

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS**

**CULTIVO DE MICROALGAS COM GASES DE COMBUSTÃO
FORMADOS DA GERAÇÃO TERMELÉTRICA**

ENG. ALIM. ELISANGELA MARTHA RADMANN

Dissertação apresentada para
obtenção do título de Mestre
em Engenharia e Ciência de
Alimentos.

Prof. Dr. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA
Orientador

RIO GRANDE, RS
2007

*"Somos o que fazemos, mas somos,
principalmente, o que fazemos
para mudar o que somos".*

Eduardo Galeano

Dedico a minha mãe, pelo amor, imensa dedicação e apoio em todos os momentos de minha vida. Ao meu namorado Marcelo Porto, pelo amor, carinho e paciência. Aos meus irmãos Carla e William, pela compreensão, carinho e paciência.

AGRADECIMENTOS

A Deus,

que sempre me deu forças e me guiou.

Ao Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa,

por ter me orientado neste trabalho e desde a Iniciação Científica, sempre com muito carinho, respeito, atenção e grande amizade.

Às bolsistas Thaisa Duarte Santos e Bruna Araujo Gonzales,

pela grande responsabilidade com o trabalho, pela incansável dedicação, pelo carinho e amizade.

A Michele da Rosa Andrade e a Michele Greque Morais,

por estarem sempre prontas a ajudar, pelas correções e sugestões, e também pela grande amizade.

Ao Felipe Vieira Camerini,

pela participação e contribuição em parte do trabalho, pela disposição em ajudar, pelo carinho e amizade.

Fabício Butierres Santana,

pela disposição em ajudar, pela amizade conquistada em tão pouco tempo e também por proporcionar horas alegres no laboratório.

À Ana Priscila Centeno da Rosa,

pois sei que encontrei uma grande amiga, pelas conversas e pelo apoio nos momentos difíceis e alegres.

A Vanessa Cerqueira,

pela amizade, e por me escutar nos momentos alegres e tristes.

Ao Roque Lourenço Zílio,

pelo auxílio indispensável em vários momentos e pelo carinho de amigo com que sempre me tratou.

À Mara Alice,

pelo carinho e apoio ao longo do trabalho.

Ao Lúcio Brusch

pelo grande apoio nos projetos de microalgas.

Aos demais colegas e amigos de laboratório, Daniele Colembergue, Michael,

Roberta Martins, Susan, Meiri Brum, Aline Klumb, Adriano Henrard,

pela amizade e pela ajuda em algum momento deste trabalho.

À Vilásia Martins, Lúcia Batista, Marta Pinto, Aline Fontana,

pelos momentos de descontração proporcionados ao longo deste trabalho, carinho e amizade.

À Jaqueline Garda e Profa. Eliana Furlong,

pelo auxílio na identificação dos ácidos graxos e em outros momentos deste trabalho.

Aos funcionários da Oficina Mecânica da FURG,

pelo indispensável auxílio.

À minha mãe,

pela compreensão nos momentos de ausência, pelo seu incondicional apoio e afeto.

Ao meu namorado, Marcelo Porto,

pelo grande amor, carinho, compreensão e imensa paciência.

Aos meus irmãos Carla e William,

que amo muito, pelo companheirismo, amor e carinho.

Aos meus sogros, Ivonete e Manoel,

pelo amor de pais com que sempre me trataram e pelo incondicional apoio.

Aos meus cunhados Kelen, Vinícius e Mateus,

pelo apoio e carinho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
NOMENCLATURA	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3 JUSTIFICATIVA	4
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
4.1 Microalgas.....	7
4.1.1 Microalga <i>Spirulina</i>	8
4.1.2 Microalga <i>Chlorella</i>	10
4.1.3 Microalga <i>Scenedesmus</i>	11
4.1.4 Microalga <i>Synechococcus</i>	12
4.2 Fotossíntese.....	13
4.3 Condições de Cultivo de Microalgas.....	14
4.3.1 Efeito da Temperatura no Cultivo de Microalgas	14
4.3.2 Efeito da Luminosidade no Cultivo de Microalgas	16
4.4 Efeito das condições de cultivo na produção de lipídios e perfil de ácidos graxos.	17
4.5 Biorreatores para o cultivo de microalgas.....	18
4.6 Biofixação de CO ₂ a partir de Microalgas em Diferentes Fotobiorreatores	20

4.7 Efeito de NO _x , SO ₂ e pH no Cultivo de microalgas	21
4.8 Efeito dos Gases de Combustão CO ₂ , SO _x e NO _x na atmosfera e o Protocolo de Kyoto.....	22
5 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	26
5.1 SELEÇÃO DE MICROALGAS PARA BIOFIXAÇÃO DE GÁS CARBÔNICO.....	27
1. INTRODUÇÃO	29
2 MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1 Microrganismos e meio de cultivo.....	31
2.2 Condições de cultivo	31
2.3 Determinações analíticas	33
2.4 Respostas estudadas.....	33
2.5 Análise estatística	34
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4 CONCLUSÕES	40
5 AGRADECIMENTOS	40
6 REFERÊNCIAS.....	41
5.2 CULTIVO DAS MICROALGAS <i>Spirulina</i> sp. E <i>Scenedesmus obliquus</i> EM FOTOBIOREACTORES TUBULARES EM SÉRIE COM ÓXIDO NÍTRICO E DIÓXIDO DE ENXOFRE.....	44
1 INTRODUÇÃO	46
2 MATERIAL E MÉTODOS	48
2.1 Microrganismos e meio de cultivo.....	48
2.2 Condições de cultivo	48
2.3 Determinações analíticas	49
2.4 Delineamento experimental e análise estatística	49
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4 CONCLUSÕES	57
5 AGRADECIMENTOS	57

6 REFERÊNCIAS.....	57
5.3 BIOFIXAÇÃO DE CO₂ POR MICROALGAS ISOLADAS DE LAGOAS PRÓXIMAS A UMA PLANTA DE ENERGIA TÉRMICA A CARVÃO	61
1 INTRODUÇÃO	63
2 MATERIAL E MÉTODOS	64
2.1 Isolamento das Microalgas.....	64
2.2 Condições de cultivo	64
2.3 Determinações analíticas	65
2.4 Análise elementar CNHS.....	66
2.5 Delineamento experimental e Análise estatística.....	66
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
3.1 Isolamento de microalgas.....	67
3.2 Cultivo das microalgas isoladas	67
4 CONCLUSÕES	73
5 AGRADECIMENTOS	74
6 REFERÊNCIAS.....	74
5.4 CONTEÚDO LIPÍDICO E COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE MICROALGAS EXPOSTAS AOS GASES DE COMBUSTÃO DO CARVÃO.....	78
1 INTRODUÇÃO	80
2 MATERIAL E MÉTODOS	82
2.1 Microrganismos e condições de cultivo	82
2.2 Quantificação de lipídios totais e perfil de ácidos graxos.....	83
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
4 CONCLUSÕES	88
5 AGRADECIMENTOS	89
6 REFERÊNCIAS.....	89
6 CONCLUSÕES GERAIS	93
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	95

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
9 ANEXOS.....	111
9.1 Figuras	111
9.2 Metodologias.....	116
9.2.1 Metodologia para determinação de lipídios em microalgas a partir do método de FOLCH & LEES (1957).	116
9.2.2 Metodologia para esterificação de lipídios segundo METCALFE & SCHIMITZ (1966).....	117
9.3 Meios de cultivo	1168
9.3.1 Meio Zarrouk (ZARROUK, 1966).....	1168
9.3.2 Meio MC (WATANABE, 1960).....	1179
9.3.3 Meio Bristol's Modificado MBM (WATANABE, 1960).....	11720
9.3.4 Meio BG-11 (RIPKA et al., 1979).....	11721

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Microfotografia da cianobactéria <i>Spirulina platensis</i>	8
Figura 2 Ciclo de vida da cianobactéria <i>Spirulina</i>	9
Figura 3 Microfotografia de <i>Chlorella vulgaris</i>	10
Figura 4 Microfotografia de <i>Scenedesmus obliquus</i>	12
Figura 5 Microfotografia de <i>Synechococcus nidulans</i>	13
Figura 6 Diferentes tipos de fotobiorreatores fechados e abertos.....	19

ARTIGO 1 - SELEÇÃO DE MICROALGAS PARA BIOFIXAÇÃO DE GÁS CARBÔNICO

Figura 1 Esquema do cultivo em fotobiorreatores tubulares.....	31
Figura 2 Curvas de pH para os ensaios	376
Figura 3 Curvas de pH para os meios de cultivo: Zarrouk, MBM e MC.....	37
Figura 4 Curvas de crescimento das microalgas <i>Spirulina</i> sp., <i>S. obliquus</i> e <i>C. homosphaera</i> com injeção de SO ₂ em 4 d após inoculação e no tempo zero do cultivo.....	38
Figura 5 Curvas de fixação diária de CO ₂ ao longo do tempo.	40

ARTIGO 2 - CULTIVO DAS MICROALGAS *Spirulina* sp. E *Scenedesmus obliquus* EM MEIO CONTENDO ÓXIDO NÍTRICO E DIÓXIDO DE ENXOFRE

Figura 1 Esquema do cultivo em fotobiorreatores tubulares em série.....	49
Figura 2 Curvas de crescimento para <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 e <i>Scenedesmus obliquus</i> cultivadas em fotobiorreatores em série.....	54

Figura 3 Curvas de fixação diária de CO ₂ ao longo do tempo para <i>Spirulina</i> sp. LEB-18 e <i>Scenedesmus obliquus</i> .	56
---	----

ARTIGO 3 - BIOFIXAÇÃO DE CO₂ POR MICROALGAS ISOLADAS DE LAGOAS PRÓXIMAS A UMA PLANTA DE ENERGIA TÉRMICA A CARVÃO

Figura 1 Esquema do cultivo em fotobiorreatores tubulares em série.	65
---	----

Figura 2 Curvas de crescimento para 1º FBR, 2º FBR e 3º FBR da série: <i>Spirulina</i> sp., <i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>Synechococcus nidulans</i> e <i>Chlorella vulgaris</i>	70
---	----

Figura 3 Produtividade em função do tempo apresentada para o 1º FBR da série de cada microalga.	71
---	----

Figura 4 Curvas de pH em função da concentração celular para o FBRT 1 de cada microalga.	72
--	----

ARTIGO 4 - CONTEÚDO LIPÍDICO E COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE MICROALGAS EXPOSTAS AOS GASES DE COMBUSTÃO DO CARVÃO

Figura 1 Esquema do cultivo em fotobiorreatores tubulares em série.	83
---	----

Figura 2 Percentuais de ácidos graxos saturados, ácidos graxos insaturados e ácido linolênico pelo total de ácidos graxos analisados, e fração do ácido linolênico pelo somatório dos ácidos oléico e linoléico para as microalgas <i>Spirulina</i> sp., <i>S. obliquus</i> , <i>S. nidulans</i> e <i>C. vulgaris</i> , cultivadas em meio contendo os gases CO ₂ , SO ₂ e NO.	86
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Principais poluentes do ar e os seus efeitos.....23

ARTIGO 1 - SELEÇÃO DE MICROALGAS PARA BIOFIXAÇÃO DE GÁS CARBÔNICO

Tabela 1 Concentração celular máxima, produtividade máxima e velocidade específica máxima de crescimento para os experimentos realizados para as diferentes microalgas.....35

ARTIGO 2 - CULTIVO DAS MICROALGAS *Spirulina* sp. E *Scenedesmus obliquus* EM MEIO CONTENDO ÓXIDO NÍTRICO E DIÓXIDO DE ENXOFRE

Tabela 1 Concentração celular máxima, produtividade máxima, velocidade específica média de crescimento e tempo de geração obtidos para microalga *Spirulina* sp.52

Tabela 2 Concentração celular máxima produtividade máxima, velocidade específica média de crescimento e tempo de geração obtidos para microalga *S. obliquus*...53

Tabela 3 Efeitos e significância dos fatores estudados sobre os parâmetros de crescimento avaliados para as microalgas *Spirulina* sp. e *S. obliquus*.535

ARTIGO 3 - BIOFIXAÇÃO DE CO₂ POR MICROALGAS ISOLADAS DE LAGOAS PRÓXIMAS A UMA PLANTA DE ENERGIA TÉRMICA A CARVÃO

Tabela 1 Concentração celular máxima, produtividade máxima, velocidade específica máxima de crescimento, tempo de geração e fixação diária máxima de CO₂ obtidos para as microalgas *Spirulina* sp., *S. obliquus*, *S. nidulans* e *C. vulgaris*...68

ARTIGO 4 - VARIAÇÃO DO CONTEÚDO LIPÍDICO E COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE MICROALGAS EXPOSTAS AOS GASES DE COMBUSTÃO DO CARVÃO

Tabela 1 Perfil de ácidos graxos (%) das microalgas *Spirulina* sp., *S. obliquus*, *S. nidulans* e *C. vulgaris*, cultivadas em 12% de CO₂, 60 ppm de SO₂, 100 ppm de NO a 30°C.....855

NOMENCLATURA

ARTIGO 1 - SELEÇÃO DE MICROALGAS PARA BIOFIXAÇÃO DE GÁS CARBÔNICO

X	concentração celular (g.L^{-1})
X_{max}	concentração celular máxima (g.L^{-1})
P	produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)
P_{max}	produtividade máxima ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)
μ_{max}	velocidade específica máxima de crescimento (d^{-1})
t	tempo (d)
ppm	partes por milhão
% (v/v)	concentração percentual em volume
p	significância estatística
FA	acúmulo de CO_2 fixado (g CO_2)
FD	fixação diária de CO_2 (g CO_2 fixado. g^{-1} CO_2 injetado. d^{-1})
FD_{max}	fixação diária máxima (g CO_2 fixado. g^{-1} CO_2 injetado. d^{-1})
m_{id}	massa de CO_2 injetada diariamente (g CO_2)
m_{cbm}	fração mássica de carbono (g C.g^{-1} amostra)
m_{CO_2}	massa molar do dióxido de carbono (g.mol^{-1})
m_{C}	massa molar do carbono (g.mol^{-1})
V_{FBR}	volume de meio no fotobiorreator (L)
Sp	<i>Spirulina</i> sp.
Ch	<i>Chlorella vulgaris</i>
Sc	<i>Scenedemus obliquus</i>

ARTIGO 2 - CULTIVO DAS MICROALGAS *Spirulina* sp. E *Scenedemus obliquus* EM MEIO CONTENDO ÓXIDO NÍTRICO E DIÓXIDO DE ENXOFRE

X	concentração celular (g.L^{-1})
X_{max}	concentração celular máxima (g.L^{-1})
P	produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)
P_{max}	produtividade máxima ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)
μ_{max}	velocidade específica máxima de crescimento (d^{-1})
t	tempo (d)
tg	tempo de geração (d)
ppm	partes por milhão

% (v/v)	concentração percentual em volume
p	significância estatística
FA	acúmulo de CO ₂ fixado (g CO ₂)
FD	fixação diária de CO ₂ (g CO ₂ fixado.g ⁻¹ CO ₂ injetado.d ⁻¹)
FD _{max}	fixação diária máxima (g CO ₂ fixado.g ⁻¹ CO ₂ injetado.d ⁻¹)
m _{id}	massa de CO ₂ injetada diariamente (g CO ₂)
m _{cbm}	fração mássica de carbono (g C.g ⁻¹ amostra)
m _{CO2}	massa molar do dióxido de carbono (g.mol ⁻¹)
m _C	massa molar do carbono (g.mol ⁻¹)
V _{FBR}	volume de meio no fotobiorreator (L)
FBRT	fotobiorreator tubular vertical
Sp	<i>Spirulina</i> sp.
Sc	<i>Scenedemus obliquus</i>

ARTIGO 3 - BIOFIXAÇÃO DE CO₂ POR MICROALGAS ISOLADAS DE LAGOAS PRÓXIMAS A UMA PLANTA DE ENERGIA TÉRMICA A CARVÃO

X	concentração celular (g.L ⁻¹)
X _{max}	concentração celular máxima (g.L ⁻¹)
P	produtividade (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)
P _{max}	produtividade máxima (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)
μ _{max}	velocidade específica máxima de crescimento (d ⁻¹)
t	tempo (d)
tg	tempo de geração (d)
vvm	volume de ar por volume de meio por minuto
ppm	partes por milhão
% (v/v)	concentração percentual em volume
p	significância estatística
FA	acúmulo de CO ₂ fixado (g CO ₂)
FD	fixação diária de CO ₂ (g CO ₂ fixado.g ⁻¹ CO ₂ injetado.d ⁻¹)
FD _{max}	fixação diária máxima (g CO ₂ fixado.g ⁻¹ CO ₂ injetado.d ⁻¹)
m _{id}	massa de CO ₂ injetada diariamente (g CO ₂)
m _{cbm}	fração mássica de carbono (g C.g ⁻¹ amostra)
m _{CO2}	massa molar do dióxido de carbono (g.mol ⁻¹)
m _C	massa molar do carbono (g.mol ⁻¹)
V _{FBR}	volume de meio no fotobiorreator (L)

FBRT	fotobiorreator tubular vertical
FBRT1	primeiro fotobiorreator da série
FBRT2	segundo fotobiorreator da série
FBRT3	terceiro fotobiorreator da série

ARTIGO 4 - CONTEÚDO LIPÍDICO E COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE MICROALGAS EXPOSTAS AOS GASES DE COMBUSTÃO DO CARVÃO

t	tempo (d)
ppm	partes por milhão
% (v/v)	concentração percentual em volume
p	significância estatística
FBRT	fotobiorreator tubular vertical
AGS	ácidos graxos saturados
AGM	ácidos graxos monoinsaturados
AGI	ácidos graxos insaturados
PUFA	ácidos graxos poliinsaturados
AGT	total dos ácidos graxos analisados
GLA	ácido γ -linolênico
O+L	ácido oléico e linoléico
SP	<i>Spirulina</i> sp.
CH	<i>Chlorella vulgaris</i>
SC	<i>Scenedemus obliquus</i>
SY	<i>Synechococcus nidulans</i>

RESUMO

O aumento da concentração de gás carbônico na atmosfera tem sensíveis conseqüências ambientais. Nos últimos anos a emissão de CO₂ na atmosfera aumentou de 280ppm (1800) para 380ppm (2004), sendo cerca de 22% dessas emissões causadas por plantas de energia termelétrica. Dentre as várias alternativas para captura e utilização de CO₂, uma abordagem particularmente interessante é o emprego de microalgas. As microalgas se destacam por apresentarem diversas potencialidades, como fonte de alimento e fonte para obtenção de bioprodutos, e também podem contribuir na redução do efeito estufa, fixando CO₂. As microalgas *Chlorella* e *Spirulina* apresentam em sua composição alto teor de proteínas, ácidos graxos, sais minerais e pigmentos, e além disso, possuem certificado GRAS (Generally Recognized As Safe), podendo ser utilizadas como alimento sem oferecer risco à saúde humana. A captura do CO₂ do gás de combustão de carvão é possível usando microalgas, tanto por separação como por uso direto do gás de combustão, sendo este último mais vantajoso, em função de uma maior economia de energia. Alguns agravantes podem influenciar no uso direto do gás de combustão como a alta temperatura, concentração de CO₂ acima de 15% e a presença de SO_x, NO_x e material particulado (em especial cinzas), dificultando assim, o método direto, a menos que a microalga suporte condições extremas. O objetivo deste trabalho foi estudar a utilização de gases de combustão do carvão provenientes da geração termelétrica, para cultivo de microalgas. Previamente foi realizada seleção de microalgas quanto à resistência a SO₂ que pode ser formado da combustão do carvão para geração de energia elétrica. As microalgas estudadas foram *Chlorella homosphaera*, *Scenedesmus obliquus* e *Spirulina* sp. expostas a de 6% de CO₂ e 30ppm de SO₂. A máxima produtividade de biomassa alcançada foi 0,19 g.L⁻¹.d⁻¹ e concentração celular máxima 2,92 g.L⁻¹, ambos para microalga *Spirulina* sp. Após estudou-se as microalgas *S. obliquus* e *Spirulina* sp. em um sistema de FBRs em série em diferentes concentrações de CO₂, SO₂, NO e diferentes temperaturas. Foi alcançada concentração celular média máxima de 3,29 g.L⁻¹ e fixação de CO₂ máxima de 35,87%, ambos resultados para *Spirulina* sp. Seguindo o estudo em biofixação de CO₂ por microalgas, foram isoladas as microalgas *Synechococcus nidulans* e *Chlorella vulgaris* da lagoa de estabilização da Usina Termelétrica Presidente Médici – UTPM/CGTEE, sul do Brasil. As microalgas isoladas foram cultivadas e comparadas com as microalgas *Spirulina* sp e *S.s obliquus*, em relação a biofixação de CO₂. As microalgas foram expostas a 12% CO₂, 60 ppm de SO₂ e 100 ppm de NO, simulando um gás de combustão de carvão. A *C. vulgaris* apresentou comportamento semelhante a *Spirulina* sp., alcançando 13,43% de fixação diária máxima. Foi determinado o conteúdo lipídico e a composição em ácidos graxos das microalgas *Spirulina* sp., *S. obliquus*, *S. nidulans* e *C. vulgaris* cultivadas em meio contendo 12% de CO₂, 60 ppm de SO₂ e 100 ppm de NO à 30°C. A microalga *S. obliquus* apresentou o maior teor lipídico (6,18%). Para as demais microalgas o conteúdo lipídico variou de 4,56 a 5,97%. O maior conteúdo em AGMI foi 66,01% para a *S. obliquus*. Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) foram alcançados em maior quantidade pelas microalgas *Spirulina* sp. (29,37%) e *S. nidulans* (29,54%). Os resultados mostraram que o cultivo de microalgas enriquecido com os gases CO₂, SO₂ e NO, apresentaram uma biomassa rica em ácidos graxos, podendo estes ser utilizados tanto para a alimentação (ácidos graxos insaturados), quanto para produção de biocombustíveis (ácidos graxos saturados). Além disso, as microalgas estudadas podem contribuir na redução do aquecimento global.

PALAVRAS-CHAVE: *Chlorella*, gás de combustão, *Scenedesmus*, *Spirulina*, *Synechococcus*.

ABSTRACT

The increasing concentration of carbon dioxide in the atmosphere has sensible environmental consequences. In the recent years the concentration of CO₂ in the atmosphere increased from 280ppm (1800) to 380ppm (2004), around 22% of these emissions caused by coal fired power plants. Amongst several alternatives for the capture and application of the CO₂, one of the most interesting overviews it is the use of microalgae. Microalgae are gain eminence for presenting potentiality, like a source of nutrients and for biofuels production, besides, they can contribute with the greenhouse gas abatement, fixing CO₂. *Chlorella* and *Spirulina* presents a high amount of proteins, fatty acids, minerals and pigments in their composition, besides, they have the GRAS certificate (Generally Recognized As Safe), allowing them to be used like food without offer any risk to the human health. The CO₂ capture from the coal fired flue gas is possible, as by the separation of the CO₂ as by the direct use of the flue gas, being the last one advantageous, due to the major energy economy. Some bottlenecks can influence the direct use of the flue gas like the high temperature of the gas, high CO₂ concentration and the presence of SO_x, NO_x and particulate matter (specially ashes), becoming hard, thus the direct method, unless that the microalga could tolerate extreme conditions. The aim of this work was to study the utilization of coal fired flue gas from power plants in microalgal cultures. Previously, was carried out the selection of the microalgae resistant to SO₂, witch can be formed in the coal fired power generation. The studied microalgae were *Chlorella homosphaera*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. LEB-18 exposed to 6% CO₂ and 30ppm SO₂. The maximum biomass productivity was 0.19 g.L⁻¹.d⁻¹ and the maximum cell concentration was 2,92 g.L⁻¹, both for *Spirulina* sp LEB-18. Later, *S. obliquus* and *Spirulina* sp. LEB-18 were studied in a serial FBRs system, at different concentration of CO₂, SO₂, NO and different temperatures. The average maximum cell concentration obtained was 3,29g.L⁻¹ and maximum CO₂ fixation 35,87%, both results for *Spirulina* sp. Following the CO₂ biofixation study by microalgae, the strains *Synechococcus nidulans* and *Chlorella vulgaris* were isolated from Presidente Médici's wastewater treatment station, south of Brazil. The isolated strains were cultivated and their CO₂ biofixation was compared with *Spirulina* sp and *S. obliquus*. The microalgae were exposed to 12% CO₂, 60ppm SO₂ and 100ppm NO, simulating the flue gas. *C. vulgaris* showed similar behavior to that of *Spirulina* sp LEB-18, reaching 13,43% of maximum daily fixation. The lipid content and the fatty acids composition were determined for *Spirulina* sp. LEB-18, *S. obliquus*, *S. nidulans* e *C. vulgaris*, cultivated in a medium with 12% CO₂, 60ppm SO₂ and 100ppm NO at 30°C. *S. obliquus* showed the major lipid content (6,18%). For the other microalgae the lipid content ranged from 4,56 to 5,97%. The major AGMI content was 66,01% for *S. obliquus*. The PUFA were obtained in major amount by *Spirulina* sp. LEB-18 (29,37%) and *S. nidulans* (29,54%). The results showed that microalgae cultures enriched with CO₂, SO₂ and NO, presented a fatty acids rich biomass, being able to be used as like a nutrient source (unsaturated fatty acids), as for biofuels production (saturated fatty acids). Besides, the studied microalgae can contribute for the global warm reduction.

KEY WORDS: *Chlorella*, flue gas, *Scenedesmus*, *Spirulina*, *Synechococcus*.

1 INTRODUÇÃO

A diversidade de microalgas há muito tempo, vem atraindo a atenção de vários pesquisadores, pois apresentam em sua composição alto teor de proteínas, sais minerais, vitaminas e ácidos graxos essenciais. Além disso, as microalgas possuem a capacidade de duplicar sua biomassa em até um dia. O mercado de alimentos utilizando microalgas apresenta rápido desenvolvimento em diversos países como França, Estados Unidos, China e Tailândia (BECKER, 2004)

Spirulina, *Chlorella* e *Scenedesmus* são microalgas que apresentam em sua composição elevado teor de proteínas e lipídios (VONSHAK, 1997). *Spirulina* e *Chlorella* possuem certificado GRAS (Generally Recognized As Safe) emitido pelo FDA (Food and Drug Administration), podendo ser utilizadas como alimento sem oferecer risco à saúde humana. A *Scenedesmus* é bastante utilizada como ração animal (HERODEK et al., 1989; PARTALI et al., 1985) e suplemento alimentar (BECKER, 2004).

A concentração de CO₂ na atmosfera aumentou de 280 ppm (1800) para 380 ppm (2004) (SIEGENTHALER et al., 2005), sendo cerca de 22% dessas emissões causadas por plantas de energia termelétrica. Dentre as várias alternativas para captura e utilização de CO₂, uma abordagem particularmente interessante é o emprego de microalgas. Na cidade de Candiota, localizada no estado do Rio Grande do Sul, a Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica (CGTEE), propõem-se a colaborar com a redução da emissão de CO₂ para atmosfera e obtenção de biocompostos a partir de microalgas. A biomassa microalgal produzida pode ser potencialmente utilizada para alimentação humana, ração animal e transformada em bioprodutos e biocombustíveis.

Fatores como SO₂ e NO podem interferir no processo de biofixação de CO₂ originado da combustão de carvão por microalgas, a menos que elas suportem condições extremas. Uma alternativa seria a utilização de microalgas tolerantes a altas concentrações de CO₂. Microalgas isoladas de lagos ou lagoas próximos às plantas de energia térmica podem apresentar alta resistência às condições referidas, já que estão expostas a concentrações variadas dos gases de combustão.

Estudar a influência de NO e SO₂ no cultivo das microalgas *Spirulina*, *Chlorella* e outras isoladas da região da Companhia de Geração Térmica de Energia

Elétrica (CGTEE) em Candiota/RS, é de grande interesse, pois podem proporcionar a redução nos custos de produção e possibilitar a viabilidade técnica da utilização de microalgas para a redução da emissão de CO₂ proveniente da geração termelétrica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a utilização de gases de combustão provenientes da geração termelétrica, para cultivo de microalgas.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar microalgas tolerantes a SO_2 .
- Analisar a influência dos gases NO e SO_2 no cultivo de microalgas em fotobiorreatores em série.
- Realizar o isolamento e seleção de microalgas provenientes de lagoas próximas a Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica (CGTEE) em Candiota/RS, que sejam resistentes a altas concentrações de CO_2 , SO_2 e NO .
- Analisar a biomassa formada com relação aos seus principais parâmetros nutricionais, tais como conteúdo lipídico e perfil de ácidos graxos.

3 JUSTIFICATIVA

O aquecimento global, causador das mudanças climáticas atuais e futuras, traz situações que caracterizam vulnerabilidades para as populações. Sendo assim, medidas devem ser tomadas para minimizar os impactos das mudanças climáticas no planeta. Os efeitos das catástrofes climáticas já podem ser sentidos em vários lugares do mundo, em especial na Europa.

O Protocolo de Kyoto firmado para atingir o objetivo primordial da Convenção Quadro das Nações Unidas sobre mudança do clima estabeleceu metas para que as emissões de gases de efeito estufa sejam reduzidas em pelo menos 5% abaixo dos níveis verificados em 1990, no período compreendido entre 2008 e 2012. O protocolo também estabeleceu mecanismos adicionais, mecanismo de desenvolvimento limpo (MDL), a implementação conjunta e o comércio de emissões, que permitem a redução de emissões ou o aumento de remoção de gases do efeito estufa da atmosfera.

A queima de combustíveis fósseis, principalmente petróleo, carvão e gás natural, estão entre as fontes industriais que têm provocado alterações da qualidade ambiental. Cerca de 22% do CO₂ encontrado na atmosfera é emitido por plantas de energia térmica. A usina termelétrica Presidente Médici, operada pela Companhia de geração térmica de energia elétrica (CGTEE), compõe o maior complexo termelétrico do Rio Grande do Sul.

O uso de microrganismos fotossintéticos para biofixar CO₂ e produzir compostos químicos de interesse têm sido alvo de estudos. O cultivo de microalgas apresenta custos relativamente baixos para a colheita e transporte e menor gasto de água, comparados aos cultivos de plantas; pode ser realizado em condições não adequadas para a produção de culturas convencionais. As microalgas utilizam carbono inorgânico para o crescimento, podendo ser utilizadas na mitigação de CO₂ mais eficazmente do que vegetais superiores (BROWN & ZEILER, 1993), pois não dependem da qualidade do solo, apresentando resultados imediatos. O CO₂ pode ser captado direto do processo fixando-o em maior quantidade, enquanto os vegetais superiores captam CO₂ da atmosfera (cerca de 0,038%). Além disso, a biomassa obtida pode ser transformada em alimento e ração, e a fração lipídica quando extraída pode ser transformada em vários compostos, como biocombustíveis.

O Laboratório de Engenharia Bioquímica da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, desde 1996 vem trabalhando na linha de pesquisa em torno das propriedades e condições de cultivo de microalgas (ANDRADE & COSTA, 2007; MORAIS & COSTA, 2007a; MORAIS & COSTA, 2007b; COLLA et al., 2007; RADMANN et al., 2007; COSTA et al., 2006; REINEHR & COSTA, 2006; COLLA et al., 2004; COSTA et al., 2003; REINEHR, 2003; BIANCHINI et al., 2002; COSTA et al., 2002; COSTA et al., 2001; SANTOS, 2001; COSTA et al., 2000; COZZA, 1999; WEBER et al., 1999). Vem sendo desenvolvidos trabalhos com a microalga *Spirulina* há alguns anos, pois além de apresentar em sua composição alto teor de proteínas, ácidos graxos, sais minerais e pigmentos, é uma microalga GRAS (Generally Recognized As Safe). Já foram desenvolvidos mais de 15 alimentos com a microalga *Spirulina* e também atualmente, estuda-se a microalga *Chlorella* que também é GRAS.

Em 2005, juntamente com a ELETROBRÁS – Centrais Elétricas Brasileiras S.A. e com a Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica (CGTEE), foi firmada uma parceria com objetivo de estudar a biofixação de CO₂ dos gases de combustão do carvão através de microalgas.

Estudos em relação à biofixação de CO₂ por microalgas vêm sendo desenvolvidos no Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG (MORAIS & COSTA, 2007a; MORAIS & COSTA, 2007b; HENRARD et al., 2006; ROSA et al. 2005). Continuando os estudos envolvendo formas de cultivo para biofixação de CO₂, faz-se necessária uma avaliação do cultivo de microalgas com adição dos gases SO₂ e NO, pois estes podem interferir no processo direto de biofixação do CO₂ pelas microalgas, utilizando CO₂ direto do gás de combustão; assim como altas temperaturas, elevadas concentrações de CO₂ e material particulado (em especial cinzas), a menos que elas suportem condições extremas. O gás de combustão emitido das chaminés da usina operada pela CGTEE contém aproximadamente 12% de CO₂, 2500 ppm de SO_x e 500 ppm de NO_x.

O isolamento de microalgas provenientes da região, seria uma alternativa para maximizar a eficiência das microalgas em fixar CO₂. Alguns pesquisadores acreditam que espécies de microalgas nativas sejam mais tolerantes a condições locais (BROWN et al., 1997; CHU et al., 1996; RENAUD et al., 1995). Assim, diminuiria o risco de impacto ambiental, a dependência de importar cepas seria eliminada, haveria tolerância a altas concentrações de NO e SO₂ e com isso, maior produtividade

Estudos relatam que as microalgas *Anacystis*, *Botryococcus*, *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Emiliana*, *Monoraphidium*, *Rhodobacter*, *Scenedesmus*, *Spirulina*, *Synechococcus*, *Tetraselmis*, *Nanocloropsis*, possuem potencial em fixar CO₂ em altas concentrações.

Os conhecimentos adquiridos poderão contribuir no funcionamento da planta-piloto instalada na Usina Termelétrica Presidente Médici – UTPM/CGTEE, sul do Brasil, e também para obtenção de bioprodutos de valor energético.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Microalgas

A utilização de microalgas na alimentação humana remonta a tempos imemoriais, tendo sido usadas como fonte de proteínas por tribos indígenas do Chade e por Índios Aztecas, os quais as secavam em lamelas que depois ingeriam (NAVALHO, 1998). Quando cultivadas em meios adequados, certas espécies de microalgas podem duplicar a sua biomassa diariamente, produzindo matéria seca com um teor protéico superior a 50% e alcançando produtividades de $30-50\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{dia}^{-1}$ em peso seco (GOLDMAN, 1980).

O cultivo comercial de microalgas em larga escala começou nos anos 60 no Japão com a cultura da *Chlorella*, seguida nos anos 70-90 pelo cultivo da *Spirulina* no México, Estados Unidos e China. Em um período de cerca de 30 anos a indústria biotecnológica de microalgas cresceu e se diversificou muito.

No Brasil, pesquisas com microalgas são relativamente recentes e têm enfocado, principalmente, o aspecto de crescimento sob diversas condições, como meios de cultivo, e outros parâmetros como nutrientes, temperatura, salinidade e luz (COSTA et al., 2001; SIPAÚBA et al., 1999; OLIVERA, 1995; DERNER, 1995).

As microalgas, responsáveis por mais de 50% da fotossíntese do planeta, necessitando de CO_2 para crescer e apresentando potencial em assimilar CO_2 , têm sido objetos de muitas investigações para biofixação de CO_2 da atmosfera, ajudando assim na redução do efeito estufa. A biomassa produzida da assimilação de CO_2 pode ser transformada em alimento humano, ração animal e os ácidos graxos extraídos da biomassa podem ser convertidos a biocombustíveis ou até alimentos e fármacos (SCRAGG et al, 2003).

Segundo ZASLAVSKAIA et al. (2001), microrganismos fotossintéticos como microalgas e cianobactérias presentes nos ambientes aquático são responsáveis por uma parcela substancial da produção de O_2 e fixação de CO_2 .

O valor nutricional das microalgas depende, principalmente, da sua composição bioquímica. Embora exista uma grande diferença nas composições das microalgas em função da classe e a espécie que se está trabalhando, a proteína é

sempre o maior constituinte orgânico, seguido usualmente de lipídios e então pelos carboidratos (COUTTEAU, 1996). A manipulação das condições ambientais e os diferentes estágios de crescimento podem alterar a composição bioquímica das microalgas (BROWN et al., 1989).

4.1.1 Microalga *Spirulina*

A *Spirulina* (Figura 1) é uma cianobactéria filamentosa, aeróbia fotossintética, tipicamente procariótica com parede celular, membrana celular, ribossomas e região nuclear, sem núcleo verdadeiro. Seu tamanho celular pode variar da típica bactéria com 0,5 a 1,0 μm de diâmetro até maiores com 60 μm de diâmetro (nas espécies *Oscillatoria princeps*). Esta última é a maior célula conhecida em procariontes (BROCK & MADIGAN, 1991).

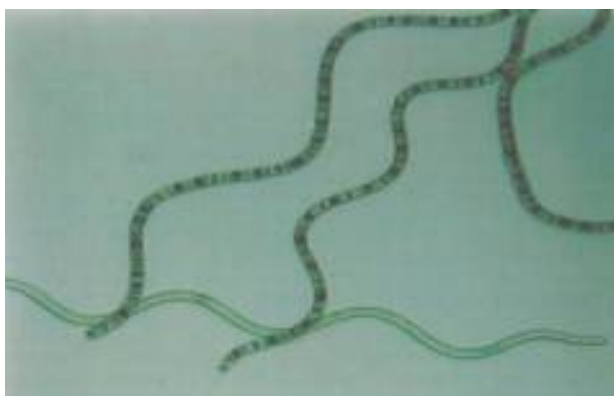


Figura 1 Microfotografia da cianobactéria *Spirulina platensis*

FONTE: Laboratório de Engenharia Bioquímica – FURG

Os tilacóides presentes nas cianobactérias apresentam-se como um sistema de membranas achatado associado aos pigmentos necessários à fotossíntese. Na estrutura celular observa-se também os ficobilissomos que são estruturas que contêm pigmentos fotossintéticos acessórios como ficobilinas, fieritrina, ficocianina, aloficocianina (BALLONI et al., 1980). Os pigmentos, importantes metabolicamente devido ao aparelho fotossintético, são principalmente carotenóides, clorofila e ficocianina.

As cianobactérias possuem vacúolo gasosos que se formam em resposta a mudanças no ambiente como aumento da intensidade luminosa, mudança de pH e salinidade causando migração vertical (BALLONI et al., 1980).

A reprodução no grupo de cianobactérias ocorre por divisão celular, não ocorre mitose ($n \rightarrow 2n$) e sim fissão binária. Pode ocorrer fragmentação e formações de hormogônios, formação de aplanósporos, heterocistos (intercalares, basais e apicais), acinetos (intercalares, basais e apicais) (LEE, 1989; BOLD WYNNW, 1992; VAN DEN HOEK, 1995; SARADA, 1999).

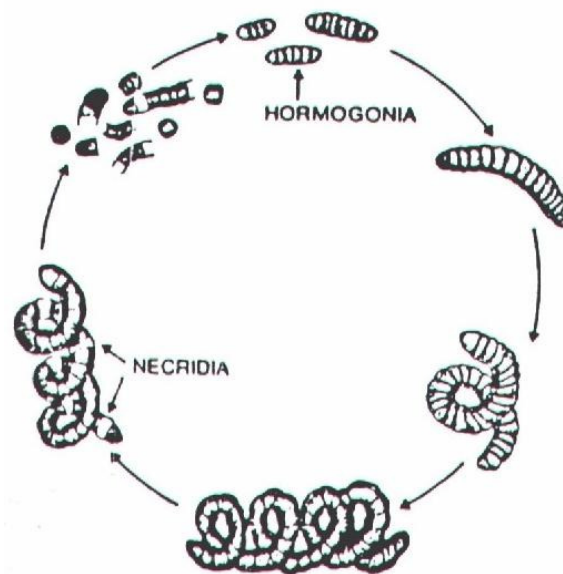


Figura 2 Ciclo de vida da cianobactéria *Spirulina*.

FONTE: RICHMOND, 1990.

A microalga *Spirulina* é uma das mais cultivadas no mundo, pois é uma fonte protéica alternativa utilizada como suplemento alimentar humano e animal, apresentando características de alta digestibilidade de até 85% e teor protéico acima de 65% (base seca). A proporção de proteínas desta microalga é superior à observada na carne de pescado (15-25%) e, também quando comparada com a da soja (35%) do leite em pó (35%) dos ovos (12%) dos cereais (8-14%) e do leite integral (3%) (HENRIKSON, 1994). Além do alto teor protéico, a *Spirulina* apresenta em sua composição de 5 a 7% de lipídios, 10 a 20% de carboidratos, 6 a 9% de minerais e oligoelementos.

Vários autores relatam a ocorrência natural da *Spirulina* sp. em diversos países como nos lagos Chad na África Central, Texcoco no México, Nakaru e Elementeita no Quênia, Aranguadi e Kilotes na Etiópia (VONSHAK, 1997; HENRIKSON, 1994). Mais recentemente no Brasil MORAIS et al. (2005) registraram a ocorrência da *Spirulina* na Lagoa Mangueira.

Em 1981, o FDA (*Food and Drug Administration*) emitiu o certificado GRAS (Generally Recognized As Safe) deliberando que a microalga *Spirulina* constitui uma fonte de proteínas e contém várias vitaminas e minerais, sendo legalmente possível sua comercialização como complemento alimentar sem oferecer risco à saúde humana.

Vários estudos têm sido realizados evidenciando os efeitos terapêuticos da microalga *Spirulina*, que incluem sua utilização no tratamento da hiperlipidemia, câncer, diabetes, obesidade, hipertensão, entre outros (HERNÁNDEZ et al., 2001; BELAY et al., 2002; COLLA et al., 2002; ARAÚJO et al., 2003;).

4.1.2 Microalga *Chlorella*

A *Chlorella* (Figura 3) é uma microalga unicelular microscópica, encontrada em tanques e lagos, com grande habilidade de realizar fotossíntese (VONSHAK, 1997). Foi descoberta pelos japoneses (RICHMOND, 1990), tradicionais consumidores de algas, os quais a apreciam e a utilizam normalmente como complemento alimentar. É uma microalga rica em clorofila, proteínas, vitaminas, sais minerais e aminoácidos essenciais (HENRIKSON, 1994).

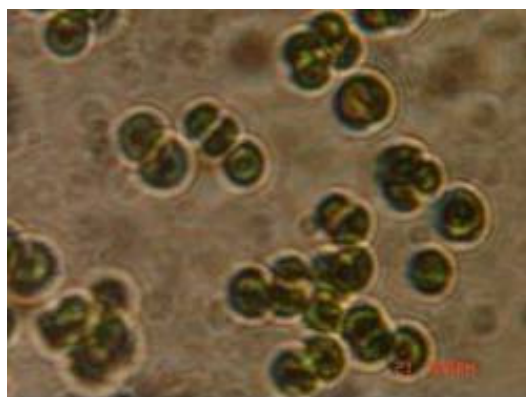


Figura 3 Microfotografia de *Chlorella vulgaris*

FONTE: Laboratório de Engenharia Bioquímica – FURG

A microalga *Chlorella* é pertencente ao grupo das Clorófitas. As clorófitas são algas que tem cloroplastos verdes, circundados por duas membranas. As paredes celulares das algas verdes, como aquelas das plantas terrestres, são compostas de pectinas e celulose, ou de polímeros de xilose ou manose conectadas com a proteína. As paredes em muitos gêneros estão incrustadas com carbonato de cálcio, sílica e, menos freqüentemente, outros minerais como óxido de ferro (MARGULIS & SCHWARTZ, 2001).

As clorófitas são um grande componente do fotoplâncton de água doce; têm-se estimado que elas fixam mais de 1bilhão de toneladas de CO₂ nos oceanos e nas águas doces a cada ano (MARGULIS & SCHWARTZ, 2001).

A *Chlorella* apresenta 53% de proteínas, 23% de carboidratos, 9% de lipídios e 5% de minerais e oligoelementos em sua composição. Assim como a *Spirulina*, a *Chlorella* possui o certificado GRAS (Generally Recognized As Safe) emitido pelo FDA (*Food and Drug Administration*), podendo ser utilizada como alimento sem apresentar risco à saúde. Além disso, a microalga *Chlorella* apresenta alta capacidade de fixação de CO₂ (YANAGI et al., 1995; HIRATA et al., 1996; YOSHIHARA et al., 1996; SUNG et al. 1999; MORAIS & COSTA, 2007) e é resistente a altas temperaturas e tolerante a SO₂ e NO (YOSHIHARA et al., 1996; LEE et al. 2002).

4.1.3 Microalga *Scenedesmus*

Assim como a *Spirulina* e a *Chlorella*, *Scenedesmus* é uma microalga rica em proteínas. Apresenta em sua composição 53% de proteínas, 29% de carboidratos, 15% de lipídios e 5% de minerais.

Scenedesmus (Figura 4) pertencente ao grupo das clorófitas apresenta-se na forma de colônias cenobiais formadas de células elipsoidais, fusiformes, aciculares ou ovóides, arranjadas lado a lado em número múltiplo de 2 em um só plano, possuindo em geral 4 ou 8 células. São algas de superfície e vivem bem em águas com elevado teor mineral (BRANCO, 1978).

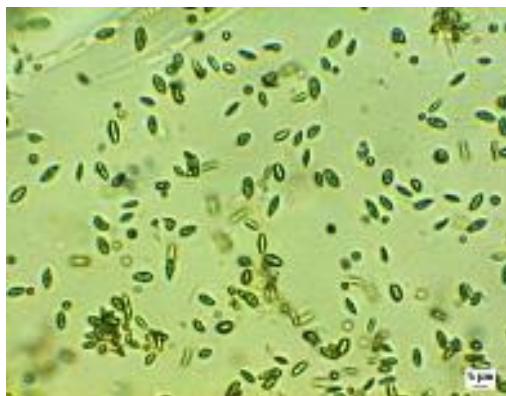


Figura 4 Microfotografia de *Scenedesmus obliquus*
FONTE: Laboratório de Engenharia Bioquímica – FURG

As clorófitas têm especial interesse para os biólogos, porque entre elas há espécies que evidenciam possíveis vias evolutivas. São seres unicelulares (isolados ou coloniais), no caso da *Scenedesmus*, ou pluricelulares. Seus cloroplastos possuem clorofila A e B, carotenos e xantofilas. A reserva é representada por amido e as paredes celulares possuem celulose. Vivem em ambientes terrestres úmidos, na água doce e no mar. A reprodução é feita sexuadamente e assexuadamente. Entre as algas verdes, pode-se observar todo um processo de reprodução sexuada, que vai desde a isogamia, heterogamia até à oogamia. A reprodução assexuada é feita por meio de esporos. Muitas apresentam alternância de gerações (metagênese).

O gênero *Scenedesmus*, que é encontrado em todos os tipos de águas naturais, é usado na biotecnologia em culturas para a produção de biomassa (KESSLER, 1991) para ração animal (HERODEK et al., 1989; PARTALI et al., 1985; CLAUS et al. 1979; SORGELLOS, 1972), suplemento alimentar (BECKER, 2004) e biofixação de CO₂ (MORAIS & COSTA, 2007b).

4.1.4 Microalga *Synechococcus*

A *Synechococcus* é uma cianobactéria da classe Coccogoneae, cocóide (esférica) unicelular, aeróbia fotossintética, presente em oceanos, sendo a mais importante fotossintetizadora do ambiente marinho, responsável por cerca de um quarto da produção de oxigênio. A reprodução da *Synechococcus* é assexuada, ocorrendo por fissão binária, semelhante à das bactérias (MARGULIS & SCHWARTZ, 2001).

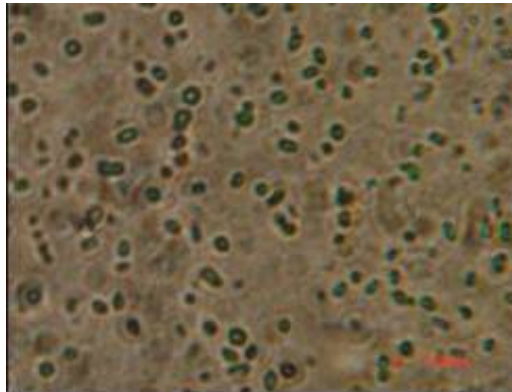


Figura 5 Microfotografia de *Synechococcus nidulans*
FONTE: Laboratório de Engenharia Bioquímica – FURG

Diversos estudos têm sido realizados com a *Synechococcus*, visando biofixação de CO₂ em altas concentrações (OHTAGUCHI et al., 1997; KAJIWARA et al., 1997; MURAKAMI et al., 1998; CHANG & YANG, 2003), produção de lipídios e ácidos graxos (GOODLOE & LIGHT, 1982; KALACHEVA & TRUBACHEV, 1981), ração animal (FAHNENSTIEL et al., 1991) e produção de pigmentos (WOOD et al., 1985; UYSAL, 2000; UYSAL, 2001).

4.2 Fotossíntese

Segundo ZASLAVSKAIA et al. (2001), microrganismos fotossintéticos como microalgas presentes nos ambientes aquáticos são responsáveis por uma parcela substancial da produção de O₂ e fixação de CO₂. Sendo então, muito importante o conhecimento da fotossíntese.

A fotossíntese pode ser definida como um processo físico-químico, mediante o qual os organismos fotossintéticos sintetizam compostos orgânicos a partir de energia solar, água, gás carbônico e sais minerais. O processo fotossintético ocorre nos cloroplastos, sendo o dióxido de carbono capturado da atmosfera e resultando na síntese de carboidratos e liberação de oxigênio molecular (MARTINEZ, 2001). A fotossíntese pode ser representada pela seguinte equação empírica:



Em geral o processo fotossintético é analisado em duas etapas, interdependentes e simultâneas: a etapa fotoquímica (fase clara) e a etapa química (fase escura). Na fotoquímica, a energia radiante excita os pigmentos fotossintéticos e este estado de excitação (energia) é transferido com auxílio da água (óxido-redução), até as moléculas de NADP e ATP (energia química). Os produtos primários da etapa fotoquímica são o ATP e o NADPH₂. Nessa etapa também ocorre a liberação do oxigênio, como subproduto da dissociação da molécula da água. Na fase química, o carbono obtido a partir de uma molécula de CO₂ é assimilado mediante uma série de reações enzimáticas com o uso de uma molécula de CO₂ é assimilado mediante uma série de reações enzimáticas com o uso da energia armazenada nas moléculas de ATP e NADPH₂, terminando por formar o primeiro produto da fotossíntese, o hidrato de carbono (CH₂O).

A fotossíntese é afetada por vários fatores como intensidade luminosa (SCHMID, 1998), temperatura e concentração de CO₂ no ar (INVERS et al., 2001).

4.3 Condições de Cultivo de Microalgas

Como qualquer outro microrganismo, as microalgas reagem a variações do meio exterior com alterações do seu meio intracelular. Desta maneira, a manipulação de condições de cultivo, nomeadamente a presença ou ausência de determinados nutrientes, estimula a biossíntese de compostos que vão desde enzimas a fármacos estimulantes da tiróide e antioxidantes naturais, alguns de elevado valor comercial. Este fato pela primeira vez referenciado por TAMIYA (1957) *in* RICHMOND (1990), que modificou a composição, principalmente no seu teor em lipídios e proteínas, variando as condições de cultivo da alga.

4.3.1 Efeito da Temperatura no Cultivo de Microalgas

A temperatura é um fator extremamente importante e determinante na vida de todos os seres vivos, já que a vida depende da ocorrência de reações bioquímicas, cuja energia de ativação é influenciada principalmente pela temperatura (SGARBIERI, 1996).

Todos os seres vivos são afetados pela temperatura, embora alguns sejam mais tolerantes a variações mais amplas, os euritérmicos, enquanto outros, conhecidos como estenotérmicos, não conseguem suportar tais variações, tendo sua distribuição limitada por este fator (PROSSER & HEATH, 1991). Entre as microalgas também se encontram espécies euritérmicas e outras estenotérmicas, como observado por SUZUKI & TAKAHASHI (1995).

O efeito mais pronunciado da temperatura no metabolismo da célula é sua influência na respiração escura. Durante a fase escura, a taxa de respiração, particularmente em microalgas, aumenta exponencialmente com a temperatura. O aumento da taxa respiratória, principalmente quando a temperatura à noite é elevada, faz com que o fenômeno de perda noturna de biomassa diminua a produtividade do cultivo.

Com relação a espécies dominantes, a temperatura exerce efeito pronunciado, principalmente em cultivos comerciais, que precisam ser mantidos monoespecíficos devido às possíveis competições entre espécies. Em cultivos de *Spirulina*, foi observado que temperaturas de aproximadamente 15°C abaixo do ótimo, a microalga *Chlorella* sp. proliferou-se rapidamente na cultura e tornou-se a espécie dominante com duas a três semanas de cultivo (RICHMOND, 1990, citado por DUARTE FILHO, 2002).

A temperatura ótima para o cultivo de *Spirulina* está na faixa de 35 a 38°C. No entanto, ótimos de temperatura podem variar entre diferentes espécies e desvios desta faixa podem inibir a capacidade fotossintética (VONSHAK, 1997).

Certos tipos de microalgas são tolerantes a temperaturas elevadas, como a *Chlorella*, que continua se desenvolvendo a temperaturas em torno de 42°C (SAKAI *et al.*, 1995). A maioria das espécies de microalgas crescem entre 10-35°C, com um ótimo entre 16 e 24°C (MICHEL, 1986).

Em estudos realizados por SUNG *et al.* (1999) com a microalga *Chlorella* sp. KR-1 à temperatura de até 40°C e até 30% de CO₂, a microalga apresentou um excelente crescimento.

4.3.2 Efeito da Luminosidade no Cultivo de Microalgas

A intensidade luminosa é um fator muito importante para a realização da fotossíntese sobre os cultivos de microalgas. O fenômeno luz tem sua importância numa produção intensiva (massiva) de microalgas, uma vez que a qualidade de seu espectro e intensidade luminosa interferem, diretamente, na quantidade e qualidade da microalga produzida.

A fixação do carbono também é afetada pela luminosidade, uma vez que muitas enzimas são ativadas pela luz. É importante lembrar que dependendo da espécie de microalga que está sendo trabalhada podemos ter respostas diferentes para a mesma qualidade e intensidade de luz.

Segundo GRIMA et al. (1996), a disponibilidade de luz é um dos principais problemas observados no cultivo fotoautotrófico de microalgas. A luz precisa ser continuamente fornecida ao sistema, porque não pode ser acumulada. A limitação do crescimento em culturas densas pode ocorrer devido ao sombreamento provocado pelas próprias células à medida que há o crescimento, impedindo que parte da cultura receba a incidência de luz.

A luz pode afetar de três maneiras os organismos fotossintetizantes, pela quantidade de energia disponível (intensidade luminosa), pela periodicidade do suprimento (fotoperíodo) e pela composição do espectro de radiação (KIRK, 1994; RICHMOND, 1990).

LEE et al. (1987) estudando a *Spirulina platensis* verificaram que houve uma inibição do crescimento em 2000 Lux, cuja explicação dada ao fenômeno foi devido ao fato de encontrarem altas quantidades de clorofila em algas crescidas em baixas intensidades luminosas. Vários investigadores (SHUGARMAN & APPLEMAN, 1966; BEALE & APPLEMAN, 1971; SHERIDEN, 1972; MEEKS, 1974) afirmam que o conteúdo de clorofila é inversamente proporcional à intensidade luminosa recebida. Sob esta lógica, o rendimento bioenergético diminui conforme aumenta a intensidade luminosa.

4.4 Efeito das condições de cultivo na produção de lipídios e perfil de ácidos graxos

Nos sistemas biológicos, os lipídios funcionam como componentes de membrana, produtos de reserva, metabólitos e como fonte de energia sendo que grande parte dos lipídios é constituída de ácidos graxos. De acordo com os seus constituintes, os lipídios se classificam em fosfolipídios, glicolipídios e triacilgliceróis. Os triacilgliceróis (TAG) podem ser considerados a principal fonte energética da maioria dos organismos (LEHNINGER, 2004).

Diversos fatores podem influenciar na produção de lipídios e ácidos graxos por microalgas, como intensidade luminosa (SUSENIK & WAHNON, 1991), temperatura (JAMES et al., 1989; THOMPSON & GUO, 1998; RENAUD et al., 2002) e nutrientes (TAGUCHI et al., 1987; SUSENIK & WAHNON, 1991). O conteúdo lipídico das microalgas pode variar de 1 a 40% e em algumas condições de cultivo podem alcançar 85%. Segundo ILLMANN et al. (2000), 30°C e baixas concentrações de nitrogênio são consideradas condições ótimas para o aumento da produção de lipídios nas cepas de *Chlorella*. Os ácidos graxos nas microalgas correspondem a maior fração lipídica, e em algumas espécies os PUFA representam entre 25 e 60% dos lipídios totais (BECKER, 2004).

Segundo TSUZUKI et al. (1990), a adição de CO₂ aos cultivos influencia no conteúdo lipídico e no grau de insaturação dos ácidos graxos, sendo este, portanto, um nutriente essencial no cultivo de microalgas. O CO₂ proveniente do ar atmosférico somente pode sustentar uma produtividade de aproximadamente 10 g.m⁻².dia⁻¹. MURADYAN et al. (2004) constataram que a composição em ácidos graxos triplicou com aumento da concentração de 2 a 10% de CO₂ nos cultivos de *D. salina*. Aumento na fração lipídica foi observado por CHU et al. (1996) adicionando ao cultivo com 5% (v/v) de CO₂.

CHU et al. (1996) observaram aumentos no conteúdo dos ácidos graxos poliinsaturados, sobretudo o C18:3 e diminuição dos saturados (principalmente do C16:0) com o aumento da concentração de gás carbônico de 0,03 a 5% (v/v) para *Nitzschia inconspicua*. HAMZA & ROBIN (1992) também relataram aumentos de 10% para os ácidos graxos poliinsaturados da série ômega 3 com aumento na concentração de CO₂ no meio de cultivo para *Platymonas suecica*. O CO₂ é

necessário na síntese do ácido palmítico, que é o precursor de todos os ácidos graxos saturados e insaturados (LEHNINGER et al., 1995).

As variações entre espécies, nos perfis de ácidos graxos, são decorrentes da variabilidade genética entre elas, principalmente entre espécies de diferentes classes (RENAUD et al., 2002).

4.5 Biorreatores para o cultivo de microalgas

Na escolha do biorreator adequado, muitas considerações devem ser observadas. Fatores como biologia da alga, custo da terra, da energia, da água, dos nutrientes, clima (em cultivos abertos), produto final, que se deseja obter devem ser cuidadosamente especificados.

Geralmente os fotobiorreatores utilizados para o cultivo comercial de microalgas, como *Chlorella* e *Spirulina* em grande escala são abertos. Estes fotobiorreatores podem apresentar zonas de estagnação da cultura, onde as células não recebem luz, afetando o processo fotossintético e baixando a absorção de CO₂, bem como o crescimento celular.

As microalgas também são limitadas por CO₂, entretanto sua adição em tanques abertos é geralmente ineficiente e sem viabilidade econômica, exceto no caso de cultivo de *Spirulina*, o qual é essencial para manter a alta alcalinidade conforme BELAY (1997), citado por BOROWITZKA (1999).

Os biorreatores fechados apresentam várias vantagens, como alta utilização da luz levando a altas produtividades, controle de temperatura e habilidade de utilizar a luz natural. Isto significa que muitas espécies podem ser cultivadas livres de contaminação, bem como a não dependência das condições climáticas. Contudo, deve-se levar em consideração que os biorreatores abertos são muito mais fáceis de lidar para o cultivo de microalgas, do que os fechados que exigem alto controle das condições, como controle de temperatura, sem falar da necessidade de luz artificial, o que resulta em culturas limitadas pela luminosidade. A operação deste sistema exige intensivo trabalho e as culturas geralmente não são devidamente agitadas (BOROWITZKA, 1999).

Nos últimos anos muitos avanços surgiram no projeto e operação de fotobiorreatores. Têm-se duas configurações básicas, que são os fotobiorreatores de placa plana e os tubulares. O princípio fundamental destas configurações é reduzir a trajetória da luz de forma a aumentar a quantidade luz disponível para cada célula da cultura. Estes biorreatores possuem uma adequada agitação para permitir uma disponibilização melhor da luz, bem como aumentar as trocas gasosas. A espessura ótima de cultura nestes biorreatores está entre 0,02 e 0,04 m (BOROWITZKA, 1999).

No Laboratório de Engenharia Bioquímica da Fundação Universidade Federal do Rio Grande foram estudados diferentes tipos de fotobiorreatores (Figura 6) no cultivo de microalgas (MORAIS & COSTA, 2007b; COLLA et al., 2007; RADMANN et al., 2007; COSTA et al., 2006; ANDRADE, 2005; COLLA et al., 2004; REINEHR, 2003; COSTA et al., 2002; DUARTE FILHO, 2002; COSTA et al., 2001; SANTOS, 2001; COSTA et al., 2000; COZZA, 1999; WEBER et al., 1999).



Figura 6 Diferentes tipos de fotobiorreatores fechados e abertos

FONTE: Laboratório de Engenharia Bioquímica – FURG

4.6 Biofixação de CO₂ a partir de Microalgas em Diferentes Fotobiorreatores

A redução de CO₂ da atmosfera, maior responsável pelo aquecimento global, pode ser feita por diversos métodos, como por crescimento de árvores, absorção pelos oceanos, substituição de combustível fóssil, cultivo de microalgas, entre outros. Comparando-se árvores com as microalgas, as árvores saem em desvantagem, pois as microalgas podem ser levadas a novos locais, o cultivo pode ser facilmente extrapolado de pequena para grande escala e são mais rápidas que outros sistemas de biomassa, devido à velocidade de crescimento destas plantas microscópicas. As árvores fixam 1 ton/ha.ano podendo alcançar 3,5 ton/ha.ano em regiões de clima tropical, as microalgas podem chegar de 6,3 ton/ha.ano a 16,2 ton/ha.ano em regiões tropicais. Resultados em cultivos de microalgas são imediatos, enquanto árvores precisam crescer para fixar quantidades consideráveis de CO₂. Além de tudo, a biomassa produzida é potencialmente utilizável na alimentação humana ou animal, ou como fonte de compostos químicos de valor econômico. O dióxido de carbono (CO₂) é um fator muito importante na fisiologia das microalgas. Diversos autores propõem a utilização de gás carbônico no crescimento de microalgas em cultivo, já que este gás fornece o elemento carbono para a síntese dos componentes das células (PARSONS et al., 1984) e pode limitar as taxas de crescimento de microalgas (BURKHARDT & RIEBESELL, 1997). Estudos revelam que se pode obter aumentos de 2 a 5 vezes, nas densidades celulares e na biomassa, quando se adiciona CO₂ aos cultivos, junto com a aeração (LAING, 1991; HERNANDEZ-MOLEJÓN, 1995).

Microrganismos fotossintéticos tais como microalgas, quando crescem em grandes tanques abertos podem usar CO₂ de gás de combustão diretamente injetado no cultivo. A produção comercial de microrganismos fotossintéticos é utilizada para produzir produtos de alto valor tais como pigmentos (BROWN, 1996).

Estudos realizados por YOSHIHARA et al. (1996) revelam que cultivando a microalga marinha NOA-113 em fotobiorreator tubular com 15%(v/v) de CO₂, a quantidade de CO₂ fixada pelas células foi em torno de 3,5 g.CO₂.dia⁻¹ por reator na taxa de 150 mL.min⁻¹. YUN et al. (1997), utilizando *Chlorella vulgaris* para biofixação de CO₂, com 15% (v/v) apresentou uma taxa de fixação de CO₂ de 26,0 g.CO₂.m⁻³.h⁻¹, este resultado só foi atingido depois de adaptar a microalga em 5% (v/v) de CO₂, pois sem a adaptação o crescimento foi inibido.

LEE et al. (2002) realizaram estudos com *Chlorella* sp. KR-1, utilizando 15% (v/v) de CO₂ foi obtido 1,66 g.L⁻¹.dia⁻¹ para produtividade. Outros estudos realizados por este autor, em 1998 com a mesma microalga *Chlorella* sp. KR-1 foram avaliados concentrações de CO₂ de 10 a 70% (v/v), onde a maior taxa de crescimento foi obtida para 10% (v/v) de CO₂ no valor de 1,15 g.L⁻¹.dia⁻¹ e a concentração celular chegou em 5,7 g.L⁻¹ em 6 dias de cultivo.

Em um fotobiorreator tubular helicoidal cônico desenvolvido por WATANABE & SAIKI (1997); *Chlorella* fixou 21,9% do CO₂ em concentração de 10% (v/v) no gás de entrada, em cada 12 h de operação.

4.7 Efeito de NO_x, SO₂ e pH no Cultivo de microalgas

A forma predominante de carbono é altamente dependente do pH, sendo que valores de pH mais alcalinos favorecem a forma bicarbonato (HCO₃⁻), que constitui mais de 80% em pH entre 7 e 9, enquanto as formas de CO₂ livre e carbonato (CO₃⁻²) predominam abaixo ou acima destes valores, respectivamente (KIRK, 1994).

Valores de pH fora da faixa de 7-8 pode prejudicar o crescimento de microalgas, por afetar a disponibilidade de outros elementos, além do carbono, como o fósforo e o ferro dissolvido (formas biodisponíveis) (ESTEVES, 1988).

Quando o nitrogênio é fornecido sob forma oxidada de nitrato ele necessita ser reduzido para incorporar-se à célula na forma de moléculas orgânicas. O nitrogênio é o elemento que quantitativamente possui maior importância na composição da matéria seca das algas, podendo variar entre 1 e 10% na composição celular (RODRIGUES, 1955; SOEDER, 1990; KAPLAN et al., 1990).

BROWN (1996) no cultivo de microalgas em tanques abertos realizou experimentos com gás de combustão simulado com a alga verde *Monoraphidium minutum* e verificou que esta pôde tolerar 200 ppm de SO₂ e 150 ppm NO. Concentrações de nitrito no meio dos cultivos tratados com gás de combustão foi mais alto do que nos cultivos controle que não receberam SO₂ e NO. Isto sugere que um pouco do NO possa ser dissolvido e ficar disponível como fonte de nitrogênio para a microalga. Similarmente a concentração de nitrato encontrada foi menor nos cultivos

tratados com gás de combustão, mas o crescimento das células não foi afetado, novamente sugerindo que o metabolismo do nitrogênio é vinculado a tolerância ao gás de combustão. Os resultados demonstraram que este tipo de simulação com gás de combustão é bem tolerado pela microalga e é um excelente substrato para seu crescimento. O pH manteve-se estável durante o experimento indicando que o SO₂ não causou problemas, já que se trata de um ácido forte.

Estudos realizados por YOSHIHARA et al. (1996), com gás de combustão simulado e com a microalga marinha NOA-113 cultivada em fotobiorreator tubular, sugerem que o cultivo só seja injetado com NO após a fase de adaptação, na metade da fase de crescimento celular, aproximadamente 4 dias após a inoculação, pois quando o cultivo foi injetado com NO (100 e 300 ppm) no ponto zero a microalga não cresceu e o NO não foi eliminado. Nenhuma evidente inibição do crescimento de células resultante da presença de NO foi detectado, quando houve a fase de adaptação. Quase 50% do NO foi eliminado em ambas concentrações e o pH do meio manteve-se constante em torno de 6 durante o período de adição de NO.

LEE et al. (2002) relatam que a microalga *Chlorella* sp. KR-1 exibe excelente tolerância a SO_x e NO_x, quando comparada com outras espécies de alga. *Chlorella* sp. KR-1 foi cultivada com 100 e 300 ppm de SO₂ e NO, e apresentaram nestas concentrações, respectivamente, 1,24 g.L⁻¹.dia⁻¹ e 0,78 g.L⁻¹.dia⁻¹ de biomassa.

4.8 Efeito dos Gases de Combustão CO₂, SO_x e NO_x na atmosfera e o Protocolo de Kyoto

Desde a época pré-histórica que o dióxido de carbono tem tido um papel determinante na regulação da temperatura global do planeta. Com o aumento da utilização de combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás natural) a concentração de dióxido de carbono na atmosfera duplicou nos últimos cem anos. Neste ritmo e com o abatimento massivo de florestas que se tem praticado (é nas plantas que o dióxido de carbono, através da fotossíntese, forma oxigênio e carbono, que é utilizado pela própria planta) o dióxido de carbono começará a proliferar levando, muito certamente, a um aumento da temperatura global, o que, mesmo tratando-se de poucos graus, levaria ao degelo das calotas polares e a grandes alterações a nível topográfico e ecológicos do planeta.

O aumento da industrialização, bem como da população urbana levaram a uma demanda maior de energia provocando, assim, maior emissão de poluentes atmosféricos (CO_2 , SO_x , NO_x). A queima de combustíveis fósseis para geração de energia está entre as principais fontes de emissão destes poluentes atmosféricos. Um dos efeitos causados por estas emissões é o efeito estufa.

A emissão dos óxidos do nitrogênio (NO_x) contidos no gás de combustão de combustíveis fósseis é uma das causas principais da chuva ácida. O óxido nítrico (NO) é o maior constituinte de NO_x em combustíveis fósseis, e o NO emitido na atmosfera é lentamente oxidado a dióxido de nitrogênio pelo oxigênio do ar, resultando em chuva ácida.

Nas últimas décadas, as precipitações ácidas têm sido um problema ambiental sério nos Estados Unidos e na Europa. O aumento das emissões de SO_2 proveniente da queima de combustíveis fósseis tem sido responsável pelo decréscimo do pH das precipitações, com valores entre 4-4,5 (OVERREIN, 1983 citado por MIGLIAVACCA, 2005).

Os países industrializados são os maiores produtores de poluentes, enviando anualmente bilhões de toneladas para a atmosfera. A Tabela 1 que segue mostra os principais poluentes do ar e os seus efeitos.

Tabela 1 Principais poluentes do ar e os seus efeitos

Poluente	Principal Fonte
Dióxido de Carbono (CO_2)	Todas as combustões
Dióxido de Enxofre (SO_2)	Centrais termoelétricas a petróleo ou carvão, fábricas de ácido sulfúrico.
Óxidos de Nitrogênio (NO, NO_2)	Centrais termoelétricas; fábricas de fertilizantes, de explosivos ou de ácido nítrico.
Oxidantes fotoquímicos- Ozônio (O_3)	Formados na atmosfera devido à reação de Óxidos de Nitrogênio, Hidrocarbonetos e luz solar.
Partículas em suspensão	Processos industriais, centrais termoelétricas, reação dos gases poluentes na atmosfera.

FONTE: ptsoft.net/vastro/referencia/estufa/poluentes/poluentes.html, acessada em novembro 2005.

As emissões de dióxido de enxofre e óxidos de nitrogênio nos EUA centrais e orientais estão causando chuvas ácidas no estado de Nova Iorque, Nova Inglaterra e na parte oriental do Canadá. Os níveis de pH de vários lagos de água fresca na região foram alterados dramaticamente por esta chuva, que acabaram por destruir cardumes inteiros de peixes. Efeitos idênticos foram também observados na Europa. As emissões de Óxido de Enxofre e subsequente formação de ácido sulfúrico podem também ser responsáveis por ataques em mármore e pedras de calcárias a longas distâncias da sua origem.

O aumento da combustão de carvão e petróleo desde os finais dos anos 40 levou a uma crescente concentração de Dióxido de Carbono na atmosfera. Se isto continuar, o aumento resultante do Efeito Estufa permitiria à radiação solar penetrar na atmosfera, mas diminuiria as conseqüentes emissões de radiação terrestre - os raios infravermelhos, deixando-os encurralados na atmosfera poderia, provavelmente, levar ao aumento da temperatura global do planeta que iria afetar o clima em nível global e levaria ao degelo das calotas polares. Muito possivelmente um aumento da nebulosidade ou a absorção do dióxido de carbono excessivo pelos oceanos impediria um aumento do Efeito de Estufa até o ponto de derreter as calotas polares. Contudo, várias pesquisas levadas a cabo durante os anos 80 comprovaram que o Efeito Estufa está realmente aumentando e que todos os países deviam imediatamente adotar medidas para lutar contra este aumento.

O efeito estufa é um fenômeno natural pelo qual a atmosfera de nosso planeta é mantida em uma temperatura superficial propícia a vida. Sem ele a temperatura média ficaria em torno de -18°C . Essa propriedade é atribuída aos gases de efeito estufa (CO_2 , CH_4 , N_2O , HFCs, PFCs, SF_6), que participando de um mecanismo de balanço térmico global mantém a superfície do planeta aquecido. Em média, para a Terra, a energia solar que chega é equilibrada pela radiação terrestre que sai.

O principal causador do efeito estufa (50%) é o CO_2 . Os níveis de CO_2 na atmosfera aumentaram de 280 ppm, desde o período antecedente a Revolução Industrial, para cerca de 380 ppm, atualmente (SIEGENTHALER et al., 2005). O fato é decorrente de gases emitidos principalmente, da queima de combustíveis fósseis (carvão, petróleo e gás natural), em usinas termelétricas, indústrias, veículos em

circulação, sistemas domésticos de aquecimento, e também das atividades agro-pastoris, lixões e aterros sanitários.

O Protocolo de Kyoto foi aberto para assinatura em 16 de março de 1998. Entrará em vigor 90 dias após a sua ratificação por pelo menos 55 Partes da Convenção, incluindo os países desenvolvidos que contabilizaram pelo menos 55% das emissões totais de dióxido de carbono em 1990 desse grupo de países industrializados. Enquanto isso, as Partes da Convenção sobre Mudança do Clima continuarão a observar os compromissos assumidos sob a Convenção e a preparar-se para a futura implementação do Protocolo.

Firmado para atingir o objetivo primordial da Convenção Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do clima, o Protocolo de Kyoto estabeleceu metas para que as emissões de gases do efeito estufa sejam reduzidas em pelo menos 5% abaixo dos níveis verificados em 1990. Essas metas são diferenciadas em consonância com o princípio das responsabilidades comuns e deverão ser atingidas num primeiro período de compromisso, compreendido entre 2008 e 2012.

O Protocolo de Kyoto também estabeleceu mecanismos adicionais que permitem a redução de emissões ou o aumento de remoção de gases do efeito estufa da atmosfera, para além das fronteiras dos países da convenção. Fazem parte o Mecanismo de desenvolvimento limpo (MDL), a Implementação Conjunta e o Comércio de Emissões.

O MDL foi definido no Artigo 12 do Protocolo de Kyoto e regulamentado pelos Acordos de Marrakech. Dispõe sobre atividades de projetos de redução de emissões ou aumento de remoções de gases do efeito estufa da atmosfera, implementadas em países que não fazem parte da convenção, que irão gerar reduções certificadas de emissões.

A Implementação Conjunta, outro mecanismo do protocolo de Kyoto, pelo qual uma parte dos países da convenção pode transferir ou adquirir de qualquer outra parte dos países da convenção unidades de emissões, a fim de cumprir seus compromissos quantificados de limitação e redução de emissões de gases de efeito estufa.

5 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Para um melhor entendimento, o trabalho foi dividido em 4 artigos:

ARTIGO 1: Seleção de microalgas para biofixação de gás carbônico.

ARTIGO 2: Cultivo das microalgas *Spirulina* sp. e *Scenedesmus obliquus* em fotobiorreatores tubulares em série com óxido nítrico e dióxido de enxofre.

ARTIGO 3: Biofixação de CO₂ por microalgas isoladas de lagoas próximas a uma planta de energia térmica a carvão.

ARTIGO 4: Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases de combustão do carvão.

5.1 SELEÇÃO DE MICROALGAS PARA BIOFIXAÇÃO DE GÁS CARBÔNICO

SELEÇÃO DE MICROALGAS PARA BIOFIXAÇÃO DE GÁS CARBÔNICO

Elisangela Martha Radmann e Jorge Alberto Vieira Costa

Laboratório de Engenharia Bioquímica, Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Caixa Postal 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil. Fax: +55-53-3233 8745. E-mail: dqmjorge@furg.br

RESUMO

Microalgas são utilizadas como alimento e fonte de compostos químicos de interesse. Estes microrganismos também se destacam pelo potencial em biofixar CO₂, contribuindo assim para a redução do efeito estufa. As plantas de energia térmica são responsáveis por 22% das emissões globais de CO₂, além de outros gases prejudiciais ao meio ambiente, como SO₂ e NO. O objetivo deste trabalho foi estudar a influência da adição de SO₂ no cultivo das microalgas *Spirulina* sp. LEB-18, *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella homosphaera*. A adição de SO₂ variou entre os ensaios, sendo realizada no tempo zero do cultivo e depois de 4 d de inoculação. A máxima produtividade de biomassa foi 0,19 g.L⁻¹.d⁻¹ e a concentração celular máxima foi 2,62 g.L⁻¹, ambos para microalga *Spirulina* sp. Os resultados demonstraram a habilidade das microalgas em tolerar concentrações de 30 ppm SO₂ sem influenciar o crescimento celular e a biofixação de CO₂.

PALAVRAS-CHAVE: *Arthrospira*, *Chlorella*, dióxido de carbono, dióxido de enxofre, *Scenedesmus*, *Spirulina*.

ABSTRACT

Microalgae are used as food and chemical compounds source. These microorganisms also gain eminence for the CO₂ biofixation potential, contributing thus for de greenhouse effect mitigation. Power plants are responsible for 22% of the CO₂ emissions in the world, besides other gases emissions as SO_x and NO_x, harmful to the environment, are formed in the coal combustion. The aim of this work was to study the addition of SO₂ to the culture of the microalgae *Spirulina* sp., *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella homosphaera*. The addition of SO₂ ranged between the experiments, being done at the beginning and after 4 d of inoculation. The maximum biomass productivity was 0.19 g.L⁻¹.d⁻¹ and the maximum cell concentration was 2.62 g.L⁻¹, both for *Spirulina* sp. The results showed the ability of the microalgae to tolerate concentrations of 30 ppm SO₂ without affect on the cell growth and the CO₂ biofixation.

KEY WORDS: *Arthrospira*, *Chlorella*, carbon dioxide, sulphur dioxide, *Scenedesmus*, *Spirulina*.

1 INTRODUÇÃO

O cultivo microalgal é um dos mais modernos processos biotecnológicos em desenvolvimento. A utilização de microalgas como fonte de alimento tem sido bastante explorada em diversos países como França, Estados Unidos, China e Tailândia (BECKER, 2004). Quando cultivadas em condições adequadas, certas espécies de microalgas podem duplicar sua biomassa diariamente, alcançando teor protéico superior a 50% (GOLDMAN, 1980).

O cultivo de microalgas apresenta custos relativamente baixos para a colheita e transporte, pequeno consumo de água e pode ser realizado em condições não adequadas para a produção de culturas convencionais, como solos desérticos, com água salobra ou salgada. As microalgas apresentam maior eficiência fotossintética que os vegetais superiores e podem ser cultivadas em meio salino simples (PIRT, 1986) e, além disto, são eficientes fixadoras de CO₂ (BROWN & ZEILER, 1993). A biomassa microalgal produzida da assimilação de CO₂ pode ser transformada em alimento humano, ração animal e os ácidos graxos extraídos da biomassa podem ser convertidos em biocombustíveis, alimentos e fármacos.

Spirulina, *Chlorella* e *Scenedesmus* são microalgas que apresentam em sua composição elevado teor de proteínas e lipídios (VONSHAK, 1997). *Spirulina* e *Chlorella* possuem certificado GRAS (Generally Recognized As Safe) emitido pelo FDA (Food and Drug Administration), podendo ser utilizadas como alimento sem oferecer risco à saúde humana. *Scenedesmus* é bastante utilizada como ração animal (HERODEK et al., 1989; PARTALI et al., 1985) e suplemento alimentar (BECKER, 2004).

A concentração de CO₂ na atmosfera aumentou de 280 ppm, desde o início da Revolução Industrial, para cerca de 380 ppm (SIEGENTHALER et al., 2005). Nos EUA aproximadamente 5,5 gigaton.ano⁻¹ de CO₂ emitido na atmosfera é proveniente da queima de combustíveis fósseis. Em adição a grande quantidade de CO₂ são gerados óxidos de nitrogênio (NO_x) e óxidos de enxofre (SO_x), em especial óxido nítrico (NO) e dióxido de enxofre (SO₂) (NEGORO et al., 1991). Nas últimas décadas, as precipitações ácidas têm sido um problema ambiental sério em vários países. O aumento das emissões de SO₂ proveniente da queima de combustíveis fósseis tem sido responsável pelo decréscimo do pH das precipitações, com valores entre 4-4,5 (OVERREIN, 1983).

LEE et al. (2002), YUN et al. (1997) e YOSHIHARA et al. (1996) relatam que concentrações acima de 12% de CO₂ são toleradas pelas microalgas. ZEILER et al. (1995), verificaram que a microalga *Monoraphidium minutum* tolerou 200 ppm de SO_x e 150 ppm de NO_x. Estudos realizados com *Odorella* sp. mostraram sua resistência a 120 ppm de NO_x (YANAGI et al., 1995). Outro estudo com *Chlorella* sp. mostrou que a microalga foi resistente a 20 ppm de SO_x e 60 de ppm NO_x em gás de combustão simulado (MAEDA et al., 1995).

O objetivo do presente trabalho foi estudar a influência da adição de SO₂ nas características cinéticas e de biofixação de CO₂ pelas microalgas *Chlorella homosphaera* LEB-24, *Scenedesmus obliquus* LEB-22 e *Spirulina* sp. LEB-18.

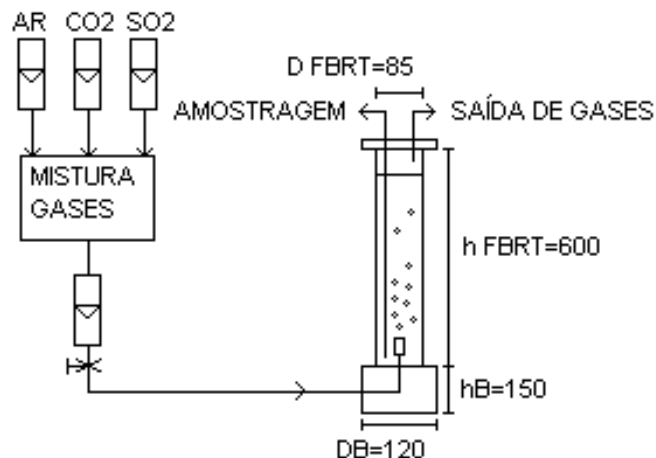
2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos e meio de cultivo

As microalgas utilizadas neste estudo foram *Chlorella homosphaera*, *Spirulina* sp. e *Scenedesmus obliquus*, mantidas e cultivadas em meio Bristol modificado - MBM (WATANABE, 1960), meio Zarrouk Modificado (ZARROUK, 1966), onde a fonte de carbono (bicarbonato de sódio) foi substituída por CO₂ (MORAIS & COSTA, 2007b), e em meio MC (WATANABE, 1960), respectivamente. Os inóculos foram previamente adaptados a 1% (v/v) de CO₂ durante 7 d.

2.2 Condições de cultivo

Os cultivos foram realizados em um sistema de fotobiorreatores fechados do tipo tubulares (FBRT) de 2L (volume útil de 1,8L), conforme mostra Figura 1, mantidos em câmara termostatzada a 30°C com fotoperíodo 12 h claro/escuro (REICHERT et al., 2006) durante 20 d. A concentração inicial dos cultivos foi 0,15 g.L⁻¹ (COLLA et al. 2007). A aeração foi realizada através de ar comprimido misturado aos gases CO₂ e SO₂ dispostos em cilindros industriais. A vazão de entrada da mistura nos cultivos foi 540 mL.min⁻¹ durante o período claro, controlado através de válvulas solenóides. A iluminância de 3200 Lux foi fornecida aos cultivos através de lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia de 40W.



D_{FBRT}: diâmetro do fotobiorreator; h_{FBRT}: altura do fotobiorreator; D_B: diâmetro da base; h_B: altura da base.

Figura 1 Esquema do cultivo em fotobiorreatores tubulares. Medidas em mm.

As microalgas foram expostas a 6% de CO₂ (MORAIS & COSTA, 2007b) e 30 ppm de SO₂. A adição de SO₂ aos cultivos variou entre os ensaios, iniciando no tempo zero de cultivo ou após 4 d de inoculação. A injeção dos gases CO₂ e SO₂ foi realizada durante o período claro durante 15 min a cada 2 h.

Foram realizados também, ensaios com os meios MBM, Zarrouk e MC, na ausência de microalgas, a fim de avaliar o comportamento em relação ao pH.

2.3 Determinações analíticas

Diariamente amostras foram coletadas assepticamente para determinação da concentração celular, calculada através da densidade óptica a 670 nm (COLLA et al., 2007) em espectrofotômetro FEMTO modelo Plus 700 com curva de calibração relacionando densidade óptica e peso seco de biomassa para cada microalga (RADMANN et al., 2007). Também foi realizada a medição do pH a cada 24h através de pHmetro digital (Quimis Q400H, Brasil).

Foi realizada análise elementar na biomassa microalgal obtida, e os teores de carbono (%) foram utilizados para o cálculo da biofixação de CO₂ pelas microalgas. A análise foi realizada em analisador elementar CNHS (Perkin Elmer 2400, USA) em duplicata. A calibração do equipamento foi realizada utilizando o padrão certificado cistina (Perkin Elmer, EUA). Os resultados de recuperação da cistina lida como amostra, foram de 100% para o carbono.

2.4 Respostas estudadas

Foram realizados 6 ensaios e comparados quanto à velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), concentração celular máxima (X_{max}), produtividade máxima (P_{max}) e a capacidade de fixação de CO₂ pelas microalgas (FA e FD) expostas a 6% de CO₂ e 30 ppm de SO₂. A velocidade específica de crescimento foi obtida através da Equação 1.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

A produtividade da biomassa, definida como a massa celular formada em determinado volume na unidade de tempo, foi calculada segundo a Equação 2.

$$P_x = \frac{X - X_0}{t - t_0} \quad (2)$$

onde, X (g.L⁻¹) é a concentração celular final, X₀ (g.L⁻¹) é a concentração celular inicial do cultivo, t (d) é o tempo final e t₀ é o tempo inicial do cultivo.

Foi calculado o acúmulo de CO₂ fixado (FA, g, Equação 3) e a fixação diária de CO₂ (FD, g. g⁻¹.d⁻¹, equação 4).

$$FA = (X_t - X_0) * m_{cbm} * V_{FBR} * \left(\frac{m_{CO_2}}{m_C} \right) \quad (3)$$

onde, X_t (g.L⁻¹) é a concentração celular no tempo t (d), X₀ (g.L⁻¹) é a concentração celular inicial do cultivo, m_{cbm} (g.g⁻¹) é a fração mássica de carbono determinada na biomassa microalgal, V_{FBR} (L) é o volume de meio no fotobiorreator, m_{CO₂} (g.mol⁻¹) e m_C são as massas molares do dióxido de carbono e do carbono, respectivamente.

$$FD = \frac{(FA_{(t+1)} - FA_t)}{m_{id}} \quad (4)$$

onde FA_(t+1) é o acúmulo de CO₂ fixado no tempo t+1 (d), FA_t é o acúmulo de CO₂ no tempo t (d), m_{id} (g) é a massa de CO₂ injetada diariamente. A fixação diária máxima (FD_{max}) é o máximo valor de fixação diária alcançado no cultivo.

2.5 Análise estatística

As repostas cinéticas obtidas a partir de dados experimentais para as microalgas *Spirulina* sp., *S. obliquus* e *C. homosphaera*, foram avaliados através de Análise de Variância (ANOVA), com nível de significância de 90% (p≤0,10) utilizando teste de Tuckey (ANDRADE & COSTA, 2007). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maior concentração celular (2,62 g.L⁻¹) foi obtida para a microalga *Spirulina* sp. (p<0,001) quando o SO₂ foi injetado a partir de 4 d de cultivo (Tabela 1). Resultados inferiores foram encontrados por KURANO et al. (1995) para microalga *Galdiera partita* (1,40 g.L⁻¹) cultivada em meio contendo 50 ppm de SO₂. LEE et al. (2002) obtiveram em torno de 2,0 g.L⁻¹ para a microalga *Chlorella* sp. KR-1 cultivada em meio com 15% de CO₂ e 60 ppm de SO₂. Resultados inferiores também foram encontrados por YANAGI et al. (1995), onde *Chlorella* sp. HA-1 apresentou aproximadamente 0,40 g.L⁻¹ em meio contendo 10% de CO₂, 50 ppm de SO₂ e 100 ppm de NO. As máximas produtividades para as microalgas *Spirulina* sp. e *C.*

homosphaera (0,19 e 0,07 g.L⁻¹.d⁻¹) também foram apresentadas para os ensaios em que a injeção de SO₂ foi realizada a partir de 4 d de cultivo (p<0,001), condição em que as microalgas estavam adaptadas ao meio e condições de cultivo.

Para a microalga *S. obliquus* a produtividade máxima não foi influenciada pelo período em que foi adicionado SO₂ (p=0,7945). Estudos relatam que a adição do gás de combustão, no tempo zero do cultivo, inibiu o crescimento da microalga marinha NOA-113. Se o inóculo for mantido em condições diferentes a dos ensaios, o período de adaptação pode ser longo, caso contrário pode ser inexistente, como ocorreu no presente trabalho com os ensaios em que o início da injeção de SO₂ se deu em 4 d de cultivo. Em relação à resposta velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), a microalga *C. homosphaera* apresentou 0,37 d⁻¹ quando a adição de SO₂ iniciou em 4 d de cultivo (p=0,0001).

Tabela 1 Concentração celular máxima (X_{max} , g.L⁻¹), produtividade máxima (P_{max} , g.L⁻¹.d⁻¹) e velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max} , d⁻¹) para os experimentos realizados para as diferentes microalgas.

Microalga	Ensaio	X_{max}	P_{max}	μ_{max}
Sp	Sp1	2,62	0,19	0,14
	Sp2	2,47	0,12	0,15
Sc	Sc1	0,81	0,07	0,16
	Sc2	0,72	0,08	0,12
Ch	Ch1	0,66	0,07	0,37
	Ch2	0,48	0,03	0,05

Sp: *Spirulina* sp.; Sc: *Scenedesmus obliquus*; Ch: *Chlorella homosphaera*. Sp1, Sc1, Ch1: injeção de SO₂ em 4 d após a inoculação; Sp2, Sc2, Ch2: injeção de SO₂ no tempo zero.

Os resultados demonstraram que a adição de 30 ppm de SO₂ foi tolerado pelas microalgas. Portanto, o SO₂ pode ser utilizado como substrato para o crescimento das microalgas. O pH dos ensaios para *Spirulina* sp. manteve-se estável em torno de 8,0 a 9,0 (Figura 2), indicando que o SO₂ não inibiu o crescimento da mesma. O cultivo de *Spirulina* requer meio alcalino, pH entre 8,3 e 11,0 (ZARROUK, 1966) com grande disponibilidade de carbonato ou bicarbonato de sódio, e

temperatura próxima a 32°C, condições ótimas de crescimento (COSTA et al., 2002). Como causa do esgotamento de CO₂ ou bicarbonato disponíveis, pode-se observar uma elevação no valor do pH (RICHMOND, 1990). O pH interfere nas reações químicas e bioquímicas, além de interferir nas conformações especiais das moléculas.

Para as microalgas *C. homosphaera* e *S. obliquus*, o pH durante os cultivos variou de 6,0 a 8,0. NEGORO et al. (1991) relataram que quando o SO₂ foi facilmente dissolvido no meio de cultivo, o pH do meio reduziu, causando forte inibição do crescimento microalgal. Valores de pH fora da faixa de 7,0 a 8,0 pode prejudicar o crescimento de microalgas, afetando a disponibilidade de nutrientes como carbono, fósforo e ferro dissolvido (ESTEVES, 1988).

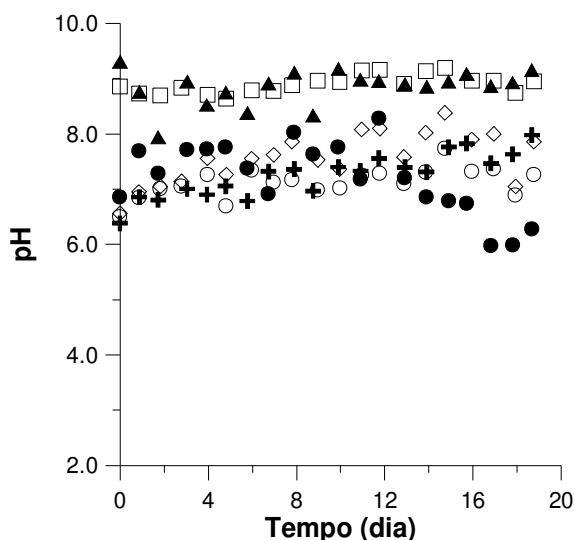


Figura 2 Curvas de pH para os ensaios: Sp 1(▲), Sc 1 (●), Ch 1(+), Sp 2(□), Sc 2 (◇), Ch 2 (○).

A injeção dos gases CO₂ e SO₂ não alterou o pH do meio Zarrouk ($p < 0,10$), mantendo-se em torno de 7,0 ao longo do tempo (Figura 3). Para os demais meios de cultivo, MBM e MC, o pH diminuiu com injeção dos gases CO₂ e SO₂, chegando a aproximadamente 2,70 para o meio MBM e 3,70 para o meio MC. No entanto, este pode ser um dos motivos de algumas microalgas não apresentarem crescimento ao longo do tempo. Segundo KIRK (1994), meios alcalinos favorecem a forma bicarbonato (HCO₃⁻), que constitui mais de 80% em pH entre 7,0 e 9,0; enquanto as formas de CO₂ livre e carbonato (CO₃⁻²) predominam abaixo ou acima destes valores, respectivamente. Valores de pH do meio de cultivo muito baixo (<5,0)

podem inibir o crescimento microalgal, levando a indisponibilidade de nutrientes (ESTEVEES, 1988).

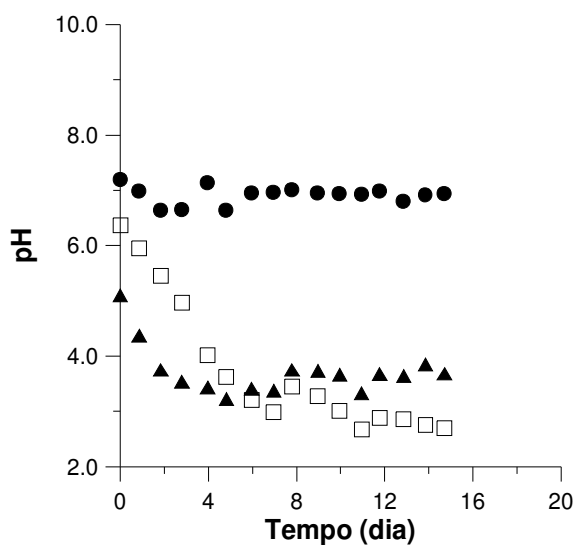


Figura 3 Curvas de pH para os meios de cultivo: (●) Meio Zarrouk, (□) Meio MBM, (▲) Meio MC.

A Figura 4 mostra as curvas de crescimento das microalgas *Spirulina* sp., *S. obliquus* e *C. homosphaera* em diferentes condições de cultivo. O ensaio Ch1 (injeção de SO_2 depois de 4 d de inoculação) diferiu em relação a X_{max} ($p < 0,001$) do ensaio Ch2 (injeção de SO_2 no tempo zero). A maior concentração final de biomassa da microalga *C. homosphaera* foi alcançada para o ensaio em que a injeção de SO_2 foi feita em 4 d de cultivo ($p < 0,01$).

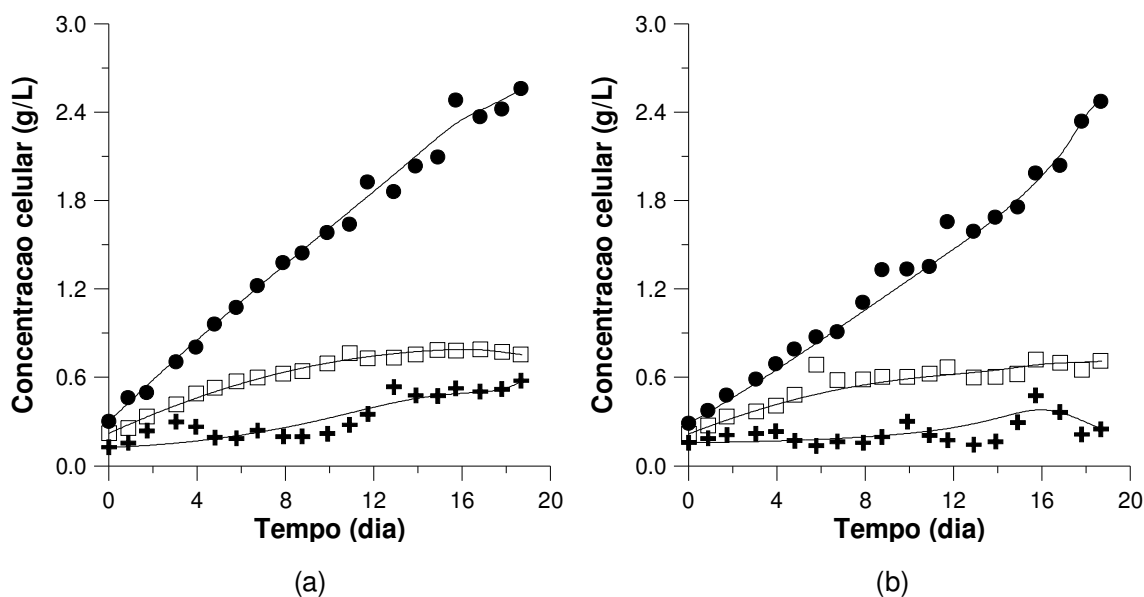


Figura 4 Curvas de crescimento das microalgas *Spirulina* sp., *S. obliquus* e *C. homosphaera*. (a) injeção de SO₂ em 4 d após inoculação; (b) injeção de SO₂ no tempo zero do cultivo: (●) Sp1 e Sp2, (□) Sc1 e Sc2, (+) Ch1 e Ch2.

A microalga *S. obliquus*, nas duas condições de cultivo apresentou comportamento semelhante e não apresentou fase de adaptação (lag). O ensaio Sc2, em que a injeção foi realizada no tempo zero do cultivo, alcançou menor concentração final de biomassa comparado ao ensaio Sc1, diferindo significativamente ($p < 0,001$), onde só foi adicionado SO₂ em 4 d de cultivo. As concentrações finais de biomassa alcançadas para os ensaios Sc1 e Sc2 foram 0,81 e 0,72 g.L⁻¹, respectivamente. MORAIS & COSTA (2007b), em estudos relacionados a biofixação de CO₂ com a microalga *Scenedesmus*, relatam que esta pode crescer em concentrações de CO₂ acima de 12%.

Como os inóculos utilizados para o início dos experimentos foram previamente aclimatados no meio contendo CO₂, a fase de adaptação (lag) da curva de crescimento não foi observada em nenhum dos ensaios para *Spirulina* sp. apresentados na Figura 4. Nos ensaios Sp1 (injeção de SO₂ depois de 4 d de inoculação) e Sp2 (injeção de SO₂ no tempo zero) a fase de crescimento logarítmico foi semelhante, com crescimento ao longo dos 20 d. A concentração final de biomassa alcançada para os ensaios Sp1 e Sp2 foram 2,62 e 2,47 g.L⁻¹ ($p < 0,001$),

respectivamente. Assim como para as microalgas *S. obliquus* e *C. homosphaera*, a maior concentração final de biomassa para microalga *Spirulina* sp. foi obtida para o ensaio em que a injeção de SO₂ foi feita em 4 d de cultivo (2,62 g.L⁻¹).

A tolerância a 30 ppm de SO₂ foi maior para *Spirulina* sp. Este fato não está de acordo com estudos realizados por LEE et al. (2002), onde a microalga *Chlorella* exibiu excelente tolerância a SO_x e NO_x quando comparada com outras espécies de microalga.

A Figura 5 apresenta a fixação diária (FD) de CO₂ ao longo do tempo de cultivo para as microalgas *Spirulina* sp., *S. obliquus* e *C. homosphaera*. A fixação diária alcançou um máximo de 19,80% (em torno de 3,81 g.d⁻¹) no ensaio Sp1 (injeção de SO₂ depois de 4 d de inoculação) e de 15,51% (em torno de 3,00 g.d⁻¹) no ensaio Sp2 (injeção de SO₂ no tempo zero). Para os demais ensaios a fixação diária máxima variou de 4,48 a 5,31% (em torno de 1,02 g.d⁻¹). Resultado inferior foi encontrado para a microalga marinha NOA-113 cultivada em fotobiorreator tubular com 15% (v/v) de CO₂, alcançando em torno de 3,50 g.d⁻¹ por reator na taxa de 150 mL.min⁻¹ (YOSHIHARA et al., 1996). A máxima fixação diária alcançada para *Chlorella homosphaera* foi 7,34% para ensaio Ch1 (injeção de SO₂ após 4 d de inoculação). Em um fotobiorreator tubular helicoidal cônico desenvolvido por WATANABE & SAIKI (1997), a microalga *Chlorella* fixou 21,90% do CO₂ em concentração de 10% (v/v) no gás de entrada, em cada 12 h de operação.

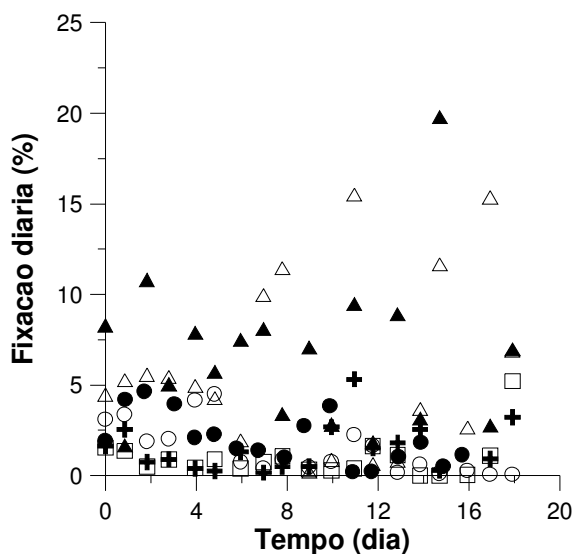


Figura 5 Curvas de fixação diária de CO₂ ao longo do tempo: (▲) Sp1, (●) Sc1, (+) Ch1, (△) Sp2, (○) Sc2, (□) Ch2.

4 CONCLUSÕES

As maiores respostas cinéticas de fixação foram alcançadas para microalga *Spirulina* sp., com produtividade máxima de 0,19 g.L⁻¹.d⁻¹, concentração celular máxima 2,62 g.L⁻¹ e máxima biofixação de CO₂ 19,80% quando submetida à injeção de SO₂ depois de 4 d de inoculação. Os resultados demonstraram o potencial das microalgas em tolerar 30 ppm de SO₂ sem afetar suas características cinéticas e a biofixação CO₂.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a ELETROBRÁS – Centrais Elétricas Brasileiras S.A. e CGTEE – Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

6 REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of Microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture* (2007): In Press.

BECKER, E. W. Biotechnology and exploitation of the green alga *Scenedesmus obliquus* in India. *Biomass*, 4, 1-19, 1984.

BECKER, W. Microalgal in human and animal nutrition. In: Richmond, A. (ed) *Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology*. London: Blackwell Science, 312-351, 2004.

BROWN, L. M.; ZEILER, K. G. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. *Energy Conversion and Management*, 34, 1005-13, 1993.

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*, 98, 1489-1493, 2007.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A.. Modelling of *Spirulina* sp. growth in fresh water using response surface methodology. *World J. Microb Biot.* 18, 603-607, 2002.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. *World J Microb Biot.* 18, 603-607, 2002.

COSTA, J. A. V.; LINDE, G.A.; ATALA, D .I. P.; MIBIELI, G.M.; KRÜGER, R. T. Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina* sp. in microcosms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 15-18, 2000.

ESTEVEZ, F. A. *Fundamentos de Limnologia*. Rio de Janeiro, Ed. Interciencia/FINEP, 574, 1988.

GOLDMAN, J. C. Outdoor algal mass cultures-II. Photosynthetic yield limitations. *Algal Biomass*. 11, 119-135,1980.

HENRIKSON R. *Microalga Spirulina: Superalimentado del futuro*. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, ISBN: 84-7953-047-2, 1994.

HERODEK, A.; TÁTRAI, I.; OLÁH, J.; VÖRÖS, L. Feeding experiments with silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) fry. *Aquaculture* (83), 3-4, 15, 331-344, 1989.

KIRK, J. T. O. *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. Cambridge University Press, Camberra, 509p., 1994.

LEE, J. S.; KIM D. K.; LEE, J. P.; PARK, S. C.; KOH, J. H.; CHO, H. S.; KIM, S. W. Effects of SO₂ and NO on growth of *Chlorella* sp. KR-1. *Bioresource Technol.*, 8, 1-4, 2002.

MAEDA, K.; OWADA, M.; KIMURA, N.; OMATA, K.; KARNHE, I. *Energy Convers. Mgrnt.*, 36, 717, 1995.

MATSUMOTO, H.; HAMASAKI, A.; SIOJI, N. Influence of CO₂, SO₂ and NO in Flue gas microalgae productivity. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 620-624, 1996.

MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V., Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor, *Journal of Biotechnology* (2007): In Press.

NEGORO, M.; SHIOJI, N.; MIYAMOTO, K.; MIURA, Y. Growth of microalgae in high CO₂ gas and effect of SO_x and NO_x. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 28/29, 877-886, 1991.

OVERREIN, L. N. Acid precipitation - an international environmental problem. *Water Sci. Technol.* 15, 1-7, 1983.

PARTALI, V.; OLSEN, Y.; FOSS, P.; LIAAEN-JENSEN, S. (1985). Carotenoids in food chain studies - I. Zooplankton (*Daphnia magna*) response to a unialgal (*Scenedesmus acutus*) carotenoid diet, to spinach, and to yeast diets supplemented with individual carotenoids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 82, 4, 767-772, 1985.

PIRT S. J. The thermodynamic efficiency (quantum demand) and dynamics of photosynthetic growth. *New Phytologist*, 102, 3-37, 1986.

RADMANN, E. M.; REINEHR, C. O., COSTA, J. A. V. Otimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. *Aquaculture*, 265, 118-126, 2007.

REICHERT, C. C.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. Braz J Chem Eng. 23, 23-28, 2006.

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

SIEGENTHALER, U.; STOCKER, T. F.; MONNIN, E.; LÜTHI, D.; SCHWANDER, J.; STAUFFER, B.; RAYNAUD, D.; BARNOLA, J. M.; FISCHER, H.; DELMONTT, V. M.; JOUZEL J. Stable carbon cycle-climate relationship during the late Pleistocene. Science, 310, 1313-1317, 2005.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, ISBN 0-7484-0674-3, 1997.

WATANABE, A. List of algal strains in collection at the Institute of Applied Microbiology University of Tokyo. J Gen Appl Microbiol. 6, 1-4, 1960.

WATANABE, Y.; SAIKI. Development of a photobioreactor incorporating *Chlorella* sp. for removal of CO₂ in stack gas. Energy Convers. Management, 38, 499-503, 1997.

YANAGI, M.; WATANABE, Y.; SAIKI, H. CO₂ fixation by *Chlorella* sp. HA-1 and its utilization. Energ. Convers. Manage. 36, 713-716, 1995.

YOSHIHARA, K.; NAGASE, H.; EGUSHI, K.; HIRATA, K. Biological elimination of nitric oxide and carbon dioxide from flue gas by marine microalga NOA-113 cultivated in a long tubular photobioreactor. Journal of Fermentation and Bioengineering, 82 (4), 351-354, 1996.

YUN, Y. S.; LEE, S. B.; PARK, J. M.; LEE, C.; YANG, J. W. Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients. J Chem Tech Biotechnol. 69, 451-455, 1997.

ZARROUK, C. Contribution a letude dune cyanophycee: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* geitler. Ph.D. Thesis, University of Paris, 1966.

ZEILER, K.; HEACOX, D.; TOON, S.; KADAM, K.; BROWN, L. The Use of Microalgae for Assimilation and Utilization of Carbon Dioxide from Fossil Fuel-fired Power Plant Flue Gas. Energy Conversion Management, 36, 707-71, 1995.

5.2 CULTIVO DAS MICROALGAS *Spirulina* sp. E *Scenedesmus obliquus* EM FOTOBIOREACTORES TUBULARES EM SÉRIE COM ÓXIDO NÍTRICO E DIÓXIDO DE ENXOFRE

CULTIVO DAS MICROALGAS *Spirulina* sp. E *Scenedesmus obliquus* EM FOTOBIOREATORES TUBULARES EM SÉRIE COM ÓXIDO NÍTRICO E DIÓXIDO DE ENXOFRE

Elisangela Martha Radmann e Jorge Alberto Vieira Costa

Laboratório de Engenharia Bioquímica, Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Caixa Postal 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil. Fax: +55-53-3233 8745. E-mail: dqmjorge@furg.br

RESUMO

Microrganismos fotossintéticos, como microalgas, têm sido alvo de vários estudos visando, além da utilização como alimento, a captura e utilização de CO₂ atmosférico contribuindo na redução do aquecimento global. O objetivo deste trabalho foi estudar a influência dos gases NO e SO₂ no cultivo das microalgas *Spirulina* sp. LEB-18 e *Scenedesmus obliquus* em um sistema de fotobiorreatores em série para biofixação de CO₂. Foram utilizadas diferentes concentrações de CO₂ (0, 6 e 12%), SO₂ (0, 30 e 60 ppm) e NO (0, 50 e 100 ppm), e diferentes temperaturas (30, 32,5 e 35°C). A concentração celular máxima alcançada para *Spirulina* sp. LEB-18 e *S. obliquus* foi 3,29 e 1,33 g.L⁻¹, respectivamente, quando submetidas à 12% de CO₂. A fixação diária máxima de CO₂ foi 35,87 e 28,11%, respectivamente, para *Spirulina* sp. LEB-18 e *S. obliquus*, quando cultivadas à 6% de CO₂. Os gases SO₂ e NO não apresentaram influência significativa (p>0,10) nos parâmetros cinéticos de fixação estudados. Os resultados mostraram que é possível a biofixação de CO₂ por microalgas utilizando CO₂ direto do gás de combustão, e, além disso, os gases SO₂ e NO podem ser utilizados como nutriente para o crescimento das microalgas.

PALAVRAS-CHAVE: dióxido de carbono, dióxido de enxofre, microalgas, óxido nítrico, *Scenedesmus*, *Spirulina*.

ABSTRACT

Photosynthetic microorganisms as microalgae have been the target of several studies, besides their application as food, in the capture and utilization of atmospheric CO₂, contributing for the global warm reduction. The aim of this work was to study the influence of NO and SO₂ in the culture of the microalgae *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* in a serial photobioreactors system for CO₂ biofixation. Different concentration of CO₂ (0, 6 e 12%), SO₂ (0, 30 e 60 ppm) e NO (0, 50 e 100 ppm), and different temperatures (30, 32,5 e 35°C). The maximum cell concentration of *Spirulina* sp. and *S. obliquus* was 3,29g.L⁻¹ and 1,33 g.L⁻¹, respectively, when exposed to CO₂ 12%. The daily maximum CO₂ fixation 35,87% and 28,11% respectively for *Spirulina* sp and *S. obliquus* when cultivated at CO₂ 6%. SO₂ and NO addition did not present significance influence (p>0,10) in the fixation kinetics parameters. The results showed that it is possible that the CO₂ biofixation by microalgae, using the CO₂ from de flue gas, besides, the gases SO₂ and NO can be used as a nutrient source.

KEY WORDS: carbon dioxide, sulphur dioxide, microalgae, nitric oxide, *Scenedesmus obliquus*, *Spirulina*.

1 INTRODUÇÃO

Diariamente, vários gases são jogados na atmosfera de forma contínua, por fontes naturais e antrópicas. O acúmulo desses gases na atmosfera conduz a mecanismos complexos de reações químicas e fotoquímicas para a formação de outros gases. Nos últimos anos a emissão de CO_2 na atmosfera aumentou de 280 ppm, desde o período antecedente a Revolução Industrial, para cerca de 380 ppm (SIEGENTHALER et al., 2005). Cerca de 22% do CO_2 encontrado na atmosfera é emitido por plantas de energia térmica. Os efeitos das mudanças climáticas já podem ser sentidos em vários lugares do mundo, em especial na Europa.

O uso de microrganismos fotossintéticos para fixar CO_2 e produzir compostos químicos de interesse têm sido alvo de estudos. As microalgas apresentam maior eficiência fotossintética que os vegetais superiores e podem ser cultivadas em meio salino simples; além disso, são eficientes fixadoras de CO_2 (BROWN & ZEILER, 1993). Segundo ZASLAVSKAIA et al. (2001) microrganismos fotossintéticos como algas e cianobactérias presentes nos ambientes aquático são responsáveis por uma parcela substancial da produção de O_2 e fixação de CO_2 . A biomassa microalgal produzida pode ser potencialmente utilizada para alimentação humana, ração animal e transformada em bioprodutos e biocombustíveis. Fatores como SO_x e NO_x produzidos durante a queima de combustíveis fósseis, podem interferir no processo direto de biofixação de CO_2 por microalgas, utilizando CO_2 direto do gás de combustão, assim como altas temperaturas, elevadas concentrações de CO_2 e material particulado (em especial cinzas).

A queima de combustíveis fósseis com elevados teores de enxofre para produção de energia é reconhecida como a principal fonte de emissão de SO_2 na atmosfera (LI & SADAKATA, 1999). A atmosfera em torno de termelétricas a carvão é carregada de material particulado, óxidos de enxofre e nitrogênio. Estes dois últimos são os agentes que contribuem para a formação da chuva ácida. A chuva ácida ocorre quando substâncias como o dióxido de enxofre (SO_2) e óxidos de nitrogênio (NO_x) reagem quimicamente com o ar e a água, na presença da luz solar, formando ácido sulfúrico (H_2SO_4) e ácido nítrico (HNO_3), que são solubilizados da atmosfera pela chuva.

Os problemas freqüentemente associados à queima de carvões minerais referem-se principalmente à poluição ambiental. O carvão mineral constitui-se em importante fonte da matriz energética mundial e apresenta-se como alternativa viável para suprir as crescentes demandas no setor energético brasileiro.

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência dos gases NO e SO₂ no cultivo das microalgas *Spirulina* sp. LEB-18 e *Scenedesmus obliquus* LEB-22, selecionadas no artigo 1 (seleção de microalgas para biofixação de gás carbônico), em um sistema de fotobiorreatores em série para biofixação de CO₂.

2 MATERIAL E MÉTODOS

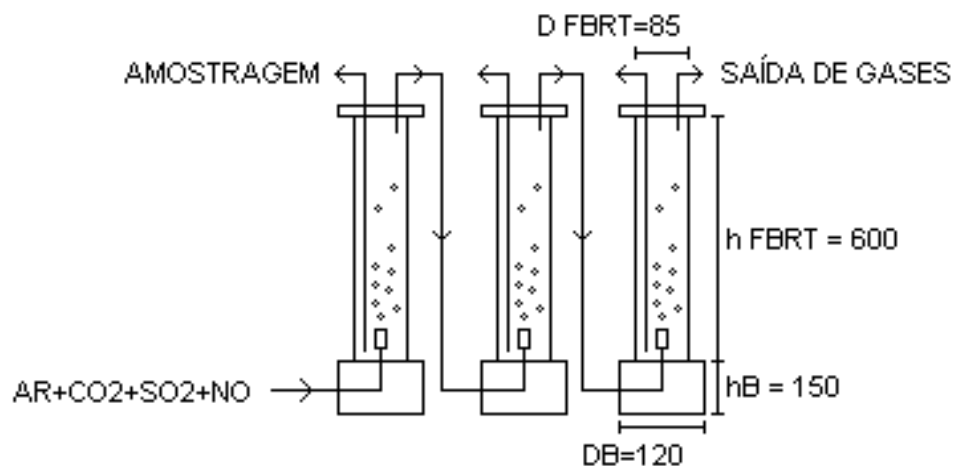
2.1 Microrganismos e meio de cultivo

As microalgas utilizadas no estudo foram *Spirulina* sp. LEB-18 (COSTA et al., 2006) e *Scenedesmus obliquus* LEB-22 (MORAIS & COSTA, 2007a), mantidas e cultivadas em meio Zarrouk modificado (ZARROUK, 1966), onde a fonte de carbono (bicarbonato de sódio) foi substituída por CO₂ (MORAIS & COSTA, 2007b), e meio MC (WATANABE, 1960), respectivamente. Os inóculos foram adaptados a 1% (v/v) de CO₂ durante 7d.

2.2 Condições de cultivo

Os cultivos foram realizados em um sistema de fotobiorreatores fechados em série do tipo tubulares (FBRT) de 2 L (volume útil de 1,8 L), conforme mostra Figura 1, com fotoperíodo de 12 h claro/escuro (REICHERT et al., 2006) durante 20 d. A concentração inicial dos cultivos foi 0,15 g.L⁻¹ (COLLA et al. 2007).

A aeração foi realizada através de ar comprimido misturado aos gases CO₂, SO₂ e NO dispostos em cilindros industriais. A vazão de entrada da mistura nos cultivos foi 540 mL.min⁻¹ durante o período claro, controlado através de válvulas solenóides. A iluminância de 3200 Lux foi fornecida aos cultivos através de lâmpadas fluorescentes de 40 W, tipo luz do dia. A aeração dos ensaios com ausência de CO₂, conforme planejamento experimental 2⁴⁻¹_{IV} proposto, passou por uma coluna de NaOH 1N para retenção do CO₂ do ar (0,038%).



D_{FBRT} : diâmetro do fotobiorreator; h_{FBRT} : altura do fotobiorreator; D_B : diâmetro da base; h_B : altura da base.

Figura 1 Esquema do cultivo em fotobiorreatores tubulares em série. Medidas em mm.

2.3 Determinações analíticas

Diariamente as amostras foram coletadas assepticamente para determinação da concentração celular, calculada através da densidade óptica a 670 nm em espectrofotômetro FEMTO modelo Plus 700 (COLLA et al., 2007) com curva de calibração relacionando densidade óptica e peso seco de biomassa para cada microalga (RADMANN et al., 2007). Também foi realizada a medição do pH a cada 24h através de pHmetro digital (Quimis Q400H, Brasil).

Foi realizada análise elementar na biomassa microalgal obtida e os teores de carbono (%) foram utilizados para o cálculo da biofixação de CO_2 pelas microalgas. A análise foi realizada em analisador elementar CNHS (Perkin Elmer 2400, USA) em duplicata. A calibração do equipamento foi realizada utilizando o padrão certificado cistina (Perkin Elmer, EUA). Os resultados de recuperação da cistina lida como amostra, foram de 100% para o carbono.

2.4 Delineamento experimental e análise estatística

Foi realizado um delineamento experimental exploratório 2^{4-1}_{IV} com triplicata no ponto central, totalizando em 11 ensaios, onde foram comparadas as respostas velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), concentração celular

máxima (X_{max}), produtividade máxima (P_{max}), tempo de geração (t_g) e a capacidade de fixação de CO_2 pelas microalgas (FA e FD), quando expostas a diferentes concentrações de CO_2 (0, 6 a 12%), SO_2 (0, 30 a 60 ppm) e NO (0, 50 a 100 ppm), e diferentes níveis de temperaturas (30, 32,5 e 35°C), Tabela 1.

A μ_{max} foi obtida por regressão exponencial na fase logarítmica de multiplicação celular. A produtividade (P , $g.L.d^{-1}$) foi calculada segundo a equação $P=(X-X_0)/(t-t_0)$, onde X ($g.L^{-1}$) é a concentração celular final, X_0 ($g.L^{-1}$) é a concentração celular inicial do cultivo, t (d) é o tempo final e t_0 é o tempo inicial do cultivo. Foi calculado o acúmulo de CO_2 fixado (FA, g CO_2 , segundo a equação $FA=(X_t-X_0)*m_{cbm}*V_{FBR}*(m_{CO_2}/m_C)$, onde, X_t ($g.L^{-1}$) é a concentração celular no tempo t (d), X_0 ($g.L^{-1}$) a concentração celular no tempo t_0 , m_{cbm} ($g C.g^{-1}$ amostra) é a fração mássica de carbono determinada na biomassa microalgal, V_{FBR} (L) é o volume de meio no fotobiorreator, m_{CO_2} ($g.mol^{-1}$) e m_C são as massas molares do dióxido de carbono e do carbono, respectivamente. A fixação diária de CO_2 (FD, g CO_2 fixado. $g^{-1} CO_2$ injetado por d^{-1}) foi calculada através da equação $FD=(FA_{(t+1)}-FA_t)/m_{id}$, onde $FA_{(t+1)}$ é o acúmulo de CO_2 fixado no tempo $t+1$ (d), FA_t é o acúmulo de CO_2 no tempo t (d), m_{id} (g CO_2) é a massa de CO_2 injetada diariamente. A fixação diária máxima (FD_{max}) é o máximo valor de fixação diária alcançado no cultivo (MORAIS & COSTA, 2007b).

As repostas cinéticas de fixação obtidas a partir do delineamento experimental exploratório 2^{4-1}_{IV} com triplicata no ponto central, para as microalgas *Spirulina* sp. LEB-18 e *S. obliquus* LEB-22, foram avaliados através de Análise de Variância (ANOVA), com nível de significância de 90% ($p \leq 0,10$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 apresenta as curvas de crescimento celular de *Spirulina* sp. (a) e *S. obliquus* (b) ao longo do tempo de cultivo, correspondentes aos ensaios 5 (30°C; 0% CO_2 ; 60 ppm SO_2 ; 100 ppm NO), 8 (35°C; 12% CO_2 ; 60 ppm SO_2 ; 100 ppm NO) e média entre os 3 pontos centrais do planejamento proposto (32,5°C; 6% CO_2 ; 30 ppm SO_2 ; 50 ppm NO). Cultivos com 12% de CO_2 apresentaram crescimento por cerca de 20 d e alcançaram maiores concentrações celulares ($3,29 \pm 0,10$ e $1,33 \pm 0,08 g.L^{-1}$) comparadas àquelas em cultivos com 0 e 6%, que atingiram máximos de 0,69 a 2,02 $g.L^{-1}$, respectivamente. A adição de 60 ppm de SO_2 e 100 ppm de NO (ensaio 8), além de não inibir o crescimento de nenhuma das microalgas, apresentou concentração

celular máxima de $1,99 \pm 0,04$ e $0,54 \pm 0,11$ g.L⁻¹ para *Spirulina* sp. e *S. obliquus*, respectivamente. YOSHIHARA et al. (1996) adicionaram 100 ppm de NO ao cultivo da microalga NOA-113 e esta alcançou 2,50 g.L⁻¹. Já YANAGI et al. (1995), ao adicionar 100 ppm de NO ao cultivo de *Chlorella* sp. HA-1, obtiveram concentração celular máxima de 0,40 g.L⁻¹. KURANO et al. (1995) obtiveram 1,40 g.L⁻¹ para microalga *Galdiera partita* cultivada em meio contendo 50 ppm de SO₂.

A produtividade máxima (Tabelas 1 e 2) foi alcançada nos ensaios Sp7 ($0,16 \pm 0,01$ g.L⁻¹.d⁻¹) e Sc7 ($0,25 \pm 0,06$ g.L⁻¹.d⁻¹), ambos submetidos a 12% de CO₂. Estes resultados mostram que a adição de 12% de CO₂, as microalgas apresentam maiores produtividades. LEE et al. (2002) estudaram a microalga *Chlorella* sp. KR-1, utilizando 15% (v/v) de CO₂ e obtiveram 1,66 g.L⁻¹.dia⁻¹ para produtividade.

O tempo de geração das microalgas variou bastante entre os ensaios, ficando entre 3,66 e 16,67 d. À medida que a velocidade de duplicação da célula aumenta, o tempo de geração diminui, viabilizando economicamente o cultivo. Assim, menores tempos de geração são esperados, com a duplicação da biomassa em um curto período de tempo, comparando-as aos vegetais superiores (HENRIKSON, 1994).

A adição dos gases SO₂ e NO, não inibiu o crescimento das microalgas, conforme mostram os resultados, podendo estes gases ser utilizados como nutriente para o crescimento de microalgas. Sendo assim, verifica-se que é possível a biofixação de CO₂ por microalgas utilizando CO₂ do gás de combustão.

Para os ensaios de *Spirulina* sp. e *S. obliquus* o pH manteve-se entre 7,0 e 11,0 ao longo dos 20 d de cultivo. O pH interfere em todas as reações químicas e bioquímicas, além de interferir nas conformações especiais das moléculas. O cultivo de *Spirulina* requer meio alcalino, pH entre 8,3 e 11,0 (ZARROUK, 1966), com grande disponibilidade de carbonato ou bicarbonato de sódio (COSTA et al., 2002). Com isso, é possível afirmar que o pH não causou inibição do crescimento de *Spirulina* sp. Segundo AZOV (1982) a microalga *Scenedesmus obliquus* apresenta maiores concentrações celulares em pH em torno de 7,5.

LEE et al. (2002) estudaram o efeito de diferentes concentrações de NO (0, 100 e 300 ppm) e SO₂ (0, 60, 100 e 150 ppm), com adição de 15% de CO₂ no cultivo de *Chlorella* sp. KR-1 e verificaram que nas maiores concentrações (150 ppm

de SO₂ e 300 ppm de NO) o crescimento foi inibido, com queda do pH (< 5,0), e nas demais concentrações o pH manteve-se em torno de 7,0. BROWN (1996) adicionou 150 ppm de NO e 200 ppm de SO₂ no cultivo de *Monoraphidium minutum* contendo 13,6% de CO₂ e o pH se manteve em torno de 7,0 com crescimento logarítmico ao longo dos 4 d de cultivo.

Tabela 1 Concentração celular máxima (X_{max} , g.L⁻¹) produtividade máxima (P_{max} , g.L⁻¹.d⁻¹), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max} , d⁻¹) e tempo de geração (tg, d) obtidos para microalga *Spirulina* sp.

Ensaio	Variáveis codificadas				Respostas			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X _{max}	P _{max}	μ_{max}	tg
Sp1	-1	-1	-1	-1	1,57±0,76	0,10±0,03	0,08±0,02	8,91±2,12
Sp2	+1	-1	-1	+1	1,16±0,52	0,13±0,02	0,19±0,14	4,88±3,50
Sp3	-1	+1	-1	+1	2,06±0,17	0,12±0,01	0,14±0,003	5,27±0,15
Sp4	+1	+1	-1	-1	2,04±0,31	0,10±0,01	0,17±0,02	4,11±0,39
Sp5	-1	-1	+1	+1	2,01±0,46	0,12±0,02	0,14±0,04	5,08±1,22
Sp6	+1	-1	+1	-1	1,20±0,65	0,14±0,04	0,12±0,04	5,98±1,55
Sp7	-1	+1	+1	-1	3,29±0,10	0,16±0,01	0,11±0,01	6,46±0,65
Sp8	+1	+1	+1	+1	1,99±0,04	0,15±0,01	0,14±0,06	5,42±1,87
Sp9	0	0	0	0	1,62±0,20	0,09±0,01	0,15±0,02	4,85±0,72
Sp10	0	0	0	0	1,64±0,09	0,09±0,01	0,15±0,01	4,59±0,42
Sp11	0	0	0	0	2,02±0,15	0,11±0,02	0,16±0,06	4,74±1,98

X₁: Temperatura (30; 32,5 e 35°C); X₂: Concentração de CO₂ (0, 6 e 12%); X₃: Concentração de SO₂ (0, 30 e 60ppm); X₄: Concentração de NO (0, 50 e 100ppm). Todos valores apresentados são a média± desvio padrão dos 3 fotobiorreatores da série.

Tabela 2 Concentração celular máxima (X_{\max} , g.L⁻¹) produtividade máxima (P_{\max} , g.L⁻¹.d⁻¹), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max} , d⁻¹) e tempo de geração (tg, d) obtidos para microalga *Scenedesmus obliquus*.

Ensaio	Variáveis codificadas				Respostas			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X _{max}	P _{max}	μ_{\max}	tg
Sc1	-1	-1	-1	-1	0,69±0,30	0,06±0,05	0,08±0,03	9,21±3,40
Sc2	+1	-1	-1	+1	0,18±0,01	0,01±0,01	0,04±0,00	16,67±1,02
Sc3	-1	+1	-1	+1	0,90±0,14	0,09±0,06	0,14±0,01	6,60±0,39
Sc4	+1	+1	-1	-1	0,59±0,11	0,04±0,02	0,13±0,01	5,27±0,22
Sc5	-1	-1	+1	+1	0,63±0,20	0,04±0,02	0,07±0,04	13,50±9,98
Sc6	+1	-1	+1	-1	0,36±0,27	0,03±0,01	0,06±0,04	13,63±8,73
Sc7	-1	+1	+1	-1	1,33±0,08	0,25±0,06	0,16±0,02	4,32±0,53
Sc8	+1	+1	+1	+1	0,54±0,11	0,05±0,02	0,17±0,03	4,19±0,68
Sc9	0	0	0	0	1,08±0,25	0,08±0,03	0,19±0,11	3,66±0,00
Sc10	0	0	0	0	0,82±0,25	0,05±0,01	0,18±0,08	4,62±2,61
Sc11	0	0	0	0	0,91±0,40	0,08±0,05	0,15±0,08	5,69±2,65

X₁: Temperatura (30; 32,5 e 35°C); X₂: Concentração de CO₂ (0, 6 e 12%); X₃: Concentração de SO₂ (0, 30 e 60ppm); X₄: Concentração de NO (0, 50 e 100ppm). Todos valores apresentados são a média ± desvio padrão dos 3 fotobiorreatores da série.

A aeração com SO₂ e NO foi realizada após a fase de adaptação, aproximadamente 4 d após a inoculação. Ensaio preliminares mostraram que quando a injeção de SO₂ e NO aos cultivos foi realizada neste tempo, as microalgas *Spirulina* sp. LEB-18 e *S. obliquus* alcançaram maiores concentrações de biomassa. Segundo YOSHIHARA et al. (1996) quando a adição de NO ao cultivo da microalga marinha NOA-113 se deu no tempo zero, o seu crescimento foi inibido.

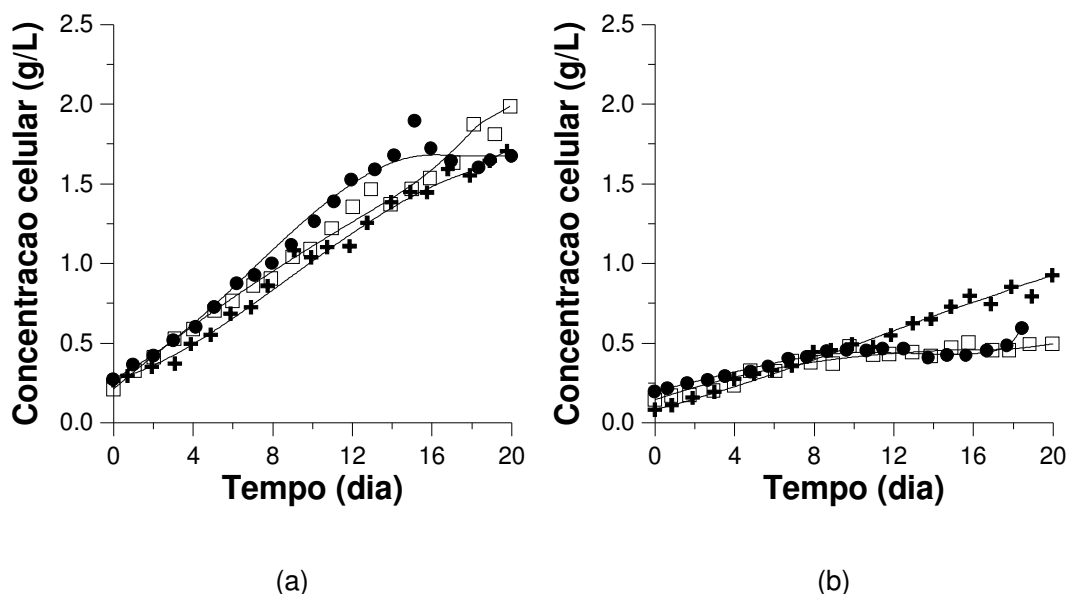


Figura 2 Curvas de crescimento para *Spirulina* sp. (a) e *Scenedesmus obliquus* (b) cultivadas em fotobiorreatores em série: (●) 30°C, 0% CO₂, 60 ppm SO₂ e 100 ppm NO; (+) 35°C, 12% CO₂, 60 ppm SO₂ e 100 ppm NO; (□) 32,5°C, 6 % CO₂, 30 ppm SO₂ e 50 ppm NO.

Através da análise estatística (Tabela 3) verificou-se que o SO₂ não apresentou influência significativa ($p > 0,10$) em nenhum dos parâmetros cinéticos avaliados para ambas microalgas. No entanto, a adição de NO aumentou em 0,03 d⁻¹ ($p = 0,083$) a velocidade específica máxima de crescimento para a *Spirulina* sp. Já para *S. obliquus* o NO não apresentou influência significativa ($p = 0,854$). A temperatura e o CO₂ influenciaram significativamente todos os parâmetros cinéticos de biofixação. Ambas microalgas apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) na produtividade máxima em relação à temperatura. Estes resultados estão de acordo aos encontrados por COSTA et al. (2003), onde o cultivo de *Spirulina platensis* a 30°C conduziu a melhores resultados de concentração de biomassa e produtividade que a 35°C. Segundo FOX (1996), a temperatura ótima para cultivo de microalgas está entre 35 e 37°C.

A *Spirulina* sp. e *S. obliquus* apresentaram aumento significativo na concentração celular máxima em 0,80 e 0,37 g.L⁻¹ ($p < 0,01$), respectivamente, em relação a concentração de CO₂ no meio de cultivo. O CO₂ é considerado um nutriente

essencial no cultivo de microalgas (TSUZUKI et al.,1990), e a baixa disponibilidade de carbono pode causar limitação do crescimento microalgal. A adição de CO₂ no meio de cultivo pode aumentar até 7 vezes a produtividade (ISHIDA et al., 2000).

A adição de NO e SO₂ aos cultivos não influenciou significativamente ($p>0,10$) no crescimento das microalgas estudadas. MATSUMOTO et al. (1996) também verificaram que o SO₂ e NO não influenciaram no crescimento das microalgas *Nannochloropsis salina* e *Phaeodactylum tricornutum*. O NO foi absorvido no meio e transformado em NO₂⁻ e utilizado na forma de nitrogênio.

Tabela 3 Efeitos e significância dos fatores estudados sobre os parâmetros de crescimento avaliados para as microalgas *Spirulina* sp. e *S. obliquus*.

Fatores	X _{máx} (g.L ⁻¹)		P _{máx} (g.L ⁻¹ .dia ⁻¹)		μ _{máx} (dia ⁻¹)		tg (dia)	
	Efeito	p	Efeito	p	Efeito	p	Efeito	p
<i>Spirulina</i> sp.								
Temp	-0,696*	0,018	0,004	0,837	0,038*	0,056	-1,330	0,177
CO ₂	0,800*	0,010	0,007	0,718	0,005	0,755	-0,895	0,342
SO ₂	0,352	0,156	0,028	0,166	-0,017	0,343	-0,056	0,950
NO	-0,281	0,242	0,006	0,738	0,034	0,083	-1,210	0,214
<i>Scenedesmus obliquus</i>								
Temp	-0,480*	0,047	-0,077*	0,044	-0,130	0,680	1,533	0,531
CO ₂	0,360	0,111	0,075*	0,048	0,085*	0,029	-8,159*	0,124
SO ₂	0,139	0,498	0,042	0,209	0,018	0,564	-0,531	0,826
NO	-0,170	0,411	-0,044	0,191	-0,006	0,854	2,133	0,392

* Efeito significativo ao nível de 90% de confiança.

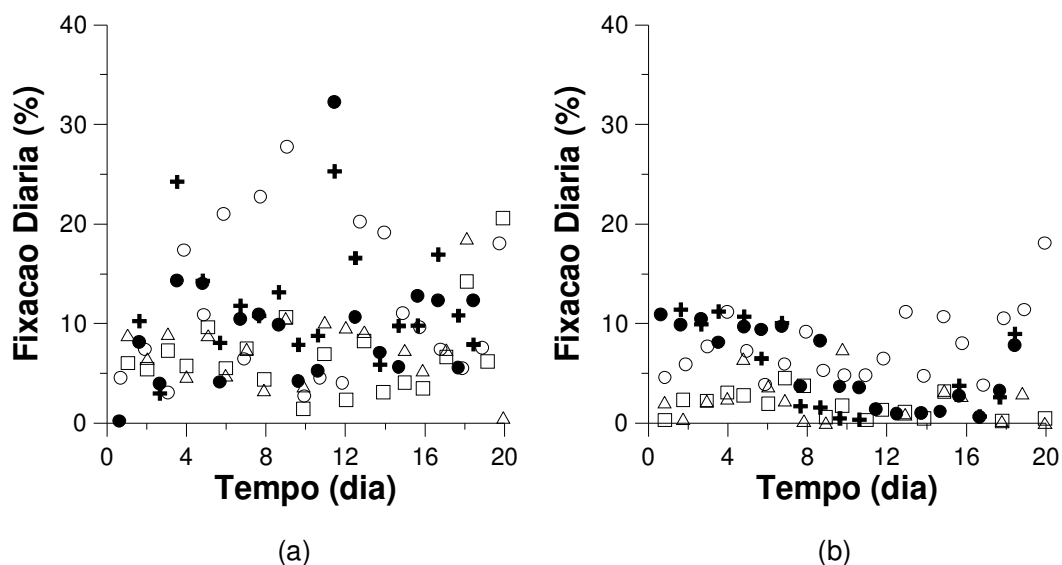


Figura 3 Curvas de fixação diária de CO_2 ao longo do tempo para *Spirulina* sp. (a) e *Scenedesmus obliquus* (b): (●) ensaio 3, (□) ensaio 4, (+) ensaio 7, (△) ensaio 8, (○) média entre os ensaios 9, 10 e 11.

A Figura 3 apresenta a fixação diária (FD) de CO_2 ao longo do tempo de cultivo para as microalgas *Spirulina* sp. e *S. obliquus*. A FD máxima alcançada pelas microalgas foi, respectivamente, 32,26 % e 35,87% nos ensaios Sp3 e Sp11 (12 e 6% de CO_2 , respectivamente), 12,86 e 28,11% nos ensaios Sp7 e Sc10 (12 e 6% de CO_2 , respectivamente). Para os demais ensaios a FD máxima variou de 10,43 a 27,93%. Estes resultados estão de acordo aos encontrados por MORAIS & COSTA (2007b), onde a *Spirulina* sp. apresentou FD máxima 53,29% e 45,61%, para os ensaios realizados com 6% e 12% de CO_2 , respectivamente. *S. obliquus* apresentou menores taxas de fixação, com máximos de 28,08% e 13,56% nos cultivos em série realizados com adição de 6% e 12% de CO_2 , respectivamente. A adição de NO e SO_2 nos cultivos parece ter diminuído a taxa de fixação de CO_2 . HANAGATA et al. (1992) selecionaram dentre 5 cepas de microalgas, a *Scenedesmus* e *Chlorella*, pois estas cresceram bem em até 50% de CO_2 . Estudos realizados por KARUBE (1995) relacionados à taxa fixação de CO_2 pela microalga *Scenedesmus* sp. indicam que esta pode crescer em concentrações de até 20% CO_2 .

4 CONCLUSÕES

Os gases SO₂ e NO não apresentaram influência significativa ($p > 0,10$) nos parâmetros cinéticos de fixação estudados, exceto na resposta velocidade específica máxima de crescimento para a *Spirulina* sp. A concentração celular máxima alcançada para *Spirulina* sp. e *S. obliquus* foi 3,29 e 1,33 g.L⁻¹, respectivamente, quando submetidas à 12% de CO₂. A fixação diária máxima de CO₂ foi 35,87 e 28,11%, para *Spirulina* sp. e *S. obliquus*, respectivamente, quando cultivadas à 6% de CO₂. Os resultados mostraram que, além dos gases SO₂ e NO poderem ser utilizados como nutriente para o crescimento das microalgas, é possível a biofixação de CO₂ por microalgas utilizando CO₂ direto do gás de combustão.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a ELETROBRÁS – Centrais Elétricas Brasileiras S.A. e CGTEE – Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

6 REFERÊNCIAS

- AZOV, Y. Effect of pH on inorganic carbon uptake in algal cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 43 (6), 1300-1306, 1982.
- BROWN, L.M.. Uptake of carbon dioxide from flue gas by microalgae. *Energy Conversion Management*, 37, 1363 – 1367, 1996.
- BROWN, M. L. & ZEILER, K. G. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. *Energy Conversion Management*, 34, 1005 - 1013, 1993.
- 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*, 98, 1489-1493, 2007.
- COSTA, J. A. V., COLLA, L. M., DUARTE FILHO, P. *Spirulina platensis* growth in open raceway ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal íons. *Z Naturforsch.* 58c, 76-80, 2003.

COSTA, J. A. V., COLLA, L. M., DUARTE FILHO, P., KABKE, K., WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. World J Microb Biot. 18, 603-607, 2002.

COSTA, J.A.V., LINDE, G.A., ATALA, D.I.P., MIBIELI, G.M.; KRÜGER, R.T. Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. World Journal of Microbiology and Biotechnology 16, 15-18, 2000.

HANAGATA, N., TAKEUCHI, T., FUKUJU, Y., BARNES, D. J., KARUBE, I. Tolerance of microalgae to high CO₂ and high temperature. Phytochemistry. 31, 3345 – 3348, 1992.

HENRIKSON R. Microalga *Spirulina*: Superalimento del futuro. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, ISBN: 84-7953-047-2, 1994.

ISHIDA, Y.; HIRAGUSHI, N.; KITAGUCHI, H.; MITSUTANI, A., NAGAI, S., YOSHIMURA, M. A Highly CO₂-tolerant diatom *Thalassiosira weissflogii* H1, enriched from coastal sea, and its fatty acid composition. Fisheries Science, 66, 655-659, 2000.

KARUBE, I., MATSUKAWA, R., CHIHARA, M. Biological CO₂ fixation by microalgae. Ionics, 21, 9 – 12, 1995.

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

LEE, J-S.; KIM, D-K.; LEE, J-P.; PARK, S-C; KOH, J-H; CHO, H-S; KIM, S-W. Effects of SO₂ and NO on growth of *Chlorella* sp. KR-1. Bioresource Technology, 82, 1-4, 2002.

LI, Y., NISHIOKA, M., AND SADAKAT, A. M. High Calcium Utilization and Gypsum Formation for Dry Desulfurization Process. Energy & Fuels, 13, 1015-1020, 1999.

MATSUMOTO, H., HAMASAKI, A, and SIOJI, N. Influence of CO₂, SO₂ and NO in Flue gas microalgae productivity. Journal of Chemical Engineering of Japan. 620-624, 1996.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. Energy Conversion & Management (2007a): In Press.

MORAIS, M.G., COSTA, J.A.V., Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. LEB-18 and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor, Journal of Biotechnology (2007b): In Press.

RADMANN, E. M.; REINEHR, C. O., COSTA, J. A. V. Otimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. Aquaculture, 265, 118-126, 2007.

REICHERT, C. C., REINEHR, C. O., COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. Braz J Chem Eng. 23, 23-28, 2006.

SIEGENTHALER, U., STOCKER, T. F., MONNIN, E., LÜTHI, D., SCHWANDER, J., STAUFFER, B., RAYNAUD, D., BARNOLA, J. M., FISCHER, H., DELMONTT, V. M., JOUZEL J. Stable carbon cycle-climate relationship during the late Pleistocene. Science, 310, 1313 – 131, 2005.

TSUZUKI, M., OHNUMA, E., SATO, N., TAKAKU, T., KAWAGUCHI, A. Effects of CO₂ concentration during growth of fatty acid composition in microalgae. Plant Physiol. 93, 851-856, 1990.

VONSHAK, A., ABELIOVICH, A., BOUSSIBA, A., ARAD, S., RICHMOND, A. Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. Biomass. 2, 175 – 185, 1982.

WATANABE, A. List of algal strains in collection at the Institute of Applied Microbiology University of Tokyo. J Gen Appl Microbiol. 6, 1 – 4, 1960.

YANAGI, M.; WATANABE, Y.; SAIKI, H. CO₂ fixation by *Chlorella* sp. HA-1 and its utilization. Energy Conversion & Management, 36, 713-716, 1995.

YOSHIHARA, K.; NAGASE, H.; EGUSHI, K.; HIRATA, K. Biological elimination of nitric oxide and carbon dioxide from flue gas by marine microalga NOA-113 cultivated in a long tubular photobioreactor. Journal of Fermentation and Bioengineering, 82 (4), 351-354, 1996.

ZARROUK, C. Contribution a letude dune cyanophycee:. influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* geitler. Ph.D. Thesis, University of Paris, 1966.

ZASLAVSKAIA, L. A.; LIPPMEIER, J. C.; SHIH, C.; EHRHARDT, D.; GROSSMAN, A. R.; APT, K. E. Trophic conversion of an obligate photoautotrophic organism through metabolic engineering. *Science*, 292, 2073-2075, 2001.

**5.3 BIOFIXAÇÃO DE CO₂ POR MICROALGAS ISOLADAS DE LAGOAS PRÓXIMAS
A UMA PLANTA DE ENERGIA TÉRMICA A CARVÃO**

BIOFIXAÇÃO DE CO₂ POR MICROALGAS ISOLADAS DE LAGOAS PRÓXIMAS A UMA PLANTA DE ENERGIA TÉRMICA A CARVÃO

Elisangela Martha Radmann e Jorge Alberto Vieira Costa

Laboratório de Engenharia Bioquímica, Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Caixa Postal 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil. Fax: +55-53-3233 8745. E-mail: dqmjorge@furg.br

RESUMO

As microalgas vêm sendo estudadas visando sua adição em alimentos, na agricultura, no tratamento de águas residuais e em especial, na redução do dióxido de carbono da atmosfera, principal causador do aquecimento global. As termelétricas são responsáveis por 22% do CO₂ emitido na atmosfera. Contudo, microalgas nativas podem ser mais tolerantes aos gases de combustão emitidos da queima de combustíveis fósseis. No presente trabalho foram isoladas microalgas da lagoa de tratamento de efluentes de uma Usina Termelétrica, localizada no sul do Brasil, e identificadas como *Synechococcus nidulans* e *Chlorella vulgaris*. As microalgas isoladas foram cultivadas e comparadas com duas diferentes cepas de microalgas, *Spirulina* sp. e *Scenedesmus obliquus*, em relação a biofixação de CO₂. As microalgas foram expostas a 12% de CO₂, 60 ppm de SO₂ e 100 ppm de NO, simulando um gás de combustão de carvão. A *Chlorella vulgaris* apresentou comportamento semelhante a *Spirulina* sp., alcançando 13,43% de fixação diária máxima. Portanto, as microalgas com maior capacidade de fixação foram a *Chlorella vulgaris* e *Spirulina* sp., podendo estas ser cultivadas em plantas de energia elétrica para biofixar o CO₂ proveniente do gás de combustão de carvão e contribuir para redução do aquecimento global.

PALAVRAS-CHAVE: *Chlorella*, gás de combustão, *Scenedesmus*, *Spirulina*, *Synechococcus*.

ABSTRACT

Microalgae are being studied aiming their application in foods, agriculture, and wastewater treatment and, in special, for the atmospheric carbon dioxide reduction, main responsible for the global warm. Coal-fired power plants are responsible for 22% of the CO₂ emitted to the atmosphere. However, native microalgae can be more tolerant to the flue gas. In the present work the strains identified as *Synechococcus nidulans* and *Chlorella vulgaris* were isolated from a coal –fired power plant, located at the south of Brazil. The isolated strains were cultivated and their CO₂ biofixation was compared with *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus*. The microalgae were exposed to 12% CO₂, 60ppm SO₂ and 100ppm NO, simulating the flue gas. *C. vulgaris* showed similar behavior to that of *Spirulina* sp., reaching 13,43% of maximum daily fixation. Therefore, the microalgae with major fixation ability were *C. vulgaris* and *Spirulina* sp., being able to be cultivated for biofixation of CO₂ from flue gas in power plants and contribute for the global warm reduction.

KEY WORDS: *Chlorella*, flue gas, *Scenedesmus*, *Spirulina*, *Synechococcus*.

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de microalgas tem sido focado quanto à produção de biomassa tanto para uso na elaboração de alimentos quanto para a obtenção de compostos bioativos (GRIMA 2003; BOROWITZKA, 1999). O mercado de alimentos utilizando microalgas apresenta rápido desenvolvimento em diversos países como França, Estados Unidos, China e Tailândia (BECKER, 2004).

O aumento da concentração de CO₂ na atmosfera tem sensíveis conseqüências ambientais. Nos últimos anos a emissão de CO₂ na atmosfera aumentou de 280ppm (1800) para 380ppm (2004) (SIEGENTHALER et al., 2005), sendo cerca de 22% dessas emissões causadas por plantas de energia termelétrica. A mitigação deste cenário passa pelo desenvolvimento de processos limpos que resultem na captura e seqüestro de CO₂. Dentre as várias alternativas para captura e utilização de CO₂, uma abordagem particularmente interessante é o emprego de microalgas.

As microalgas *Anacystis*, *Botryococcus*, *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Emiliania*, *Monoraphidium*, *Rhodobacter*, *Scenedesmus*, *Spirulina*, *Synechococcus*, *Tetraselmis* e *Nanocloropsis* possuem potencial de fixar CO₂ em altas concentrações (CHANG & YANG, 2003). Além disso, as microalgas apresentam maior eficiência fotossintética que os vegetais superiores e podem ser cultivadas em meio salino simples (BROWN & ZEILER, 1993).

Na tentativa de se obter maior eficiência na biofixação de CO₂ por microalgas, surge a possibilidade de isolar microalgas provenientes de regiões próximas a plantas de energia termelétrica. Alguns pesquisadores acreditam que espécies de microalgas nativas sejam mais tolerantes a condições locais (BROWN et al., 1996; CHU et al., 1996). MORAIS & COSTA (2007a) isolaram as microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella kessleri*, de lagoas próximas de uma planta de energia térmica, e verificaram que estas apresentam crescimento quando cultivadas com 18% de CO₂.

O objetivo do presente trabalho foi isolar e selecionar microalgas de lagoas próximas à Usina Termelétrica Presidente Médici – UTPM em Candiota/RS e estudar a utilização de gases de combustão formados da geração termelétrica para o cultivo das microalgas, testando as tolerâncias aos gases NO e SO₂ e a biofixação de CO₂.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento das Microalgas

Foram coletadas amostras de água de lagoas de tratamento de efluente da Usina Termelétrica Presidente Médici – UTPM no extremo Sul do Brasil, latitude 24°36'13''S e longitude 52°32'43''W, e transportadas assepticamente ao Laboratório de Engenharia Bioquímica da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

As amostras foram inoculadas em tubos de ensaio, em fotobiorreatores fechados do tipo erlenmeyer e em fotobiorreatores abertos do tipo raceway. Os meios de cultivo como meio Zarrouk (ZARROUK, 1966), Bristol's modificado (WATANABE, 1960), MC (WATANABE, 1960) e BG-11 (RIPPKA et al., 1979). As amostras foram mantidas em câmara termostatzada a 30°C, com fotoperíodo 12h claro/escuro (REICHERT et al., 2006) e iluminância de 3200 Lux fornecida através de lâmpadas fluorescentes de 40 W tipo luz do dia.

Periodicamente as amostras foram observadas em microscópio ótico, até a detecção do crescimento de microalgas, sendo isoladas em placas de ELISA contendo 200µL de meio Zarrouk, MBM, MC ou BG-11, de acordo com o meio utilizado no inóculo inicial. Esta técnica de isolamento consiste em determinar a concentração da amostra com auxílio de câmara de contagem de microrganismos (Sedgewick-Rafter Cell S50) sob aumento de 100 vezes. A amostra foi diluída de forma que se obtivesse somente uma célula em 50µL de amostra adicionada a cada poço da placa de ELISA.

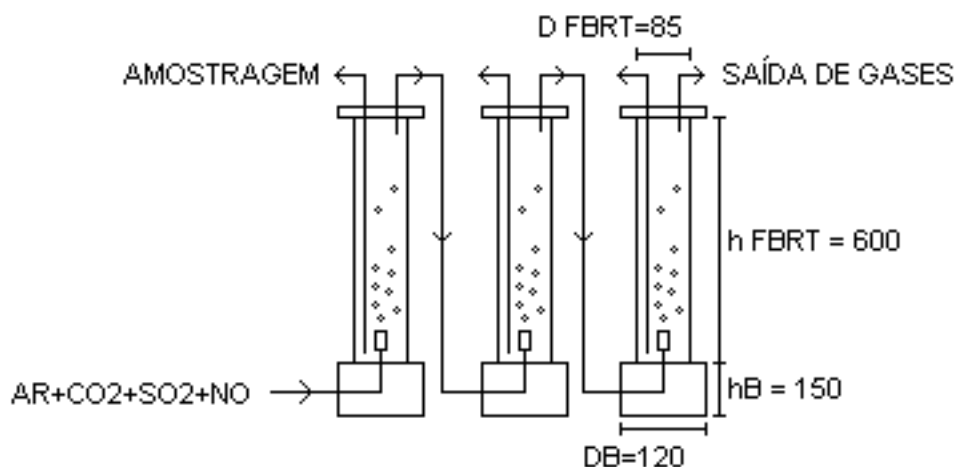
A identificação das microalgas foi realizada através de microscópio Axioscop 40 (Zeiss, Alemanha)– equipado com câmara clara, ocular de medição e equipamento de captura de imagem.

2.2 Condições de cultivo

As microalgas utilizadas neste estudo foram *Spirulina* sp. LEB-18 (COSTA et al., 2006), *Scenedesmus obliquus* LEB-22 (MORAIS & COSTA, 2007a), *Synechococcus nidulans* LEB-25 e *Chlorella vulgaris* LEB-106, isoladas de lagoas próximas a Usina Termelétrica Presidente Médici – UTPM no extremo Sul do Brasil, latitude 24°36'13''S e longitude 52°32'43''W.

As microalgas foram mantidas e cultivadas em meio BG-11 (RIPPKA et al., 1979) e Zarrouk (ZARROUK, 1966) modificado, onde a fonte de carbono (bicarbonato de sódio) foi substituída por CO_2 (MORAIS & COSTA, 2007b). Os inóculos foram previamente adaptados a 1% (v/v) de CO_2 durante 7 d. Foram realizados cultivos em um sistema de fotobiorreatores (FBRs) fechados em série do tipo tubulares de 2 L (volume útil de 1,8 L), conforme mostra a Figura 1, mantidos em câmara termostatazada a 30°C com fotoperíodo 12 h claro/escuro (REICHERT et al., 2006) durante 20 d. A concentração inicial dos cultivos foi $0,15 \text{ g.L}^{-1}$ (COLLA et al. 2007).

A aeração foi realizada através de ar comprimido misturado aos gases CO_2 (12% v/v), SO_2 (60 ppm) e NO (100 ppm) dispostos em cilindros industriais. A vazão de entrada da mistura nos cultivos foi 540 mL.min^{-1} durante o período claro, controlado através de válvulas solenóides. A iluminância foi 3200 Lux fornecida através de lâmpadas fluorescentes de 40 W, tipo luz do dia.



D_{FBRT} : diâmetro do fotobiorreator; h_{FBRT} : altura do fotobiorreator; D_{B} : diâmetro da base; h_{B} : altura da base.

Figura 1 Esquema do cultivo em fotobiorreatores tubulares em série. Medidas em mm.

2.3 Determinações analíticas

Diariamente as amostras foram coletadas assepticamente para determinação da concentração celular, calculada através da densidade óptica a 670 nm (COLLA et al., 2007) em espectrofotômetro FEMTO modelo Plus 700 com curva de

calibração relacionando densidade ótica e peso seco de biomassa para cada microalga (RADMANN et al., 2007). Também foi realizada a medição do pH a cada 24h através de pHmetro digital (Quimis Q400H, Brasil).

A cada 2 d foi determinada a alcalinidade dos ensaios, segundo método proposto por CARMOUZE (1994) a fim de calcular a quantidade de carbono inorgânico total disponível para a microalga. A alcalinidade foi determinada através do método de titulação com ácido clorídrico 0,1N (STANDART METHODS, 1998).

2.4 Análise elementar CNHS

Foi realizada análise elementar na biomassa microalgal obtida, e os teores de carbono (%) foram utilizados para o cálculo da biofixação de CO₂ pelas microalgas e também se determinou através desta análise a quantidade de nitrogênio, hidrogênio e enxofre na biomassa ao final de cada ensaio e dos seus respectivos inóculos. A análise foi realizada em analisador elementar CNHS (Perkin Elmer 2400, USA) em duplicata (MORAIS & COSTA, 2007b).

2.5 Delineamento experimental e Análise estatística

Foram realizados 4 ensaios em duplicata, comparando-se as respostas velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), concentração celular máxima (X_{max}), produtividade máxima (P_{max}) e a capacidade de fixação de CO₂ pelas microalgas (acúmulo de CO₂ fixado, FA e fixação diária de CO₂, FD).

A velocidade específica máxima de crescimento foi obtida por regressão exponencial na fase logarítmica de multiplicação. A Produtividade (P , g.L.d⁻¹) foi calculada segundo a equação $P=(X-X_0)/(t-t_0)$, onde X (g.L⁻¹) é a concentração celular final, X_0 (g.L⁻¹) é a concentração celular inicial do cultivo, t (d) é o tempo final e t_0 é o tempo inicial do cultivo. Foi calculado o acúmulo de CO₂ fixado (FA, g CO₂, segundo a equação $FA=(X_t-X_0)*m_{cbm}*V_{FBRT}*(m_{CO_2}/m_C)$, onde, X_t (g.L⁻¹) é a concentração celular no tempo t (d), X_0 (g.L⁻¹) a concentração celular no tempo t_0 , m_{cbm} (g C.g⁻¹ amostra) é a fração mássica de carbono determinada na biomassa microalgal, V_{FBRT} (L) é o volume de meio no fotobiorreator, m_{CO_2} (g.mol⁻¹) e m_C são as massas molares do dióxido de carbono e do carbono, respectivamente. Também foi calculada a fixação diária de CO₂ (FD, g CO₂ fixado. g⁻¹ CO₂ injetado.d⁻¹) através da equação $FD=(FA_{(t+1)}-FA_t)/m_{id}$, onde $FA_{(t+1)}$ é o acúmulo de CO₂ fixado no tempo $t+1$ (d), FA_t é o acúmulo de CO₂ no tempo t

(d), m_{id} (g CO₂) é a massa de CO₂ injetada diariamente. A fixação diária máxima (FD_{max}) é o máximo valor de fixação diária alcançado no cultivo (MORAIS & COSTA, 2007b).

As repostas cinéticas obtidas para as microalgas *Spirulina* sp. LEB-18, *Scenedesmus obliquus*, *Synechococcus nidulans* e *Chlorella vulgaris* foram avaliadas através de Análise de Variância (ANOVA), com nível de significância de 90% ($p \leq 0,10$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento de microalgas

Após o processo de isolamento das microalgas, em diferentes meios de cultivo e biorreatores, foram observados distintos microrganismos, dentre eles foram identificadas duas cepas de microalgas.

Uma delas tratava-se de uma cianobactéria, mantida em meio Zarrouk, e identificada como *Synechococcus nidulans* e o material presentemente identificado provem do plâncton de água doce, mas com elevada alcalinidade. A outra cepa foi identificada em amostra de água com meio BG-11, e tratava-se de uma chlorophyta que corresponde ao táxon *Chlorella vulgaris* Beij. var. *viridis* R. Chod., que é caracterizada pelo tipo de autósporos elípticos a arredondados com tamanhos diferentes.

As microalgas identificadas provêm de água com elevada alcalinidade e com pH em torno de 10,0, devido à presença de cinzas oriundas da combustão do carvão utilizado para geração de energia termelétrica.

3.2 Cultivo das microalgas isoladas

Através da Tabela 1, observa-se que a maior concentração celular foi obtida para a *Spirulina* sp. alcançando $1,59 \text{ g.L}^{-1} \pm 0,27$ ($p < 0,02$) para o terceiro fotobiorreator da série (FBRT 3). As máximas concentrações celulares para as microalgas *Scenedesmus obliquus* ($0,68 \text{ g.L}^{-1} \pm 0,12$, $p \geq 0,01$) e *Chlorella vulgaris* ($0,98 \text{ g.L}^{-1} \pm 0,12$, $p \geq 0,02$) foram alcançadas também para o FBRT 3. Resultados superiores a estes foram encontrados por SUNG et al. (1999) em estudo com *Chlorella* sp. KR-1,

onde apresentou maior concentração celular ($5,7 \text{ g.L}^{-1}$) em 6 d de cultivo com adição de 10% de CO_2 . YANAGI et al. (1995) encontraram resultados inferiores aos do presente trabalho, obtendo para *Chlorella* sp. HA-1 aproximadamente $0,40 \text{ g.L}^{-1}$ ao adicionar 10% de CO_2 , 50 ppm de SO_2 e 100 ppm de NO ao cultivo. Para *Synechococcus nidulans* a máxima concentração celular média foi alcançada para o FBRT 2 ($0,41 \text{ g.L}^{-1} \pm 0,09$, $p \geq 0,01$). Os resultados de concentração celular encontrados para a *Synechococcus nidulans*, cultivada com adição de 12% de CO_2 , 60 ppm de SO_2 , 100 ppm de NO a 30°C , são semelhantes aos encontrados por OHTAGUCHI et al. (1997), que obtiveram $0,31 \text{ g.L}^{-1}$ utilizando 6% de CO_2 nos cultivos de *Synechococcus leopoliensis* a 30°C . Já KAJIWARA et al. (1997) encontraram $0,85 \text{ g.L}^{-1}$ para *Synechococcus* PCC7942; enriquecendo o cultivo com 10% de CO_2 a 30°C .

Tabela 1 Concentração celular máxima (X_{max} , g.L^{-1}), produtividade máxima (P_{max} , $\text{g.L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max} , d^{-1}), tempo de geração (tg, d) e fixação diária máxima de CO_2 (FD_{max} , % v/v) obtidos para as microalgas *Spirulina* sp. LEB-18, *Scenedesmus obliquus*, *Synechococcus nidulans* e *Chlorella vulgaris*. Média \pm desvio padrão.

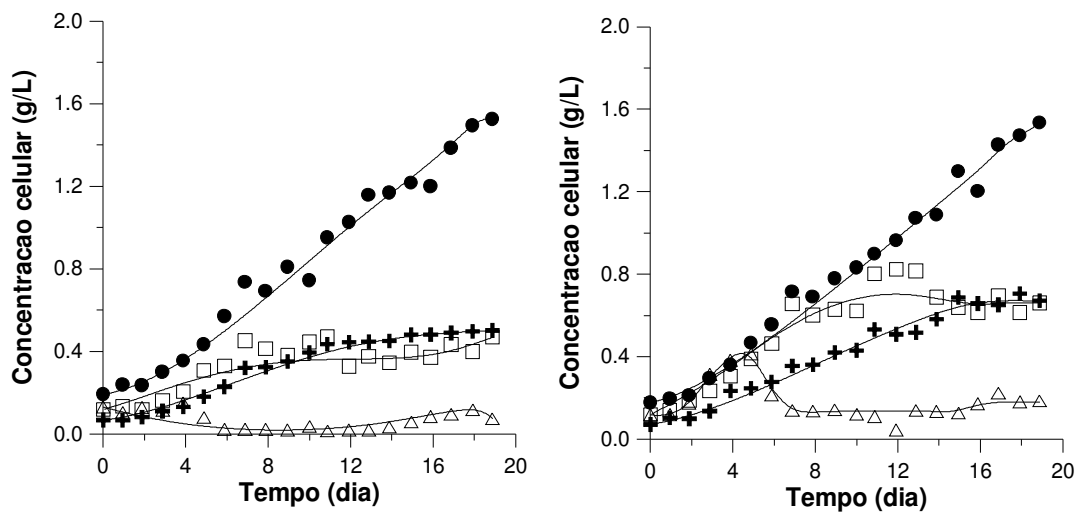
Ensaio	FBRT	X_{max}	P_{max}	μ_{max}	tg	FD_{max}
<i>Spirulina</i> sp. LEB-18	1	$1,53 \pm 0,05$	$0,08 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,01$	$3,11 \pm 0,15$	
	2	$1,54 \pm 0,03$	$0,08 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,01$	$2,95 \pm 0,07$	14,85
	3	$1,59 \pm 0,27$	$0,08 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,02$	$3,16 \pm 0,26$	
<i>Scenedesmus obliquus</i>	1	$0,50 \pm 0,19$	$0,04 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,07$	$2,77 \pm 0,74$	
	2	$0,67 \pm 0,09$	$0,06 \pm 0,02$	$0,24 \pm 0,02$	$2,93 \pm 0,27$	8,60
	3	$0,68 \pm 0,12$	$0,05 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,01$	$2,88 \pm 0,11$	
<i>Synechococcus nidulans</i>	1	$0,20 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,03$	<0,001	-	
	2	$0,41 \pm 0,09$	$0,07 \pm 0,02$	<0,001	-	3,46
	3	$0,24 \pm 0,03$	$0,04 \pm 0,01$	<0,001	-	
<i>Chlorella vulgaris</i>	1	$0,56 \pm 0,45$	$0,05 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,02$	$2,66 \pm 0,24$	
	2	$0,88 \pm 0,23$	$0,08 \pm <0,01$	$0,25 \pm 0,01$	$2,83 \pm 0,08$	13,43
	3	$0,98 \pm 0,11$	$0,09 \pm <0,01$	$0,25 \pm 0,02$	$2,83 \pm 0,24$	

Em relação à velocidade específica máxima de crescimento todas microalgas apresentaram resultados semelhantes (variando de 0,22 a 0,26 d⁻¹), exceto para *Synechococcus nidulans*, a qual alcançou um valor menor que 0,001 d⁻¹, não apresentando fase exponencial de crescimento nítida e conseqüentemente o tempo de geração também muito alto. Para as demais microalgas o tempo de geração manteve-se entre 2,66 e 3,16 d. Estes resultados confirmam o fato das microalgas biofixar CO₂ muito mais rápido do que vegetais superiores (HENRIKSON, 1994). Ainda, segundo LAING (1991), a adição de CO₂ nos cultivos pode proporcionar aumentos de 2 a 5 vezes nas densidades celulares e na biomassa.

As fixações diárias máximas (FD) alcançadas pelas microalgas *Spirulina* sp. e *Chlorella vulgaris* foram semelhantes (14,85 e 13,43%, respectivamente). Já para *Scenedesmus obliquus* e *Synechococcus nidulans*, foi alcançado 8,60 e 3,46% de FD, respectivamente. Em ensaios preliminares, testou-se outra cepa da microalga *Chlorella vulgaris* LEB-104 e a mesma não apresentou crescimento com a adição de 30 ppm de SO₂ aos cultivos. No presente trabalho a *Chlorella vulgaris*, que foi isolada de uma lagoa próxima a Usina Termelétrica, apresentou crescimento com adição de 60 ppm de SO₂ e 100 ppm de NO. Segundo BROWN et al. (1996) e CHU et al. (1996), espécies de microalgas nativas são mais tolerantes a condições locais.

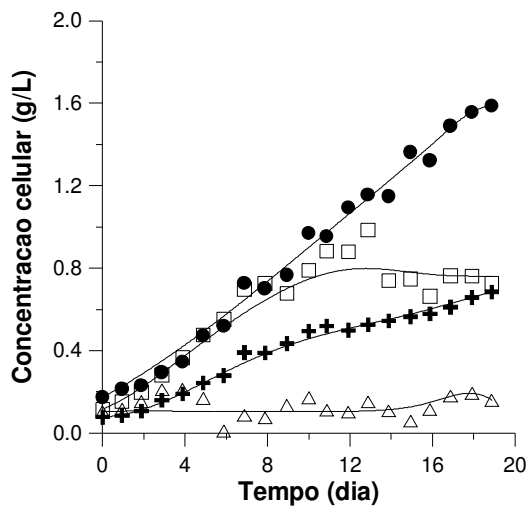
A adição dos gases SO₂ e NO aos cultivos das microalgas foi realizado após 4 d de inoculação (metade da fase exponencial de crescimento), pois em ensaios realizados anteriormente (tempo zero e 4 d) constatou-se que as microalgas *Spirulina* sp. e *Scenedesmus obliquus* alcançaram maiores concentrações de biomassa, quando a adição dos gases se deu em 4 d após a inoculação. Segundo YOSHIHARA et al. (1996) a adição de NO (100 e 300 ppm) aos cultivos no tempo zero, inibiu o crescimento da microalga marinha NOA-113.

A Figura 2 apresenta as curvas de crescimento celular de *Spirulina* sp., *Scenedesmus obliquus*, *Synechococcus nidulans* e *Chlorella vulgaris* ao longo do tempo de cultivo: (a) 1º FBR da série, (b) 2º FBR da série e (c) 3º FBR da série. Todas microalgas apresentaram comportamento semelhante em relação aos FBRs da série.



(a)

(b)



(c)

Figura 2 Curvas de crescimento para 1º FBR da série (a), 2º FBR da série (b) e 3º FBR da série (c): *Spirulina* sp. (●), *Scenedesmus obliquus* (+), *Synechococcus nidulans* (Δ) e *Chlorella vulgaris* (□).

As produtividades máximas alcançadas para *Spirulina* sp., *Scenedesmus obliquus*, *Synechococcus nidulans* e *Chlorella vulgaris* foram $0,08 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ($p > 0,05$); $0,06 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ($p > 0,14$); $0,09 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ ($p > 0,26$), respectivamente (Figura 3). A microalga *Synechococcus nidulans* apresentou inibição no crescimento, por isso, o comportamento da produtividade ao longo do tempo não foi mostrado. A produtividade máxima alcançada pela *Synechococcus nidulans* foi $0,07 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1} \pm 0,02$ ($p > 0,15$). Segundo VONSHAK et al. (1982) a produtividade é um parâmetro importante de se analisar do ponto de vista econômico. Entretanto, maiores produtividades podem ser alcançadas pelas microalgas ao adicionar 12% de CO_2 nos cultivos.

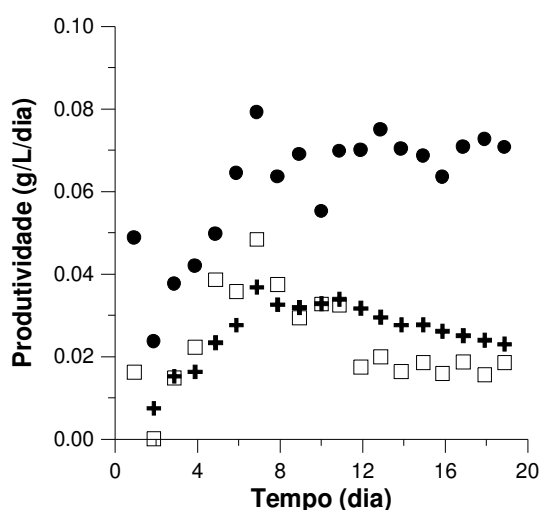


Figura 3 Produtividade em função do tempo apresentada para o 1º FBR da série de cada microalga: (●) *Spirulina* sp., (+) *Scenedesmus obliquus* e (□) *Chlorella vulgaris*.

O pH dos ensaios manteve-se entre 6,0 e 10,0 para todas microalgas estudadas (para os 3 FBRs) ao longo dos 20 d de cultivo. As maiores concentrações celulares foram alcançadas em pH entre 8,0 e 9,0 para as microalgas *Spirulina* sp., *Scenedesmus obliquus*, *Synechococcus nidulans* e *Chlorella vulgaris* (Figura 4). KIJWARA et al. (1997) avaliaram o crescimento de *Synechococcus* PCC7942 em diferentes valores de pH e constataram que a microalga apresentou maior crescimento em pH 6,2 e 6,8, em pH menores ou maiores que estes o crescimento foi inibido. Este fato foi observado neste trabalho, onde houve inibição do crescimento da *Synechococcus nidulans* com uma grande variação do pH entre 7,0 e 10,0. BROWN (1996) verificou que o pH das culturas de *Monoraphidium minutum* se manteve

constante, com adição de SO_2 (200 ppm) e NO (150 ppm), indicando que o SO_2 não causou inibição no crescimento da microalga. Ensaios realizados por YOSHIHARA et al. (1996) com a microalga NOA-113 com adição de 100 e 300 ppm de NO , o pH foi mantido em torno de 6,0 durante todo cultivo. Em culturas de *Chlorella* sp. KR-1, com a injeção de 10% de CO_2 , o pH se manteve entre 5,0 e 8,0 durante 8 d de cultivo (SUNG et al., 1999). LEE et al. (2002) reportaram que ensaios de *Chlorella* sp. KR-1 com os gases CO_2 (15%), SO_2 (60, 100 e 150 ppm) e NO (100 e 300 ppm) mantiveram o pH entre 5,0 e 8,0.

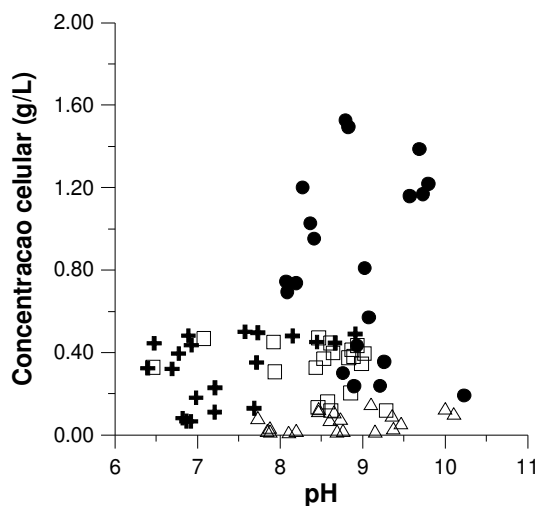


Figura 4 Curvas de pH em função da concentração celular para o 1° FBR da série de cada microalga: *Spirulina* sp. (●), *Scenedesmus obliquus* (+), *Synechococcus nidulans* (Δ) e *Chlorella vulgaris* (□).

O pH está diretamente relacionado à forma de carbono inorgânico disponível no cultivo, pois meios alcalinos favorecem a forma bicarbonato (HCO_3^-), que constitui mais de 80% em pH entre 7,0 e 9,0; enquanto as formas de CO_2 livre e carbonato (CO_3^{2-}) predominam abaixo ou acima destes valores, respectivamente (KIRK, 1994). Geralmente em cultivos de microalga há queda na concentração do carbono total e um aumento no pH, produzindo então, uma perturbação no sistema tampão do carbonato. Quando o pH atinge valores próximos a 11,0; ocorre inibição do crescimento da *Spirulina*, pois o carbono inorgânico remanescente no meio torna-se não disponível ao microrganismo (KAPLAN et al., 1990) e, além disso, valores de pH elevados prejudicam o crescimento das microalgas por afetar a disponibilidade de

outros elementos, além do carbono, como fósforo e ferro dissolvido (formas biodisponíveis) (ESTEVES, 1988). Fato este que não ocorreu no presente trabalho com nenhuma das microalgas, pois o máximo de pH alcançado foi 10,0. A quantidade de carbono inorgânico total dissolvido manteve-se em torno de 0,10 a 0,90 g.L⁻¹ para as microalgas *Spirulina* sp., *Scenedesmus obliquus*, *Synechococcus nidulans* e *Chlorella vulgaris* durante os 20 d de cultivo.

Através da análise elementar CNHS foram obtidos 40,19; 47,84; 29,62 e 45,52% de C; 4,54; 6,92; 4,78 e 6,41% de H; 7,30; 8,19; 7,87 e 8,15% de N; 1,21; 0,55; 1,38 e 0,45% de S, para as microalgas *Spirulina* sp., *Scenedesmus obliquus*, *Synechococcus nidulans* e *Chlorella vulgaris*, respectivamente. Resultados superiores foram encontrados por OHTAGUCHI et al. (1997), onde obtiveram 47,32% de C; 7,07% de H; 9,41% de N e 0,56% de S, para microalga *Synechococcus leopoliensis* cultivada em meio enriquecido com 6% de CO₂. Resultados semelhantes foram obtidos por HIRATA et al. (1996) na biomassa de *Chlorella* sp. UK001 cultivada com adição da mistura CO₂:O₂:N₂ (10:3:87) numa vazão de 0,05 L.min⁻¹, apresenta esta, 54,0% de C; 8,60% de H; 3,30% de N e 0,36% de S.

4 CONCLUSÕES

Foram isoladas duas espécies de microalgas, *Synechococcus nidulans* e *Chlorella vulgaris*, da Lagoa de Tratamento de Efluentes de uma Usina Termelétrica a carvão. As microalgas isoladas se desenvolveram quando expostas a 12% de CO₂, 60 ppm de SO₂ e 100 ppm de NO. As maiores concentrações de biomassa foram obtidas pelas microalgas *Spirulina* sp. LEB-18 (1,59 g.L⁻¹) e *Chlorella vulgaris* (0,98 g.L⁻¹). Para a *Scenedesmus obliquus* foi alcançado 0,68 g.L⁻¹ e para a *Synechococcus nidulans* 0,41 g.L⁻¹. Com adição de 12% de CO₂, 60 ppm de SO₂ e 100 ppm de NO, foram alcançadas produtividades máximas de 0,08; 0,06; 0,07 e 0,09 g.L⁻¹.d⁻¹, para *Spirulina* sp. LEB-18, *Scenedesmus obliquus*, *Synechococcus nidulans* e *Chlorella vulgaris*, respectivamente.

A fixação diária máxima (FD) alcançada pelas microalgas *Spirulina* sp. LEB-18 e *Chlorella vulgaris*, foram semelhantes (14,85 e 13,43%, respectivamente). Já para *Scenedesmus obliquus* e *Synechococcus nidulans*, foi alcançado 8,60 e 3,46% de FD, respectivamente. Sendo assim, as microalgas que apresentaram maior

capacidade de fixação (*Spirulina* sp. LEB-18 e *Chlorella vulgaris*), em meio contendo os gases SO₂ e NO podem ser cultivadas em plantas de energia elétrica para biofixar o CO₂ proveniente do gás de combustão do carvão, contribuindo na redução do aquecimento global.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a ELETROBRÁS – Centrais Elétricas Brasileiras S.A. e CGTEE – Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

6 REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - STANDART METHODS. For The Examination Of Water And Wastewater. 20 Ed. American Public Health Association. Washington, 1998.

BECKER, W. Microalgal in human and animal nutrition. In: Richmond, A. (ed) Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology. London: Blackwell Science, 312-351, 2004.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgal: ponds, tanks, tubes and fermenters. Journal of Biotechnology, 70, 313-321, 1999.

BROWN, L.M.. Uptake of carbon dioxide from flue gas by microalgae. Energy Conversion Management, 37, 1363-1367, 1996.

BROWN, M. L. & ZEILER, K. G. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. Energy Conversion Management, 34, 1005-1013, 1993.

CARMOUZE, J-P. O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas. Ed. Edgard Blucher. 11, 183-200, 1994.

CHANG, E. H. & YANG, S. S. Some characteristics of microalgae isolated in Taiwan for biofixation of carbon dioxide. Bot. Bull. Acad. Sin. 44, 43-52, 2003.

CHU, W. L., PHANG, S. M., GOH, S. H. Environmental effects on growth and biochemical composition of *Nitzschia inconspicua* grunow. J. Appl. Phycol. 8, 389-396, 1996.

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, 98, 1489-1493, 2007.

COSTA, J. A. V., COLLA, L. M., DUARTE FILHO, P., KABKE, K., WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. World J Microb Biot. 18, 603-607, 2002.

COSTA, J. A. V., MORAIS, M. G., DALCANTON, F., REICHERT, C. C., DURANTE, A. J. Simultaneous cultivation of *Spirulina platensis* and the toxigenic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. Z Naturforsch. 61c, 105-110, 2006.

MORAIS, M. G. Fixação de dióxido de carbono e produção de ácidos graxos por microalgas. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2006.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. Energy Conversion & Management (2007): In Press. (a)

MORAIS, M.G., COSTA, J.A.V., Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor, Journal of Biotechnology (2007): In Press. (b)

ESTEVEZ, F. A. Fundamentos de Limnologia. Rio de Janeiro, Ed. Interciencia/FINEP. 574, 1988.

GRIMA, M. E. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. Biotechnology Advance. 20, 491-515, 2003.

HENRIKSON R. Microalga *Spirulina*: Superalimento del futuro. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, ISBN: 84-7953-047-2, 1994.

HIRATA, S.; HAYASHITANI, M.; TAYA, M.; TONE, SETSUJI. Carbon dioxide fixation in batch culture of *Chlorella* sp. Using a photobioreactor with a sunlight-collection device. *Journal of fermentation and bioengineering*, 81, 470-472, 1996.

KAJIWARA, S.; YAMADA, H.; OHKUNI, N.; OHTAGUCHI, K. Design of the bioreactor for carbon dioxide fixation by *Synechococcus* PCC7942. *Energy Conversion & Management*, 38, 529-532, 1997.

KAPLAN, D.; RICHMOND, A. E.; DUBINSKY, Z.; AARONSON, S. Algal Nutrition. In: RICHMOND, A. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Boca Raton: CRC Press. P. 174-198, 1990.

KIRK, J. T. O. *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. Cambridge University Press, Camberra, 509, 1994.

LAING, I. Cultivation of Marine Unicellular Algae. *Lab. Leafl. Direct. Fish. Res.*, Lowestoft, 67,1-31, 1991.

LEE, J. S.; KIM, D. K.; LEE, J. P.; PARK, S. C; KOH, J. H; CHO, H. S; KIM, S. W. Effects of SO₂ and NO on growth of *Chlorella* sp. KR-1. *Bioresource Technology*, 82, 1-4, 2002

OHTAGUCHI, K.; KAJIWARA, S.; MUSTAQIM, D.; TAKAHASHI, N. Cyanobacterial bioconversion of carbon dioxide for fuel productions. *Energy Conversion & Management*, 38, 523-528, 1997.

RADMANN, E. M.; REINEHR, C. O., COSTA, J. A. V. Otimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. *Aquaculture*, 265, 118-126, 2007.

REICHERT, C. C., REINEHR, C. O., COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. *Braz J Chem Eng.* 23, 23-28, 2006.

RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J. W., HERDMAN, M. & STANIER, R. G. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111, 1-61, 1979.

SIEGENTHALER, U., STOCKER, T. F., MONNIN, E., LÜTHI, D., SCHWANDER, J., STAUFFER, B., RAYNAUD, D., BARNOLA, J. M., FISCHER, H., DELMONTT, V. M., JOUZEL J. Stable carbon cycle-climate relationship during the late Pleistocene. *Science*, 310, 1313-1316, 2005.

SUNG, K. D.; LEE, J. S.; SHIN, C. S.; PARK, S. C., CHOI, M. J. CO₂ fixation by *Chlorella* sp. KR-1 and its cultural characteristics. *Bioresource Technology*, 68, 269-273, 1999.

VONSHAK, A., ABELIOVICH, A., BOUSSIBA, A., ARAD, S., RICHMOND, A. Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass*, 2, 175-185, 1982.

WATANABE, A. List of algal strains in collection at the Institute of Applied Microbiology University of Tokyo. *J Gen Appl Microbiol*, 6, 1-4, 1960.

YANAGI, M.; WATANABE, Y.; SAIKI, H. CO₂ fixation by *Chlorella* sp. HA-1 and its utilization. *Energy Conversion & Management*, 36, 713-716, 1995.

YOSHIHARA, K.; NAGASE, H.; EGUSHI, K.; HIRATA, K. Biological elimination of nitric oxide and carbon dioxide from flue gas by marine microalga NOA-113 cultivated in a long tubular photobioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82 (4), 351-354, 1996.

ZARROUK, C. Contribution a l'etude d'une Cyanophyce, Influence de Divers Facteurs physiques et Chimiques sur la Croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* Geitler. Ph.D. Thesis University of Paris. 1966.

**5.4 CONTEÚDO LIPÍDICO E COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE
MICROALGAS EXPOSTAS AOS GASES DE COMBUSTÃO DO CARVÃO**

CONTEÚDO LIPÍDICO E COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DE MICROALGAS EXPOSTAS AOS GASES DE COMBUSTÃO DO CARVÃO

Elisangela Martha Radmann e Jorge Alberto Vieira Costa

Laboratório de Engenharia Bioquímica, Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Caixa Postal 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil. Fax: +55-53-3233 8745. E-mail: dqmjorge@furg.br

RESUMO

As microalgas se destacam por apresentar diversas potencialidades, como alimentos, fármacos e química fina. Os lipídios nos sistemas biológicos funcionam como componentes de membrana, produtos de reserva e como fonte de energia sendo que, parte dos lipídios é constituída de ácidos graxos. O objetivo do presente trabalho foi determinar o conteúdo lipídico e a composição em ácidos graxos das microalgas *Spirulina* sp., *Scenedesmus obliquus*, *Synechococcus nidulans* e *Chlorella vulgaris* cultivadas em meio contendo CO₂, SO₂ e NO. A microalga *Scenedesmus obliquus* cultivada com 12% de CO₂, 60 ppm de SO₂ e 100 ppm de NO, apresentou o maior teor lipídico (6,18%). Para as demais microalgas o conteúdo lipídico variou de 4,56 a 5,97%. O maior conteúdo em ácidos graxos monoinsaturados (AGM) foi 66,01% para a *Scenedesmus obliquus*. Os PUFA foram alcançados em maior quantidade pelas microalgas *Spirulina* sp. (29,37%) e *Synechococcus nidulans* (29,54%). O ácido palmitoléico (C16:1) se apresentou em maior quantidade, com concentração de 41,02% (*Spirulina* sp.).

PALAVRAS-CHAVE: ácidos graxos, dióxido de carbono, lipídios, microalgas.

ABSTRACT

Microalgae are gain eminence for presenting several potentialities as food. The lipids, in biological systems, act as membrane compounds, reserve products and energy source, being part of the lipids constituted by fatty acids. The main of the present work was to verify the lipid content and the fatty acids composition of the microalgae *Spirulina* sp., *Scenedesmus obliquus*, *Synechococcus nidulans* and *Chlorella vulgaris* cultivated in a medium containing CO₂, SO₂ and NO at 30°C. The microalga *Scenedesmus obliquus* cultivated with 12% CO₂, 60 ppm SO₂ and 100 ppm NO, presented the highest lipid content (6,18%). For the other microalgae the lipid content ranged from 4,56 to 5,97%. The major monounsaturated fatty acids content (AGM) was 66,01% for *Scenedesmus obliquus*. The PUFA were obtained in major amount by the microalgae *Spirulina* sp. (29,37%) and *Synechococcus nidulans* (29,54%). The palmitoleic acid (C16:1) was in larger amount with 41,02% (*Spirulina* sp.)

KEY WORDS: fatty acids, carbon dioxide, lipids, microalgae.

1 INTRODUÇÃO

Com o surgimento de indústrias e usinas termelétricas movidas a combustíveis fósseis, principalmente carvão e petróleo, as sociedades passaram a liberar no ar dióxido de carbono (CO₂) e outros gases como dióxido de enxofre (SO₂) e óxido nítrico (NO) agravando o efeito estufa. Existem diversos métodos para captura de CO₂ atmosférico, dentre eles os quais a biofixação por microalgas. Com a utilização de CO₂, as microalgas se multiplicam e produzem uma série de compostos de interesse, principalmente proteínas, ácidos graxos e corantes. Os ácidos graxos quando extraídos podem ser utilizados como alimento, fármacos ou transformados em biocombustíveis.

Além das microalgas serem utilizadas para biofixar CO₂ da atmosfera, elas também vêm sendo estudadas como alimentos para humanos e animais, na agricultura, no tratamento de águas residuais e na obtenção de diversos compostos, com alto valor agregado, como corantes e ácidos graxos (COLLA et al., 2004; RICHMOND, 2004; GRIMA, 2003; ILLMAN et al., 2000). O conteúdo lipídico das microalgas pode variar de 1 a 40% (BECKER, 2004). Os ácidos graxos nas microalgas correspondem a maior fração lipídica, e em algumas espécies os PUFA representam entre 25 e 60% dos lipídios totais (BECKER, 2004; BROWN, 1991). Comparadas aos vegetais superiores, as microalgas apresentam maior eficiência fotossintética e podem ser cultivadas em meio salino simples (OLGUÍN et al., 2001). Em relação à produção de lipídios, as microalgas podem produzir, pelo menos, quinze vezes mais que a palma, um dos vegetais de maior rendimento e produtividade. A estimativa de produção de lipídios por microalgas varia de 15.000 a 30.000 L.Km⁻² e a extração é simples, podendo ser aplicados os métodos tradicionais usados na indústria química, incluindo a extração por solventes (em especial, hexano).

Diversos fatores influenciam a produção de lipídios e ácidos graxos por microalgas, como a intensidade luminosa (OLGUÍN et al., 2001; TANTICHAROEN et al., 1994; HIRANO et al., 1990), a temperatura (THOMPSON e GUO, 1998) e os nutrientes adicionados (SUKENIK e WAHNON, 1991). Dentre os nutrientes que podem influenciar a produção de lipídios e ácidos graxos, estão a fonte de nitrogênio e de enxofre, as quais são utilizadas pelas microalgas na síntese de aminoácidos e ácidos graxos (RICHMOND, 1990). COSTA et al. (2000) estudaram o efeito da concentração inicial de nitrato de 0,003; 0,015; 0,030 e 0,060 M no crescimento da *Spirulina*

platensis e verificaram que a concentração de ácidos graxos não foi influenciada pela concentração deste sal. PIORRECK et al. (1984) verificaram que microalgas cultivadas em baixas concentrações de nitrogênio tiveram seu conteúdo lipídico incrementado, sem, no entanto, alterar o perfil lipídico e de ácidos graxos.

Segundo ISHIDA et al. (2000), a baixa disponibilidade de carbono pode causar limitação do crescimento microalgal e a adição de CO₂ no meio de cultivo pode aumentar até 7 vezes a produtividade. MURADYAN et al. (2004) constataram que a composição em ácidos graxos triplicou com aumento da concentração de 2 a 10% de CO₂ nos cultivos de *Dunaliella salina*.

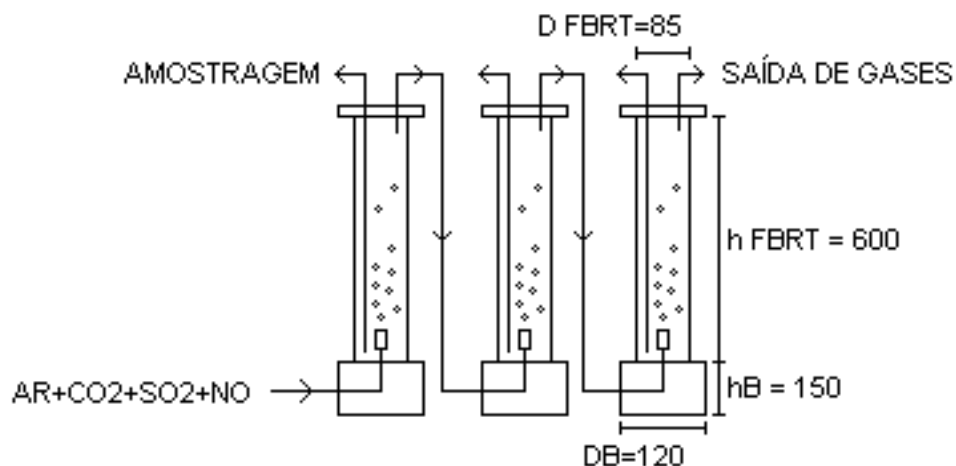
O objetivo deste trabalho foi determinar o conteúdo lipídico e o perfil gás cromatográfico dos ácidos graxos das microalgas *Spirulina* sp. LEB-18, *Scenedesmus obliquus* LEB-22, *Synechococcus nidulans* LEB-25 e *Chlorella vulgaris* LEB-106 cultivadas na presença dos gases CO₂, SO₂ e NO.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos e condições de cultivo

As microalgas utilizadas neste estudo foram *Spirulina* sp. LEB-18 (COSTA et al., 2006), *Scenedesmus obliquus* LEB-22 (MORAIS & COSTA, 2007a), *Synechococcus nidulans* LEB-25 e *Chlorella vulgaris* LEB-106 isoladas de lagoas de tratamento de efluente da Usina Termelétrica Presidente Médici – UTPM no extremo Sul do Brasil, latitude 24°36'13"S e longitude 52°32'43"W. As microalgas foram mantidas e cultivadas em meio BG-11 (RIPKA et al., 1979) (*C. vulgaris*) contendo (g.L⁻¹): NaNO₃ 1,50; K₂HPO₄.3H₂O 0,04; MgSO₄.7H₂O 0,075; CaCl₂.2H₂O 0,036; Citrato Férrico 0,006; EDTA 0,001; Na₂CO₃ 0,02; Ácido Cítrico 0,006; H₃BO₃ 2,86.10⁻³; MnSO₄.H₂O 1,70.10⁻³; ZnSO₄.7H₂O 0,222.10⁻³; Na₂MoO₄.2H₂O 0,39.10⁻³; CuSO₄.5H₂O 0,079.10⁻³; CoCl₂.6H₂O 0,0404.10⁻³; meio Zarrouk modificado (MORAIS & COSTA, 2007b) (*Spirulina* sp. e *S. nidulans*) contendo (g.L⁻¹): CO₂ 12% (v/v); NaNO₃ 2,5; K₂HPO₄ 0,5; K₂SO₄ 1,0; NaCl 1,0; MgSO₄.7H₂O, 0,2; CaCl₂ 0,04; FeSO₄.7H₂O 0,01; EDTA, 0,08 e micronutrientes; onde a fonte de carbono (bicarbonato de sódio) foi substituída por CO₂; e em meio MC (WATANABE, 1960) (*S. obliquus*) contendo (g.L⁻¹): KNO₃ 0,25; MgSO₄.7H₂O 0,075; KH₂PO₄ 0,175; FeSO₄.7H₂O 0,02 e micronutrientes. Os inóculos foram previamente adaptados a 1% (v/v) de CO₂ durante 7 d.

Foram realizados 4 ensaios em duplicata, onde foram comparadas as respostas conteúdo lipídico e composição em ácidos graxos, sendo expostas a 12% de CO₂, 60 ppm de SO₂, 100 ppm de NO à 30°C. Os ensaios foram realizados em um sistema de fotobiorreatores fechados em série do tipo tubulares (FBRT) de 2 L (volume útil de 1,8 L), conforme mostra Figura 1, mantidos em câmara termostatizada a 30°C com fotoperíodo 12 h claro/escuro (REICHERT et al., 2006) durante 20 d. A concentração inicial dos cultivos foi 0,15 g.L⁻¹ (COLLA et al. 2007). A aeração foi realizada com ar comprimido misturado aos gases CO₂ (12%), SO₂ (60 ppm) e NO (100 ppm) dispostos em cilindros industriais. A vazão de entrada da mistura nos cultivos foi 540 mL.min⁻¹ durante o período claro, controlado através de válvulas solenóides. A iluminância foi 3200 Lux fornecida através de lâmpadas fluorescentes de 40 W tipo luz do dia.



D_{FBRT} : diâmetro do fotobiorreator; h_{FBRT} : altura do fotobiorreator; D_B : diâmetro da base; h_B : altura da base.

Figura 1 Esquema do cultivo em fotobiorreatores tubulares em série. Medidas em mm.

2.2 Quantificação de lipídios totais e perfil de ácidos graxos

Para a quantificação de lipídios totais foi utilizada a metodologia proposta por FOLCH & LESS (1957). A fração lipídica foi esterificada para obtenção dos metil-ésteres dos ácidos graxos, segundo metodologia proposta por METCALFE & SCHIMITZ (1966).

A determinação de ácidos graxos foi realizada em cromatógrafo a gás modelo Varian – 3400CX equipado com detector de ionização de chama e coluna de sílica fundida contendo fase estacionária de polietileno glicol com 30 m de comprimento e 0,32 mm de diâmetro. O gás de arraste foi nitrogênio a $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As temperaturas do injetor e do detector foram 250 e 280 °C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi 100 °C seguido de aumento de $8 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 230 °C permanecendo por 20 min. Os ácidos graxos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com padrões e quantificados por normalização de áreas.

Os padrões de ácidos graxos utilizados (Sigma Supelco; Bellefonte, EUA) foram ácido caprótico (C6:0); ácido caprílico (C8:0); ácido cáprico (C10:0); ácido undecanóico (C11:0); ácido láurico (C12:0); ácido mirístico (C14:0); ácido miristoléico (C14:1); ácido palmítico (C16:0); ácido palmitoléico (C16:1); ácido margarico (C17:0);

ácido margaroléico (C17:1); ácido esteárico (C18:0); ácido elaídico (C18:1); ácido oléico (C18:1); ácido linoléico trans (C18:2); ácido linoléico cis (C18:2); ácido α - linolênico (C18:3); ácido γ - linolênico (C18:3); ácido araquídico (C20:0); ácido gadoléico (C20:1); ácido eicosadienóico (C20:2); ácido eicosatrienóico (C20:3); ácido bênio (C22:0); ácido eicosapentaenóico (C20:5); ácido erúico (C22:1); ácido lignocérico (C24:0); ácido miristoléico (C24:1).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta as concentrações de ácidos graxos saturados (AGS), ácidos graxos monoinsaturados (AGM) e ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) para os ensaios realizados com as microalgas *Spirulina* sp. LEB-18, *Scenedesmus obliquus*, *Synechococcus nidulans* e *Chlorella vulgaris*. A microalga *Scenedesmus obliquus* apresentou o maior teor lipídico ($6,18 \pm 0,20\%$, $p \geq 0,46$). Para *Spirulina* sp. LEB-18, *Synechococcus nidulans* e *Chlorella vulgaris* foi alcançado a concentração $5,97 \pm 1,22\%$ ($p \geq 0,60$), $5,00 \pm 0,80\%$ ($p \geq 0,60$) e $5,21 \pm 0,06\%$ ($p \geq 0,60$), respectivamente, sendo todas microalgas cultivadas em meio adicionado de 12% CO₂, 60 ppm SO₂, 100 ppm de NO a 30°C. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por MORAIS & COSTA (2006), com 5,20; 3,30 e 4,60% de lipídios para *Spirulina* sp. LEB-18, *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris*, respectivamente, com adição de 12% de CO₂, porém sem adição dos gases SO₂ e NO. As condições de cultivo são os principais fatores na produção de lipídios, podendo estes variar de 1 a 40% (BECKER, 2004). Segundo ILLMANN et al. (2000), 30°C e baixas concentrações de nitrogênio são consideradas condições ótimas para o aumento da produção de lipídios nas cepas de *Chlorella*. O aumento na fração lipídica também foi observado por CHU et al. (1996) enriquecendo o cultivo com 5% (v/v) de CO₂.

Tabela 1 Perfil de ácidos graxos (%) das microalgas *Spirulina* sp. LEB-18, *Scenedesmus obliquus*, *Synechococcus nidulans* e *Chlorella vulgaris*, cultivadas em 12% de CO₂, 60 ppm de SO₂, 100 ppm de NO a 30°C.

	<i>Spirulina</i> sp.	<i>S.obliquus</i>	<i>S. nidulans</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>
Ácidos graxos saturados				
C 15:0	0,08	2,14	0,08	0,14
C 16:0	2,54	3,22	0,73	4,36
C 17:0	1,92	1,02	8,18	1,26
C 18:0	0,33	0,91	0,78	1,20
C 20:0	12,60	0,70	0,13	29,10
C 22:0	nd	nd	nd	0,15
C 23:0	nd	2,06	1,15	0,97
C 24:0	nd	0,58	0,09	nd
Ácidos graxos monoinsaturados				
C 14:1	0,26	0,57	0,36	0,21
C 15:1	1,26	1,57	0,09	2,30
C 16:1	41,02	37,01	36,04	23,47
C 17:1	2,45	6,28	2,73	1,80
C 18:1	8,04	18,27	16,9	21,81
C 20:1	0,14	0,67	nd	0,37
C 24:1	nd	1,64	2,85	1,00
Ácidos graxos poliinsaturados				
C 18:2	2,71	3,98	3,53	6,26
C 18:3	25,73	8,94	17,72	3,12
C 20:2	0,08	4,99	7,64	0,31
C 20:3	0,36	0,69	0,19	0,57
C 20:4	0,49	nd	0,12	0,49
C 20:5	nd	nd	0,10	0,13
C 22:2	nd	1,16	0,11	0,89
C 22:6	nd	3,60	0,13	0,10

nd = não detectado

O maior conteúdo de ácidos graxos saturados (AGS) ocorreu na *Chlorella vulgaris* (37,18%) e o maior conteúdo em ácidos graxos monoinsaturados (AGM) foi 66,01% para a *Scenedesmus obliquus* (Figura 2). Os ácidos graxos poliinsaturados

(PUFA) foram produzidos em maior quantidade (%) pelas microalgas *Spirulina* sp. LEB-18 (29,37%) e *Synechococcus nidulans* (29,54%). Resultados inferiores a estes, exceto para *Chlorella vulgaris*, foram encontrados por MORAIS & COSTA (2006), com 26,70; 50,50 e 72,00% de AGI e 5,40; 19,20 e 24,40% de PUFA, para as microalgas *Spirulina* sp., *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris*, respectivamente, cultivadas com 12% de CO₂ em fotobiorreator do tipo erlenmeyer sem adição de SO₂ e NO. No presente trabalho, o fotobiorreator utilizado foi do tipo tubular em série que proporciona uma maior disponibilidade de luz e conseqüentemente maior utilização de CO₂. MURADYAN et al. (2004) obtiveram 58,60% de AGS; 15,00% de AGM e 26,40% de PUFA para *D. salina* cultivada em meio enriquecido com 10% de CO₂. Segundo TSUZUKI et al. (1990), a adição de CO₂ aos cultivos influencia no conteúdo lipídico e no grau de insaturação dos ácidos graxos, sendo este, portanto, um nutriente essencial no cultivo de microalgas.

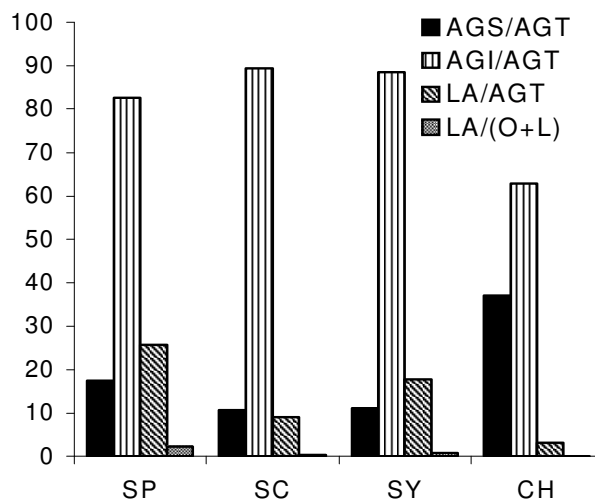


Figura 2 Percentuais de ácidos graxos saturados (AGS), ácidos graxos insaturados (AGI) e ácido linolênico (LA) pelo total de ácidos graxos analisados, e fração do ácido linolênico pelo somatório dos ácidos oléico e linoléico (O+L) para as microalgas *Spirulina* sp. (SP), *Scenedesmus obliquus* (SC), *Synechococcus nidulans* (SY) e *Chlorella vulgaris* (CH) cultivadas em meio contendo os gases CO₂, SO₂ e NO.

Os PUFA podem atuar na prevenção e tratamento de muitas doenças cardiovasculares, redução da pressão arterial, redução dos níveis de colesterol e triglicéridios no plasma, câncer, e, além disso, são considerados essenciais tanto para nutrição infantil quanto para o desenvolvimento cerebral (SIMOPOULOS, 2002; FÁBREGAS et al., 1994; BOROWITZKA, 1993). A biomassa microalgal comparada com outras fontes de ácidos graxos apresenta algumas vantagens como ausência de contaminação e ainda certas microalgas possuem significativamente maior espectro de PUFA, alguns com cadeias com mais de 18 átomos de carbono (WEN & CHEN, 2000).

Dentre os ácidos graxos saturados, o ácido palmítico (C16:0), que variou de 0,73 a 4,36% para as microalgas estudadas, é um ácido graxo importante para alimentação infantil, encontrado de 20 a 30% no leite materno (WILLIS et al., 1998). O ácido araquídico (C20:0) foi mais abundante entre os AGS, apresentando 29,10% para microalga *Chlorella vulgaris*. Já os demais AGS variaram entre 0,08 e 12,60%. Os ácidos graxos saturados (AGS) são importantes na produção de biodiesel, com alto número de cetano e são menos propensos à oxidação que os compostos insaturados (CANAKCI, 2005).

O ácido palmitoléico (C16:1) apresentou-se em maior concentração em relação aos outros ácidos graxos monoinsaturados (AGM), variando de 23,47 a 41,02%. O ácido palmitoléico é um importante constituinte da dieta humana, auxiliando na prevenção de diversas doenças, dentre elas, as cardiovasculares (WILLIS et al., 1998), e, além disso, é utilizado em cosméticos de ação rejuvenescedora. Os resultados apresentados são superiores aos encontrados por MASLOVA et al. (2004), que obtiveram 18,20% de ácido palmitoléico (C16:1) para a microalga *Synechococcus* sp. a 32°C. Segundo ILLMAN et al. (2000), a temperatura em torno de 30°C é considerada ótima para aumentar a produção de lipídios. Os ácidos graxos monoinsaturados estão relacionados à diminuição dos níveis de colesterol, triglicéridios, glicose e aumento do colesterol HDL. Já os ácidos graxos poliinsaturados têm um importante efeito na proteção cardiovascular. Por sua vez, o ácido oléico (C18:1) variou de 8,04 a 21,81% para as microalgas estudadas.

Dentre os PUFA, o ácido linolênico (C18:3) apresentou predominância variando de 3,12 a 25,73%. A fração de ácido linolênico sobre os ácidos oléico e linoléico mostrou variação entre 0,11 a 2,40%, indicando que as condições de cultivo

afetaram o grau de insaturação dos ácidos graxos presentes. Além da temperatura, os nutrientes do meio de cultivo também são muito importantes na produção de ácidos graxos, como a fonte de carbono (TSUZUKI et al., 1990). Portanto, a concentração de 12% de CO₂, 60 ppm de SO₂ e 100 ppm de NO, favoreceram a produção de determinados ácidos graxos. COLLA et al. (2004) obtiveram 20,90% de ácido linolênico em ensaios a 30 °C e 2,5 g.L⁻¹ de nitrato de sódio. Segundo WARD & SINGH (2005), o ácido linolênico pode ser utilizado no tratamento de diversas doenças como esclerose múltipla e doenças cardiovasculares.

Foram encontrados traços de ácido eicosapentaenóico (C20:5) – EPA, produzido pelas microalgas *Synechococcus nidulans* (0,10%) e *Chlorella vulgaris* (0,13%). Este ácido pode atuar na prevenção de formação de blocos de prostaglandinas prejudiciais, e também pode realçar e melhorar a função imunológica.

4 CONCLUSÕES

O conteúdo lipídico encontrado foi 5,97% para *Spirulina* sp., 6,18% para *Scenedesmus obliquus*, 5,00% para *Synechococcus nidulans* e 5,21% para *Chlorella vulgaris*. A maior quantidade em ácidos graxos essenciais foi 21,81% de ácido oléico e 6,26% de ácido linoléico, ambos para *Chlorella vulgaris*, e 25,73% de ácido linolênico para *Spirulina* sp. O perfil de ácidos graxos obtido para todas microalgas, exceto para *Chlorella vulgaris*, mostrou ser o ácido palmitoléico (C16:1) o mais abundante, alcançando concentração de 41,02% (*Spirulina* sp.). Para *Chlorella vulgaris* o ácido araquídico (C20:0) apresentou-se em maior concentração (29,10%).

O cultivo de microalgas com os gases CO₂, SO₂ e NO, apresentou biomassa rica em ácidos graxos, podendo estes ser utilizados tanto para a alimentação (ácidos graxos insaturados), quanto para produção de biocombustíveis (ácidos graxos saturados). Além disso, as microalgas estudadas podem contribuir na redução do aquecimento global, com a fixação do dióxido de carbono, principal componente dos gases do efeito estufa na atmosfera.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a ELETROBRÁS – Centrais Elétricas Brasileiras S.A. e CGTEE – Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

6 REFERÊNCIAS

BECKER, W. Microalgal in human and animal nutrition. In: Richmond, A. (ed) Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology. London: Blackwell Science, 312-351, 2004.

BOROWITZKA, M. A. Products from microalgal. Infofish International, 5, 21-26, 1993.

BROWN, M. R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgal used in mariculture. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 145, 79-99, 1991.

CANAKCI, M. The potencial of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks. Biores. Biotech. (2005): In Press.

CHU, W. L., PHANG, S. M., GOH, S. H. Environmental effects on growth and biochemical composition of *Nitzschia inconspicua* grunow. J. Appl. Phycol. 8, 389-396, 1996.

COLLA, L. M., BERTOLIN, T. E., COSTA, J. A. V. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. Z. Naturforsch. 59c, 55-59, 2004.

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, 98, 1489-1493, 2007.

COSTA, J. A. V., LINDE, G. A., ATALA, D. I. P., Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. World J Microb Biot. 16, 15-18, 2000.

COSTA, J. A. V., MORAIS, M. G., DALCANTON, F., REICHERT, C. C., DURANTE, A. J. Simultaneous cultivation of *Spirulina platensis* and the toxigenic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. Z Naturforsch. 61c, 105-110, 2006.

MORAIS, M. G. Fixação de dióxido de carbono e produção de ácidos graxos por microalgas. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2006.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. Energy Conversion & Management (2007): In Press. (a)

MORAIS, M.G., COSTA, J.A.V., Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor, Journal of Biotechnology (2007): In Press. (b)

FÁBREGAS, J.; HERRERO, C.; GAMALLO, Y.; OTERO, A.; PAZ, J. M.; VECINO, E. Decrease of plasma cholesterol with the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* in hypercholesterolemic rats. Journal of General and Applied Microbiology, 40, 540-553, 1994.

FOLCH, J. & LEES, M. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226, 497-509, 1957.

GRIMA, M. E. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. Biotechnology Advance. 20, 491-515, 2003.

HIRANO, M.; MORI, H.; MURA, Y.; MATSUNAGA, N.; NAKAMURA, N.; MATSUNAGA, T. γ -linolenic acid production by microalgae. Applied Biochemistry and Biotechnology, 24, 183-191, 1990.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grow in low nitrogen medium. Enzyme and Microbial Technology, 27, 631-635, 2000.

ISHIDA, Y.; HIRAGUSHI, N.; KITAGUCHI, H.; MITSUTANI, A., NAGAI, S., YOSHIMURA, M. A Highly CO₂-tolerant diatom *Thalassiosira weissflogii* H1, enriched from coastal sea, and its fatty acid composition. Fisheries Science, 66, 655-659, 2000.

MASLOVA, I. P., MOURADYAN, E. A., LAPINA, S. S., KLYACHKO-GURVICH, AND LOS, D. A. Lipid Fatty Acid Composition and Thermophilicity of Cyanobacteria. Russian Journal of Plant Physiology, 51, 353-360, 2004.

METCALFE, L. D. A. A. & SCHIMITZ, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. Anal. Chem. 38, 510, 1966.

MURADYAN, E. A., KLYACHKO-GURVICH, G. L., TSOGLIN, L. N., SERGEYENKO, T. V., AND PRONINA, N. A. Changes in Lipid Metabolism during Adaptation of the *Dunaliella salina* Photosynthetic Apparatus to High CO₂ Concentration. Russian Journal of Plant Physiology, 51, 53-62, 2004.

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. Biores. Technol. 77, 19-24, 2001.

PIORRECK, M.; BAASCH, K. H.; POHL, P. Biomass production, total protein, chlorophyllis, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. Phytochemistry, 23 (2), 207-216, 1984.

REICHERT, C. C., REINEHR, C. O., COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. Braz J Chem Eng. 23, 23-28, 2006.

RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: Black Well Science, 566, 2004.

RICHMOND, A. Handbook of microalgal mass culture. Boston: CRC Press. ISBN 0-8493-3240-0, 1990.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. W.; HERDMAN, M.; STANIER, R. G. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacterium. J. Gen. Microbiol. 111, 1-61, 1979.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. Biomedicine & Pharmacotherapy, 56, 8, 365-379, 2002.

SUKENIK, A.; WAHNON, R. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition: I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, 97, 61-72, 1991.

TAGUCHI, S.; HIRATA, J. A.; LAWS, E. A. Silicate deficiency and lipid synthesis of marine diatoms. *J. Phycol.* 23, 260-267, 1987.

TANTICHAROEN, M.; REUNGJITCHAWALI, M.; BOONAG, B.; VONDTAVEESUK, P.; VONSHAK, A.; COHEN, Z. Optimization of γ -linolenic acid (GLA) production in *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 6, 295-300, 1994.

THOMPSON, P. A.; GUO, M. Effect of variation in temperature: I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. *J. Phycol.* 28, 481-488, 1992.

TSUZUKI, M.; OHNUMA, E.; SATO, N.; TAKAKU, T.; KAWAGUCHI, A. Effects of CO₂ concentration during growth of fatty acid composition in microalgae. *Plant. Physiol.* 93, 851-856, 1990.

WARD, O. P.; SINGH, A. Omega – 3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochem.* 40, 3627-3652, 2005.

WATANABE, A. List of algal strains in collection at the Institute of Applied Microbiology University of Tokyo. *J Gen Appl Microbiol.* 6, 1-4, 1960.

WEN, Z. Y.; CHEN, F. Production potential of eicosapentanoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*: effects of silicate and glucose. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 25, 218-224, 2000.

WILLIS, W. M.; LENCKI, R. E.; MARANGONI, A. G. Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils. *Crit rev food sci.* 38, 639-674, 1998.

YANAGI, M.; WATANABE, Y.; SAIKI, H. CO₂ fixation by *Chlorella* sp. HA-1 and its utilization. *Energy Convers Manage.* 36, 713-716, 1995.

ZARROUK, C. Contribution a l'etude d'une Cyanophycee, Influence de Divers Facteurs physiques et Chimiques sur la Croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* Geitler. Ph.D. Thesis University of Paris. 1966.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Na seleção de microalgas quanto à tolerância a SO_2 , a *Spirulina* sp. alcançou as maiores respostas cinéticas de fixação, com produtividade máxima de biomassa $0,19 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, concentração celular máxima $2,62 \text{ g.L}^{-1}$ e máxima biofixação de CO_2 19,80% quando submetida à injeção de SO_2 depois de 4 d de inoculação.

Os gases SO_2 e NO não apresentaram influência significativa ($p>0,10$) nos parâmetros cinéticos de fixação estudados. A concentração celular máxima alcançada para *Spirulina* sp. e *S. obliquus* foi $3,29$ e $1,33 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente, quando submetidas à 12% de CO_2 . A fixação diária máxima de CO_2 foi 35,87 e 28,11%, respectivamente, para *Spirulina* sp. e *S. obliquus*, quando cultivadas à 6% de CO_2 . Os cultivos realizados em FBRTs ligados em série aumentaram a biofixação de CO_2 .

Foram isoladas duas espécies de microalgas *S. nidulans* e *C. vulgaris* da Lagoa de Tratamento de Efluentes de uma Usina Termelétrica a carvão. As microalgas isoladas se desenvolveram quando expostas a 12% de CO_2 , 60 ppm de SO_2 e 100 ppm de NO . A fixação diária máxima (FD) alcançada pelas microalgas *Spirulina* sp. e *C. vulgaris*, foram semelhantes (14,85 e 13,43%, respectivamente). Já para *S. obliquus* e *S. nidulans* foi obtido 8,60 e 3,46% de FD, respectivamente.

Através da análise elementar CNHS foram obtidos 40,19; 47,84; 29,62 e 45,52% de C; 4,54; 6,92; 4,78 e 6,41% de H; 7,30; 8,19; 7,87 e 8,15% de N; 1,21; 0,55; 1,38 e 0,45% de S, para as microalgas *Spirulina* sp., *S. obliquus*, *S. nidulans* e *C. vulgaris*, respectivamente.

O conteúdo lipídico encontrado foi 5,97% para *Spirulina* sp., 6,18% para *S. obliquus*, 5,00% para *S. nidulans* e 5,21% para *C. vulgaris*. A maior quantidade em ácidos graxos essenciais foi 21,81% de ácido oléico e 6,26% de ácido linoléico, ambos para *C. vulgaris*, e 25,73% de ácido linolênico para *Spirulina* sp. O perfil de ácidos graxos obtido para todas microalgas, exceto para *C. vulgaris*, mostrou ser o ácido palmitoléico (C16:1) o mais abundante, alcançando concentração de 41,02% (*Spirulina* sp.). Para *C. vulgaris* o ácido araquídico (C20:0) apresentou-se em maior concentração (29,10%).

Portanto, as microalgas que apresentaram maior capacidade de fixação (*Spirulina* sp. e *C. vulgaris*), em meio contendo os gases SO_2 e NO podem ser

cultivadas em plantas de energia elétrica a carvão para biofixar o CO₂ proveniente do gás de combustão, contribuindo na redução do aquecimento global. Além disso, o cultivo de microalgas com os gases CO₂, SO₂ e NO, apresentou biomassa rica em ácidos graxos, podendo estes ser utilizados tanto para a alimentação (ácidos graxos insaturados), quanto para produção de biocombustíveis (ácidos graxos saturados).

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Determinar outras variáveis que possam influenciar na eficiência fotossintética das microalgas;

Estudar a biofixação de CO_2 através de microalgas em cultivo semicontínuo utilizando condições favoráveis para obtenção de bioprodutos de valor energético;

Realizar ensaios com gás de combustão real na usina termelétrica; para biofixação microalgal de CO_2 ;

Automatizar o controle do pH dos cultivos, onde a injeção do gás de combustão, simulado ou real, seja acionada de acordo com a variação do pH dos cultivos.

Avaliar parâmetros de cultivo, como por exemplo, concentração celular ótima que deve ser mantida no biorreator e intensidade luminosa, para que se obtenha biomassa microalgal rica em compostos energéticos, como ácidos graxos que podem ser transformados em biodiesel.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - STANDART METHODS. For The Examination Of Water And Wastewater. 20 Ed. American Public Health Association. Washington, 1998.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of Microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture* (2007): In Press.

ARAÚJO, K. G. L., FACCHINETTI, A. D., SANTOS, C. P. Influência da ingestão de biomassas de *Spirulina* (*Arthrospira* sp.) sobre o peso corporal e consumo de ração em ratos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 23 (1), 6-9, 2003.

AZOV, Y. Effect of pH on inorganic carbon uptake in algal cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 43 (6), 1300-1306, 1982.

BALLONI, W.; TOMASELLI, L.; GIOVANETTI, L.; MARGHERI, M. C. *Biologia fondamentale del genere Spirulina*. In: *Tai del Convengo Propective della coltura de Spirulina in Itália*. Firenze, 1980.

BEALE, S. I.; APPLEMAN, D. *Plant physiol.* 47, 230, 1971. *Apud* LEE, H. Y.; ERICKSON, L. E.; YANG, S. S. 1987. Kinetics and Bioenergetics of Light-Limited Photoautotrophic Growth of *Spirulina platensis*. *Biotechnology and Bioengineering* 29, 832-843, 1987.

BECKER, E. W. Biotechnology and exploitation of the green alga *Scenedesmus obliquus* in India. *Biomass* 4, 1-19, 1984.

BECKER, W. Microalgal in human and animal nutrition. In: Richmond, A. (ed) *Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology*. London: Blackwell Science, 312-351, 2004.

BELAY, A. Mass culture of *Spirulina* outdoors – The Earthrise farms experience. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997.

BELAY, A. The Potential Application of *Spirulina* (*Arthrospira*) as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health Management. *The Journal of the American Nutraceutical Association*, 5, 2, 2002.

BIANCHINI, A.; SILVA, D. C. M. N.; CAVALLET, O.; GONZALES, T. A. Cultivo de *Spirulina platensis* e sua utilização na formulação de diferentes produtos alimentícios. Trabalho de graduação em Engenharia de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2002.

BOLD, H. C.; WYNNW, M. J. Introduction to the algae: structure and reproduction. New Jersey: Mc Graw Hill, p. 725. 1992.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: pond, tanks, tubes and fermenters. Journal of biotechnology 70, 313-321, 1999.

BOROWITZKA, M. A. Products from microalgal. Infofish International, 5, 21-26, 1993.

BRANCO, S.M. Hidrologia aplicada à engenharia sanitária. 2.ed. [s.l.]: CETESB, 620p. 1978. In: ZANOTELLI, C. T. Modelagem matemática de nitrogênio e fósforo em lagoas facultativas e de aguapés para tratamento de dejetos de suínos. Tese de Doutorado em Engenharia de Produção – UFSC, Florianópolis, SC, 2002.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T. Biology of Microorganisms. 6ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall 573, 717-719, 1991.

BROWN, L. M. Uptake of carbon dioxide from flue gas by microalgae. Energy Convers. Mgmt. 37, 1363-1367, 1996.

BROWN, L. M.; ZEILER, K. G. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. Energy Conversion and Management, 34, 1005-13, 1993.

BROWN, M. R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgal used in mariculture. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 145, 79-99, 1991.

BROWN, M. R.; JEFFREY, S. W.; GARLAND, C. D. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review. CSIRO Marine Laboratories 205, 34, 1989.

BURKHARDT, S.; RIEBESELL, U. CO₂ availability affects elemental composition (C:N:P) of the marine diatom *Skeletonema costatum*. Marine Ecology Progress Series, 155, 67-76, 1997.

CANAKCI, M. The potencial of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks. Biores. Biotech. (2005): In Press.

CARMOUZE, J-P. O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas. Ed. Edgard Blucher. 11, 183-200, 1994.

CHANG, E. H.; YANG, S. S. Some characteristics of microalgae isolated in Taiwan for biofixation of carbon dioxide. Bot. Bull. Acad. Sin. 44, 43 – 52, 2003.

CHU, W. L.; PHANG, S. M.; GOH, S. H. Environmental effects on growth and biochemical composition of *Nitzschia inconspicua* Grunow. Journal of Applied Phycology, 8, 389-396, 1996.

CLAUS, C.; BENIJTS, F.; VANDEPUTTE G.; GARDNER, W. The biochemical composition of the larvae of two strains of *Artemia salina* (L.) reared on two different algal foods. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. (36) 2, 22, 171-183, 1979.

COLLA, L. M., BERTOLIN, T. E., COSTA, J. A. V. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. Z. Naturforsch. 59c, 55-59, 2004.

COLLA, L. M.; ALVAREZ, J.; PRATO, C.; MUCHILLO-BAISCH, A. L.; COSTA, J. A. V. Influencia das condições de crescimento sobre o potencial antioxidante da microalga *Spirulina platensis* e seu potencial na redução da hipercolesterolemia. Tese de Mestrado em Engenharia de Alimentos. FURG, RS, Brasil, 2002.

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, 98, 1489-1493, 2007.

COSTA, J. A. V., COLLA, L. M., DUARTE FILHO, P. *Spirulina platensis* growth in open raceway ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal íons. Z Naturforsch. 58c, 76-80, 2003.

COSTA, J. A. V., MORAIS, M. G., DALCANTON, F., REICHERT, C. C., DURANTE, A. J. Simultaneous cultivation of *Spirulina platensis* and the toxigenic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. Z Naturforsch. 61c, 105-110, 2006.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. World J Microb Biot. 18, 603-607, 2002.

COSTA, J. A. V.; COZZA, K. L.; OLIVEIRA, L.; MAGAGNIN, G. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17, 439-442, 2001.

COSTA, J. A. V.; LINDE, G.A.; ATALA, D .I. P.; MIBIELI, G.M.; KRÜGER, R. T. Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina* sp. in microcosms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 15-18, 2000.

COUTTEAU, P. Micro-algae In: PLAVENS; SORGELOOS, P. Manual on the production and use of live food for aquaculture, FAO Fisheries Technical Paper 361, 7-48, 1996.

COZZA, K. L. *Spirulina platensis* em meios naturais e sintéticos: fatores nutricionais e custos. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos – FURG, Rio Grande, 1999.

DERNER, R. B. Crescimento da microalga *Thalassiosira fluviatilis* (classe *Bacillariophyceae*) sob diferentes regimes de iluminação, na região sul do Brasil. Dissertação de Mestrado – Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p. 108, 1995.

DUARTE FILHO, P. F. M. Crescimento da cianobactéria *Spirulina platensis* em diferentes configurações de fotobiorreator e condições de cultivo. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2002.

ESTEVES, F. A. Fundamentos de Limnologia. Rio de Janeiro, Ed. Interciencia/FINEP. p. 574, 1988.

FÁBREGAS, J.; HERRERO, C.; GAMALLO, Y.; OTERO, A.; PAZ, J. M.; VECINO, E. Decrease of plasma cholesterol with the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* in hypercholesterolemic rats. *Journal of General and Applied Microbiology*, 40, 540-553, 1994.

FAHNENSTIEL, G. L.; CARRICK, H. J.; ITURRIAGA, R. Physiological-characteristics and food-web dynamics of *Synechococcus* in lakes Huron and Michigan. *Limnology and oceanography* 36 (2), 219-234, 1991.

FOLCH, J. & LEES, M. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509, 1957.

GOLDMAN, J. C. Outdoor algal mass cultures – II. Photosynthetic yield limitations. *Algal Biomass* 11, 119-135, 1980.

GOODLOE, R. S.; LIGHT, R. J. Structure and composition of hydrocarbons and fatty-acids from a marine blue-green-alga, *Synechococcus* sp. *Biochimica et biophysica acta*, 710 (3), 485-492, 1982.

GRIMA, M. E. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advance*. 20, 491-515, 2003.

GRIMA, M. E.; SEVILLA, J. M. F.; PÉREZ, J. A. S.; CAMACHO, F. G. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *Journal of Biotechnology*, 45, 59-69, 1996.

HAMZA, N.; ROBIN, J. Influence du CO₂ la composition lipidique de la chaine algues-rtotifères. *Océanis*, 18, 185-188, 1992.

HANAGATA, N., TAKEUCHI, T., FUKUJU, Y., BARNES, D. J., KARUBE, I. Tolerance of microlage to high CO₂ and high temperature. *Phytochemistry*. 31, 3345 – 3348, 1992.

HENRRARD, A. S. A.; TUBINO, M. V.; PINHO, A. L. Implantação de uma Unidade Piloto de Biofixação de CO₂. Trabalho de graduação em Engenharia de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2006.

HENRIKSON R. Microalga *Spirulina*: Superalimento del futuro. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, ISBN: 84-7953-047-2, 1994.

HERNÁNDEZ, R.; BLÉ-CASTILLO, J. L.; JUÁREZ-OROPEZA, M. A.; J.C. DÍAZ-ZAGOYA.. *Spirulina maxima* prevents fatty liver formation in CD-1 male and female mice with experimental diabetes. *Life Sciences*, 69, 1029-1037, 2001.

HERNANDÉZ-MOLEJÓN, O. G. Estudio y Cultivo de la Microalga *Nannochloropsis oculata* (DROOP) HIBBERD, en Cuba. Dissertação–Maestro en Ciencias. Combinado Pesquero Industrial de Casilda, Sancti Spiritus. Ciudad de La Habana. p. 102, 1995.

HERODEK, S.; TÁTRAI, I.; OLÁH, J.; VÖRÖS, L. Feeding experiments with silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) fry. *Aquaculture* (83), 3-4, 15, 331-344, 1989.

HIRANO, M.; MORI, H.; MURA, Y.; MATSUNAGA, N.; NAKAMURA, N.; MATSUNAGA, T. γ -linolenic acid production by microalgae. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 24, 183-191, 1990.

HIRATA, S.; HAYASHITANI, M.; TAYA, M.; TONE, SETSUJI. Carbon dioxide fixation in batch culture of *Chlorella* sp. Using a photobioreactor with a sunlight-collection device. *Journal of fermentation and bioengineering*, 81, 470-472, 1996.

ILLMAN, A. M.; SCRAGG, A. H.; SHALES, S. W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grow in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology* 27, 631-635, 2000.

INVERS, O.; ZIMMERMAN, R. C.; ALBERTE, R. S.; PÉREZ, M.; ROMERO, J. Inorganic carbon sources for seagrass photosynthesis: an experimental evaluation of bicarbonate use in species inhabiting temperate waters. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 265, 203-217, 2001.

ISHIDA, Y.; HIRAGUSHI, N.; KITAGUCHI, H.; MITSUTANI, A., NAGAI, S., YOSHIMURA, M. A Highly CO₂-tolerant diatom *Thalassiosira weissflogii* H1, enriched from coastal sea, and its fatty acid composition. *Fisheries Science*, 66, 655-659, 2000.

JAMES, C.M., AL-HINTY, S., SALMAN, A. E. Growth and omega-3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. *Aquaculture* 77, 337–352, 1989.

KAJIWARA, S.; YAMADA, H.; OHKUNI, N.; OHTAGUCHI, K. Design of the bioreactor for carbon dioxide fixation by *Synechococcus* PCC7942. *Energy Conversion & Management*, 38, 529-532, 1997.

KALACHEVA, G. S.; TRUBACHEV, I. N. Lipids of the blue-green-alga *Synechococcus elongates*. *Soviet plant physiology*, 28 (3), 366-370, 1981.

KAPLAN, D.; RICHMOND, A. E.; DUBINSKY, Z.; AARONSON, S. Algal Nutrition. *In*: RICHMOND, A. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Boca Raton: CRC Press. p. 174-198, 1990.

KARUBE, I., MATSUKAWA, R., CHIHARA, M. Biological CO₂ fixation by microalgae. *Ionics*, 21, 9 – 12, 1995.

KIRK, J. T. O. Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems. Cambridge University Press, Camberra, p. 509, 1994.

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

LAING, I. Cultivation of Marine Unicellular Algae. Lab. Leaflet. Direct. Fish. Res., Lowestoft, 67,1-31, 1991.

LEE, H. Y.; ERICKSON, L. E.; YANG, S. S. Kinetics and Bioenergetics of Light-Limited Photoautotrophic Growth of *Spirulina platensis*. Biotechnology and Bioengineering 29, 832-843, 1987.

LEE, J. S.; KIM, D. K.; LEE, J. P.; PARK, S. C; KOH, J. H; CHO, H. S; KIM, S. W. Effects of SO₂ and NO on growth of *Chlorella* sp. KR-1. Bioresource Technology, 82, 1-4, 2002

LEE, R. E. Phycology. Cambridge: Cambridge University Press. 2nd Edition. p. 645, 1989.

LEHNINGER, A. L. Bioquímica: Componentes moleculares das células. São Paulo. SP. Editora Edgard Blucher LTDA. ISBN 8521200285, 2004.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Fundamentos de Bioquímica. Savier, São Paulo, p. 839, 1995.

LI, Y., NISHIOKA, M., AND SADAKAT, A. M. High Calcium Utilization and Gypsum Formation for Dry Desulfurization Process. Energy & Fuels, 13, 1015-1020, 1999.

MAEDA, K.; OWADA, M.; KIMURA, N.; OMATA, K.; KARNHE, I. Energy Convers. Mgrnt., 36, 717, 1995.

MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K. V. Cinco Reinos: Um Guia Ilustrado dos Filos da Vida na Terra. Terceira Edição. Editora Guanabara Koogan, 2001.

MASLOVA, I. P., MOURADYAN, E. A., LAPINA, S. S., KLYACHKO-GURVICH; D. A. Lipid Fatty Acid Composition and Thermophilicity of Cyanobacteria. Russian Journal of Plant Physiology, 51, 353-360, 2004.

MATSUMOTO, H.; HAMASAKI, A.; SIOJI, N. Influence of CO₂, SO₂ and NO in Flue gas microalgae productivity. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 620-624, 1996.

MEEKS, J. C. *Algal Physiology and Biochemistry*. Berkeley Blackwell Scientific, 1974. *Apud* LEE, H. Y.; ERICKSON, L. E.; YANG, S. S. Kinetics and Bioenergetics of Light-Limited Photoautotrophic Growth of *Spirulina platensis*. *Biotechnology and Bioengineering* 29, 832-843, 1987.

METCALFE, L. D. A. A. & SCHIMITZ, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. *Anal. Chem.* 38, 510, 1966.

MICHEL, J. P. *Manual de Metodologias y Alternativas para el cultivo de Microalgas*. Ensenada, Baja California, Mexico, 1986.

MORAIS, M. G. Fixação de dióxido de carbono e produção de ácidos graxos por microalgas. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2006.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. *Energy Conversion & Management* (2007a): In Press.

MORAIS, M.G., COSTA, J.A.V., Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor, *Journal of Biotechnology* (2007b): In Press.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; DALCANTON, F.; REICHERT, C. C.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F. F. A novel strain of *Spirulina* from southern Brazil with potencial for cultivation. *Memóires de l' Institut Océanographique Paul Ricard*. 20 - 21, 2005.

MURADYAN, E. A., KLYACHKO-GURVICH, G. L., TSOGLIN, L. N., SERGEYENKO, T. V., AND PRONINA, N. A. Changes in Lipid Metabolism during Adaptation of the *Dunaliella salina* Photosynthetic Apparatus to High CO₂ Concentration. *Russian Journal of Plant Physiology* 51, 53-62, 2004.

MURAKAMI, M.; YAMAGUCHI, N.; NISHIDE, T.; MURANAKA, T.; TAKIMOTO, Y. Over-expressed effect of carbonic anhydrase on CO₂ fixation in cyanobacterium,

Synechococcus sp. PCC7942. Advances In Chemical Conversions For Mitigating Carbon Dioxide Studies In Surface Science And Catalysis, 114, 629-632, 1998.

NAVALHO, J. Biotecnologia de *Dunaliella salina* para produção de beta-caroteno. Tese de Mestrado em Aquicultura. Universidade do Algarve -Unidade de Ciências e Tecnologias dos Recursos Aquáticos, 112p. 1998.

NEGORO, M.; SHIOJI, N.; MIYAMOTO, K.; MIURA, Y. Growth of microalgae in high CO₂ gas and effect of SO_x and NO_x. Appl. Biochem. Biotechnol., 28/29, 877-886, 1991.

OHTAGUCHI, K.; KAJIWARA, S.; MUSTAQIM, D.; TAKAHASHI, N. Cyanobacterial bioconversion of carbon dioxide for fuel productions. Energy Conversion & Management, 38, 523-528, 1997.

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. (*Arthospira*) grown on digested pig waste. Biores. Technol. 77, 19-24, 2001.

OLIVERA, A. *Crescimento das diatomáceas Bacillariophyceae Chaetoceros sp., Skeletonema costatum e Thalassiosira fluviatilis* em diferentes meios de cultivo e em condições controladas de temperatura e salinidade. Dissertação de Mestrado-Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p. 64, 1995.

OVERREIN, L. N. Acid precipitation - an international environmental problem. Water Sci. Technol. 15, 1-7, 1983.

PARSONS, T. R.; TAKAHASHI, M.; HARGRAVE, B. Biological Oceanographic Processes. Pergamon Press, Oxford, p. 330, 1984. PARTALI, V.; OLSEN, Y.; FOSS, P.; LIAAEN-JENSEN, S. (1985). Carotenoids in food chain studies - I. Zooplankton (*Daphnia magna*) response to a unialgal (*Scenedesmus acutus*) carotenoid diet, to spinach, and to yeast diets supplemented with individual carotenoids. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 82, 4, 767-772, 1985.

PARTALI, V.; OLSEN, Y.; FOSS, P.; LIAAEN-JENSEN, S. Carotenoids in food chain studies - I. Zooplankton (*Daphnia magna*) response to a unialgal (*Scenedesmus*

acutus) carotenoid diet, to spinach, and to yeast diets supplemented with individual carotenoids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 82, 4, 767-772, 1985.

PIORRECK, M.; BAASCH, K. H.; POHL, P. Biomass production, total protein, chlorophyllis, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry*, 23 (2), 207-216, 1984.

PIRT S. J. The thermodynamic efficiency (quantum demand) and dynamics of photosynthetic growth. *New Phytologist*, 102, 3-37, 1986.

PROSSER, C. L.; HEATH, J. E. Temperature. In: PROSSER, C. I. (Ed.), *Environmental and Metabolic Animal Physiology – Comparative Animal Physiology*. New York, Wiley-Liss, p. 578, 1991.

RADMANN, E. M.; REINEHR, C. O., COSTA, J. A. V. Otimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. *Aquaculture*, 265, 118-126, 2007.

REICHERT, C. C., REINEHR, C. O., COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. *Braz J Chem Eng.* 23, 23-28, 2006.

REINEHR, C. O. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em modo semicontínuo. *Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2003.*

REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Repeated batch cultivation of the microalga *Spirulina platensis*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22, 937-943, 2006.

RENAUD, S. M.; THINH, L. V.; LAMBRIDIS, G.; PARRY, D. L. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, 211, 195-214, 2002.

RICHMOND, A. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Black Well Science, 566, 2004.

RICHMOND, A. Large scale microalgal culture and applications. In *Progress in Physiological Research*. Round & Chapman (Eds). Biopress Ltd. 7, p. 61, 1990.

RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J. W., HERDMAN, M. & STANIER, R. G. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111, 1-61, 1979.

RODRIGUES, J. E. M. Conselhos para colheita e conservação das algas de água doce. *Separata do Anuário da Sociedade Broteriana.* Ano XXI. 1955.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A.; BLÉ-CASTILLO, J. L.; JUÁREZ-OROPEZA, M. A.; DÍAZ-ZAGOYA, J.C. *Spirulina maxima* prevents fatty liver formation in CD-1 male and female mice with experimental diabetes. *Life Sciences*, 69, 1029-1037, 2001.

ROSA, A. P. C.; CARVALHO, L. F.; GOLDBECK. Fixação de gás carbônico por microalgas e obtenção de biomassa para alimentação de animais aquáticos. Trabalho de graduação em Engenharia de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2005.

SAKAI, N., SAKAMOTO, Y., KISHIMOTO, N., CHIHARA, M., KARUBE, I. *Chlorella* strains from hot springs tolerant to high temperature and high CO₂. *Energy Convers Manage.* 16, 693 - 696, 1995.

SANTOS, R. C. Influência da temperatura, iluminância e taxa de aeração na concentração de biomassa da cianobactéria *Spirulina platensis*. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2001.

SARADA, R.; PILLAI, M. J.; RAVISHANKAR, G. A. Phycocyanin from *Spirulina* sp.: influence of precessing of biomass on phycocyanin yeld, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Elsevier Applied Science*, Índia, 1999.

SCHMID, R. Photosynthesis of *Ectocarpus siliculosus* in red light and after pulses of blue light at high pH – evidence for bicarbonate uptake. *Plant, Cell and Environment*, 21, 532-529, 1998.

SCRAGG, A. H., MORRISON, J., SHALES, S. W. The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine. *Enzyme Microb Tech.* 33, 884 - 889, 2003.

SGARBIERI, V. C. Proteínas em Alimentos Protéicos. Propriedades: Degradações: Modificações. Livraria Varela, São Paulo, p. 517, 1996.

SHERIDEN, R. P. 1972. *Apud* LEE, H. Y.; ERICKSON, L. E.; YANG, S. S. Kinetics and Bioenergetics of Light-Limited Photoautotrophic Growth of *Spirulina platensis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 29, 832-843, 1987.

SHUGARMAN, P. M.; APPLEMAN, D. *Plant Physiol.* 41, 1701, 1966. *Apud* LEE, H. Y.; ERICKSON, L. E.; YANG, S. S. Kinetics and Bioenergetics of Light-Limited Photoautotrophic Growth of *Spirulina platensis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 29, 832-843, 1987.

SIEGENTHALER, U.; STOCKER, T. F.; MONNIN, E.; LÜTHI, D.; SCHWANDER, J.; STAUFFER, B.; RAYNAUD, D.; BARNOLA, J. M.; FISCHER, H.; DELMONTT, V. M.; JOUZEL J. Stable carbon cycle-climate relationship during the late Pleistocene. *Science*, 310, 1313-1317, 2005.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56, 8, 365-379, 2002.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; PELICIONE, L. C.; OLIVERA, A. Use of inorganic (NPK) and the Chu₁₂ medium for cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* in laboratory. *Brazilian Journal of Ecology*. 3, 32-37, 1999.

SOEDER, C. J. *An historical outline of applied algology*. 1990. In: Richmond, p. 25-41. 1990.

SORGELLOS, P. High density culturing of the brine shrimp, *Artemia salina* L. *Aquaculture*, (1) 385-391, 1972.

SUKENIK, A.; WAHNON, R. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. *Aquaculture* 91, 61-72, 1991.

SUNG, K. D.; LEE, J. S.; SHIN, C. S.; PARK, S. C., CHOI, M. J. CO₂ fixation by *Chlorella* sp. KR-1 and its cultural characteristics. *Bioresource Technology*, 68, 269-273, 1999.

SUZUKI, Y.; TAKAHASHI, M. Growth responses of several diatom species isolated from various environments to temperature. *Journal of Phycology*, 31, 880-888, 1995.

TAGUCHI, S.; HIRATA, J. A.; LAWS, E. A. Silicate deficiency and lipid synthesis of marine diatoms. *J. Phycol.* 23, 260–267, 1987.

TAMIYA, H., SHIBATA, K., SASA, T., IWAMURA, T., MORIMURA, Y. Effect of Diurnally Intermittent Illumination of the Growth and some Cellular Characteristics of *Chlorella*, in *Algal Culture. From Laboratory to Pilot Plant*, Publ. n 600, BURLEW, J.S., ed. The Carnegie Institution, Washington D.C., 1953. *In: RICHMOND, A. Large scale microalgal culture and applications. In Progress in Phycological Research. Round & Chapman (Eds). Biopress Ltd. 7, p. 61, 1990.*

TANTICHAROEN, M.; REUNGJITCHAWALI, M.; BOONAG, B.; VONDTAVEESUK, P.; VONSHAK, A.; COHEN, Z. Optimization of γ -linolenic acid (GLA) production in *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 6, 295-300, 1994.

THOMPSON, P.A.; GUO, M. Effect of variation in temperature: I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. *J. Phycol.* 28, 481–488, 1992.

TSUZUKI, M., OHNUMA, E., SATO, N., TAKAKU, T., KAWAGUCHI, A. Effects of CO₂ concentration during growth of fatty acid composition in microalgae. *Plant. Physiol.* 93, 851– 856, 1990.

UYSAL, Z. Chroococcoid cyanobacteria *Synechococcus* spp. in the Black Sea: pigments, size, distribution, growth and diurnal variability. *Journal of Plankton Research* 23 (2), 175-189, 2001.

UYSAL, Z. Pigments, size and distribution of *Synechococcus* spp. in the Black Sea. *Journal of Marine Systems* 24 (3-4), 313-326, 2000.

VAN DEN HOEK, C. MANN, D. G.; JAHNS, H. M.N. *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 623, 1995.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira) physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor & Francis, ISBN 0-7484-0674-3, 1997.

VONSHAK, A., ABELIOVICH, A., BOUSSIBA, A., ARAD, S., RICHMOND, A. Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass.* 2, 175 – 185, 1982.

WARD, O. P.; SINGH, A. Omega – 3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochem.* 40, 3627-3652, 2005.

WATANABE, A. List of algal strains in collection at the Institute of Applied Microbiology University of Tokyo. *J Gen Appl Microbiol.* 6, 1 – 4, 1960.

WATANABE, Y.; SAIKI. Development of a photobioreactor incorporating *Chlorella* sp. for removal of CO₂ in stack gas. *Energy Conversion Management*, 38, 499-503, 1997.

WEBER, A.; KABKE, K.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P. Estudo da viabilidade técnica da utilização da água da lagoa Mangueira para a produção de microalgas de valor comercial. Trabalho de graduação em Engenharia de Alimentos – FURG, Rio Grande, 1999.

WEN, Z. Y.; CHEN, F. Production potencial of eicosapentainoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*: effects of silicate and glucose. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 25, 218-224, 2000.

WILLIS, W. M., LENCKI, R. E., MARANGONI, A. G. Lipid modification strategies in the production of nutritionally functional fats and oils. *Crit rev food sci.* 38, 639-674, 1998.

WOOD, A. M.; HORAN, P. K.; MUIRHEAD, K. Discrimination between types of pigments in marine synechococcus spp by scanning spectroscopy, epifluorescence microscopy, and flow-cytometry. *Limnology and Oceanography*, 30 (6), 1303-1315, 1985.

YANAGI, M.; WATANABE, Y.; SAIKI, H. CO₂ fixation by *Chlorella* sp. HA-1 and its utilization. *Energy Conversion & Management*, 36, 713-716, 1995.

YOSHIHARA, K.; NAGASE, H.; EGUSHI, K.; HIRATA, K. Biological elimination of nitric oxide and carbon dioxide from flue gas by marine microalga NOA-113 cultivated in a long tubular photobioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82 (4), 351-354, 1996.

YUN, Y. S.; LEE, S. B.; PARK, J. M.; LEE, C.; YANG, J. W. Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients. *J Chem Tech Biotechnol.* 69, 451-455, 1997.

ZARROUK, C. Contribution a Letude Dune Cyanophyce, Influence de Divers Facteurs physiques et Chimiques sur la Croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* geitler. Ph.D. Thesis University of Paris. 1966.

ZASLAVSKAIA, L. A.; LIPPMEIER, J. C.; SHIH, C.; EHRHARDT, D.; GROSSMAN, A. R.; APT, K. E. Trophic conversion of an obligate photoautotrophic organism through metabolic engineering. *Science*, 292, 2073-2075, 2001.

ZEILER, K., HEACOX, D., TOON, S., KADAM, K., AND BROWN, L. The Use of Microalgae for Assimilation and Utilization of Carbon Dioxide from Fossil Fuel-fired Power Plant Flue Gas. *Energy Conversion Management*, 36, 707-71, 1995.

Páginas Internet

<http://ptsoft.net/vastro/referencia/estufa/poluentes/poluentes.html>, acessada em novembro 2005.

9 ANEXOS

9.1 Figuras

9.1.1 Isolamento de microalgas



(a)



(b)

Figura A1 Amostras de água da lagoa de estabilização da Usina Termelétrica Presidente Médici – UTPM/CGTEE, sul do Brasil; em meio Zarrouk e BG-11. (a) 2 dias após a inoculação; (b) 15 dias após a inoculação.

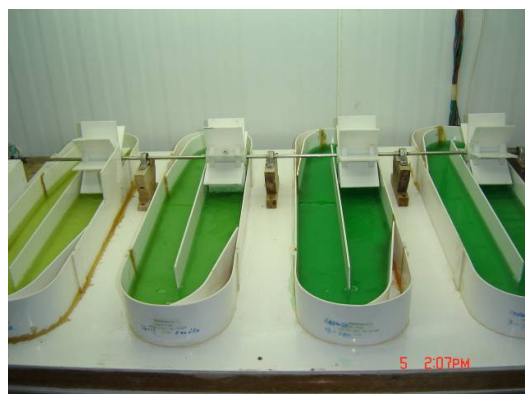


Figura A2 Amostras de água da lagoa de estabilização da Usina Termelétrica Presidente Médici – UTPM/CGTEE, sul do Brasil; em fotobiorreatores abertos do tipo raceway de 6L.



Figura A3 Amostras isoladas em placa de ELISA.



Figura A4 Amostras em fotobiorreatores fechados do tipo erlenmeyers de 6L e de 0,5L.



Figura A5 Amostras inoculadas em fotobiorreatores do tipo erlenmeyer.



Figura A6 Amostras encaminhadas para identificação

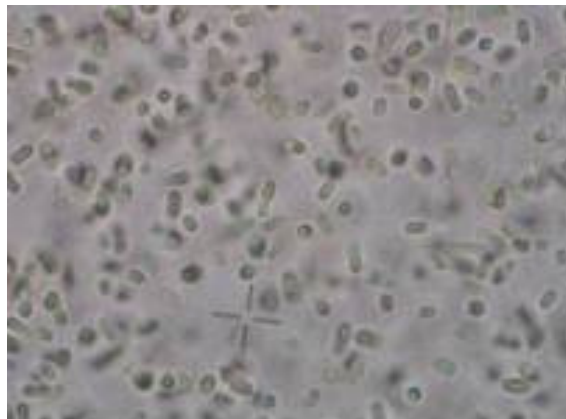


Figura A7 Vista geral de células de *Synechococcus nidulans*

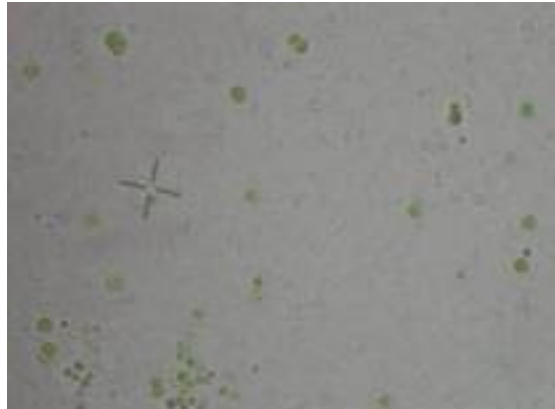


Figura A8 Vista geral de células de *Chlorella vulgaris*

9.1.2 Cultivo de microalgas



Figura A9 Cultivos realizados em FBRT de 2L.



Figura A10 Cultivos realizados em FBRT de 2L em série.

9.2 Metodologias

9.2.1 Metodologia para determinação de lipídios em microalgas a partir do método de FOLCH & LEES (1957).

- Pesar 0,5 g de amostra;
- Adicionar 5 mL de clorofórmio: metanol (2:1);
- Agitar em ultrassom durante 5 min e centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min;
- Recolher o sobrenadante com uma pipeta e repetir os passos anteriores 3 vezes;
- Filtrar os sobrenadantes em papel filtro, lavando o filtro com 10 mL da mistura de reagentes;
- Em funil de separação adicionar 1/4 do volume de KCl 0,88%. Misturar cuidadosamente. Na separação de fases, utilizar a fase inferior;
- Adicionar 1/4 do volume de metanol água (2:1), agitar cuidadosamente e na separação de fases, utilizar fase inferior;
- Filtrar em sulfato de sódio anidro;
- O filtrado colocar em um balão de fundo chato previamente tarado e pesado e evaporar o solvente em rotaevaporador;
- Levar à estufa a 50⁰C durante 2 h, pesar;
- Determinar o percentual de lipídios em g.100g⁻¹ de biomassa.

9.2.2 Metodologia para esterificação de lipídios segundo METCALFE & SCHIMITZ (1966)

- Ao lipídio extraído adicionar em balão de fundo chato 3mL de hexano BF₃ 8% e agitar;
- colocar no condensador a 100°C por 50 min, misturar ocasionalmente e checar se não há perda. Esfrie a temperatura ambiente;
- passar para tubo de centrífuga de 10mL e adicionar 1mL de hexano e 2mL de água destilada. Agitar;
- centrifugue 5 min;
- com pipeta automática remover a camada superior para outro tubo;
- repetir na camada inferior mais duas extrações;
- adicionar 2mL de água destilada, agitar e centrifugar 2 min,
- transferir a camada superior para outro tubo contendo sulfato de sódio anidro, misturar e centrifugar;
- transferir para outro tubo e deixar o sulfato de sódio anidro no fundo;
- evaporar sob nitrogênio em banho Maria;
- injetar em cromatógrafo gasoso adicionando 1mL de hexano;

9.3 Meios de cultivo

9.3.1 Meio Zarrouk (ZARROUK, 1966).

Tabela 9.3.1.1 Composição do Meio Zarrouk

Reagentes	Quantidade (g.L ⁻¹)
NaHCO ₃	16,8
K ₂ HPO ₄	0,50
NaNO ₃	2,50
K ₂ SO ₄	1,00
NaCl	1,00
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,20
CaCl ₂	0,04
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,01
EDTA	0,08
Solução A5	1 mL
Solução B6	1 mL

Fonte: ZARROUK, 1966.

Solução A5: (g.L⁻¹): H₃BO₃: 2,86; MnCl₂. 4H₂O: 1,81; ZnSO₄. 7H₂O: 0,222; CuCO₄.5H₂O:0,079; MnO₃: 0,015.

Solução B6: (mg.L⁻¹): NH₄VO₃: 22,86; KCr(SO₄)₂. 12 H₂O: 192; NiSO₄. 6H₂O: 44,8; Na₂WO₄. 2H₂O: 17,94; TiOSO₄. 8H₂O: 61,1; CO(NO₃)₂. 6H₂O: 43,98.

9.3.2 Meio MC (WATANABE, 1960).

Tabela 9.3.2.1 Composição do meio MC.

Reagente	Quantidade (g.L⁻¹)
KNO ₃	1,25
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,25
KH ₂ PO ₄	1,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,02
Solução A5	1 mL

Fonte: WATANABE, 1960.

Solução A5: (g.L⁻¹): H₃BO₃: 2,86; MnCl₂. 4H₂O: 1,81; ZnSO₄. 7H₂O: 0,222; CuCO₄.5H₂O:0,079; MnO₃: 0,015.

9.3.3 Meio Bristol's Modificado MBM (WATANABE, 1960).

Tabela 9.3.3.1 Composição do meio MBM.

Reagente	Quantidade (gL⁻¹)
KNO ₃	0,25
CaCl ₂	0,01
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075
K ₂ HPO ₄	0,075
KH ₂ PO ₄	0,175
NaCl	0,025
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,02
Solução A5	1 mL

Fonte: WATANABE, 1960.

9.3.4 Meio BG-11 (RIPKA et al., 1979).

Tabela 9.3.4.1 Composição do meio MBM.

Reagente	Quantidade (g.L ⁻¹)
NaNO ₃	1,50
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,036
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,04
Citrato férrico	0,006
EDTA	0,001
Na ₂ CO ₃	0,02
Ácido cítrico	0,006
H ₃ BO ₃	2,86.10 ⁻³
MnSO ₄ .H ₂ O	1,70.10 ⁻³
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,222.10 ⁻³
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,39.10 ⁻³
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,079.10 ⁻³
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,04.10 ⁻³

Fonte: RIPKA et al. (1979)