

**Universidade Federal de São Carlos**  
**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde**  
**Departamento de Botânica**  
**Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais**

**Cultivo de *Chlorella sorokiniana* exposta a gases de combustão (CO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> e SO<sub>2</sub>):  
crescimento, fotossíntese e bioquímica**

Eduardo Caffagni de Camargo

São Carlos – 2016

**Universidade Federal de São Carlos**  
**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde**  
**Departamento de Botânica**  
**Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais**

**Eduardo Caffagni de Camargo**

**Cultivo de *Chlorella sorokiniana* exposta a gases de combustão (CO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> e SO<sub>2</sub>):  
crescimento, fotossíntese e bioquímica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Teresa Lombardi**

**São Carlos – 2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C172c Camargo, Eduardo Caffagni de  
Cultivo de Chlorella sorokiniana exposta a gases  
de combustão (CO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> e SO<sub>2</sub>) : crescimento,  
fotossíntese e bioquímica / Eduardo Caffagni de  
Camargo. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
47 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de  
São Carlos, 2016.

1. Chlorella sorokiniana. 2. Cimento. 3. Gases de  
combustão. 4. Fluorescência. 5. Fotossíntese. I.  
Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Eduardo Caffagni de Camargo, realizada em 14/03/2016:

---

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi  
UFSCar

---

Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão  
UFSCar

---

Profa. Dra. Silvia Helena Govoni Brondi  
CEDIN

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela conclusão desta importante etapa da minha formação acadêmica.

Aos meus pais, pelo amparo emocional nos momentos difíceis.

Aos colegas de laboratório, pela inestimável companhia e auxílio nas atividades diárias.

Ao técnico Carlos A. Casali, pelos valiosos conselhos de ordem teórica e prática.

À professora Ana Teresa Lombardi, pela paciência e por todo o conhecimento compartilhado ao longo dos últimos anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro a esta pesquisa.

## RESUMO

Inserida na problemática do aquecimento global, a indústria de cimento é uma das que mais contribui para emissão de CO<sub>2</sub> e de poluentes como SO<sub>2</sub> e NO<sub>2</sub> na atmosfera. Visando alternativas para mitigação desses gases, que são oriundos principalmente de processos de combustão, foram testados seis cultivos fototróficos semicontínuos de *Chlorella sorokiniana*, para avaliar o efeito de diferentes volumes (0,1; 0,3; 0,8; 1,5; 6 e 48 L d<sup>-1</sup>) de uma simulação gasosa composta por CO<sub>2</sub> (18%), O<sub>2</sub> (9%), NO<sub>2</sub> (300 ppm) e SO<sub>2</sub> (140 ppm). Os volumes variaram conforme o aumento do tempo de borbulhamento diário dos gases nos cultivos. O tratamento controle, composto por ar sintético e CO<sub>2</sub> (18%), teve seu tempo de borbulhamento definido pela variação de pH do meio. O fornecimento da simulação gasosa resultou na acidificação do meio de cultura e afetou a densidade celular, a atividade fotossintética, a viabilidade celular e a composição bioquímica de *C. sorokiniana*. Comparadas ao controle, as exposições diárias de 6 e 48 L gás d<sup>-1</sup> reduziram a taxa específica de crescimento em 17 e 39%, respectivamente. Por meio da fluorescência de amplitude modulada (PAM), verificamos baixos valores de rendimento quântico máximo ( $\Phi_M$  0,40) e operacional ( $\Phi'_M$  0,47) um dia após o primeiro borbulhamento de 48 L gás. Curvas de saturação de luz confirmaram os efeitos negativos do estresse prolongado à mistura gasosa. A análise de decaimento da fluorescência da clorofila, por sua vez, indicou um aumento da energia luminosa direcionada à fotoquímica da fotossíntese (qP) e baixos valores de dissipação não fotoquímica da energia luminosa (qN e NPQ). A simulação gasosa resultou, ainda, em menor viabilidade celular, se comparada ao controle. Pelas análises bioquímicas, constatamos que 6 e 48 L gás d<sup>-1</sup> levaram a um aumento significativo do conteúdo proteico de 75% e 154%, respectivamente; os mesmos tratamentos também aumentaram a quantidade de carboidratos totais em 148% e 195%. Apesar das alterações fisiológicas, *C. sorokiniana* resistiu às condições subótimas de crescimento, o que comprova sua robustez e relevância em aplicações biotecnológicas envolvendo gases de combustão.

**Palavras-chave:** *Chlorella sorokiniana*. Cimento. Gases de combustão. Fluorescência. Fotossíntese. Viabilidade celular. Proteínas. Carboidratos.

## ABSTRACT

The cement industry, closely associated with the global warming question, accounts for significant emissions of CO<sub>2</sub> and other air pollutants, such as SO<sub>2</sub> and NO<sub>2</sub> in the atmosphere. In search for ways to mitigate the atmospheric CO<sub>2</sub>, we performed semi-continuous cultures of *Chlorella sorokiniana* under phototrophic conditions to test the effect of a flue gas simulation (18% CO<sub>2</sub>, 9% O<sub>2</sub>, 300 ppm NO<sub>2</sub> and 140 ppm SO<sub>2</sub>). This was provided once a day in six serial experiments, in which the exposure to the gas was increased through the increase of bubbling time. A constant flow rate allowed us to calculate the total volume of gas introduced into the system each day (0.1, 0.3, 0.8, 1.5, 6 and 48 L). Air-CO<sub>2</sub> (18%) was used as control and its bubbling time was pH-regulated. Culture medium acidification led to suboptimal growth conditions that affected cell density, photosynthetic activity, cell viability and the biochemical composition of *C. sorokiniana*. Compared to control, the specific growth rate decreased by 17 and 39% in cultures that received 6 and 48 L gas d<sup>-1</sup>, respectively. The pulse-amplitude modulated (PAM) fluorometry was used for culture evaluation. It revealed low maximum quantum yield ( $\Phi_M$  0.40) and operational quantum yield ( $\Phi'_M$  0.47) values one day after 48 L gas bubbling. Light saturation curves confirmed the negative effects of long-time gas simulation stress. On the other hand, quenching analysis indicated an increase in photochemical light use and low values of non photochemical quenching (qN and NPQ). Exposure of the cells to the flue gas simulation resulted in lower cell viability compared to control. Biochemical analysis showed that 6 and 48 L gas d<sup>-1</sup> significantly increased protein content by 75% and 154%, respectively; total carbohydrates also increased in the presence of the gas, 148% and 195%, respectively. Despite the physiological changes, *C. sorokiniana* resisted suboptimal growth conditions imposed by the gas, supporting its vigorous nature and relevance in biotechnological applications with flue gases.

**Keywords:** *Chlorella sorokiniana*. Cement flue gases. Fluorescence. Photosynthesis. Cell viability. Proteins. Carbohydrates.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática da série de cultivos semicontínuos. A repicagem de células foi realizada em 72 h do cultivo anterior para novos meios esterilizados, sempre em triplicata. O tempo de borbulhamento ininterrupto de gás aumentou ao longo dos diferentes cultivos. .... 16
- Figura 2.** (a) Cilindro utilizado no armazenamento da simulação de gases de combustão (SGC). A ele foi acoplado um regulador de pressão de duplo estágio. Regulada a pressão, o gás era conduzido ao sistema de regulação de fluxo, de onde seguia para as culturas de microalgas. (b) Cultivo de *C. sorokiniana* em frascos de vidro de 500 mL. O borbulhamento de gases foi simultâneo em todas as três réplicas..... 17
- Figura 3.** Representação esquemática dos cinco níveis de fluorescência, em unidades relativas (RFU), obtidos a partir da fluorometria PAM: fluorescência máxima em adaptação ao escuro ( $F_m$ ); fluorescência máxima em adaptação à luz ( $F'_m$ ); fluorescência mínima em adaptação ao escuro ( $F_o$ ); fluorescência mínima em adaptação à luz ( $F'_o$ ) e fluorescência em estado estável de transporte de elétrons ( $F_s$ ). Quatro tipos de luz são usados durante as leituras: luz modulada (LM); pulso saturante (PS); luz actínica (LA) e luz na faixa do vermelho-extremo (VE)..... 18
- Figura 4.** Curva-padrão de absorvância (Abs) para determinação de (a) proteínas totais, preparada com albumina bovina (BSA) e (b) carboidratos totais, preparada com glicose. As barras de erro indicam o desvio padrão ( $n = 3$ )..... 22
- Figura 5.** Densidade celular de *C. sorokiniana* (a) em valores brutos e (b) em logaritmo natural. As setas indicam os dias em que o borbulhamento dos gases foi realizado. Barras de erro indicam o desvio padrão ( $n = 3$ ). .... 23
- Figura 6.** Resultados de (a) taxa específica de crescimento e (b) biomassa final (120 h) de *C. sorokiniana* em cultivos com diferentes exposições a SGC. A linha tracejada representa o valor obtido com o tratamento controle. Letras iguais sobre as barras indicam semelhança estatística. A letra ao lado da linha tracejada corresponde à estatística para o controle. As barras de erro indicam o desvio padrão ( $n = 3$ )..... 24
- Figura 7.** Acompanhamento diário de (a) concentração celular de clorofila *a* (Chl *a*) e (b) rendimento quântico máximo ( $\Phi_M$ ) de *C. sorokiniana*. As setas especificam os dias em que o borbulhamento dos gases foi realizado. As barras de erro indicam o desvio padrão ( $n = 3$ ). .... 25
- Figura 8.** Valores de rendimento quântico máximo ( $\Phi_M$ ) e operacional ( $\Phi'_M$ ) em *C. sorokiniana*, 24 h após a primeira exposição a diferentes cargas de SGC. As linhas íntegra e tracejada representam, respectivamente, os resultados do tratamento controle para  $\Phi_M$  e  $\Phi'_M$ . As barras de erro indicam o desvio padrão ( $n = 3$ )..... 25

**Figura 9.** Valores de *quenching* (qP, qN e NPQ) em *C. sorokiniana*, 24 h após a primeira exposição a diferentes cargas de SGC. As linhas íntegra e tracejada correspondem aos resultados do tratamento controle para qP e qN/NPQ, respectivamente. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3)..... 26

**Figura 10.** Curvas de saturação de luz em *C. sorokiniana*, 24h após a primeira exposição a diferentes cargas de SGC. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3)..... 27

**Figura 11.** Efeito da exposição crescente de *C. sorokiniana* a SGC nos valores de (a)  $\alpha$ , (b)  $ETR_{max}$  (c)  $I_k$  e (d)  $R^B$ . A linha tracejada indica o valor obtido com o tratamento controle. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3). ..... 27

**Figura 12.** Viabilidade celular de *C. sorokiniana*, quando exposta à simulação de gases de combustão (SGC). A linha tracejada representa o valor obtido com o tratamento controle. Letras iguais sobre as barras indicam semelhança estatística. A letra ao lado da linha tracejada corresponde à estatística para o controle. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3). ..... 33

**Figura 13.** Gráficos de dispersão ilustrando a detecção de fluorescência da clorofila (*Nucleated Cells*) em diferentes culturas de *C. sorokiniana*, 24 h após primeira exposição a (a) Ar-CO<sub>2</sub> 18% (controle); (b) 0,1 L SGC; (c) 0,3 L SGC; (d) 0,8 L SGC; (e) 1,5 L SGC; (f) 6 L SGC e (g) 48 L SGC. Células viáveis (*Live*) estão agrupadas na área superior esquerda; células não-viáveis (*Dead*) se concentram na área inferior esquerda, próximo à linha tracejada que delimita a zona de detritos (*Debris*)..... 34

**Figura 14.** (a) Proteínas totais, (b) carboidratos totais e (c) razão proteína:carboidrato (P:C) em *C. sorokiniana*, quando exposta à simulação de gases de combustão (SGC). A linha tracejada representa o valor obtido com o tratamento controle. Letras iguais sobre as barras indicam semelhança estatística. A letra ao lado da linha tracejada corresponde à estatística para o controle. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3). ..... 36

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$	Inclinação inicial da curva de saturação de luz, fase em que somente a luz é fator limitante à fotossíntese
BSA	Albumina sérica bovina
Chl <i>a</i>	Concentração de clorofila <i>a</i>
CKD	Pó de forno de cimento
Abs	Absorbância
ETR	Taxa relativa de transporte de elétrons
ETR <sub>max</sub>	Máxima taxa relativa de transporte de elétrons
$\Phi_M$	Rendimento quântico máximo
$\Phi'_M$	Rendimento quântico operacional
SGC	Simulação de gases de combustão
F <sub>m</sub>	Fluorescência máxima em adaptação ao escuro
F' <sub>m</sub>	Fluorescência máxima em adaptação à luz
F <sub>o</sub>	Fluorescência mínima em adaptação ao escuro
F' <sub>o</sub>	Fluorescência mínima em adaptação à luz
F <sub>s</sub>	Fluorescência em estado estável de transporte de elétrons
I <sub>k</sub>	Irradiação saturante
$\mu$	Taxa específica de crescimento
NPQ	Decaimento não-fotoquímico equivalente à perda de calor
PAM	Fluorescência de amplitude modulada
PAR	Radiação fotossinteticamente ativa
Q <sub>A</sub>	Plastoquinona <i>a</i>
qP	Decaimento fotoquímico
qN	Decaimento não-fotoquímico
R <sup>B</sup>	Respiração
RFU	Unidades relativas de fluorescência

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
2.1    Objetivo geral .....	15
2.2    Objetivos específicos .....	15
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
3.1    Cultivo fototrófico de <i>Chlorella sorokiniana</i> .....	16
3.2    Testes com gases.....	17
3.3    Medições e Parâmetros fotossintéticos .....	18
3.4    Viabilidade celular e análises bioquímicas .....	21
3.5    Análise dos dados .....	22
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
4.1    CAPÍTULO 1.....	23
4.1.1    Resultados.....	23
4.1.2    Discussão .....	28
4.2    CAPÍTULO 2.....	33
4.2.1    Resultados.....	33
4.2.2    Discussão .....	37
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>40</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>41</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A atividade industrial sustenta diversos setores da economia e requer um consumo massivo de energia. Como consequência, cresce a preocupação ambiental com relação aos resíduos liberados a partir dessas atividades. A poluição do ar tem importante destaque nessa discussão, uma vez que a queima de combustíveis fósseis ainda é largamente utilizada.

O aumento da concentração atmosférica de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) acentua o efeito estufa, levando ao aquecimento global. Severas consequências desse fenômeno são previstas a curto e longo prazo, incluindo derretimento do gelo polar, elevação do nível dos oceanos, morte de corais por aquecimento das águas, desertificação, intensificação de estiagens, alterações em regimes pluviométricos, impactos em interações bióticas e comprometimento de serviços ecossistêmicos (LAM; LEE; MOHAMED, 2012; MONTOYA; RAFFAELLI, 2010; SOLOMON et al., 2009).

Dentre as atividades industriais, a produção de cimento têm impacto direto no agravamento desse cenário. Segundo Benhelal et al. (2013), fábricas de cimento são responsáveis por 5-7% das emissões globais de  $\text{CO}_2$ , com uma liberação estimada de 900 kg de  $\text{CO}_2$  para cada tonelada de cimento produzida. A maior parte do  $\text{CO}_2$  emitido provém da combustão em fornos onde ocorrem os processos de calcinação e clínquerização (JOSA et al., 2007). Além disso, o consumo de energia em todo o processo de extração e trituração do calcário, resfriamento e moagem do clínquer, somado ao transporte e distribuição do cimento, representa um acréscimo indireto de  $\text{CO}_2$  na atmosfera (ALI et al., 2011).

Além de  $\text{CO}_2$  e material particulado, gases potencialmente tóxicos, como óxidos de nitrogênio ( $\text{NO}_x$ ) e dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ), também estão presentes em gases liberados dos fornos de clínquer. A oxidação de monóxido de nitrogênio (NO) leva à formação de dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ), poluente responsável por causar graves doenças respiratórias (CASTRO; ARAÚJO; SILVA, 2013). Originado do enxofre encontrado na argila e em outros materiais brutos queimados nos fornos (JOSA et al., 2007), o  $\text{SO}_2$  possui alta reatividade com outros poluentes atmosféricos e é, assim como  $\text{NO}_x$ , um precursor do fenômeno conhecido como chuva ácida (RADMANN et al., 2011). A chuva ácida afeta não apenas os ecossistemas naturais, mas as áreas urbanas, danificando edifícios e monumentos históricos. Além de causar eutrofização em lagos, os óxidos de nitrogênio, junto com o  $\text{SO}_2$ , bloqueiam a luz solar e afetam a visibilidade

em ambientes densamente poluídos. Tal efeito, denominado *smog* fotoquímico, decorre da reação atmosférica de NO<sub>x</sub> com compostos orgânicos voláteis, na presença de luz (SUN; ZWOLIŃSKA; CHMIELEWSKI, 2015).

Em um estudo de modelagem com gases de cimento, Abu-Allaban e Abu-Qudais (2011) estimaram uma concentração anual de SO<sub>2</sub> e de NO<sub>x</sub> no ambiente de 0,005 e 0,008 ppm, respectivamente. Ambas as concentrações dependem não apenas do tempo de previsão usado no modelo, mas da distância de uma fonte emissora (2 km, no caso desse estudo). A caracterização das emissões de gases de combustão liberados por indústrias cimenteiras varia na literatura (LI et al., 2013). O percentual típico de CO<sub>2</sub>, por exemplo, oscila entre 14 a 33% (BOSOAGA; MASEK; OAKLEY, 2009). São fatores que justificam tais discrepâncias: o tipo de cimento produzido, o tipo de combustível utilizado no aquecimento do calcário, a composição do clínquer e o nível de tecnologia empregado no processo de produção como um todo (JOSA et al., 2007).

Estratégias para mitigação do efeito estufa e da poluição do ar têm sido amplamente estudadas (CUÉLLAR-FRANCA; AZAPAGIC, 2014; JACOBSON, 2009; WOODWARD et al., 2009). Conciliar a atividade industrial com a bioremediação de efluentes é uma alternativa que merece destaque. A ideia de associar gases de combustão de cimento com sistemas de cultivo de microalgas vem sendo incentivada em diferentes trabalhos (BORKENSTEIN et al., 2011; LARA-GIL; ÁLVAREZ; PACHECO, 2014; OLOFSSON et al., 2015; TALEC et al., 2013). O cultivo de microalgas beneficia-se de um mecanismo natural, a fotossíntese, para promover a fixação de carbono. Alvo de grande interesse em aplicações biotecnológicas, as microalgas possuem maior eficiência fotossintética do que plantas vasculares e seu cultivo pode ser realizado em espaços menores, por meio de biorreatores apropriados (MUJTABA et al., 2012). Em estudos toxicológicos, esses organismos atuam como bioindicadores de poluição tanto em ambientes marinhos quanto de água doce (HÖRNSTRÖM, 1990). Por seu rápido crescimento, fácil isolamento e manipulação em laboratório, as microalgas também representam um sistema ideal para estudo dos mecanismos e da regulação do fluxo de elétrons na fotossíntese (CARDOL; FORTI; FINAZZI, 2011).

A seleção adequada de uma espécie de microalga é determinante para a eficácia da bioremediação de efluentes gasosos. Dentre as microalgas citadas e comparadas por Cuellar-Bermudez et al. (2015), o gênero *Chlorella* ganha destaque em taxa de consumo de CO<sub>2</sub>, produção de biomassa e tolerância a altas concentrações de CO<sub>2</sub>. A espécie

*Chlorella sorokiniana* Shihira et Krauss (1965) é considerada um microorganismo-modelo para estudos sobre mitigação de carbono. Trata-se de uma espécie unicelular, robusta, com alta tolerância a variações de temperatura, capaz de crescer em águas residuais acrescidas de CO<sub>2</sub> e de remover NO<sub>x</sub> de forma eficiente (LIZZUL et al., 2014). Morita et al. (2000) comprovaram a resistência e o elevado desempenho fotossintético de uma cepa de *C. sorokiniana* em testes com CO<sub>2</sub>, NO e SO<sub>2</sub>. Mesmo apresentando diferentes taxas de crescimento, outra estirpe da mesma espécie conseguiu crescer em uma faixa de pH de 5,0 a 10,0 (XIA et al., 2013), característica importante quando se trabalha com gases ácidos, como NO<sub>x</sub> e SO<sub>2</sub> e concentrações elevadas de CO<sub>2</sub>.

Independentemente da espécie escolhida para o cultivo, o comportamento fisiológico das microalgas precisa ser avaliado com precisão. A fluorescência de amplitude modulada (PAM) é uma ferramenta cada vez mais usada para esse intuito. A associação de fluorescência com fisiologia decorre do princípio básico de que a energia luminosa incidente sobre um organismo fotossintetizante, seja ele uma microalga, cianobactéria ou um vegetal vascular, pode ter três possíveis destinos: (1) investimento energético em fotoquímica, por meio do qual ocorre a produção de biomassa e compostos bioquímicos de interesse comercial; (2) perda de energia por dissipação de calor e (3) reemissão de luz na forma de fluorescência da clorofila (MISRA; MISRA; SINGH, 2012). O estado fisiológico do organismo e sua reação às condições ambientais exercem alta influência no destino dessa energia. A partir da detecção de fluorescência, emitida principalmente pelo fotossistema II (PSII), a técnica PAM consegue estimar a perda de calor e, assim, inferir o quanto de energia foi investido em fotoquímica. Trata-se de uma análise rápida, sensível, não-invasiva (NAPOLÉON; CLAQUIN, 2012), capaz de detectar alterações fisiológicas causadas por quantidades vestigiais de componentes tóxicos (LOMBARDI; MALDONADO, 2011) e sua associação com gases de combustão em cultivos de microalgas é uma abordagem inovadora.

Usado para monitorar alterações no transporte linear de elétrons *in vivo*, o rendimento quântico é um dos parâmetros mais importantes obtidos a partir da fluorimetria PAM. Seu valor depende não apenas da quantidade de centros de reação abertos no PSII, mas da eficiência com a qual esses centros abertos conseguem capturar e utilizar a energia de excitação armazenada no interior dos complexos PSII (GENTY; BRIANTAIS; BAKER, 1989). Estimada a partir do rendimento quântico de células adaptadas à luz, a taxa de transporte de elétrons pode ser analisada em um intervalo

crescente de irradiância, possibilitando a construção de curvas de saturação de luz. Considerada a maior contribuição à fluorometria PAM (ENRÍQUEZ; BOROWITZKA, 2010), a análise de decaimento da fluorescência (*quenching*) permite a comparação entre a proporção de energia investida em fotoquímica e a quantidade de energia perdida em processos como a liberação de calor, dependendo das condições ambientais às quais as microalgas são expostas.

Dados sobre a viabilidade celular complementam a análise dos efeitos que os gases de combustão podem exercer em *C. sorokiniana*. Considerada uma ferramenta importante em testes de toxicidade envolvendo microalgas (FRANQUEIRA et al., 2000), a citometria de fluxo, além de distinguir contaminantes em bioensaios multiespecíficos (STAUBER; FRANKLIN; ADAMS, 2002), também é capaz de detectar rapidamente o efeito de compostos nocivos em organismos fotossintetizantes por meio de medições *in vivo* da fluorescência da clorofila (PRADO et al., 2015).

Se bem sucedida, a iniciativa de cultivar microalgas para promover a biorremediação de efluentes gasosos pode, ainda, gerar uma biomassa comercialmente desejável. As perspectivas de uso em larga escala das microalgas para fins econômicos vêm sendo analisadas há décadas (BONOTTO, 1988; KLAUSNER, 1986; RAJA et al., 2014; SUGANYA et al., 2016). Van Den Hende, Vervaeren e Boon (2012) apontam que é possível usar gases de combustão para alterar e valorizar a composição bioquímica das algas. Muito se discute a respeito da produção de lipídios a partir do cultivo de microalgas com gases de combustão (KAO et al., 2014; LIZZUL et al., 2014; RADMANN; COSTA, 2008; XIA et al., 2013), aspecto este que tem como principal objetivo a geração de biocombustíveis. Sabe-se que *C. sorokiniana* apresenta não apenas uma maior produtividade lipídica (XIA et al., 2013), mas uma composição de ácidos graxos modificada quando cultivada com gases de combustão (KUMAR; BANERJEE; DAS, 2014).

Faltam informações, no entanto, a respeito da quantificação de proteínas e carboidratos em *C. sorokiniana*, quando exposta a gases de combustão. Sabe-se que em *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella tertiolecta*, *Isochrysis galbana* e *Thalassiosira weissflogii*, o uso de gases de combustão oriundos da produção de cimento não afeta de forma significativa a composição de carboidratos e proteínas (TALEC et al., 2013). Em *Tetraselmis* sp. e *Skeletonema marinoi*, o borbulhamento de gases de cimento com CO<sub>2</sub> (12–15%) também não alterou o conteúdo lipídico, proteico e de carboidratos, se comparado ao fornecimento de ar e CO<sub>2</sub> puro (OLOFSSON et al., 2015). É importante

ressaltar que cada espécie de alga pode responder a um agente químico de diferentes maneiras. Dependendo das condições de cultivo e da forma como são fornecidos, os gases de combustão podem induzir *C. sorokiniana* a um estado de estresse, capaz de elevar o acúmulo de proteínas e/ou de carboidratos. Trata-se, pois, de uma lacuna a ser preenchida e de uma contribuição para referências sobre a bioquímica dessa espécie em particular.

Embora *Chlorella* seja um grupo reconhecido e valorizado para suplementação alimentar (GUCCIONE et al., 2014; SUGANYA et al., 2016), particularmente por sua alta constituição proteica, são necessários estudos toxicológicos prévios quando seu cultivo é associado a gases poluentes. Certas espécies de *Chlorella* também podem apresentar altos níveis de amido, principalmente se cultivadas em condições de limitação nutricional (BRÁNYIKOVÁ et al., 2011; ZHU et al., 2014). Além do aspecto energético para a alimentação, trabalhos recentes vêm sendo realizados com o objetivo de viabilizar o uso de carboidratos algais na fermentação e produção de etanol (CHEN et al., 2013; HO et al., 2013; LEE; OH; LEE, 2015).

Apesar das diversas aplicações industriais das microalgas, o alto custo de produção da biomassa ainda é um fator que impede sua ampla realização. O uso de gases de combustão durante o cultivo pode ser uma forma de enriquecer esse produto, aumentar seu valor agregado e estimular a bioremediação de efluentes gasosos em parceria com empresas poluidoras. Com base no acima exposto, propomos a integração entre microalgas e gases de combustão como uma importante aplicação biotecnológica. A obtenção de biomassa com elevado percentual de proteínas e carboidratos pode torná-la economicamente vantajosa, viabilizando seu emprego em larga escala.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o crescimento, o comportamento fisiológico e a composição bioquímica de *C. sorokiniana*, exposta a gases de combustão (CO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> e SO<sub>2</sub>), simulados de acordo com emissões registradas da produção industrial de cimento.

### **2.2 Objetivos específicos**

- a) Promover cultivos sequenciais de *C. sorokiniana*, em condições controladas de laboratório, para testar tempos crescentes de exposição das microalgas aos gases poluentes;
- b) Avaliar a cinética de crescimento e a densidade celular final de *C. sorokiniana* ao longo de todos os experimentos;
- c) Analisar a resposta fotossintética da microalga utilizando parâmetros da fluorometria PAM;
- d) Estimar a viabilidade celular de *C. sorokiniana* em cada tratamento por meio da citometria de fluxo;
- e) Detectar alterações no conteúdo celular de proteínas e carboidratos em função da exposição crescente aos gases de combustão.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Cultivo fototrófico de *Chlorella sorokiniana*

Experimentos em série foram feitos por meio de cultivos semicontínuos (ANDERSEN, 2005), com transferência de *C. sorokiniana* de meios previamente expostos aos gases para novos meios de cultura esterilizados, sempre mantendo as células em crescimento exponencial. Cada experimento teve duração total de 5 dias (120 h). Os cultivos em triplicata foram realizados em frascos de vidro borossilicato (500 mL), com 400 mL de meio BG-11 modificado (RIPPKA et al., 1979) e inóculo inicial ( $5 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup>) retirado da cultura anterior em fase exponencial de crescimento (72 h), como ilustra o esquema da Figura 1. Para minimizar oscilações do pH, nós adicionamos ao meio 500 mg L<sup>-1</sup> de tris(hidroximetil)aminometano (Tris), um agente tamponante de pH.



Figura 1. Representação esquemática da série de cultivos semicontínuos. A repicagem de células foi realizada em 72 h do cultivo anterior para novos meios esterilizados, sempre em triplicata. O tempo de borbulhamento ininterrupto de gás aumentou ao longo dos diferentes cultivos.

Na tampa de rosca de cada frasco de vidro, fizemos dois orifícios de 5 mm para a introdução e a saída dos gases. Uma mangueira de silicone (3 mm de calibre) foi inserida no orifício de entrada e acoplada a uma pedra porosa de cerâmica, usada para reduzir o tamanho das bolhas e permitir, assim, maior difusão do gás no meio líquido. A altura da coluna de meio nutritivo foi de 9 cm. O pH inicial das culturas foi ajustado para 7,0. Todos os frascos foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ) e a iluminação artificial foi feita com diodos emissores de luz (LED,  $130 \text{ } \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , fotoper\u00edodo de 12:12 h claro:escuro).

### 3.2 Testes com gases

A simulação de gases de combustão (SGC) teve como referência emissões-padrão registradas por uma empresa produtora de cimento. Realizamos o tratamento controle com ar sintético e CO<sub>2</sub> (18%) introduzido como suplemento. Para SGC, foi preparada em cilindro único uma mistura gasosa, com base em nitrogênio (N<sub>2</sub>), composta por CO<sub>2</sub> (18%), O<sub>2</sub> (9%), NO<sub>2</sub> (300 ppm) e SO<sub>2</sub> (140 ppm). Regulamos a saída do gás para 3,5 bar e o fluxo constante de aeração foi de 0,1 L min<sup>-1</sup> (0,25 vvm). A Figura 2 mostra o cilindro de armazenamento dos gases e a disposição dos frascos com culturas de *C. sorokiniana* em um dos cultivos da série experimental.



Figura 2. (a) Cilindro utilizado no armazenamento da simulação de gases de combustão (SGC). A ele foi acoplado um regulador de pressão de duplo estágio. Regulada a pressão, o gás era conduzido ao sistema de regulação de fluxo, de onde seguia para as culturas de microalgas. (b) Cultivo de *C. sorokiniana* em frascos de vidro de 500 mL. O borbulhamento de gases foi simultâneo em todas as três réplicas.

Ao todo, cada experimento recebeu três cargas de SGC. A primeira exposição aos gases ocorreu 48 horas após a inoculação, para diferenciar qualquer efeito tóxico de um possível período de adaptação fisiológica de *C. sorokiniana* ao meio. O borbulhamento ininterrupto foi feito uma vez ao dia, precisamente em 48, 72 e 96 h de cultivo. Nosso controle com CO<sub>2</sub> teve seu tempo regulado de acordo com a variação do pH do meio (borbulhamos o suficiente para atingir um pH-limite de  $7,0 \pm 0,2$ ). Para os tratamentos com SGC, foram estabelecidos tempos fixos de borbulhamento ininterrupto. A multiplicação de cada tempo de exposição pelo fluxo constante nos indicou o volume de gás introduzido diariamente nos fotobioreatores: 1 min (0,1 L d<sup>-1</sup>), 3 min (0,3 L d<sup>-1</sup>), 8 min (0,8 L d<sup>-1</sup>), 15 min (1,5 L d<sup>-1</sup>), 1 h (6 L d<sup>-1</sup>) e 8 h (48 L d<sup>-1</sup>). O último tratamento

representou a exposição equivalente ao período claro de 12 h do fotoperíodo completo, desconsiderando as duas primeiras horas da manhã e as duas horas finais da tarde, intervalos nos quais a atividade fotossintética das algas é baixa.

### 3.3 Medições e Parâmetros fotossintéticos

Uma vez ao dia, amostras de 3 mL foram colhidas para monitoramento do crescimento de *C. sorokiniana*, feito por meio da contagem de células em hemocitômetro (Fuchs-Rosenthal) sob microscópio óptico e da medição de fluorescência *in vivo*, em unidades relativas (RFU), em um fluorímetro digital (Turner Designs, Trilogy, USA). Obtivemos a concentração de clorofila *a* (Chl *a*;  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) a partir de uma curva-padrão de calibração (RFU versus Chl *a*). Em cada teste, a taxa específica de crescimento,  $\mu$  ( $\text{d}^{-1}$ ), foi calculada pelo ajuste linear da fase exponencial de crescimento em gráfico de logaritmo natural da densidade celular ( $\text{cel mL}^{-1}$ ) versus tempo de cultivo (dias).

A mesma amostragem diária também permitiu a avaliação dos parâmetros fotossintéticos, medidos por meio de um fluorímetro de amplitude modulada (Phytoplankton Analyzer, PHYTO-PAM, Heinz Walz GmbH, Germany) em temperatura ambiente. Uma representação esquemática (Figura 3) ilustra os cinco níveis fundamentais de fluorescência obtidos a partir da fluorometria PAM.

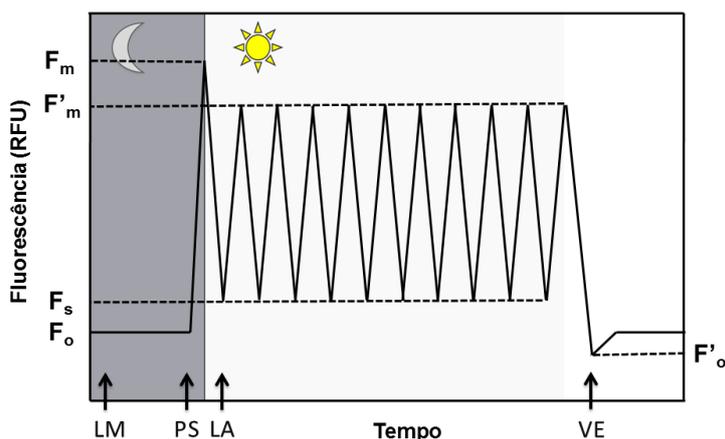


Figura 3. Representação esquemática dos cinco níveis de fluorescência, em unidades relativas (RFU), obtidos a partir da fluorometria PAM: fluorescência máxima em adaptação ao escuro ( $F_m$ ); fluorescência máxima em adaptação à luz ( $F'_m$ ); fluorescência mínima em adaptação ao escuro ( $F_o$ ); fluorescência mínima em adaptação à luz ( $F'_o$ ) e fluorescência em estado estável de transporte de elétrons ( $F_s$ ). Quatro tipos de luz são usados durante as leituras: luz modulada (LM); pulso saturante (PS); luz actínica (LA) e luz na faixa do vermelho-extremo (VE).

Antes das medições, todas as amostras foram pré-adaptadas ao escuro por 20 min. Usamos luz modulada de baixa intensidade ( $1 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) para medir a fluoresc\u00eancia inicial constante ( $F_o$ ) das microalgas e evitar a redu\u00e7\u00e3o da plastoquinona  $a$  ( $Q_A$ ), o acceptor prim\u00e1rio de el\u00e9trons (JUNEAU; EL BERDEY; POPOVIC, 2002). A aplica\u00e7\u00e3o de um pulso saturante ( $0,2 \text{ s}$ ;  $2000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) reduziu  $Q_A$ , levando ao registro de fluoresc\u00eancia m\u00e1xima das c\u00e9lulas adaptadas ao escuro ( $F_m$ ). Determinados esses dois valores, foi poss\u00edvel calcular tanto a fluoresc\u00eancia vari\u00e1vel ( $F_v$ ) quanto o rendimento qu\u00e2ntico m\u00e1ximo ( $\Phi_M$ ) segundo as equa\u00e7\u00f5es abaixo.

$$F_v = F_m - F_o \quad (1)$$

$$\Phi_M = \frac{F_v}{F_m} \quad (2)$$

Em 72 h de cultivo, um dia ap\u00f3s a primeira exposi\u00e7\u00e3o aos gases de combust\u00e3o, o comportamento fotossint\u00e9tico de *C. sorokiniana* foi avaliado em condi\u00e7\u00e3o luminosa, ainda durante a fase exponencial de crescimento. O acionamento da luz act\u00ednica ( $130 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) alterou a fluoresc\u00eancia em estado est\u00e1vel ( $F_s$ ), permitindo que novos pulsos saturantes, aplicados a cada 40 s, durante 20 min, medissem a fluoresc\u00eancia m\u00e1xima em adapta\u00e7\u00e3o \u00e0 luz ( $F'_m$ ). A partir de  $F_s$  e  $F'_m$ , obtivemos o rendimento qu\u00e2ntico operacional ( $\Phi'_M$ ).

$$\Phi'_M = \frac{F'_m - F_s}{F'_m} \quad (3)$$

A fluoresc\u00eancia m\u00ednima de c\u00e9lulas adaptadas \u00e0 luz ( $F'_o$ ), medida na faixa de comprimento de onda do vermelho-extremo, em aus\u00eancia de luz act\u00ednica, foi calculada a partir da equa\u00e7\u00e3o proposta por Oxborough e Baker (1997):

$$F'_o = \frac{F_o}{\frac{F_v}{F_m} + \frac{F_o}{F'_m}} \quad (4)$$

Com todos os parâmetros de adaptação ao escuro e à luz, pudemos estimar o valor de três tipos de *quenching* de acordo com Juneau, El Berdey e Popovic (2002). O *quenching* fotoquímico (qP) indica a fração de energia luminosa destinada à etapa fotoquímica da fotossíntese, a partir da qual o CO<sub>2</sub> é incorporado ao Ciclo de Calvin. O *quenching* não-fotoquímico (qN) representa os processos de decaimento não relacionados à fotoquímica, energia esta que é perdida durante a fotossíntese. Considerado um parâmetro alternativo para descrever a magnitude do decaimento não-fotoquímico (ENRÍQUEZ; BOROWITZKA, 2010), o *quenching* NPQ descreve a dissipação de energia por calor, mecanismo este usado como defesa contra o excesso de luz e danos oxidativos (MÜLLER; LI; NIYOGLI, 2001; CUARESMA FRANCO et al. 2012).

$$qP = \frac{F'_m - F'_s}{F'_m - F'_o} \quad (5)$$

$$qN = 1 - \left[ \frac{F'_m - F'_o}{F_m - F_o} \right] \quad (6)$$

$$NPQ = \frac{F_m - F'_m}{F'_m} \quad (7)$$

As leituras em 72 h também incluíram a obtenção da curva de saturação de luz. Pulsos crescentes de radiação fotossinteticamente ativa (PAR; 0 – 960 μmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) foram disparados a cada 20 s, durante cerca de 10 min, gerando valores sucessivos de Φ'<sub>M</sub>. Sugerido por Ralph et al. (2002), o uso da taxa relativa de transporte não-cíclico de elétrons (ETR; μmol elétrons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) tem ampla aceitação como parâmetro de resposta fotossintética à luz (ENRÍQUEZ; BOROWITZKA, 2010), podendo ser calculada por meio da multiplicação entre Φ'<sub>M</sub> e PAR. O ajuste da curva de saturação de luz foi feito de acordo com Jassby e Platt (1976), de modo a obter o valor da inclinação inicial das curvas (α; mg C [mg Chl a]<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> [μmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>]<sup>-1</sup>), a taxa máxima de transporte de elétrons (ETR<sub>max</sub>; μmol elétrons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), a respiração (R<sup>B</sup>; mg C [mg Chl a]<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) e a irradiação saturante (Ik; μmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), calculada a partir de α e ETR<sub>max</sub>.

$$Ik = \frac{ETR_{max}}{\alpha} \quad (8)$$

### 3.4 Viabilidade celular e análises bioquímicas

Em 72 h de cada cultivo, além da avaliação fotossintética, foram coletadas amostras para análise da viabilidade celular de *C. sorokiniana*, feita por meio de um analisador de células com citometria de fluxo (MUSE CELL ANALYSER; Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Medições realizadas com microalgas dispensaram o uso de corantes, conforme especificado pelo fabricante. Para obter maior precisão de leitura pelo aparelho, fizemos uma diluição prévia das amostras de 1:20 (20 µL da amostra e 380 µL de meio de cultura esterilizado) em tubos Eppendorf (1,5 mL). A viabilidade foi expressa em porcentagem de células viáveis versus o número total de células analisadas na citometria.

No mesmo período, também retiramos amostras para determinação de carboidratos totais (10 mL) e proteínas totais (50 mL). As alíquotas foram centrifugadas (4400 rpm, 20 °C, 15 min), o conteúdo sobrenadante foi descartado e o *pellet* acumulado, mantido a -20 °C até a realização das análises.

Realizamos a quantificação proteica das microalgas de acordo com Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (*bovine serum albumin* – BSA; 1 mg mL<sup>-1</sup>) como referência para elaboração de uma curva-padrão (Figura 4a). A determinação de carboidratos totais nas culturas foi feita pelo método colorimétrico *Ácido Sulfúrico-UV*, proposto por Albalasmeh et al. (2013) e a curva-padrão (Figura 4b) teve como base uma solução de glicose (1 mg mL<sup>-1</sup>). Pelos altos valores de absorbância (Abs) obtidos no experimento, tomamos como referência para o ajuste de linearidade somente os últimos quatro pontos da curva de carboidratos.

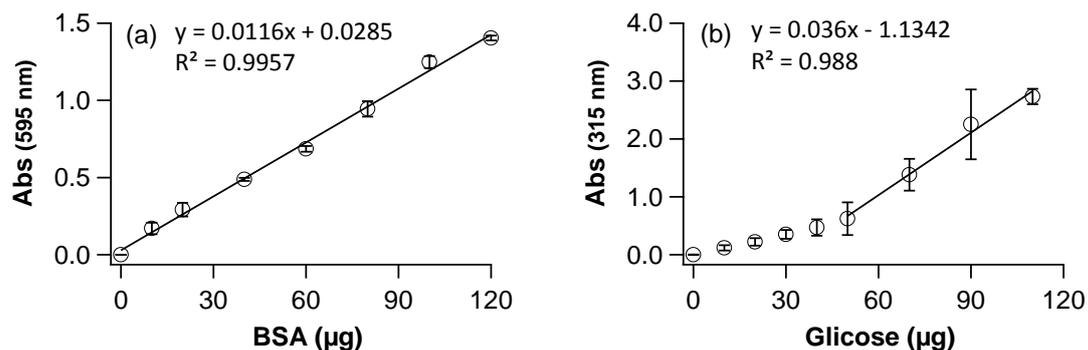


Figura 4. Curva-padrão de absorvância (Abs) para determinação de (a) proteínas totais, preparada com albumina bovina (BSA) e (b) carboidratos totais, preparada com glicose. As barras de erro indicam o desvio padrão ( $n = 3$ ).

### 3.5 Análise dos dados

Usamos o programa Igor PRO 5,03 (Wavemetrics, USA) para a elaboração de gráficos. Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados estatisticamente pelo teste de Tukey HSD (nível de significância  $p \leq 0,05$ ), utilizando o programa R, versão 3.2.2 (R CORE TEAM, 2015).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CAPÍTULO 1

#### Resposta fotossintética de *C. sorokiniana* à simulação de gases de combustão da indústria cimenteira

##### 4.1.1 Resultados

Ao longo de todos os tratamentos, não foi registrada morte celular nas culturas de *C. sorokiniana* como um todo, mas sim variações nas taxas de crescimento, dependendo da quantidade de SGC borbulhada. Na Figura 5a, observamos redução do crescimento em culturas expostas a 0,8 ou mais L gás d<sup>-1</sup>. O logaritmo natural da densidade celular (Figura 5b), no entanto, evidenciou uma maior influência dos gases na curva de crescimento apenas com 8 h de exposição a SGC (48 L d<sup>-1</sup>). Neste caso, *C. sorokiniana* não apresentou aumento de densidade celular do segundo ao terceiro dia de cultivo. No mesmo intervalo de tempo, também observamos uma desaceleração menos acentuada do crescimento com 6 L d<sup>-1</sup> de SGC.

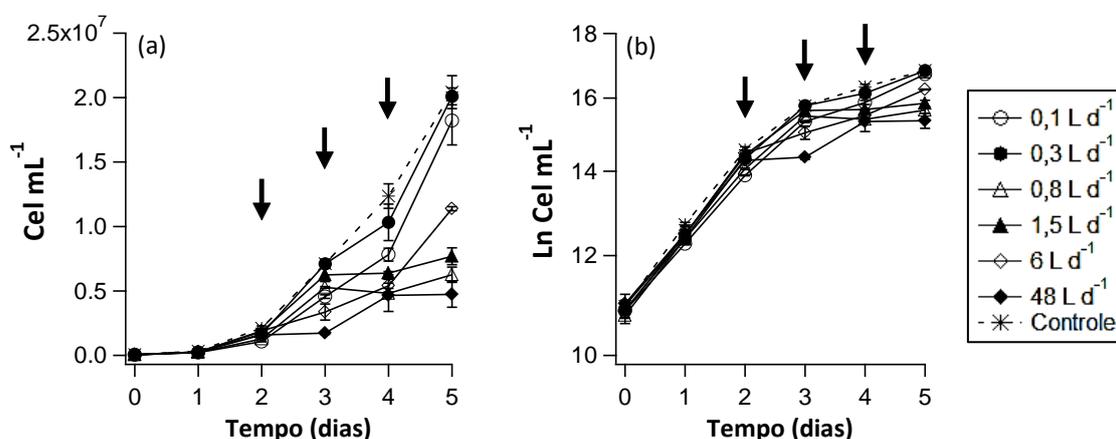


Figura 5. Densidade celular de *C. sorokiniana* (a) em valores brutos e (b) em logaritmo natural. As setas indicam os dias em que o borbulhamento dos gases foi realizado. Barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3).

A Figura 6a mostra que o estresse, mantido durante 1 e 8 h de borbulhamento, afetou a fase exponencial de crescimento e inibiu  $\mu$  em cerca de 17% (6 L d<sup>-1</sup>) e 39% (48 L d<sup>-1</sup>), se comparado ao controle ( $p < 0,05$ ). Em termos de biomassa final, em 120 h

de cultivo (Figura 6b), somente os tratamentos com menor tempo de exposição ao gás (0,1 e 0,3 L d<sup>-1</sup>) apresentaram resultados similares ao controle (p > 0,05).

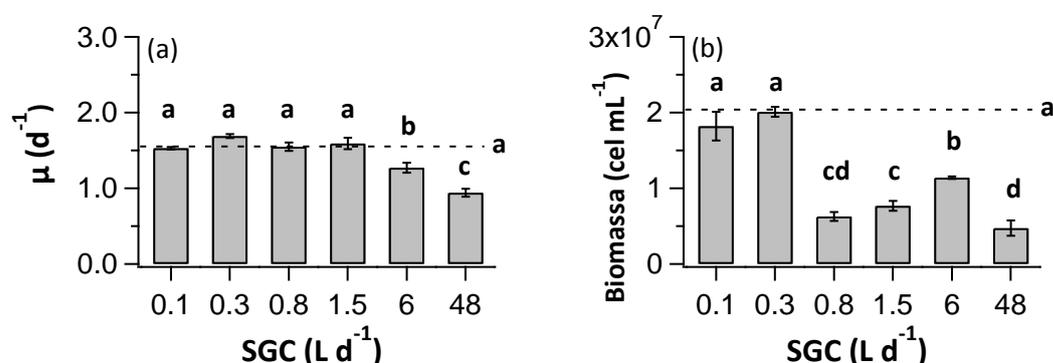


Figura 6. Resultados de (a) taxa específica de crescimento e (b) biomassa final (120 h) de *C. sorokiniana* em cultivos com diferentes exposições a SGC. A linha tracejada representa o valor obtido com o tratamento controle. Letras iguais sobre as barras indicam semelhança estatística. A letra ao lado da linha tracejada corresponde à estatística para o controle. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3).

O valor de pH do meio diminuiu rapidamente em função da exposição ao gás, mas estabilizou entre 5,7 e 6,0 em todos os tratamentos com borbulhamento de SGC superior a 8 min (0,8 L d<sup>-1</sup>). Testes complementares, realizados nas mesmas condições, mas com volume de meio reduzido (20 mL), também resultaram em estabilização do pH na mesma faixa, com ou sem a adição do tampão Tris, comprovando a existência de um limite de solubilidade dos gases no meio líquido. Esse resultado mostra que, embora tenha minimizado as oscilações de pH, tanto na aplicação dos gases quanto na alcalinização natural do meio, o tampão Tris pode ser considerado um componente não-essencial para o cultivo de *C. sorokiniana*, nas condições atuais.

O conteúdo celular de clorofila *a* (Figura 7a) não apresentou alterações que pudessem ser atribuídas à introdução dos gases nas culturas. É importante ressaltar que, no último dia de cultivo, o tratamento com 48 L d<sup>-1</sup> resultou em maior concentração deste pigmento. Isso pode ter ocorrido devido à limitação na densidade celular, o que elevou a razão Chl *a*/célula. O acompanhamento diário de  $\Phi_M$  (Figura 7b) reforça o efeito negativo da exposição ininterrupta de *C. sorokiniana* a SGC. O teste com exposição mais intensa ao gás (48 L d<sup>-1</sup>) fez com que a média de  $\Phi_M$  caísse de 0,70 (48 h), condição fisiologicamente saudável, para 0,40 (72 h) e 0,26 (120 h), condições características de estresse. A medição da fluorescência máxima em situação de exposição à luz também resultou em uma média mais baixa de  $\Phi'_M$  (0,47), como mostra

a Figura 8. A análise de decaimento da fluorescência revelou que qP foi elevado em todos os tratamentos (Figura 9). Os resultados praticamente nulos de qN e NPQ indicaram que a mistura de gases não elevou a perda de energia por meios não-fotoquímicos. Pouca oscilação foi observada em qP até o teste final com 48 L d<sup>-1</sup>, condição que induziu *C. sorokiniana* a aumentar significativamente o investimento energético em fotoquímica.

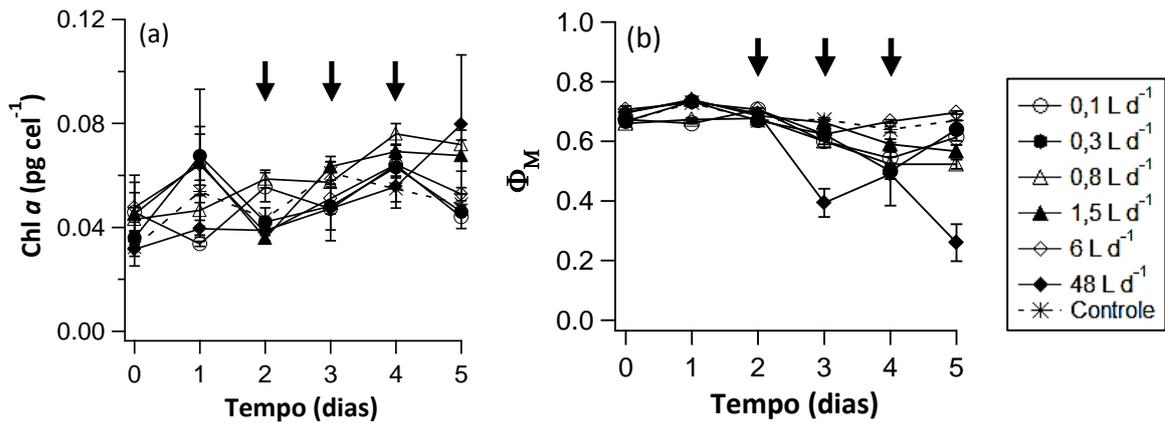


Figura 7. Acompanhamento diário de (a) concentração celular de clorofila *a* (Chl *a*) e (b) rendimento quântico máximo ( $\Phi_M$ ) de *C. sorokiniana*. As setas especificam os dias em que o borbulhamento dos gases foi realizado. As barras de erro indicam o desvio padrão ( $n = 3$ ).

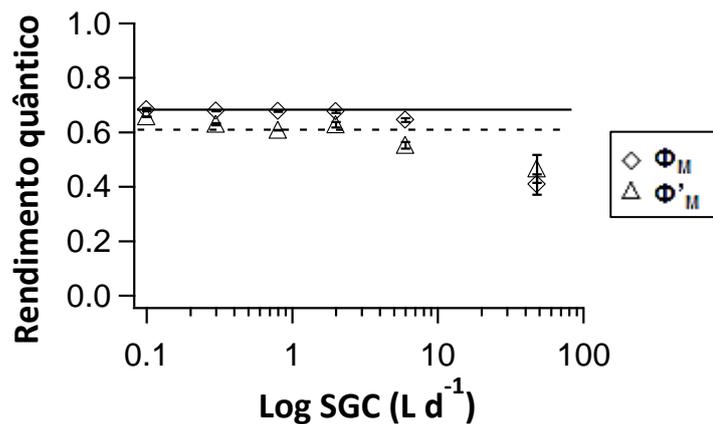


Figura 8. Valores de rendimento quântico máximo ( $\Phi_M$ ) e operacional ( $\Phi'_M$ ) em *C. sorokiniana*, 24 h após a primeira exposição a diferentes cargas de SGC. As linhas íntegra e tracejada representam, respectivamente, os resultados do tratamento controle para  $\Phi_M$  e  $\Phi'_M$ . As barras de erro indicam o desvio padrão ( $n = 3$ ).

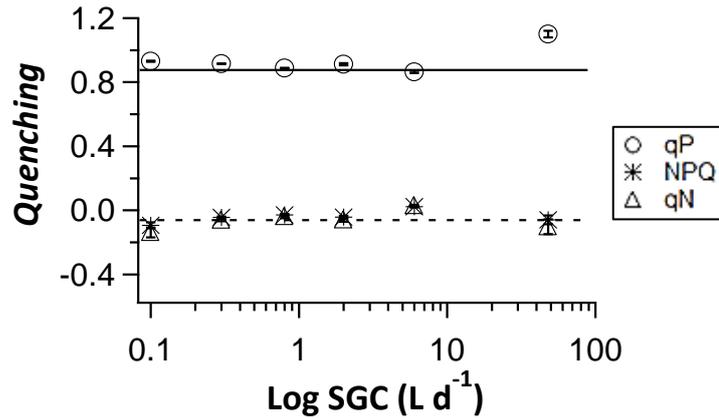


Figura 9. Valores de *quenching* (qP, qN e NPQ) em *C. sorokiniana*, 24 h após a primeira exposição a diferentes cargas de SGC. As linhas íntegra e tracejada correspondem aos resultados do tratamento controle para qP e qN/NPQ, respectivamente. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3).

A curva de saturação de luz (Figura 10), por sua vez, confirmou o estresse no tratamento com 48 L d<sup>-1</sup>, que resultou nos valores mais baixos de ETR, e o benefício do borbulhamento por curtos períodos de tempo, pois o transporte de elétrons com 1 min e 3 min de SGC (0,1 e 0,3 L SGC d<sup>-1</sup>) se sobressaiu em relação ao registrado no controle (p < 0,05). Os quatro parâmetros obtidos a partir da curva (Figura 11) reafirmam a tendência de diminuição de  $\alpha$ ,  $I_k$  e  $ETR_{max}$  conforme elevamos o fornecimento de SGC e, conseqüentemente, a exposição da alga ao gás. Tratamentos com 0,1 e 0,3 L d<sup>-1</sup> foram vantajosos, pois induziram um aumento significativo de  $ETR_{max}$  e  $I_k$  (p < 0,05), associado a uma menor perda de energia por R<sup>B</sup>.

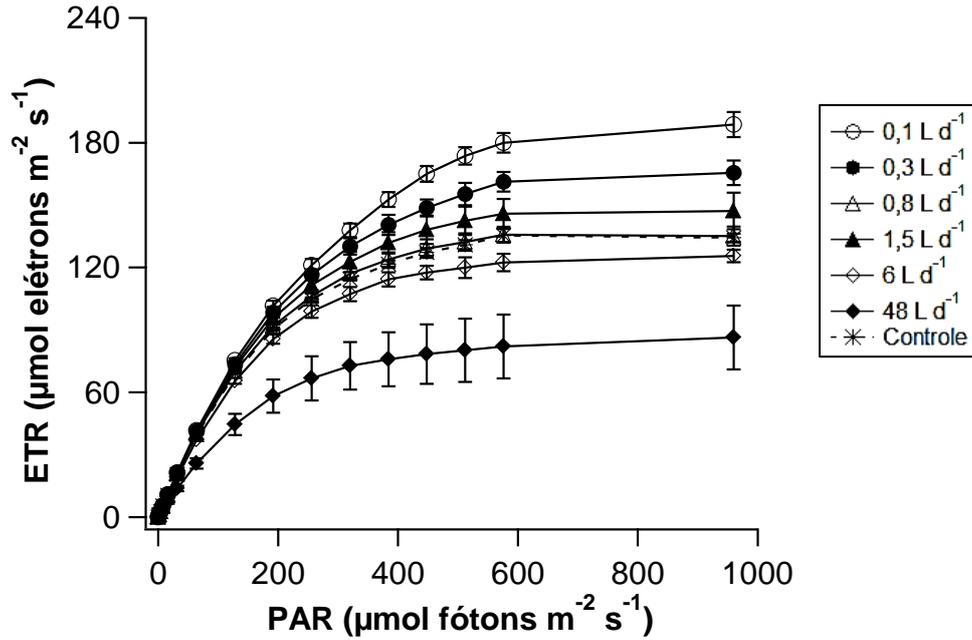


Figura 10. Curvas de saturação de luz em *C. sorokiniana*, 24h após a primeira exposição a diferentes cargas de SGC. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3).

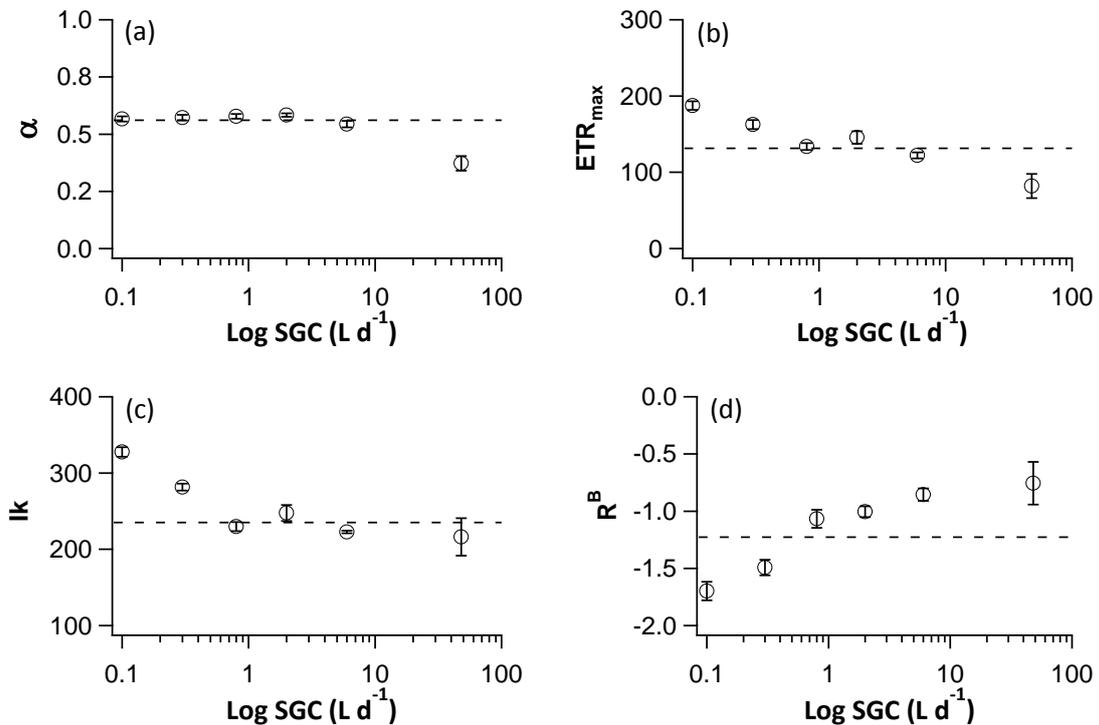


Figura 11. Efeito da exposição crescente de *C. sorokiniana* a SGC nos valores de (a)  $\alpha$ , (b)  $ETR_{max}$  (c)  $I_k$  e (d)  $R^B$ . A linha tracejada indica o valor obtido com o tratamento controle. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3).

#### 4.1.2 Discussão

Mesmo sendo uma fonte suplementar de carbono, o CO<sub>2</sub>, em excesso, leva à rápida acidificação do meio de cultura devido à formação e subsequente dissociação do ácido carbônico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). A mesma desvantagem ocorre na presença da SGC, que, além do CO<sub>2</sub>, normalmente contém NO<sub>2</sub> e SO<sub>2</sub>. Dissolvido em meio aquoso, NO<sub>2</sub> dá origem ao ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) e mesmo NO, que é pouco solúvel em água, acabaria formando NO<sub>2</sub> na presença de oxigênio (VAN DEN HENDE; VERVAEREN; BOON, 2012). A dissolução de SO<sub>2</sub> em água forma, por sua vez, o ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a partir do ácido sulfuroso (H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) e do óxido sulfúrico (SO<sub>3</sub>). Segundo Kumar et al. (2011), o crescimento populacional algal é mais afetado pelos óxidos de enxofre devido às mudanças de pH do meio do que pela concentração de sulfato no meio, motivo pelo qual o tamponamento é apontado, pelos autores, como alternativa para prevenir esse percalço.

Embora espécies de microalgas tenham um intervalo ótimo de pH para crescimento, muitas podem tolerar maior acidez se forem adaptadas a tal condição. Maeda et al. (1995) mostraram que *Chlorella* sp. T-1 tolerou até 50% de CO<sub>2</sub> sem decréscimo significativo na taxa de crescimento, se comparado à condição ótima de apenas 10% de CO<sub>2</sub>. A mesma espécie conseguiu, ainda, crescer, sem reajuste de pH, quando aerada com 20 e 60 ppm de SO<sub>x</sub> e NO<sub>x</sub>, respectivamente. A adição de CaCO<sub>3</sub> ao meio, contudo, impediu a queda de pH, permitindo o cultivo com até 80 e 240 ppm de SO<sub>x</sub> e NO<sub>x</sub>.

No presente trabalho, a exposição prolongada a SGC no tratamento com 48 L d<sup>-1</sup> manteve constantemente o pH em torno de 5,7, condição subótima que inibiu o crescimento de *C. sorokiniana*, levando a uma menor densidade celular ao final do cultivo. Morita, Watanabe e Saiki (2000) constataram que *C. sorokiniana* perde sua coloração esverdeada e morre em pH 3,6, resultado da aeração combinada de CO<sub>2</sub> (10%) e SO<sub>2</sub> (40 – 60 ppm). Apesar disso, com um fluxo de 0,04 L min<sup>-1</sup> e uma mistura de CO<sub>2</sub> (10%), NO (100 ppm) e SO<sub>2</sub> (25 ppm), os mesmos autores calcularam uma taxa específica de crescimento equivalente a 2,66 (d<sup>-1</sup>). Diferentes espécies de microalgas, metodologias de cultivo e de aplicação dos gases de combustão podem gerar discrepâncias quanto ao valor da taxa de crescimento ( $\mu$ ) na literatura. No presente trabalho, o maior valor de  $\mu$  (1,691 ± 0,03) foi obtido com 0,3 L SGC d<sup>-1</sup>. De acordo com Cazzaniga et al. (2014), uma cepa selvagem de *C. sorokiniana* pode apresentar

valores próximos de  $\mu$  quando cultivada em escala laboratorial (1 L;  $\mu = 1,28 \pm 0,05$ ) e ampliada (7 L;  $\mu = 1,25 \pm 0,04$ ). Xia et al. (2013) testaram o efeito de simulações de gases de combustão com 0, 5, 10 e 15% de  $\text{CO}_2$  no cultivo de *C. sorokiniana* CS-01 e obtiveram  $\mu$  ( $\text{d}^{-1}$ ) igual a  $0,29 \pm 0,01$ ;  $0,31 \pm 0,04$ ;  $0,35 \pm 0,02$  e  $0,24 \pm 0,01$ , respectivamente. Testes com *Chlorella emersonii* em fotobiorreatores de 5,5 L, com fornecimento de gases brutos de uma fábrica de cimento (com 15% de  $\text{CO}_2$ ), levaram, segundo Borkenstein et al. (2011), a uma taxa de crescimento de apenas  $0,13 \pm 0,08$ . A concentração efetiva de um agente tóxico, capaz de causar 50% de inibição do crescimento algal em 96 h de cultivo ( $\text{EC}_{50}$ ) é comumente utilizada como índice de toxicidade (HÖRNSTRÖM, 1990). Considerando os três últimos valores médios de  $\mu$  (correspondentes a 1,5, 6 e 48 L  $\text{d}^{-1}$ ), foi possível traçar uma regressão linear negativa e, a partir da equação da reta, estimamos o volume de gás necessário para reduzir  $\mu$  ao valor de 0.8 (cerca de 50% do valor obtido com o controle). Esse volume (aproximadamente 60 L  $\text{d}^{-1}$ ) corresponderia a 10 h ininterruptas de borbulhamento.

Em termos de densidade celular final, Yanagi, Watanabe e Saiki (1995) não observaram diferença na exposição de *Chlorella* sp. HA-1 a  $\text{CO}_2$  (10%) e uma mistura gasosa contendo  $\text{CO}_2$  (10%), NO (100 ppm) e  $\text{NO}_2$  (20 ppm). É importante ressaltar que os autores empregaram metade do fluxo de aeração utilizado no presente trabalho e o tempo total de cultivo foi de apenas 60 h. A ausência de toxicidade, neste caso, não poderia ser assegurada com rigor, pois muitos efeitos só começam a ser detectados ao final da fase exponencial de crescimento ou durante a fase estacionária.

No presente trabalho, não foi constatada degradação da clorofila, o que é benéfico, pois, segundo Talec et al. (2013), em condições controladas de luz e temperatura, o conteúdo celular de clorofila *a* é o principal regulador da atividade fotossintética. A elevação de qP com 48 L SGC  $\text{d}^{-1}$  indicou um aumento do número de centros de reação do PSII que passaram a ficar abertos e oxidados (MAXWELL; JOHNSON, 2000). Interpreta-se, neste caso, um maior investimento energético em fotoquímica mediante uma situação de estresse fisiológico. A ausência de variação nos resultados qN e NPQ sugere que rotas de dissipação de energia induzidas por estresse não foram acionadas pelo metabolismo celular. Embora seja um indicador de estresse (MISRA; MISRA; SINGH, 2012), NPQ não sinalizou mudanças significativas na eficiência de dissipação de calor devido à exposição a SGC. De acordo com Cuaresma Franco et al. (2012), *C. sorokiniana* poderia apresentar maiores valores de NPQ mediante exposição a luz em

excesso e condições subótimas de temperatura, fatores que controlamos ao longo de todo o cultivo.

Devido ao rápido crescimento de *C. sorokiniana*, optamos por amostragem em 72h para registro da curva de saturação de luz e comparação entre  $\Phi_M$  e  $\Phi'_M$ . Períodos inferiores de amostragem poderiam não ser suficientes para detectar efeitos dos poluentes, inicialmente aplicados em 48 h. Períodos superiores, por sua vez, deixariam de refletir esses efeitos na fase exponencial de crescimento dessa espécie de microalga. De acordo com Sakshaug et al. (1997), a curva de saturação de luz é dividida em três etapas: (1) linearidade inicial da fotossíntese, limitada pela incidência de luz; (2) fase não-linear crescente e, atingida a saturação luminosa, verifica-se um (3) declínio da taxa fotossintética (fotoinibição). A inclinação da etapa (1),  $\alpha$ , tida como medida da eficiência de captura da luz (HENLEY, 1993; JODŁOWSKA; LATAŁA, 2012), é uma estimativa da taxa de aumento da fotossíntese em relação à irradiância. Nesta fase, apenas a luz é fator limitante. O estresse prolongado de 48 L SGC d<sup>-1</sup> diminuiu tanto essa taxa quanto a máxima produção fotossintética ( $ETR_{max}$ ). Exposições menores a SGC (0,1 e 0,3 L d<sup>-1</sup>), por sua vez, estenderam o limite da irradiância saturante ( $I_k$ ) em comparação ao controle ( $p < 0,05$ ), permitindo um aumento igualmente significativo da  $ETR_{max}$ . Em todos os tratamentos,  $I_k$  foi superior à intensidade luminosa utilizada neste trabalho (130  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), o que é ben\u00e9fico, pois, mantidas as condi\u00e7\u00f5es atuais, seria poss\u00edvel elevar a irradi\u00e2ncia de cultivo para aproximadamente 200  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  sem causar saturação fotossintética.

O aumento de  $R^B$  resulta de um importante fator: a presença de  $O_2$  (9%) na composição de SGC. Ao mesmo tempo em que *C. sorokiniana* realizou fotossíntese, fixando  $CO_2$  introduzido pela simulação e liberando  $O_2$ , uma carga adicional de  $O_2$  foi acrescentada ao sistema, favorecendo a atividade oxigenase da enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO) e aumentando a fotorrespiração (RAVEN; GIRARD-BASCOU, 2001), processo inversamente proporcional a  $\Phi_M$  (SAGE; KOCACINAR; KUBIEN, 2010). Foi em *Chlorella* que Warburg (1920) descobriu que altas concentrações de oxigênio inibem a taxa da fotossíntese. Isso é verificado particularmente em condições saturantes de luz e com percentual de oxigênio na faixa de 21–100% (TURNER; BRITAIN, 1962). Causas sugeridas para esse efeito, conhecido como efeito Warburg, incluem inativação enzimática, fotoxidação e a chamada reação de Mehler, caracterizada pela transferência de elétrons da ferredoxina-

NADP redutase para o oxigênio e consequente formação de superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), uma espécie de radical livre altamente reativa (BJORKMAN, 1966; BADGER et al., 2000).

Em 72 h,  $\Phi_M$  e  $\Phi'_M$  não diferiram entre si após o fornecimento de 48 L SGC d<sup>-1</sup>. A queda mais acentuada de  $\Phi_M$ , no entanto, sugere que  $\Phi'_M$  é um parâmetro menos sensível a variações ambientais, conforme o observado por Lombardi e Maldonado (2011). Sabe-se que o bloqueio parcial e a diminuição do transporte de elétrons do PSII para o PSI limitam a reoxidação da  $Q_A$ , levando ao decaimento de  $\Phi_M$  (MALLICK; MOHN, 2003), efeito que pode ser ocasionado por baixos valores de pH. Kromkamp et al. (2008) apontam que, enquanto  $\Phi_M$  gera informações a respeito do estado fisiológico do fitoplâncton,  $\Phi'_M$  sinaliza a atividade fotossintética, igualmente afetada pela acidez do meio.

O efeito indireto causado pelo pH pode não ter sido o único malefício do excesso de SGC. Efeitos fitotóxicos de  $NO_x$  decorrem do estresse combinado entre acidificação celular, aumento dos níveis de nitrito ( $NO_2^-$ ) e amônia ( $NH_3$ ), além da interferência direta de radicais livres ( $\cdot NO$ ) em mecanismos enzimáticos (WELLBURN, 1990). Por agir como doador e aceptor de elétrons, o  $SO_2$  em meio aquoso é capaz de interferir no transporte de elétrons, afetando o metabolismo de plantas (OSMOND; AVADHANI, 1970). A ligação irreversível do  $SO_2$  com ferro encontrado na ferredoxina e nos citocromos pode levar à inativação desses carreadores de elétrons e, conseqüentemente, à inibição da fotossíntese (MALHOTRA; HOCKING, 1976). Não menos importante, a ionização de  $H_2SO_3$  dá origem a sulfito ( $SO_3^{2-}$ , em  $pH \geq 6$ ) e bissulfito ( $HSO_3^-$ , em  $pH < 6$ ), podendo este último ser tóxico, dependendo da concentração (LARA-GIL; ÁLVAREZ; PACHECO, 2014; VAN DEN HENDE; VERVAEREN; BOON, 2012).

Apesar disso, o  $SO_2$ , se fornecido de maneira controlada, não deixa de ser uma fonte de enxofre às microalgas, importante na constituição de aminoácidos e de lipídios dos tilacoides (VAN DEN HENDE; VERVAEREN; BOON, 2012). Formados a partir de  $NO_x$ , tanto nitrito ( $NO_2^-$ ) quanto nitrato ( $NO_3^-$ ) podem estimular a taxa de evolução do oxigênio em culturas limitadas em nitrogênio (Thomas et al. 1976). É comprovado, também, que a depleção de nitrogênio em cultivo de *Chlorella* sp. reduz  $\Phi_M$ ,  $\alpha$ , ETR e aumenta NPQ (WHITE; ANANDRAJ; BUX, 2011).

A tendência de limitação da densidade celular por exposição excessiva a SGC caracteriza um ponto desfavorável se o objetivo é associar a emissão abundante de gases da indústria cimenteira com a produção massiva de microalgas para fins comerciais. É possível, no entanto, adotar estratégias para poupar as algas do estresse constante e

potencializar seu desempenho. A inibição de crescimento pode ser superada, por exemplo, usando inóculos com maior densidade celular (CHIU et al., 2008). A pré-adaptação de determinadas espécies a baixos níveis de pH é igualmente possível (SUNG et al., 1998). O acréscimo de soluções alcalinas e tampões compensam ou, pelo menos, retardam a acidificação dos meios. Mesmo concentrações mais elevadas de gases, quando intercaladas com borbulhamento de ar, podem resultar em otimização do crescimento algal (HE; SUBRAMANIAN; TANG, 2012).

## 4.2 CAPÍTULO 2

### Efeito da simulação de gases de combustão da indústria cimenteira em viabilidade celular, proteínas e carboidratos totais de *C. sorokiniana*

#### 4.2.1 Resultados

A Figura 12 mostra que *C. sorokiniana* apresentou viabilidade celular média estatisticamente inferior à do cultivo controle (97%) quando cultivada com SGC ( $p < 0,05$ ). A diferença, no entanto, não foi proporcional ao aumento da exposição aos gases, pois os dois tratamentos com maiores tempos de borbulhamento (1h – 6 L d<sup>-1</sup> ; 8h – 48 L d<sup>-1</sup>) resultaram em número de células viáveis igual ao dos testes intermediários, com apenas 8 e 15 min de borbulhamento (0,8 e 1,5 L d<sup>-1</sup>).

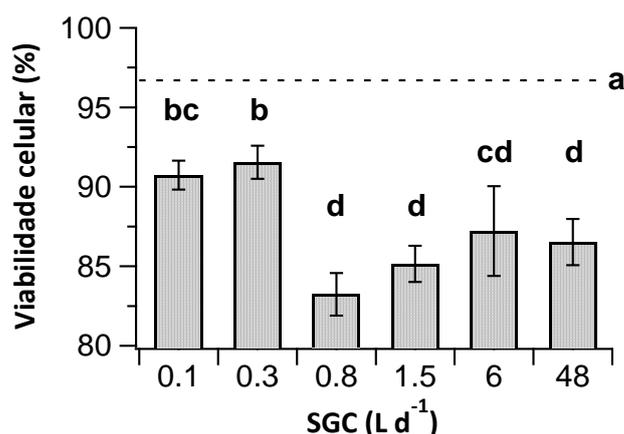


Figura 12. Viabilidade celular de *C. sorokiniana*, quando exposta à simulação de gases de combustão (SGC). A linha tracejada representa o valor obtido com o tratamento controle. Letras iguais sobre as barras indicam semelhança estatística. A letra ao lado da linha tracejada corresponde à estatística para o controle. As barras de erro indicam o desvio padrão ( $n = 3$ ).

Sete gráficos de dispersão gerados pelo analisador de células (Figura 13) mostram o perfil de viabilidade de *C. sorokiniana* ao longo dos seis cultivos com SGC e do cultivo controle. Ressalta-se que a emissão de fluorescência torna singular a interpretação da viabilidade celular em microalgas. O eixo “X” teria relevância apenas em casos de estudo com células animais ou microrganismos contaminantes. A leitura dos gráficos deve se basear apenas no eixo “Y” (*Nucleated cells*), equivalente à fluorescência da clorofila. Cada gráfico corresponde a apenas uma das três réplicas do

respectivo tratamento, pois, para cada amostra, o citômetro realizava uma leitura independente.

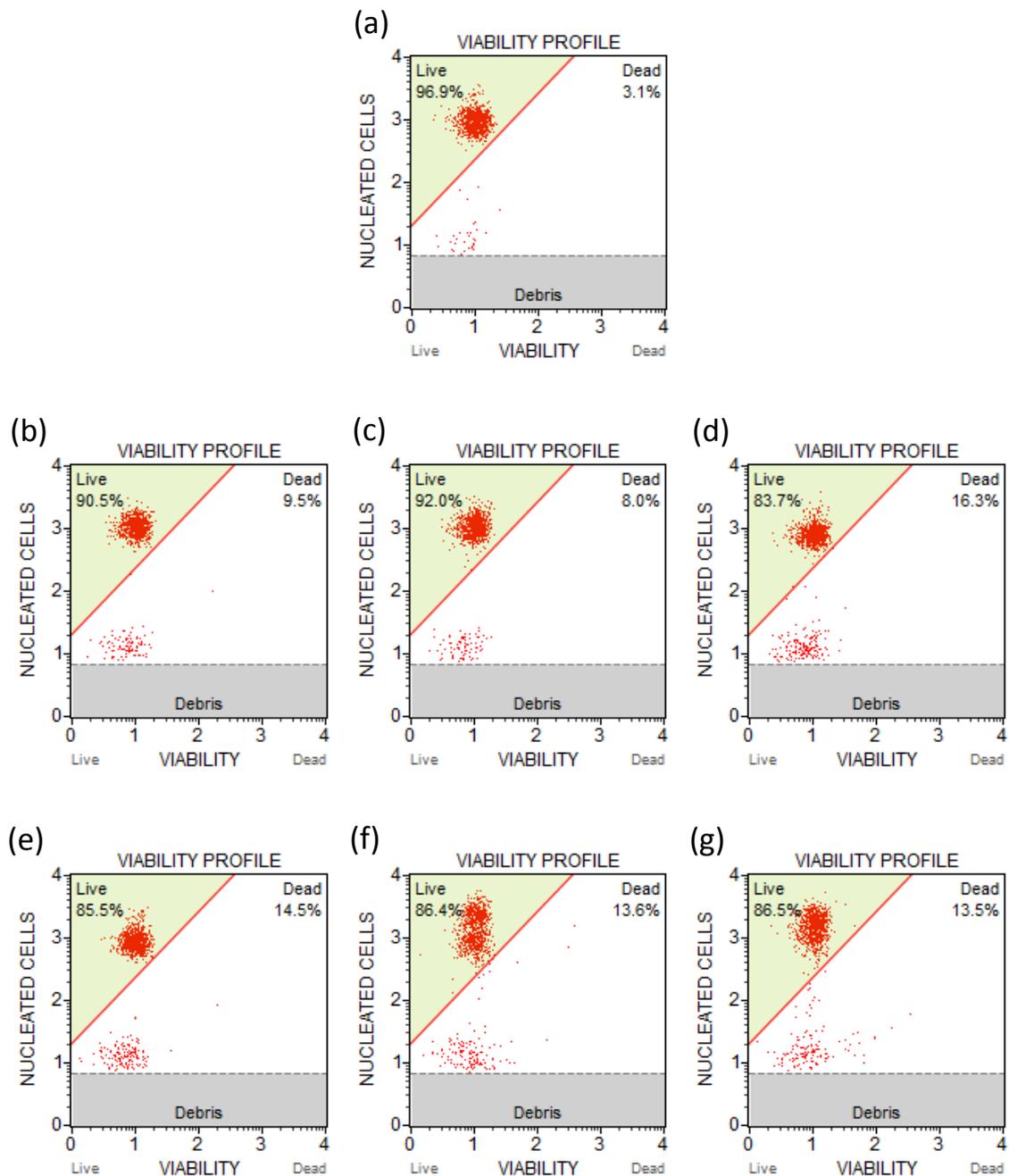


Figura 13. Gráficos de dispersão ilustrando a detecção de fluorescência da clorofila (*Nucleated Cells*) em diferentes culturas de *C. sorokiniana*, 24 h após primeira exposição a (a) Ar-CO<sub>2</sub> 18% (controle); (b) 0,1 L SGC; (c) 0,3 L SGC; (d) 0,8 L SGC; (e) 1,5 L SGC; (f) 6 L SGC e (g) 48 L SGC. Células viáveis (*Live*) estão agrupadas na área superior esquerda; células não-viáveis (*Dead*) se concentram na área inferior esquerda, próximo à linha tracejada que delimita a zona de detritos (*Debris*).

Um dia após o primeiro borbulhamento, percebemos que a simulação gasosa, mesmo em exposições mais curtas, gerou um aglomerado de células mortas (com baixa ou nenhuma fluorescência detectada) maior do que o registrado no controle. Diferenças visuais no agrupamento de células com níveis normais de fluorescência só ficaram evidentes nos tratamentos com 6 e 48 L d<sup>-1</sup> de SGC. A maior dispersão de pontos é sinal de que o estresse prolongado aumentou o número de células debilitadas na cultura, embora ainda não pudessem ser consideradas mortas. Uma dispersão mais acentuada de células mortas também pode ser constatada nesses dois casos.

A partir dos dados quantitativos obtidos com a determinação de proteínas e carboidratos (Figura 14), calculou-se a relação proteínas:carboidratos (P:C) para cada condição experimental. O fornecimento de gás por 1 e 8 h aumentou o conteúdo proteico de *C. sorokiniana* em 75% e 154%, respectivamente. Os mesmos tratamentos também levaram a um aumento significativo de 148% e 195% no conteúdo celular de carboidratos totais ( $p < 0,05$ ). A razão P:C obtida a partir do controle ( $1,042 \pm 0,107$ ) não diferiu estatisticamente dos tratamentos com 0,1 L d<sup>-1</sup> ( $1,067 \pm 0,013$ ), 0,3 L d<sup>-1</sup> ( $0,993 \pm 0,040$ ) e 48 L d<sup>-1</sup> ( $0,901 \pm 0,174$ ). Em todas as análises, os desvios padrão aumentaram nos dois últimos testes.

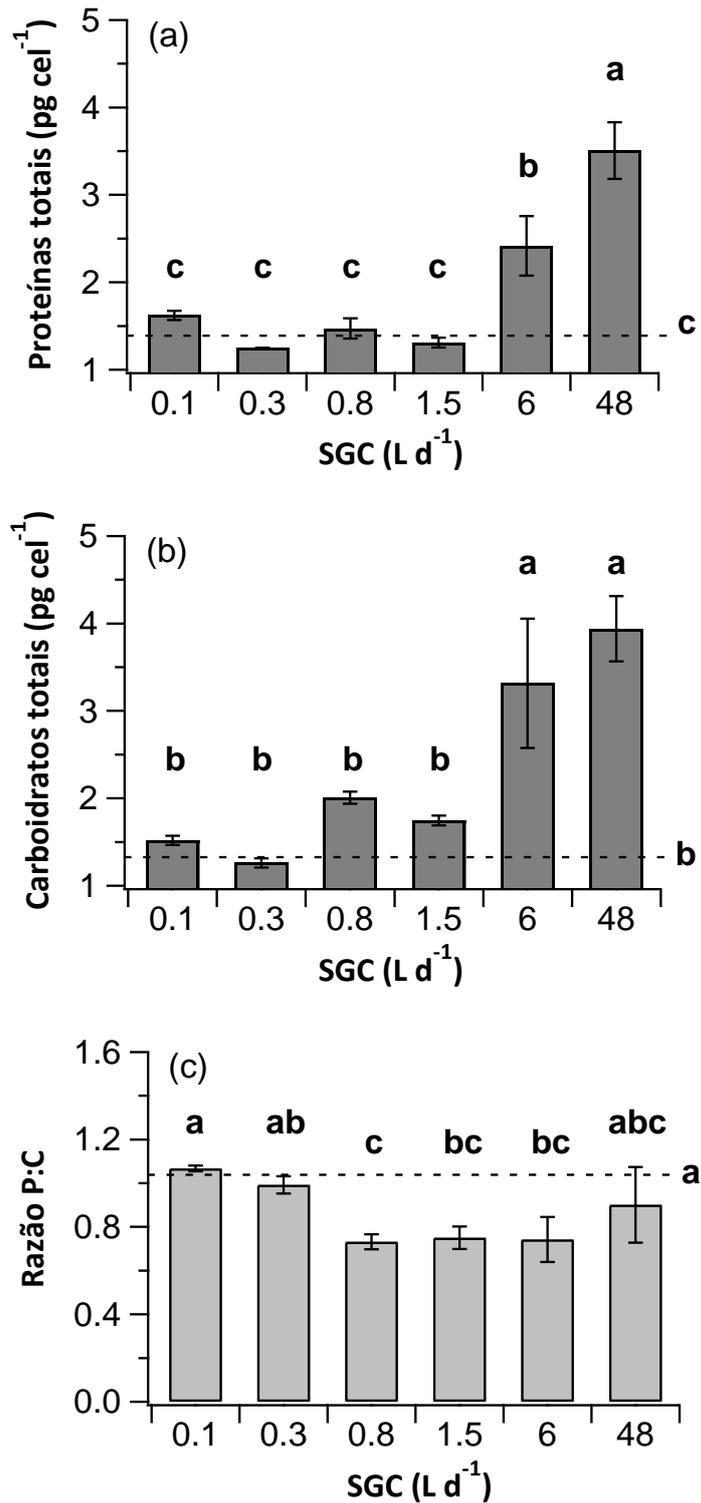


Figura 14. (a) Proteínas totais, (b) carboidratos totais e (c) razão proteína:carboidrato (P:C) em *C. sorokiniana*, quando exposta à simulação de gases de combustão (SGC). A linha tracejada representa o valor obtido com o tratamento controle. Letras iguais sobre as barras indicam semelhança estatística. A letra ao lado da linha tracejada corresponde à estatística para o controle. As barras de erro indicam o desvio padrão (n = 3).

#### 4.2.2 Discussão

A simulação gasosa afetou *C. sorokiniana*, mesmo em exposições reduzidas, como confirmado pelos resultados de citometria de fluxo. A maior viabilidade foi constatada no tratamento com CO<sub>2</sub> (18%) e sem a interferência dos gases poluentes, o controle. A queda da viabilidade, porém, não se acentuou conforme aumentamos a exposição para mais de 0,8 L d<sup>-1</sup>. Duas possibilidades justificam esse resultado: apesar do estresse, *C. sorokiniana* se adaptou à presença dos gases no sistema de cultivo ou a mistura de gases simplesmente atingiu um limite de solubilidade no meio líquido (como evidenciado pelos dados de pH), de modo que o borbulhamento excessivo deixou de surtir efeito direto nas microalgas. Neste último caso, a maior parte do gás pode ter sido perdida para a atmosfera e a permanência do pH do meio em níveis subótimos, por um tempo maior, foi a responsável pelo estresse contínuo.

Ao longo dos tratamentos, a menor média de porcentagem da viabilidade celular registrada pela citometria de fluxo foi 83% (valor obtido no tratamento intermediário com 0,8 L SGC d<sup>-1</sup>). Isso é benéfico, se comparado à porcentagem de inibição verificada em testes com substâncias comprovadamente tóxicas, como metais-traço (MONTEIRO et al., 2011). O malefício de SGC para as algas até poderia ser maior se o fluxo de gás fosse aumentado, mas o impacto nas culturas tornaria contraproducente a aplicação excessiva de gás em termos de cultivo massivo com propósito comercial, motivo pelo qual permanecemos no limiar da toxicidade, buscando entender o processo fisiológico responsável pelo efeito.

A partir dos resultados da análise bioquímica, percebemos que o borbulhamento superior a 15 min (1,5 L SGC d<sup>-1</sup>) criou uma condição de estresse que induziu *C. sorokiniana* a investir tanto na produção de proteínas quanto de carboidratos. A razão P:C, de modo geral, manteve-se próxima à registrada no controle, exceto pelos tratamentos intermediários. Um aumento na relação P:C seria evidência de células saudáveis; o decréscimo, por sua vez, sinaliza condição estressante (ROCHA et al., 2015). No tratamento extremo de 48 L d<sup>-1</sup>, *C. sorokiniana* manteve sua proporção interna de proteínas e carboidratos, indício de uma estratégia de adaptação para resistir às condições subótimas de pH do meio de cultura.

O uso intencional da limitação nutricional, em conjunto com a aplicação de gases de combustão, é uma estratégia com potencial para aumentar a obtenção de biomoléculas de interesse comercial. Em um teste para otimização de produção de

lipídios, foi comprovado que *C. sorokiniana* possui boa adaptação a baixos níveis de nitrogênio (NEGI et al., 2015). Em *C. vulgaris*, o estresse provocado pela carência em nitrogênio pode elevar o conteúdo de carboidratos de 16% em situação normal para 22,4% (KIM et al., 2014). De acordo com Kumar, Dasgupta e Das (2014), a biomassa de *Chlorella*, em condição de estresse proporcionado por gases de combustão, apresenta maior constituição proteica ( $40,15 \pm 4\%$ ) do que quando cultivada apenas com  $\text{CO}_2$  ( $33,12 \pm 2,5\%$ ).

Força motriz da fotossíntese, a luz é um fator crucial na obtenção de biomassa com alto teor proteico, comprovaram Seyfabadi, Ramezanpour e Amini Khoeyi (2011). Em um cultivo de *C. vulgaris*, os autores verificaram uma composição proteica de 46% com iluminação de  $100 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e fotoper\u00edodo de 16:8 h (claro:escuro) e de 33% com  $37,5 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e fotoper\u00edodo de 8:16 h. Embora existam carboidratos com fun\u00e7\u00e3o estrutural, encontrados nas paredes celulares, os carboidratos de armazenamento s\u00e3o os que as c\u00e9lulas acumulam, dentro e fora dos cloroplastos, em condi\u00e7\u00f5es limitadas de luz e nutrientes (GEIDER; LA ROCHE, 2002).

O tempo de exposi\u00e7\u00e3o a um agente estressante tamb\u00e9m \u00e9 crucial em testes ecotoxicol\u00f3gicos. Isso \u00e9 constatado no uso, por exemplo, de metais-tra\u00e7o, capazes de reduzir os n\u00edveis de clorofila total e de prote\u00ednas sol\u00faveis em *C. sorokiniana* (CARFAGNA et al., 2013). Outro fator importante concerne o tipo de cultivo realizado. Em condi\u00e7\u00f5es mixotr\u00f3ficas, a constitui\u00e7\u00e3o proteica de *C. sorokiniana* ( $47,8 \pm 2\%$ ) \u00e9 maior do que em condi\u00e7\u00f5es autotr\u00f3ficas ( $37,7 \pm 1\%$ ). O oposto, no entanto, \u00e9 verificado em rela\u00e7\u00e3o ao percentual de carboidratos, para as mesmas condi\u00e7\u00f5es mixotr\u00f3ficas ( $18,08 \pm 3,64\%$ ) e autotr\u00f3ficas ( $27,51 \pm 3,29\%$ ) (KUMAR; DASGUPTA; DAS, 2014). Depreende-se dos resultados desse estudo que o fato de haver uma fonte alternativa de carbono leva as microalgas armazenar menor quantidade de carboidratos. O cultivo mixotr\u00f3fico de *C. sorokiniana* tamb\u00e9m pode aumentar a taxa de crescimento e o rendimento em biomassa (JUNTILA; BAUTISTA; MONOTILLA, 2015).

Observamos que a indu\u00e7\u00e3o de estresse deve ser aplicada com cautela, pois, embora aumente o percentual de prote\u00ednas e carboidratos nas c\u00e9lulas, ela afeta o crescimento, diminui a densidade celular e reduz, por conseguinte, a quantidade final de biomol\u00e9culas desejadas. O controle da acidez pode criar condi\u00e7\u00f5es para que outros fatores sejam estrategicamente modificados. Subproduto da ind\u00fas\u00e9ria cimenteira, o chamado “p\u00f3 de forno de cimento” (*cement kiln dust* – CKD) \u00e9 naturalmente alcalino, devido \u00e0 presen\u00e7a de res\u00edduos de \u00f3xido de c\u00e1lcio em sua composi\u00e7\u00e3o, e foi testado com

sucesso por Lara-Gil, Álvarez e Pacheco (2014) como tamponante de meio para *Desmodesmus abundans*. Atribuiu-se a CKD uma otimização da concentração de sulfato em meio BG-11 e um possível benefício às microalgas a partir dos principais constituintes da poeira, incluindo CaO, SiO<sub>2</sub>, SO<sub>3</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e K<sub>2</sub>O. A incorporação de elementos de CKD pelas microalgas ajuda na limpeza desse resíduo e enriquece a biomassa, o que é benéfico, dependendo de sua finalidade.

Embora não seja o foco do presente capítulo, é importante mencionar que o cultivo de microalgas com CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO também pode resultar em biomassa rica em ácidos graxos (Radmann e Costa, 2008). *C. sorokiniana*, em particular, apresenta notável habilidade para sintetizar e acumular lipídios, o que é muito valorizado na produção de biocombustíveis (Xia et al., 2013).

Para fins alimentares, porém, a biomassa gerada a partir de cultivos aerados com gases de combustão coletados diretamente de chaminés industriais deve passar por uma inspeção cuidadosa antes de ser comercializada. Borkenstein et al. (2011) verificaram níveis de chumbo acima do normal em biomassa de *C. emersonii*, cultivada nessas condições. De acordo com os mesmos autores, as fábricas de cimento podem incinerar, além de combustíveis fósseis, materiais como pneus, plásticos descartados, restos de carne e ossos triturados, misturas de diversos solventes, lama de depuração de esgoto e resíduos de óleo para aquecer o calcário. Não há como prever, de forma generalizada, que tipos de substâncias voláteis serão incorporadas à biomassa algal. Inspeccionar a procedência do cimento, sua produção e a composição de emissões dela derivadas é, portanto, um pré-requisito fundamental para a implantação de projetos que associam gases brutos de combustão e cultivo de microalgas com finalidade comercial. O mesmo princípio vale para o uso de gases oriundos de outras atividades industriais que envolvam a queima de combustíveis fósseis, como termelétricas, fábricas de carvão e refinarias.

## 5. CONCLUSÕES

Nas condições do presente trabalho, *C. sorokiniana* foi uma espécie tolerante à simulação de gases de combustão baseada em emissões da indústria cimenteira. Entretanto, a exposição a SGC por longos períodos de tempo acidificou o meio de cultura, caracterizando uma condição de estresse que afetou o desempenho e a fotossíntese das microalgas.

Em comparação ao tratamento controle, as exposições diárias de 1 e 8 h (6 e 48 L gás d<sup>-1</sup>) reduziram a taxa específica de crescimento de *C. sorokiniana* em 17 e 39%, respectivamente. Constatamos que borbulhamentos superiores a 8 min (0,8 L d<sup>-1</sup>) diminuíam significativamente a densidade celular ao final de cada cultivo.

A técnica da fluorometria PAM evidenciou alterações fisiológicas em *C. sorokiniana*, particularmente no tratamento extremo com 8 h de gás por dia (48 L d<sup>-1</sup>). Índícios de estresse e queda na atividade fotossintética foram registrados através dos baixos valores de  $\Phi_M$  (0,40) e  $\Phi'_M$  (0,47), respectivamente. Parâmetros das curvas de saturação de luz ( $\alpha$ ,  $ETR_{max}$ ,  $I_k$  e  $R^B$ ) confirmaram os efeitos negativos do estresse prolongado. Verificamos um aumento inesperado do *quenching* fotoquímico (qP) e baixa perda de energia por dissipação de calor (NPQ).

A partir da citometria de fluxo, observamos que todos os tratamentos com a simulação gasosa resultaram em menor viabilidade celular, se comparados com o controle. Apesar disso, a queda do número de células viáveis não acompanhou a exposição crescente à SGC e não foi registrada viabilidade celular menor do que 83%. As análises bioquímicas revelaram um aumento expressivo de 75% e 154% do conteúdo proteico de *C. sorokiniana* com 6 e 48 L gás d<sup>-1</sup>, respectivamente. Os mesmos tratamentos também aumentaram a quantidade de carboidratos totais em 148% e 195%.

De modo geral, mesmo apresentando alterações fisiológicas, *C. sorokiniana* resistiu às condições subótimas de crescimento, o que comprova sua robustez e ressalta sua relevância em aplicações biotecnológicas envolvendo gases de combustão. Não é recomendado o borbulhamento contínuo dos gases, a menos que seu uso seja intencional, visando maior obtenção de compostos bioquímicos de interesse comercial, como proteínas e carboidratos.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABU-ALLABAN, M.; ABU-QUDAIS, H. Impact assessment of ambient air quality by cement industry: a case study in Jordan. **Aerosol and Air Quality Research**, v. 11, p. 802–810, 2011.
- ALBALASMEH, A. A.; BERHE, A. A.; GHEZZEHEI, T. A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 2, p. 253–261, 2013.
- ALI, M. B.; SAIDUR, R.; HOSSAIN, M. S. A review on emission analysis in cement industries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 5, p. 2252–2261, 2011.
- ANDERSEN, R. A. **Algal Culturing Techniques**. USA: Elsevier Academic Press, 2005.
- BADGER, M. R. et al. Electron flow to oxygen in higher plants and algae: rates and control of direct photoreduction (Mehler reaction) and rubisco oxygenase. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 355, n. 1402, p. 1433–46, 2000.
- BENHELAL, E. et al. Global strategies and potentials to curb CO<sub>2</sub> emissions in cement industry. **Journal of Cleaner Production**, v. 51, p. 142–161, 2013.
- BJORKMAN, O. The effect of oxygen concentration on photosynthesis in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v. 19, n. 3, p. 618–633, 1966.
- BONOTTO, S. Food and chemicals from microalgae. **Progress in Oceanography**, v. 21, p. 207–215, 1988.
- BORKENSTEIN, C. G. et al. Cultivation of *Chlorella emersonii* with flue gas derived from a cement plant. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 1, p. 131–135, 2011.
- BOSOAGA, A.; MASEK, O.; OAKEY, J. E. CO<sub>2</sub> capture technologies for cement industry. **Energy Procedia**, v. 1, p. 133–140, 2009.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976.
- BRÁNYIKOVÁ, I. et al. Microalgae – novel highly efficient starch producers. **Biotechnology and bioengineering**, v. 108, n. 4, p. 766–76, 2011.
- CARDOL, P.; FORTI, G.; FINAZZI, G. Regulation of electron transport in microalgae. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1807, p. 912–918, 2011.
- CARFAGNA, S. et al. Physiological and morphological responses of Lead or Cadmium exposed *Chlorella sorokiniana* 211-8K (Chlorophyceae). **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 1–7, 2013.
- CASTRO, A. H. S.; ARAÚJO, R. S.; SILVA, G. M. M. Qualidade do ar – parâmetros

de controle e efeitos na saúde humana: uma breve revisão. **Holos**, v. 5, p. 107–121, 2013.

CAZZANIGA, S. et al. Domestication of the green alga *Chlorella sorokiniana*: reduction of antenna size improves light-use efficiency in a photobioreactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 157, p. 1–13, 2014.

CHEN, C. Y. et al. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 1–10, 2013.

CHIU, S.-Y. et al. Reduction of CO<sub>2</sub> by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3389–3396, 2008.

CUARESMA FRANCO, M. et al. Performance of *Chlorella sorokiniana* under simulated extreme winter conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 4, p. 693–699, 2012.

CUELLAR-BERMUDEZ, S. P. et al. Photosynthetic bioenergy utilizing CO<sub>2</sub>: an approach on flue gases utilization for third generation biofuels. **Journal of Cleaner Production**, v. 98, p. 53–65, 2015.

CUÉLLAR-FRANCA, R. M.; AZAPAGIC, A. Carbon capture, storage and utilisation technologies: A critical analysis and comparison of their life cycle environmental impacts. **Journal of CO<sub>2</sub> Utilization**, v. 9, p. 82–102, 2014.

ENRÍQUEZ, S.; BOROWITZKA, M. A. The use of the fluorescence signal in studies of seagrasses and macroalgae. In: SUGGETT, D. J.; BOROWITZKA, M.; PRÁŠIL, O. (Eds.). **Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications**. Developments in Applied Phycology. [s.l.] Springer Netherlands, 2010. p. 187–208.

FRANQUEIRA, D. et al. Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae. **Science of The Total Environment**, v. 247, n. 2-3, p. 119–126, 2000.

GEIDER, R.; LA ROCHE, J. Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. **European Journal of Phycology**, v. 37, n. 1, p. 1–17, 2002.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J.-M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 990, n. 1, p. 87–92, 1989.

GUCCIONE, A. et al. *Chlorella* for protein and biofuels: from strain selection to outdoor cultivation in a Green Wall Panel photobioreactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 84, p. 1–12, 2014.

HE, L.; SUBRAMANIAN, V. R.; TANG, Y. J. Experimental analysis and model-based optimization of microalgae growth in photo-bioreactors using flue gas. **Biomass and Bioenergy**, v. 41, n. 314, p. 131–138, 2012.

HENLEY, W. J. Measurement and interpretation of photosynthetic light-response

curves in algae in the context of photo inhibition and diel changes. **Journal of Phycology**, v. 29, n. 6, p. 729–739, 1993.

HO, S. H. et al. Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 191–198, 2013.

HÖRNSTRÖM, E. Toxicity test with algae – A discussion on the batch method. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 20, n. 3, p. 343–353, 1990.

JACOBSON, M. Z. Review of solutions to global warming, air pollution, and energy security. **Energy & Environmental Science**, v. 2, n. 2, p. 148, 2009.

JASSBY, A. D.; PLATT, T. Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. **Limnology and Oceanography**, v. 21, n. 4, p. 540–547, 1976.

JODŁOWSKA, S.; LATAŁA, A. Mechanisms of photoacclimation on photosynthesis level in cyanobacteria. In: **Advances in Photosynthesis - Fundamental Aspects**. [s.l.] InTech, 2012. p. 588.

JOSA, A. et al. Comparative analysis of the life cycle impact assessment of available cement inventories in the EU. **Cement and Concrete Research**, v. 37, n. 5, p. 781–788, 2007.

JUNEAU, P.; EL BERDEY, A.; POPOVIC, R. PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 42, n. 2, p. 155–164, 2002.

JUNTILA, D. J.; BAUTISTA, M. A.; MONOTILLA, W. Biomass and lipid production of a local isolate *Chlorella sorokiniana* under mixotrophic growth conditions. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 395–398, 2015.

KAO, C.-Y. et al. Utilization of carbon dioxide in industrial flue gases for the cultivation of microalga *Chlorella* sp. **Bioresource Technology**, v. 166, p. 485–493, 2014.

KIM, K. H. et al. Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation. **Bioresource technology**, v. 153, p. 47–54, 2014.

KLAUSNER, A. Algaculture: Food for Thought. **Bio/Technology**, v. 4, n. 11, p. 947–953, 1986.

KROMKAMP, J. C. et al. Estimating phytoplankton primary production in Lake IJsselmeer (The Netherlands) using variable fluorescence (PAM-FRRF) and C-uptake techniques. **European Journal of Phycology**, v. 43, n. 4, p. 327–344, 2008.

KUMAR, K. et al. Development of suitable photobioreactors for CO<sub>2</sub> sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 8, p. 4945–4953, 2011.

- KUMAR, K.; BANERJEE, D.; DAS, D. Carbon dioxide sequestration from industrial flue gas by *Chlorella sorokiniana*. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 225–233, 2014.
- KUMAR, K.; DASGUPTA, C. N.; DAS, D. Cell growth kinetics of *Chlorella sorokiniana* and nutritional values of its biomass. **Bioresource technology**, v. 167, p. 358–366, 2014.
- LAM, M. K.; LEE, K. T.; MOHAMED, A. R. Current status and challenges on microalgae-based carbon capture. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 10, p. 456–469, 2012.
- LARA-GIL, J. A.; ÁLVAREZ, M. M.; PACHECO, A. Toxicity of flue gas components from cement plants in microalgae CO<sub>2</sub> mitigation systems. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, p. 357–368, 2014.
- LEE, O. K.; OH, Y.-K.; LEE, E. Y. Bioethanol production from carbohydrate-enriched residual biomass obtained after lipid extraction of *Chlorella* sp. KR-1. **Bioresource technology**, v. 196, p. 22–7, 2015.
- LI, J. et al. Technological, economic and financial prospects of carbon dioxide capture in the cement industry. **Energy Policy**, v. 61, p. 1377–1387, 2013.
- LIZZUL, A. M. et al. Combined remediation and lipid production using *Chlorella sorokiniana* grown on wastewater and exhaust gases. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 12–18, 2014.
- LOMBARDI, A. T.; MALDONADO, M. T. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. **Photosynthesis research**, v. 108, p. 77–87, 2011.
- MAEDA, K. et al. CO<sub>2</sub> fixation from the flue gas on coal-fired thermal power plant by microalgae. **Energy Conversion and Management**, v. 36, n. 6-9, p. 717–720, 1995.
- MALHOTRA, S. S.; HOCKING, D. Biochemical and cytological effects of sulphur dioxide on plant metabolism. **New Phytologist**, v. 76, n. 2, p. 227–237, 1976.
- MALLICK, N.; MOHN, F. H. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: A case study with the green microalga *Scenedesmus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55, n. 1, p. 64–69, 2003.
- MAXWELL, K.; JOHNSON, G. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659–668, 2000.
- MISRA, A. N.; MISRA, M.; SINGH, R. Chlorophyll fluorescence in plant biology. In: **Biophysics**. [s.l.] InTech, 2012.
- MONTEIRO, C. M. et al. Toxicity of cadmium and zinc on two microalgae, *Scenedesmus obliquus* and *Desmodesmus pleiomorphus*, from Northern Portugal. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 1, p. 97–103, 2011.
- MONTOYA, J. M.; RAFFAELLI, D. Climate change, biotic interactions and ecosystem services. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, p. 2013–2018, 2010.

- MORITA, M.; WATANABE, Y.; SAIKI, H. High photosynthetic productivity of green microalga *Chlorella sorokiniana*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 203–218, 2000.
- MUJTABA, G. et al. Lipid production by *Chlorella vulgaris* after a shift from nutrient-rich to nitrogen starvation conditions. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 279–283, 2012.
- MÜLLER, P.; LI, X. P.; NIYOGI, K. K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. **Plant physiology**, v. 125, n. 4, p. 1558–1566, 2001.
- NAPOLÉON, C.; CLAQUIN, P. Multi-parametric relationships between PAM measurements and carbon incorporation, an in situ approach. **PLoS one**, v. 7, n. 7, p. e40284, 2012.
- NEGI, S. et al. Impact of nitrogen limitation on biomass, photosynthesis, and lipid accumulation in *Chlorella sorokiniana*. **Journal of Applied Phycology**, 2015.
- OLOFSSON, M. et al. Baltic Sea microalgae transform cement flue gas into valuable biomass. **Algal Research**, v. 11, p. 227–233, 2015.
- OSMOND, C. B.; AVADHANI, P. N. Inhibition of the b-carboxylation pathway of CO<sub>2</sub> fixation by bisulphite compounds. **Plant Physiology**, v. 45, p. 228–230, 1970.
- OXBOROUGH, K.; BAKER, N. R. Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components – calculation of qP and F<sub>v</sub>'/F<sub>m</sub>' without measuring F<sub>o</sub>'. **Photosynthesis Research**, v. 54, n. 1989, p. 135–142, 1997.
- RADMANN, E. M. et al. Isolation and application of SO<sub>x</sub> and NO<sub>x</sub> resistant microalgae in biofixation of CO<sub>2</sub> from thermoelectricity plants. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 10, p. 3132–3136, 2011.
- RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1609–1612, 2008.
- RAJA, R. et al. Biomass from microalgae: an overview. **Oceanography: Open Access**, v. 2, n. 1, p. 1–7, 2014.
- RALPH, P. J. et al. Spatial heterogeneity in active chlorophyll fluorescence and PSII activity of coral tissues. **Marine Biology**, v. 141, n. 4, p. 639–646, 2002.
- RAVEN, J. A.; GIRARD-BASCOU, J. Algal model systems and the elucidation of photosynthetic metabolism. **Journal of Phycology**, v. 37, n. 6, p. 943–950, 2001.
- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria, R Foundation for Statistical Computing, 2016. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>. Acesso em: 5 fev. 2016
- RIPPKA, R. et al. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1–61, 1979.

ROCHA, G. S. et al. Growing *Scenedesmus quadricauda* in used culture media: is it viable? **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 1, p. 171–178, 2015.

SAGE, R. F.; KOCACINAR, F.; KUBIEN, D. S. C4 photosynthesis and temperature. In: RAGHAVENDRA, A. S.; SAGE, R. F. (Eds.). **C4 photosynthesis and related CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms**. Advances in Photosynthesis and Respiration. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. v. 32p. 161–195.

SAKSHAUG, E. et al. Parameters of photosynthesis: definitions, theory and interpretation of results. **Journal of Plankton Research**, v. 19, n. 11, p. 1637–1670, 1997.

SEYFABADI, J.; RAMEZANPOUR, Z.; AMINI KHOEYI, Z. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 4, p. 721–726, 2011.

SOLOMON, S. et al. Irreversible climate change due to carbon dioxide emissions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 6, p. 1704–1709, 2009.

STAUBER, J. L.; FRANKLIN, N. M.; ADAMS, M. S. Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 141–143, 2002.

SUGANYA, T. et al. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 909–941, 2016.

SUN, Y.; ZWOLIŃSKA, E.; CHMIELEWSKI, A. G. Abatement technologies for high concentrations of NO<sub>x</sub> and SO<sub>2</sub> removal from exhaust gases: A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 2, p. 119–142, 2015.

SUNG, K.-D. et al. Isolation of a new highly CO<sub>2</sub> tolerant fresh water microalga *Chlorella* sp. KR-1. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 15, n. 4, p. 449–450, 1998.

TALEC, A. et al. Effect of gaseous cement industry effluents on four species of microalgae. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 353–359, 2013.

THOMAS, R. J.; HIPKIN, C. R.; SYRETT, P. J. The interaction of nitrogen assimilation with photosynthesis in nitrogen deficient cells of *Chlorella*. **Planta**, v. 133, n. 1, p. 9–13, 1976.

TURNER, J. S.; BRITAIN, E. G. Oxygen as a factor in photosynthesis. **Biological Reviews**, v. 37, n. 1, p. 130–170, 1962.

VAN DEN HENDE, S.; VERVAEREN, H.; BOON, N. Flue gas compounds and microalgae: (Bio-)chemical interactions leading to biotechnological opportunities. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1405–1424, 2012.

WELLBURN, A. R. Tansley Review No. 24 – Why are atmospheric oxides of nitrogen usually phytotoxic and not alternative fertilizers? **New Phytologist**, v. 115, n. 3, p. 395–

429, 1990.

WHITE, S.; ANANDRAJ, A.; BUX, F. PAM fluorometry as a tool to assess microalgal nutrient stress and monitor cellular neutral lipids. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1675–1682, 2011.

WOODWARD, F. I. et al. Biological approaches to global environment change mitigation and remediation. **Current Biology**, v. 19, n. 14, p. R615–R623, 2009.

XIA, J. et al. Effects of simulated flue gases on growth and lipid production of *Chlorella sorokiniana* CS-01. **Journal of Central South University**, v. 20, n. 3, p. 730–736, 2013.

YANAGI, M.; WATANABE, Y.; SAIKI, H. CO<sub>2</sub> fixation by *Chlorella* sp. HA-1 and its utilization. **Energy Conversion and Management**, v. 36, n. 6-9, p. 713–716, 1995.

ZHU, S. et al. Enhanced accumulation of carbohydrate and starch in *Chlorella zofingiensis* induced by nitrogen starvation. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 174, n. 7, p. 2435–45, 2014.