

FRANCISCO MARCELO SANTANA DA CUNHA

INFLUÊNCIA DA INJEÇÃO DE GÁS CARBÔNICO NO CULTIVO DA MICROALGA
Spirulina platensis

Monografia submetida à Coordenação do Curso de Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Engenheiro de Pesca.

Aprovada em ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Wladimir Ronald Lobo Farias, D. Sc (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profª Silvana Saker Sampaio, Ph.D.
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Alexandre Holanda Sampaio, Ph.D.
Universidade Federal do Ceará - UFC

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me dar forças e coragem a enfrentar um dos maiores desafios da minha vida, minha formatura.

Ao Professor Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias, pela orientação, sempre disposto a ajudar e oferecendo informações valiosas para conclusão deste trabalho. Obrigado professor.

Aos Engenheiros de Pesca Carlos Henrique Profírio Marques e Jefferson Pablo de Sousa Saboya, por todo apoio e amizade construída durante os anos de faculdade e laboratório.

A todos os professores do Departamento de Engenharia de Pesca, pois foram de fundamental importância para minha formação pessoal e profissional.

Ao amigo Frederico Magalhães por sua disponibilidade em ajudar para que esse trabalho fosse realizado e por sua valiosa amizade.

A Universidade Federal do Ceará por me proporcionar uma quantidade imensa de aprendizado e lições de vida.

Aos meus pais José Arcanjo da Cunha e Maria da Conceição Santana da Cunha, pois tiveram paciência, serenidade, bons conselhos e cumpriram papel fundamental para que esse dia pudesse se realizar.

A minha tia Nilda Xavier pois seu sonho é ter um sobrinho graduado. A minha irmã Gabrielle Cunha, prima Maria Vanderléia e amigo Aldir, pelos esforços dedicados a elaboração desse trabalho.

Ao meu tio Geraldo Xavier Santana, pelos anos de incentivo e pelo orgulho que sentia em ter um sobrinho Engenheiro de Pesca. Espero que estejas sempre olhando por mim aí de cima tio. Meu muito obrigado.

A minha namorada Tainá Oliveira pelo incentivo, paciência, dedicação e compartilhamento de seus conhecimentos como biblioteconomista.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C978i Cunha, Francisco Marcelo Santana da.
Influência da injeção de gás carbônico no cultivo da microalga *Spirulina platensis* / Francisco Marcelo Santana da Cunha. – 2010.
26 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2010.
Orientação: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias.

1. *Spirulina platensis*. 2. Gás carbônico. 3. Cultivo. 4. Microalga. I. Título.

CDD 639.2

RESUMO

A microalga *Spirulina platensis*, utilizada no presente estudo, é uma cianobactéria microscópica e filamentosa que deriva seu nome da sua morfologia em forma de helicóide. Esta espécie vem sendo consumida pelo ser humano desde tempos remotos e atualmente é utilizada como suplemento alimentar devido ser uma ótima fonte de proteína, carboidratos, minerais e vitaminas. Apesar de ser uma cianobactéria, o consumo de *S. platensis* não apresenta nenhum efeito colateral, já que a maioria das cianobactérias são tóxicas. Também é rica em ácidos fenólicos, ácido g-linolênico e não possui a parede celular recoberta por celulose e sim composta de mucopolissacarídeos, facilitando sua digestão. Além de sua importância como alimento, as microalgas em geral, contribuem com a preservação do meio ambiente devido à sua alta capacidade de fixar o gás carbônico e cumprem um papel importante na redução de gases causadores do efeito estufa. Por outro lado, as microalgas produzem lipídios que podem ser utilizados para a produção de biocombustíveis, que são uma alternativa eficiente aos combustíveis fósseis. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da injeção de CO₂ no cultivo estacionário de *S. platensis*. Para isso foram utilizadas duas baterias de três garrafas de 5 L, nos quais a cianobactéria foi cultivada em meio enriquecido com fertilizantes agrícolas, na salinidade de 40 e sob iluminação constante de 800 lux. Em três dos garrafas foi injetado, durante seis horas por dia, um fluxo de CO₂ através de um difusor flexível no fundo dos garrafas. O controle, sem o gás, foi submetido apenas a uma aeração com bomba de ar. A determinação do CO₂ livre foi realizada através de titulação e o acompanhamento do cultivo realizado através da absorbância de 680nm utilizando um espectrofotômetro. Os resultados mostraram que, apesar, da forte redução do pH, durante a injeção de CO₂, em um dos cultivos a cianobactéria se adaptou, alcançando praticamente os mesmos valores de biomassa obtidos nos controles sem a injeção do gás. No entanto, mais estudos devem ser realizados, principalmente para que seja otimizada a quantidade de CO₂ a ser injetada. Assim, é possível concluir que a utilização de CO₂ para a produção de *Spirulina* pode vir a ser viável e que, em escala comercial, esta microalga pode ser utilizada para sequestrar este gás produzido por indústrias, produzindo biomassa de alto valor nutricional.

Palavras-chave: *Spirulina platensis*. Gás carbônico. Cultivo. Microalga.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Cultivo de <i>Spirulina platensis</i> em garrações de 5 L.	17
Figura 2	Difusor flexível utilizado para distribuir o ar/CO ₂ nos garrações de 5 L.	18
Figura 3	Variação do pH ao longo do dia, durante e após a injeção de CO ₂ .	21
Figura 4	Curvas de crescimento da microalga <i>S. platensis</i> obtidas dos cultivos com injeção de CO ₂ (A) e dos cultivos sem a injeção do gás (B).	22
Figura 5	Comparação entre os dois melhores cultivos de <i>S. platensis</i> com e sem a injeção de CO ₂ .	23
Figura 6	Comparação do tricoma gigante semi-espiralado da microalga <i>Spirulina platensis</i> e filamentos do tratamento que não recebeu injeção de gás carbônico.	24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DA LITERATURA	11
3	MATERIAIS E MÉTODOS	15
	3.1 Obtenção da microalga	15
	3.2 Meio de cultivo	15
	3.3 Obtenção do inoculo	15
	3.4 Cultivo da <i>Spirulina</i>	16
	3.5 Proteção do cultivo	17
	3.6 Determinação de CO ₂	18
	3.6.1 Cálculo do resultado	18
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
	4.1 Determinação de CO ₂	19
	4.2 Variação do pH	20
	4.3 Curvas de crescimento de <i>Spirulina platensis</i>	21
5	CONCLUSÕES	24
	REFERÊNCIAS	25

INFLUÊNCIA DA INJEÇÃO DE GÁS CARBÔNICO NO CULTIVO DA MICROALGA *Spirulina platensis*

FRANCISCO MARCELO SANTANA DA CUNHA

1 INTRODUÇÃO

Há décadas as microalgas têm sido empregadas em aquicultura na alimentação de diversos organismos de interesse econômico. Apesar dos esforços para a substituição das microalgas por alimento artificial, os cultivos comerciais, em especial as larviculturas, permanecem dependentes da produção de culturas massivas de algas microscópicas (DERNER; BELTRAME; OZÓRIO, 2006).

A composição química das microalgas apresentam compostos importantíssimos para as indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêutica, como a C-ficocianina (C-FC), um pigmento comum nas cianobactérias e um dos mais abundantes constituintes da *Spirulina platensis*. Esta microalga vem sendo estudada por possuir várias propriedades como antioxidante, hepatoprotetora e antiinflamatória (MARINS; SOUZA; TRINDADE, 2006).

A *Spirulina* também é uma boa fonte de carotenos, os quais apresentam importantes aplicações nas indústrias de alimentos, sendo muitas vezes adicionados como corantes, conferindo diversas tonalidades do amarelo ao vermelho, bem como por sua atividade pró-vitamina A e seu poder antioxidante. Além disso, esta microalga também produz ácidos graxos essenciais, como o ácido graxo γ -linolênico que tem importante papel como precursor das prostaglandinas, substâncias semelhantes a hormônios que controlam diversas funções no organismo humano (CANELA *et al.*, 2002).

A microalga *Spirulina platensis* pode ser cultivada em meio de cultura sintético, sendo o carbono o responsável pela maior parte dos gastos de produção. Existe um grande interesse científico e comercial no cultivo dessa microalga devido ao seu alto valor nutricional (ALCANTARA *et al.*, 2000).

Tendo em vista a sua importância, existe uma grande busca por alternativas para incrementar o aumento da biomassa de forma economicamente viável e em períodos de cultivos cada vez mais curtos.

A adição de gás carbônico é uma opção interessante para a redução do tempo de cultivo e aumento na produtividade da microalga. A possível utilização de cultivos em escala comercial necessita de um suporte constante de carbono e a injeção de dióxido de carbono pode ser uma alternativa, principalmente a parcela produzida pelas indústrias.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da injeção de CO₂ no desenvolvimento de um cultivo estacionário de *S. platensis* em laboratório.

2 REVISÃO DA LITERATURA

As microalgas são organismos unicelulares, fotossintéticos e de desenvolvimento rápido se comparadas às plantas superiores. Seus requisitos nutricionais são considerados simples e sua biomassa tem sido utilizada como fonte alimentar por muitas culturas no decorrer da história (PANIAGUA-MICHEL *et al.*, 1993).

No âmbito ambiental, as microalgas são importantes consumidoras de CO₂, através da fotossíntese, que é considerada um dos mais eficientes processos de remoção do gás carbônico da atmosfera, convertendo-o em biomassa que poderá ser utilizada como complemento e/ou suplemento nutricional, na indústria farmacêutica, bem como na produção de biocombustível (ROSA *et al.*, 2005). Além disso, as microalgas apresentam uma ampla resistência a fatores ambientais desfavoráveis, podendo ser cultivadas intensivamente em pequenos espaços, representando assim uma alternativa efetiva para a redução do efeito estufa, já que o CO₂ é um dos gases que contribuem para tal fenômeno (KURANO *et al.*, 1995).

Atualmente, os recursos energéticos renováveis, entre os quais a energia solar, eólica, hidrelétrica, geotérmica e de biomassa, representam cerca de 14% do consumo de energia primária no mundo, sendo a energia obtida de biomassa a mais significativa, chegando a aproximadamente 10% (ANTIZAR; GOMEZ, 2008).

A energia provinda da biomassa de organismos vivos pode ser convertida em diversas formas ecologicamente corretas como a forma de calor, vapor, eletricidade, biogás e biocombustíveis, sendo o etanol o mais utilizado hoje (ANTIZAR; SEARCHINGER, 2008).

O uso de microalgas pode ser uma alternativa adequada aos combustíveis fósseis, pois elas são as melhores opções biológicas para produção de óleo e uma fonte de biomassa versátil que, em breve, poderá ser um dos mais importantes precursores de combustíveis renováveis do Planeta (CAMPBELL, 1997).

O rendimento médio de produção de biodiesel a partir de microalgas pode ser de 10 a 20 vezes superior ao rendimento obtidos a partir de vegetais superiores (CHISTI, 2007). Algumas microalgas têm alto teor de óleo e ainda podem ser induzidas a produzir uma maior concentração de lipídios, através de variações nas condições físico-químicas do cultivo (ILLMAN; SCRAGG; SHALES, 2000).

Um desafio enfrentado na produção de microalgas para a obtenção de biodiesel é a identificação de cepas com maiores taxas de crescimento e teor de óleo com adequada

composição (GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009). A presença de ácidos graxos não saponificáveis é preferida para a produção de um biodiesel com elevada qualidade (DOTE, 1994).

Entre as tecnologias disponíveis para produção de energia tem-se a conversão termoquímica, gaseificação, pirólise, liquefação e a partir de fontes térmicas; a conversão bioquímica, obtida pelos processos de fermentação e digestão anaeróbia e a conversão biológica, ou seja a extração de óleos vegetais. Esta última tem provado ser uma solução eficaz, não só para a produção energética como também para a recuperação de ambientes através do tratamento de resíduos (ABATZOGLOU; BOIVIN, 2009).

O biogás pode ser produzido a partir de muitas fontes, tais como: resíduos sólidos de vegetais, esterco de animais, algas, lodo de esgoto, resíduos agroalimentares e ainda a fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos (HILKIAH *et al.*, 2008; KAPARAJU; RINTALA, 2006; THEMELIS; ULLOA, 2007).

Outra função ambientalmente importante das microalgas é possibilitar a melhoria da qualidade de água absorvendo compostos nitrogenados tóxicos aos animais aquáticos, como a amônia e nitritos (LAVENS; SORGELOOS, 1996). Além disso, podem atuar também no combate a bactérias patogênicas utilizando substâncias antibióticas por elas produzidas (REITAN; RAINUZZO; OLSEN, 1994).

O cultivo de organismos fotossintéticos em efluentes ricos em nutrientes pode ser um processo economicamente viável na produção de biomassa com altos valores protéicos para alimentação animal, bem como para a extração de compostos de interesse farmacêutico (BOROWITZKA, 1988). Desta forma, a produção de microalgas em águas residuais gera biomassa e, ao mesmo tempo, promove a remoção de compostos orgânicos e inorgânicos com potencial poluidor (MARTINEZ *et al.*, 1999). Muitas espécies de microalgas têm sido usadas com sucesso para tratamentos de águas residuais (VÍLCHEZ *et al.*, 2001; VOLTOLINA; GOMES-VILLA; CORREA, 2005).

A utilização de microalgas para o tratamento de águas residuais oferece as vantagens de não ser ambientalmente perigoso, já que se baseia nos princípios dos ecossistemas naturais, a biomassa produzida pode ser reciclada reduzindo as causas de poluição secundária, o crescimento de algas no efluente remove os metais pesados e substâncias xenobióticas e permite, através da fotossíntese a liberação do oxigênio, aumentando assim a capacidade de recuperação dos corpos d'água (CRAGGS; SMITH; MCAULEY, 1995; DE-BASHAN *et al.*, 2002; GARBISU *et al.*, 1991).

No tocante ao consumo humano, as microalgas funcionam como suplemento rico em proteínas, carboidratos, vitaminas e ácidos graxos. Na aquicultura são empregadas como

fonte primária de alimento para larvas, juvenis, moluscos, crustáceos e peixes adultos, bem como do zooplâncton que servirá de alimento para outros animais aquáticos cultivados (BROWN *et al.*, 1997).

As cianobactérias são micro-organismos que possuem morfologia semelhante às bactérias e utilizam-se da fotossíntese (ASHBY; HOUMARD, 2006) como principal forma de obter o carbono. Seu cultivo pode ser um processo rentável no tocante a obtenção de proteínas para a alimentação humana e animal (DALLAIRE *et al.*, 2007).

A *Spirulina platensis* é uma cianobactéria, pertencente à divisão Cyanophyta, também conhecida como “algas azuis”, com estrutura tipicamente procariótica e forma filamentosa, que habita diversos ambientes como solos, pântanos, lagos alcalinos, águas salinas, salobras e doces (RICHMOND, 1990). Esta cianobactéria é capaz de produzir um alto teor de proteína sob condições favoráveis que pode ser superior a 74% da biomassa seca, o que despertou a atenção da comunidade científica para seu grande potencial nutricional. Além disso, ainda possibilita a obtenção de pigmentos como a clorofila, carotenóides e ficobiliproteínas, além de ácidos graxos poli-insaturados, aminoácidos essenciais, vitaminas e sais minerais (COLLA *et al.*, 2007; HONGSTHONG *et al.*, 2007; PATIL *et al.*, 2008). Um notório benefício do ponto de vista nutricional, é que a digestibilidade da *S. platensis* chega a 70% já que sua parede celular é composta por mucopolissacarídeos (SOLETTO *et al.*, 2004) e não celulose, como ocorre em outras microalgas.

A importância da *Spirulina* na manutenção da saúde humana já é conhecida em alguns aspectos. Pesquisas sugerem consideráveis melhorias nos quadros de fadiga crônica, alergias, rinite e até mesmo alguns tipos de viroses (Herpes simples tipo I, influenza A e HIV-1). Em estudos recentes, suplementos de *S. platensis* foram administrados em pacientes com cardiopatia isquêmica o que resultou em uma significativa redução do “colesterol ruim” (LDL e triglicerídeos) e aumento do “colesterol bom” (HDL). Apesar de serem necessários mais estudos, seu papel como suplemento alimentar combinado a outras opções terapêuticas não pode ser menosprezado (KARKOS *et al.*, 2008).

A produção comercial de *S. platensis* é realizada quase que exclusivamente em reatores abertos, especialmente “raceways” (RICHMOND, 1990). Alguns problemas são observados nessa forma de cultivo, mas nada que impeça sua realização. Os tanques são de simples construção e operação, podendo ter grandes dimensões (5.000 m² ou mais) (TREDICI *et al.*, 1993). Já os cultivos do tipo estacionário “batch” são geralmente economicamente inviáveis, pois necessitam de longo período de crescimento e os custos envolvidos na manutenção dos biorreatores são altos.

Uma forma alternativa para o cultivo de microalgas é o cultivo tipo semi-contínuo. Neste, o reator é inicialmente preenchido com meio de cultura e incubado sob condições ideais e, depois de certo período, um volume específico do cultivo é removido e substituído por uma quantidade igual de meio fresco, servindo como inóculo inicial o que ficou mantido no reator (OTERO *et al.*, 1998). Este tipo de cultivo é uma excelente maneira de regular a taxa de reposição de nutrientes para otimizar a produtividade e, ao mesmo tempo, evitar seu excesso ou deficiência (GIRIDHAR; SRIVASTAVA, 2001).

Vários nutrientes têm sido utilizados na formulação de meios de cultivo para a cianobactéria *S. platensis*. A fonte de nitrogênio convencional para esta microalga é o nitrato (PAOLETTI; PUSHPARAJ; TOMASELLI, 1975). O uso de sulfato de amônio ou uréia é particularmente interessante do ponto de vista econômico, porque estes são mais baratos e estão frequentemente presentes em águas residuais (CONVERTI *et al.*, 2006). Em particular, o uso de uréia como fonte de nitrogênio proporciona um ganho energético devido à sua possível hidrólise em amônia em meio alcalino, sendo facilmente assimilado por *S. platensis* (CONVERTI *et al.*, 2006). Stanca; Popovici (1996) observaram que o uso reduzido de nitrogênio melhorou a produção de biomassa desta cianobactéria que também apresenta preferência por ambientes alcalinos minimizando assim, contaminações por outras espécies (OLGUÍN *et al.*, 2001).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção da microalga

Este estudo utilizou a cianofícea *Spirulina platensis* proveniente do laboratório de Planctologia do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, onde é cultivada obedecendo rigorosamente todos os critérios necessários para obtenção de uma cepa de qualidade e livre de organismos indesejados.

3.2 Meio de cultivo

Para o preparo do meio de cultivo, foram utilizados os sais cloreto de sódio (30gL^{-1}) e bicarbonato de sódio (10gL^{-1}) e os fertilizantes agrícolas nitrogênio, fósforo e potássio - NPK (1gL^{-1}) e superfosfato triplo - SPT ($0,1\text{gL}^{-1}$). Após a completa dissolução dos sais de sódio em um recipiente plástico contendo 30 L de água, os fertilizantes foram macerados e adicionados à mistura. Em seguida, a água foi submetida a uma aeração constante por 24 horas e, posteriormente, decantada.

3.3 Obtenção do inóculo

A partir do cultivo de *S. platensis* mantido no laboratório de Planctologia, foi obtido um inóculo inicial, através da transferência de 300 mL do cultivo pré-estabelecido para um erlenmeyer de 1 L. Em seguida, foi adicionado, a cada dois dias, meio de cultivo até completar o volume do recipiente, sendo o inóculo agitado manualmente. Posteriormente, este cultivo foi transferido para um garrafão de 5 L e, da mesma maneira, foi adicionado meio até atingir sua capacidade máxima. O inóculo foi mantido sob iluminação constante de aproximadamente 800 Lux, temperatura de $28 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e aeração constante fornecida por bomba de ar. A densidade celular foi acompanhada a cada dois

dias, até alcançar valores semelhantes à do cultivo pré-estabelecido, através da absorbância do cultivo no comprimento de onda de 680 nm utilizando um espectrofotômetro.

3.4 Cultivo da *Spirulina*

Os cultivos foram realizados em seis garrações de 5 L, dispostos em uma estante metálica provida de lâmpadas fluorescentes e aeração fornecida por bomba de ar.

As lâmpadas foram fixadas a uma altura de 50 cm dos garrações, resultando em uma intensidade de luz em torno de 650 lux, avaliada com um luxímetro digital. A iluminação foi constante, a salinidade dos cultivos foi de 40 e a temperatura da sala ficou em torno de 27°C.



Figura 1 - Cultivo de *Spirulina platensis* em garrações de 5 L.

Para o início dos cultivos, 500 mL do inóculo foram transferidos para cada garração e completado o volume total para 3.000 mL, com a adição de novo meio de cultivo, sendo a absorbância inicial em torno de 0,120. O experimento constou de dois tratamentos com três repetições. No primeiro tratamento (amostras A, B e C), a aeração foi substituída por uma injeção de CO₂ contínua, proveniente de um cilindro comercial de 25 kg, com duração de seis horas em um período de dez dias.

O segundo tratamento foi o controle (amostras D, E e F), sendo o cultivo realizado sem gás carbônico, apenas com a aeração da bomba de ar. A pressão do cilindro de CO₂ foi regulada em torno de 60-70 bar e vazão de 7 L/min, para que as bolhas fossem suficientes

para realizar, tanto a movimentação dos tricomas no meio, quanto uma boa distribuição de gás carbônico.

A injeção do ar e do CO₂ dentro de cada garrafão foi realizada na forma de uma cortina de bolhas, utilizando difusores flexíveis com 65 cm de comprimento, recobertos por microfuros e foi manualmente moldado em formato espiral ocupando todo interior do garrafão. A vazão de ar/CO₂ nos difusores individuais foi regulada constantemente para que as bolhas tivessem tamanhos uniformes, garantindo a mesma intensidade para todos os garrafões.

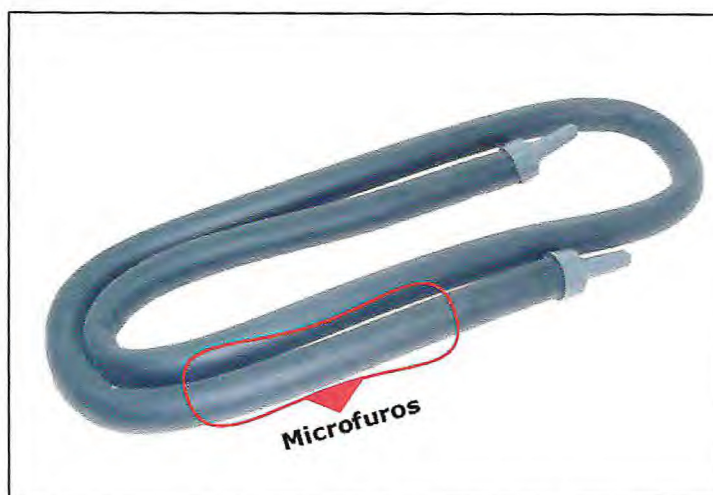


Figura 2 - Difusor flexível utilizado para distribuir o ar/CO₂ nos garrafões de 5 L.

3.5 Proteção do cultivo

Para evitar a contaminação por *Chlorella* sp., os garrafões foram fechados com toucas descartáveis, usualmente utilizadas em salões de beneficiamento do pescado, que eram trocadas a cada dois dias evitando assim o seu escurecimento e proliferação de organismos indesejados para o cultivo. As toucas não eram completamente opacas, permitindo a passagem de luz. A cada três dias eram feitas observações ao microscópio para um controle mais rigoroso e monitorar possíveis contaminações.

3.6 Determinação de CO₂

Foram coletados 10 mL de amostra, de cada garrafão, em frasco de erlenmeyer, ao qual foram adicionadas 7 gotas do indicador de fenolftaleína e a mistura foi titulada com carbonato de sódio (Na₂CO₃) 0,0454 N, até a virada da cor de incolor para ligeiramente rosa (APHA, 1992).

3.6.1 Cálculo do resultado

Multiplica-se o volume de Na₂CO₃ obtido na titulação por 100 e obtém-se a concentração de CO₂ livre na amostra expressa em mg CO₂/L. Caso a amostra já se torne rosa com a adição da fenolftaleína, relata-se o resultado de CO₂ como zero.

$$\text{CO}_2 \text{ livre (mg L}^{-1}\text{)} = \text{mL de Na}_2\text{CO}_3 \text{ consumidos} \times 100$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação de CO₂

Através da determinação de CO₂ livre foi possível avaliar a quantidade de gás dissolvido no meio de cultivo e com isso demonstrar a eficácia da utilização do difusor de ar (cortina de bolhas) na distribuição uniforme do gás carbônico por todo o volume do garrafão. As determinações foram realizadas durante três dias seguidos e apresentaram valores crescentes (Tabela 1). Esta tendência crescente pode ser explicada pelo efeito cumulativo do gás no meio de cultivo.

Tabela 1 - Concentração de gás carbônico (g/L) disponível no meio de cultivo de *Spirulina platensis*.

REPETIÇÕES	ANÁLISE I	ANÁLISE II	ANÁLISE III
A	6,1	6,8	9,6
B	6,3	7,6	9,0
C	5,9	6,9	7,5
MÉDIAS	6,1	7,1	8,7

É importante ressaltar que as quantidades de CO₂ foram reguladas diariamente, pois o sistema tinha que ser montado a cada dia e a vazão e tamanho das bolhas eram regulados para que tivessem uniformidade visual e também fossem suficientes para a movimentação das culturas. A concentração de CO₂ livre também foi dosada nos cultivos sem a injeção do gás, mas neste caso, não foi detectada.

4.2 Variação do pH.

A injeção do CO₂ nos cultivos resultou em uma acidificação do meio de cultivo, sendo o pH monitorado a cada hora. O pH inicial do meio, antes da injeção do CO₂, bem como nos cultivos sem a injeção do gás estava alcalino e ficou em torno de 9,0. Foi observado que, na primeira hora de injeção de CO₂, o pH foi reduzido para a faixa ligeiramente ácida, em torno de 6,0, ficando constante por mais cinco horas, quando o aporte de CO₂ cessava. Após dezoito horas sem injeção do gás, indicada pela quebra no gráfico (Figura 3), observou-se que o pH do meio retornou para valores próximos de 9,0 e permanecia dessa maneira até o início da próxima injeção.

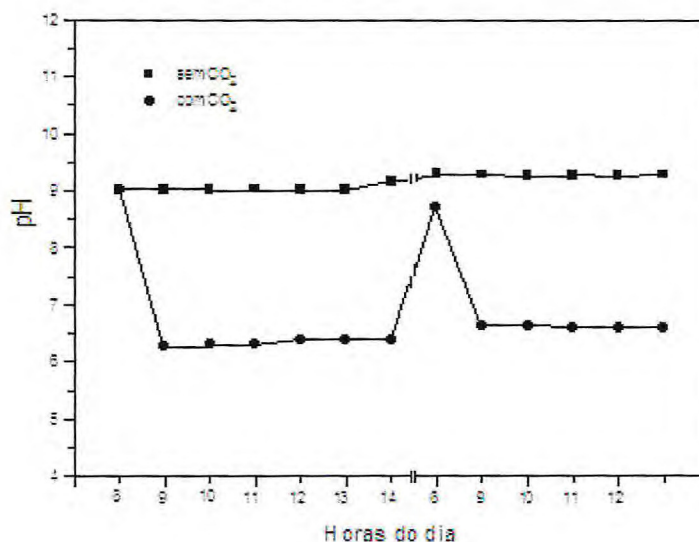


Figura 3 - Variação do pH ao longo do dia, durante e após a injeção de CO₂.

Durante esse período a *Spirulina* foi submetida a uma condição que não é o ideal para seu desenvolvimento, pois uma característica dessa cianobactéria é a preferência por ambientes alcalinos.

A rápida recuperação do pH observada no cultivo com CO₂ pode ser explicada devido à elevada capacidade fixadora de gás carbônico que a *S. platensis* possui. Sydney *et al.* (2010) estudaram a capacidade fixadora de quatro tipos de microalgas e a *Spirulina platensis*

aparece em segundo lugar como importante redutora de gás carbônico com cerca de 318,61 mg L⁻¹ dia⁻¹, sendo inferior apenas para a espécie *Botryococcus braunii* com uma alta taxa de fixação 468,98 mg L⁻¹ dia⁻¹.

4.3 Curvas de crescimento de *S. platensis*

Os cultivos apresentaram uma duração de 16 dias, independentemente da adição ou não de CO₂ (Figura 4). No entanto, apresentaram algumas diferenças, principalmente no tocante às fases do cultivo. Segundo Pelczar, Chan e Krieg (1996), a primeira fase de um cultivo do tipo estacionário é a fase lag ou de indução, na qual não existe grande aumento da cultura, devido a adaptação das células ao novo ambiente de cultivo. A segunda fase do cultivo é fase exponencial ou log, na qual as células estão se dividindo sucessivamente em intervalos regulares de tempo, sendo esse o momento ideal para a transferência das culturas e extração de substâncias biologicamente ativas. A terceira fase é de diminuição do crescimento relativo, conseqüência da diminuição de nutrientes no meio, do acúmulo de metabólitos tóxicos e da redução da fotossíntese. Portanto, a repicagem e filtragem das microalgas devem ser feitas neste momento para garantir o sucesso da produção, já que a partir desse ponto, a cultura entra na fase estacionária onde as taxas de crescimento e mortalidade se equilibram, passando rapidamente para fase de morte da cultura, que é o resultado da depleção de nutrientes e ocorrência de níveis elevados de metabólitos tóxicos.

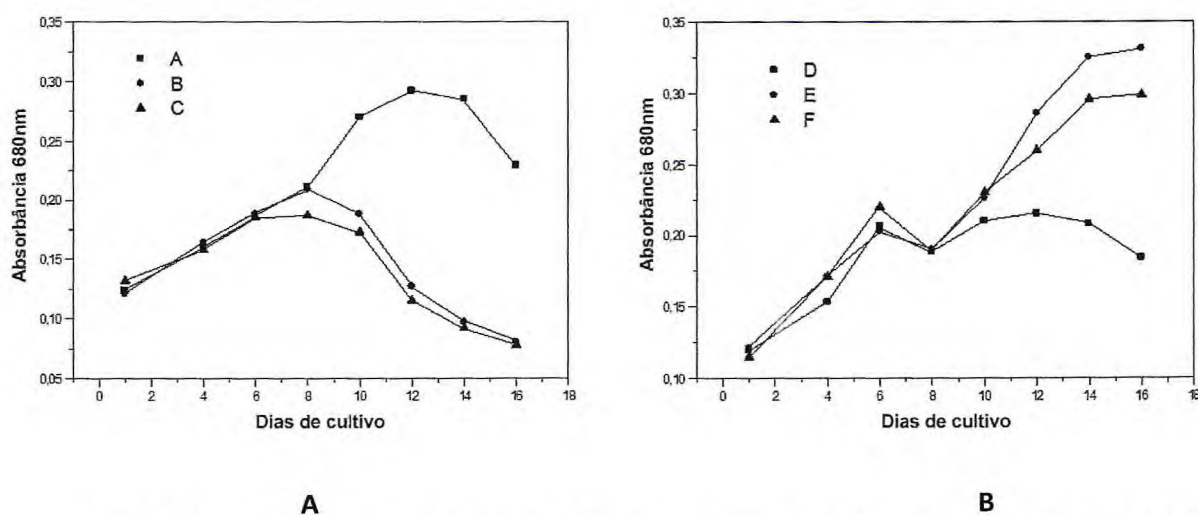


Figura 4 - Curvas de crescimento da microalga *S. platensis* obtidas dos cultivos com injeção de CO₂ (A) e dos cultivos sem a injeção do gás (B).

Nota-se, que todos os cultivos passaram por uma lenta fase de indução que perdurou até o 8º dia (Figura 4). Observa-se até uma certa redução nas culturas neste dia, o que pode ter sido resultado de falha no sistema de aeração, quando a bomba de ar foi danificada e substituída. Após este período, dois dos cultivos com a injeção do gás entraram em fase de declínio, sem mesmo atingir a fase exponencial. No entanto, um dos cultivos se adaptou à nova condição, entrando em fase exponencial a partir deste momento até 10º dia (Figura 4A). Já nos cultivos sem a injeção do gás, dois dos cultivos entraram na fase exponencial que se prolongou até o 14º dia de cultivo, enquanto um deles entrou na fase estacionária (Figura 4B). Podemos também observar, que o cultivo adaptado à injeção do gás, atingiu a fase estacionária no 12º dia e, no 16º dia de cultivo, já se encontrava na fase de declínio. Por outro lado, no melhor cultivo sem CO₂ a fase estacionária só foi atingida no 14º dia de cultivo (Figura 4B).

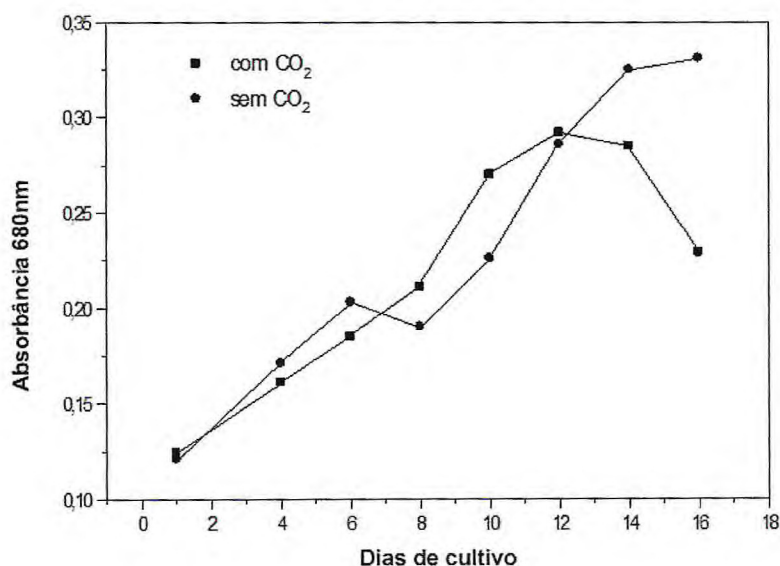


Figura 5 – Comparação entre os dois melhores cultivos de *S. platensis* com e sem a injeção de CO₂.

Comparando os dois cultivos mais adaptados, nota-se que o crescimento das microalgas foi semelhante na fase de indução, até próximo do 8º dia, onde as duas passaram para a fase exponencial (Figura 5). A partir daqui a amostra cultivada com CO₂ obteve os melhores valores até o 12º dia, quando começou a decair e o cultivo sem gás carbônico continuou com seu curso normal.

Segundo Solleto *et al.* (2008) uma grande quantidade de CO₂ causa inibição no crescimento da biomassa devido ao excesso de carbono, da mesma maneira que a salinidade e o aumento da pressão osmótica.

Portanto, as quantidades de gás carbônico oferecidas ao cultivo foram satisfatórias tendo em vista que o crescimento das amostras cultivadas com CO₂ não cessou.

Em todo caso, um ponto positivo muito evidente chamou a atenção. Durante uma avaliação microscópica das amostras dos cultivos submetidos à injeção do CO₂ foi constatado um desenvolvimento extraordinário no tamanho dos tricomas e o início do espiralamento característico dessa microalga. Enquanto isso no cultivo controle, os tricomas apareciam segmentados e de tamanho reduzido.

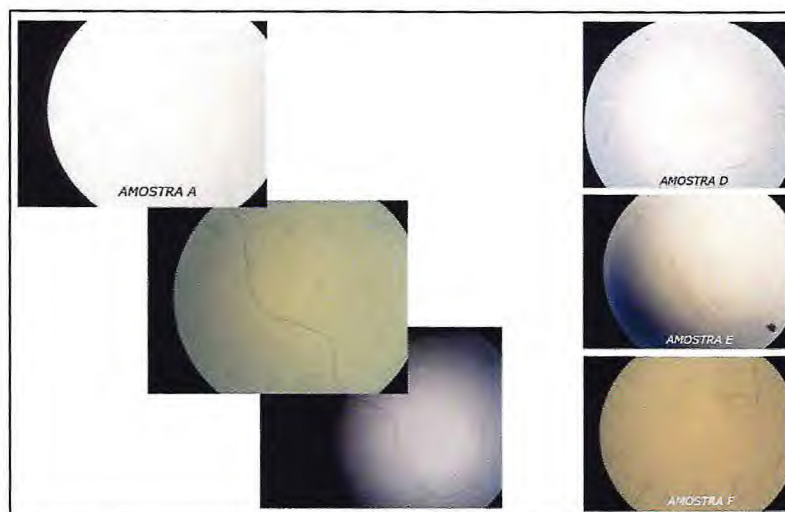


Figura 6 - Comparação do tricoma gigante semi-espiralado da microalga *Spirulina platensis* e filamentos do tratamento que não recebeu injeção de gás carbônico.

Segundo Vonshak (1997), a redução de sucessivas operações de bombeamento, além de reduzir o custo com energia, no caso específico da *Spirulina*, pode também reduzir a quebra dos tricomas e facilitar a eficiência da operação de filtração para obtenção da microalga. Um maior tamanho de tricoma fica retido mais facilmente na malha de separação, resultando em um incremento de biomassa e, conseqüentemente, uma maior quantidade de compostos presentes na microalga podem ser extraídos, inclusive os lipídios. Moraes e Costa (2008) constataram que o cultivo de *Spirulina sp.* com 18% de CO₂ e 16,8 g L⁻¹ de bicarbonato de sódio resultou em 81,6% de lipídios saturados, o que é muito importante para a produção de biodiesel, em que são desejáveis altas concentrações de ácidos graxos saturados.

REFERÊNCIAS

ABATZOGLOU, N., BOIVIN, S. **A review of biogas purification processes.** *Biofuels, Bioprod. Bioref.* v.3, p. 42–71, 2009.

ALCANTARA, S. ; WAGNER, K. ; COSTA, V. P. ; COSTA JR, J. C. . **Determinação de parâmetros físico-químicos para a obtenção da taxa máxima de absorção de CO₂ do ar por culturas de microalgas.** In: II Jornada Jovens Talentos da FAPERJ, Petrópolis. Livro de Resumos, v. 1. p. 12-12, 2000.

ANTIZAR-LADISLAO B., TURRION GOMEZ J.L., **Second-generation biofuels and local bioenergy systems,** *Biofuels Bioproducts Bioreferencing.* v. 2 , p. 455–469, 2008.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and waste water.** APHA: Washington, 1992.

ASHBY, M.K., HOUMARD, J. **Cyanobacterial two-component proteins: structure, diversity, distribution, and evolution,** *Microbiology and Molecular Biology.* Washington v.70, p. 472–509, 2006.

BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. **Current knowledge on potencial health benefits of *Spirulina*.** *Journal of Applied Phycology,* Dordrecht, v.5, n.2, p. 235-241, Apr 1993.

BOROWITZKA, M.A. **Products from microalgae.** *Infofish International,* v.5, p.21-26, 1993.

BOROWITZKA MA. **Vitamins and fine chemicals from microalgae.** In: Borowitzka MA, Borowitzka LJ (eds) *Microalgal biotechnology.* Cambridge University Press, Cambridge, p. 153–196, 1988.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **VII Lista dos novos ingredientes aprovados** – Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, 2008.

BROWN, MR, SW JEFFREY, JK VOLKMAN, & GA DUNSTAN. **Nutritional properties of microalgae for mariculture.** *Aquaculture,* v. 151, p. 315-331, 1997.

CANELA, A. P. R. F. ; ROSA, P. T. V. ; MARQUES, M. O. M. ; MEIRELES, Maria Angela de Almeida . **Supercritical Fluid Extraction of Fatty Acids and Carotenoids from the Microalgae *Spirulina maxima***. *Industrial & Engineering Chemical Research*, v. 41, p. 3012-3018, 2002.

CAMPBELL C.J. **The coming oil crisis**. Multi-science Publishing Company and Petroconsultants S.A, Essex, England, p. 210, 1997.

CHISTI Y. **Biodiesel from microalgae**. *Biotechnol*, v. 25, p. 294–306, 2007.

COHEN, Z. **The chemicals of *Spirulina***. London: Taylor & Francis, p.233, 1997.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. **Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes**. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 7, p. 1489-1493, May 2007.

CONVERTI A., SCAPAZZONI S., LODI A., CARVALHO J.C.M., **Ammonium and urea removal by *Spirulina platensis***, *Bioresource Technology*, v. 100, n. 33, p. 8-16, jan. 2006.

CRAGGS R.J., SMITH V.J., MCAULEY P.J. **Wastewater nutrient removal by marine microalgae cultured under ambient conditions in mini-ponds**. *Water Sci Technol* v. 31, p.151–160, 1995.

DALLAIRE V., LESSARD P., VANDENBERG G., J. DE LA NOÛE, **Effect of algal incorporation on growth, survival and carcass composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry**, *Biores. Technol.* v.98, p. 1433–1439, 2007.

DE-BASHAN L.E., MORENO M., HERNANDEZ J.P., BASHAN Y. **Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense***. *Water Res* v.36, p.2941–2948, 2002.

DERNER, R. B, BELTRAME, E., OZÓRIO R. Á. **Aplicações biotecnológicas das microalgas**. Gráfica e Editora Ltda, v. 16, n. 95, p. 27-29, maio/jun. 2006.

NOTE Y., SAWAYAMA S., INOUE S., MINOWA T., YOKOYAMA S. **Recovery of liquid fuel from hydrocarbon-rich microalgae by thermochemical liquefaction**. v. 73, p.1855–1857, 1994.

GARBISU C., GIL J.M., BAZIN M.J., HALL D.O., SERRA J.L. **Removal of nitrate from water by foam-immobilized *Phormidium laminosum* in batch and continuous-flow bioreactors.** *J Appl Phycol.* v. 3, p.221–234, 1991.

GIRIDHAR R.; SRIVASTAVA A.K. **Repeated fed-batch sorbose fermentation by *Gluconobacter oxydans*,** *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly.* v. 15, p. 127–129, 2001.

GOUVEIA L.; OLIVEIRA A.C.; **Microalgae as a raw material for biofuels production,** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* v. 36, p. 269–274, 2009.

HILKIAH A. I., AYOTAMUNO M.J., EZE C.L., OGAJI S.O.T., PROBERT S.D., **Designs of anaerobic digesters for producing biogas from municipal solid-waste,** *Appl. Energ.*v. 85, p. 430–438, 2008.

HONGSTHONG A., SIRIJUNTARUT M., PROMMEENATE P., THAMMATHORN S., BUNNAG B., CHEEVADHANARAK S., TANTICHAROEN M. **Revealing differentially expressed proteins in two morphological forms of *Spirulina platensis* by proteomic analysis,** *Mol. Biotechnol.*v. 36, p. 123–130, 2007.

ILLMAN A.M., SCRAGG A.H., SHALES S.W. **Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium.** *Enzyme Microb Technol* v. 27, p. 631–635, 2000.

KAPARAJU, RINTALA J.A. **Thermophilic anaerobic digestion of industrial orange waste,** *Environ. Technol.* v. 27, p. 623–633, 2006.

KARKOS P.D.; LEONG S.C., KARKOS C.D., SIVAJI N., ASSIMAKOPOULOS D.A. ***Spirulina* in Clinical Practice: Evidence-Based Human Applications.** *Evid. Based Complement. Altern. Med.*, Sep 2008.

KURANO N., IKEMOTO H., MIYASHITA H., HASEGAWA T., HATA H., MIYACHI S. **Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis.** *Energy Convers. Mgmt.* v. 36, n. 6-9, p. 689-692, 1995.

LAVENS, SORGELOOS P.P. **Manual on the production and use of live food for aquacultures.** FAO Fisheries Technical Paper. n. 361.Rome, FAO. p.295, 1996.

MARINS L. F., SOUZA K. W., TRINDADE G. S. **Ação fotodinâmica da C-ficocianina, pigmento extraído da *Spirulina platensis*, nas linhagens tumorais humanas K562 (não MDR) e K562-Lucena 1(MDR)**. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2006.

MARTÍNEZ M.E., SANCHEZ S., JIMENEZ J.M., ELYOUSFI F., MUNOZ L. **Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus***. *Biores Technol* v.73, p.263–272, 1999.

MATA T.M., MARTINS A.A., CAETANO NIDIA.S. **Microalgae for biodiesel production and other applications: A review** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.14, pp. 217-232, 2010.

MORAIS M.G., COSTA J.A.V. **Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono**. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1245-1251, jul./ago., 2008.

OLGUÍN E., GALICIA S., ANGULO-GUERRERO O., HERNÁNDEZ E. **The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste**. *Bioresource Technology*, Essex, v. 77, p. 19-24, 2001.

OTERO A., DOMÍNGUEZ A., LAMELA T., GARCÍA D., FÁBREGAS J. **Steady-states of semicontinuous cultures of a marine diatom: Effect of saturating nutrient concentrations**. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 227, p. 23-34, 1998.

PAOLETTI C., PUSHPARAJ B., TOMASELLI F. **Ricerche sulla nutrizione minerale di *Spirulina platensis***. In: Italian Society of Microbiology (ed) *Atti del XVII congresso della Società Italiana de Microbiologia*. Padua, Italy, p. 833–839, 1975.

PANIAGUA-MICHEL, J.; DUJARDIN, E.; SIRONVAL, C. **CRONICA AZTECA: El tecuitlatl, concentrado de algas *espirulinas* fuente de proteínas comestibles del pueblo de los AZTECAS**. Traduzido por Angélica López de LEROUX, *Cahiers Agricultures*, v.2, p.283-287, 1993.

PATIL G., CHETHANA S., MADHUSUDHANA M.C., RAGHAVARAO K.S.M.S., **Fractionation and purification of the phycobiliproteins from *Spirulina platensis***, *Biores. Technol.* V. 99, p. 7393–7396, 2008.

PELCZAR M. J., CHAN E. C. S., KRIEG N. R., **Microbiologia: conceitos e aplicações**. v.2. ed. São Paulo: MAKRON Books, 1996.

REITAN K.I., RAINUZZO J.R., OLSEN Y. **Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae**. *J. Phycol.*,v.30, p.972-979, 1994.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal mass culture**. Boston: CRC, 1990.

ROSA A. P. C., CARVALHO, GOLDBECK, COSTA, COSTA, J. A. V. **Fixação de Gás Carbônico no Crescimento da Microalga *Spirulina* em Condições de Cultivo Controladas**. In: IV Mostra de Produção Universitária, Rio Grande, 2005.

SEARCHINGER T., HEIMLICH R., HOUGHTON R.A., DONG F., ELOBEID A., FABIOSA J., TOKGOZ S., HAYES D. **Use of U.S. croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land use change**, *Science* v.319, p. 1238–1240, 2008.

SOLETTI, D.; BINAGHI, A.; LODI, A.; CARVALHO, D.C.M.; CONVERTI, A. **Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources**. *Aquaculture*. Amsterdam, v. 243, p. 217-224, 2004.

SOLETTI D., BINAGHI A., FERRARI L., LODI A., CARVALHO L.C.M., ZILLI M., CONVERTI A., **Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor**. *Biochemical Engineering Journal* 39, p. 369–375, 2008.

STANCA D., POPOVICI E. **Urea as nitrogen source in modified Zarrouk medium**. *Rev Roum Biol* v.41, p.25–31, 1996.

SYDNEY E.B., STURM W., CARVALHO J.C., THOMAZ-SOCCOL V., LARROCHE C., PANDEY A., RICARDO SOCCOL C.R., **Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae**. *Bioresource Technology* v.101, p. 5892–5896, 2010.

THEMELIS N.J., AND ULLOA P.A., **Methane generation in landfills**, *Renew. Energ.*v. 32, p. 1243–1257, 2007.

TREDICI M.R., ZITTELLI G.C., BIAGIOLINI S., MATERASSI R. **Novel photobioreactors for the mass cultivation of *Spirulina* spp, Spiruline, algue de vie**, *Bulletin de l'Institut océanographique*. v.12, p. 89–96, 1993.

VÍLCHEZ C., GARBAYO I., MARKVICHEVA E., GALVA N. F., LEON R. **Studies on the suitability of alginate-entrapped *Chlamydomonas reinhardtii* cells for sustaining nitrate consumption processes**. *Biores Technol* v.78, p.55–61, 2001.

VOLTOLINA D., GOMEZ-VILLA H., CORREA G. **Nitrogen removal and recycling by *Scenedesmus obliquus* in semicontinuous cultures using artificial wastewater and a simulated light and temperature cycle**. *Biores Technol* v.96, p.359–362, 2005.

VONSHAK A. *Spirulina platensis* (Arthrospira) **physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis, p.233, 1997