two peaks (86 hours with 120 mA/cm² and 144 hours with 130 mA/cm²) followed by a small loss and resumption of growth reaching a maximum current density production, I_d max, of 147 mA/cm² and a CE = 33.1%, suggesting that the microalgae got a good efficiency in the use of CO₂ as a substrate for power generation. As a superior performance to the results reported by other authors, such as Caprariis in 2014, who obtained values of 0.20 mA/m², equivalent to 0.00002 mA/cm² using the same organism and similar experimental conditions and lower than the results obtained in conventional microbial fuel cells. Even with a yield slightly lower, the PFC

have some advantages, such as not requiring an organic substrate, they are powered exclusively by light, not emitting gases and consuming atmospheric carbon dioxide.

Figure 3: Chronoamperometric profile obtained from at PFC experiment with photosynthetic cathode of *C. vulgaris*.



4. CONCLUSION

The data obtained in this experiment further reinforce the great potential of the Photosynthetic fuel cells as an alternative to generate clean, renewable energy. Confirming that the use of a microalgae cathode as electron acceptor is feasible. The analysis of biomass also demonstrated that the microalgae has a great potential to sequester CO₂, which is a major cause of global warming, transforming it into commercially valuable products such as lipids which may be used in multiple areas and particularly in the generation of biofuels such as biodiesel.

5. ACKNOWLEDGMENTS

Our This work was financially supported by Higher Education Personnel Improvement Coordination (CAPES), National Counsel of

Technological and Scientific Development (CNPq), Support Foundation Science and Technology Pernambuco (FACEPE) and We are also grateful to the Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology (NPCIAMB), Catholic University of Pernambuco (Recife-PE, Brazil) for the use of its laboratories.

6. REFERENCES

- [1] Appenroth, K. J., Krech, K. , Keresztes, Á., Fischer, W., Koloczek, H., (2010) “Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation”, *Chemosphere* 78, pp 216–223.
- [2] De Caprariis, B., De Filippis, P., Di Battista, A., Di Palma, L., Scarsella, M., (2014) “Exoelectrogenic Activity of a Green Microalgae, *Chlorella vulgaris*, in a Bio-Photovoltaic Cells (BPVs)” *Chemical Engineering Transactions*, 38, pp 523-528.
- [3] Cheah, W.Y., Show, P.L., Chang, J-S., Ling, T. C., Juan, J. C., (2015) Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. *Bioresource Technology* 184. pp 190–201.
- [4] La Rotta C. E. H., Leite, A. L., Dantas, P. V., Ramos, S. P., De los Angeles Perez, M., Takaki, G. M. C., (2014) “Hybrid Microbial-Photosynthetic Biofuel Cells for Simultaneous Bacterial Glycerol Biotransformation and Algal Carbon Dioxide Capture”. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 25, No. 3, pp 560-571.
- [5] Medeiros, D. L., Sales, E. A., Kiperstok, A. 2015. “Energy production from microalgae biomass: carbon footprint and energy balance”, *Journal of Cleaner Production* 96, pp 493 - 500.
- [6] Manocha, M. S., San-blas, G., Centeno, S. 1980 Lipid Composition of *Pavacoccidioides brasiliensis*: Possible Correlation with Virulence of Different Strains. *Journal of General Microbiology*, 117, pp 147-154.
- [7] Mendes, M.C.Q., Gonzalez, A.A.C., Menezes, M., Nunes, J.M.C., Pereira, S., Nascimento, I.A. 2012. Coleção de microalgas de ambientes dulciaquícolas naturais da Bahia, Brasil, como potencial fonte para a produção de biocombustíveis: uma abordagem taxonômica. *Acta Botanica Brasilica* 26(3): pp 691-696.
- [8] Morant, K. V., Silva, P. H., Takaki, G. M. C., La Rotta C. E. H. 2014. Isolation and bioelectrochemical characterization of novel fungal sources with oxidasic activity applied in situ for the cathodic oxygen reduction in microbial fuel cells. *Enzyme and Microbial Technology* 66, pp.20–27.
- [9] Pienkos, P.T. & Darzins, A. 2009. The promise and challenges of microalgal-derived biofuels. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining* 3: pp 431-440.
- [10] Rahimnejad, M., Ghoreyshi, A.A., Najafpour, G., Jafary, T. 2011. Power generation from organic substrate in batch and continuous flow microbial

fuel cell operations. *Applied Energy* 88, pp 3999–4004.

[11] Schenk, P.M., Thomas-Hall, S.R., Stephens, E., Marx, U., Mussgnug, J.H. 2008. Second generation biofuels: highefficiency microalgae for biodiesel production. *Bioenergy Res*, 1, pp. 20–43.

[12] Jiang, Y. L., Zhang, W., Wang, J. F., Chen, Y., Shen, S. H., Liu, T. Z.

2013. Utilization of simulated flue gas for cultivation of *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresour.Technol.*128, pp 359–364.

[13] Zhou, H., He, H., Jin, T., Wang, H. 2012. Power generation enhancement in novel microbial carbon capture cells with immobilized *Chlorella vulgaris*. *Journal of Power Sources* 214. pp 216 e 219.

CAPÍTULO 3

ARTIGO II

**Otimização das Condições de Cultivo de *Chlorella vulgaris*
para a Geração de Energia, Acumulação de Amido e Lipídios
em Célula a Combustível Fotossintética**

* Manuscrito a ser submetido ao periódico **Bioresource Technology**

Otimização das Condições de Cultivo de *Chlorella vulgaris* Para Geração de Energia, Acumulação de Amido e Lipídios em Célula a Combustível Fotossintética

Davi Cavalcanti ^a; Camilo La Rotta ^b; Galba M. Campos-Takaki ^c

^a Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. ^b Laboratório de Bioeletroquímica - Universidade Católica de Pernambuco, Brasil. Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais e Biotecnologia - Universidade Católica de Pernambuco, Brasil.

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 diminuindo assim seus custos. 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 e a concentração de nitrogênio do meio de cultivo seguindo um planejamento fatorial completo 2², durante 10 dias. Nossos resultados demonstram que a iluminação é o fator que mais influi na geração de energia onde foram obtidos valores de densidade de corrente máxima $I_{d_{max}} = 178 \text{ mA/cm}^2$ e eficiência coulômbica de 42.5%, bem como uma acumulação máxima de amido de 38% e 77% de lipídios, demonstrando que a utilização de um cátodo fotossintético é viável para produção de energia e também para produção de metabólitos com alto valor comercial.

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

1. Introdução

A demanda por energia tem crescido bastante nas últimas décadas devido ao aumento da população e a melhora nos seus padrões de vida. Grande parte desta energia é oriunda de fontes não renováveis como o petróleo. A contínua utilização destas fontes causará em longo prazo um colapso da matriz energética mundial. Além da utilização desta fonte causar um grande impacto ao meio ambiente, poluindo ecossistemas inteiros e contribuindo com o aquecimento global (Campos et al 2015).

Contudo, novas tecnologias para geração de energia limpa vêm sendo desenvolvidas, uma das mais promissoras são as células a combustível (CC). Esta tecnologia utiliza equipamentos que convertem a energia química em energia elétrica sem a necessidade de combustão e com maior eficiência do que as atuais tecnologias e sem a emissão de poluentes. Porém, esta tecnologia tem algumas limitações, como por exemplo, os custos

operacionais do sistema que são altos, pois utilizam materiais de alto valor como a platina, dificultando assim sua utilização em larga escala (Tan zhongfu et al, 2015).

Devido a todos estes problemas, tecnologias que utilizem fontes alternativas para geração de energia vêm ganhando espaço no cenário energético mundial. Dentre estas tecnologias promissoras destacam-se as células a combustível microbianas (CCM), que são biorreatores que utilizam a energia armazenada em compostos orgânicos e a convertem em energia elétrica através de reações eletrocatalizadas por micro-organismos (Rahimnejad et al., 2011). Dentro desta tecnologia existem algumas variações que conseguem diminuir os custos operacionais do sistema acoplando a produção de insumos de alto valor comercial a produção de energia. Esta variação da CCM é chamada de células a combustível fotossintéticas (CCF).

Estes equipamentos utilizam organismos fotossintetizantes que atuam como biocatalizadores utilizando o processo natural da fotossíntese para melhorar a produção de eletricidade. Esta tecnologia consegue acoplar a produção de energia a produção de compostos com alto valor comercial como o amido e lipídios que podem ser utilizados para produzir biocombustíveis como o etanol e o biodiesel. Estes organismos também tem a capacidade de sequestrar o dióxido de carbono em excesso na atmosfera e converte-lo em biomassa, diminuindo assim parte das emissões de CO₂ (Chandra et al, 2012.; El mekawya, 2014).

No presente estudo a microalga *Chlorella vulgaris* foi utilizada no compartimento catódico de uma célula a combustível fotossintética, utilizando o CO₂ atmosférico como única fonte de carbono, para a produção de energia subprodutos da biomassa, como amido e lipídios totais.

2. Materiais e Métodos

2.1. 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.

2.2. 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 (Tabela 3), 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).

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 mantido em temperatura ambiente, iluminação contínua e aeração constante.

2.3. 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. 1), uma vez que uma resistência de carga externa de 1 kΩ foi empregada.

$$Id = E \times R \quad (1)$$

2.4. Cálculo da Eficiência Coulômbica (CE)

A eficiência coulômbica (%) foi calculada de acordo com a Eq. 2. 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. 3.

$$CE = CR / CT \quad (2)$$

$$CT = NZF \quad (3)$$

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. 4. 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).

$$CE = (M \int_0^{tf} Id dt A) / (FzV_{AC/CC} \Delta S) \quad (4)$$

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. 5.

$$S = ([Cs \times Vol (Ext)] \times 100) / Fw \quad (5)$$

Onde $Cs = A605 / ((0,07757 \times P + 4,463))$, $P = ((7,295 \times A605 / A530 - 4,463)) / ((7,757 - 0,729 \times A605 / A530)) \times 100$, o Vol (ext) = volume do extrato da alga após a homogeneização (mL), FW = peso fresco (mg).

2.6. Análise de Lipídios Totais

Para determinar a porcentagem de lipídios contido nas células de microalgas, foi utilizado o método de Manocha 1980. Utilizando 100 mg de biomassa liofilizada, realizou-se uma extração com clorofórmio e metanol respectivamente nas seguintes proporções, 2:1; 1:1 e 1:2 v/v. 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. 6, 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.

$$\text{Lipídios Totais (\%)} = (T2 - T1) / B \times 100\% \quad (6)$$

2.7. Planejamento Fatorial

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 fotoperíodo sobre a variável resposta produção de amido, lipídio e intensidade de corrente. As variáveis e seus níveis estão codificados da seguinte maneira: Tempo de Iluminação - Níveis Inferior (-) = Sem iluminação, Superior (+) = Iluminação 24 horas, Ponto central (0) = iluminação com fotoperíodo de 12 horas. Concentração de Nitrogênio $[N_2]$ - 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.

3. Resultados e discussão

3.1. Análises eletroquímicas

As análises de cronoamperometria realizadas durante dez dias de experimento nas condições específicas do planejamento fatorial 2^2 apresentaram padrões específicos de geração de energia (Figura 10). Constatou-se que a iluminação é um dos parâmetros mais importantes na eficiência de uma CCF, pois o mesmo influi significativamente na geração de energia. Esta influência positiva da luz também foi evidenciada por GOUVEIA et al 2014, que obtiveram um aumento na produção de energia utilizando uma CCF de *C. vulgaris*.

Nos ensaios onde não houve iluminação apresentaram o mesmo perfil de cronoamperometria (ensaios 1 e 2), pois ocorreu a morte de todas as microalgas e consequentemente a não geração de corrente (Figura 1a.). Nos demais experimentos com iluminação foram os que apresentaram boa eficiência e os picos de correntes mais altos. Nos ensaios do ponto central (Figura 1b.) houve o maior pico, chegando a 180 mA/cm² e uma eficiência coulômbica de 42.2%. No ensaio 3 (Figura 1d.), os experimentos foram conduzidos com a concentração mínima de nitrogênio e iluminação 24 horas por dia, a geração de energia cresceu abruptamente até atingir sua densidade máxima de corrente 160 mA/cm², durante as primeiras 48 horas de experimento, seguido de uma estabilidade da corrente produzida até o fim do experimento, alcançando uma eficiência coulômbica $C_E = 42.5 \%$. O ensaio 4 (Figura 1c.) gerou um pico de corrente de 178 mA/cm², porém sua eficiência foi um pouco abaixo das demais, chegando a uma eficiência $C_E = 34.6\%$. Porém, estes resultados são superiores aos obtidos por Caprariis em 2014, que obteve valores de 0.20 mA/m², que equivalem a 0.00002 mA/cm² e Cavalcanti et al 2015 que obteve picos de correntes de $I_{d\ max} = 147$ mA/cm² utilizando o mesmo organismo e condições experimentais semelhantes.

3.2. Análise da biomassa

A figura 11 mostra os resultados da produção de amido e lipídios obtidos após 10 dias de experimentos nas diversas condições do planejamento fatorial. Após a análise da biomassa constatou-se um aumento considerável no acúmulo de amido e lipídios na biomassa da microalga *C. vulgaris*, em relação ao estudo base para este experimento publicado por Cavalcanti et al 2015. Todos os ensaios exceto os ensaios 1 e 2 apresentaram boas porcentagens de acúmulo de amido e lipídios onde o ensaio 4 e o ponto central, apresentaram as maiores produções de lipídios (77%) e o ensaio 3 a maior concentração de amido 32%. Porém nos ensaios sem iluminação não houve crescimento. A importância da iluminação e da concentração de nitrogênio está evidenciada nos diagramas de Pareto (Figura 12).

Os efeitos estimados do tempo de iluminação e a concentração de nitrogênio sobre o acúmulo de amido e 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 12. Segundo Cuellar-Bermudez et al 2015, 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 nitrogênio. Assim ao testar dois destes fatores, luz e concentração de nitrogênio, o tempo de iluminação foi o mais significativo na produção e acúmulo do amido (Figura 12a). E de todas as condições aplicadas ao planejamento, a condição do ensaio 3 foi a que obteve a maior concentração deste carboidrato de reserva, alcançando um acúmulo de 32% de amido.

Porém, a análise da biomassa também revelou que a interação entre o tempo de iluminação e a concentração de nitrogênio mostrou uma influência significativa na produção de lipídios (Figura 3b). Ao mesmo tempo, ambos os fatores independentemente foram estatisticamente significativos. Esta influência também é relatada por Khoeyi et al., 2012 e Gouveia et al 2014, que 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 e os nutrientes são os parâmetros mais importantes.

4. Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho mostram a viabilidade de se utilizar uma CCF de *C. vulgaris* para gerar energia, podendo ser utilizada como um substituto viável as formas tradicionais de geração de energia. Também evidencia a grande capacidade da microalga *C. vulgaris* em acumular metabolitos de grande valor comercial como amido e lipídios que agregam valor a esta tecnologia, podendo ser utilizados na produção de biocombustíveis como o etanol e o biodiesel e assim diminuir ainda mais os custos de implementação das CCFs.

5. Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) – Projeto: (CNPq e FACEPE DCR No. 0008-1.06/11), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Projeto: (CNPq Universal No. 474997/2012-0.) pelo suporte financeiro. Ao O Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB – UNICAP), Por ceder as instalações de pesquisa. Ao Laboratório de Combustíveis e Energia (POLICOM –UPE) Por ceder as microalgas utilizadas neste trabalho.

6. Bibliografia

Appenroth, K. J.; Krech, K.; Keresztes, Á.; 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. 2010. *Chemosphere*, v.78, p. 216–223.

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

Cuellar-bermudez, S.P.; Romero-ogawa, M.A.; Yenjung, V.; Lai, S.; Rittmann, B.E.; Parra-saldivar, R. Effects of light intensity and carbon dioxide on lipids and fatty acids produced by *Synechocystis* sp. PCC6803 during continuous flow. 2015. *Algal Research*, v. 12, p.10–16.

Del campo, A.G.; Perez, J.F.; Cañizares, P.; Rodrigo, M.A.; Fernandez, F.J.; Lobato, J. Characterization of light/dark cycle and long-term performance test in a photosynthetic microbial fuel cell. 2015. *Fuel*, v.140, p. 209–216.

El mekawya, A.; Hegab, H.M.; Vanbroekhoven, K.; Pant, D. Techno-productive potential of photosynthetic microbial fuel cells through different configurations. 2014. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 39, p.617–627.

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. 2014. *Bioresource Technology*, v. 154, p. 171–177.

Khoeyi, Z.A.; Seyfabadi, J.; Ramezanpour, Z. Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. 2012. *Aquacult. Int.*, v.20, p. 41–49.

La rotta, C. E. H.; Leite, A. L.; Dantas, P. V.; Ramos, S. P.; de Los angeles, M. P.; Takaki, G. M. C. Hybrid Microbial-Photosynthetic Biofuel Cells for Simultaneous Bacterial Glycerol Biotransformation and Algal Carbon Dioxide Capture. 2014. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 25, n. 3, p 560-571.

Manocha, M. S.; San-blas, G.; Centeno, S. Lipid Composition of *Pavacoccidioides brasiliensis*: Possible Correlation with Virulence of Different Strains. 1980. *Journal of General Microbiology*, v.117, p. 147-1 54.

Morant, K.V.; Silva, P.H.; Takaki, G.M.C.; La rotta, C.E. H. Isolation and bioelectrochemical characterization of novel fungal sources with oxidasic activity applied in situ for the cathodic oxygen reduction in microbial fuel cells. 2014. *Enzyme and Microbial Technology* 66, pp. 20–27.

Rahimnejad, M.; Ghoreyshi, A. A.; Najafpour, G.; Jafary, T. Power generation from organic substrate in batch and continuous flow microbial fuel cell operations. 2011. *Applied Energy*, v.88, p. 3999–4004.

Shih-hsin, H.; Shu-wen, H.; Chun-yen, C.; Hasunuma, T.; Kondo, A.; Jo-shu, C. Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga *Chlorella vulgaris* FSP-E. 2013. *Bioresource Technology*, v. 135, p. 157–165.

Tan Zhongfu, T.; Chen, Z.; Pingkuo, L.; Reed, B.; Jiayao, Z. Focus on fuel cell systems in China. 2015. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.47, p. 912–923.

7. Anexo (tabelas e figuras)

Tabela 3: Composição do meio mineral utilizado no cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*.

Componentes	g/L
K ₂ HPO ₄	75.00 x 10 ⁻³
KH ₂ PO ₄	1.75 x 10 ⁻³
MgSO ₄	75.00 x 10 ⁻³
Uréia	1.16 x 10 ⁻³
CaCl ₂	25.00 x 10 ⁻³
NaCl	25.00 x 10 ⁻³
EDTA	0.50 x 10 ⁻³
KOH	3.10 x 10 ⁻³
FeSO ₄	498.00 x 10 ⁻³
H ₂ SO ₄	1x 10 ⁻³ (mL)
Ác. Bórico	0.70 x 10 ⁻³
ZnSO ₄	706.00 x 10 ⁻³
MnCl ₂	116.00 x 10 ⁻³
CuSO ₄	126.00 x 10 ⁻³
Co(NO ₃) ₂	0.40 x 10 ⁻³
(NH ₄) ₂ MoO ₄	0.9610 ⁻³

Tabela 4: Matriz do planejamento fatorial completo 2²

Ensaios	Tempo de Iluminação	[N]g/L ⁻¹
1	-	-
2	-	+
3	+	-
4	+	+
Ponto Central	0	0

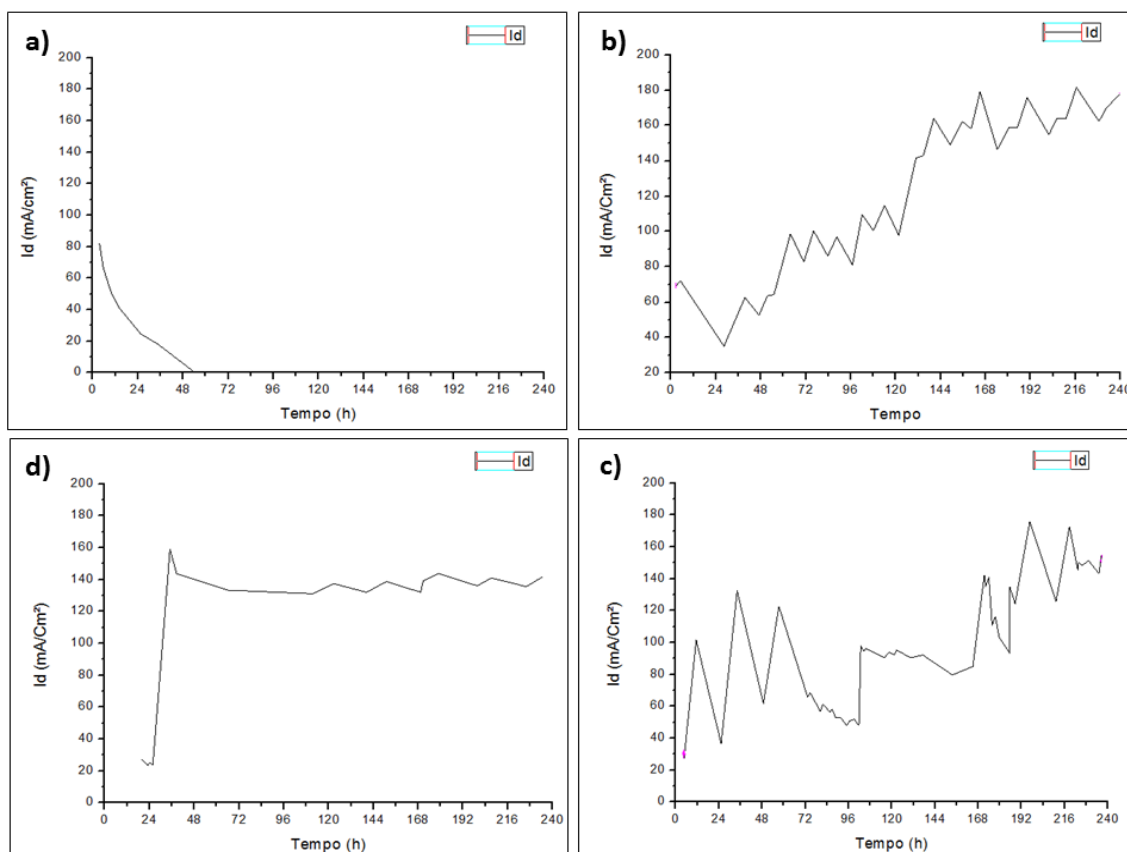


Figure 10: Perfil cronoamperométrico de uma CCF com cátodo de microalga *C. vulgaris* em diversas condições de cultivo. a) Ensaios 1 e 2: Sem iluminação b) Ponto central: Fotoperíodo de 12 horas e $[N]=5,42\text{g/L}$. c) Ensaios 3: iluminação 24 horas e $[N]=2,6\text{g/L}$. d) Ensaios 3 com iluminação 24 horas e $[N]=8,24\text{g/L}$.

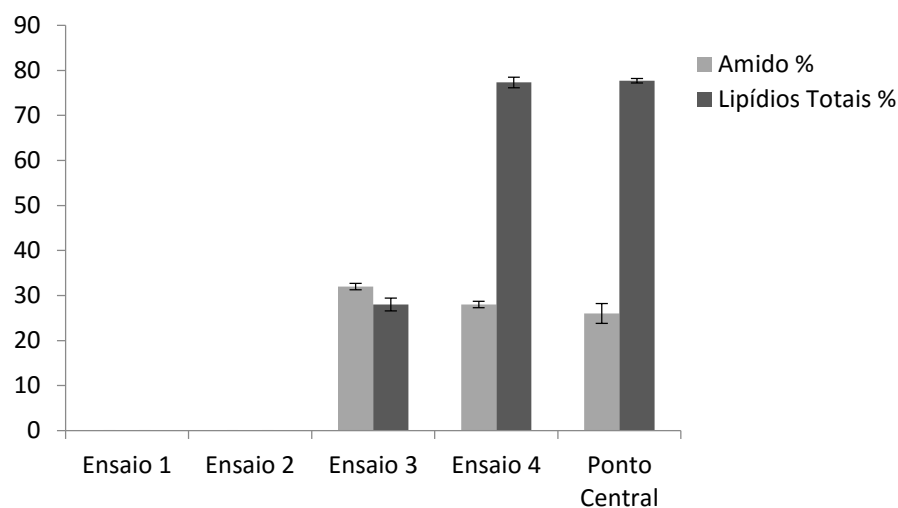


Figure 11: Porcentagem de amido e lipídios em *C. vulgaris* cultivadas em diversas condições de cultivo seguindo o planejamento fatorial 2^2

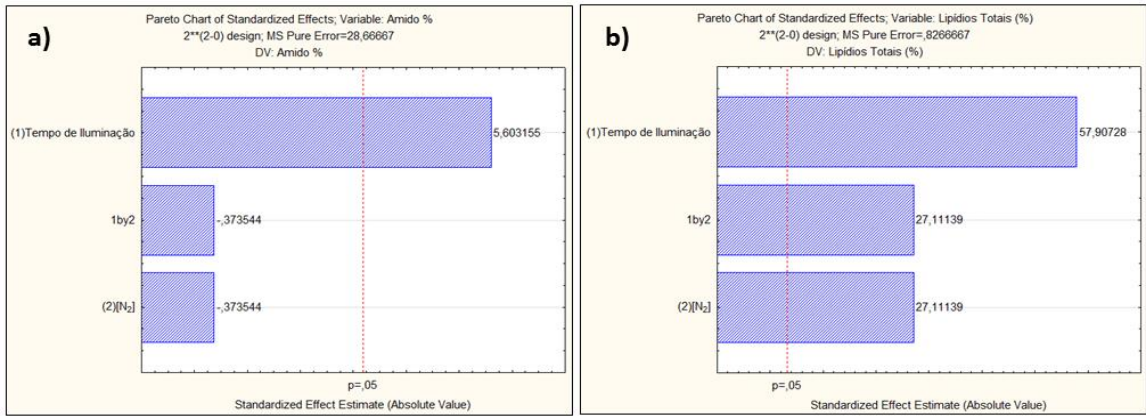


Figure 12: Diagrama de Pareto ilustrando os efeitos das interações entre as variáveis independente intensidade luminosa e concentração de nitrogênio sobre a variável resposta acúmulo de amido (a) e lipídios (b).

CONCLUSÕES GERAIS

A partir do desenvolvimento das atividades experimentais e resultados obtidos com *Chlorella vulgaris*, conclui-se:

- Elevado potencial das células a combustível fotossintéticas como uma forma viável na geração de energia limpa e renovável;
- Eficiência de um sistema de biocátodo de *Chlorella vulgaris*, em uma CCF;
- Comprovar a eficiência da fixação do dióxido de carbono pela microalga convertendo-o em produtos comercialmente valorizados como amido e lipídios;
- Otimização da produção de energia em uma célula a combustível fotossintética;
- Ao alterar as condições de cultivo da microalga em um biocátodo, os percentuais de acumulação celular de amido e lipídios sua produção e acúmulo aumentaram consideravelmente;
- Produção otimizada da matéria-prima para a fabricação de biocombustíveis como o etanol e o biodiesel.
- Os subprodutos gerados no processo de produção de energia, demonstra valorização do bioprocessos, redução dos custos compensando assim parte dos gastos operacionais, viabilizando a implantação do sistema de CCF em escala semindustrial.

ANEXOS

1.1. Regras de formatação de artigos a serem submetidos ao periódico Bioresource Technology

PREPARATION

Manuscript Preparation

General: Authors must follow guide for authors strictly, failing which the manuscripts would be rejected without review. Editors reserve the right to adjust the style to certain standards of uniformity.

Structure:

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, Figure Captions, Tables and Figures. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be avoided. Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article and do not include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise.

Text Layout:

Use double spacing and wide (3 cm) margins on white paper. (Avoid full justification, i.e., do not use a constant right-hand margin.) Ensure that each new paragraph is clearly indicated. Present tables and figure legends on separate pages at the end of the manuscript. If possible, consult a recent issue of the journal to become familiar with layout and conventions. Number all pages consecutively, use 12 pt font size and standard fonts.

Page length:

Maximum page length should be 15, 35 and 40 pages for Short Communication, Original article/case study and review paper, including text, references, tables and figures. Each figure and table must be put separately on a single page.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

Article structure:

Subdivision - numbered sections Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing; do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results and Discussion

Results should be clear and concise, and be part of a single section, discussing the significance of the results of the work, not repeat them. Extensive citation and discussion of the published literature should be avoided.

Conclusions

The main conclusions drawn from results should be presented in a short Conclusions section (maximum 100 words).

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address.

Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address

If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes. There can be only one person as corresponding author and manuscript must be submitted by the corresponding author in EES.

Abstract

A concise and factual abstract is required. Each paper should be provided with an abstract of about 100-150 words. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone.

For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <https://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <https://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords to be included in an article, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following

formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used. Note that the maximum number of figures allowed for Original article, case study, and review papers is 6. Multiple figures can be expressed as one figure (for e.g. 1a, 1b, 1c etc...), while retaining the maximum limit of 6. The Journal discourages publication of simple one line graphs/figures, pattern figures, conventional spectra (X-ray, FTIR, UV, NMR, etc) and SEM photographs of a routine nature.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article. Note that

the maximum number of figures allowed for Original article, case study, and review papers is 6. The Journal discourages publication of simple one parameter tables; such information should be preferably described in the text itself.

References

Maximum 20, 35 and 75 references for short communication, original research paper/case study and review papers, respectively.

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley

(<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as

citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/bioresource-technology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically).

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically, THEN NUMBERED NUMERICALLY, and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci.Comm.* 163, 51–59. Reference to a book: Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York. Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

References in the list should be placed first alphabetically, then numbered chronologically.

1. Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

2. Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. The Elements of Style, fourth ed. Longman, New York.
3. Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. J. Sci. Commun. 163, 51-59.
- 4....