UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Estudo das condições ambientais no cultivo de *Arthrospira*
(*Spirulina*) *platensis* em fotobiorreator tubular por processo
descontínuo alimentado com uréia como fonte de nitrogênio

Ana Lucía Morocho Jácome

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

São Paulo

2010

Ana Lucía Morocho Jácome

Estudo das condições ambientais no cultivo de *Arthrospira*
(*Spirulina*) *platensis* em fotobiorreator tubular por processo
descontínuo alimentado com uréia como fonte de nitrogênio

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho
Orientador/Presidente

Prof. Dr. José Abrahão Neto
1º. examinador

Prof. Dr. Marcelo Palma Sircili
2º. examinador

São Paulo, Março de 2010

O coração do entendido adquire o conhecimento, e o ouvido dos sábios busca a sabedoria.

Provérbios 18, 15

*Aos meus amados pais, Leonor e Jaime,
pelo amor brindado na minha educação.*

AGRADECIMENTOS

Infinita gratidão a Deus, pela vida, pelas oportunidades e pela sua presença incondicional sempre.

Ao Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho, pela confiança, pelos ensinamentos, pelo apoio, e sobre tudo, pela paciência e amizade que recebi ao longo do meu mestrado.

Ao Prof. Tit. Adalberto Pessoa Júnior e Prof. Tit. Sunao Sato pela confiança depositada em meu trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, ao técnico do laboratório, Prof. Dr. Dante Augusto de Moraes (Laboratório de Tecnologia de Fermentações), Elza e Miriam (Secretaria–FBT), pela disponibilidade e ajuda.

Aos secretários da Pós-Graduação–FCF, Jorge Alves de Lima e Elaine Midori Ychico pela eficiência no atendimento aos pós-graduandos.

Aos amigos pós-graduandos da FCF/USP, em especial, Raquel Pedrosa Bezerra, Marcelo Chuei Matsudo, Mayla Rodrigues, Livia Seno, Ivan Ávila e Carolina Cruz, por compartilhar seus conhecimentos e pelo apoio no laboratório.

Às alunas da Iniciação Científica, Camila Knysak e Lais Guimarães, pela disponibilidade e ajuda na parte experimental deste trabalho.

Aos meus amados pais, Leonor Jácome e Jaime Morocho, meu irmão, Jaime Patricio, a minha sobrinha Emily Maily, porque a pesar da distancia, sempre estiveram comigo, me apoiando e me incentivando.

Aos meus amigos equatorianos, Edison Sotomayor, Santiago Vaca, Tammia Chiriboga, Jenny Salcedo, Jenny Paucar, Angélica Reyes, Judith e Alexandra Parra, Silvia Clavijo e Gabriela Sarzosa, que mesmo distantes, sempre me animaram e tiveram palavras de conforto nos momentos difíceis.

Aos amigos do Centro Universitário Jacamar, especialmente, Sussana, Elisa e Javier, que com carinho, me animaram durante a pós-graduação.

Aos amigos do Laboratório de Produtos Naturais na Faculdade de Ciências Químicas da Universidade Central do Equador, Profa. Dra. Ximena Chiriboga e Prof. Dr. Patricio Miño, porque graças a sua confiança, o começo da minha vida acadêmica foi bem mais produtivo.

Finalmente, ao Programa Estudantes Convênio – Pós-Graduação (PEC–PG) do MEC e ao CNPq, pelo apoio financeiro que permitiu a execução desse trabalho.

RESUMO

JÁCOME, A. L. M. **Estudo das condições ambientais no cultivo de *Arthrospira (Spirulina) platensis* em fotobiorreator tubular por processo descontínuo alimentado com uréia como fonte de nitrogênio**. 2010. 119 p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A cianobactéria *Arthrospira (Spirulina) platensis*, uns dos microrganismos fotossintetizantes mais estudados e cultivados no planeta, tem uma composição particular de biomassa que inclui: elevado conteúdo de proteínas, ácidos graxos poliinsaturados, pigmentos naturais e outras substâncias de interesse nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. Estudos recentes demonstram que devido a sua composição de biomassa, está sendo estudada para a extração de biocompostos e para a produção de biocombustíveis. O uso de fontes de nitrogênio de baixo custo, como a uréia, pode contribuir para a viabilização da produção deste microrganismo. *A. platensis* foi cultivada em fotobiorreatores tubulares fechados de capacidade de 3,5 L, com intensidade luminosa de $120 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ utilizando processo descontínuo alimentado com uréia como fonte de nitrogênio com adição intermitente. O planejamento experimental utilizado foi de modelo fatorial 2^2 , acrescido dos pontos centrais, mais configuração estrela que permitiu avaliar o efeito das variáveis independentes temperatura (T) e vazão molar de alimentação diária de uréia (K). Os resultados foram avaliados com auxílio da metodologia de superfície de resposta que permitiu verificar, através da otimização simultânea das variáveis independentes, uma condição ótima de $T = 32 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e $K = 1,16 \text{ mM.dia}^{-1}$ para o crescimento de *A. platensis* durante 8 dias de cultivo, conseguindo-se nestas condições, concentração celular máxima de $4186 \pm 39 \text{ mg.L}^{-1}$, produtividade celular de $757 \pm 8 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e fator de conversão de nitrogênio em células de $14,3 \pm 0,1 \text{ mg.mg}^{-1}$. Os valores de X_m obtidos experimentalmente correspondem a 0,4 % a menos do que os valores máximos estimados pelo modelo matemático. O teor de lipídeo da biomassa não foi influenciado pelas condições experimentais adotadas neste trabalho,

sendo os valores obtidos dentro da faixa citada na literatura para este microrganismo (aproximadamente 7 %). O teor de proteína da biomassa foi dependente da temperatura e da vazão molar de alimentação diária de uréia. Para vazões molares de uréia até 0.717 mM. dia⁻¹, o aumento da temperatura diminui o teor de proteínas na biomassa. Por outro lado, para valores de vazão de uréia maiores ($\geq 0,883$ mM.dia⁻¹), o aumento da temperatura leva ao aumento do teor de proteínas na biomassa. O maior valor de teor de proteína obtido neste trabalho foi de 39,49 % (T = 33 °C, K = 1,879 mM.dia⁻¹).

Palavras-chave: *Arthrospira (Spirulina) platensis*. Processo descontínuo alimentado. Temperatura. Uréia. Vazão molar.

ABSTRACT

JÁCOME, A. L. M. **Study of environment conditions of *Arthrospira (Spirulina) platensis* culture in tubular photobioreactor using fed-batch process with urea as nitrogen source.** 2010. 119 p. Master Dissertation – Faculty of Pharmaceutical Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

The cyanobacterium *Arthrospira (Spirulina) platensis*, one of the most studied and cultivated photosynthetic microorganisms in the planet, has a unique biomass composition that includes: high protein content, polyunsaturated fat acids, natural pigments and other substances of interest in food, pharmaceutical and cosmetic industries. Recent studies demonstrate that due to its biomass composition, it has been studied for biocomponents extraction and bio-fuels production. The use of low cost nitrogen sources, such as urea, can contribute to the viability of this microorganism production. *A. platensis* was cultivated in 3.5-liters closed tubular photobioreactors, under luminous intensity of $120 \mu\text{mol f\acute{otons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}}$, using fed-batch cultivation process with urea as nitrogen source, added intermittently. The utilized experimental design was one of a factorial model 2^2 , increased of the central points and star configuration, which allowed evaluating the effect of the independent variables, such as temperature (T) and urea daily molar flow-rate (K). The results were evaluated with response surface methodology (RSM) that allowed verifying, through the simultaneous optimization of the independent variables, an optimum condition of $T = 32 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and $K = 1.16 \text{ mM.dia}^{-1}$ for the growth of *A. platensis* during 8 days of culture, obtaining maximum cellular concentration of $4186 \pm 39 \text{ mg.L}^{-1}$, cellular productivity of $757 \pm 8 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ and nitrogen-to-cells factor of $14.3 \pm 0.1 \text{ mg.mg}^{-1}$. The X_m values obtained experimentally corresponds to 0.4 % less than the maximum values estimated by the mathematical model. The biomass lipid content was not influenced by the experimental conditions adopted in this work, being the obtained values within the range mentioned in the literature for this microorganism (approximately 7 %). The biomass protein content was dependent of the temperature and urea molar flow-rate. For the latter parameter, values up to $0.717 \text{ mM.dia}^{-1}$, the increase in temperature diminished

biomass protein content. On the other hand, for higher urea molar flow-rate values ($\geq 0,883 \text{ mM.dia}^{-1}$), the increase of temperature leads to increase of biomass protein content. The highest value of biomass protein content obtained in this work was of 39.49 % ($T = 33 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $K = 1.879 \text{ mM.dia}^{-1}$).

Keywords: *Arthrospira (Spirulina) platensis*. Fed-batch process.

Temperature. Urea. Molar flow-rate.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1. Histórico	23
2.2. Cianobactérias	24
2.3. <i>Arthrospira</i> sp.	25
2.3.1. Classificação e Morfologia	25
2.3.2. Propriedades e Aplicações	26
2.3.3. Produção e Comercialização	29
2.3.4. Condições de cultivo	29
2.3.4.1. Fonte de nitrogênio	30
2.3.4.2. pH	31
2.3.4.3. Temperatura	32
2.3.4.4. Luz	34
2.3.5. Fotobiorreator tubular	36
2.3.6. Processo descontínuo alimentado de cultivo	37
3. OBJETIVOS	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1. Microrganismo	41
4.2. Meios de cultura	41
4.3. Inóculo	43
4.4. Dispositivo de cultura	43
4.5. Experimentos realizados	44
4.6. Técnicas analíticas	46
4.6.1. Acompanhamento do cultivo	46
4.6.1.1. Determinação da concentração celular	46
4.6.1.2. Determinação da concentração de amônia total	47
4.6.1.3. Determinação da concentração de carbonato total	47
4.6.1.4. Determinação do pH	48
4.6.2. Avaliação da biomassa	48
4.6.2.1. Determinação do teor de proteínas	49
4.6.2.2. Determinação do teor de lipídios	49

5. ANÁLISE DOS RESULTADOS	50
5.1. Cálculo dos parâmetros cinéticos	50
5.1.1. Produtividade em células	50
5.1.2. Fator de conversão de nitrogênio em células	51
5.2. Análise estatística	51
5.3. Descrição de um experimento	52
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
6.1. Curvas de calibração	54
6.1.1. Determinação da concentração celular	54
6.1.2. Determinação da concentração de amônia total	55
6.2. Resultados	56
6.3. Discussões	85
6.3.1. Avaliação do crescimento celular	87
6.3.2. Avaliação da biomassa	90
6.3.3. Análise Estatística	92
6.3.3.1. Concentração celular máxima	92
6.3.3.2. Produtividade em células	95
6.3.3.3. Fator de conversão de nitrogênio em células	98
6.3.4. Crescimento de <i>A. platensis</i> nos pontos de ótimo	101
7. CONCLUSÕES	104
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> UTEX1926 (Fonte: UTEX, 2006)	41
Figura 2.	Valores codificados dos experimentos realizados (X_1 , temperatura; X_2 , vazão molar de uréia) referentes ao planejamento inicial (♦) e aos experimentos adicionais (●)	44
Figura 3.	Curva de calibração para determinação da concentração celular de suspensões de <i>A. platensis</i>	54
Figura 4.	Curva de calibração para determinação da concentração de amônia total em amostras isentas de células de <i>A. platensis</i>	55
Figura 5.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E_1	57
Figura 6.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E_2	58
Figura 7.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E_3	59
Figura 8.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E_4	60
Figura 9.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E_5	61
Figura 10.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E_6	62
Figura 11.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E_7	63
Figura 12.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E_8	64
Figura 13.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E_9	65
Figura 14.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E_{10}	66
Figura 15.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E_{11}	67

Figura 16.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E ₁₂	68
Figura 17.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E ₁₃	69
Figura 18.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E ₁₄	70
Figura 19.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E ₁₅	71
Figura 20.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E ₁₆	72
Figura 21.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E ₁₇	73
Figura 22.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E ₁₈	74
Figura 23.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E ₁₉	75
Figura 24.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E ₂₀	76
Figura 25.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E ₂₁	77
Figura 26.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E ₂₂	78
Figura 27.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E ₂₃	79
Figura 28.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo de confirmação da otimização O ₁	80
Figura 29.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo de confirmação da otimização O ₂	81
Figura 30.	Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo de confirmação da otimização O ₃	82
Figura 31.	Fase lag apresentada nos cultivos E ₁ (T = 33,0 °C; K = 0,385 mM.dia ⁻¹) e E ₆ (T = 23,3 °C; K = 0,551 mM.dia ⁻¹)	88

Figura 32.	Superfície de resposta para a concentração celular máxima (X_m) em função dos valores codificados de temperatura (X_1) e de vazão molar de alimentação diária de uréia (X_2)	94
Figura 33.	Gráfico de contorno para a concentração celular máxima (X_m) em função dos valores codificados de temperatura (X_1) e de vazão molar de alimentação diária de uréia (X_2)	95
Figura 34.	Superfície de resposta para a produtividade em células (P_X) em função dos valores codificados de temperatura (X_1) e de vazão molar de alimentação diária de uréia (X_2)	97
Figura 35.	Gráfico de contorno para a produtividade em células (P_X) em função dos valores codificados de temperatura (X_1) e de vazão molar de alimentação diária de uréia (X_2)	98
Figura 36.	Superfície de resposta para o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função dos valores codificados de temperatura (X_1) e de vazão molar de alimentação diária de uréia (X_2)	100
Figura 37.	Gráfico de contorno para o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função dos valores codificados de temperatura (X_1) e de vazão molar de alimentação diária de uréia (X_2)	101
Figura 38.	Concentração celular (X) de <i>A. platensis</i> , em função do tempo, referentes aos cultivos de ponto central do planejamento (E_9 – E_{11}) (●); barras de erro correspondentes ao desvio padrão	102
Figura 39.	Concentração celular (X) de <i>A. platensis</i> , em função do tempo, referentes aos cultivos de ponto de ótimo (O_1 – O_3) (●); barras de erro correspondentes ao desvio padrão	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição de aminoácidos essenciais de <i>Arthrospira platensis</i> e <i>Arthrospira máxima</i>	27
Tabela 2.	Teor de alguns dos ácidos graxos poliinsaturados encontrados em <i>Arthrospira platensis</i>	27
Tabela 3.	Comparação entre fotobiorreatores abertos e tubulares no cultivo de microalgas	36
Tabela 4.	Composição do meio mineral de cultura de Schlösser (SCHLÖSSER, 1982)	42
Tabela 5.	Valores codificados e reais das variáveis experimentais: temperatura (X_1) e vazão molar de uréia (X_2) dos experimentos realizados	45
Tabela 6.	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E_1 ($T = 33,0\text{ }^{\circ}\text{C}$; $K = 0,385\text{ mM.dia}^{-1}$)	57
Tabela 7.	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E_2 ($T = 33,0\text{ }^{\circ}\text{C}$; $K = 0,717\text{ mM.dia}^{-1}$)	58
Tabela 8.	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E_3 ($T = 25,0\text{ }^{\circ}\text{C}$; $K = 0,717\text{ mM.dia}^{-1}$)	59
Tabela 9.	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E_4 ($T = 25,0\text{ }^{\circ}\text{C}$; $K = 0,385\text{ mM.dia}^{-1}$)	60
Tabela 10.	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E_5 ($T = 29,0\text{ }^{\circ}\text{C}$; $K = 0,316\text{ mM.dia}^{-1}$)	61
Tabela 11.	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E_6 ($T = 23,3\text{ }^{\circ}\text{C}$; $K = 0,551\text{ mM.dia}^{-1}$)	62

Tabela 12.	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E ₇ (T = 29,0 °C; K = 0,786 mM.dia ⁻¹)	63
Tabela 13.	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E ₈ (T = 34,6 °C; K = 0,551 mM.dia ⁻¹)	64
Tabela 14.	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E ₉ (T = 29,0 °C; K = 0,551 mM.dia ⁻¹)	65
Tabela 15.	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E ₁₀ (T = 29,0 °C; K = 0,551 mM.dia ⁻¹)	66
Tabela 16.	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E ₁₁ (T = 29,0 °C; K = 0,551 mM.dia ⁻¹)	67
Tabela 17.	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E ₁₂ (T = 25,0 °C; K = 0,883 mM.dia ⁻¹)	68
Tabela 18.	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E ₁₃ (T = 29,0 °C; K = 0,883 mM.dia ⁻¹)	69
Tabela 19.	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E ₁₄ (T = 33,0 °C; K = 0,883 mM.dia ⁻¹)	70
Tabela 20.	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E ₁₅ (T = 37,0 °C; K = 0,883 mM.dia ⁻¹)	71
Tabela 21.	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E ₁₆ (T = 33,0 °C; K = 0,786 mM.dia ⁻¹)	72

Tabela 22.	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E ₁₇ (T = 37,0 °C; K = 0,717 mM.dia ⁻¹)	73
Tabela 23.	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E ₁₈ (T = 29,0 °C; K = 1,215 mM.dia ⁻¹)	74
Tabela 24.	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E ₁₉ (T = 33,0 °C; K = 1,215 mM.dia ⁻¹)	75
Tabela 25.	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E ₂₀ (T = 37,0 °C; K = 1,215 mM.dia ⁻¹)	76
Tabela 26.	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E ₂₁ (T = 29,0 °C; K = 1,879 mM.dia ⁻¹)	77
Tabela 27.	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E ₂₂ (T = 33,0 °C; K = 1,879 mM.dia ⁻¹)	78
Tabela 28.	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E ₂₃ (T = 37,0 °C; K = 1,879 mM.dia ⁻¹)	79
Tabela 29	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao cultivo de confirmação da otimização O ₁ (T = 31,74 °C; K = 1,16 mM.dia ⁻¹)	80
Tabela 30.	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao cultivo de confirmação da otimização O ₂ (T = 31,74 °C; K = 1,16 mM.dia ⁻¹)	81
Tabela 31.	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao cultivo de confirmação da otimização O ₃ (T = 31,74 °C; K = 1,16 mM.dia ⁻¹)	82

Tabela 32.	Teor de proteínas e lipídeos na biomassa seca de <i>Arthrospira platensis</i> dos experimentos realizados	83
Tabela 33.	Valores de X_m (concentração celular máxima), P_x (produtividade em células) e $Y_{x/N}$ (fator de conversão de nitrogênio em células) relacionados com as variáveis estudadas	84
Tabela 34.	Análise da regressão multivariável para X_m	93
Tabela 35.	Análise de variância do modelo de regressão multivariável para X_m	93
Tabela 36.	Análise da regressão multivariável para P_x	96
Tabela 37.	Análise de variância do modelo de regressão multivariável para P_x	96
Tabela 38.	Análise da regressão multivariável para $Y_{x/N}$	99
Tabela 39.	Análise de variância do modelo de regressão multivariável para $Y_{x/N}$	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC	Association of Analytical Communities
Co	(do inglês <i>Company</i>) Empresa
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EQ	equação
FAO	Food and Agriculture Organization
lag	Fase de adaptação do crescimento microbiano
S.A.	Sociedade Anônima
SCP	(do inglês <i>single cell protein</i>) proteína obtida a partir de microrganismos
<i>sp.</i>	(do latim <i>specie</i>) espécie
U.S.	(do inglês <i>United States</i>) Estados Unidos de América
UTEX	(do inglês <i>University of Texas</i>) Universidade do Texas

LISTA DE SÍMBOLOS

E	cultivos referentes ao planejamento experimental
F	valor do Teste F da análise de variância da regressão multivariável
K	vazão molar de alimentação diária de uréia ($\text{mM} \cdot \text{dia}^{-1}$)
N_T	quantidade total de nitrogênio adicionado (mg)
O	cultivos referentes ao ponto de ótimo
p	nível descritivo correspondente ao erro
pH	Potencial hidrogeniônico
P_X	produtividade em células ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$)
t_c	tempo (dias)
T	Valor do Teste t da regressão multivariável
T	temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
U.S.\$	Moeda norte-americana Dólar
V	volume do meio (L)
X	concentração celular
X_1	valor codificado da variável temperatura
X_2	valor codificado da variável vazão molar de alimentação diária de uréia
X_i	concentração celular inicial em base seca ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
X_m	concentração celular máxima em base seca ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
$Y_{X/N}$	fator de conversão da fonte de nitrogênio em células ($\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$)

1. INTRODUÇÃO

Os cultivos de microalgas e cianobactérias estão relacionados com importantes necessidades humanas, podendo ser destacadas a produção de alimentos, tratamento de efluentes e remoção de gás carbônico atmosférico e/ou industrial.

Os microrganismos fotossintetizantes mais estudados são *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*, *Dunaliella salina*, *Chlorella vulgaris*. Porém a pesquisa destas e outras cianobactérias cresce a cada dia, principalmente visando à produção de biocombustíveis.

Arthrospira platensis é uma fonte reconhecida de proteínas que vem sendo cultivada fotoautotroficamente para a produção de biomassa com alto conteúdo protéico, da ordem de 70 % em massa seca (PELIZER *et al.*, 2003). Sua biomassa possui boa digestibilidade e baixo teor de ácidos nucléicos (CIFERRI & TIBONI, 1985). Contém vitaminas A, E, K, B e C (BECKER, 1981), ácidos graxos poliinsaturados (MAHAJAN & KAMAT, 1995), bem como pigmentos e antioxidantes (PULZ & SCHEIBENBOGEN, 1998).

As fontes convencionais de nitrogênio utilizadas para a produção de *Arthrospira* são os nitratos de potássio ou de sódio. No entanto, a utilização do processo descontínuo alimentado possibilitou o uso de uréia como fonte de nitrogênio em reatores abertos (DANESI *et al.*, 2002; SANCHEZ-LUNA *et al.*, 2007), e em fotobiorreatores tubulares (MATSUDO *et al.*, 2009) acarretando numa diminuição considerável do custo de produção.

O cultivo de cianobactérias pode ocorrer em reatores abertos ou fechados. O uso de reatores tubulares, caracterizados como reatores fechados, permite a obtenção de altas concentrações, diminuição de contaminantes, bem como a menor perda de CO₂ (TREDICI & CHINI ZITTELLI, 1998). Biorreatores fechados têm sido utilizados em escala industrial na produção de *Haematococcus* e *Chlorella* (SPOLAORE *et al.*, 2006).

O pH, é uma variável ambiental de destacada influência no crescimento microbiano. No caso de cultivo de *Arthrospira*, a importância é maior ainda, pois determina a forma que a fonte de carbono se apresenta. O meio padrão para *Arthrospira* (SCHLÖSSER, 1982) é rico em bicarbonato e carbonato e

devido à presença deles e meio é alcalino. A forma de carbono preferencialmente assimilada por cianobactérias é o bicarbonato, sendo o pH ideal de cultivo aquele que assegure o maior deslocamento do equilíbrio químico no sentido de sua formação. Particularmente em cultivo com fonte de nitrogênio que leva à formação de amônia no meio de cultivo, o pH também determina a forma em que esta substância se apresenta no meio de cultivo. Em pH abaixo de 8,0 há uma predominância de íon amônio. Em pH acima de 11,0, o nitrogênio encontra-se na forma não protonada de amônia que é a forma que tem passagem livre pela membrana celular (BELKIN & BOUSSIBA, 1991).

A temperatura é outro parâmetro de grande importância no crescimento de todos os microrganismos. Em particular, Vonshak (1997a) reportou que a *Arthrospira* cresce numa faixa ótima de 24–32 °C, de acordo com a espécie.

Este trabalho demonstra a influência da temperatura e da vazão molar de uréia no cultivo de *A. platensis* em fotobiorreator tubular usando processo descontínuo alimentado, bem como na composição da biomassa.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

Os primeiros usos de microalgas como alimento ocorreram com os chineses e remonta 2000 anos, utilizando *Nostoc* como para sobreviver em épocas de escassez de alimento. Adicionalmente, a *Arthrospira* era produto de consumo dos Astecas, no Vale do México, e da população do Lago Chaad, na África (PARADA *et al.*, 1998).

A biomassa de *Arthrospira* sp. seca era consumida pela população asteca residente nas proximidades do Lago Texcoco na época da colonização espanhola. Tenochtitlán (atual cidade do México), densamente povoada na época da colonização espanhola, possuía praças e mercados onde a biomassa desse microrganismo era vendida com o nome de *tecuitlatl* (LACAZ–RUIZ, 2003). Acredita-se que o prato mexicano, junto com o milho e tabaco tenha sido levado à África nas viagens de ida, em navios que transportavam escravos africanos para a América, tornando-se um alimento para o povo Kanembu, na África Central, que cultivam essa cianobactéria no Lago Chade (CIFERRI & TIBONI, 1985; DURAND-CHASTEL, 1980).

Apesar do contato do homem com microalgas e cianobactérias advir de tempos remotos, a biotecnologia microalgal somente realmente começou na metade do século passado. Atualmente, o mercado de biomassa algal produz aproximadamente 5000 toneladas de matéria seca por ano e movimenta aproximadamente U.S. \$ $1,25 \times 10^9$ ano⁻¹ (SPOLAORE *et al.*, 2006). A produção de microalgas fotossintetizantes obteve uma grande ascensão no mundo em função da possibilidade de utilização de culturas de algas como renovadoras de oxigênio e fonte de proteína alimentar em vôos espaciais (BOROWITZKA, 1999). No final dos anos 70, Sosa Texcoco Co., localizada no México, foi a primeira indústria a produzir a *Arthrospira* sp. em larga escala. Posteriormente, diversos países como Taiwan, Índia, Estados Unidos, México e Japão iniciaram a produção desta cianobactéria em biorreatores abertos (SHIMAMATSU *et al.*, 2004).

2.2 Cianobactérias

Cianobactérias são bactérias fotossintetizantes que requerem apenas nutrientes inorgânicos, água e luz para seu crescimento que está caracterizado por altas velocidades (CHRONAKIS *et al.*, 2000).

A produção de proteínas de microrganismos é uma via alternativa de disponibilidade de fonte protéica para alimentação. Esse tipo de proteína é conhecido como proteína unicelular (*single cell protein*–SCP), leveduras e bactérias, particularmente as cianobactérias (LITCHFIELD, 1977).

Tacon & Jackson (1985) enumeraram as seguintes vantagens das cianobactérias como fonte alternativa protéica: a) são capazes de utilizar fontes de carbono inorgânico e orgânico; b) possuem em torno de 40–70 % de proteína bruta em função da espécie; c) apresentam tempos de geração curtos sob condições ótimas de crescimento; d) são facilmente cultivadas em pequenas áreas; e) permitem possíveis manipulações genéticas para alteração de sua composição.

O cultivo de cianobactérias é um ramo da biotecnologia moderna, embora haja registros de cultivo de *Chlorella vulgaris* já em 1890 (BOROWITZA, 1999). Na década de 50 foram estudados principalmente os gêneros *Chlorella* e *Scenedesmus*, que apresentaram dificuldade de secagem da biomassa, elevado custo de extração de componentes, e baixa digestibilidade da parede celulósica (RICHMOND, 1989).

O cultivo comercial em larga escala iniciou-se por volta de 1960, no Japão, também com *Chlorella* (TSUKADA; KAWAHARA; MIYACHI, 1977). Na década seguinte, foi introduzida a comercialização de *Spirulina* (DURAND-CHASTEL, 1980); tal gênero foi considerado um avanço por não apresentar nenhuma das dificuldades mencionadas.

2.3 *Arthrospira* sp.

A microalga *Arthrospira platensis* vem sendo cultivada fotoautotroficamente para a produção de biomassa com alto conteúdo protéico, da ordem de 70 % em massa seca (PELIZER *et al.*, 2002), colocando-se acima das carnes (15–25 %) e da soja (DILLON; PHUC; DUBACQ, 1995; STANCA & POPOVIC, 1996). Apresenta a vantagem de não conter o colesterol das carnes, é pouco calórica, além de conter todos os aminoácidos essenciais recomendados pela FAO. Sua biomassa é caracterizada pela boa digestibilidade e por possuir baixo teor de ácidos nucléicos, não ultrapassando 5 % da massa seca (CIFERRI & TIBONI, 1985; BALLONI *et al.*, 1981; DURAND-CHASTEL, 1980). Adicionalmente, tem em sua constituição vitaminas A, E, K, B e C (BECKER, 1981), ácidos graxos polinsaturados (MAHAJAN & KAMAT, 1995), bem como polissacarídeos com propriedade imunomodulatória, pigmentos e antioxidantes (PULZ & SCHEIBENBOGEN, 1998).

A *Arthrospira* cresce em meios líquidos específicos ricos em sais minerais, compostos principalmente por bicarbonato e carbonato de sódio, com pH de 8 a 11. As regiões propícias são as tropicais e subtropicais quentes e ensolaradas. Isoladas no México, Tchad, Etiópia, Quênia, Zaire, Zâmbia, etc., as espécies do gênero *Arthrospira* constituem um dos raros exemplos de cianobactérias continentais utilizadas naturalmente como alimento humano e animal (ABDIN EL SHERIF & CLEMENT, 1982).

2.3.1. Classificação e Morfologia

Arthrospira pertencente à ordem *Oscillatoriales*, família *Cyanophyceae*, é uma cianobactéria filamentosa, de cor verde azulada, caracterizada por uma cadeia de células cilíndricas dispostas de forma helicoidal, denominados tricomas (GUGLIELMI; RIPPKA; TANDEAU DE MARSAC, 1993), que variam de tamanho e morfologia conforme as condições de crescimento, porém

possuem geralmente cerca de 500 µm de comprimento e de 6 a 12 µm de diâmetro (TOMASELLI, 1997).

Existe discordância entre diversos autores em relação à denominação desta cianobactéria. As espécies pertencem ao gênero *Arthrospira*, que foi oficialmente incluído no *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (CASTENHOLZ, 1989) no ano de 1989, e que foi diferenciado do gênero *Spirulina* com base em diversas características morfológicas e genéticas (TOMASELLI, 1997; SANCHEZ *et al.*, 2003).

2.3.2. Propriedades e Aplicações

As proteínas representam até 74 % da massa seca de *Arthrospira*, valor este que varia conforme a espécie e as condições de crescimento (COHEN, 1997). Entre as proteínas estão presentes as ficocianinas, biliproteínas envolvidas nas reações bioquímicas de fotossíntese e que funcionam como reservatórios de nitrogênio (CIFERRI, 1983). Segundo Dillon, Phuc e Dubacq (1995), esta cianobactéria representa uma das mais ricas fontes de proteínas, e seu conteúdo é superior ao de carnes e peixes (15–25 %) e também ao da soja (35 %). Os autores afirmam que até 47 % da proteína presente equivalem a aminoácidos essenciais (TAB. 1), com a presença inclusive de metionina, aminoácido ausente na maioria das cianobactérias e algas.

Os ácidos graxos poliinsaturados presentes nesta cianobactéria são, principalmente, os ácidos palmítico, linoléico, oléico e, especialmente, os ácidos essenciais alfa-linolênico e gama-linolênico, correspondendo estes últimos a até 30 % de todos os ácidos graxos presentes (HIRANO *et al.*, 1990). *Arthrospira* é única por conter uma concentração superior de ácido gama-linolênico: 1 % da massa seca, quando comparada com os organismos vegetais (DILLON; PHUC; DUBACQ, 1995).

O teor de ácidos graxos presentes varia conforme a espécie ou subespécie de cianobactéria (HONGSTHONG *et al.*, 2007) e as condições de crescimento, principalmente ao que se diz respeito à fonte de nitrogênio (TAB. 2) (PIORRECK; BAASCH; POHL, 1984).

Tabela 1. Composição de aminoácidos essenciais de *Arthrospira platensis* e *Arthrospira maxima*

Aminoácidos	<i>A. platensis</i>	<i>A. maxima</i>
	(mg AA . g PTN ⁻¹)	
Fenilalanina	53	49
Histidina	22	17
Isoleucina	67	60
Leucina	98	87
Lisina	48	41
Metionina	25	20
Treonina	62	49
Triptofano	3	12
Valina	71	63

FONTE: Dillon; Phuc; Dubacq, 1995.

Tabela 2. Teor de alguns dos ácidos graxos poliinsaturados encontrados em *Arthrospira platensis*

Ácidos graxos poliinsaturados	Teor %, em relação ao conteúdo protéico
Palmítico	34 – 42
Palmitoléico	9 – 11,5
Oléico	3 – 8
Linoléico	19 – 26
Gamma-linolênico	16 – 25

FONTE: Piorreck; Baasch; Pohl, 1984; Hongsthong *et al.*, 2007.

Dentre os pigmentos presentes em *Arthrospira*, destacam-se os carotenóides (ANNAPURNA; DEOSTHALE; BAMJI, 1991), especialmente beta-caroteno (CARERI *et al.*, 2001); e a clorofila (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004), encontrados, respectivamente, em teores de até 0,4 e 1,5 % na biomassa seca (CIFERRI, 1983). Recentemente, maior atenção vem sendo dada à *Arthrospira*

pelo potencial de coloração de seus pigmentos de interesse às indústrias de alimentos, farmacêuticas e de cosméticos (DANESI *et al.*, 2004). Existe atualmente uma tendência na substituição de corantes artificiais por produtos naturais (DANESI *et al.*, 2002), o que sugere a possibilidade de maior exploração das espécies de *Arthrospira*, pois essas cianobactérias são uma das principais fontes de clorofila na natureza. Está constituída de clorofila “a”, exclusivamente (PAOLETTI *et al.*, 1980).

Devido à composição química particular e pela presença de outros compostos fitoquímicos de ação antioxidante (HERRERO *et al.*, 2005), as cianobactérias do gênero *Arthrospira* são atrativas para produção de alimentos ou suplementos alimentícios, seja para alimentação humana ou animal.

Existem muitos estudos com *Arthrospira* focados na produção de biomassa com finalidade alimentícia. Morist *et al.* (2001), por exemplo, desenvolveram um processo de recuperação e uma série de tratamentos adicionais para utilização da biomassa, cultivada em fotobiorreator contínuo, na produção de alimento para sustento do homem em missões espaciais. Concluíram que preparações baseadas nesta cianobactéria podem ser consideradas como uma fonte alimentar potencial com tal objetivo, pois a biomassa pode ser eficientemente obtida e tratada, e é estável quanto às suas características microbiológicas, químicas e nutricionais.

No entanto, as utilizações de *Arthrospira* não são restritas à alimentação. Vários outros estudos foram realizados acerca das utilizações diversas dessa cianobactéria. Chronakis *et al.* (2000) destacaram que as proteínas de *A. platensis* podem ser usadas com estabilizantes de emulsões e espumas, como agentes emulsificantes e gelatinizantes, pois apresentam pequena tensão interfacial ar/água. Mosulishvili *et al.* (2002) estabeleceram que selênio e iodo podem ser incorporados à biomassa desta cianobactéria sem alteração de suas propriedades naturais, e que o cultivo em condições controladas, com a utilização de reagentes com alto grau de pureza, possibilita a utilização de *A. platensis* para a produção de produtos farmacêuticos.

Recentemente, a biomassa de *A. platensis* tem sido testada para remoção de materiais indesejáveis como excesso de fertilizantes, metais pesados, corantes têxteis e pesticidas de diversos tipos de efluentes

(CHOJNACKA *et al.*, 2005; SOLISIO *et al.*, 2006; PANE *et al.*, 2008; LODI *et al.*; 2008).

2.3.3. Produção e Comercialização

A primeira planta experimental para a produção de *A. platensis* foi desenvolvida na década dos anos 60 pelo Institut Française du Pétrole. Segundo Ciferi & Tiboni, 1985, o Japão e os Estados Unidos de América têm produção em escala industrial. Além disso, mais de 40 tipos de produtos estão disponíveis no mercado. Atualmente, a indústria biotecnológica de microalgas tem se expandido significativamente no mundo (PULZ & GROSS, 2004).

No Brasil, devido aos problemas de nutrição deficiente e pela existência de regiões com condições climáticas adequadas, a produção de *A. platensis* pode ser considerada como uma alternativa econômica e social (PELIZER *et al.*, 2003).

2.3.4. Condições de cultivo

Quanto aos aspectos tecnológicos de cultivo da *Arthrospira*, esta apresenta vantagens em relação aos demais fotoautotróficos. Dentre estas, podem ser citadas o crescimento em pH alcalino e altamente salino, fatores importantes na prevenção de contaminação no reator por microrganismos estranhos (WALACH *et al.*; 1987, BOROWITZKA, 1999) e a separação fácil do meio de cultivo, devido à forma espiralada e maiores dimensões (RICHMOND, 1983; PIORRECK *et al.*, 1984). Desenvolve-se em meios em que os constituintes principais são as fontes minerais de carbono (carbonatos, bicarbonatos), fósforo e nitrogênio (normalmente, nitratos) e cresce bem em temperaturas da ordem de 30 °C (VONSHAK, 1997a).

2.3.4.1. Fonte de nitrogênio

Sabe-se que a quantidade e qualidade da fonte de nitrogênio usada no meio de cultura podem influenciar no conteúdo de proteína, bem como em outros constituintes da *Spirulina sp.*, tais como lipídeos e suas frações e pigmentos (BOUSSIBA & RICHMOND, 1980; PIORRECK *et al.*, 1984; NAES & POST, 1988; STANCA & POPOVIC, 1996; RANGEL, 2000; SASSANO, 1999). Neste sentido, muitos trabalhos foram realizados visando à utilização de diversas fontes de nitrogênio para o cultivo de *A. platensis*, e os melhores resultados atribuídos aos nitratos em termos de biomassa produzida (FAINTUCH, 1989; CORNET *et al.* 1998), o que confirma a ampla utilização dos meios de Paoletti (PAOLETTI *et al.*, 1975) e Zarrouk (STANCA & POPOVIC, 1996), que utilizam KNO_3 e NaNO_3 como fonte de nitrogênio, respectivamente.

Faintuch (1989), estudando diferentes fontes de nitrogênio para cultivo de *S. maxima* por processo descontínuo, verificou que a utilização de fontes alternativas de nitrogênio em vez de nitrato, como cloreto de amônio e uréia, só foram viáveis com reduzidos níveis de concentração do nutriente, com conseqüente diminuição da quantidade de biomassa produzida.

Saxena *et al.* (1983), trabalhando com produção de *A. platensis* a partir de águas residuárias domésticas adicionadas de sais, conseguiram bons resultados com uréia a 0,01 % como complementação, embora os teores protéicos maiores tenham sido obtidos para a fonte nitrato de sódio 0,1 %. Isso poderia ser esperado em função do planejamento executado, que levou ao fornecimento de 3,53 vezes mais nitrogênio (considerando em número de átomos) na complementação realizada com nitrato. Há estudos indicando que durante depleção de nitrato o crescimento pára e apoproteínas e ficocianinas são degradadas para suprir as necessidades de nitrogênio (CORNET *et al.*, 1998), o que poderia ser estendido para outras fontes, uma vez que o nitrogênio incorporado nos aminoácidos é o amoniacal. Com respeito aos sais de amônio (cloreto e sulfato de amônio), Saxena *et al.* (1983) encontraram os piores resultados em relação aos nitratos, o que provavelmente se deve aos

baixos suprimentos (valores da ordem de 10^{-4} g de nitrogênio por litro de meio de cultivo).

Segundo Danesi *et al.*, 2002, uma vantagem da uréia em relação aos nitratos é que fornece dois átomos de nitrogênio. Além disso, a uréia como fonte de nitrogênio provê um ganho energético pela hidrólise espontânea até amônia em meio alcalino, que depois é assimilada pela *Spirulina*.

O cultivo de *Spirulina platensis* utilizando uréia gerou um aumento de 37 % na produção de biomassa e até menor custo quando foi comparado com os cultivos realizados com KNO_3 (DANESI *et al.*, 2002).

Na *S. platensis*, a deficiência de nitrogênio durante o período de crescimento leva a um decréscimo na produção de ficocianina e clorofila, também a composição de ácidos graxos pode ser afetada (FUNTEU *et al.*, 1997).

Com a adição de fonte de nitrogênio em cultivos deficientes em nitrogênio ocorre um rápido aumento na quantidade de proteínas, tais como ficocianinas e, com menos intensidade, são produzidas outras proteínas celulares (CORNET *et al.*, 1998).

O uso de uréia como fonte de nitrogênio, evita o efeito inibitório observado com cloreto de amônio, e as curvas de crescimento que descrevem o processo não apresentam fase lag. O rendimento de biomassa em nitrogênio diminui progressivamente com o aumento da vazão molar de uréia. (SANCHEZ-LUNA *et al.*, 2007).

2.3.4.2. pH

O meio padrão para *Spirulina* (SCHLÖSSER, 1982) é rico em bicarbonato e carbonato. Este meio é alcalino devido à presença destes íons. A forma de carbono preferencialmente assimilada por cianobactérias é o bicarbonato, sendo o pH ideal de cultivo aquele que assegure o maior deslocamento do equilíbrio químico no sentido de sua formação. Particularmente em cultivo com fonte de nitrogênio que leva à formação de amônia, o pH também determina a forma em que esta substância se apresenta

no meio de cultivo. Em pH abaixo de 8,0 há uma predominância de íon amônio. Em pH acima de 11,0, o nitrogênio encontra-se na forma não protonada de amônia que é a forma que tem passagem livre pela membrana celular (BELKIN & BOUSSIBA, 1991).

A assimilação fotossintética do carbono é realizada pela passagem ativa de bicarbonato do meio de cultura para o interior das células, onde no sistema fotossintético ocorre a captura do anidrido carbônico com conseqüente liberação do carbonato remanescente (FERRAZ, 1986). Assim, com o crescimento celular tem-se um aumento do valor de pH, pelo acúmulo de carbonato no meio. Por isso, para o controle do pH, é necessária a manutenção da relação bicarbonato/carbonato que assegure o pH desejado. Isso pode ser feito pelo borbulhamento de anidrido carbônico (CO₂) ou pode-se restabelecer o pH por acréscimo de ácido mineral, deslocando o equilíbrio no sentido de formação de bicarbonato. Neste estudo optou-se pelo uso de gás carbônico para o controle de pH, pois não aumenta a salinidade do meio de cultivo, o que poderia levar a uma inibição do crescimento microbiano (VONSHAK *et al.*, 1996). Por outro lado, seu emprego no cultivo de *A. platensis* é extremamente vantajoso considerando que em cultivos em grande escala muito gás carbônico seria fixado na forma orgânica, evitando a emissão desse gás para a atmosfera, contribuindo para diminuição do efeito estufa.

2.3.4.3. Temperatura

É importante conhecer o efeito da temperatura no cultivo, esse efeito é explicado como se fossem dois fatores: pela ação da temperatura na estrutura dos componentes celulares (proteínas e lipídeos) e pela relação dos coeficientes de temperatura com a taxa de reação os quais dependem das energias de ativação das reações (FAINTUCH, 1989).

Vonshak (1997a) reportou que a *Arthrospira* cresce numa faixa ótima de 24–32 °C, de acordo com a espécie. A temperatura mínima permitida para o crescimento de *Arthrospira* sp. é de 18 °C (JIMÉNEZ *et al.*, 2003).

Embora Rafiqui *et al.* (2005) reportaram que as condições ótimas na produção de biomassa para *S. platensis* são 32 °C e pH de 9.0, e Abu *et al.* (2007) reportaram que as condições ótimas de crescimento de *S. platensis* são 30 °C e pH de 9.0, neste trabalho foi considerado como ponto central uma temperatura de 29 °C e pH de 9,5, verificadas como ótimas para o crescimento de *A. platensis* UTEX 1926 em biorreatores abertos (SANCHEZ-LUNA *et al.*, 2007).

É importante estudar a influência da temperatura nos reatores tubulares, já que altera a solubilidade de oxigênio, pois, no uso de reator fechados, o oxigênio tende a se concentrar, chegando a valores da ordem de até 30 mg.L⁻¹, o que pode prejudicar o crescimento celular.

A temperatura tem influência importante na produção de biomassa, proteínas, lipídios e compostos fenólicos no cultivo de *A. platensis* (35 °C que têm um efeito negativo na produção de biomassa, porém tem um efeito positivo na produção de proteína, lipídios e compostos fenólicos). Foram obtidas concentração de biomassa e produtividade altas aos 30 °C, embora a concentração de nitrogênio demonstrasse não ter nenhum efeito na quantidade de proteína, lipídios ou compostos fenólicos produzidos (COLLA *et al.*, 2005).

Colla *et al.*, 2005 demonstraram que houve maior crescimento de *A. platensis* com 30 °C do que com 35 °C porque a pressão parcial do CO₂ no meio é maior com 30 °C do que com 35 °C provocando uma maior concentração de bicarbonato e concomitantemente um aumento na taxa fotossintética. Ademais, com elevadas temperaturas (i.e. 35 °C), há um aumento na atividade respiratória na fase escura da respiração, onde as células usam material de reserva (e.g. carboidratos) na respiração e diminui o crescimento celular. (VONSHAK *et al.*, 1983).

Gao *et al.* (2008) afirmaram que as baixas temperaturas de manhã e elevada quantidade de luz produz fotoinibição nos cultivos de *A. platensis* provocando mudanças na morfologia celular como produto de mudanças fisiológicas e moleculares da célula.

A elevada densidade populacional provoca um efeito de fotoproteção, evitando danos morfológicos no espiral, inibição fotossintética e danos no DNA, independente da temperatura analisada. Porém, temperaturas inferiores as reportadas como favoráveis dentro da faixa ótima de 24–32 °C produzem

danos morfológicos e fotoinibição. O dano na espiral pode se produzir pela degradação de proteínas de membrana que são essenciais na manutenção da estrutura espiral, a degradação poderia acontecer com baixas temperaturas quando sua síntese é lenta. Na condição de elevada quantidade de luz e baixa temperatura, não há balanço entre a energia transferida e o processo de fixação de carbono que, concomitantemente, produz energia excessiva provocando fotoinibição e dano protéico (GAO *et. al.*, 2008). Esse fenômeno é evidenciado pela alteração ou dano na morfologia da estrutura espiral, porém, sem alteração do DNA.

Gao e Ma (2008), estudaram o crescimento de *A. platensis* em resposta a radiação UV. Demonstraram a proteção fotossintética dos carotenóides da *A. platensis* contra UV-B e observaram que a estrutura espiral da célula muda de acordo com variações ambientais. Mühling *et. al.* (2003) demonstraram que a orientação da hélice pode ser revertida com mudança de temperatura. Também afirmaram que a célula reta é menos capaz de boiar e por isso diminui a sua possibilidade de receber luz em tanques abertos.

Vonshak (1997a) reportou que a fotoinibição em cultivos de *A. platensis* pode acontecer quando a concentração celular está em valores inferiores de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ devido ao excesso de luz que incide no cultivo, que induz processos fisiológicos e metabólicos, como a acumulação de H_2O_2 , o que diminui ou inibe o uso de luz pela célula.

Mühling *et al.* (2003) sugerem que nos cultivos de *Arthrospira* sp. a 20°C , a irradiação superior a $60 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (5 klux) favorece a desnaturação dos ácidos graxos da membrana. Essa desnaturação pode ser explicada pela danificação da membrana celular e/ou aparato fotossintético causado pelo efeito fotoinibitório.

2.3.4.4. Luz

Atendidas as necessidades de nutrientes, de forma a que estes não limitem o crescimento, fatores ambientais são extremamente importantes no crescimento microalgal, influenciando na produtividade e na composição

química da *Arthrospira* sp. (OLGUÍN *et al.*, 1997). Dentre estes fatores, merece destaque a intensidade luminosa utilizada no cultivo. A intensidade e a duração da irradiação luminosa determinam a taxa de crescimento e o rendimento da produção, limitados, entretanto, por mecanismos enzimáticos do microrganismo. Este limite é denominado ponto de saturação luminosa, sendo, segundo Balloni *et al.*, 1980, da ordem de 5 a 10 klux.

Vonshak *et al.* (1983) mostraram que um fator importante, que influencia a taxa de crescimento e a eficiência fotossintética, é o ciclo claridade/escuridão ao qual a célula do biorreator aberto é exposta durante o dia. O regime claridade/escuridão é afetado pela intensidade de agitação do tanque, da turbulência e da densidade populacional (RICHMOND, 1988; RANGEL, 2000). Em condições de baixa intensidade luminosa, a velocidade de crescimento é diminuída, com conseqüente pequena produção de biomassa (BALLONI *et al.*, 1980).

No entanto, a iluminação muito forte dos cultivos de algas gera dois efeitos principais: fotoinibição, que leva a um decréscimo no rendimento máximo do crescimento e fotoxidação, que tem efeitos letais nas células, podendo levar à perda total da cultura (JENSEN & KNUTSEN, 1993). A fotonibição ocorre com o aumento da intensidade luminosa acima do nível de saturação da taxa fotossintética. Entretanto, este fenômeno também pode ocorrer sob intensidades luminosas moderadas se a taxa fotossintética estiver limitada por fatores estressantes, como baixas temperaturas, por exemplo, (SAMUELSSON *et al.*, 1985). Ademais, a intensidade luminosa exerce influência marcante nos parâmetros de crescimento celular, como fator de crescimento em células e produtividade em células, bem como na composição da biomassa obtida. Altos valores de intensidades luminosas favorecem os parâmetros de crescimento, enquanto que valores mais baixos (da ordem de 2 klux) favorecem a obtenção de biomassa rica em clorofila (DANESI *et al.*, 2004). Também se encontraram informações que as condições de iluminação do cultivo afetam a fração lipídica da biomassa (MAHAJAN & KAMAT, 1995).

Há aumento na síntese de carboidratos quando o cultivo de *A. platensis* é realizado com altos valores de intensidade luminosa ou com uma temperatura inferior à ótima em cultivos feitos em reatores abertos, o excesso de carboidratos sintetizados durante a fase luminosa são parcialmente

utilizados pela célula na síntese de proteína na fase escura (TORZILLO & VONSHAK, 1995).

2.3.5. Fotobiorreator tubular

Para o cultivo temos dois tipos de sistema: tanques abertos com moderada relação superfície/volume ($3\text{--}10\text{ m}^{-1}$) e fotobiorreatores com elevada relação superfície/volume ($25\text{--}125\text{ m}^{-1}$) (WEISSMAN *et al.*, 1988).

Enquanto os sistemas de cultivo de tanques abertos são de baixo custo, os fotobiorreatores fornecem outras vantagens (ROSELLO–SASTRE *et al.* 2007) como: maior relação superfície/volume, habilidade de prevenir contaminação, capacidade para obter alta densidade e alta produtividade de biomassa, e assim, alta taxa de fixação de CO_2 (TAB. 3).

O reator tubular que tem a configuração mais conhecida (TRAVIESO *et al.*, 2001), tem uma seqüência de tubos transparentes diretos para captar a luz solar. Um diâmetro pequeno de tubo, geralmente 0,1 m ou menos, é necessário para garantir produtividade elevada de biomassa.

Tabela 3. Comparação entre fotobiorreatores abertos e tubulares no cultivo de microalgas

Sistema	Reator aberto	Fotobiorreator tubular
Eficiência de luz	Bom	Excelente
Controle de temperatura	Nenhum	Excelente
Transferência de gás	Escasso	Baixo – Alto
Oxigênio produzido	Baixo	Alto
Acumulação	Baixo	Baixo – Alto
Stress hidrodinâmico na alga	Difícil	Fácil
Controle de espécies	Nenhum	Executável
Esterilidade	Baixo	Alto
Valor para ampliar escala	Baixo	Alto

FONTE: Vonshak; Richmond, 1988; Rosello Sastre *et al.*, 2007; Travieso *et al.*, 2001

2.3.6. Processo descontínuo alimentado de cultivo

Sassano (1999) afirma que a forma de adição do substrato nas domas pode interferir na qualidade da biomassa produzida. No processo descontínuo, todo o substrato é adicionado no início do cultivo, mas o processo descontínuo alimentado é uma técnica onde um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador no decorrer do cultivo e, os produtos aí permanecem até o final do processo. Nesta operação, a mudança de volume pode ou não ocorrer, dependendo da concentração de substrato no meio de alimentação e da taxa de evaporação do sistema (CARVALHO & SATO, 2001).

Deve-se mencionar que parte do desenvolvimento do processo descontínuo alimentado tem se dado empiricamente em escala industrial, e essas informações, quase sempre determinantes da viabilidade da produção industrial, constituem segredo industrial e dificilmente são divulgadas (YAMANE & SHIMIZU, 1984).

Algumas das finalidades ao se empregar as fermentações descontínuas alimentadas são:

- a) Minimizar efeitos do controle do metabolismo celular, como indução ou inibição por feed-back, como por exemplo, a indução da formação de proteases em cultivos com microrganismos modificados geneticamente para produção de proteínas, ou quando do trabalho com mutantes auxotróficos para produção de aminoácidos.
- b) Adequar o cultivo microbiano a condições operacionais, por exemplo, visando menor formação de espuma, como ocorreu no Brasil devido ao aumento da capacidade volumétrica dos fermentadores após o Pró-Álcool, na década de 70.
- c) Minimizar a formação de produtos de metabolismo tóxicos, que pode levar a baixos títulos do produto desejado, que é o caso quando se trabalha com bactérias geneticamente modificadas, como a *Escherichia coli*, ou com cultivo de células animais, com formação de metabólitos tóxicos, como ácido acético e ácido láctico, respectivamente.
- d) Evitar inibição por substrato ou precursores, como por exemplo, nos casos de produção de biomassa microbiana a partir de metanol como fonte de nitrogênio.

Então, o processo descontínuo alimentado é uma técnica muito útil quando se trata de evitar fenômenos de inibição e formação de produtos tóxicos de metabolismo, adequar condições operacionais em processos fermentativos e para realizar estudos de cinética. Tem aplicação em produção de levedura (LEE & KIM, 2001), antibióticos (CRUZ *et al.*, 1999), aminoácidos (SASSI *et al.*, 1998), etanol (CARVALHO *et al.*, 2003), enzimas (ECHEGARAY *et al.*, 2000), e até mesmo em cultivo de células animais (XIE & WANG, 1994).

Um parâmetro que também influencia no processo descontínuo alimentado é a forma de alimentação do nutriente de interesse. Por exemplo, a alimentação deste pode ocorrer de acordo com um protocolo de adição pré-estabelecido ou por meio de um processo de retroalimentação, ou seja, em decorrência de medidas realizadas no meio em cultivo e/ou até mesmo no gás de exaustão, que podem estar ocorrendo continuamente ou através da retirada de amostras. No caso da alimentação ser determinada por um protocolo pré-estabelecido, a adição pode se dar de forma contínua ou de forma intermitente, por meio de pulsos. Neste caso, outra variável se apresenta, que seria o intervalo de tempo para que esses pulsos sejam realizados. Dessa forma, Danesi *et al.* (2002) e Sanchez-Luna *et al.* (2004), trabalhando com vazão de alimentação exponencialmente crescente e constante, respectivamente, obtiveram bons resultados utilizando alimentação por pulsos a cada 24 horas.

Particularmente, em trabalho recente, Ferreira (2008) cultivando *A. platensis* em fotobiorreator tubular, determinou experimentalmente que as vazões de alimentação de sulfato de amônio que dariam sustentação adequada ao crescimento celular seriam as parabólicas. Adicionalmente, devido ao intenso crescimento celular observado nos cultivos, a demanda por nitrogênio era extremamente alta, chegando, nos crescimentos ótimos, a valores da ordem de 12 mM.dia^{-1} . Como uma única adição de fonte de nitrogênio amoniacal que leve a concentração da ordem de 6 mM leva a uma diminuição da velocidade específica de crescimento (CARVALHO *et al.*, 2004), considerando o período todo do cultivo, a adição de 12 mM.dia^{-1} , numa única adição diária, muito provavelmente levaria a morte celular. Dessa forma, a adição parcelada e 8 vezes levou a excelentes resultados, com obtenção de concentrações celulares máximas da ordem de 14 g.L^{-1} .

Matsudo (2006) estudou o processo descontínuo alimentado repetitivo no cultivo de *A. platensis* utilizando uréia como fonte de nitrogênio visando diminuir os custos de produção e aumento de produtividade, verificando que os teores de proteínas e lipídios não foram alterados pelas condições utilizadas no processo.

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como principal objetivo verificar a influência da temperatura e da vazão molar de alimentação diária de uréia na produção de *Arthrospira platensis* por processo descontínuo alimentado, em fotobiorreator tubular.

Como objetivos específicos podem ser listados:

- Utilização da metodologia de superfície de resposta na determinação das condições ótimas de crescimento (temperatura e vazão molar de alimentação diária de uréia) na produção de *A. platensis* em fotobiorreator tubular.
- Análise da influência da temperatura e da vazão molar de alimentação diária de uréia nos teores de lipídios e proteínas na biomassa.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado para a realização dos cultivos foi *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* UTEX1926 (FIG. 1), proveniente da UTEX (*The Culture Collection of Algae of the University of Texas at Austin* – U.S.).

Esta cianobactéria foi mantida em meio de cultura líquido padrão (SCHLÖSSER, 1982), de maneira asséptica, em temperatura ambiente e sem agitação.

Figura 1. *Spirulina platensis* UTEX1926 (Fonte: UTEX, 2006)

4.2. Meios de cultura

Foram utilizados dois tipos de meio de cultura líquido: um meio padrão (TAB. 4), contendo nitrato de sódio como fonte de nitrogênio (SCHLÖSSER, 1982), e este mesmo meio, porém preparado com uréia em substituição ao nitrato de sódio, denominado meio modificado.

Tabela 4. Composição do meio mineral de cultura de Schlösser (SCHLÖSSER, 1982)

Reagente Químico	Concentração
NaHCO_3	$13,61 \text{ g.L}^{-1}$
Na_2CO_3	$4,03 \text{ g.L}^{-1}$
K_2HPO_4	$0,50 \text{ g.L}^{-1}$
NaNO_3	$2,50 \text{ g.L}^{-1}$
K_2SO_4	$1,00 \text{ g.L}^{-1}$
NaCl	$1,00 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$0,20 \text{ g.L}^{-1}$
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$0,04 \text{ g.L}^{-1}$
Vitamina B_{12}	1 mL.L^{-1}
Solução PIV – metal *	6 mL.L^{-1}
Solução CHU **	1 mL.L^{-1}

*Solução de metais - PIV (mg.L^{-1}): Na_2EDTA , 750; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 97; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 41; ZnCl_2 , 5; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4.

**Solução de micronutrientes - CHU (mg.L^{-1}): Na_2EDTA , 50; H_3BO_3 , 618; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 19,6; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 44; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 12,6; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 12,6.

O meio de cultura padrão foi utilizado para a manutenção do microrganismo e para a etapa de preparo de inoculo, enquanto que o meio de cultura modificado foi utilizado para a realização de todos os cultivos deste trabalho.

A fonte de nitrogênio foi adicionada posteriormente conforme o plano de alimentação.

O valor de pH inicial de ambos os meios de cultura foi de $9,5 \pm 0,2$.

4.3. Inóculo

Sob condições assépticas, uma pequena quantidade da cultura de *A. platensis*, foi transferida para um tubo de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura líquido padrão (SCHLÖSSER, 1982). Após quinze dias, a suspensão foi transferida para frascos *Erlenmeyer* de 500 mL, contendo 200 mL do mesmo meio de cultura previamente utilizado. Estes frascos foram mantidos em frequência de agitação de 100 rpm, temperatura de 30 ± 1 °C (VONSHAK, 1997b) e intensidade luminosa de $72 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (CARVALHO *et al.*, 2004) por cerca de seis a oito dias, durante os quais o crescimento, caracteristicamente exponencial (PELIZER *et al.*, 2003), foi acompanhado.

A suspensão resultante de *A. platensis* foi filtrada, lavada com solução fisiológica para retirada do nitrato de potássio, e ressuspensa em meio de cultura modificado. Esta suspensão, contendo células em crescimento em fase exponencial, serviu de inóculo para todos os cultivos deste trabalho, de tal forma que a concentração celular inicial de cada cultivo foi de 400 mg.L^{-1} (SOLETTO *et al.*, 2008, FERREIRA, 2008).

4.4. Dispositivo de cultura

O fotobiorreator tubular utilizado foi do tipo *air-lift*, desenvolvido no Laboratório de Tecnologia de Fermentações do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. É constituído de tubos transparentes de diâmetro interno de 1,0 cm. O volume total do sistema foi de 3,5 L e o volume iluminado correspondeu a 2,0 L, com fluxo da cultura de $40 \pm 1 \text{ L.h}^{-1}$.

4.5. Experimentos realizados

Os experimentos realizados estão apresentados na Tabela 5, divididos do modo seguinte:

- Parte A. Planejamento experimental inicial, cultivos experimentais E₁ a E₈, nos quais foram aplicadas diferentes temperaturas e diversas quantidades de uréia por unidade de volume de reator, assim como os cultivos experimentais E₉ a E₁₁, correspondentes ao ponto central de tal planejamento (FIG. 2).
- Parte B. Cultivos experimentais adicionais para a otimização do processo, E₁₂ a E₂₃, justificados pelo item 5.2. (FIG. 2)
- Parte C. Cultivos experimentais de confirmação do ponto de ótimo, O₁ a O₃, correspondentes à concentração celular máxima (X_m) obtida pela metodologia de superfície de resposta.

Na Figura 2 estão representados os experimentos iniciais (Parte A) (♦) e os experimentos adicionais para otimização do processo (Parte B) (●).

Figura 2. Valores codificados dos experimentos realizados (X_1 , temperatura; X_2 , vazão molar de uréia) referentes ao planejamento inicial (♦) e aos experimentos adicionais (●)

Tabela 5. Valores codificados e reais das variáveis experimentais: temperatura (T) e vazão molar de uréia (K), referentes aos experimentos realizados

Cultivos	Valores codificados		Valores reais	
	X_1^a	X_2^b	T (°C)	K (mM.dia ⁻¹)
Parte A: Planejamento experimental inicial				
E ₁	-1	-1	25,0	0,385
E ₂	1	-1	33,0	0,385
E ₃	-1	1	25,0	0,717
E ₄	1	1	33,0	0,717
E ₅	0	-1,414	29,0	0,316
E ₆	-1,414	0	23,3	0,551
E ₇	0	1,414	29,0	0,786
E ₈	1,414	0	34,6	0,551
E ₉	0	0	29,0	0,551
E ₁₀	0	0	29,0	0,551
E ₁₁	0	0	29,0	0,551
Parte B: Experimentos adicionais para otimização do processo				
E ₁₂	-1	2	25,0	0,883
E ₁₃	0	2	29,0	0,883
E ₁₄	1	2	33,0	0,883
E ₁₅	2	2	37,0	0,883
E ₁₆	1	1,414	33,0	0,786
E ₁₇	2	1	37,0	0,717
E ₁₈	0	4	29,0	1,215
E ₁₉	1	4	33,0	1,215
E ₂₀	2	4	37,0	1,215
E ₂₁	0	8	29,0	1,879
E ₂₂	1	8	33,0	1,879
E ₂₃	2	8	37,0	1,879
Parte C: Experimentos para confirmação da otimização				
O ₁	0,685	3,667	31,74	1,160
O ₂	0,685	3,667	31,74	1,160
O ₃	0,685	3,667	31,74	1,160

^a valor codificado da variável temperatura (T)

^b valor codificado da variável vazão molar de alimentação diária de uréia (K)

O planejamento experimental utilizado foi de modelo fatorial 2^2 , acrescido dos pontos centrais mais configuração estrela (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). Tal planejamento, de composição central, é baseado na realização de quatro experimentos nos níveis clássicos do planejamento fatorial 2^n (valores codificados $\pm 1,000$), e mais quatro experimentos com rotação de 45° (valores codificados $\pm 1,414$), experimentos que, quando dispostos sobre os anteriores, apresentam configuração de uma estrela (FIG. 2).

O expoente “n” é determinado pelo número de fatores considerados no planejamento; neste trabalho foi representado pela temperatura e pela quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume de reator. Três repetições do ponto central foram realizadas, a fim de determinar a variabilidade experimental. O ponto ótimo foi obtido a partir da diferenciação do modelo matemático de X_m em função das variáveis independentes codificadas avaliadas.

Os valores codificados do planejamento experimental fatorial apresentam relação proporcional aos valores reais de ambos os fatores considerados (temperatura e quantidade da fonte de nitrogênio). Cada unidade de valor codificado corresponde ao valor real de 4°C ou $0,166\text{ mM}$ de uréia; o ponto central é representado por 29°C e $0,551\text{ mM}$ de uréia (SANCHEZ-LUNA *et al.*, 2007).

4.6. Técnicas analíticas

4.6.1. Acompanhamento do cultivo

4.6.1.1. Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada por turbidimetria, conforme descrito por Leduy e Therien (1977). Foram utilizadas amostras de 5 mL de meio contendo células, retiradas após a homogeneização dos fotobiorreatores.

Essas amostras, diluídas quando necessário, foram analisadas em espectrofotômetro (FEMTO 700 PL_μS), em comprimento de onda de 560 nm.

4.6.1.2. Determinação da concentração de amônia total

A concentração de amônia total foi determinada por potenciometria, conforme descrito por Carvalho *et al.* (2004), através de potenciômetro (ORION 710 A) e de eletrodo seletivo para amônia (95–12 ORION). O volume de amostra utilizado foi de 10 mL de meio isento de células.

Foi necessária a alcalinização prévia das amostras, e para tal foi utilizada solução de NaOH 1,5 N, em quantidade suficiente para o aumento do valor do pH das amostras para cerca de 13,0. Em tal valor de potencial hidrogeniônico, a forma amoniacal se apresenta totalmente como amônia, conforme o equilíbrio químico (EQ. 1)

A conversão de íons amônio em amônia é essencial, uma vez que a membrana do eletrodo é permeável apenas a esta última.

4.6.1.3. Determinação da concentração de carbonato total

A concentração de carbonato foi determinada por titulometria, conforme descrito por Pierce e Haenisch (1948). Foram utilizados 10 mL de meio isento de células para a análise. Às amostras foi adicionado NaOH 1,5 N, pois na presença de base ocorre a conversão dos íons hidrogenocarbonato em íons carbonato (EQ. 2). A solução foi titulada com HCl 0,50 N na presença de indicador fenolftaleína; em meio ácido, a conversão é inversa – os íons carbonato são convertidos em íons hidrogenocarbonato (EQ. 3). Uma segunda titulação foi realizada então, utilizando a mesma solução ácida, porém na presença de indicador alaranjado de metila; em meio ácido em excesso, os

íons hidrogenocarbonato formados acabam por ser convertidos em ácido carbônico, por reação de deslocamento de equilíbrio (EQ. 4).

O cálculo da concentração de íons carbonato é baseado na diferença entre os volumes medidos nas duas titulações, considerando os valores de normalidade tanto do ácido quanto do sal.

4.6.1.4. Determinação do pH

Os valores de pH foram acompanhados através de potenciômetro (METTLER TOLEDO 2100E). O eletrodo (METTLER TOLEDO) utilizado nas medições foi calibrado conforme as instruções do fabricante, em relação à exatidão e precisão, sempre anteriormente a uma leitura individual ou a uma série de leituras consecutivas. As leituras de pH foram realizadas através da imersão direta dos eletrodos nos tanques de cultivo.

O valor de pH foi fixado em $9,5 \pm 0,2$, de acordo com trabalho de SANCHEZ-LUNA *et al.* (2007), valor este mantido pela adição diária de CO_2 proveniente de cilindro (CONVERTI *et al.*, 2006).

4.6.2. Avaliação da biomassa

Ao final do cultivo, os 3,5 L de suspensão de meio de cultivo e células de *A. platensis* foram filtradas e posteriormente, utilizaram-se três lavagens sucessivas com 500 mL de água destilada para retirada dos sais adsorvidos às células, e, após secagem em estufa com ar circulante a 55 °C por 12 horas (PELIZER *et al.*, 1999), foi avaliado o teor de lipídios e proteínas da biomassa.

4.6.2.1. Determinação do teor de proteínas

O teor protéico total na biomassa seca foi determinado pelo clássico método de micro-Kjeldahl, adotando-se o fator de 6,25 para a conversão a partir dos teores de nitrogênio total (AOAC, 1984). As amostras desengorduradas, provenientes da etapa da determinação de lipídios, foram trituradas novamente e submetidas a aquecimento intenso, na presença de H_2SO_4 concentrado e catalisador. Tal procedimento promove a destruição da matéria orgânica e formação de nitrogênio inorgânico, na forma de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A alcalinização deste resíduo, durante uma etapa de destilação do nitrogênio, promove a conversão do sal em amônia, recolhida em solução saturada de HBO_3 . A titulação desta solução com HCl 0,020 N padrão permite a determinação da concentração de nitrogênio na amostra utilizada.

4.6.2.2. Determinação do teor de lipídios

O teor lipídico total na biomassa seca foi determinado de acordo com Olguín *et al.* (2001). Amostras trituradas foram submetidas à extração da fração lipídica por solvente orgânico (clorofórmio 2: metanol 1), em extrator contínuo de Soxhlet. Os resíduos lipídicos, juntamente aos solventes, foram então submetidos a tratamento em sistema evaporador rotativo a vácuo, para eliminação destes últimos. Os valores em massa de lipídios foram calculados com base na diferença de peso do balão de fundo redondo utilizado, antes e depois do procedimento.

5. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Com os valores de concentração celular máxima obtidos nos cultivos foram calculados alguns parâmetros, como produtividade em células e fator de conversão de nitrogênio em células, e realizadas análises estatísticas. Verificou-se a influência dos fatores estudados (temperatura e quantidade de uréia por unidade de volume de reator, em seus níveis codificados) através de regressão multivariável, obtendo-se equações polinomiais que permitiram a avaliação simultânea das variáveis, com detecção de possíveis interações entre estas.

Realizou-se também uma avaliação das curvas de crescimento celular e da quantidade de amônia presente no meio. Outros dados coletados, tais como teores de proteínas e lipídios, foram analisados e comparados com as informações disponíveis na literatura, a fim de avaliar também o conteúdo da biomassa formada, e possíveis influências exercidas nesta pelas fontes de nitrogênio.

5.1. Cálculo dos parâmetros cinéticos

5.1.1. Produtividade em células

Representa a media de crescimento celular diária (EQ. 5).

$$P_X = (X_m - X_i) / t_c \quad (\text{equação 5})$$

Onde, P_X : Produtividade em células ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)

X_m : concentração celular máxima (mg.L^{-1})

X_i : concentração celular inicial (mg.L^{-1})

t_c : tempo correspondente a X_m (d)

5.1.2. Fator de conversão de nitrogênio em células

Representa quanto do nitrogênio presente na quantidade total de uréia adicionada foi convertido em células (EQ. 6).

$$Y_{X/N} = [(X_m - X_i) \cdot V] / N_T \quad (\text{equação 6})$$

Onde, $Y_{X/N}$: Fator de conversão de nitrogênio em células ($\text{mg} \cdot \text{mg}^{-1}$)

X_m : concentração celular máxima ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

X_i : concentração celular inicial ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

V : volume do meio (L)

N_T : quantidade total de nitrogênio adicionado (mg)

5.2. Análise estatística

Os parâmetros X_m , P_X e $Y_{X/N}$ dos cultivos realizados com uréia, correspondentes ao planejamento experimental aplicado (cultivos E_1 a E_{23}), foram avaliados por regressão multivariável, com o objetivo de facilitar a compreensão da influência das variáveis independentes em estudo (temperatura e quantidade total de uréia adicionada, em seus níveis codificados) nas respostas de interesse (variáveis dependentes).

Para a análise estatística, foram testados modelos quadráticos e lineares. Junto às análises que foram realizadas, encontram-se os chamados níveis descritivos (p), que indicam os erros. Na análise de regressão, os valores de p indicam o menor erro em que se incorre ao afirmar que um determinado coeficiente tem influência na determinação do parâmetro estimado. Em outras palavras, testando o coeficiente correspondente a uma variável independente é possível verificar se esta tem importância na determinação do parâmetro estimado. Na análise de variância da regressão, por sua vez, o valor de p indica se houve um bom ajuste da equação obtida através da regressão, ou seja, se a regressão realizada foi satisfatória

(FERNANDES, 1998). Para os testes dos coeficientes associados aos fatores, foi considerado $p < 0,15$ (ECHEGARAY *et al.*, 2000; RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004) desde que a inclusão do respectivo coeficiente melhorasse o modelo matemático obtido, enquanto que as regressões foram aceitas somente se a análise de variância da regressão apresentou um valor de p inferior a 0,050.

5.3. Descrição de um experimento

Foram fixadas as seguintes condições experimentais: volume de líquido nos fotobiorreatores tubulares de 3,5 L e intensidade luminosa de 120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (FERREIRA, 2008), mensurada por luxímetro (LI-COR 250A).

O inóculo (ITEM 4.3) de *A. platensis* (ITEM 4.1) foi misturado com aproximadamente dois litros de meio de cultura modificado (ITEM 4.2). Após, foi adicionada uma solução concentrada de uréia de molaridade total pré-determinada (ITEM 4.5). Então, a suspensão obtida foi colocada no fotobiorreator tubular (ITEM 4.4), e finalmente, o volume foi acertado para 3,5 L com adição de meio de cultura modificado, de tal forma que a concentração celular inicial atingisse a concentração de 400 mg.L^{-1} . O valor de temperatura foi mantido utilizando termostatos eletrônicos de 50 W (ARISTOS), seguindo os valores determinados no planejamento (ITEM 4.5).

O processo descontínuo alimentado foi escolhido para o desenvolvimento de todos os cultivos realizados com a presença de uréia (cultivos experimentais e cultivos de ótimo), uma vez que tal fonte é potencialmente tóxica ao microrganismo quando em altas concentrações. A vazão molar de alimentação inicial foi com valores iniciais de 1,33 mM uréia (DANESI *et al.*, 2002).

Durante os cultivos foram acompanhados os diversos parâmetros avaliados neste trabalho, conforme as técnicas analíticas já descritas (ITENS 4.6.1.1–4.6.1.4). Todos os dias adicionaram-se soluções de uréia em concentrações pré-determinadas até o dia em que não se observasse aumento da concentração celular (ITEM 4.5).

Ao final do cultivo, caracterizado pela estabilização do crescimento celular, a suspensão de *A. platensis* foi retirada em quase toda sua totalidade e filtrada, posteriormente foi lavada com três lavagens sucessivas utilizando água destilada para a retirada do sal adsorvido às células. Após a secagem com ventilação a 55 °C por 12 horas (PELIZER *et al.*, 1999), a massa de cianobactérias foi triturada, e seguiu para as análises finais (ITENS 4.6.2.1 e 4.6.2.2).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Curvas de calibração

6.1.1. Determinação da concentração celular

A determinação da concentração celular ao longo dos cultivos foi realizada através de uma curva de calibração que correlaciona o logaritmo da transmitância com um valor de concentração celular, em miligramas por litro. A curva de calibração obtida pode ser observada na Figura 3, junto à equação utilizada para os cálculos de concentração celular.

Figura 3. Curva de calibração para determinação da concentração celular de suspensões de *A. platensis*

Para construção da curva de calibração, foram realizadas diversas diluições de uma suspensão de *A. platensis*, proveniente de um cultivo com meio de cultura padrão Schlösser (ITEM 4.2). Alíquotas dessas diluições foram retiradas para leitura de transmitância em comprimento de onda de 560 nm, utilizando cubeta de caminho óptico de 1 cm. O valor da concentração celular da suspensão mãe utilizada no procedimento foi determinado por biomassa

seca, a fim de validar os resultados obtidos em espectrofotômetro (FEMTO 700 PLμS). Nesta primeira metodologia, são filtrados e lavados com água destilada 25 mL da suspensão mãe de células em fase de crescimento exponencial, com a utilização de uma membrana de acetato de celulose de porosidade de 1,2 μm. Esta membrana foi previamente seca a 70 °C por 12 horas, e a 100 °C por 5 horas posteriormente à filtração da referida suspensão, tempo suficiente para obtenção de massa constante. A massa de células foi determinada com base na diferença de massa das membranas, antes e depois da filtração.

6.1.2. Determinação da concentração de amônia total

A determinação da concentração de amônia total ao longo dos cultivos foi realizada através de curvas de calibração que correlacionam o logaritmo da concentração de amônia com um determinado valor de tensão de corrente elétrica, em milivolts. Segue-se um exemplo de curva de calibração obtida, na Figura 4, com a equação correspondente. Neste caso específico, a maior diluição, 1,00E-06 M (cujo valor de log é igual a -6,0) apresentou uma leitura de 191,14 mV no eletrodo seletivo de amônia.

Figura 4. Curva de calibração para determinação da concentração de amônia total em amostras isentas de células de *A. platensis*

Foram desenvolvidas curvas de calibração a cada dia de análise, como recomendado pelo fabricante do potenciômetro (ORION 710A). Estas foram construídas através de leituras da tensão de corrente elétrica de soluções de cloreto de amônio de diversas concentrações, após alcalinização, procedimento este semelhante a aquele de determinação experimental descrito anteriormente (ITEM 4.6.1.2).

6.2. Resultados

A seguir, são dispostos em tabelas e gráficos os resultados de concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia (TAB. 06–31; FIG. 5–30) coletados para cada experimento realizado: cultivos do planejamento experimental inicial E_1 a E_{11} , cultivos adicionais E_{12} a E_{23} e cultivos para a confirmação do ponto de ótimo O_1 a O_3 .

São dispostos também os resultados referentes às análises de teores de lipídios e proteínas (TAB. 32), além dos valores dos parâmetros: concentração celular máxima, produtividade em células, e fator de conversão de nitrogênio em células (TAB. 33).

As determinações de concentração celular e pH foram feitas diariamente, enquanto que as medidas de carbonato total e amônia total foram realizadas a cada dois dias. Os teores de proteínas e lipídios foram determinados nas amostras de biomassa seca.

Tabela 6. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E₁ (T = 33,0 °C; K= 0,385 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,51	11,60	-
1	446,86	9,45	-	-
2	496,42	9,67	11,19	9,63E-04
3	724,62	9,37	-	-
4	1400,39	9,51	10,88	1,77E-06
5	1607,58	9,48	-	-
6	1924,46	9,59	10,42	*
7	2141,50	9,6	-	-
8	2131,70	9,49	10,27	2,86E-06

“-”, amostra não realizada; “*”, resultado abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada

Figura 5. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E₁.

Tabela 7. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E₂ (T = 33,0 °C; K= 0,717 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,45	11,60	-
1	909,07	9,59	-	-
2	1435,56	9,42	11,19	3,62E-06
3	1710,30	9,31	-	-
4	2167,08	9,69	10,88	*
5	2325,35	9,48	-	-
6	2313,15	9,50	10,42	2,33E-06

“-”, amostra não realizada; “*”, resultado abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada

Figura 6. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E₂.

Tabela 8. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E₃ (T = 25,0 °C; K= 0,717 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,52	11,60	-
1	785,25	9,69	-	-
2	1084,40	9,52	11,19	2,49E-04
3	1501,86	9,31	-	-
4	1859,08	9,69	10,88	1,03E-04
5	2250,61	9,48	-	-
6	2499,24	9,50	10,42	6,45E-04
7	2657,53	9,43	-	-
8	2646,68	9,40	10,42	*

“-“, amostra não realizada; “*“, resultado abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada

Figura 7. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E₃.

Tabela 9. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E₄ (T = 25,0 °C; K = 0,385 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,63	11,60	-
1	608,89	9,60	-	-
2	1078,03	9,42	11,19	*
3	1504,31	9,61	-	-
4	1977,38	9,49	10,88	*
5	2327,38	9,38	-	-
6	2661,88	9,50	10,27	2,03E-06
7	2920,66	9,43	-	-
8	3215,15	9,40	10,42	2,96E-06
9	3186,13	9,58	-	-

“-”, amostra não realizada; “*”, resultado abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada

Figura 8. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E₄.

Tabela 10. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E₅ (T = 29,0 °C; K = 0,316 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,68	11,60	-
1	490,17	9,43	-	-
2	776,95	9,47	10,88	*
3	1041,57	9,51	-	-
4	1602,16	9,48	10,27	1,28E-06
5	1754,38	9,59	-	-
6	1750,74	9,60	10,42	1,37E-05

“-“, amostra não realizada; “*“, resultado abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada

Figura 9. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E₅.

Tabela 11. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E₆ (T = 23,3 °C; K = 0,551 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,43	11,60	-
1	445,32	9,65	-	-
2	515,27	9,51	10,27	8,12E-04
3	805,49	9,48	-	-
4	1422,84	9,59	10,88	*
5	2064,95	9,71	-	-
6	2317,21	9,38	10,42	2,45E-06
7	2303,01	9,47	-	-

“-”, amostra não realizada; “*”, resultado abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada

Figura 10. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E₆.

Tabela 12. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E₇ (T = 29,0 °C; K = 0,786 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,71	11,60	-
1	1033,68	9,58	-	-
2	1716,34	9,50	11,19	*
3	2161,17	9,43	-	-
4	2405,34	9,40	10,88	4,16E-06
5	2657,53	9,63	-	-
6	2920,66	9,46	10,42	2,43E-06
7	3385,36	9,57	-	-
8	3520,10	9,48	10,42	*
9	3502,10	9,66	-	-

“-”, amostra não realizada; “*”, resultado abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada

Figura 11. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E₇.

Tabela 13. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E₈ (T = 34,6 °C; K = 0,551 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,51	11,60	-
1	718,63	9,59	-	-
2	1108,35	9,42	11,19	1,01E-03
3	1563,09	9,31	-	-
4	2019,35	9,39	11,04	2,25E-06
5	2321,28	9,68	-	-
6	2577,77	9,50	10,42	*
7	2932,11	9,39	-	-
8	2922,95	9,42	10,58	*

“-”, amostra não realizada; “*”, resultado abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada

Figura 12. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E₈.

Tabela 14. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E₉ (T = 29,0 °C; K = 0,551 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,50	11,60	-
1	681,34	9,65	-	-
2	1045,37	9,39	11,19	3,62E-06
3	1461,47	9,48	-	-
4	1970,83	9,53	11,04	*
5	2460,44	9,62	-	-
6	2827,16	9,64	10,58	2,33E-06
7	2950,50	9,56	-	-
8	2934,41	9,49	10,27	2,96E-06

“-“, amostra não realizada; “*“, resultado abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada

Figura 13. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E₉.

Tabela 15. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E₁₀ (T = 29,0 °C; K = 0,551 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,52	11,60	-
1	665,76	9,69	-	-
2	1062,15	9,52	11,19	*
3	1284,20	9,31	-	-
4	1641,12	9,69	10,88	*
5	2165,11	9,48	-	-
6	2666,23	9,50	10,42	1,74E-06
7	2845,68	9,43	-	-
8	2836,67	9,40	10,27	*

“-”, amostra não realizada; “*”, resultado abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada

Figura 14. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E₁₀.

Tabela 16. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E₁₁ (T = 29,0 °C; K = 0,551 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,67	11,60	-
1	860,88	9,45	-	-
2	1143,68	9,61	11,19	1,01E-03
3	1563,09	9,39	-	-
4	2011,70	9,51	11,04	3,19E-03
5	2417,76	9,48	-	-
6	2672,77	9,59	10,88	3,58E-03
7	2843,43	9,37	-	-
8	2838,92	9,55	10,42	*

“-“, amostra não realizada; “*“, resultado abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada

Figura 15. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E₁₁.

Tabela 17. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E₁₂ (T = 25,0 °C; K = 0,883 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,70	11,60	-
1	647,08	9,51	-	-
2	821,45	9,63	11,19	1,01E-03
3	1244,36	9,37	-	-
4	1652,86	9,61	10,88	2,25E-06
5	2194,62	9,58	-	-
6	2913,02	9,50	10,58	*
7	3207,28	9,47	-	-
8	3128,57	9,54	10,42	*

“-“, amostra não realizada; “*“, resultado abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada

Figura 16. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E₁₂.

Tabela 18. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E₁₃ (T = 29,0 °C; K = 0,883 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,65	11,60	-
1	859,07	9,58	-	-
2	1437,27	9,52	11,19	2,65E-06
3	2086,85	9,60	-	-
4	2495,03	9,39	11,04	*
5	3010,71	9,50	-	-
6	3517,52	9,54	10,58	*
7	3975,36	9,69	-	-
8	3969,73	9,40	9,81	*

“-”, amostra não realizada; “*”, resultado abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada

Figura 17. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E₁₃.

Tabela 19. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E₁₄ (T = 33,0 °C; K = 0,883 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,68	11,60	-
1	860,88	9,47	-	-
2	1657,80	9,50	11,19	3,60E-04
3	2092,68	9,60	-	-
4	2331,45	9,39	11,04	*
5	2664,06	9,39	-	-
6	3621,59	9,54	10,88	2,22E-06
7	4057,77	9,39	-	-
8	3997,96	9,56	10,88	2,86E-06

“-“, amostra não realizada; “*“, resultado abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada

Figura 18. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E₁₄.

Tabela 20. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E₁₅ (T = 37,0 °C; K = 0,883 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,70	11,60	-
1	909,07	9,48	-	-
2	1325,51	9,50	11,19	6,77E-04
3	1812,11	9,60	-	-
4	2319,24	9,39	11,04	2,56E-06
5	2936,70	9,50	-	-
6	3210,30	9,54	10,88	*
7	3502,10	9,39	-	-
8	3448,47	9,56	10,73	2,67E-06

“-”, amostra não realizada; “*”, resultado abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada

Figura 19. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E₁₅.

Tabela 21. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E₁₆ (T = 33,0 °C; K = 0,786 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,58	11,60	-
1	859,07	9,51	-	-
2	1289,95	9,42	11,19	2,48E-04
3	1709,13	9,31	-	-
4	2163,14	9,39	11,04	*
5	2751,84	9,42	-	-
6	3407,99	9,50	10,42	2,45E-06
7	3352,85	9,39	-	-

“-“, amostra não realizada; “*“, resultado abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada

Figura 20. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E₁₆.

Tabela 22. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E₁₇ (T = 37,0 °C; K = 0,717 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,65	11,6	-
1	718,63	9,58	-	-
2	1123,30	9,52	11,19	5,44E-04
3	1572,25	9,60	-	-
4	1866,51	9,39	10,88	*
5	2331,45	9,50	-	-
6	2319,24	9,54	10,88	3,76E-06

“-”, amostra não realizada; “*”, resultado abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada

Figura 21. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E₁₇.

Tabela 23. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E₁₈ (T = 29,0 °C; K = 1,215 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,71	11,60	-
1	860,88	9,65		-
2	1290,83	9,47	11,19	1,12E-05
3	2011,70	9,54		
4	2573,49	9,60	11,04	5,57E-06
5	3407,99	9,40		
6	3941,65	9,62	10,58	*
7	4161,97	9,32		
8	4153,20	9,65	10,27	2,86E-06

“-”, amostra não realizada; “*”, resultado abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada

Figura 22. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E₁₈.

Tabela 24. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E₁₉ (T = 33,0 °C; K = 1,215 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,65	11,60	-
1	909,07	9,48	-	-
2	1289,17	9,58	11,19	2,75E-06
3	2082,97	9,49	-	-
4	3303,24	9,39	11,04	*
5	3833,61	9,50	-	-
6	4176,61	9,54	10,58	2,60E-06
7	4538,23	9,49	-	-
8	4531,94	9,40	10,42	3,92E-06

“-”, amostra não realizada; “*”, resultado abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada

Figura 23. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E₁₉.

Tabela 25. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E₂₀ (T = 37,0 °C; K = 1,215 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,75	11,60	-
1	718,63	9,58	-	-
2	1098,75	9,52	11,19	1,27E-05
3	1783,55	9,60	-	-
4	2323,31	9,39	10,88	2,93E-06
5	2927,53	9,50	-	-
6	3717,11	9,54	10,88	*
7	3927,67	9,49	-	-
8	3922,09	9,40	10,73	7,43E-06

“-”, amostra não realizada; “*”, resultado abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada

Figura 24. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E₂₀.

Tabela 26. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E₂₁ (T = 29,0 °C; K = 1,879 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,51	11,60	-
1	647,91	9,45	-	-
2	860,88	9,67	11,19	4,93E-06
3	1286,75	9,37	-	-
4	1650,39	9,51	11,04	*
5	2076,60	9,48	-	-
6	2259,68	9,59	10,88	1,27E-06
7	2234,70	9,37	-	-

“-”, amostra não realizada; “*”, resultado abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada

Figura 25. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E₂₁.

Tabela 27. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E₂₂ (T = 33,0 °C; K = 1,879 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,53	11,60	-
1	516,05	9,62	-	-
2	817,89	9,54	11,19	4,50E-06
3	1320,09	9,39	-	-
4	1745,92	9,52	11,04	1,86E-06
5	2143,15	9,43	-	-
6	2323,24	9,57	10,88	*
7	2291,26	9,36	-	-

“-”, amostra não realizada; “*”, resultado abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada

Figura 26. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E₂₂.

Tabela 28. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao experimento E₂₃ (T = 37,0 °C; K = 1,879 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,45	11,60	-
1	618,19	9,62	-	-
2	786,13	9,54	11,19	3,34E-05
3	1151,51	9,39	-	-
4	1601,52	9,52	10,27	*
5	2200,75	9,43	-	-
6	2171,79	9,57	10,88	4,04E-06

“-”, amostra não realizada; “*”, resultado abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada

Figura 27. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo E₂₃.

Tabela 29. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao cultivo de confirmação da otimização O₁ (T = 31,74 °C; K = 1,16 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,71	11,00	-
1	787,88	9,65	-	-
2	1347,56	9,47	10,32	1,26E-05
3	2073,28	9,54	-	-
4	2651,02	9,40	9,98	2,44E-06
5	3095,29	9,59	-	-
6	3624,22	9,62	11,01	3,62E-06
7	4156,12	9,42	-	-
8	4132,81	9,65	10,32	4,07E-06

“-“, amostra não realizada

Figura 28. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo de confirmação da otimização O₁.

Tabela 30. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao cultivo de confirmação da otimização O₂ (T = 31,74 °C; K = 1,16 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,53	11,60	-
1	909,07	9,59		-
2	1355,95	9,67	10,67	1,63E-05
3	2082,97	9,58		
4	2705,56	9,64	11,01	4,36E-06
5	3276,16	9,59		-
6	3624,22	9,60	10,32	*
7	4170,75	9,57		-
8	4135,72	9,68	10,67	1,16E-05

“-”, amostra não realizada; “*”, resultado abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada

Figura 29. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo de confirmação da otimização O₂.

Tabela 31. Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total, em função do tempo, referentes ao cultivo de confirmação da otimização O₃ (T = 31,74 °C; K = 1,16 mM.dia⁻¹)

Tempo (d)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato Total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	400,00	9,62	11,60	-
1	850,96	9,70	-	-
2	1372,79	9,57	10,67	1,41E-05
3	1928,23	9,60	-	-
4	2659,71	9,58	10,32	2,37E-06
5	3203,04	9,49	-	-
6	3677,09	9,57	9,98	*
7	4229,68	9,52	-	-
8	4206,03	9,57	10,32	3,85E-06

“-”, amostra não realizada; “*”, resultado abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada

Figura 30. Concentração celular (X) e valor de pH em função do tempo, referente ao cultivo de confirmação da otimização O₃.

Tabela 32. Teor de proteínas e lipídeos na biomassa seca de *Arthrospira platensis* dos experimentos realizados

Cultivos	T (°C)	K (mg.d ⁻¹)	Proteínas (%)	Lipídeos (%)
Parte A: Planejamento experimental inicial				
E ₁	25,0	0,385	22,28	7,98
E ₂	33,0	0,385	19,44	6,77
E ₃	25,0	0,717	24,99	8,80
E ₄	33,0	0,717	23,55	7,89
E ₅	29,0	0,316	24,99	6,73
E ₆	23,3	0,551	28,33	7,98
E ₇	29,0	0,786	26,90	8,76
E ₈	34,6	0,551	21,00	6,34
E ₉	29,0	0,551	26,61	6,90
E ₁₀	29,0	0,551	25,49	6,64
E ₁₁	29,0	0,551	24,28	6,33
Parte B: Experimentos adicionais para otimização do processo				
E ₁₂	25,0	0,883	23,10	11,78
E ₁₃	29,0	0,883	25,15	6,63
E ₁₄	33,0	0,883	27,90	6,82
E ₁₅	37,0	0,883	32,84	6,91
E ₁₆	33,0	0,786	24,28	7,12
E ₁₇	37,0	0,717	23,64	7,27
E ₁₈	29,0	1,215	25,55	6,63
E ₁₉	33,0	1,215	27,47	6,35
E ₂₀	37,0	1,215	30,57	7,72
E ₂₁	29,0	1,879	38,70	8,25
E ₂₂	33,0	1,879	39,49	7,98
E ₂₃	37,0	1,879	38,68	7,87
Parte C: Experimentos para confirmação da otimização				
O ₁	31,7	1,160	30,20	7,38
O ₂	31,7	1,160	32,96	7,06
O ₃	31,7	1,160	29,01	7,69

Tabela 33. Valores de X_m (concentração celular máxima), P_x (produtividade em células) e $Y_{x/N}$ (fator de conversão de nitrogênio em células) relacionados com as variáveis estudadas.

Cultivos	T (°C)	K (mM.d ⁻¹)	X_m (mg.L ⁻¹)	P_x (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	$Y_{x/N}$ (mg.mg ⁻¹)
Parte A: Planejamento experimental inicial					
E ₁	25,0	0,385	2142	249	15,46
E ₂	33,0	0,385	2325	385	21,12
E ₃	25,0	0,717	2658	323	12,70
E ₄	33,0	0,717	3215	352	14,23
E ₅	29,0	0,316	1754	271	16,62
E ₆	23,3	0,551	2317	320	14,77
E ₇	29,0	0,786	3520	390	14,63
E ₈	34,6	0,551	2932	362	17,43
E ₉	29,0	0,551	2951	364	17,56
E ₁₀	29,0	0,551	2846	349	16,84
E ₁₁	29,0	0,551	2843	349	16,82
Parte B: Experimentos adicionais para otimização do processo					
E ₁₂	25,0	0,883	3207	401	13,35
E ₁₃	29,0	0,883	3975	511	17,00
E ₁₄	33,0	0,883	4058	523	17,39
E ₁₅	37,0	0,883	3502	443	14,75
E ₁₆	33,0	0,786	3408	501	17,77
E ₁₇	37,0	0,717	2331	386	14,03
E ₁₈	29,0	1,215	4162	537	13,66
E ₁₉	33,0	1,215	4538	591	15,03
E ₂₀	37,0	1,215	3928	504	12,81
E ₂₁	29,0	1,879	2260	310	5,27
E ₂₂	33,0	1,879	2323	321	5,45
E ₂₃	37,0	1,879	2201	360	6,00
Parte C: Experimentos para confirmação da otimização					
O ₁	31,74	1,16	4156	751	14,20
O ₂	31,74	1,16	4171	754	14,25
O ₃	31,74	1,16	4230	766	14,47

6.3. Discussões

O processo descontínuo alimentado utilizado para o cultivo de *A. platensis* permitiu a obtenção de resultados satisfatórios com o uso de uréia como fonte de nitrogênio, reduzindo os níveis da concentração de amônia ao longo do cultivo e adequando-se aos níveis indicados como ótimos para o crescimento celular.

A adição de um nutriente num processo descontínuo alimentado pode ser feita de forma contínua ou intermitente (CARVALHO & SATO, 2001). Danesi *et al.*, (2002) compararam os regimes de alimentação de uréia no cultivo de *A. platensis*, obtendo resultados similares na forma de alimentação contínua e intermitente. Neste trabalho optou-se a utilização de alimentação a cada 12 horas para evitar atingir concentrações tóxicas de amônia.

A forma de carbono preferencialmente assimilada por cianobactérias é o bicarbonato, sendo o pH ideal de cultivo, aquele que garanta o maior deslocamento do equilíbrio químico no sentido de sua formação..

A assimilação fotossintética de carbono ocorre pela passagem ativa de íon bicarbonato no meio de cultivo até o interior celular, onde no sistema fotossintético ocorre a captura de anidrido carbônico com conseqüente liberação de carbono remanescente. (FERRAZ, 1986)

Portanto, o crescimento celular acontece com um incremento no valor do pH, devido ao acúmulo de íon carbonato no meio. Então, a reposição de íons carbonato é necessária e foi feita mediante borbulhamento de CO₂ para manter o pH entre os valores de 9,30 e 9,70. Os resultados de pH, apresentados nas Tabelas 6 a 28 indicam que o controle foi feito com sucesso, mantendo-se os valores dentro dos limites estabelecidos.

Assim, os valores obtidos de carbonato total para todos os experimentos, mantiveram-se perto do valor inicial, não houve diminuição do valor pela reposição feita usando CO₂ de cilindro.

O pH, é também uma condição determinante no equilíbrio da fonte de nitrogênio amoniacal, que pode se apresentar como amônia livre ou íon amônio (DANESI, 2001). Quanto mais alcalino se torna o médio de cultivo, maior é a

proporção de amônia em relação ao amônio, e, por conseguinte, maior é a perda de amônia por volatilização.

O nitrogênio é um nutriente essencial para o metabolismo do microrganismo na construção de proteínas celulares, alguns lipídios e ácidos nucleicos. A uréia é uma fonte de nitrogênio alternativa para o cultivo de *A. platensis*, pois as células utilizam a amônia que é incorporada diretamente no metabolismo celular. No entanto, esta substância torna-se tóxica para as células quando presente em altas concentrações.

Ao longo dos experimentos, as concentrações de amônia residuais sempre apresentaram uma concentração não inibitória, e inclusive inferior à concentração mínima detectável pela metodologia analítica aplicada, pois esta torna-se tóxica numa concentração acima de 2mM (ABELIOVICH & AZOV, 1976; CARVALHO *et al.*, 2004). Os resultados obtidos no acompanhamento dos cultivos realizados (TAB. 6–28) permitem afirmar que não houve efeito tóxico. Resultados similares foram apresentados por Sanchez–Luna *et al.* 2003 e Matsudo 2006.

Carvalho *et al.*, (2004) cultivaram células em frascos de Erlenmeyer, utilizando processo descontínuo, com a concentração celular inicial de 50 mg.L⁻¹ e observaram que houve limitação do crescimento celular por nitrogênio nos cultivos com concentrações de cloreto de amônio menores que 1,6 mM, enquanto que nos cultivos com concentrações de cloreto de amônio acima desse valor, o crescimento celular foi inibido pelo excesso de amônia.

Em solução aquosa, a amônia, existe tanto na forma de íon NH₄⁺ como na forma gasosa NH₃ dependendo do pH e da temperatura do meio. A forma iônica é altamente solúvel em água e é geralmente considerada menos tóxica para microalgas (MANNING *et al.*, 1996). Mais de 90 % da amônia encontra-se na forma gasosa no pH 10,5 e 20 °C (NURDOGAN & OSWALD, 1995). Então, em cultivos a 30 °C e pH acima de 10 foram esperados ter uma grande perda desse nutriente para a atmosfera, embora o fato de trabalhar com fotobiorreator fechado possa ter minimizado essa perda.

6.3.1. Avaliação do crescimento celular

Os resultados apresentados nas Figuras 6–9 e 11–30 demonstram que o incremento da concentração celular da *A. platensis* foi similar nas condições experimentais estudadas. Não existe uma fase de adaptação, e a fase de crescimento exponencial é evidente em todos os experimentos. Porém, nas Figuras 5 e 10, correspondentes aos cultivos E₁ (T = 33,0 °C, K = 0,385 mM uréia) e E₆ (T = 23,3 °C, K = 0,551 mM uréia dia⁻¹) é evidente a fase de adaptação, possivelmente pelas condições experimentais extremas do cultivo, elevada e baixa temperatura combinadas com escassez na fonte de nitrogênio, respectivamente, que impossibilitaram o desenvolvimento previsto das células de *A. platensis*. A fase de adaptação de aproximadamente 48 h (2 dias) dos cultivos mencionados (E₁ e E₆), está evidenciada claramente na Figura 31. Esse fenômeno foi evidenciado, no decorrer dos cultivos experimentais, pelo crescimento de células de cor amarelo atípico, possivelmente pela carência na fonte de nitrogênio, elevada intensidade luminosa e temperaturas extremas capazes de provocar fenômenos de fotoinibição que pode ser claramente evidenciado em cultivos com concentrações celulares inferiores a 0,5 g.L⁻¹ (VONSHAK, 1997a).

Gao *et al.* (2008) afirmaram que as baixas temperaturas de manhã e elevada quantidade de luz produz fotoinibição nos cultivos de *A. platensis*, mas o aquecimento do cultivo até uma temperatura de 35 °C reverte o efeito. Mesmo assim, evidenciaram que o uso de temperaturas baixas, especialmente no inverno (18–20 °C), produz dano na estrutura espiral da cianobactéria, produzindo tricomas pequenos (Wu *et al.*, 2005), de menor tamanho que o normal. Neste trabalho, esse fato foi claramente evidenciado no final do cultivo, quando a biomassa produzida foi de difícil separação final do meio de cultivo porque os pequenos tricomas obstruíam o filtro utilizado.

Figura 31. Fase lag apresentada nos cultivos E₁ (T = 33,0 °C; K = 0,385 mM uréia) e E₆ (T = 23,3 °C; K = 0,551 mM uréia)

A presença de fase lag também foi evidenciada por outros autores. Assim, Çelekli & Yavuzatmaca (2008), trabalharam com *A. platensis* em meio padrão Schlösser e explicaram que aquela fase lag de curta duração (2,43–5,85 h) foi consequência da adaptação que as células sofrem quando são transferidas para meio fresco com condições similares. Estes autores estudaram diferentes concentrações de nitrato de sódio e cloreto de sódio no meio de cultivo padrão Schlösser, porém a temperatura foi mantida em valores de 30 ± 2 °C e os experimentos foram feitos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio com uma intensidade luminosa de 2,0 klux ($24,0 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Da mesma forma, Kim *et. al.* (2007) cultivando *Scenedesmus* sp. usando efluentes provenientes de suínos, também evidenciaram a presença de fase de adaptação.

Assim, conhecendo as diferenças das condições experimentais, fica evidente a influência fundamental produzida pela temperatura nos cultivos realizados em fotobiorreator tubular e utilizando uréia como fonte de nitrogênio.

Nos demais experimentos, a ausência de fase de adaptação está plenamente justificada pela utilização de uréia como fonte de nitrogênio, que

em meio alcalino sofre hidrólise liberando amônia, fonte de nitrogênio preferencialmente utilizada pela *A. platensis*. (BOUSSIBA, 1989; BELKIN & BOUSSIBA, 1991), que entra por difusão na célula para ser incorporada na biossíntese de aminoácidos. Este fenômeno foi observado por outros autores como Danesi *et al.* (2002) que trabalharam com uréia como fonte de nitrogênio, e também não observaram a presença de fase lag no cultivo de *A. platensis*. Colla *et al.* (2005) e Radmann *et al.* (2007) também reportaram ausência de fase lag no crescimento deste microrganismo.

Pelizer *et al.* (2003) usaram KNO_3 como fonte de nitrogênio e relataram a influência da idade do inóculo no crescimento da *S. platensis*, comprovando que a utilização de inóculo no sexto dia de cultivo, com concentração de 50 mg.L^{-1} , proporcionou maiores valores no crescimento celular. Nessas condições, também não detectaram fase lag de crescimento.

A melhor temperatura de crescimento foi conseguida no cultivo E_{19} ($T = 33,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $K = 1,215 \text{ mM.dia}^{-1}$), com concentração celular máxima de 4538 mg.L^{-1} ; onde as condições utilizadas são muito próximas às determinadas por Rafiqul *et al.* (2005), que afirmaram que $32,0 \text{ }^\circ\text{C}$ e a utilização de pH de 9,0, são condições ótimas para produção de biomassa no caso de *A. platensis*. No cultivo E_5 ($T = 29,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $K = 0,316 \text{ mM.dia}^{-1}$), observou-se a menor concentração celular máxima, 1754 mg.L^{-1} , devido a carência da fonte de nitrogênio adicionada.

No cultivo E_{23} ($T = 37,0 \text{ }^\circ\text{C}$; $K = 1,879 \text{ mM.dia}^{-1}$), observou-se uma queda no crescimento celular, possivelmente decorrente das elevadas temperaturas que provocam uma perda de amônia do sistema favorecendo a carência da fonte de nitrogênio, bem como dano nas membranas e/ ou enzimas celulares.

A utilização do processo descontínuo alimentado, utilizando uréia como fonte de nitrogênio em fotobiorreatores tubulares, permitiu atingir melhores resultados que os relatados na literatura referentes a cultivos com *A. platensis*. Com a utilização de processo descontínuo alimentado em sistemas abertos, Sánchez–Luna *et al.* (2006) obtiveram $749,0 \text{ mg.L}^{-1}$ mediante o uso exclusivo de uréia, Matsudo (2006) obteve 2101 mg.L^{-1} utilizando uréia e processo descontínuo alimentado repetitivo.

É importante mencionar que o tempo de cultivo variou para cada experimento (6–9 dias), dependendo das condições experimentais.

Provavelmente o crescimento foi afetado pela alta densidade populacional que provoca dois efeitos claramente definidos: o fenômeno de sombreamento, a onde a densidade populacional elevada evita a distribuição homogênea da luz e dificulta a sua captação pela célula (RICHMOND, 1988; FERRAZ, 1986); e o estresse (fadiga física) que intensifica os choques entre os tricomas, que apresentam membranas mucopolissacarídicas frágeis (DANESI, 2001).

Analisando os valores de produtividade celular, confirma-se o determinado pelos valores de concentração máxima. Assim, no cultivo E₁₉ (T = 33,0 °C; K = 1,215 mM.dia⁻¹), obteve-se o maior valor de produtividade celular (591 mg.L⁻¹.d⁻¹). Por outro lado, nos cultivos E₁ (T = 25,0 °C; K = 0,385 mM.dia⁻¹) e E₅ (T = 29,0 °C e K = 0,316 mM.dia⁻¹), foram registrados os menores valores de produtividade celular, correspondentes a 249 mg.L⁻¹.d⁻¹ e 271 mg.L⁻¹.d⁻¹, respectivamente.

6.3.2. Avaliação da biomassa

É bem conhecido que o conteúdo de proteínas de muitas cianobactérias é afetado pelos diversos fatores nutricionais e ambientais presentes no cultivo (OLGUÍN *et al.*, 2001).

Nos cultivos realizados neste trabalho, para vazões de uréia ate 0,717 mM.dia⁻¹, o aumento da temperatura diminui o teor de proteínas na biomassa. Assim, no cultivo E₂ (T = 33 °C, K = 0,385 mM.dia⁻¹) obteve-se o menor valor de teor de proteínas (19,44 %, TAB. 33) confirmando-se que a escassez na fonte de nitrogênio reflete diretamente na produção de proteínas. Por outro lado, para valores de vazão de uréia maiores ($\geq 0,883$ mM.dia⁻¹), ao aumentar a temperatura, aumenta-se também o teor de proteínas na biomassa, obtendo-se o maior valor de teor de proteína de 39,49 % (Tabela 33) no cultivo E₂₂ (T = 33 °C, K = 1,879 mM.dia⁻¹). Essa diferença de comportamento é decorrente da menor disponibilidade de nitrogênio para esta cianobactéria em condições de fornecimento de nitrogênio mais baixas, o que pode levar a um desvio do

metabolismo para formação de moléculas orgânicas que não são constituídas por nitrogênio (SASSANO, 2004; ZHEKISHEVA *et al.*, 2002).

Esses resultados diferem daqueles obtidos por Colla *et al.* (2005), que reportaram que a concentração de nitrogênio adicionada e a temperatura pareciam não influenciar no teor de proteína, lipídios ou compostos fenólicos produzidos no cultivo de *S. platensis*. A diferença dos resultados deve-se provavelmente as menores demandas de nitrogênio decorrentes das menores produtividades celulares obtidas (da ordem de 24 mg.L⁻¹.dia⁻¹) nos cultivos realizados nas condições experimentais adotadas por estes autores.

Os teores de proteínas nos pontos de ótimo variam entre 29,01 e 32,96 %, sendo da mesma ordem de grandeza do que os obtidos por Bezerra *et al.* (2008) que trabalharam com fotobiorreator aberto e cloreto de amônio como fonte de nitrogênio.

O teor de lipídios em biomassas de cianobactérias pode sofrer influência de temperatura, intensidade luminosa, concentração celular e fonte de nitrogênio (COHEN, 1997). Tantichareon *et al.* (1994) observaram que os lipídios e ácidos graxos de *Spirulina sp.* dependem da cepa e das condições do meio ambiente. *Spirulina sp.* contém 6–13 % de lipídios, sendo que metade são ácidos graxos (COHEN, 1997).

Os resultados da Tabela 32 demonstram que as porcentagens de lipídios na biomassa de *A. platensis* nos cultivos realizados nas condições experimentais testadas, encontram-se dentro dos valores reportados anteriormente (6,34–11,78 %), de forma que não foi possível evidenciar a influência da temperatura e quantidade total de nitrogênio adicionada na produção de lipídios.

Os teores de lipídios obtidos nos pontos de ótimo deste trabalho variam entre 7,06 e 7,69 %, sendo esses resultados, similares aos obtidos por Rafiqui *et al.* (2005), que estudando as condições ambientais ótimas tais como luz, temperatura e pH na produção de biomassa de *Spirulina sp.*, observaram que o teor de lipídios totais de *A. platensis* é de 7,2 %.

6.3.3. Análise Estatística

Utilizando os resultados obtidos, foram calculados os parâmetros cinéticos para cada cultivo, E_1 a E_{23} e O_1 a O_3 : X_m (concentração celular máxima), P_x (produtividade celular) e $Y_{x/N}$ (fator de conversão de nitrogênio em células) (TAB. 33).

Esses parâmetros foram avaliados por análise de regressão multivariável para estudar a influência das variáveis independentes em estudo (temperatura e vazão molar de alimentação diária de uréia), nas respostas de interesse (variáveis dependentes), sendo as regressões realizadas com os valores codificados das variáveis independentes, como comentado em Materiais e Métodos.

6.3.3.1. Concentração celular máxima

As Tabelas 34 e 35 apresentam os resultados da análise de regressão quadrática multivariável para a concentração celular máxima (X_m) em função das variáveis independentes codificadas: temperatura (X_1) e vazão molar de alimentação diária de uréia (X_2), bem como os resultados da análise de variância da regressão, respectivamente; a regressão foi feita com os experimentos 1 a 23 (TAB. 5, partes A e B).

Tabela 34. Análise da regressão multivariável para X_m

Fator	Coefficiente de regressão	Erro padrão	Valor t	P
Constante	2967	89,05	33,32	0,0000
X_1	170,1	77,39	2,20	0,0421
X_2	642,5	56,00	11,47	0,0000
X_1^2	-285,1	61,52	-4,63	0,0002
X_2^2	-93,22	7,78	-11,98	0,0000
$X_1 \cdot X_2$	60,12	28,24	2,13	0,0481

R^2 ajustado= 0,8818

X_1 , valores codificados da variável temperatura (T)

X_2 , valores codificados da variável vazão molar de alimentação de uréia (K)

Tabela 35. Análise de variância do modelo de regressão multivariável para X_m

Fator de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F Calculado	P
Modelo	11715802	5	2343160	33,84	0,0000
Erro	1177222	17	69248,3		
Total	12893024	22			

A equação obtida na análise de regressão para concentração celular máxima (X_m) foi:

$$X_m = 2967 + 170,1 X_1 + 642,5 X_2 - 285,1 X_1^2 - 93,22 X_2^2 + 60,12 X_1 X_2 \text{ (EQ. 7)}$$

A partir das análises de regressão quadrática multivariável (TAB. 34), foi possível observar os níveis descritivos dos coeficientes e o coeficiente de determinação do modelo. Demonstrou-se que a concentração celular máxima é uma função quadrática da temperatura e da vazão molar de alimentação diária de uréia, assim como também, que o modelo é capaz de explicar os resultados experimentais obtidos.

Após a derivação da equação 7, chegou-se aos valores codificados $X_1 = 0,685$ e $X_2 = 3,667$ como os correspondentes pontos de ótimo. Esses valores representam, respectivamente, 31,74 °C e 1,16 mM uréia dia⁻¹, com uma concentração celular máxima esperada de 4203 mg.L⁻¹. Assim, os cultivos de ótimo (O_1 a O_3), foram realizados para confirmação do modelo, com estas condições pré-determinadas.

O valor médio da concentração celular máxima ($X_m = 4186 \pm 39$ mg.L⁻¹) é apenas 0,41 % menor do que o valor estimado a partir da equação 7 (4203 mg.L⁻¹), confirmando a utilidade da regressão multivariável na otimização das condições experimentais para maximização de X_m .

O valor de p da análise de variância do modelo foi inferior a 0,050 (TAB. 35), comprovando ser o ajuste do modelo adequado aos dados experimentais. Na Figura 32 pode ser visualizada a superfície de resposta correspondente ao modelo ajustado, enquanto que na Figura 33 é apresentado o correspondente gráfico de contorno.

Figura 32. Superfície de resposta para a concentração celular máxima (X_m) em função dos valores codificados de temperatura (X_1) e de vazão molar de alimentação diária de uréia (X_2).

Figura 33. Gráfico de contorno para a concentração celular máxima (X_m) em função dos valores codificados de temperatura (X_1) e de vazão molar de alimentação diária de uréia (X_2).

6.3.3.2. Produtividade em células

As Tabelas 36 e 37 apresentam os resultados da análise de regressão quadrática multivariável para produtividade em células (P_X) em função das variáveis independentes: temperatura (T) e vazão molar de alimentação diária de uréia (K), bem como os resultados da análise de variância da regressão, respectivamente; a regressão foi feita com os experimentos 1 a 23 (TAB. 5, partes A e B).

Tabela 36. Análise da regressão multivariável para P_X

Fator	Coefficiente de regressão	Erro padrão	Valor t	P
Constante	370,76	14,89	24,89	0,0000
X_1	37,95	13,24	2,87	0,0103
X_2	68,06	10,05	6,77	0,0000
X_1^2	-20,31	9,35	-2,17	0,0435
X_2^2	-9,037	1,29	-7,01	0,0000

R^2 ajustado = 0,7330

X_1 , valores codificados da variável temperatura (T)

X_2 , valores codificados da variável vazão molar de alimentação de uréia (K)

Tabela 37. Análise de variância do modelo de regressão multivariável para P_X

Fator de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	P
Modelo	143507	4	35876,80	16,10	0,0000
Erro	40121,1	18	2228,95		
Total	183628	22			

A equação obtida na análise de regressão para a produtividade em células (P_X) foi:

$$P_X = 370,76 - 37,95 X_1 + 68,06 X_2 - 20,31 X_1^2 - 9,037 X_2^2 \quad (\text{equação 8})$$

Utilizando a análise de regressão múltipla, observou-se o nível de significância dos coeficientes e o coeficiente de determinação do modelo (TAB. 36).

O coeficiente de interação de fatores $X_1.X_2$, mostrou-se estatisticamente não significativo, apresentado um valor de $p = 0,33$, valor fora dos limites aceitáveis, sendo retirado do modelo para um melhor ajuste da equação com um valor de R^2 de 0,7330. O valor de p da análise de variância do modelo foi

inferior a 0,050 (TAB. 37), comprovando ser o ajuste do modelo adequado aos dados experimentais.

O coeficiente quadrático da variável codificada X_2 (vazão molar de alimentação diária de uréia) é negativo, indicando que há um ponto máximo de produtividade em células entre as diferentes vazões de uréia analisadas. Isso pode ser observado de melhor maneira na Figura de superfície de resposta (FIG. 34). O mesmo poder ser observado na Figura 35, que representa o gráfico de contorno da equação 8.

Figura 34. Superfície de resposta para a produtividade em células (P_x) em função dos valores codificados de temperatura (X_1) e de vazão molar de alimentação diária de uréia (X_2).

Figura 35. Gráfico de contorno para a produtividade em células (P_X) em função dos valores codificados de temperatura (X_1) e de vazão molar de alimentação diária de uréia (X_2).

6.3.3.3. Fator de conversão de nitrogênio em células

As Tabelas 38 e 39 apresentam os resultados da análise de regressão quadrática multivariável para fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função das variáveis independentes: temperatura (T) e vazão molar de alimentação diária de uréia (K), bem como os resultados da análise de variância da regressão, respectivamente; a regressão foi feita com os experimentos 1 a 23 (TAB. 5, partes A e B).

Tabela 38. Análise da regressão multivariável para $Y_{X/N}$

Fator	Coefficiente de regressão	Erro padrão	Valor t	P
Constante	17,18	0,45	38,03	0,0000
X_1	1,429	0,40	3,56	0,0022
X_2	-0,568	0,30	-1,86	0,0790
X_1^2	-0,877	0,28	-3,09	0,0063
X_2^2	-0,107	0,04	-2,74	0,0135

R^2 ajustado= 0,8714

X_1 , valores codificados da variável temperatura (T)

X_2 , valores codificados da variável vazão molar de alimentação de uréia (K)

Tabela 39. Análise de variância do modelo de regressão multivariável para $Y_{X/N}$

Fator de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	P
Modelo	314,099	4	78,53	38,28	0,0000
Erro	36,920	18	2,05		
Total	351,019	22			

A equação obtida na análise de regressão para o fator de conversão de nitrogênio em celular ($Y_{X/N}$) foi:

$$Y_{X/N} = 17,18 + 1,429 X_1 - 0,568 X_2 - 0,877 X_1^2 - 0,107 X_2^2 \quad (\text{equação 9})$$

Utilizando a análise de regressão multivariável, observou-se o nível de significância dos coeficientes e o coeficiente de determinação do modelo (TAB. 38). O coeficiente de interação de fatores $X_1.X_2$, mostrou-se estatisticamente não significativo, apresentado um valor de $p = 0,53$, sendo retirado do modelo para um melhor ajuste da equação, cujo R^2 aumentou, de 0,86 a 0,87 e, mesmo assim, o valor de p passou de 0,09 a 0,079.

Não foi retirado o coeficiente linear do fator correspondente ao valor codificado da variável vazão molar de uréia (X_2) porque quando este fator foi

retirado da regressão houve diminuição do coeficiente de determinação do modelo.

Os dados analisados indicam, como esperado pela observação dos resultados da Tabela 33, que a tendência de obter maiores fatores de conversão de nitrogênio em células ocorre com a diminuição da quantidade de nitrogênio total. Essa relação de $Y_{X/N}$ com a quantidade adicionada de cloreto de amônio foi observada por Carvalho *et al.* (2004). Os mesmos resultados foram observados por Rodrigues (2008) quando trabalhou-se com nitrato de potássio e cloreto de amônio, simultaneamente.

Neste trabalho, verificou-se, mais uma vez, a mesma relação para a uréia, o que pode indicar que essa função decrescente de $Y_{X/N}$ e nitrogênio total poderia ser ampliada para outras fontes de nitrogênio.

O valor de p da análise de variância do modelo foi inferior a 0,050 (TAB. 39), comprovando ser o ajuste do modelo adequado aos dados experimentais. Nas Figuras 36 e 37 podem ser visualizadas a superfície de resposta e o gráfico de contorno correspondentes ao modelo ajustado.

Figura 36. Superfície de resposta para o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função dos valores codificados de temperatura (X_1) e de vazão molar de alimentação diária de uréia (X_2).

Figura 37. Gráfico de contorno para o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função dos valores codificados de temperatura (X_1) e de vazão molar de alimentação diária de uréia (X_2).

6.3.4. Crescimento de *A. platensis* nos pontos de ótimo

Nas Figuras 38 e 39 estão apresentadas as curvas de crescimento de *A. platensis* referentes aos cultivos de ponto central do planejamento experimental (E_9 – E_{11}) e de ponto de ótimo obtido após a aplicação da análise estatística e a aplicação da metodologia da superfície de resposta (O_1 – O_3), respectivamente. As figuras mencionadas, também não apresentam fase de adaptação no crescimento celular.

Além disso, fica evidente que houve aumento de concentração celular máxima (X_m) de aproximadamente o dobro após a otimização das condições de temperatura e vazão molar diária de uréia, bem como um aumento na produtividade celular (P_x) e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$).

Esse fato, associado à pequena diferença entre os valores de X_m estimados pelo modelo (EQ. 7) e os valores experimentais (FIG. 39), demonstram a aplicabilidade da metodologia utilizada.

FIGURA 38. Concentração celular (X) de *A. platensis*, em função do tempo, referentes aos cultivos de ponto central do planejamento (E_9 – E_{11}) (●); barras de erro correspondentes ao desvio padrão.

FIGURA 39. Concentração celular (X) de *A. platensis*, em função do tempo, referentes aos cultivos de ponto de ótimo (O_1 – O_3) (●); barras de erro correspondentes ao desvio padrão.

7. CONCLUSÕES

As variações de temperatura (T) e vazão molar de alimentação diária de uréia (K) adicionada no decorrer do cultivo influenciam na concentração celular máxima (X_m) e na produtividade em células (P_x), bem como no fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$).

O teor de lipídeo da biomassa não foi influenciado pelas condições experimentais adotadas neste trabalho, sendo os valores obtidos dentro da faixa citada na literatura para este microrganismo.

O teor de proteína da biomassa foi dependente da temperatura e da vazão molar de alimentação diária de uréia. Para vazões de uréia até $0,717 \text{ mM.dia}^{-1}$, o aumento da temperatura diminuiu o teor de proteínas na biomassa. Por outro lado, para valores de vazão de uréia maiores ($\geq 0,883 \text{ mM.dia}^{-1}$), ao aumentar a temperatura, aumenta-se também o teor de proteínas na biomassa. O maior valor de teor de proteína obtido neste trabalho foi de 39,49 % ($T = 33^\circ\text{C}$, $K = 1,879 \text{ mM.dia}^{-1}$).

As regressões quadráticas das variáveis dependentes (concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_x) e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função dos valores codificados de temperatura (X_1) e da vazão molar de alimentação diária de uréia (X_2), permitiram obter as equações que explicaram satisfatoriamente os resultados experimentais. Os modelos matemáticos obtidos para esses parâmetros foram:

$$X_m = 2967 + 170,1 X_1 + 642,5 X_2 - 285,1 X_1^2 - 93,22 X_2^2 + 60,12 X_1 X_2$$

$$P_x = 370,76 - 37,95 X_1 + 68,06 X_2 - 20,31 X_1^2 - 9,037 X_2^2$$

$$Y_{X/N} = 17,18 + 1,429 X_1 - 0,568 X_2 - 0,877 X_1^2 - 0,107 X_2^2$$

Comprovou-se a aplicabilidade da metodologia de superfície de resposta na otimização deste processo, assim, neste trabalho, as condições experimentais determinadas como ótimas foram uma temperatura de 31,7 °C e 1,16 mM de uréia como vazão molar de alimentação diária, obtendo-se valores de concentração celular máxima (X_m) de $4186 \pm 39 \text{ mg.L}^{-1}$, produtividade celular (P_x) de $757 \pm 8 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) de $14,3 \pm 0,1 \text{ mg.mg}^{-1}$, valores estes, maiores daqueles apresentados em outros trabalhos no cultivo desse microrganismo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- ABDIN EL SHERIF, S.A.; CLEMENT, G. *Spirulina* sp. food algae: discovery of natural lakes at Wadi El Natrun in the Arab Republic of Egypt. **Oil & Gas Science and Technology – Revue de L'IFP**, Paris, v. 37, n.1, p.123-130, Jan-Feb. 1982.
- ABELIOVICH, A.; AZOV, Y. Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 31, n. 6, p. 801-806, June 1976.
- ABU, G.; OGBONDA, K.; AMINIGO, R. Optimization studies of biomass production and protein biosynthesis in a *Spirulina* sp. isolated from an oil - polluted flame pit in the Niger Delta. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 22, p. 2550-2554, 2007.
- ANNAPURNA, V.V.; DEOSTHALE, Y.G.; BAMJI, M.S. *Spirulina* as a source of vitamin A. **Plant foods for human nutrition**, v. 41, p. 125-134, 1991.
- BALLONI, W., TOMASELLI, L., GIOVANNETTI, L., MARGHERI, M.C. **Biologia fondamentale del genere *Spirulina***. In: Atti del Convegno: Prospettive della coltura di *Spirulina* in Italia. Firenze, p. 49-82, 1980.
- BALLONI, W.; MATERASSI, R.; PELOSI, E.; PUSHPARAJ, B.; FLORENZANO, G.; STENGEL, E.; SOEDER, C.J. Comparison of two different culture devices for mass production of microalgae. I – Yields of *Scenedesmus obliquus* and *Coelastrum sphaericum* – **Archive of Hydrobiology Supplement**, v. 60, n. 3, p. 324-331, 1981.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 3ª ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2001. 300 p.
- BEZERRA, R.P.; MATSUDO, M.C.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J.C.M. Influence of Ammonium Chloride Feeding Time and Light Intensity on the Cultivation of *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 2, 2008.

¹ As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

- BECKER, E. W. Algae mass cultivation – production and utilization. **Processes in Biochemistry**, v. 16, n. 5, p. 10–14, 1981.
- BELKIN, S.; BOUSSIBA, S. High internal pH conveys ammonia resistance in *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 38, n. 2-3, p. 167-169, 1991.
- BOROWITZKA, M.A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 313–321, 1999.
- BOUSSIBA, S. Ammonia uptake in the alkalophilic cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Plant Cell Physiology**, v. 30, p. 303–308, 1989.
- BOUSSIBA, S.; RICHMOND, A. C-Phycocyanin as a storage protein in blue-green algae. **Archives of Microbiology**, v. 125, p. 143–147, 1980.
- CARERI, M.; FURLATTINI, L.; MANGIA, A.; MUSCI, M.; ANKLAM, E.; THEOBALD, A.; VON HOLST, C. Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina pacifica* algae: a chemometric approach. **Journal of Chromatography A**, v. 912, n. 1, p. 61-71, Mar. 2001.
- CARVALHO, J.C.M.; VITOLO, M.; SATO, S.; AQUARONE, E. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* grown in sugarcane blackstrap molasses through a fed-batch process: optimization by response surface methodology. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 110, p. 151–164, 2003.
- CARVALHO, J.C.M.; FRANCISCO, F.R.; ALMEIDA, K.A.; SATO, S.; CONVERTI, A. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially-increasing feeding rate. **Journal of Phycology**, v. 40, p. 589–597, 2004.
- CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. **Fermentação descontínua alimentada**. In: Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica. SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. São Paulo: Edgar Blucher Ltda., p. 205–218, 2001.
- CASTENHOLZ, R.W. Subsection III, order *Oscillatoriales*. In: STANLEY, J.T. *et al.* (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. v. 3, Baltimore: William and Wilkins, p. 1771, 1989.

- ÇELEKLI, A.; YAVUZATMACA, M. Predictive modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of nitrate and NaCl concentrations. **Bioresource Technology**, n. 100, p. 1847-1851, Set, 2008.
- CHOJNACKA, K., CHOJNACKA, A., GÓRECKA, H., 2005. Biosorption of Cr^{3+} , Cd^{2+} and Cu^{2+} ions by blue-green algae *Spirulina sp.*: kinetics, equilibrium and the mechanism of the species. *Chemosphere* 59, 75–84.
- CIFERRI, O. *Spirulina*, the Edible Microorganism. **Microbiological Reviews**, v. 47, n. 4, p. 551-578, 1983.
- CIFERRI, O.; TIBONI, O. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. **Annual Review of Microbiology**, v. 39, p. 503-526, 1985.
- CHRONAKIS, I.S.; GALATANU, A.N.; NYLANDER, T.; LINDMAN, B. The behaviour of protein preparation from blue-green algae (*Spirulina platensis* strain Pacifica) at the air/water interface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 173, p. 181-192, 2000.
- COHEN, Z. The chemical of *Spirulina*. In: VONSHAK, A., ed. ***Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology***. London: Taylor and Francis, p. 175-204, 1997.
- COLLA L.M., REINEHR C.O., REICHERT C., COSTA J.A.V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 1489–1493, Sep. 2005
- CONVERTI, A.; LODI, A.; DEL BORGHI, A.; SOLISIO, C. Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift tubular reactor system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 13-18, 2006.
- CORNET, J.F.; DUSSAP, C.G.; GROS, J.B. Kinetics and energetics of photosynthetic micro-organisms in photobioreactors. Application to *Spirulina* growth. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, v. 59, p. 155–194, 1998.
- CRUZ, A.J.G.; SILVA, A.S.; ARAUJO, M.L.G.C.; GIORDANO, R.C.; HOKKA, C.O. Modelling and optimization of the cephalosporin C production bioprocess in a fed-batch bioreactor with invert sugar as substrate. **Chemical Engineering Science**, v. 54, p. 3137–3142, 1999.

- DANESI, E.D.G. **Cultivo de *Spirulina platensis* por processo descontínuo alimentado para obtenção de clorofila**. São Paulo, 2001, 214p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- DANESI, E.D.G.; RANGEL-YAGUI, C.O.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass & Bioenergy**, v. 23, p. 261–269, 2002.
- DANESI, E.D.G.; RANGEL, C.O.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass & Bioenergy**, v. 26, p. 329-335, 2004.
- DILLON, J. C.; PHUC, A. P.; DUBACQ, J. P. Nutritional value of the alga *Spirulina*. **Plants in Human Nutritions**, v. 77, p. 32-46, 1995.
- DURAND-CHASTEL, H. **Production and use of *Spirulina* in Mexico**. In: SHELEF, G. & SOEDER, C.J., eds. Algae biomass. Elsevier–North Holland, Biomedical Press, Amsterdam, Holand, p. 851, 1980.
- ECHEGARAY, O.; CARVALHO, J.; FERNANDES, A.; SATO, S.; AQUARONE E. e VITOLO, M. Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugarcane blackstrap molasses: invertase activity of intact cells in ethanol fermentation, **Biomass and Bioenergy**, n. 19, p. 39–50, 2000.
- FAINTUCH, B.L. **Análise comparativa da produção de biomassa a partir de três cianobactérias empregando distintas fontes nitrogenadas**. 1989. 192 p. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.
- FERNANDES, A.N.R. **Contribuição ao estudo do processo descontínuo alimentado de fermentação alcoólica**. 1998. 171 p. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.
- FERRAZ, C.A.M. Produção de *Spirulina maxima*: Influência de ecofatores e uso de um subproduto da indústria alcooeira. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 70-74, 1986.

- FERREIRA, L.S. **Estudo da intensidade luminosa no cultivo de *Arthrospira (Spirulina) platensis* em reator tubular utilizando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio por processo descontínuo alimentado**. 2008. 113 p. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.
- FUNTEU, F.; GUET, C.; WU, B.; TRÉMOLIÈRES, A. Effects of environmental factors on the lipid metabolism in *Spirulina platensis*. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 35, p. 63-71, 1997.
- GAO, K.; LI, P.; WATANABE, T.; HELBLING E.W. Combined effects of ultraviolet radiation and temperature on morphology, photosynthesis, and DNA of *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Cyanophyta). **Journal of Phycology**, n. 44, p. 777–786. 2008.
- GAO, K.; MA, Z. Photosynthesis and growth of *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Cyanophyta) in response to solar UV radiation, with special reference to its minor variant. **Environmental and Experimental Botany**, n. 63, p. 123-129, 2008.
- GRANER, C.A.; ZUCCARI, M.L.; PINHO, S.Z. Determinação da demanda química de oxigênio em águas por espectrofotometria simultânea dos íons crômio (III) e dicromato. **Eclética Química**, v. 23, 1998.
- GUGLIELMI, G.; RIPPKA, R.; TANDEAU DE MARSAC, N. Main properties that justify the different taxonomic position of *Spirulina* spp and *Arthrospira* spp. among Cyanobacteria. **Bulletin of the Institute of Oceanography**, Monaco, v. 12, p. 13, 1993.
- HERRERO, M.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J.; SEÑORÁNS, F.J.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. **Food Chemistry**, v. 93, n. 3, p. 417-423, Dec. 2005.
- HIRANO, M.; MORI, H.; MIURA, Y.; MATSUNAGA; NAKAMURA, N. γ -Linolênic acid production by microalgae, *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 24-25, p. 183-191, 1990.
- HONGSTHONG, A.; SIRIJUNTARUT, M.; PROMMEENATE, P.; THAMMATHORN, S.; BUNNAG, B.; CHEEVADHANARAK, S.; TANTICHAROEN, M. Revealing differentially expressed proteins in two

- morphological forms of *Spirulina platensis* by proteomic analysis. **Molecular Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 123-130, June 2007.
- JENSEN, S.; KNUTSEN, G. Influence of light and temperature on photoinhibition of photosynthesis in *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, p. 495-504, 1993.
- JIMÉNEZ, C.; COSSÍO, B.R.; LABELLA, D.; NIELL, F.X. The feasibility of industrial production of *Spirulina* (*Arthrospira*) in Southern Spain. **Aquaculture**, v. 217, n. 1-4, p. 179-190, Mar. 2003.
- KIM, M.K.; PARK, J.W.; PARK, C.S.; KIM, S.J.; JEUNE, K.H.; CHANG, M.U.; ACREMAN, J. Enhanced production of *Scenedesmus* sp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. **Bioresource Technology**, n. 98, p. 2220–2228, 2007.
- LACAZ-RUIZ, R. *Espirulina e Zootecnia*. In: LACAZ-RUIZ, R., ed. **Espirulina – Estudos & Trabalhos**. São Paulo: Ed. Roca, p. 1-34, 2003.
- LEDUY, A.; THERIEN, N. An improved method for optical density measurement of the semicroscopic blue algae *Spirulina maxima*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 19, p. 1219-1224, 1977.
- LEE, B.; KIM, J. K. Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. **Aquacultural Engineering**, v. 25, n. 20, p. 111-124, 2001.
- LITCHFIELD, J. H. Single cell protein. **Food technology**, v. 31, p. 175-179, 1977.
- LODI, A.; SOLETTI, D.; SOLISIO, C.; CONVERTI, A. Chromium (III) removal by *Spirulina platensis* biomass. *Chemical Engineering Journal*, n. 136, p. 151-155, 2008.
- MATA, T.M.; MARTINS, A.A.; CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n. 14, p. 217-232, 2010.
- MACEDO, R.V.T.; ALEGRE, R.M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina máxima* em dois níveis de temperatura. Parte II: Produção de lipídeos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 183-186, 2001.
- MAHAJAN, G.; KAMAT, M. γ -Linolenic acid production from *Spirulina platensis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 466-469, 1995.

- MANNING, T.M.; WILSON, S.P.; CHAPMAN, J.C. Toxicity of chlorine and other chlorinated compounds to some Australian aquatic organisms. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, p. 971-976, 1996.
- MATSUDO, M.C. **Cultivo de *Spirulina platensis* por processo descontínuo alimentado repetitivo utilizando uréia como fonte de nitrogênio**. 2006. 103 p. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.
- MATSUDO, M. C.; BEZERRA, R. P.; SATO, S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J.C.M. Repeated fed-batch cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* using urea as nitrogen source. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p. 52-57, 2009.
- MORIST, A.; MONTESINOS, J.L.; CUSIDÓ, J.A.; GÒDIA, F. Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 535-547, Dec. 2001.
- MOSULISHVILI, L.M.; KIRKESALI, E.I.; BELOKOBILSKY, A.I.; KHIZANISHVILI, A.I.; FRONTASYEVA, M.V.; PAVLOV, S.S.; GUNDORINA, S.F. Experimental substantiation of the possibility of developing selenium- and iodine-containing pharmaceuticals based on blue-green algae *Spirulina platensis*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, n. 1, p. 87-97, Aug. 2002.
- MÜHLING, M.; HARRIS, N.; BELAY, A.; WHITTON, B.A. Reversal of helix orientation in the cyanobacterium *Arthrospira*. **Journal of Phycology**, n. 39, p. 360–367. 2003.
- NAES, H.; POST, A.F. Transient states of geosmin, pigments, carbohydrates and proteins in continuous cultures of *Oscillatoria brevis* induced by changes in nitrogen supply. **Archives of Microbiology**, v. 150, p. 333-337, 1988.
- NURDOGAN, Y. & OSWALD, W.J. Enhanced nutrient removal in high-rate ponds. **Water Science and Technology**, v. 31, n. 12, p. 33-43, 1995.
- OLGUIN, E.J.; GALICIA, S., CAMACHO, R., MERCADO, G. Production of *Spirulina* sp. in sea water supplemented with anaerobic effluents in outdoor raceways under temperate climatic conditions. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 48, p. 242-247, 1997.

- OLGUÍN, E.J.; GALICIA, S.; HERNÁNDEZ, E. ANGULO, O. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. Growth on pig waste. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 19-24, 2001.
- PANE, L.; SOLISIO, C.; LODI, A.; MARIOTTINI, G.L.; CONVERTI, A. Effect of extracts from *Spirulina platensis* bioaccumulating cadmium and zinc on L929 cells. **Ecotoxicology Environment Safety**, v. 70, n. 1, p. 121-126. 2008.
- PAOLETTI, C.; PUSHPARAJ, B.; TOMASELLI FEROCI, L. Ricerche sulla nutrizione minerale di *Spirulina platensis*. In: Atti del Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, 17, 26-28 ott. 1975, Padova, Italia. **Società Italiana di Microbiologia**, [s.n.], v. 2, p. 845-853, 1975.
- PAOLETTI, C.; VINCENZINI, M.; BOCCI, F.; MATERASSI, R. Composizione biochimica generale delle biomassa di *S. platensis* e *S. maxima*. In: MATERASSI, R. **Prospettive della coltura di *Spirulina* in Italia**. Rome: Consiglio Nazionale delle Ricerche, p. 111-125, 1980.
- PARADA, J. L.; CAIRE, G. Z.; MULE, M. C. Z.; CANO, M. M. S. Lactic acid bacteria growth promoters from *Spirulina platensis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45, p. 225-228, 1998.
- PELIZER, L. H.; SASSANO, C. E. N.; CARVALHO, J. C. M.; SUNAO, S.; GIOIELLI, L. A.; MORAES, I.O. Padronização do método de secagem da biomassa de *Spirulina platensis*. **Revista de Farmácia e Química**, v. 32, n. 1, p. 37-40, 1999.
- PELIZER, L.H.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S.; MORAES, I.O. *Spirulina platensis* growth estimation by pH determination at different cultivations conditions. *Electronic Journal of Biotechnology* [on line], v. 5, n. 3, p. 251-257, 2002. <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol5/issue3/full/8/8.pdf>
- PELIZER, L.H.; DANESI, E.D.G.; RANGEL, C.O.; SASSANO, C.E.N.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S.; MORAES, I.O. influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 371-375, 2003.
- PIERCE, W. C.; HAENISCH, E. L. **Quantitative Analysis**, 3ed., John Willey e Sons Inc., New York, 1948.
- PIORRECK, M.; HINNERK, K.; POHL, B.; POHL, P. Biomass production, total protein chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue

- green algae under different nitrogen regimes. **Phytochemistry**, v. 23, n. 2, p. 207-216, 1984.
- PIORRECK, M.; BAASCH, K.H.; POHL, P. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. **Phytochemistry**, v. 23, n. 2, p. 207-216, Jan. 1984.
- PULTZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 65, p. 635–648, 2004.
- PULZ, O.; SCHEIBENBOGEN, K. Photobioreactors: Design and performance with respect to light energy input. **Advances in Biochemistry Engineering and Biotechnology**, v. 41, p. 124-48, 1998.
- RADMANN, E.M.; REINEHR, C.O.; COSTA, J.A.V. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. *Aquaculture*, n. 265 (1–4), p. 118-126. 2007
- RAFIQUL, I.M.; JALAL, K.C.A.; ALAM, M.Z. Environmental Factors for Optimization of *Spirulina* Biomass in Laboratory Culture. **Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 19-22, 2005.
- RANGEL, C. O. **Influência da luz e uréia no crescimento e conteúdo de clorofila da biomassa de *Spirulina platensis***. São Paulo, 2000, 132p. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.
- RANGEL-YAGUI, C.O.; DANESI, E.D.G.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-bach process. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 133-141, 2004.
- RICHMOND, A. Phototropic microalgae. In: REHM, H. J.; REED, G. (eds.) **Biotechnology**. Weinheim: Verlag Chemie, v. 3, 1983.
- RICHMOND, A. *Spirulina*. In: BOROWITZKA, M.A., BOROWITZKA, L.J. **Microalgal Biotechnology**, Cambridge: Cambridge University Press, p. 85-121, 1988.
- RICHMOND, A.; In: BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. (Eds.) *Micro-Algae Biotechnology*, Cambridge University Press, 1989.

- RICHMOND, A.; QIANG, H. Principles for efficient utilization of light for mass production of photoautotrophic microorganisms. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 63-65, p. 649-658, 1997.
- RODRIGUES, A. **Contribuição ao estudo do processo descontínuo alimentado de fermentação alcoólica**. São Paulo, 1998. 171p. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.
- RODRIGUES, M.S. **Avaliação do cultivo de *Spirulina platensis* utilizando simultaneamente nitrato de potássio e cloreto de amônio como fontes de nitrogênio**. São Paulo, 2008. 149p. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.
- ROSELLO-SASTRE, R.; CSÖGÖR Z.; PERNER-NOCHTA, I.; FLECK-SCHNEIDER P.; POSTEN, C. Scale-down of microalgae cultivations in tubular photo-bioreactors – a conceptual approach. **Journal of Biotechnology**, n. 132, p. 127-133, Ap. 2007.
- SAMUELSON, G.; LÖNNEBORG, A.; ROSENQVIST, E.; GUSTAFSSON, P.; ÖQUIST, G. Photoinhibition and reactivation of photosynthesis in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. **Plant Physiology**, v. 79, p. 992-995, 1985.
- SÁNCHEZ, M.; BERNAL-CASTILHO, J.; ROZO, C.; RODRÍGUEZ, I. *Spirulina* (*Arthrospira*): An edible microorganism. A review. Revista de la Facultad de Ciencias, v. 8, n.1, 2003. www.javeriana.edu.co/universitas_scientiarum/vol8n1. Acesso em 13 de julho de 2009.
- SANCHEZ-LUNA, L.D; TONINI, G.C.; SATO, S.; CARVALHO, J.C.M. Avaliação do crescimento de *Spirulina platensis* por processo descontínuo alimentado utilizando metodologia de superfície de resposta. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, supl. 3, 2003.
- SÁNCHEZ-LUNA, L.D.; CONVERTI, A.; TONINI, G.C.; SATO, S.; CARVALHO, J.C.M. Continuous and pulse feedings of urea as a nitrogen source in fed-batch cultivation of *Spirulina platensis*. **Aquacultural Engineering**, v. 31, n. 3-4, p. 237-245, 2004.

- SANCHEZ-LUNA, L.D.; BEZERRA, R.P.; MATSUDO, M.C.; SATO, S.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J.C.M. Influence of pH, temperature, urea molar flowrate on *Arthrospira platensis* fed-batch cultivation: a kinetic and thermodynamic approach. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 4, 2007.
- SANCHEZ-LUNA, L. D.; CONVERTI, A.; TONINI, G. C. ; SATO, S. ; CARVALHO, J.C.M. Continuous and pulse feedings os urea as a nitrogen source in fed-batch cutivation of *Spirulina platensis*. **Aquacultural Engineering**, v. 31, p. 237-245, 2004.
- SASSANO, C. E. N. **Influência da uréia no crescimento e no teor do ácido graxo γ -linolênico da biomassa de *Spirulina platensis***. 1999, 144p. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.
- SASSANO, C. E. N. **Cultivo de *Spirulina platensis* por processo contínuo utilizando cloreto de amônio como fonte de nitrogênio**. 2004. 116 p. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.
- SASSI, A. H.; FAUVART, L.; DESCHAMPS, A. M.; LEBEAULT, J.M. Fed-batch production of L-lysine by *Corynebacterium glutamicum*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 1, p. 85-90, 1998.
- SAXENA, P. N.; AHMAD, M. R.; SHYAM, R. Cultivation of *Spirulina* in sewage for poultry feed. **Amnia. Experientia**, v. 39, p. 1077-1083, 1983.
- STANCA, D.; POPOVIC, E. Urea as nitrogen source in modified Zarrouk medium. **Review Roumain de Biologie Animals**, v. 41, n. 1, p. 25-31, 1996.
- SCHLÖSSER, U. G. Sammlung von Algenkulturen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v. 95, p. 181-276, 1982.
- SHIMAMATSU, H. Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. **Hydrobiologia**, v. 512 n.1, p. 39-44, Jan. 2004.
- SOLETTTO, D.; BINAGHI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J.C.M ; CONVERTI, A. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. **Aquaculture**, v. 243, p. 217-224, 2005.

- SOLETTTO, D.; BINAGHI, L.; FERRARI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J.C.M.; ZILLI, M.; CONVERTI, A. Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 2, p. 369-375, 2008.
- SOLISIO, C.; LODI, A.; TORRE, P.; CONVERTI, A.; DEL BORGHI, M. Copper removal by dry and re-hydrated biomass of *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, n. 97, p. 1756-1760, 2006.
- SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae, **Journal Bioscience and Bioengineering**, n. 101, p. 87-96, 2006.
- STANCA, D.; POPOVIC, E. Urea as nitrogen source in modified Zarrouk medium. **Review Roumain de Biology Animals**, v. 41, n. 1, p. 25-31, 1996.
- TACON, A.; JACKSON, A. **Utilization of conventional and unconventional source in practical fish feeds**. In: Nutrition and feeding in fish. London, Academic Press, p. 119-45, 1985.
- TANTICHAROEN, M.; REUNGJITCHACHAWALI, M.; BOONAG, B.; VONKTAVEESUK, P.; VONSHAK, A.; COHEN, Z. Optimization of γ -linolenic acid (GLA) production in *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 3, p. 295-300, 1994.
- TOMASELLI, L. Morphology, Ultrastructure and Taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* and *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. In: VONSHAK, A., ed. ***Spirulina platensis* (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor and Francis, p. 79-99, 1997.
- TORZILLO, G.; VONSHAK, A. Effect of light and temperature on the photosynthetic activity of cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, Aberdeen, v. 6, p. 399-403, 1994.
- TRAVIESO, L.; HALL, D. O.; RAO, K.K.; BENÍTEZ, F.; SÁNCHEZ, E.; BORJA, R. A helical tubular photobioreactor producing *Spirulina* in a semicontinuous mode. International. **Biodeterioration & Biodegradation**, v. 47, p. 151-155, 2001.

- TREDICI, M.R.; CHINI ZITTELLI, G. Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, p. 187-197, 1998.
- TSUKADA, O.; KAWAHARA, T.; MIYACHI, S. Mass culture *Chlorella* in Asian countries. In: MITSUI, A.; MIYACHI, S.; SAN PIETRO, A.; TAMURA, S. Eds. **Biological Solar Energy Conversion**. Academic Press, New York, p. 363-365, 1977.
- UTEX The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin. Algae Detail. <<http://www.utex.org/>>. Acessado em 15 de abril de 2008.
- VONSHAK, A.; BOUSSIBA, S.; ABELIOVICH, A.; RICHMOND, A. Production of *Spirulina* Biomass: maintenance of monoalgal culture outdoors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 2, p. 341-349, 1983.
- VONSHAK, A.; KANCHARAKSA, N.; BUNNAG, B.; TANTICHAROEN, M. Role of light and photosynthesis on the acclimation process of the cyanobacterium *Spirulina platensis* to salinity stress. *Journal Applied Phycology*, v. 8, p. 119-124, 1996
- VONSHAK, A. (Ed.). ***Spirulina platensis (Arthrospira)***: physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor and Francis, 233 p, 1997a.
- VONSHAK, A. *Spirulina*: growth, physiology and biochemistry. In: VONSHAK, A. (Ed.). ***Spirulina platensis (Arthrospira)***: physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor and Francis, cap. 3, p. 43-65, 1997b.
- WATANABE, Y.; HALL, D.O. Photosynthetic CO₂ conversion technologies using a photobioreactor incorporating microalgae – energy and material balances. **Energy Conversion and Management**, v. 37, p. 1321-1326, 1996.
- WALACH, M.R.; BAZIN, M.J.; PIRT, S.J.; BALLYUZI, H.H.M. Computer control of carbon-nitrogen-ratio in *S. platensis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 29, p. 520-528, 1987.
- WU, H.; GAO, K.; VILLAFañE, V.E.; WATANABE, T.; HELBLING, E.W. Effects of solar UV radiation on morphology and photosynthesis of filamentous cyanobacterium *Arthrospira platensis*. **Applied Environment Microbiology**, n.71, p. 5004–5013. 2005.

- XIE, L.; WANG, D.L.C. Fed-batch cultivation of animal cell using different medium design concepts and feeding strategies. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, n. 11, p. 1175–89, 1994.
- YAMANE, T.; SHIMIZU, S. Fed-batch techniques in microbial process. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**. v. 30, p. 147-194. 1984.
- ZHEKISHEVA,M.; BOUSSIBA,S.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; ZARKA, A.; COHEN, Z. Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. **Journal of Phycology**, v.38, p. 325-331, 2002.