MAYLA SANTOS RODRIGUES

Avaliação da utilização do dióxido de carbono proveniente da fermentação alcoólica no cultivo de *Spirulina (Arthrospira) platensis*: uso simultâneo de nitrato de sódio e sulfato de amônio como fontes de nitrogênio em fotobiorreator aberto

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Universidade de São Paulo

Área: Tecnologia de Fermentações

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

Facoltà di Ingegneria

Università degli Studi di Genova

Área: *Ingegneria Chimica, dei Materiali e di Processo*

Orientador: Prof. Dr. Attilio Converti

São Paulo

2011

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

R696a Rodrigues, Mayla Santos
Avaliação da utilização do dióxido de carbono proveniente da fermentação alcoólica no cultivo de *Spirulina (Arthrospira) platensis*: uso simultâneo de nitrato de sódio e sulfato de amônio como fontes de nitrogênio em fotobiorreator aberto. / Mayla, Santos Rodrigues. -- São Paulo, 2011.

169p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Carvalho, João Carlos Monteiro de

Orientador: Converti, Attilio

1. Bioquímica industrial 2. Biotecnologia 3. Microbiologia industrial I. T. II. Carvalho, João Carlos Monteiro de, orientador III. Converti, Attilio, orientador.

660.63 CDD

Mayla Santos Rodrigues

Avaliação da utilização do dióxido de carbono proveniente da fermentação alcoólica no cultivo de *Spirulina (Arthrospira) platensis*: uso simultâneo de nitrato de sódio e sulfato de amônio como fontes de nitrogênio em fotobiorreator aberto

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho
orientador/presidente

Prof. Dr. Attilio Converti
1º examinador

Profa. Dra. Patrizia Perego
2º examinador

Prof. Dr. José Abrahão Neto
3º examinador

Dr. Fernando Fratelli
4º examinador

São Paulo, 10 de fevereiro de 2012.

*Ao meu pai, Carlos Alberto,
e à minha mãe, Dirce Maria,
que acreditaram e investiram em mim.*

Obrigada.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho e ao Prof. Dr. Sunao Sato, pela oportunidade de realização do curso de doutorado e pelo apoio durante todo o processo de orientação.

Ao Prof. Dr. Attilio Converti, Profa. Dra. Patrizia Perego e Dra. Alessandra Lodi, pela oportunidade de realização da pesquisa na Itália, e principalmente por todo o apoio, atenção e dedicação durante a minha estadia em Gênova.

Às estagiárias Camila Knysak e Laís Guimarães, por toda a ajuda técnica e moral, aos colegas do Brasil, Ana Lucía M. Jácome, Ivan Alejandro A. León, Lina Carolina C. Martinez, Lívia S. Ferreira, Marcelo C. Matsudo e Raquel P. Bezerra, e aos colegas da Itália, Alessandro A. Casazza, Ana Paula E. Santo, Bahar Aliakbarian, Mohamed Lataoui, Pier Francesco Ferrari e Ricardo P. S. Oliveira, pelo apoio e companhia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de ambas as bolsas de doutorado nacional e internacional.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para esta pesquisa.

Meus sinceros agradecimentos.

“Per insegnare bisogna prima imparare”
(*provérbio italiano*)

RESUMO

RODRIGUES, M. S. **Avaliação da utilização do dióxido de carbono proveniente da fermentação alcoólica no cultivo de *Spirulina (Arthrospira) platensis*: uso simultâneo de nitrato de sódio e sulfato de amônio como fontes de nitrogênio em fotobiorreator aberto.** 2011. 169 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O principal objetivo deste trabalho foi a avaliação do potencial da utilização do dióxido de carbono proveniente da fermentação alcoólica no cultivo *Spirulina (Arthrospira) platensis*, visando demonstrar a possibilidade do uso de um gás efluente na produção de biomassa microbiana de alto valor comercial. Para tanto, tal cianobactéria foi cultivada em tanques abertos, em escala laboratorial, em temperatura de 30 ± 1 °C e intensidade luminosa de 156 ± 20 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O estudo de diversas variáveis de cultivo levou à fixação das seguintes condições: concentração do inóculo de 400 ± 20 mg L^{-1} ; pH de $9,0 \pm 0,3$, controlado por meio da adição de dióxido de carbono proveniente de cilindros; meio de cultura Schlösser, modificado de maneira a conter 0,497 e 16,4 g L^{-1} de carbonato e bicarbonato de sódio, respectivamente, e apenas 5,9 mM de nitrato de sódio; adição de 7,5 mM de sulfato de amônio no decorrer de 13 dias, em quantidades diárias exponencialmente crescentes, através do processo descontínuo alimentado de cultivo. Sob tais condições foram obtidos os seguintes resultados: concentração celular máxima (X_m) de 2990 mg L^{-1} , produtividade celular (P_X) de 185 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$, velocidade específica máxima de crescimento (μ_m) de 0,42 d^{-1} , fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) de 8,85 mg mg^{-1} , teor final de clorofila (CL_f) de 4,3 mg g^{-1} , e teores de proteínas (PTN) e lipídeos (LIP) de 35 e 21 %, respectivamente. Com a finalidade de estimular o crescimento celular de *A. platensis*, optou-se por aumentar o valor da intensidade luminosa de 156 para 192 ou 252 ± 20 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no 5º, 8º ou 11º dia de cultivo. Os melhores resultados cinéticos ($X_m = 3954$ mg L^{-1} , $P_X = 253$ $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) e de conteúdo da biomassa ($CL_f = 4,2$ mg g^{-1} , PTN = 28 %, LIP = 19 %) foram obtidos com aumento da intensidade luminosa para 192 ± 20 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no 8º dia de cultivo. Os ensaios realizados sob tais condições otimizadas, porém com dióxido de carbono proveniente da fermentação alcoólica, levaram à obtenção dos seguintes resultados: $X_m = 3298$ mg L^{-1} , $P_X = 206$ $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$, $CL_f = 4,0$ mg g^{-1} , PTN = 28 %, LIP = 17 %. Por fim, conclui-se viável a utilização do gás carbônico resultante da fermentação alcoólica no cultivo de *A. platensis*. Sugere-se um estudo mais aprofundado da influência desse gás efluente industrial no metabolismo e crescimento de tal microrganismo fotossintetizante, a fim de possibilitar a obtenção de resultados de concentração e produtividade celulares tão altos quanto aqueles obtidos quando do uso de gás carbônico puro.

Palavras-chave: *Spirulina (Arthrospira) platensis*. Fontes de nitrogênio. Intensidade luminosa. Tanques abertos. Fermentação alcoólica. Dióxido de carbono.

ABSTRACT

RODRIGUES, M. S. **Evaluation of the use of carbon dioxide from alcoholic fermentation on *Spirulina (Arthrospira) platensis* cultivation: simultaneous use of sodium nitrate and ammonium sulphate as nitrogen sources in open photobioreactor.** 2011. 169 p. Doctor Thesis – Pharmaceutical Sciences College, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

The main objective of this work was the evaluation of the potential of using carbon dioxide from alcoholic fermentation on *Spirulina (Arthrospira) platensis* cultivation, aiming to prove the feasibility of applying an effluent gas in the production of high added-value microbial biomass. In order to do so, the cyanobacterium was cultivated in laboratorial-scale open raceway tanks at temperature 30 ± 1 °C and light intensity 156 ± 20 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. After the study of several cultivation variables, the following conditions were set: inoculum concentration 400 ± 20 mg L^{-1} ; pH $9,0 \pm 0,3$, controlled by the addition of carbon dioxide from cylinders; Schlösser medium, modified as to contain 0,497 and 16,4 g L^{-1} sodium carbonate and bicarbonate, respectively, and only 5,9 mM sodium nitrate; addition of 7,5 mM ammonium sulphate throughout 13 days, at exponentially increasing amounts, by the fed-batch cultivation process. Under such conditions, the following results were obtained: maximum cell concentration $X_m = 2990$ mg L^{-1} , cell productivity $P_X = 185$ $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$, maximum specific growth rate $\mu_m = 0,42$ d^{-1} , cell to nitrogen conversion factor $Y_{X/N} = 8,85$ mg mg^{-1} , final chlorophyll content $CL_f = 4,3$ mg g^{-1} , and content of proteins (PTN) and lipids (LIP) of 35 and 21 %, respectively. Objectiving further optimized *A. platensis* growth, it was chosen to increase the light intensity from 156 to 192 or 252 ± 20 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ on the 5th, 8th or 11th day of cultivation. The best results in terms of growth ($X_m = 3954$ mg L^{-1} , $P_X = 253$ $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) and biomass content ($CL_f = 4,2$ mg g^{-1} , PTN = 28 %, LIP = 19 %) were reached with increasing the light intensity to 192 ± 20 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ on the 8th day of cultivation. The runs carried out under such optimum conditions, but using carbon dioxide from alcoholic fermentation, led to the following results: $X_m = 3298$ mg L^{-1} , $P_X = 206$ $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$, $CL_f = 4,0$ mg g^{-1} , PTN = 28 %, LIP = 17 %. Conclusively, the use of carbonic acid gas from alcoholic fermentation on *A. platensis* cultivation was found viable. It would be valuable to further study the influence of this industrial effluent gas on the metabolism and growth of such photosynthetic microorganism, in order to make it possible reaching cell concentration and productivity results as high as those obtained using pure carbon dioxide.

Keywords: *Spirulina (Arthrospira) platensis*. Nitrate sources. Light intensity. Open raceway ponds. Alcoholic fermentation. Carbon dioxide.

RIASSUNTO

RODRIGUES, M. S. **Utilizzo di anidride carbonica proveniente dalla fermentazione alcolica nella coltura di *Spirulina (Arthrospira) platensis*: impiego simultaneo di nitrato di sodio e solfato d'ammonio come fonti di azoto in fotobioreattore all'aperto.** 2011. 169 f. Tesi (Dottorato) – Facoltà di Scienze Farmaceutiche, Università di São Paulo, São Paulo, Brasile.

L'obiettivo principale di questo studio è stato la valutazione del potenziale impiego in colture di *Spirulina (Arthrospira) platensis* di anidride carbonica proveniente da fermentazione alcolica, al fine di dimostrare la possibilità di utilizzare un gas effluente nella produzione di biomassa microbica ad elevato valore commerciale. A tal fine, il cianobatterio è stato coltivato in fotobioreattore all'aperto, in scala di laboratorio, alla temperatura di 30 ± 1 °C e con intensità luminosa pari a 156 ± 20 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Lo studio delle diverse variabili di crescita ha portato alle seguenti condizioni di crescita ottimali: concentrazione dell'inoculo 400 ± 20 mg L^{-1} , pH $9,0 \pm 0,3$, controllato con l'aggiunta di anidride carbonica proveniente da bombola, terreno di crescita di Schlösser, modificato con 0,497 e 16,4 g L^{-1} rispettivamente di carbonato e bicarbonato di sodio, ed appena di 5,9 mM di nitrato di sodio, aggiunta di 7,5 mM di solfato di ammonio durante i 13 giorni di durata della crescita esponenziale, con il processo fed-batch di coltura. In tali condizioni, sono stati ottenuti i seguenti risultati: concentrazione cellulare massima (X_m) di 2990 mg L^{-1} , produttività cellulare (P_X) di 185 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$, velocità specifica massima di crescita (μ_m) di 0,42 d^{-1} , fattore di conversione di azoto in biomassa ($Y_{X/N}$) di 8,85 mg mg^{-1} , contenuto finale di clorofilla (CL_f) di 4,3 mg g^{-1} , e contenuti di proteine (PTN) e lipidi (LIP) rispettivamente del 35 e 21 %. Al fine di stimolare la crescita cellulare di *A. platensis*, si è deciso di aumentare il valore dell'intensità luminosa da 156 a 192 o 252 ± 20 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nei giorni 5, 8 o 11 di crescita. I migliori risultati in termini di crescita ($X_m = 3954$ mg L^{-1} , $P_X = 253$ $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) e di composizione della biomassa ($CL_f = 4,2$ mg g^{-1} , PTN = 28 %, LIP = 19 %) sono stati ottenuti aumentando l'intensità luminosa a 192 ± 20 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ dopo 8 giorni. Le prove effettuate in queste stesse condizioni, ma con anidride carbonica proveniente dalla fermentazione alcolica, hanno portato ai seguenti risultati: $X_m = 3298$ mg L^{-1} , $P_X = 206$ $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$, $CL_f = 4,0$ mg g^{-1} , PTN = 28 %, LIP = 17 %. In conclusione, sembra fattibile impiegare l'anidride carbonica proveniente da fermentazione alcolica nella coltivazione di *A. platensis*. Ulteriori studi dovrebbero essere effettuati al fine di valutare l'influenza di questo gas effluente sul metabolismo e sulla crescita del microrganismo fotosintetico studiato, al fine di consentire il raggiungimento di risultati di concentrazione e produttività cellulare elevati come quelli riportati nelle prove eseguite con anidride carbonica pura.

Parole chiave: *Spirulina (Arthrospira) platensis*. Fonti di azoto. Intensità luminosa. Fotobioreattore aperto. Fermentazione alcolica. Anidride carbonica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 –	<i>Arthrospira (Spirulina) platensis.</i>	34
Figura 02 –	Exemplos de dispositivos de cultura em escala comercial: tanques e fotobiorreatores tubulares.	39
Figura 03 –	<i>Chlorella vulgaris.</i>	45
Figura 04 –	Cultivo de <i>A. platensis</i> em mini-tanques em escala laboratorial.	49
Figura 05 –	Representação esquemática do sistema de incorporação de dióxido de carbono acoplado ao fotobiorreator: mini-tanque aberto (1), pás rotativas para homogeneização (2), mangueira de silicone transparente (3), bomba motorizada de submersão (4), conector de vidro em forma de Y (5), fonte de dióxido de carbono (6).	50

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 01** – Concentração celular (X , quadrados) e velocidade específica de crescimento (μ_X , pontos) em função do tempo (t) do ensaio padrão 01, realizado com processo descontínuo de cultivo. 72
- Gráfico 02** – Concentração celular (X , quadrados) e velocidade específica de crescimento (μ_X , pontos) em função do tempo (t) do ensaio padrão 02, realizado com processo descontínuo alimentado de cultivo. 73
- Gráfico 03** – Concentração celular (X) em função do tempo (t) dos ensaios de adaptação 04 (quadrados) e 05 (círculos), realizados sem e com controle de pH, respectivamente. 76
- Gráfico 04** – Concentração residual de íons carbonato (CO_3^{-2}) em função do tempo (t) dos ensaios preliminares 07 (triângulos) e 12 (losangos), realizados com tempo de alimentação da fonte amoniacal de 13 dias, sem e com controle de pH, respectivamente. 78
- Gráfico 05** – Concentração residual de íons nitrato (NO_3^-) em função do tempo (t) dos ensaios preliminares 07 (triângulos) e 12 (losangos), realizados com tempo de alimentação da fonte amoniacal de 13 dias, sem e com controle de pH, respectivamente. 79
- Gráfico 06** – Velocidade específica de crescimento (μ_X) em função do tempo (t) dos ensaios preliminares 07 (linha completa) e 12 (linha pontilhada), realizados com tempo de alimentação da fonte amoniacal de 13 dias, sem e com controle de pH, respectivamente. 81
- Gráfico 07** – Valores de pH em função do tempo (t) dos ensaios preliminares 17a (linha completa), 20a (linha pontilhada) e 23a (linha tracejada), realizados com tempo de alimentação da fonte amoniacal de 13 dias e $\text{pH} = 9,0, 9,7$ e $10,4 \pm 0,3$, respectivamente. 83
- Gráfico 08** – Concentração celular (X) em função do tempo (t) dos ensaios principais 25 (quadrados) e 28 (círculos), realizados com intensidades luminosas de 156 e 252 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. 87
- Gráfico 09** – Velocidade específica de crescimento (μ_X) em função do tempo (t) dos ensaios principais 25 (linha completa) e 28 (linha pontilhada), realizados com intensidades luminosas de 156 e 252 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}$

s⁻¹, respectivamente. 88

Gráfico 10 – Concentração celular (X, quadrados) e velocidade específica de crescimento (μ_X , círculos) em função do tempo (t) do ensaio principal 29b, antes (símbolos cheios) e depois (símbolos vazios) da aplicação da intensidade luminosa 192 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no 5º dia de cultivo; ensaio realizado com dióxido de carbono proveniente de cilindros. 91

Gráfico 11 – Concentração celular (X) em função do tempo (t) dos ensaios principais 32a (quadrados) e 32b (círculos), antes (símbolos cheios) e depois (símbolos vazios) da aplicação da intensidade luminosa 252 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no 5º dia de cultivo; ensaios realizados com dióxido de carbono proveniente de cilindros. 92

Gráfico 12 – Concentração celular (X) em função do tempo (t) dos ensaios principais 30a (quadrados) e 33b (círculos), antes (símbolos cheios) e depois (símbolos vazios) da aplicação das intensidades luminosas 192 e 252 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente, no 8º dia de cultivo; ensaios realizados com dióxido de carbono proveniente de cilindros. 94

Gráfico 13 – Concentração celular (X) em função do tempo (t) dos ensaios principais 31b (quadrados) e 37b (círculos), antes (símbolos cheios) e depois (símbolos vazios) da aplicação da intensidade luminosa 192 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no 11º dia de cultivo; ensaios realizados com dióxido de carbono proveniente de cilindros e da fermentação alcoólica, respectivamente. 96

Gráfico 14 – Concentração celular (X, quadrados) e velocidade específica de crescimento (μ_X , círculos) em função do tempo (t) do ensaio principal 35a, antes (símbolos cheios) e depois (símbolos vazios) da aplicação da intensidade luminosa 192 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no 5º dia de cultivo; ensaio realizado com dióxido de carbono proveniente da fermentação alcoólica. 98

Gráfico 15 – Eficiência fotossintética (EF) em função do tempo (t) do ensaio principal 29b, antes (símbolos cheios) e depois (símbolos vazios) da aplicação da intensidade luminosa 192 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no 5º dia de cultivo; ensaio realizado com dióxido de carbono proveniente de cilindros. 99

- Gráfico 16 –** Valores médios do teor de clorofila (CL) em função do tempo (t) dos ensaios principais 33 (quadrados) e 39 (círculos), antes (símbolos cheios) e depois (símbolos vazios) da aplicação da intensidade luminosa $252 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ no 8º dia de cultivo; ensaios realizados com dióxido de carbono proveniente de cilindros e da fermentação alcoólica, respectivamente. 103
- Gráfico 17 –** Valores médios do teor de clorofila (CL) em função do tempo (t) dos ensaios principais 30 (quadrados) e 36 (círculos), antes (símbolos cheios) e depois (símbolos vazios) da aplicação da intensidade luminosa $192 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ no 8º dia de cultivo; ensaios realizados com dióxido de carbono proveniente de cilindros e da fermentação alcoólica, respectivamente. 104
- Gráfico 18 –** Valores do fator de separação (α) em função da concentração inicial dos íons metálicos (C_0) referentes aos sistemas binários $\text{Ni}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ (quadrados), $\text{Ni}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ (círculos) e $\text{Zn}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ (triângulos) nos quais as biomassas de *A. platensis* (símbolos cheios) e *C. vulgaris* (símbolos vazios) foram utilizadas como biossorventes. 110
- Gráfico 19 –** Concentração de íons Zn^{2+} adsorvidos à superfície da biomassa de *A. platensis* em função do tempo (t) em sistemas único (símbolo vazio, FERREIRA et al., 2011) e binários (símbolos cheios) – na presença de $0,50 \text{ mM Pb}^{2+}$ (quadrados), $1,0 \text{ mM Pb}^{2+}$ (círculos) e $2,0 \text{ mM Pb}^{2+}$ (triângulos). Testes com concentração inicial de $1,0 \text{ mM Zn}^{2+}$. 123
- Gráfico 20 –** Concentração de íons Pb^{2+} adsorvidos à superfície da biomassa de *A. platensis* em função do tempo (t) em sistemas único (símbolo vazio, FERREIRA et al., 2011) e binários (símbolos cheios) – na presença de $0,50 \text{ mM Ni}^{2+}$ (quadrados), $1,0 \text{ mM Ni}^{2+}$ (círculos) e $2,0 \text{ mM Ni}^{2+}$ (triângulos). Testes com concentração inicial de $1,0 \text{ mM Pb}^{2+}$. 123
- Gráfico 21 –** Média dos valores do capacidade de sorção no equilíbrio (q_e) dos íons bivalentes de níquel (quadrados), zinco (círculos) e chumbo (triângulos), nos testes com as biomassas de *A. platensis* (símbolos cheios) e *C. vulgaris* (símbolos vazios): sistemas únicos (a, FERREIRA et al., 2011), sistemas binários (b) e sistema ternário (c). 127
- Gráfico 22 –** Espectro infravermelho (absorbância em função do número de ondas)

da biomassa de *A. platensis*, livre (a, FERREIRA et al., 2011) e carregada com íons metálicos: $\text{Ni}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ (b), $\text{Ni}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ (c), $\text{Zn}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ (d), e $\text{Ni}^{2+}/\text{Zn}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ (e).

128

Gráfico 23 – Espectro infravermelho (absorbância em função do número de ondas) da biomassa de *C. vulgaris*, livre (a, FERREIRA et al., 2011) e carregada com íons metálicos: $\text{Ni}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ (b), $\text{Ni}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ (c), $\text{Zn}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ (d), e $\text{Ni}^{2+}/\text{Zn}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ (e).

129

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 – Composição mineral da solução principal dos meios de cultura originais de Paoletti e Schlösser.	51
Quadro 02 – Composição das soluções adicionais de metais e de microelementos dos meios de cultura originais de Paoletti e Schlösser.	52
Quadro 03 – Concentrações das fontes de carbono (carbonato e bicarbonato de sódio) dos meios de cultura modificados Schlösser I, II e III.	53
Quadro 04 – Ensaios e condições de experimentação dos cultivos de <i>A. platensis</i> em mini-tanques.	55
Quadro 05 – Protocolos de adição de dióxido de carbono proveniente de cilindros, e respectivas condições operacionais para a aplicação dos mesmos.	57
Quadro 06 – Protocolo de adição de dióxido de carbono proveniente da fermentação alcoólica, e respectiva condição operacional para a aplicação do mesmo.	58
Quadro 07 – Tipos de análises de variância, e respectivos fatores e respostas, aplicados para avaliação estatística dos resultados obtidos nos cultivos de <i>A. platensis</i> em mini-tanques.	64
Quadro 08 – Condições de experimentação dos testes de adsorção realizados com as biomassas secas de <i>A. platensis</i> e <i>C. vulgaris</i> .	66
Quadro 09 – Condições de cultivo do ensaio padrão 01.	71
Quadro 10 – Condições de cultivo do ensaio padrão 02.	73
Quadro 11 – Condições de cultivo dos ensaios de adaptação (ensaios 03 a 05).	74
Quadro 12 – Condições otimizadas do cultivo de <i>A. platensis</i> em mini-tanques.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 –	Quantidade de sulfato de amônio adicionada, m_t , a cada instante do cultivo, t , e valor de k para cada tempo de alimentação da fonte de nitrogênio considerado.	56
Tabela 02 –	Resultados referentes aos ensaios de adaptação, realizados com diferentes concentrações celulares iniciais, com e sem controle de pH (ensaios 03 a 05).	75
Tabela 03 –	Condições de cultivo e principais resultados dos ensaios preliminares A, realizados com diversos tempos de alimentação da fonte amoniacal, T_A , sem e com controle de pH (ensaios 06 a 15).	78
Tabela 04 –	Resultados obtidos na análise de variância “ANOVA 2 fatores”, realizada com base nos ensaios preliminares A (ensaios 06 a 15): médias dos resultados experimentais, valor p , com nível de significância 0,05, e valor de R^2 ajustado ao modelo.	80
Tabela 05 –	Condições de cultivo e principais resultados dos ensaios preliminares B, realizados com diferentes tempos de alimentação de sulfato de amônio, T_A , e valores de pH (ensaios 16 a 24).	82
Tabela 06 –	Resultados obtidos na análise de variância “ANOVA 2 fatores”, realizada com base nos ensaios preliminares B (ensaios 16 a 24): médias dos resultados experimentais, valor p , com nível de significância 0,05, e valor de R^2 ajustado ao modelo.	85
Tabela 07 –	Condições de cultivo e principais resultados dos ensaios principais A, realizados com diferentes valores de intensidade luminosa, IL (ensaios 25 a 28).	86
Tabela 08 –	Condições de cultivo e principais resultados dos ensaios principais B, realizados com troca de intensidade luminosa (de 156 para 192 ou 252 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e dióxido de carbono proveniente de cilindros (ensaios 29 a 34).	89
Tabela 09 –	Condições de cultivo e principais resultados dos ensaios principais B, realizados com troca de intensidade luminosa (de 156 para 192 ou 252 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e dióxido de carbono proveniente da fermentação alcoólica (ensaios 35 a 40).	90

Tabela 10 –	Resultados obtidos na análise de variância “ANOVA 2 fatores”, realizada com base nos ensaios principais 30, 31, 33 e 34: médias dos resultados experimentais, valor p , com nível de significância 0,05, e valor de R^2 ajustado ao modelo.	93
Tabela 11 –	Condições de experimentação dos ensaios selecionados para análise da biomassa e resultados de teor final de clorofila, CL_f , teor de proteínas, PTN, e de lipídeos, LIP (ensaios 17, 25, 30, 33, 36 e 39).	100
Tabela 12 –	Resultados obtidos na análise de variância “ANOVA 1 fator”, realizada com base nos ensaios selecionados para análise da biomassa (ensaios 17, 25, 30, 33, 36 e 39): médias dos resultados experimentais, valor p , com nível de significância 0,05, e valor de R^2 ajustado ao modelo.	102
Tabela 13 –	Resultados obtidos na análise de variância “ANOVA 2 fatores”, realizada com base nos ensaios selecionados para análise da biomassa nos quais houve aumento da intensidade luminosa (ensaios 30, 33, 36 e 39): médias dos resultados experimentais, valor p , com nível de significância 0,05, e valor de R^2 ajustado ao modelo.	105
Tabela 14 –	Condições de experimentação e principais resultados de adsorção dos testes com as biomassas de <i>A. platensis</i> e <i>C. vulgaris</i> em sistemas únicos de íons metálicos bivalentes de níquel, zinco e chumbo.	107
Tabela 15 –	Condições de experimentação e principais resultados cinéticos dos testes com as biomassas de <i>A. platensis</i> e <i>C. vulgaris</i> em sistemas únicos de íons metálicos bivalentes de níquel, zinco e chumbo.	108
Tabela 16 –	Condições de experimentação e principais resultados do estudo das isotermas de equilíbrio dos testes com as biomassas de <i>A. platensis</i> e <i>C. vulgaris</i> em sistemas únicos de íons metálicos bivalentes de níquel, zinco e chumbo.	109
Tabela 17 –	Condições de experimentação e principais resultados de adsorção dos testes com a biomassa seca de <i>A. platensis</i> em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de níquel e zinco.	111
Tabela 18 –	Condições de experimentação e principais resultados de adsorção dos testes com a biomassa seca de <i>C. vulgaris</i> em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de níquel e zinco.	112

Tabela 19 –	Condições de experimentação e principais resultados da cinética de adsorção dos testes com a biomassa seca de <i>A. platensis</i> em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de níquel e zinco.	114
Tabela 20 –	Condições de experimentação e principais resultados da cinética de adsorção dos testes com a biomassa seca de <i>C. vulgaris</i> em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de níquel e zinco.	115
Tabela 21 –	Condições de experimentação e principais resultados de adsorção dos testes com a biomassa seca de <i>A. platensis</i> em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de níquel e chumbo.	116
Tabela 22 –	Condições de experimentação e principais resultados de adsorção dos testes com a biomassa seca de <i>C. vulgaris</i> em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de níquel e chumbo.	117
Tabela 23 –	Condições de experimentação e principais resultados da cinética de adsorção dos testes com a biomassa seca de <i>A. platensis</i> em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de níquel e chumbo.	118
Tabela 24 –	Condições de experimentação e principais resultados da cinética de adsorção dos testes com a biomassa seca de <i>C. vulgaris</i> em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de níquel e chumbo.	119
Tabela 25 –	Condições de experimentação e principais resultados de adsorção dos testes com a biomassa seca de <i>A. platensis</i> em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de zinco e chumbo.	120
Tabela 26 –	Condições de experimentação e principais resultados de adsorção dos testes com a biomassa seca de <i>C. vulgaris</i> em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de zinco e chumbo.	120
Tabela 27 –	Condições de experimentação e principais resultados da cinética de adsorção dos testes com a biomassa seca de <i>A. platensis</i> em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de zinco e chumbo.	121
Tabela 28 –	Condições de experimentação e principais resultados da cinética de adsorção dos testes com a biomassa seca de <i>C. vulgaris</i> em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de zinco e chumbo.	122
Tabela 29 –	Condições de experimentação e resultados do estudo das isothermas de equilíbrio de Langmuir dos testes com as biomassas de <i>A. platensis</i> e <i>C. vulgaris</i> em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de	

níquel, zinco e chumbo. 125

Tabela 30 –	Condições de experimentação e resultados do estudo das isothermas de equilíbrio de Freundlich dos testes com as biomassas de <i>A. platensis</i> e <i>C. vulgaris</i> em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de níquel, zinco e chumbo.	126
--------------------	--	-----

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

μ_m	velocidade específica máxima de crescimento (unidade: d^{-1})
μ_x	velocidade específica de crescimento (unidade: d^{-1})
a	coeficiente de competição
C_0	concentração inicial de íons metálicos (unidade: mM)
C_e	concentração de íons metálicos em equilíbrio (unidade: mM)
CL	teor de clorofila (unidade: $mg\ g^{-1}$)
CL_f	teor final de clorofila (unidade: $mg\ g^{-1}$)
C_T	concentração total inicial de íons metálicos (unidade: mM)
EF	eficiência fotossintética (unidade: %)
EF_m	eficiência fotossintética máxima (unidade: %)
$f\text{-CO}_2$	fonte de dióxido de carbono
H_G	entalpia da biomassa seca ($kJ\ g^{-1}$)
IL	intensidade luminosa (unidade: $\mu mol\ fótons\ m^{-2}\ s^{-1}$)
$IPAR$	radiação fotossintética ativa ($kJ\ g^{-1}$)
k	constante do perfil de alimentação do sistema
k_2	constante de velocidade de adsorção (unidade: $g\ mmol^{-1}\ min^{-1}$)
K_F	constante de Freundlich (unidade: $mmol^{1-1/n}\ L^{1/n}\ g^{-1}$)
K_L	constante de Langmuir (unidade: $L\ mmol^{-1}$)
LIP	teor de lipídeos (unidade: %)
m	massa seca da biomassa (unidade: g)
m_0	quantidade inicial de sal de amônio (unidade: mM)
m_t	quantidade de sal de amônio (unidade: mM)
m_T	quantidade total de sal de amônio (unidade: mM)
n	intensidade de adsorção
N_T	massa total de nitrogênio (unidade: mg)
p	nível descritivo
pH	potencial hidrogeniônico
PTN	teor de proteínas (unidade: %)
P_X	produtividade celular (unidade: $mg\ L^{-1}\ d^{-1}$)
q_c	capacidade teórica de sorção em equilíbrio (unidade: $mmol\ g^{-1}$)
q_e	capacidade de sorção em equilíbrio (unidade: $mmol\ g^{-1}$)

q_F	capacidade teórica de sorção segundo Freundlich (unidade: mmol g^{-1})
q_L	capacidade teórica de sorção segundo Langmuir (unidade: mmol g^{-1})
q_m	capacidade máxima de sorção (unidade: mmol g^{-1})
r_G	crescimento celular máximo diário (g d^{-1})
t	instante do cultivo ou teste (unidade: d ou min)
t^*	instante de aumento da intensidade luminosa (unidade: d)
T_A	tempo de alimentação da fonte amoniacal (unidade: d)
T_C	tempo de cultivo (unidade: d)
V	volume total do cultivo ou da solução (unidade: L)
X	concentração celular (unidade: mg L^{-1})
X_i	concentração celular inicial ou do inóculo (unidade: mg L^{-1})
X_m	concentração celular máxima (unidade: mg L^{-1})
Y_R	eficiência de remoção de íons metálicos (unidade: %)
$Y_{X/N}$	fator de conversão de nitrogênio em células (unidade: mg mg^{-1})
α	fator de separação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	30
2 REVISÃO DA LITERATURA	32
2.1 Microalgas	32
2.2 Cianobactérias do gênero <i>Arthrospira</i> (<i>Spirulina</i>)	33
2.2.1 <i>Características morfológicas e fisiológicas</i>	34
2.2.2 <i>Composição química</i>	35
2.2.3 <i>Propriedades e aplicações</i>	36
2.2.4 <i>Cultivos laboratoriais</i>	38
2.2.4.1 <u>Processos de cultivo</u>	38
2.2.4.2 <u>Dispositivos de cultura</u>	39
2.2.4.3 <u>Tipos de cultivo e meios de cultura</u>	40
2.2.4.4 <u>Nutrientes</u>	41
2.2.4.5 <u>Temperatura, pH e intensidade luminosa</u>	43
2.3 Fermentação alcoólica e o dióxido de carbono	44
2.4 Microalgas do gênero <i>Chlorella</i> e a remoção de metais pesados	44
3 OBJETIVOS	48
4 MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1 Cultivo de <i>Arthrospira platensis</i> (ensaios 01 a 40)	49
4.1.1 <i>Microrganismo e dispositivo de cultura</i>	49
4.1.2 <i>Meios de cultura</i>	51
4.1.3 <i>Preparo do inóculo</i>	53
4.1.4 <i>Ensaios e condições de experimentação</i>	54
4.1.4.1 <u>Adição das fontes de nitrogênio</u>	55
4.1.4.2 <u>Adição de dióxido de carbono</u>	57
4.1.4.3 <u>Variação da intensidade luminosa</u>	58
4.1.5 <i>Técnicas analíticas</i>	59
4.1.5.1 <u>Determinação da concentração celular e do pH</u>	59
4.1.5.2 <u>Determinação da concentração de carbonato total</u>	59

4.1.5.3 <u>Determinação da concentração de amônia total</u>	60
4.1.5.4 <u>Determinação da concentração de nitrato</u>	60
4.1.5.5 <u>Determinação da concentração de clorofila</u>	61
4.1.5.6 <u>Determinação do teor de proteínas e lipídeos</u>	61
4.1.6 <i>Análise dos resultados</i>	62
4.1.6.1 <u>Cálculo dos parâmetros</u>	62
4.1.6.2 <u>Análise estatística</u>	63
4.2 Fermentação alcoólica (dorna 01 e 02)	64
4.3 Testes de adsorção de íons metálicos (testes 01 a 27)	65
4.3.1 <i>Biossorventes e soluções de íons metálicos</i>	65
4.3.2 <i>Testes de adsorção</i>	66
4.3.3 <i>Análise dos resultados</i>	67
4.3.3.1 <u>Capacidade de biossorção</u>	67
4.3.3.2 <u>Cinética de biossorção</u>	68
4.3.3.3 <u>Isotermas de equilíbrio</u>	68
4.3.4 <i>Caracterização da biomassa</i>	70
 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	 71
5.1 Cultivo de <i>Arthrospira platensis</i> (ensaios 01 a 40)	71
5.1.1 <i>Ensaio padrão 01 e 02 e ensaios de adaptação 03 a 05</i>	71
5.1.2 <i>Ensaio preliminares 06 a 24</i>	77
5.1.3 <i>Ensaio principais 25 a 40</i>	86
5.1.4 <i>Análise da biomassa</i>	100
5.2 Fermentação alcoólica (dorna 01 e 02)	105
5.3 Testes de adsorção de íons metálicos (testes 01 a 27)	106
5.3.1 <i>Adsorção de Ni^{2+}, Zn^{2+} e Pb^{2+} em sistemas únicos</i>	106
5.3.2 <i>Afinidade das biomassas de <i>A. platensis</i> e <i>C. vulgaris</i> pelos íons metálicos</i>	109
5.3.3 <i>Capacidade e cinética de adsorção nos sistemas Ni^{2+}/Zn^{2+}</i>	111
5.3.4 <i>Capacidade e cinética de adsorção nos sistemas Ni^{2+}/Pb^{2+}</i>	115
5.3.5 <i>Capacidade e cinética de adsorção nos sistemas Zn^{2+}/Pb^{2+}</i>	119
5.3.6 <i>Comparação da adsorção em sistemas únicos e múltiplos</i>	122
5.3.7 <i>Isotermas de equilíbrio de sistemas binários</i>	124
5.3.8 <i>Adsorção em sistema ternário ($Ni^{2+}/Zn^{2+}/Pb^{2+}$)</i>	127

5.3.9 Caracterização das biomassas de <i>A. platensis</i> e <i>C. vulgaris</i>	128
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	131
7 CONCLUSÕES	133
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
ANEXO A – Artigo publicado: “<i>Influence of ammonium sulphate feeding time on fed-batch Arthrospira (Spirulina) platensis cultivation and biomass composition with and without pH control</i>”	153
ANEXO B – Lista de manuscritos	161
APÊNDICES	163

1 INTRODUÇÃO

Microalgas e cianobactérias são microrganismos fotossintetizantes que requerem apenas nutrientes inorgânicos, água e luz para seu crescimento. Apresentam biomassa de alto conteúdo protéico, ácidos graxos poli-insaturados e pigmentos de alto valor comercial, aplicáveis na indústria alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e de biotecnologia. As espécies de cianobactérias do gênero *Arthrospira* (*Spirulina*), por exemplo, apresentam extensa aplicação como alimento ou suplemento alimentar humano e animal. Já as microalgas do gênero *Chlorella*, em especial *Chlorella vulgaris*, são amplamente estudadas para emprego na produção de biocombustíveis e na remoção de contaminantes metálicos de efluentes industriais líquidos.

No cultivo de *A. platensis*, o custo do meio de cultura é um dos fatores limitantes, e o estudo das fontes de nitrogênio e de carbono é importante para a otimização da produção comercial. Os cultivos convencionais utilizam sais de nitrato como fonte de nitrogênio, e estudos vem sendo desenvolvidos para utilização otimizada de fontes alternativas, como os sais de amônio e a uréia, que possibilitam uma diminuição significativa no custo de produção. O uso simultâneo de duas fontes distintas de nitrogênio também é possível. Estudo recente (RODRIGUES, 2008) demonstrou que a adição de uma fonte amoniacal de nitrogênio a cultivos desenvolvidos com quantidades reduzidas de sais de nitrato leva à obtenção de cultivos com altas concentrações celulares, além de uma biomassa com altos teores de proteínas, lipídeos e clorofila.

Sinônimo de combustível renovável, que polui menos em comparação com os derivados de petróleo, o etanol voltou a ocupar lugar de destaque no cenário energético do Brasil. Sua produção apresenta um grande impacto no âmbito socioeconômico, uma vez que cerca de 300 indústrias nacionais trabalham com a fermentação alcoólica. Tal processo produz uma grande quantidade de gás carbônico, que geralmente é liberado na atmosfera após ter sido tratado. A utilização do dióxido de carbono proveniente da fermentação alcoólica no cultivo de *A. platensis* representa uma boa aplicação desse gás efluente, pois associa a redução de emissões gasosas à produção de um microrganismo de alto valor comercial.

Dentro desse contexto, foi proposta para este trabalho a produção otimizada de *A. platensis* com utilização do dióxido de carbono proveniente da fermentação alcoólica, tanto como fonte de carbono assimilável quanto como forma de controle dos valores de pH do cultivo da cianobactéria. Para tal, as condições de experimentação definidas em trabalho anterior (RODRIGUES, 2008) foram adaptadas a novas condições laboratoriais de cultivo de

A. platensis, e posteriormente foram realizados estudos com o objetivo de avaliar a influência do controle do pH em diferentes faixas e da intensidade luminosa no crescimento celular da selecionada cianobactéria. Por fim, cultivos desenvolvidos com dióxido de carbono proveniente da fermentação alcoólica foram comparados com cultivos desenvolvidos com dióxido de carbono proveniente de cilindros, a fim de avaliar a eficiência da utilização do gás efluente no crescimento celular de *A. platensis*, principalmente.

Uma parte adicional deste estudo, realizada na *Facoltà di Ingegneria* da *Università degli Studi di Genova*, na Itália, tratou da avaliação da capacidade da biomassa de *A. platensis* de adsorver íons metálicos. Uma série de testes foi realizada com soluções binárias de chumbo, zinco e níquel, e os resultados foram comparados com aqueles obtidos em testes desenvolvidos com a biomassa da microalga *C. vulgaris*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microalgas

“Microalga” é um termo sem valor taxonômico que faz referência aos microrganismos detentores de sistema fotossintetizante semelhante ao das plantas. Sob tal denominação estão inclusos tanto os microrganismos de estrutura eucariótica, como por exemplo as microalgas verdes (divisão *Chlorophyta*, gêneros *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Scenedesmus*) e vermelhas (divisão *Rhodophyta*, gêneros *Palmaria*, *Porphyra*, *Rhodella*), como os de estrutura procariótica, tais como as cianobactérias (divisão *Cyanophyta*, gêneros *Anabaena*, *Arthrospira*, *Nostoc*, *Synechococcus*) (DERNER et al., 2006). Esses microrganismos podem ser encontrados em especial no meio aquático, seja ele de água doce ou salgada, e requerem, em sua maioria, apenas nutrientes inorgânicos, água e luz para seu crescimento. Algumas espécies são fontes economicamente atrativas para obtenção de biomassa rica em proteínas ou lipídeos, por causa da facilidade de manutenção dos cultivos, decorrente principalmente da alta resistência das microalgas a condições ambientais extremas (BOROWITZKA, 1999), e da eficiência de utilização de recursos naturais pelas células na produção de biomassa ou compostos bioativos (DERNER et al., 2006).

Os primeiros registros do cultivo de microalgas datam de 1890; por volta de trinta anos depois, cultivos de microalgas verdes do gênero *Chlorella* foram utilizados no estudo da fisiologia vegetal (BOROWITZKA, 1999). Na década de 1950 iniciaram-se os estudos de produção de biomassa de microalgas para fins alimentícios, devido à crescente preocupação com o aumento populacional da época (SPOLAORE et al., 2006). O cultivo comercial em larga escala desses microrganismos iniciou-se por volta de 1960, no Japão, com o gênero *Chlorella*, e na década seguinte foi introduzida a comercialização, no México, da cianobactéria do gênero *Spirulina* (BOROWITZKA, 1999; SHIMAMATSU, 2004; SPOLAORE et al., 2006). Antes do início da década de 1980, a produção total de microalgas no continente asiático já era de mais de uma tonelada ao mês (BOROWITZKA, 1999). O cultivo voltado para a extração de pigmentos foi marcado, em especial, pela instalação de indústrias produtoras de *Dunaliella salina* em 1986 na Austrália, para extração de beta-caroteno, e de *Haematococcus pluvialis* em 2005 nos Estados Unidos e na Índia, para extração de astaxantina (BOROWITZKA, 1999; SPOLAORE et al., 2006). Dados recentes mostraram que a produção global de microalgas manteve-se, no período de 2006 a 2010, em 5 mil toneladas de biomassa ao ano (SPOLAORE et al., 2006; WIJFFELS; BARBOSA;

EPPINK, 2010); no entanto, com o recente desenvolvimento de tecnologias de produção de biodiesel a partir de microrganismos fotossintéticos, é esperado um aumento significativo em tais valores. A maior parte das indústrias produtoras de biomassa de microalgas ou extratoras de seus compostos está concentrada na China; outros países produtores incluem Japão, Tailândia, Estados Unidos, Austrália e Índia (BOROWITZKA, 1999; SHIMAMATSU, 2004; SPOLAORE et al., 2006).

A produção de microalgas é de grande interesse das indústrias de biotecnologia, de alimentos, de produtos cosméticos e farmacêuticos, pois implica na obtenção de grandes quantidades de produto por área útil em função do tempo, sem afetar drasticamente o meio ambiente (DERNER et al., 2006). Além de sua aplicação na alimentação humana, tal biomassa também é utilizada: a) na aquicultura, para alimentação direta ou indireta de algumas espécies de peixes, moluscos e crustáceos (BOROWITZKA, 1999; DERNER et al., 2006); b) na síntese de compostos nutracêuticos, como os ácidos graxos poli-insaturados (ABOU-SHANAB et al., 2011; BARCLAY; MEAGER; ABRIL, 1994), e de pigmentos carotenóides, como a astaxantina e o beta-caroteno (BEN-AMOTZ; SHAISH; AVRON, 1991; YAN et al., 2011), que apresentam propriedades terapêuticas; c) na produção de moléculas bioativas com propriedades antibacterianas, antivirais e antifúngicas, entre outras (ABEDIN; TAHA, 2008; BOROWITZKA, 1995; CAICEDO et al., 2011); d) na síntese de substâncias corantes, como o pigmento vermelho ficoeritrina e o pigmento azul ficocianina (ARAD; YARON, 1992), que encontram aplicação principalmente na produção de alimentos e cosméticos; e) no tratamento de águas residuárias, para remoção de compostos ou íons metálicos (ATKINSON; BUX; KASAN, 1998; CHOJNACKA, 2010; DAS, 2010); f) e, mais recentemente, na produção de hidrogênio e também de biocombustíveis líquidos (CHISTI, 2007; DUTTA; CHAUDHURI; BHATTACHARYA, 2005).

2.2 Cianobactérias do gênero *Arthrospira* (*Spirulina*)

Cianobactérias são microrganismos que apresentam estrutura celular procariótica semelhante a aquela das bactérias, e que obtêm energia através de mecanismos fotossintéticos similares a aqueles das plantas (HOLM-HANSEN, 1968). Também conhecidas como algas verde-azuladas, constituem o mais amplo e diversificado grupo de organismos com tal estrutura. Destacam-se principalmente pela natureza dos pigmentos fotossintéticos – a clorofila “a” e as ficobiliproteínas, e pela estrutura e composição química da parede celular,

de característica gram-negativa (STANIER; COHEN-BAZIRE, 1977) e constituída principalmente por peptideoglicanos.

Dentre as cianobactérias de maior destaque, encontram-se aquelas do gênero *Spirulina*, mais recentemente classificadas como pertencentes ao gênero *Arthrospira*.

2.2.1 Características morfológicas e fisiológicas

Arthrospira (*Spirulina*) (Figura 01) é um gênero de cianobactéria pluricelular e filamentosa, de cor verde azulada, pertencente à ordem *Oscillatoriales*, família *Cyanophyceae*.

Figura 01 – *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*.

Fonte: UTEX, 2011.

As espécies do gênero *Arthrospira* são formadas principalmente por tricomas – cadeias de células cilíndricas dispostas em forma helicoidal, que variam de tamanho e morfologia conforme as condições de crescimento (CIFERRI, 1983; CIFERRI; TIBONI, 1985). A orientação desses tricomas, por exemplo, pode ser afetada pela temperatura a qual as células são submetidas, ou por qualquer tipo de estresse mecânico, como a agitação contínua durante um cultivo (MÜHLING et al., 2003). Existem registros também sobre a linearização das células de algumas espécies quando submetidas a altas intensidades luminosas, o que pode resultar em cultivos com menores produtividades e biomassa com menor teor protéico (WANG; ZHAO, 2005).

São de característica fotoautotrófica, ou seja, utilizam energia luminosa na fotossíntese para seu próprio desenvolvimento (HOLM-HANSEN, 1968); no entanto, estudos reportaram

o crescimento de algumas espécies de *Arthrospira* em cultivos mixotróficos e heterotróficos, nos quais são utilizadas fontes orgânicas de carbono (CHOJNACKA; NOWORYTA, 2004).

As espécies do gênero *Arthrospira* ocorrem naturalmente no solo, na areia, nas marismas, em água doce, em água salobra e em água do mar (CIFERRI, 1983; CIFERRI; TIBONI, 1985). São tipicamente encontradas em alguns lagos alcalinos e salinos do México e da África, especialmente na região africana de *Chad* (ABDULQADER; BARSANTI; TREDICI, 2000), onde crescem naturalmente junto a outras cianobactérias em lagos com concentração salina inferior a 30 g L⁻¹ e com pH entre 7,0 e 9,5 (CIFERRI, 1983; CIFERRI; TIBONI, 1985). Em condições de salinidade entre 20 e 70 g L⁻¹ e pH entre 9,5 e 10,5, são encontradas quase que exclusivamente sozinhas – apenas algumas bactérias gram-negativas resistem a tais variáveis ambientais (CIFERRI, 1983). São também capazes de suportar condições de crescimento extremamente desfavoráveis, nas quais é virtualmente impossível o crescimento de outros microrganismos, como em lagos com concentração salina de até 270 g L⁻¹ e com pH por volta de 11,0 (CIFERRI, 1983).

2.2.2 Composição química

A composição química das espécies de *Arthrospira* varia conforme as condições de crescimento, dentre as quais podem ser mencionadas a temperatura, a intensidade luminosa, e principalmente o tipo e a quantidade de nitrogênio disponibilizado às células.

Os conteúdos protéico e lipídico da biomassa seca desta cianobactéria geralmente variam entre 40 e 60 % (CIFERRI; TIBONI, 1985), e 7 e 22 % (PIORRECK; BAASCH; POHL, 1984), respectivamente. Em alguns casos, o teor de proteínas ultrapassa 70 %, valor muito superior a aquele de diversos alimentos; já o conteúdo de ácidos nucleicos é consideravelmente baixo – geralmente inferior a 5 % (CIFERRI; TIBONI, 1985). Entre os aminoácidos essenciais presentes em altas quantidades, estão a leucina, isoleucina, lisina e metionina (AHLGREN; GUSTAFSSON; BOBERG, 1992; PIORRECK; BAASCH; POHL, 1984). Entre os ácidos graxos, podem ser encontrados especialmente 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 (COHEN; VONSHAK; RICHMOND, 1987; PIORRECK; BAASCH; POHL, 1984; RADMANN; COSTA, 2008; XUE et al., 2002).

Os carboidratos e as cinzas são encontrados na biomassa seca das espécies da cianobactéria em questão geralmente em teores de até 15 e 10 %, respectivamente (CIFERRI;

TIBONI, 1985; TOKUŞOĞLU; ÜNAL, 2003). Dentre os pigmentos presentes, destacam-se a clorofila “a” (PAOLETTI et al., 1980) e o beta-caroteno, sendo encontrados em teores de até 1,5 e 0,4 % (CIFERRI, 1983; CIFERRI; TIBONI, 1985), respectivamente.

As espécies de *Arthrospira* apresentam também quantidades apreciáveis de fibras e minerais, tais como ferro, cálcio, potássio, fósforo, manganês, cobre, magnésio e zinco, e vitaminas como cianocobalamina (B₁₂), piridoxina (B₆), riboflavina (B₂), tiamina (B₁), tocoferol (E), fitomenadiona (K), e retinol (A) (BRANGER et al., 2003; SHARMA et al., 2011).

2.2.3 Propriedades e aplicações

Em decorrência principalmente do alto teor protéico da biomassa das espécies de *Arthrospira*, esta cianobactéria tem sido utilizada na produção de alimentos ou suplementos alimentícios (BELAY, 2002), seja para alimentação humana ou animal. A principal vantagem deste microrganismo em relação a outras microalgas é o fato de que sua parede celular é composta de peptideoglicanos, o que faz das células digeríveis. Isso significa também que a biomassa pode ser consumida por inteiro, e os constituintes mais frágeis, como as vitaminas e os ácidos graxos essenciais, podem ser disponibilizados no organismo humano sem degradação alguma (TOMASELLI, 1997).

A utilização da biomassa das espécies de *Arthrospira* como alimento na aquacultura já está bem estabelecida mundialmente (PULZ; GROSS, 2004); a China é o principal país produtor desta cianobactéria e utilizador da mesma na cultura de moluscos (MULLER-FEUGA, 2000). Suplementos alimentares a base dessa cianobactéria já são atualmente comercializados para consumo humano; por outro lado, estudos de otimização de tal utilização ainda estão em desenvolvimento. Morist et al. (2001), por exemplo, desenvolveram um processo de cultivo, recuperação e tratamento das células de *A. platensis* com o principal objetivo de uso da biomassa como fonte de alimento humano. Os autores estudaram a apresentação da biomassa final tanto na forma líquida como sólida, e deram enfoque à qualidade da biomassa, em termos da composição nutricional, e mínima contaminação microbiológica do processo em geral.

As proteínas das espécies de *Arthrospira* possuem valor além daquele referente à nutrição. Os benefícios à saúde decorrentes da ação antioxidante da ficocianina são inúmeros (McCARTY, 2007); parte de tais benefícios foi relacionada também à ação quelante dessa proteína (BERMEJO; PIÑERO; VILLAR, 2008). Em estudo recente, Chen e Wong (2008)

sugeriram o enriquecimento da ficocianina proveniente de *A. platensis* com selênio, com o objetivo de potencializar as ações de tal proteína no organismo. Esta proteína também já foi estudada para ser utilizada como agente emulsificante e gelatinizante (CHRONAKIS et al., 2000), ou até mesmo como receptor seletivo para mercúrio (SURESH et al., 2009). A ficoferritina, uma proteína que funciona como depósito de ferro nas células de *A. platensis*, também tem sido foco de estudos recentes (DEEPA; SASHIDHAR; DESHPANDE, 2008).

O ácido graxo poli-insaturado gama-linolênico tem potencial valor farmacêutico em decorrência dos seus benefícios à saúde humana. Tantos estudos tratam da otimização da produção de tal componente da fração lipídica (COHEN; VONSHAK; RICHMOND, 1987; DE; CHAUDHURY; BHATTACHARYYA, 1999; QUOC; DUBACQ, 1997; RONDA; LELE, 2008) e diversos outros reportam a extração e purificação desse ácido graxo da biomassa de *A. platensis* (ANDRICH et al., 2006; COHEN et al., 1993; SAJILATA; SINGHAL; KAMAT, 2008). Tiburcio et al. (2007) estudaram, inclusive, o tempo e a temperatura de degradação do ácido gama-linolênico com o objetivo de estimar o tempo de prateleira de produtos a base de *A. platensis*.

Outros componentes da biomassa das espécies de *Arthrospira* merecem destaque. Os pigmentos clorofila “a” e beta-caroteno tem chamado a atenção pelo fato de que os cultivos de microalgas e cianobactérias são processos renováveis que não causam danos ao meio ambiente, e portanto constituem excelentes fontes de corantes naturais (DUFOSSE et al., 2005). Alguns outros estudos que trataram da aplicação de substâncias provenientes de espécies de *Arthrospira* podem ser mencionados. Rechter et al. (2006), por exemplo, analisaram a atividade antiviral do espirulano cálcico, um polissacarídeo sulfatado presente na biomassa de *A. platensis*. Mendiola et al. (2008), por sua vez, trabalharam com a extração da vitamina E, enquanto Miyake et al. (2000) estudaram o acúmulo de poli-idroxibutirato pelas células de *A. platensis*. Por fim, Mosulishvili et al. (2002) sugeriu o uso da biomassa de *A. platensis* na formulação de drogas farmacêuticas enriquecidas com selênio e iodo.

As espécies de *Arthrospira* também encontram aplicação ampla na preservação e recuperação do meio ambiente. A biomassa desta cianobactéria pode ser utilizada como um todo, nas formas fresca ou seca, com ou sem tratamento prévio, na recuperação de efluentes industriais, pois apresenta grande capacidade de remoção de nutrientes, como íons nitrato e fosfato (OGBONNA; YOSHIZAWA; TANAKA, 2000), e metais pesados, como por exemplo o cobre, cromo, cobalto, cádmio, chumbo, zinco e níquel (GOKHALE; JYOTI; LELE, 2009; ŞEKER et al., 2008; VANNELA; VERMA, 2006). Além disso, a alta produtividade dos cultivos compensa o relativo baixo teor lipídico da biomassa de *A. platensis* (MARKOU;

YAVUZATMACA; BOZKURT, 2011), fazendo com que esta encontre aplicação também na produção de biocombustíveis (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

2.2.4 Cultivos laboratoriais

Para o bom desenvolvimento de cultivos laboratoriais de *A. platensis*, alguns fatores devem ser considerados, como o processo e o dispositivo de cultura a serem utilizados, a concentração dos nutrientes e a forma na qual estes serão disponibilizados às células, os parâmetros ótimos de crescimento do microrganismo, ou aqueles que propiciam a produção de um composto qualquer ou o acúmulo de determinadas moléculas e complexos, por exemplo.

2.2.4.1 Processos de cultivo

O processo descontínuo de cultivo – o mais simples dos processos existentes, consiste no desenvolvimento de um cultivo no qual o microrganismo e o meio de cultura são inserido no dispositivo de cultura no instante inicial do processo, e retirados ao final deste; não há a adição de nutrientes no decorrer do cultivo e teoricamente o volume de trabalho permanece constante (SCHMIDELL et al., 2001). Já o processo descontínuo alimentado de cultivo implica na adição de um ou mais nutrientes no decorrer do processo, possibilitando desta maneira a prevenção de efeitos inibitórios ou tóxicos por parte de determinados nutrientes, e até mesmo o deslocamento do metabolismo celular para a obtenção de um determinado produto (LEE et al., 1999; SCHMIDELL et al., 2001). No caso de cultivos de *A. platensis*, a utilização de fontes de nitrogênio que levam à formação de amônia no meio de cultivo faz com que o processo descontínuo alimentado seja necessário (BEZERRA, 2006; FERREIRA, 2008), pois tal nutriente, quando em altas concentrações, pode ser inibitório ou tóxico à cianobactéria (ABELIOVICH; AZOV, 1976; YUAN et al., 2011).

Existem algumas variações dos processos descritos acima. O processo descontínuo, por exemplo, pode ser feito com reaproveitamento do inóculo (processo com recirculação de células) ou com transferência de parte do volume de um fermentador para outro (processo por meio de cortes); já o processo descontínuo alimentado pode ser realizado com remoção repetitiva de parte do volume de trabalho (processo repetitivo) ou mantido por prolongados períodos de tempo (processo estendido) (SCHMIDELL et al., 2001). Matsudo (2006), por

exemplo, estudou diversas frações de corte e obteve sucesso na aplicação do processo descontínuo alimentado repetitivo no cultivo de *A. platensis*.

O processo contínuo de cultivo consiste no desenvolvimento de um cultivo no qual o microrganismo e o meio de cultura são inseridos no dispositivo de cultura no instante inicial do processo, e durante tal, há remoção de cultura e inserção de meio de maneira contínua; os fluxos de retirada e adição são iguais e, teoricamente, o volume de trabalho permanece constante (SCHMIDELL et al., 2001). A principal vantagem de tal processo é o aumento da produtividade dos cultivos. Alguns autores foram bem sucedidos na aplicação do processo contínuo no cultivo de *A. platensis* (LEÓN, 2010; MATSUDO, 2010).

2.2.4.2 Dispositivos de cultura

Dois principais tipos de reatores são usualmente utilizados no cultivo de cianobactérias, dentre elas *A. platensis*: os chamados “tanques abertos”, que são dispositivos ovais alongados cuja superfície é completamente exposta ao meio ambiente, e os chamados “fotobiorreatores fechados”, que são estruturas verticais nas quais as células percorrem tubos ou placas (Figura 02).

Figura 02 – Exemplos de dispositivos de cultura em escala comercial: tanques e fotobiorreatores tubulares.

Fontes: ALGAE ENERGY, 2011; GREEN TECH MEDIA, 2011.

Os tanques são os dispositivos de cultura mais utilizados na produção comercial de microalgas em geral, principalmente devido ao baixo custo de instalação e manutenção. Possuem de 0,2 a 0,3 metros de profundidade; por tal motivo, os cultivos apresentam baixa densidade celular, o que resulta nos altos custos de recuperação da biomassa (NORSKER et

al., 2011). Para cultivos laboratoriais, são utilizados os mini-tanques – réplicas em menor escala dos tanques comerciais.

Cultivos ao ar livre são bastante susceptíveis à contaminação. Cianobactérias em geral são resistentes em ambientes com altos valores de pH e concentrações de amônia relativamente altas, o que significa que o cultivo de *A. platensis* em tais condições reduz as chances de contaminação (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011). Cultivos completamente isentos de contaminação são quase impossíveis de serem desenvolvidos. Mesmo em condições que desfavorecem o crescimento de microrganismos além de *A. platensis*, bactérias gram-negativas aderem aos tricomas desta cianobactéria e resistem às condições ambientais adversas, podendo representar até 1 % da biomassa em cultivo abertos (CIFERRI, 1983).

Segundo Norsker et al. (2011), dentre os fotobiorreatores verticais destacam-se aqueles do tipo “tubular” e “painel plano”. Em tais dispositivos, as células circulam por tubos ou painéis transparentes, impulsionadas geralmente por bombas. A alta concentração de oxigênio reduz a produtividade dos cultivos, e portanto um bom sistema de desgaseificação deve ser acoplado ao dispositivo. Apesar da melhor utilização da intensidade luminosa por parte das células em decorrência da configuração desses tipos de reatores, existe um grande gasto energético com a homogeneização e a manutenção da temperatura das culturas neles desenvolvidas, o que resulta em alto custo de manutenção.

Além dos fotobiorreatores mencionados, muitos outros com configurações diversas são desenvolvidos e estudados, em especial no cultivo laboratorial de microrganismos fotossintéticos. Dentre tais dispositivos estão os fotobiorreatores do tipo “air-lift” (BARBOSA et al., 2003), nos quais o próprio fluxo de ar do cultivo promove a circulação celular, contornando de certa forma o problema dos gastos relacionados à homogeneização dos cultivos.

2.2.4.3 Tipos de cultivo e meios de cultura

As cianobactérias do gênero *Arthrospira* geralmente são cultivadas em meios de cultura contendo sais inorgânicos, compondo cultivos autotróficos nos quais a luz é a principal fonte de energia, e portanto, o principal fator determinante da velocidade de crescimento do microrganismo (CHOJNACKA; NOWORYTA, 2004). Nos cultivos laboratoriais, são utilizados com frequência os meios de cultura de Paoletti (PAOLETTI; PUSHPARAJ; TOMASELLI FEROCI, 1975), Schlösser (SCHLÖSSER, 1982) e Zarrouk (ZARROUK, 1966), bastante similares e compostos basicamente de sais inorgânicos;

carbonato e bicarbonato de sódio são as fontes de carbono, enquanto os sais de nitrato são as fontes de nitrogênio. Esses meios de cultura são de relativo baixo custo e proporcionam cultivos com altas produtividades. Mais recentemente Raoof, Kaushik e Prasanna (2006) sugeriram um novo meio de cultura, adaptado do meio de Zarrouk, com custo cinco vezes menor que este último. A salinidade desses meios de cultura interfere diretamente no crescimento e desenvolvimento das células, assim como na atividade fotossintética do microrganismo e, conseqüentemente, no teor de clorofila da biomassa (DHIAB et al., 2007).

Em cultivos heterotróficos de espécies de *Arthrospira*, o carbono orgânico constitui a principal fonte de energia. Entre as fontes mais utilizadas, encontram-se a glicose, frutose e o acetato. Em cultivos mixotróficos, ocorrem dois processos distintos dentro das células: a fotossíntese, determinada pela intensidade luminosa, e a respiração aeróbica, dependente da disponibilidade de carbono orgânico (CHOJNACKA; NOWORYTA, 2004). Essa combinação de fontes de energia leva ao desenvolvimento de cultivos com células de alta velocidade de crescimento e com produtividades três vezes maiores que aquelas obtidas em condições autotróficas (CIFERRI; TIBONI, 1985). Muitos autores já demonstraram os benefícios da utilização de fontes orgânicas de carbono em cultivos de espécies de *Arthrospira* desenvolvidos na presença de luz (CHEN; ZHANG, 1997; CHOJNACKA; NOWORYTA, 2004; MULITERNO et al., 2005).

Diversos estudos tratam do cultivo de espécies de *Arthrospira* em águas efluentes industriais ou de dejetos humanos. Cañizares e Dominguez (1993), por exemplo, cultivaram com sucesso *A. maxima* com efluente diluído proveniente da suinocultura, previamente aerado e estabilizado. Anaga e Abu (1996), por sua vez, cultivaram a cianobactéria com efluente de uma indústria de fertilizantes, rico em íons nitrato, fosfato e sulfato. Mais recentemente, Feng e Wu (2006) cultivaram *A. platensis* em urina humana.

2.2.4.4 Nutrientes

Grande parte do gasto total com a produção de microalgas é devido ao meio de cultura exigido para o seu desenvolvimento, e portanto se faz importante o estudo dos nutrientes presentes no meio, em especial as fontes de nitrogênio e carbono.

As espécies de *Arthrospira* assimilam, como fontes de nitrogênio, íons nitrato, nitrito e amônia. De acordo com Markou e Georgakakis (2011), com o auxílio de enzimas redutase, íons nitrato são reduzidos a íons nitrito, que por sua vez são reduzido a amônia e então assimilados. A assimilação de íons nitrato depende de energia luminosa, e portanto todo esse

processo requer um gasto energético por parte das células; por tal motivo, as espécies de *Arthrospira* apresentam preferência por íons já reduzidos. A uréia, por sua vez, é reduzida diretamente à amônia pela enzima urease (CARVAJAL et al., 1982), e portanto acarreta em um menor gasto de energia. Já os sais de amônio disponibilizam amônia diretamente às células, e não constituem gasto energético algum. Na presença de duas fontes de nitrogênio – uma fonte nítrica e outra formadora de amônia, as espécies de *Arthrospira* consomem preferencialmente a segunda (BOUSSIBA, 1989; RODRIGUES et al., 2010). No entanto, esse consumo é extremamente dependente da quantidade das duas fontes (RODRIGUES et al., 2010), pois o excesso de uma inibe a assimilação da outra (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011). Com o principal objetivo de reduzir os custos de produção, as fontes nítricas de nitrogênio foram substituídas com sucesso por sais de amônio, como o cloreto de amônio (CARVALHO et al., 2004), o sulfato de amônio (FERREIRA et al., 2010) e o fosfato de amônio (COSTA et al., 2001), e também pela uréia (SÁNCHEZ-LUNA et al., 2004) no cultivo de *A. platensis*. No entanto, os íons nitrato ainda são os mais recomendados para o cultivo desta cianobactéria, especialmente quando se trata da obtenção de biomassa de alta qualidade, ou seja, com alto valor protéico e lipídico.

A temperatura e os valores de pH do meio influenciam a forma na qual o nitrogênio é disponibilizado às células, e assim interferem diretamente na assimilação deste nutriente pelas espécies de *Arthrospira*. Altas temperaturas e valores de pH superiores a 9,25 favorecem a formação de amônia livre (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011), que em altas concentrações pode ser tóxica ou inibitória ao crescimento celular da cianobactéria em questão (ABELIOVICH; AZOV, 1976; YUAN et al., 2011). Já a origem e a quantidade de nitrogênio influenciam a composição da biomassa final. Em geral, o aumento da concentração de nitrogênio disponibilizado no meio leva a um aumento no teor protéico e de clorofila da biomassa (PIORRECK; BAASCH; POHL, 1984; RODRIGUES et al., 2010). O efeito desse nutriente no teor lipídico ainda não foi bem elucidado: Piorreck, Baasch e Pohl (1984) sugeriram que o nitrogênio não influencia a fração lipídica da biomassa, enquanto alguns autores diferem em afirmar que a limitação de nitrogênio leva ao aumento ou à diminuição do teor lipídico de *A. platensis* (RODRIGUES et al., 2010; SASSANO et al., 2010), no caso. É possível que, em tais estudos, outros fatores determinantes do cultivo tenham interferido nos resultados referentes à composição da biomassa.

As fontes de carbono usadas no cultivo das espécies de *Arthrospira* podem ser inorgânicas ou orgânicas, sendo as primeiras as mais utilizadas. Esta cianobactéria concentra carbono no meio extracelular, disponível na forma de dióxido de carbono ou bicarbonato de

sódio, e através da enzima anidrase carbônica, converte todo o carbono em íons bicarbonato (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011). A utilização direta do dióxido de carbono como nutriente é vantajosa economicamente somente quando este gás é efluente, pois representa assim uma fonte de carbono de baixo custo para a produção desse microrganismo e colabora com a redução da liberação desse gás na atmosfera. Recentemente, a fixação de dióxido de carbono por microalgas tem sido estudada amplamente (RAMANAN et al., 2010; SOBCZUK et al., 2000; STEWART; HESSAMI, 2005; SYDNEY et al., 2010). Mais uma vez, a temperatura e os valores de pH do meio influenciam diretamente a assimilação desses nutrientes; valores de pH menores que 10,0 favorecem a formação de bicarbonato, o íon assimilável (MILLER; COLMAN, 1980), e consequentemente levam ao desenvolvimento de cultivos com altas concentrações celulares finais.

2.2.4.5 Temperatura, pH e intensidade luminosa

As condições ótimas de crescimento de *A. platensis* em cultivos laboratoriais são:, temperatura de 30 a 35 °C, intensidade luminosa de 240 a 360 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, e pH de 8,0 a 10,0 (CIFERRI; TIBONI, 1985; MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011).

A temperatura e os valores de pH de um cultivo interferem diretamente na disponibilidade das fontes de nitrogênio e de carbono, e assim afetam tanto o crescimento de *A. platensis* como a qualidade da biomassa, no que se diz respeito aos teores de proteínas, lipídeos e clorofila, principalmente. A temperatura influencia ainda a estrutura das membranas celulares e o oxigênio relacionado à fotossíntese, possuindo portanto uma relação direta com a absorção da intensidade luminosa pelas células (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011).

A luz é a fonte primária de energia para os microrganismos fotossintéticos em cultivo autotrófico, e a fotossíntese é dependente da qualidade e da quantidade de luz provida aos cultivos. O aumento da intensidade luminosa leva ao aumento do crescimento celular até um determinado valor, denominado ponto de saturação, no qual a atividade fotossintética celular atinge seu pico máximo (FERREIRA et al., 2010; JENSEN; KNUTSEN, 1993). Intensidades luminosas superiores a esse ponto promovem a fotoinibição do crescimento celular ou até mesmo a perda de um cultivo por foto-oxidação. Em um cultivo, a disponibilidade de luz para cada célula é função da intensidade e duração da irradiação luminosa. A densidade celular afeta a maneira como as células recebem e absorvem luz. Em cultivos com alta concentração celular, ocorre o efeito sombra (BECKER, 1981; RICHMOND, 1988), no qual as células mais próximas da superfície impedem as mais distantes de receber luz, e a atividade fotossintética

do cultivo é reduzida (QIANG; ZARMI; RICHMOND, 1998; MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011).

Em geral, o aumento da intensidade luminosa, até níveis considerados dentro daquele ótimo para o crescimento celular, de cultivos das espécies de *Arthrospira* leva ao aumento do teor de clorofila da biomassa (DANESI et al., 2011), porém à diminuição dos teores de proteínas e lipídeos (BEZERRA et al., 2008; MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011; OLGUÍN et al., 2001).

2.3 Fermentação alcoólica e o dióxido de carbono

A fermentação alcoólica é o processo no qual uma levedura ou bactéria converte açúcar em energia, produzindo principalmente álcool etílico e gás carbônico. No Brasil, esse processo é realizado através da fermentação de caldo de cana-de-açúcar ou melaço por leveduras do gênero *Saccharomyces*, em especial *S. cerevisiae*.

A produção de etanol no Brasil variou entre 24,0 e 27,5 bilhões de litros nos anos safra de 2008/2009 a 2010/2011, e estima-se que no ano safra 2011/2012 haja uma redução de cerca de 15 % na produção, principalmente em decorrência da crise atual e do envelhecimento natural dos canaviais (UNICA, 2011). Considerando que etanol e dióxido de carbono são produzidos em quantidades quase que equimolares (0,96 g CO₂ g etanol), a quantidade de gás carbônico proveniente da fermentação alcoólica liberado na atmosfera é imensa.

Alguns recentes estudos envolveram a utilização do dióxido de carbono proveniente da fermentação alcoólica no cultivo de *A. platensis* e provaram viável a produção de tal cianobactéria com o auxílio de gás carbônico efluente. Em cultivos realizados em fotobiorreatores tubulares, Bezerra (2010) e Matsudo (2010) obtiveram, através da aplicação dos processos descontínuo alimentado e contínuo de cultivo, cerca de 3,1 e 1,4 g L⁻¹ de células, respectivamente. As biomassas obtidas apresentaram teores de proteínas que variaram entre 32 e 47 %, e teores de lipídeos de cerca de 10 %. Todos esses resultados corresponderam, dentro dos intervalos de variação, a aqueles obtidos em cultivos correspondentes porém realizados com dióxido de carbono puro.

2.4 Microalgas do gênero *Chlorella* e a remoção de metais pesados

Chlorella (Figura 03) é um gênero de microalga unicelular, de cor verde amarelada, pertencente à classe *Chlorophyceae*.

Figura 03 – *Chlorella vulgaris*.

Fonte: UTEX, 2011.

Possui composição química e propriedades semelhantes a aquelas da cianobactéria *A. platensis*; no entanto, geralmente apresenta conteúdo de lipídeos um pouco mais elevado, e tanto as formas “a” e “b” do pigmento clorofila (BERTOLDI; SANT’ANNA; OLIVEIRA, 2008). Em decorrência do teor lipídico, que pode chegar a 40 % dependendo das condições de cultivo (LIANG; SARKANY; CUI, 2009; LV et al., 2010), *C. vulgaris* é umas das microalgas com maior potencial para produção de biocombustíveis (CHADER; HACENE; AGATHOS, 2009; CONVERTI et al., 2009; HSIEH; WU, 2009). Uma outra aplicação bastante explorada desta microalga é a utilização da biomassa na remoção de nutrientes (GONZÁLEZ; CAÑIZARES; BAENA, 1997) e metais pesados (AL-RUB et al., 2006; EL-NAAS et al., 2007) de efluentes industriais diversos.

Na remoção de metais pesados de efluentes industriais líquidos, o uso de biomassa microbiana representa uma alternativa de baixo custo aos tratamentos tradicionais realizados através da aplicação de técnicas químicas, físicas e biológicas, que incluem métodos de precipitação, floculação, cristalização, troca iônica e filtração por membrana, entre outras (CRINI, 2006; VIJAYARAGHAVAN, YUN, 2008). As microalgas, entre elas as espécies de *Chlorella*, funcionam como bons bioabsorventes pois apresentam uma relativa alta capacidade de sorção (WANG; CHEN, 2009) e não geram um impacto grande no meio ambiente. Esse processo de sorção é dado através da absorção dos metais pesados através da membrana de células ativas, ou da adsorção dos íons na superfície da parede celular de células ativas ou inativas.

No processo de adsorção de íons metálicos por células de microalgas, a parede celular desses microrganismos, que é composta principalmente por polissacarídeos e proteínas, apresenta grupos funcionais eletronicamente carregados, tais como os ácidos carboxílicos, as hidroxilas ou as aminas (BAI; ABRAHAM, 2002; TOBIN; ROUX, 1998). Esses grupos, dependendo do valor de pH do meio, podem apresentar-se na forma protonada ou desprotonada, e portanto são responsáveis pela presença de sítios aniônicos e catiônicos na superfície das células (AKSU; DÖNMEZ, 2006; FINOCCHIO et al., 2010), onde ocorre o processo de adsorção, através de fenômenos de complexação e atração eletrostática (AKSU; DÖNMEZ, 2006).

Os estudos de biossorção incluem dados referentes à adsorção de um único metal (sistemas únicos) ou de dois ou mais metais simultaneamente (sistemas múltiplos) na superfície de uma célula microbiana. Considerando que a maior parte das indústrias libera efluentes que contêm diversos contaminantes e que a adsorção de um íon geralmente é afetada pela presença de outro, faz-se importante o estudo do fenômeno de biossorção em soluções binárias e ternárias, por exemplo (AKSU; DÖNMEZ, 2006). Os mecanismos da biossorção em sistemas múltiplos é bastante complexo e não foi ainda completamente explicado ou entendido. Depende, principalmente, do valor de pH do meio, da temperatura, do número de íons metálicos e da concentração de cada um deles (VIJAYARAGHAVAN, YUN, 2008), e do tipo de interação que ocorre entre os diferentes íons, e entre os íons e os sítios de adsorção na superfície do biossorvente. De acordo com diversos autores (AKSU; DÖNMEZ, 2006; LI et al., 2004; TING; LAWSON; PRINCE, 1991), uma mistura de íons metálicos pode apresentar três diferentes comportamentos: antagonismo, sinergismo e não interação. Se a adsorção de um íon metálico em sistema múltiplo é menor ou maior que aquela em sistema único, então a interação deste íon com outros em uma solução binária ou ternária é considerada, respectivamente, antagônica e sinérgica. Se não há diferença de adsorção de um íon metálicos em sistemas únicos e múltiplos, então se entende que a presença de outros íons não interfere na adsorção deste, e portanto não há interação entre os componentes.

Diversos estudos registraram a capacidade da microalga *C. vulgaris* em biossorver íons e metais pesados como o chumbo (LEE et al., 2009), níquel (FERREIRA et al., 2011), cádmio (AL-QUNAIBIT; KHALIL; AL-WASSIL, 2005), ferro (AKSU; AÇIKEL, 2000) e cromo (GOKHALE; JYOTI; LELE, 2008), especialmente. Tajés-Martínez et al. (2006), por exemplo, desenvolveram um método para especiação de mercúrio em águas usando colunas de *C. vulgaris* imobilizada em sílica gel. Os autores testaram o sistema com água de torneira, água do mar e água efluente, todas contaminadas com mercúrio, e obtiveram uma eficiência

de bioissorção superior a 97 %. São trabalhos como este que demonstram a alta capacidade desta microalga em bioissorver íons metálicos e outras substâncias, e sendo assim, a avaliação de outros microrganismos como possíveis bioissorventes pode ser feita através da comparação da capacidade de adsorção destes com aquela de *C. vulgaris*.

3 OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi a avaliação da possibilidade de emprego do dióxido de carbono proveniente de fermentação alcoólica contínua como fonte de carbono e forma de controle de pH em cultivos de *Spirulina (Arthrospira) platensis*.

Para tal, foi necessária a otimização prévia dos cultivos desta cianobactéria em tanques abertos, realizados por processo descontínuo alimentado. Assim, constitui objetivo secundário deste trabalho o estudo das condições de cultivo mais adequadas a propiciar um bom aproveitamento das fontes de nitrogênio (nitrato de sódio e sulfato de amônio) e de carbono (bicarbonato de sódio e dióxido de carbono), o que inclui a avaliação da concentração do inóculo, do tempo de alimentação da fonte amoniacal, da proporção de carbonato e bicarbonato de sódio no meio de cultura, da faixa de controle de pH, e da alteração da intensidade luminosa no decorrer dos cultivos, inclusive do tempo de cultivo mais adequado para tal alteração.

Como objetivo adicional pode ser considerada a avaliação do potencial da biomassa de *Spirulina (Arthrospira) platensis*, cultivada com a adição de dióxido de carbono, como bioissorvente para remoção de íons metálicos de sistemas múltiplos, contendo mais de uma espécie metálica. Estão inclusos nesta avaliação o estudo da cinética e isothermas de bioissorção, e comparação dos resultados com aqueles obtidos em testes realizados com a biomassa de *Chlorella vulgaris*, considerada padrão para os propósitos deste trabalho.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A seção de Materiais e Métodos desse trabalho foi dividida em três partes: a primeira (Item 4.1) é referente aos ensaios com a cianobactéria *Arthrospira (Spirulina) platensis* em mini-tanques; a segunda (Item 4.2) é referente à fermentação alcoólica, realizada com o objetivo de gerar dióxido de carbono a ser incorporado nos ensaios da primeira parte; e a terceira (Item 4.3) é referente aos testes de adsorção realizados com a biomassa seca de *Arthrospira (Spirulina) platensis* e *Chlorella vulgaris*.

4.1 Cultivo de *Arthrospira platensis* (ensaios 01 a 40)

4.1.1 *Microrganismo e dispositivo de cultura*

O microrganismo selecionado para experimentação foi *Spirulina (Arthrospira) platensis* 1926, adquirido da *The Culture Collection of Algae of the University of Texas* (UTEX). A cianobactéria foi conservada em um tubo de ensaio com meio de cultura líquido Paoletti ou Schlösser (Item 4.1.2), e mantida em condições de assepsia a temperatura ambiente.

O dispositivo de cultura selecionado para experimentação foi o mini-tanque de forma alongada (BELAY, 1997), em decorrência da sua semelhança com os dispositivos industriais atualmente utilizados na produção de *A. platensis* (Figura 04).

Figura 04 – Cultivo de *A. platensis* em mini-tanques em escala laboratorial.

Fonte: RODRIGUES, 2008.

Tal dispositivo foi construído com lâminas de cloreto de polivinila de cor branca, de forma a possuir uma área de $0,123 \text{ m}^2$ e capacidade total de 5 L. A movimentação da cultura, necessária para homogeneização, foi executada por pás rotativas com frequência de 18 rpm. Acima do fotobiorreator foi instalado um sistema de iluminação, constituído de uma série de lâmpadas fluorescentes fixas em um suporte móvel. Esse sistema possibilitou o acerto da intensidade luminosa através do controle do número de lâmpadas em funcionamento e da distância entre estas e o tanque. Um sistema adicional de mangueiras de silicone foi adicionado ao redor do mini-tanque, de maneira a permitir a inserção eficiente de gás no cultivo durante os ensaios realizados com controle de pH (ensaios 01, 05 e 11 a 40). A Figura 05 é uma representação esquemática de tal sistema.

Figura 05 – Representação esquemática do sistema de incorporação de dióxido de carbono acoplado ao fotobiorreator: mini-tanque aberto (1), pás rotativas para homogeneização (2), mangueira de silicone transparente (3), bomba motorizada de submersão (4), conector de vidro em forma de Y (5), fonte de dióxido de carbono (6).

No decorrer de um cultivo, uma pequena bomba motorizada (Alife, modelo AE-01-180, Nantou, Taiwan) conectada a uma ponta da mangueira de silicone e submersa na cultura próxima às pás rotativas removeu meio de cultivo e células de dentro do mini-tanque. Essa suspensão percorreu então a mangueira até entrar em contato com o dióxido de carbono, proveniente de cilindros (ensaios 01, 05, e 11 a 34) ou da fermentação alcoólica (ensaios 35 a 40), inserido no sistema através de um conector de vidro na forma Y. A partir desse ponto, a suspensão continuou a percorrer a mangueira, juntamente com o dióxido de carbono, até retornar ao interior do mini-tanque. O espaço que o meio de cultivo com células percorreu juntamente com o gás carbônico garantiu tempo de contato suficiente entre o líquido e o gás para incorporação deste último no primeiro.

4.1.2 Meios de cultura

Dois principais meios de cultura líquidos foram selecionados para este trabalho: o meio de cultura Paoletti (PAOLETTI; PUSHPARAJ; TOMASELLI FEROCI, 1975) e o meio de cultura Schlösser (SCHLÖSSER, 1982). Ambos são comumente utilizados no cultivo de *A. platensis*, e são compostos basicamente de soluções principais (Quadro 01), contendo sais minerais, e soluções adicionais de microelementos (Quadro 02), contendo em sua maioria concentrações bastante reduzidas de sais de metais.

Quadro 01 – Composição mineral da solução principal dos meios de cultura originais de Paoletti e Schlösser ^a.

Reagente químico	Concentração do sal (g L ⁻¹)	
	Meio de Paoletti	Meio de Schlösser
Na ₂ CO ₃	8,89	4,03
NaHCO ₃	15,2	13,6
KNO ₃	2,57	-
NaNO ₃	-	2,50
Na ₂ SO ₄	1,88	-
K ₂ SO ₄	-	1,00
K ₂ HPO ₄	0,500	0,500
NaCl	0,920	1,00
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,0500	0,0400
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,250	0,200

Fonte: PAOLETTI; PUSHPARAJ; TOMASELLI FEROCI, 1975; SCHLÖSSER, 1982.

“-“ indica que o reagente químico não faz parte da composição do referido meio de cultura e portanto não foi adicionado.

Para o preparo do meio de cultura Paoletti, a um litro da solução principal (Quadro 01) foram adicionados 1 mL da solução de microelementos de Paoletti (Quadro 02) e 1 mL da solução Fe-EDTA (29,8 g L⁻¹ EDTA-Na₂ + 24,9 g L⁻¹ FeSO₄ 7H₂O). Para o preparo do meio de cultura Schlösser, a uma litro da solução principal (Quadro 01) foram adicionados 1 mL da solução de microelementos de Schlösser e 6 mL da solução de metais P-IV (Quadro 02), além de 1 mL de solução de vitamina B₁₂ (15 µg em 100 mL H₂O).

Quadro 02 – Composição das soluções adicionais de metais e de microelementos dos meios de cultura originais de Paoletti e Schlösser.

Reagente químico	Concentração (mg L ⁻¹)		
	Solução de microelementos do meio de Paoletti	Solução de microelementos do meio de Schlösser	Solução de metais P-IV do meio de Schlösser
EDTA-Na ₂	-	50	2750
H ₃ BO ₃	-	620	-
LiCl	293	-	-
BaCl ₂ 2H ₂ O	2846	-	-
CoCl ₂ 6H ₂ O	194	20	2
FeCl ₃ 6H ₂ O	-	-	97
MnCl ₂ 4H ₂ O	173	12	41
SeCl ₂ 2H ₂ O	146	-	-
SnCl ₂ 2H ₂ O	304	-	-
ZnCl ₂	-	-	5
ZnSO ₄ 7H ₂ O	-	44	-
CuSO ₄ 5H ₂ O	186	20	-
NiSO ₄ 5H ₂ O	717	-	-
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	121	12	4

Fonte: PAOLETTI; PUSHPARAJ; TOMASELLI FEROCI, 1975; SCHLÖSSER, 1982.

“-“ indica que o reagente químico não faz parte da composição da referida solução e portanto não foi adicionado.

Apesar da composição similar das soluções principais, tais meios de cultura diferem principalmente quanto às concentrações das fontes de nitrogênio e carbono; o meio de cultura Paoletti contém 25,4 mM de nitrato de potássio e 12,0 g L⁻¹ de carbonato total, enquanto que o meio de cultura Schlösser contém 29,4 mM de nitrato de sódio e 15,9 g L⁻¹ de carbonato total. Além disso, a solução principal do meio de cultura Paoletti é mais salina que aquela do meio de cultura Schlösser; maior salinidade é vantajosa para a redução das chances de contaminação de um cultivo, enquanto que menor salinidade implica em menor estresse celular. Ambos os meios possuem valor inicial de pH de 9,5 ± 0,1.

Os meios de cultura originais de Paoletti e Schlösser foram utilizados para conservação do microrganismo (Item 4.1.1) e na parte inicial do preparo do inóculo (Item

4.1.3). O meio de cultura Schlösser também foi utilizado no primeiro ensaio padrão (ensaio 01), realizado para fins de comparação. Para a efetiva experimentação das condições de cultivo de *A. platensis*, tais meios de cultura foram modificados quanto à concentração das fontes de nitrogênio. Assim, os meios de cultura Paoletti I (ensaio 02) e Schlösser I (ensaios 03, 04, 06 a 10, e 19 a 21) apresentaram apenas 20 % da concentração original dos sais de nitrato – 5,1 mM de nitrato de potássio (RODRIGUES, 2008) e 5,9 mM de nitrato de sódio, respectivamente. Já o meio de cultura Schlösser I sofreu posteriores modificações em relação à concentração das fontes de carbono – carbonato e bicarbonato de sódio, originando assim os meios de cultura Schlösser II (ensaios 05, 11 a 18, e 25 a 40) e III (ensaios 22 a 24), com valores diferenciados de pH inicial (Quadro 03).

Quadro 03 – Concentrações das fontes de carbono (carbonato e bicarbonato de sódio) dos meios de cultura modificados Schlösser I, II e III.

Meio de cultura modificado	Concentração do sal (g L ⁻¹)		Valor de pH inicial
	Na ₂ CO ₃	NaHCO ₃	
Schlösser I ^a	4,03	13,6	9,4
Schlösser II	0,497	16,4	8,7
Schlösser III	11,1	8,01	10,1

^a as concentrações de carbonato e bicarbonato de sódio do meio de cultura Schlösser I correspondem às concentrações encontradas no meio de cultura original.

Apesar da forma na qual a fonte de carbono foi disponibilizada às células de *A. platensis* ter variado conforme a modificação do meio de cultura Schlösser, a quantidade total de carbonato foi de 12,0 g L⁻¹ em todos os casos.

4.1.3 Preparo do inóculo

Uma parte da cultura de *A. platensis* mantida no laboratório foi transferida, sob condições assépticas, para um tubo de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura Paoletti ou Schlösser (Item 4.1.2), ambos com a composição original (PAOLETTI; PUSHPARAJ; TOMASELLI FEROCI, 1975; SCHLÖSSER, 1982). Após quinze dias, a suspensão foi inteiramente transferida para frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 190 mL do mesmo meio de cultura previamente utilizado. Estes frascos foram mantidos em agitador sob frequência de 100 rpm, temperatura de 30 ± 1 °C (VONSHAK, 1997b) e intensidade luminosa

de 72 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (CARVALHO et al., 2004) por cerca de seis a oito dias, durante os quais o crescimento celular foi acompanhado. A suspensão foi dividida em volumes iguais e distribuída para outros frascos Erlenmeyer, e o procedimento foi repetido quantas vezes necessárias até a obtenção de uma concentração celular suficiente para o início dos ensaios.

A suspensão resultante de *A. platensis* foi filtrada, lavada com solução fisiológica para retirada dos sais de nitrato adsorvidos à superfície das células, e ressuspensa em meio de cultura Paoletti ou Schlösser (Item 4.1.2) sem a adição de nenhuma das fontes de nitrogênio. Esta suspensão, contendo células em crescimento em fase exponencial (PELIZER et al., 2003), serviu de inóculo para todos os cultivos de *A. platensis* em fotobiorreator aberto, e as concentrações celulares iniciais foram de 50 mg L^{-1} (ensaios 02 e 03) ou 400 mg L^{-1} (ensaios 01, e 04 a 40). As fontes de nitrogênio foram adicionadas posteriormente (Item 4.1.4.1), conforme a condição de cada cultivo.

4.1.4 Ensaios e condições de experimentação

Foram realizados um total de 61 ensaios, divididos em quatro principais grupos: ensaios padrão (ensaios 01 e 02), que evidenciam os efeitos benéficos da utilização de duas fontes de nitrogênio simultaneamente no crescimento celular de *A. platensis*; ensaios de adaptação (ensaios 03 a 05), que permitem a avaliação dos efeitos do aumento da concentração do inóculo no crescimento da cianobactéria; ensaios preliminares A (ensaios 06 a 15) e B (ensaios 16 a 24), nos quais são selecionados os valores de tempo de alimentação da fonte amoniacal de nitrogênio e de controle de pH que levam à otimização do crescimento celular de *A. platensis*; e ensaios principais A (ensaios 25 a 28) e B (ensaios 29 a 40), nos quais os efeitos da intensidade luminosa e da utilização de dióxido de carbono proveniente da fermentação alcoólica são avaliados (Quadro 04).

Os ensaios foram numerados de 01 a 40. Nos ensaios preliminares B e ensaios principais B (Quadro 04) foram estudadas as condições de experimentação mais relevantes para este trabalho, e portanto tais ensaios foram realizados em duplicatas, identificadas como “a” e “b”. Para todos os ensaios, as condições fixas de cultivo foram: agitação com frequência de 18 rpm, determinada pelas pás rotativas do mini-tanque (Item 4.1.1); temperatura de 30 ± 1 °C (VONSHAK, 1997b), e controlada através de termostatos eletrônicos (Sarlo Better, modelo Aristos 50 W, São Caetano do Sul, Brasil) submersos na cultura; e volume de trabalho de 5 L, determinado pela configuração do mini-tanque (Item 4.1.1).

Quadro 04 – Ensaios e condições de experimentação dos cultivos de *A. platensis* em mini-tanques.

Ensaios	Principais variáveis	Principais objetivos
Ensaios padrão (ensaios 01-02)	a) processo descontínuo e descontínuo alimentado b) uma e duas fontes de nitrogênio pH livre e controlado	Avaliar qual conjunto de condições experimentais beneficia o crescimento celular
Ensaios de adaptação (ensaios 03-05)	a) concentração de inóculo 50 e 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ b) pH livre e controlado	Avaliar o efeito do aumento da concentração do inóculo no crescimento celular e identificar variáveis a serem otimizadas
Ensaios preliminares A (ensaios 06-15)	a) tempo de alimentação da fonte amoniacal de 7 a 15 dias b) pH livre e controlado	Selecionar os valores de tempo de alimentação da fonte amoniacal que suportam o aumento da concentração do inóculo
Ensaios preliminares B (ensaios 16-24)	a) tempo de alimentação da fonte amoniacal de 11 a 15 dias b) pH controlado em 9,0, 9,7 e 10,4	Selecionar os valores de pH que beneficia o crescimento celular
Ensaios principais A (ensaios 25-28)	a) intensidade luminosa de 156, 192, 228 e 252 $\mu\text{mol} \text{ fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	Selecionar o valor de intensidade luminosa mais adequado às condições estabelecidas de cultivo
Ensaios principais B (ensaios 29-40)	a) aumento da intensidade luminosa de 156 para 192 e 252 $\mu\text{mol} \text{ fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ nos dias 5, 8 e 11 de cultivo b) pH controlado com CO_2 de cilindro e proveniente da fermentação alcoólica	Avaliar o efeito do aumento da intensidade luminosa no crescimento celular e a possibilidade do uso de CO_2 proveniente da fermentação alcoólica no cultivo de <i>A. platensis</i>

4.1.4.1 Adição das fontes de nitrogênio

O processo descontínuo alimentado foi escolhido para o desenvolvimento dos ensaios realizados com concentrações reduzidas das fontes nítricas de nitrogênio e com suplementação com cloreto ou sulfato de amônio (ensaios 02 a 40), uma vez que tais fontes são potencialmente tóxicas à *A. platensis* quando em altas concentrações. A vazão de alimentação da fonte amoniacal de nitrogênio foi de característica exponencial crescente (CARVALHO et al., 2004), e realizada de acordo com a seguinte equação:

$$m_t = m_0 e^{kt} \quad (\text{Equação 01}),$$

onde “ m_t ” é a quantidade de sal de amônio, expressa em mM (Tabela 01), adicionada por unidade de volume do reator até o instante “ t ”; “ m_0 ” é a quantidade inicial desta fonte de nitrogênio, expressa também em mM, adicionada por unidade de volume do reator; “ k ” é a constante que determina o perfil de alimentação do sistema, expressa em d^{-1} ; e “ t ” é o instante de adição da fonte de nitrogênio, expresso em dias.

Tabela 01 – Quantidade de sulfato de amônio adicionada, m_t , a cada instante do cultivo, t , e valor de k para cada tempo de alimentação da fonte de nitrogênio considerado.

t (dias)	m _t (mM)					
	17 dias	15 dias	13 dias	11 dias	9 dias	7 dias
1	0,12	0,13	0,15	0,19	0,23	0,31
2	0,13	0,15	0,18	0,23	0,30	0,42
3	0,15	0,18	0,22	0,28	0,38	0,58
4	0,17	0,20	0,26	0,34	0,48	0,79
5	0,19	0,24	0,30	0,41	0,61	1,1 ^a
6	0,22	0,27	0,36	0,50	0,78	1,5 ^a
7	0,25	0,32	0,42	0,61	0,99 ^a	2,0 ^a
8	0,28	0,37	0,50	0,74	1,3 ^a	-
9	0,32	0,42	0,59	0,91 ^a	1,6 ^a	-
10	0,37	0,49	0,70	1,1 ^a	-	-
11	0,42	0,57	0,83	1,3 ^a	-	-
12	0,47	0,66	0,98 ^a	-	-	-
13	0,54	0,76	1,2 ^a	-	-	-
14	0,61	0,88 ^a	-	-	-	-
15	0,70	1,0 ^a	-	-	-	-
16	0,79	-	-	-	-	-
17	0,90 ^a	-	-	-	-	-
k	0,1281	0,1452	0,1675	0,1979	0,2419	0,3111

^a valor de m_t que, por ser maior que aquele de m_0 (0,85 mM), foi dividido em duas ou três partes iguais adicionadas com 6 horas de intervalo.

“-” indica que tal instante não foi considerado para a alimentação do sulfato de amônio.

De acordo com a Equação 01, quando $t = T_A$, então $m_t = m_T$, sendo que T_A representa o tempo de alimentação da fonte amoniacal, expresso em dias, e m_T representa a quantidade total de sal de amônio adicionada ao cultivo, expressa em mM. Em geral, os valores de T_A variaram entre 7 e 17 dias. Já os valores de m_0 e m_T foram fixados em 1,7 e 15 mM de nitrogênio (CARVALHO et al., 2004; RODRIGUES, 2008), respectivamente. Dado que o sulfato de amônio contém dois átomos de nitrogênio enquanto o cloreto de amônio contém apenas um, os valores de m_0 , m_t e m_T dos cultivos realizados com o primeiro sal (ensaios 03 a 40) são a metade daqueles dos cultivos realizados com o segundo (ensaio 02). Nenhum valor de m_t excedeu aqueles considerados inibitório ou tóxico ao crescimento celular de *A. platensis*; quando $m_t > m_0$, a adição foi parcelada de forma a evitar qualquer efeito negativo decorrente da alta concentração de amônia no meio.

A adição de nitrato de potássio ou sódio, fonte esta presente em todos os ensaios realizados, foi única, no instante inicial $t = 0$, e dessa forma o ensaio 01, realizado com apenas esse tipo de fonte de nitrogênio, foi caracterizado pelo processo descontínuo de cultivo.

4.1.4.2 Adição de dióxido de carbono

A adição de dióxido de carbono proveniente de cilindros (ensaios 01, 05, e 11 a 34) foi realizada seguindo quatro diferentes protocolos de adição (Quadro 05).

Quadro 05 – Protocolos de adição de dióxido de carbono proveniente de cilindros, e respectivas condições operacionais para a aplicação dos mesmos.

Protocolo de adição de CO ₂	Intervalo de pH	pH mínimo	pH máximo	Frequência de adição de CO ₂ ^a
Protocolo I	9,2 ± 0,5	8,7	9,7	uma vez ao dia
Protocolo II	9,0 ± 0,3	8,7	9,3	duas vezes ao dia
Protocolo III	9,7 ± 0,3	9,4	10,0	uma vez a cada dois dias
Protocolo IV	10,4 ± 0,3	10,1	10,7	uma vez a cada cinco dias

^a cada adição de dióxido de carbono durou de 15 a 30 minutos.

O intervalo de pH referente ao protocolo I foi determinado pela praticidade de realização das adições de dióxido de carbono; inserindo-se diariamente CO₂ proveniente de cilindros uma única vez até pH de 8,7, o consumo de carbono pelas células de *A. platensis* fez com que o pH do cultivo atingisse no máximo 9,7, em especial durante os dez primeiros dias.

Os valores de pH dos protocolos II e III estão dentro do intervalo considerado ótimo para o crescimento de *A. platensis*, ou seja, são em geral menores que 10,0, diferentemente daqueles do protocolo IV. No entanto, a maior parte dos valores de pH do protocolo II é menor que o valor de pK_a da amônia (9,25), o que deve favorecer a absorção deste nutriente. Os protocolos II e III foram estabelecidos, portanto, com o objetivo de avaliar a influência dos valores de pH no consumo de amônia pelas células. A frequência de adição de dióxido de carbono de cada protocolo corresponde à condição operacional (Quadro 05), determinada experimentalmente. Quando da aplicação dos protocolos de adição de dióxido de carbono I, II e IV, a proporção de carbonato e bicarbonato de sódio do meio de cultura foi alterada (Item 4.1.2) afim de que o valor inicial de pH deste correspondesse ao valor mínimo de pH do respectivo protocolo (Quadro 05).

Enquanto a adição de dióxido de carbono proveniente de cilindros foi feita durante alguns minutos, aquela do dióxido de carbono proveniente da fermentação alcoólica (ensaios 35 a 40) foi realizada uma vez por dia por até 10 horas, conforme o necessário (Quadro 06). Isso devido ao fato de que o gás carbônico da fermentação alcoólica é formado continuamente porém em pequenos volumes.

Quadro 06 – Protocolo de adição de dióxido de carbono proveniente da fermentação alcoólica, e respectiva condição operacional para a aplicação do mesmo.

Protocolo de adição de CO₂	Intervalo de pH	pH mínimo	pH máximo	Frequência de adição de CO₂^a
Protocolo II*	9,0 ± 0,3	8,7	9,3	uma vez ao dia

^a cada adição de dióxido de carbono durou de 8 a 10 horas.

4.1.4.3 Variação da intensidade luminosa

A variação da intensidade luminosa foi realizada através do controle do número de lâmpadas em funcionamento no sistema acoplado aos dispositivos de cultura (Item 4.1.1). Quando necessário, isopores foram posicionados ao redor do mini-tanque a fim de aumentar a incidência de luz na superfície do dispositivo. A intensidade luminosa foi mensurada com um sensor específico (Li-Cor, modelo LI-190 SB, Lincoln, Nebraska, EUA) em três diferentes pontos do mini-tanque.

Para a realização dos ensaios 01 a 25, o valor da intensidade luminosa foi constante e fixado em $156 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nos ensaios 26 a 28, foram estudadas as intensidades 192,

228 e 252 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Na realiza\u00e7\u00e3o dos ensaios 29 a 40, a intensidade luminosa inicial foi fixada em 156 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, e posteriormente aumentada para 192 ou 252 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ no quinto, oitavo ou d\u00e9cimo primeiro dia de cultivo.

4.1.5 *T\u00e9cnicas anal\u00edticas*

4.1.5.1 Determina\u00e7\u00e3o da concentra\u00e7\u00e3o celular e do pH

A concentra\u00e7\u00e3o celular foi determinada diariamente por turbidimetria (LEDUY; THERIEN, 1977) a partir de amostras de 5 mL de meio contendo c\u00e9lulas, retiradas ap\u00f3s a homogeneiza\u00e7\u00e3o dos cultivos. Essas amostras, dilu\u00eddas quando necess\u00e1rio, foram analisadas em espectrofot\u00f4metro (Femto, modelo 700 Plus, S\u00e3o Paulo, Brasil), em comprimento de onda de 560 nm. Os resultados foram aplicados \u00e0 equa\u00e7\u00e3o resultante da curva de calibra\u00e7\u00e3o ($y = -530,1x + 1059$, $R^2 = 0,9980$), que correlaciona o logaritmo da transmit\u00e2ncia com um determinado valor de concentra\u00e7\u00e3o celular, em miligramas por litro.

Os valores de pH foram acompanhados diariamente com o aux\u00edlio de um potenci\u00f4metro (Mettler Toledo, modelo 2100E, S\u00e3o Paulo, Brasil). O eletrodo utilizado nas medi\u00e7\u00f5es foi calibrado conforme as instru\u00e7\u00f5es do fabricante, em rela\u00e7\u00e3o \u00e0 exatid\u00e3o e precis\u00e3o, sempre anteriormente a uma leitura individual ou a uma s\u00e9rie de leituras consecutivas. As leituras de pH foram realizadas atrav\u00e9s da imers\u00e3o direta dos eletrodos nos tanques de cultivo.

4.1.5.2 Determina\u00e7\u00e3o da concentra\u00e7\u00e3o de carbonato total

A concentra\u00e7\u00e3o de carbonato total foi determinada por titulometria (PIERCE; HAENISCH, 1948). A 10 mL de meio isento de c\u00e9lulas foi adicionado NaOH 1,5 N, de forma a converter todos os \u00f3ns hidrogenocarbonato em \u00f3ns carbonato (Equa\u00e7\u00e3o 02). A solu\u00e7\u00e3o foi titulada com HCl 0,50 N na presen\u00e7a de indicador fenolftale\u00edna; em meio \u00e1cido, a convers\u00e3o \u00e9 inversa, e os \u00f3ns carbonato s\u00e3o convertidos em \u00f3ns hidrogenocarbonato (Equa\u00e7\u00e3o 03). Uma segunda titula\u00e7\u00e3o foi realizada ent\u00e3o, utilizando a mesma solu\u00e7\u00e3o \u00e1cida, por\u00e9m na presen\u00e7a de indicador alaranjado de metila; em meio \u00e1cido em excesso, os \u00f3ns hidrogenocarbonato formados acabam por ser convertidos em \u00e1cido carb\u00f4nico, por deslocamento de equil\u00edbrio (Equa\u00e7\u00e3o 04).

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.

4.1.5.3 Determinação da concentração de amônia total

A concentração de amônia total foi determinada por espectrofotometria, conforme a metodologia do fenol hipoclorito (SOLÓRZANO, 1969). Foram utilizados 25 mL de meio isento de células para a análise.

A amônia presente na amostra reage com o fenol e o hipoclorito de sódio contidos em solução alcoólica de fenol 10 % e solução oxidante contendo o segundo reagente, na presença do catalisador nitroprussiato de sódio em solução 0,5 %. Após uma hora em temperatura ambiente é formado o indofenol, composto de coloração azul que pode ser quantificado por espectrofotômetro (Femto, modelo 700 Plus, São Paulo, Brasil), em comprimento de onda 640 nm. Os resultados foram aplicados à equação resultante da curva de calibração ($y = -6,01 \cdot 10^{-5}x + 1,23 \cdot 10^{-4}$, $R^2 = 0,9970$), que correlaciona o logaritmo da transmitância com um determinado valor de concentração de amônia, em milimoles por litro.

4.1.5.4 Determinação da concentração de nitrato

A concentração de nitrato foi determinada conforme a metodologia descrita por Vogel (2002), que inclui passagens de redução, destilação e titulação. Foram utilizados 10 mL de meio isento de células para a análise.

Os íons nitrato presentes na amostra foram reduzidos à amônia em consequência da presença dos metais da liga de Devarda (50 % cobre, 45 % alumínio e 5 % zinco) em meio alcalino forte, provido este último por solução de NaOH 0,50 N (Equação 05).

A destilação permite a captura da amônia formada em solução padronizada de HCl 0,20 N, e a quantificação desta é feita através da titulação do excesso de ácido com solução

padronizada de NaOH 0,20 N, na presença de indicador vermelho de metila. A conversão de volume de ácido titulado (mililitros) em massa de íons nitrato (gramas) foi baseada na informação de que 1 mL de ácido clorídrico 1,0 N corresponde a 0,06201 g de íons nitrato. Do resultado final é exclusiva a quantidade de amônia detectada no dia pela metodologia anterior (Item 4.1.5.3).

4.1.5.5 Determinação da concentração de clorofila

A análise de clorofila foi realizada por espectrofotometria (VONSHAK, 1997a), em amostras de 5 mL de meio contendo células. As células foram extraídas das amostras líquidas retiradas dos tanques através de filtração a vácuo, e submetidas a processo de extração do pigmento com metanol, a 70 °C, e filtração com membranas de politetrafluoretileno com porosidade de 1,0 µm. Diluições alcoólicas das soluções resultantes foram preparadas e submetidas à leitura de absorbância em espectrofotômetro (Femto, modelo 700 Plus, São Paulo, Brasil), em comprimento de onda de 665 nm. Os resultados foram aplicados à equação resultante da curva de calibração ($y = 26,57x - 1,126$, $R^2 = 0,9880$), que correlaciona a absorbância com um determinado valor de concentração de clorofila, em miligramas por litro.

4.1.5.6 Determinação do teor de proteínas e lipídeos

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.

O teor protéico total na biomassa seca foi determinado pelo clássico método de 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 H₂SO₄ concentrado e catalisador. Tal procedimento promove a destruição da matéria orgânica e formação de nitrogênio inorgânico, na forma de (NH₄)₂SO₄. 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.

4.1.6 *Análise dos resultados*

4.1.6.1 Cálculo dos parâmetros

Os valores de concentração celular máxima (X_m), expressos em miligramas por litro, foram determinados a partir das curvas de crescimento celular de todos os ensaios realizados (ensaios 01 a 40). Corresponderam ao maior valor diário de concentração celular (X , mg L^{-1}) após o término da alimentação da fonte amoniacal de nitrogênio, quando utilizada.

Os valores de produtividade celular (P_X), expressos em miligramas por litro por dia, representam a média de crescimento celular diária, e foram determinados para todos os ensaios realizados (ensaios 01 a 40) com base na concentração total de células formadas e no tempo total de cultivo (Equação 06).

Os valores de fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$), expressos em miligramas de células por miligrama de nitrogênio, representam quanto do nitrogênio provido aos cultivos foi efetivamente convertido em células, e foram determinados para todos os ensaios realizados (ensaios 01 a 40) com base na massa total de células formadas e na massa total de nitrogênio adicionada (Equação 07).

$$P_X = \frac{X_m - X_i}{T_C} \quad (\text{Equação 06}),$$

$$Y_{X/N} = \frac{X_m - X_i}{N_T} V \quad (\text{Equação 07}),$$

onde “ X_m ” é a concentração celular máxima (mg L^{-1}), “ X_i ” é a concentração celular inicial (mg L^{-1}), “ T_C ” é o tempo de cultivo (d), “ V ” é o volume total do cultivo (L), e “ N_T ” é a massa total de nitrogênio adicionada (mg).

A velocidade específica de crescimento, indicada como μ_X e expressa em d^{-1} , foi calculada para todos os ensaios realizados (ensaios 01 a 40) por derivação das curvas experimentais de crescimento e posterior aplicação do método de Leduy e Zajic (1973), e o seu valor máximo (μ_m , d^{-1}) foi encontrado na fase exponencial de tais curvas, geralmente no início das mesmas. Nos ensaios realizados com a aplicação de dois distintos valores de

intensidade luminosa (ensaios 29 a 40), um valor de velocidade específica máxima de crescimento foi determinado para cada fase do cultivo (μ_{m1} e μ_{m2}).

A eficiência fotossintética, indicada como EF e expressa em porcentagem, foi calculada para os ensaios nos quais a intensidade luminosa era um dos fatores de avaliação (ensaios 25 a 40), a partir da derivação das curvas experimentais de crescimento e com base na área de iluminação e na quantidade de energia luminosa fornecida aos cultivos (Equação 08).

$$EF = \frac{r_G H_G}{IPAR} 100 \quad (\text{Equação 08}),$$

onde “ r_G ” é o crescimento celular máximo diário (g d^{-1}), estimado pela derivação das curvas experimentais de crescimento, “ H_G ” é a entalpia da biomassa seca ($21,01 \text{ kJ g}^{-1}$), e “IPAR” é a radiação fotossintética ativa (kJ d^{-1}), calculada com fator de conversão $18,78 \text{ kJ s d}^{-1}$.

O valor de eficiência fotossintética máxima (EF_m , %) foi encontrado na fase exponencial das curvas derivadas de crescimento celular, geralmente no início das mesmas. Nos ensaios realizados com a aplicação de dois distintos valores de intensidade luminosa (ensaios 29 a 40), um valor de eficiência fotossintética máxima foi determinado para cada fase do cultivo (EF_{m1} e EF_{m2}).

4.1.6.2 Análise estatística

Os resultados de concentração celular máxima (X_m), produtividade celular (P_X), fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$), velocidade específica máxima de crescimento (μ_m , μ_{m1} e μ_{m2}) e eficiência fotossintética máxima (EF_{m1} e EF_{m2}) foram submetidos à análise estatística a fim de identificar qualquer relação entre tais variáveis e determinados parâmetros de cultivo, como a concentração do inóculo (X_i), o tempo de alimentação da fonte amoniacal (T_A), as diferentes faixas de controle de pH, a intensidade luminosa (IL_2) e o tempo de aumento da intensidade luminosa (t^*).

A análise estatística selecionada, realizada no programa Minitab 16, foi a análise de variância (ANOVA, *analysis of variance*), dos tipos “1 fator” e “2 fatores”, aplicáveis quando existem, respectivamente, um e dois parâmetros influentes (Quadro 07). Os valores dos níveis descritivos (p) foram estimados na análise, e o nível de confiança foi determinado em 95 % –

quando $p < 0,05$, entendeu-se que um determinado parâmetro apresentou influência estatística significativa sobre uma determinada variável.

Quadro 07 – Tipos de análises de variância, e respectivos fatores e respostas, aplicados para avaliação estatística dos resultados obtidos nos cultivos de *A. platensis* em mini-tanques.

Ensaio	ANOVA	Fator (Parâmetro Influyente) ^a	Resposta (Variável) ^b
01 a 05	1 fator	X_i	μ_m
06 a 15	2 fatores	T_A , pH	X_m , P_X , $Y_{X/N}$, μ_m
16 a 24	2 fatores	T_A , pH	X_m , P_X , $Y_{X/N}$, μ_m
30,31,33,34	2 fatores	IL_2 , t^*	X_m , P_X , $Y_{X/N}$, EF_{m2}
36,37,39,40	2 fatores	IL_2 , t^*	X_m , P_X , $Y_{X/N}$, EF_{m2}
17, 25, 30, 33, 36, 39	1 fator	IL ou IL_2	CL_f , PTN, LIP
30, 33, 36, 39	2 fatores	IL_2 , $f\text{-CO}_2$	CL_f , PTN, LIP

^a concentração do inóculo, X_i ; tempo de alimentação da fonte amoniacal, T_A ; intensidade luminosa, IL ; intensidade luminosa da segunda fase, IL_2 ; instante de aumento da intensidade luminosa, t^* ; fonte de dióxido de carbono, $f\text{-CO}_2$.

^b concentração celular máxima, X_m ; produtividade celular, P_X ; fator de conversão de nitrogênio em células, $Y_{X/N}$; velocidade específica máxima de crescimento, μ_m ; eficiência fotossintética máxima da segunda fase, EF_{m2} ; teor final de clorofila, CL_f ; teor de proteínas, PTN; teor de lipídeos, LIP.

4.2 Fermentação alcoólica (dorna 01 e 02)

A cepa *Saccharomyces cerevisiae* foi obtida da Fundação Tropical André Tosello (Campinas, São Paulo, Brasil) e mantida em Agar *Sabouraud* semi-sólido e líquido. Amostras foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de melão de cana de açúcar, caracterizado por concentração de açúcares redutores totais de 50 g L^{-1} , e deixados por 24 horas em agitador rotatório a 100 rpm e $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

De acordo com trabalho anterior (MATSUDO et al., 2011), 1 L do inóculo foi então transferido para um biorreator de vidro juntamente com 9 L de melão de cana de açúcar diluído, contendo 170 g L^{-1} de açúcares redutores totais, 1 g L^{-1} de sulfato de amônio e 25 U L^{-1} de penicilina. A fermentação alcoólica foi realizada com agitação a 500 rpm, temperatura de $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH de $4,5 \pm 0,5$, sendo este último controlado pela adição de quantidades mínimas de NaOH 1,5 N. Após 8 horas, a alimentação contínua de melão de cana de açúcar

teve início, com valor de diluição de $0,025 \text{ h}^{-1}$. Dois biorreatores (dorna 01 e 02) operaram continuamente em regime permanente por 36 dias cada um, e durante tal período proveram dióxido de carbono aos cultivos de *A. platensis*, incorporado este através do sistema de mangueiras de silicone acoplado aos mini-tanques (Item 4.1.1).

A concentração celular foi determinada por pesagem após secagem a $108 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas (CARVALHO et al., 2003). A concentração total de açúcares redutores foi calculada como glicose e determinada pela metodologia descrita por Somogyi (1952), após hidrólise ácida das amostras. A concentração de etanol foi determinada pelo método do micro-dicromato (JOSLYN, 1970). Todos os resultados foram expressos, em grama por litro, como médias dos dados experimentais coletados durante o regime permanente. O rendimento da fermentação, expresso em porcentagem, foi calculado através da divisão do rendimento real (concentração de açúcares redutores totais dividido pela concentração de etanol) pelo teórico (0,511).

4.3 Testes de adsorção de íons metálicos (testes 01 a 27)

4.3.1 Biossorventes e soluções de íons metálicos

Os microrganismos selecionados para experimentação foram a cianobactéria *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* 1926, adquirida da *The Culture Collection of Algae of the University of Texas* (UTEX), e a microalga *Chlorella vulgaris* 211, adquirida da *Culture Collection of Algae and Protozoa in Argyll* (CCAP).

Uma parte da cultura desses microrganismos mantida no laboratório foi repicada sob condições ideais para o crescimento celular, e a suspensão resultante serviu de inóculo para cultivos em fotobiorreatores tubulares. Assim, *A. platensis* foi cultivada em meio de cultura Schlösser (SCHLÖSSER, 1982), em temperatura de $30 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e pH de $9,5 \pm 0,5$ (VONSHAK, 1997b), enquanto que *C. vulgaris* foi cultivada em meio de cultura Bold (BISCHOFF; BOLD, 1963) em temperatura de $20 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e pH de $7,0 \pm 0,5$ (FERREIRA et al., 2011). Ambos os cultivos foram desenvolvidos com o auxílio de dióxido de carbono proveniente de cilindros como fonte de carbono e forma de controle de pH. As biomassas foram recolhidas ainda durante a fase exponencial de crescimento dos microrganismos, após cerca de dez e vinte dias de cultivo para *A. platensis* e *C. vulgaris*, respectivamente. As suspensões de células foram centrifugadas e lavadas até atingirem pH 7,0. As células foram

então secas a 40 °C por 24 horas, trituradas e armazenadas em local arejado e protegido da luz.

Soluções estoque de metais com concentração de 100 mM foram preparadas, dissolvendo-se quantidades exatas dos reagentes de alta pureza $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ em água deionizada. As soluções foram armazenadas individualmente em frascos âmbar em temperatura ambiente. As soluções binárias dos testes, contendo concentrações de 0,5, 1,0 ou 2,0 mM de cada metal, foram preparadas no instante da experimentação a partir das soluções estoque.

4.3.2 Testes de adsorção

Foram realizados um total de 54 testes (Quadro 08) em frascos Erlenmeyer de capacidade para 250 mL, mantidos sob constante agitação a 150 rpm e temperatura ambiente de 25 ± 1 °C, nos quais a biomassa seca dos microrganismos, em concentração de 2 g L^{-1} , foi mantida em contato com soluções binárias de íons metálicos por 120 minutos. Com base em trabalho anterior (FERREIRA et al., 2011), os valores de pH foram mantidos na faixa de 5,0 a 5,5 através da adição de soluções ácidas ou básicas. Amostras foram retiradas nos tempos 5, 10, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos, e filtradas através de membranas de porosidade $0,45 \mu\text{m}$ para remoção das células. O filtrado resultante foi analisado quanto à concentração residual de íons metálicos utilizando-se um espectrofotômetro de adsorção atômica (Varian, modelo AA240FS, Milão, Itália).

Quadro 08 – Condições de experimentação dos testes de adsorção realizados com as biomassas secas de *A. platensis* e *C. vulgaris*.

Testes ^a	Combinação de Íons Metálicos ^b
01 a 09	$\text{Ni}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$
10 a 18	$\text{Ni}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$
19 a 27	$\text{Zn}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$

^a testes realizados com a biomassa de *A. platensis* foram denominados “A”, e testes realizados com a biomassa de *C. vulgaris* foram denominados “C”.

^b os íons metálicos foram combinados variando as concentrações entre 0,50, 1,0 e 2,0 mM.

4.3.3 Análise dos resultados

4.3.3.1 Capacidade de bioadsorção

O potencial das biomassas de *A. platensis* e *C. vulgaris* como bioadsorventes de íons de níquel, zinco e chumbo foi avaliado em termos de capacidade de sorção em equilíbrio (q_e), determinada experimentalmente e expressa em mmol g^{-1} , e de eficiência de remoção de metais (Y_R), expressa em porcentagem.

$$q_e = (C_0 - C_e) \frac{V}{m} \quad (\text{Equação 09}),$$

$$Y_R = \frac{C_0 - C_e}{C_0} 100 \quad (\text{Equação 10}),$$

onde “ C_0 ” e “ C_e ” representam respectivamente as concentrações de íons metálicos no instante inicial e em situação de equilíbrio, quando não há mais adsorção (mM), “ V ” é o volume da solução (L), e “ m ” é a massa seca da biomassa (g).

A preferência da biomassa por um dos dois íons metálicos presentes nas soluções binárias foi expressa pelo fator de separação $\alpha_{1,2}$ (EL-NAAS et al., 2007; MALIK et al., 2002), definido como:

$$\alpha_{1,2} = \frac{q_{e,1} C_{e,2}}{q_{e,2} C_{e,1}} \quad (\text{Equação 11}),$$

onde “1” e “2” representam dois íons metálicos diferentes. Se a biomassa selecionada adsorve preferencialmente o íon metálico referido como 1, então $\alpha_{1,2} > 1$; se, pelo contrário, a biomassa adsorve preferencialmente o íon metálico referido como 2, então $\alpha_{1,2} < 1$ (EL-NAAS et al., 2007).

A fim de evitar qualquer diferença nos resultados em decorrência das diferentes concentrações testadas, o fator de separação foi calculado com base nos dados dos testes nos quais as concentrações dos íons metálicos eram iguais: testes 01 (0,50 mM Ni^{2+} + 0,50 mM Zn^{2+}), 05 (1,0 mM Ni^{2+} + 1,0 mM Zn^{2+}), 09 (2,0 mM Ni^{2+} + 2,0 mM Zn^{2+}), 10 (0,50 mM Ni^{2+} + 0,50 mM Pb^{2+}), 14 (1,0 mM Ni^{2+} + 1,0 mM Pb^{2+}), 18 (2,0 mM Ni^{2+} + 2,0 mM Pb^{2+}), 19

(0,50 mM Zn²⁺ + 0,50 mM Pb²⁺), 23 (1,0 mM Zn²⁺ + 1,0 mM Pb²⁺), e 27 (2,0 mM Zn²⁺ + 2,0 mM Pb²⁺).

4.3.3.2 Cinética de bioadsorção

A equação de velocidade de pseudo-segunda ordem (Equação 12) sugerida por Ho e McKay (2000), baseada na capacidade de adsorção de sólidos, foi utilizada para o estudo da cinética de bioadsorção deste trabalho.

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_c - q_t)^2 \quad (\text{Equação 12}),$$

onde “q_t” é a capacidade de sorção em um determinado instante “t” (mmol g⁻¹), “k₂” é a constante de velocidade de pseudo-segunda ordem (g mmol⁻¹ min⁻¹), e “q_c” é o valor teórico da capacidade de sorção em equilíbrio (mmol g⁻¹).

A integração da Equação 12 leva à obtenção da Equação 13, que permite a obtenção dos valores de q_c e k₂ à partir dos valores experimentais de t e q_t.

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_c^2} + \frac{1}{q_c} t \quad (\text{Equação 13}).$$

4.3.3.3 Isotermas de equilíbrio

Isotermas de adsorção são modelos matemáticos que incluem dados da adsorção em equilíbrio, quando não há mudança na concentração residual de íons metálicos em solução, relacionados com a distribuição de tais íons metálicos na superfície dos bioadsorventes. As isotermas são uma importante ferramenta no estudo da remoção de metais pesados, pois geram informações úteis sobre a capacidade de adsorção das células e a afinidade destas por íons metálicos. As equações de Langmuir (1918) e Freundlich (1906) são as mais utilizadas na avaliação da adsorção em sistemas únicos, nos quais apenas um metal está presente. Modelos matemáticos mais complexos são necessários para avaliação de sistemas múltiplos, pois a presença de um íon metálico geralmente interfere na adsorção de outro.

A isoterma multicomponente de Langmuir (MARKHAM; BENTON, 1931) selecionada para este trabalho é baseada na utilização de dados referentes à adsorção em

sistemas únicos na descrição do comportamento em sistemas múltiplos. Considerando-se que existe uma competição entre os íons metálicos pelos sítios de ligação na superfície do bioissorvente, a isoterma se dá pela seguinte equação:

$$q_{L,i} = \frac{q_{m,i} K_{L,i} C_{e,i}}{1 + \sum_{j=1}^n K_{L,j} C_{e,j}} \quad n = 2 \text{ para sistemas binários} \quad (\text{Equação 14})$$

onde “i” e “j” fazem referência a dois diferentes íons metálicos, sendo “ $q_{L,i}$ ” (valor teórico da capacidade de sorção em equilíbrio para o íon “i”, mmol g⁻¹), “ $C_{e,i}$ ” (concentração do íon “i” no equilíbrio, mM) e “ $C_{e,j}$ ” (concentração do íon “j” no equilíbrio, mM) retirados dos testes realizados com sistema múltiplo, e “ $q_{m,i}$ ” (valor teórico da capacidade máxima de sorção para o íon “i”, mmol g⁻¹), “ $K_{L,i}$ ” (constante de Langmuir para o íon “i”, L mmol⁻¹) e “ $K_{L,j}$ ” (constante de Langmuir para o íon “j”, L mmol⁻¹) retirados dos testes realizados com sistema único (FERREIRA et al., 2011).

Uma das isotermas multicomponente de Freundlich (SHEINDORF; REBHUN; SHEINTUCH, 1981) selecionada para este trabalho também é baseada na utilização de dados referentes à adsorção em sistemas únicos na descrição do comportamento em sistemas múltiplos. Considerando-se que cada íon metálico obedece individualmente a isoterma de Freundlich quando em sistemas únicos, a isoterma em sistemas múltiplos se dá pela seguinte equação:

$$q_{F,i} = K_{F,i} C_{e,i} \left(\sum_{j=1}^n a_{ij} C_{e,j} \right)^{1/n_i - 1} \quad n = 2 \text{ para sistemas binários} \quad (\text{Equação 15})$$

onde “i” e “j” fazem referência a dois diferentes íons metálicos, sendo “ $q_{F,i}$ ” (valor teórico da capacidade de sorção em equilíbrio para o íon “i”, mmol g⁻¹), “ $C_{e,i}$ ” (concentração do íon “i” no equilíbrio, mM), “ $C_{e,j}$ ” (concentração do íon “j” no equilíbrio, mM) e “ a_{ij} ” (coeficiente de competição, sem unidade) retirados dos testes realizados com sistema múltiplo, e “ $K_{F,i}$ ” (constante de Freundlich para o íon “i”, mmol^{1-1/n} L^{1/n} g⁻¹) e “ n_i ” (intensidade de adsorção para o íon “i”, sem unidade) retirados dos testes realizados com sistema único (FERREIRA et al., 2011).

O coeficiente de competição foi calculado como a intercepta do eixo ordenado da linha obtida no gráfico $C_{e,i} / C_{e,j}$ versus $\beta_i / C_{e,j}$, sendo que:

$$\beta_i = \left(\frac{K_{F,i} C_{e,i}}{q_{e,i}} \right)^{\frac{1}{1-\frac{1}{n_i}}} \quad (\text{Equação 16})$$

4.3.4 Caracterização da biomassa

Ao final dos testes de adsorção, as biomassas de *A. platensis* e *C. vulgaris* foram recuperadas através de centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos, secas a 40 °C por 24 horas, e trituradas novamente. Amostras foram preparadas para análise de espectrofotometria de infravermelho (FTIR, *Fourier Transform Infrared*) através da misturas destas com KBr em concentração 1 % e a produção de pequenos discos, que posteriormente foram analisados usando um espectrofotômetro de infravermelho (Thermo Fisher, modelo Nicolet 6700, Waltham, EUA) equipado com um detector DTGS-KBr e software de aquisição Ominic (100 *scans* por espectro, 2 cm⁻¹ de resolução).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seção de Resultados e Discussão desse trabalho foi dividida em três partes: a primeira (Item 5.1) é referente aos ensaios com a cianobactéria *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* em mini-tanques; a segunda (Item 5.2) é referente à fermentação alcoólica, realizada com o objetivo de gerar dióxido de carbono a ser incorporado nos ensaios da primeira parte; e a terceira (Item 5.3) é referente aos testes de adsorção realizados com a biomassa seca de *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* e *Chlorella vulgaris*.

5.1 Cultivo de *Arthrospira platensis* (ensaio 01 a 40)

Foram realizados um total de 61 ensaios, distribuídos da seguinte maneira: ensaios padrão 01 e 02, e ensaios de adaptação 03 a 05 (Item 5.1.1), ensaios preliminares A e B, numerados de 06 a 24 (Item 5.1.2), e ensaios principais A e B, numerados de 25 a 40 (Item 5.1.3). Referente a esses ensaios foram apresentados os principais resultados de consumo de nutrientes, concentração celular, produtividade, conversão de nitrogênio, velocidade de crescimento, e eficiência fotossintética. Posteriormente também são discutidos resultados referentes ao conteúdo de proteínas, lipídeos e clorofila de alguns ensaios selecionados.

5.1.1 Ensaios padrão 01 e 02 e ensaios de adaptação 03 a 05

O ensaio padrão 01 foi realizado com o objetivo de avaliar o crescimento de *Arthrospira platensis* em condições básicas de cultivo (Quadro 09).

Quadro 09 – Condições de cultivo do ensaio padrão 01.

Processo de cultivo	descontínuo
Meio de cultura	Schlösser (Item 4.1.2)
Fonte de nitrogênio	29,4 mM NaNO ₃
Massa total de nitrogênio, N _T	2059 mg
Intensidade luminosa, IL	156 ± 20 μmol fótons m ⁻² s ⁻¹
Concentração do inóculo, X _i	400 ± 20 mg L ⁻¹
pH	protocolo I : 9,2 ± 0,5 (Item 4.1.4.2)

Apesar de não ter alcançado a fase estacionária de crescimento, o ensaio 01 foi interrompido no vigésimo dia de cultivo devido aos baixos valores diários de concentração celular (Gráfico 01). A concentração celular máxima, X_m , e a produtividade celular, P_X , foram de 2318 mg L^{-1} e 96 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$, respectivamente; valores estes considerados muito baixos para cultivos de *A. platensis* em tanques abertos. A velocidade específica de crescimento, μ_X , no primeiro dia de cultivo – correspondente também ao valor máximo, μ_m – foi de 0,26 d^{-1} . A partir do sétimo dia de cultivo, os valores de μ_X já eram menores que 0,10 d^{-1} (Gráfico 01). O fator de conversão de nitrogênio em células, $Y_{X/N}$, que representa a massa de células produzida por massa de nitrogênio fornecida ao sistema, foi de 4,73 mg mg^{-1} .

Gráfico 01. Concentração celular (X , quadrados) e velocidade específica de crescimento (μ_X , pontos) em função do tempo (t) do ensaio padrão 01, realizado com processo descontínuo de cultivo.

Considerando os resultados obtidos no ensaio 01, para a próxima fase deste trabalho optou-se pela utilização simultânea de duas fontes de nitrogênio – um sal de nitrato e um de amônio, com o objetivo de aumentar X_m e diminuir o tempo de cultivo, T_C .

Rodrigues (2008) demonstrou que o uso simultâneo de nitrato de potássio e cloreto de amônio estimula o crescimento de *A. platensis* em tanques abertos, e permite a obtenção de cultivos com altos valores de X_m e P_X . O ensaio 6 deste trabalho destacou-se por apresentar quase que completo consumo da fonte nítrica e o mais baixo custo do grama de nitrogênio –

R\$0,02 por grama de células. Por tais motivos, as condições de cultivo do ensaio 6 do referido trabalho foram tomadas como base para a realização do ensaio padrão 02 (Quadro 10).

Quadro 10 – Condições de cultivo do ensaio padrão 02.

Processo de cultivo	descontínuo alimentado
Meio de cultura	Paoletti I (Item 4.1.2)
Fonte de nitrogênio	5,1 mM KNO ₃ + 15 mM NH ₄ Cl ^a
Massa total de nitrogênio, N _T	1407 mg
Intensidade luminosa, IL	156 ± 20 μmol fótons m ⁻² s ⁻¹
Concentração do inóculo, X _i	50 ± 5 mg L ⁻¹
pH	livre

^a adição diária de quantidades exponencialmente crescente do sal de amônio no decorrer de 17 dias.

Já num primeiro momento é possível notar que a curva de crescimento celular do ensaio 02 (Gráfico 02) apresentou perfil bastante diferente daquela do ensaio 01 (Gráfico 01).

Gráfico 02. Concentração celular (X, quadrados) e velocidade específica de crescimento (μ_X , pontos) em função do tempo (t) do ensaio padrão 02, realizado com processo descontínuo alimentado de cultivo.

Considerando os 5 % de desvio padrão da metodologia de determinação da concentração celular, pode-se afirmar que o valor de X_m do ensaio 02, 2105 mg L⁻¹, é equivalente a aquele obtido no ensaio 01. Apesar do ensaio 01 ter tido a vantagem do controle de pH e de uma massa total de nitrogênio maior, que teoricamente possibilitariam um maior crescimento celular, os efeitos benéficos da utilização de duas fontes de nitrogênio simultaneamente no ensaio 02 prevaleceram. Isso porque o uso de uma fonte amoniacal disponibiliza nitrogênio na sua forma mais facilmente assimilada pelas células, sem envolver gasto energético por parte do microrganismo (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011).

Além disso, o valor de P_X do ensaio 02, 114 mg L⁻¹ d⁻¹, foi quase 20 % maior que aquele do ensaio 01, pois apesar da menor concentração do inóculo, X_i , o ensaio durou dois dias a menos. O valor de μ_m , 0,71 d⁻¹, foi quase três vezes maior que aquele do ensaio 01; uma vez que μ_m é determinado nos primeiros dias de cultivo, essa grande diferença entre os valores encontrados para os ensaios padrão está provavelmente relacionada com a diferença de valores de X_i entre eles. Adicionalmente, a redução progressiva dos valores de μ_X foi mais lenta no ensaio 02 (Gráfico 02) que no ensaio 01 (Gráfico 01). Por fim, no ensaio 02 foi obtido $Y_{X/N}$ de 7,31 mg mg⁻¹, indicando um melhor aproveitamento da fonte de nitrogênio que no ensaio 01.

Com a finalidade de adaptar o ensaio padrão 02 às novas condições laboratoriais de cultivo, ensaios de adaptação 03 a 05 foram realizados com meio de cultura e fontes de nitrogênio diferentes, variando-se a concentração do inóculo e o pH (Quadro 11).

Quadro 11 – Condições de cultivo dos ensaios de adaptação (ensaios 03 a 05) ^a.

Condições \ Ensaios	03	04	05
Meio de cultura ^b	Schlösser I	Schlösser I	Schlösser II
Concentração do inóculo, X_i	50 ± 5 mg L ⁻¹	400 ± 20 mg L ⁻¹	400 ± 20 mg L ⁻¹
pH	livre	livre	protocolo I : 9,2 ± 0,5 (Item 4.1.4.2)

^a processo descontínuo alimentado; fontes de nitrogênio 5,9 mM NaNO₃ + 7,5 mM (NH₄)₂SO₄, este último adicionado diariamente em quantidades exponencialmente crescentes no decorrer de 17 dias; massa total de nitrogênio, N_T , de 1463 mg.

^b (Item 4.1.2).

O ensaio 03 foi realizado sob as mesmas condições que o ensaio 02, porém com o meio de cultura Schlösser, modificado principalmente quanto à concentração da fonte nítrica de nitrogênio (Schlösser I). Assim, da mesma forma que apenas 20 % da massa total de potássio de nitrato do meio de cultura Paoletti foram providos ao ensaio 02 (5,1 mM), a mesma proporção de nitrato de sódio em relação ao meio de cultura Schlösser foi utilizada no ensaio 03 (5,9 mM). Apesar da massa total de nitrogênio, N_T , ser diferente nos dois casos, ensaios adicionais provaram que 5,1 KNO_3 e 5,9 mM $NaNO_3$ resultam em cultivos quase que idênticos no que se diz respeito aos valores de X_m , P_X , μ_m e $Y_{X/N}$. O mesmo foi confirmado para as fontes amoniacaais de nitrogênio, NH_4Cl , utilizado no ensaio 02, e $(NH_4)_2SO_4$, utilizado no ensaio 03.

No ensaio 03 foi obtido um valor de X_m (Tabela 02) 24 % maior que aquele do ensaio 02. Consequentemente, os valores de P_X e $Y_{X/N}$ (Tabela 02) também foram maiores. O maior crescimento celular do ensaio 03 é evidenciado também pelo alto valor de pH, 11,3, registrado no décimo primeiro dia de cultivo; o maior valor registrado no ensaio 02 foi de 10,8.

Tabela 02. Resultados referentes aos ensaios de adaptação, realizados com diferentes concentrações celulares iniciais, com e sem controle de pH (ensaios 03 a 05) ^a.

Ensaios	X_m (mg L ⁻¹)	P_X (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	μ_m (d ⁻¹)	$Y_{X/N}$ (mg mg ⁻¹)
03	2613	135	0,74	8,82
04	2252	97	0,30	6,34
05	2338	108	0,32	6,61

^a concentração celular máxima, X_m ; produtividade celular, P_X ; velocidade específica máxima de crescimento, μ_m ; fator de conversão de nitrogênio em células, $Y_{X/N}$.

Apesar da composição diferenciada dos meios de cultura, a fonte de carbono não foi exaurida em nenhum dos ensaios; as concentrações residuais do íon carbonato registradas nos últimos dias de cultivo variaram por volta de 6,00 g L⁻¹. O íon nitrato foi consumido da mesma maneira nos dois casos: as últimas concentrações registradas foram 0,525 e 0,509 mM no décimo segundo dia de cultivo dos ensaios 02 e 03, respectivamente. As concentrações residuais de amônia foram todas da ordem de 10⁻⁵ mM, registradas a partir do segundo dia de cultivo, em ambos os casos. Assim, conclui-se que a diferença de crescimento celular entre os ensaios só pode ter sido decorrente da diferença de salinidade entre os meios de cultura. Apesar de ambos possuírem composição muito semelhante, o meio Schlösser tem a maior

parte dos sais em menores concentrações que aquelas encontradas no meio Paoletti, e portanto apresenta menor molaridade total. Consequentemente, o meio Schlösser tem menor pressão osmótica, o que significa menor estresse ao microrganismo nele cultivado; as células de *A. platensis* perdem menos água para o meio, mantendo-se íntegras em sua maioria.

O ensaio 04 foi realizado sob as mesmas condições que o ensaio 03, porém com maior valor de X_i . O ensaio 05, por sua vez, foi realizado tal como o ensaio 04, mas com controle do pH através da adição de dióxido de carbono puro. As curvas de crescimento dos ensaios 04 e 05 (Gráfico 03) mostraram que a fase estacionária de crescimento celular foi alcançada precocemente em ambos os casos – por volta do décimo segundo dia de cultivo, provavelmente em decorrência da alta concentração do inóculo. Isso levou aos baixos valores de X_m e P_X (Tabela 02), principalmente. Além disso, considerando os 5 % de desvio padrão da metodologia de determinação da concentração celular, pode-se afirmar que os valores de X_m dos ensaios 04 e 05 são equivalentes. Teoricamente, o ensaio 05 deveria ter levado a obtenção de maiores valores de X_m que o ensaio 04, em decorrência das vantagens do controle de pH na assimilação das fontes de carbono e nitrogênio pelas células (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011; MILLER; COLMAN, 1980).

Gráfico 03. Concentração celular (X) em função do tempo (t) dos ensaios de adaptação 04 (quadrados) e 05 (círculos), realizados sem e com controle de pH, respectivamente.

Os resultados de concentração residual de nitrato dos ensaios 04 e 05 são semelhantes a aqueles dos ensaios anteriores, já mencionados. Enquanto a concentração residual de carbonato decresceu progressivamente de 12,0 a 7,66 g L⁻¹ no ensaio 04, esta variou entre 8,35 e 9,81 g L⁻¹ no ensaio 05 devido à adição diária de CO₂. As concentrações residuais diárias de amônia, todas da ordem de 10⁻⁵ mM, foram registradas a partir do segundo dia de cultivo no ensaio 04 e a partir do oitavo dia no ensaio 05, o que sugere que o controle do pH possibilita uma maior assimilação da fonte amoniacal de nitrogênio. Isso porque a adição diária da fonte amoniacal de nitrogênio foi realizada logo após a redução dos valores de pH, o que garantiu uma alta disponibilidade deste nutriente às células.

Os valores de μ_m obtidos nesses ensaios (Tabela 02) se aproximam mais daquele obtido no ensaio padrão 01, onde X_i foi 400 mg L⁻¹, que daquele do ensaio padrão 02 e ensaio de adaptação 03, iniciados com 50 mg L⁻¹. De fato, a análise estatística de variância “ANOVA 1 fator”, realizada com os dados experimentais dos ensaios 01 a 05, indicou que μ_m varia conforme X_i (R^2 ajustado = 0,9863; $p = 0,000$), e independe dos outros parâmetros.

Por fim, os baixos resultados de X_m e P_X sugerem que as quantidades da fonte amoniacal de nitrogênio adicionadas diariamente não são adequadas ao novo perfil de crescimento celular, estabelecido pelo novo valor de X_i . O fato de que X_m foi igual para os ensaios 04 e 05, dadas as diferentes condições de cultivo e os diferentes resultados de consumo das fontes de carbono e nitrogênio amoniacal, indica que a inadequação da alimentação do sal de amônio mascarou os possíveis efeitos benéficos do controle de pH.

5.1.2 Ensaios preliminares 06 a 24

Foram realizados ensaios com e sem controle de pH, variando o tempo de alimentação da fonte amoniacal de nitrogênio, T_A , no intervalo de 7 a 15 dias (Tabela 03), com o objetivo de melhorar o perfil de crescimento celular de *A. platensis* (ensaios preliminares A).

Os ensaios 06 a 10 foram realizados em meio de cultura Schlösser I (Item 4.2.1), cujo pH inicial foi de cerca de 9,5; durante os cultivos, esses valores aumentaram progressivamente até 10,5-10,7 e se estabilizaram por volta desses mesmos valores. Já os ensaios 11 a 15 foram realizados em meio de cultura Schlösser II (Item 4.2.1), cujo pH inicial foi de 8,7, e tiveram o pH mantido em $9,2 \pm 0,5$. As concentrações residuais de carbonato decresceram até 6,20-7,03 g L⁻¹ nos ensaios sem controle de pH, e se mantiveram na faixa de 9,81-10,9 g L⁻¹ naqueles com controle de pH (Gráfico 04, ensaios 07 e 12 como exemplos).

Tabela 03. Condições de cultivo e principais resultados dos ensaios preliminares A, realizados com diversos tempos de alimentação da fonte amoniacal, T_A , sem e com controle de pH (ensaios 06 a 15) ^a.

Ensaio	Controle de pH	T_A (d)	T_C (d)	X_m (mg L ⁻¹)	P_X (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	μ_m (d ⁻¹)	$Y_{X/N}$ (mg mg ⁻¹)
06	livre	15	16	2597	138	0,38	7,50
07		13	14	2637	160	0,41	7,73
08		11	12	1920	127	0,34	5,22
09		9	11	2011	147	0,32	5,51
10		7	10	1820	142	0,32	4,90
11	protocolo I: 9,2 ± 0,5 (Item 4.1.4.2)	15	16	3000	162	0,37	8,94
12		13	14	2911	180	0,42	8,64
13		11	12	2516	177	0,36	7,21
14		9	11	2287	172	0,35	6,50
15		7	11	2099	155	0,34	5,85

^a tempo de cultivo, T_C ; concentração celular máxima, X_m ; produtividade celular, P_X ; velocidade específica máxima de crescimento, μ_m ; fator de conversão de nitrogênio em células, $Y_{X/N}$.

Gráfico 04. Concentração residual de íons carbonato (CO_3^{2-}) em função do tempo (t) dos ensaios preliminares 07 (triângulos) e 12 (losangos), realizados com tempo de alimentação da fonte amoniacal de 13 dias, sem e com controle de pH, respectivamente.

Em cultivos com duas fontes distintas de nitrogênio – um sal de nitrato e uma fonte amoniacal ou formadora de amônia – a fonte nítrica implica em gasto energético por parte das células e funciona como uma reserva de nutriente, enquanto a fonte amoniacal é preferencialmente consumida (RODRIGUES et al., 2010). As últimas concentrações residuais de nitrato, 0,555-0,630 mM, foram registradas do décimo ao décimo quarto dia de cultivo; o consumo deste íon foi progressivo em todos os casos, e aparentemente não influenciado pelo pH (Gráfico 05, ensaios 07 e 12 como exemplos).

Gráfico 05. Concentração residual de íons nitrato (NO_3^-) em função do tempo (t) dos ensaios preliminares 07 (triângulos) e 12 (losangos), realizados com tempo de alimentação da fonte amoniacal de 13 dias, sem e com controle de pH, respectivamente.

O uso de $T_A = 13$ e 15 dias levou à obtenção dos maiores valores de X_m e $Y_{X/N}$ (Tabela 03) dentre os ensaios realizados tanto sem como com controle de pH, o que sugere que esses valores de T_A adequam a adição diária da fonte de amônia às necessidades de crescimento das células. No entanto, os ensaios 07 e 12 se destacaram por apresentar valores de P_X (Tabela 03) relativamente maiores; com dois dias a menos de cultivo, alcançaram a mesma concentração celular que os ensaios 06 e 11, respectivamente. Adicionalmente, a análise de variância “ANOVA 2 fatores” indicou que os valores de μ_m obtidos nos ensaios 07 e 12 (Tabela 03), onde $T_A = 13$ dias, são maiores e estatisticamente diferentes de todos os outros (Tabela 04).

Esse resultado sugere que, apesar da semelhança de valores de X_m e P_X obtidos nos ensaios realizados com $T_A = 13$ e 15 dias, as condições de alimentação da fonte amoniacal no primeiro caso favoreceram bastante o crescimento celular, especialmente no início do cultivo.

Tabela 04. Resultados obtidos na análise de variância “ANOVA 2 fatores”, realizada com base nos ensaios preliminares A (ensaios 06 a 15): médias dos resultados experimentais, valor p , com nível de significância 0,05, e valor de R^2 ajustado ao modelo ^a.

Variáveis	X_m (mg L ⁻¹)	P_X (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	μ_m (d ⁻¹)	$Y_{X/N}$ (mg mg ⁻¹)
Tempo de alimentação da fonte amoniacal de nitrogênio, T_A (d)				
7	1960 ^A	148 ^A	0,33 ^A	5,3 ^A
9	2149 ^A	159 ^A	0,34 ^A	6,0 ^A
11	2218 ^A	152 ^A	0,35 ^A	6,2 ^A
13	2774 ^B	170 ^A	0,42 ^B	8,1 ^B
15	2799 ^B	150 ^A	0,38 ^A	8,2 ^B
p	0,003	0,332	0,006	0,003
pH				
livre	2197 ^A	143 ^A	0,35 ^A	6,2 ^A
9,2 ± 0,5	2563 ^B	169 ^B	0,37 ^A	7,4 ^B
p	0,004	0,014	0,108	0,004
R^2 ajustado	0,9430	0,6766	0,9032	0,9434

^a para cada variável dependente (concentração celular máxima, X_m ; produtividade celular, P_X ; velocidade específica máxima de crescimento, μ_m ; fator de conversão de nitrogênio em células, $Y_{X/N}$), letras diferentes dentro de uma mesma variável independente (T_A , pH) indicam diferença estatística.

O efeito benéfico do controle do pH no crescimento do microrganismo foi bastante evidente, especialmente nos ensaios onde $T_A \geq 11$ dias. Comparando-se os ensaios 08 e 13, realizados com $T_A = 11$ dias, foi possível obter um aumento de 31 % no valor de X_m através do controle de pH (Tabela 03). De fato, o valor de P_X do ensaio 13 foi o segundo maior de todo o grupo de ensaios, sugerindo que $T_A = 11$ dias pode ser considerado promissor para o cultivo de *A. platensis* se unido ao controle do pH. A influência do pH também pode ser notada na assimilação da fonte amoniacal de nitrogênio. Em todos os ensaios, as concentrações residuais de amônia foram da ordem de 10⁻⁵ mM. Quando $T_A \geq 11$ dias, tais

concentrações foram determinadas a partir do oitavo dia de cultivo nos ensaios realizados sem controle de pH, ensaios 06 a 08, e somente após a última adição do sal de amônio nos ensaios 11 a 13, nos quais o pH foi controlado. Esses resultados comprovam que o controle do pH é de grande importância para a assimilação deste tipo de fonte de nitrogênio.

Nos ensaios realizados com $T_A < 11$ dias, o crescimento celular foi baixo (Tabela 03), indicando que tais curtos tempos são inadequados para a alimentação da fonte amoniacal. Tanto os valores de X_m quanto os de $Y_{X/N}$ foram estatisticamente iguais (Tabela 04), independentemente da condição de controle ou não do pH, confirmando que os efeitos benéficos do controle do pH durante cultivos de *A. platensis* são mascarados quando o tempo de T_A é inadequado, assim como no ensaio de adaptação 05. O consumo de amônia também não foi influenciado pelo controle de pH nesses ensaios; este nutriente foi detectado a partir do oitavo e quarto dia de cultivo nos ensaios realizados com $T_A = 9$ e 7 dias, respectivamente.

Por fim, apesar do controle de pH não ter exercido influência estatística sobre μ_m (Tabela 04), os valores finais de μ_X foram todos menores nos ensaios realizados com controle de pH, indicando que este parâmetro reduziu levemente o decréscimo natural dos valores de velocidade específica de crescimento (Gráfico 06, ensaios 07 e 12 como exemplos).

Gráfico 06. Velocidade específica de crescimento (μ_X) em função do tempo (t) dos ensaios preliminares 07 (linha completa) e 12 (linha pontilhada), realizados com tempo de alimentação da fonte amoniacal de 13 dias, sem e com controle de pH, respectivamente.

Uma vez determinado que $T_A = 11, 13$ e 15 dias permitem a obtenção de altos valores de X_m quando associados ao controle de pH, os referidos tempos de alimentação da fonte amoniacal de nitrogênio foram considerados para o próximo grupo de ensaios. Foram realizados ensaios, em duplicata, com controle de pH em três diferentes valores: $9,0, 9,7$ e $10,4 \pm 0,3$ (Tabela 05), com o objetivo de identificar qual condição experimental levaria à obtenção de altos valores de concentração celular (ensaios preliminares B).

Tabela 05. Condições de cultivo e principais resultados dos ensaios preliminares B, realizados com diferentes tempos de alimentação de sulfato de amônio, T_A , e valores de pH (ensaios 16 a 24) ^a.

Ensaios	Controle de pH ^b	T_A (d)	T_C (d)	X_m (mg L ⁻¹)	P_X (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	μ_m (d ⁻¹)	$Y_{X/N}$ (mg mg ⁻¹)
16a	protocolo II: $9,0 \pm 0,3$	15	16	2910	157	0,40	8,65
16b			16	2830	151	0,43	8,30
17a		13	14	2990	185	0,42	8,85
17b			14	2973	183	0,43	8,81
18a		11	12	2510	176	0,36	7,22
18b			12	2533	178	0,37	7,34
19a	protocolo III: $9,7 \pm 0,3$	15	16	2767	148	0,42	8,10
19b			16	2744	146	0,42	8,00
20a		13	14	2948	182	0,43	8,75
20b			14	2964	183	0,43	8,83
21a		11	12	2342	162	0,35	6,72
21b			12	2353	163	0,34	6,72
22a	protocolo IV: $10,4 \pm 0,3$	15	16	2234	114	0,31	6,32
22b			16	2315	119	0,31	6,52
23a		13	14	2547	153	0,31	7,31
23b			14	2611	158	0,31	7,54
24a		11	12	1998	133	0,31	5,55
24b			12	1996	133	0,32	5,55

^a tempo de cultivo, T_C ; concentração celular máxima, X_m ; produtividade celular, P_X ; velocidade específica máxima de crescimento, μ_m ; fator de conversão de nitrogênio em células, $Y_{X/N}$.

^b (Item 4.1.4.2).

A fim de que os ensaios fossem iniciados em valores de pH dentro dos intervalos selecionados, o meio de cultura Schlösser sofreu modificações quanto a concentração das fontes de carbono; os grupos de ensaios 16 a 18, 19 a 21, e 22 a 24 foram realizados em meio de cultura Schlösser II, I e III (Item 4.2.1), respectivamente. Testes adicionais mostraram que, em ensaios onde o pH é controlado diariamente pela adição de dióxido de carbono, são necessárias cerca de nove horas para que o pH aumente de 8,7 a 9,2; portanto, a adição de CO_2 nos ensaios 16 a 18 foi feita duas vezes ao dia. Para os ensaios 19-21 e 22-24, bastou uma adição a cada dois e cinco dias, respectivamente, para manter o pH do cultivo dentro dos respectivos intervalos selecionados.

Os diferentes protocolos de adição de dióxido de carbono levaram à obtenção de três diferentes curvas de pH (Gráfico 07, ensaios 17a, 20a e 23a como exemplos). As concentrações residuais de carbonato se mantiveram na faixa de $10,1\text{--}11,1 \text{ g L}^{-1}$, e confirmam que a adição de CO_2 durante os cultivos foi eficaz na manutenção de altos valores da fonte de carbono.

Gráfico 07. Valores de pH em função do tempo (t) dos ensaios preliminares 17a (linha completa), 20a (linha pontilhada) e 23a (linha tracejada), realizados com tempo de alimentação da fonte amoniacal de 13 dias e $\text{pH} = 9,0, 9,7 \text{ e } 10,4 \pm 0,3$, respectivamente.

Novamente, os maiores valores de X_m foram obtidos nos ensaios realizados com $T_A = 13$ e 15 dias, em especial quando a adição de dióxido de carbono manteve os valores de pH

abaixo de 10,0 (Tabela 05). Nesses ensaios, as concentrações residuais de amônia foram detectadas apenas após a última alimentação do sulfato de amônio, indicando um bom aproveitamento da fonte de nitrogênio. Já nos ensaios realizados com $T_A = 11$ dias, os resultados de X_m obtidos quando $pH < 10,0$ foram numericamente equivalentes a aqueles dos ensaios realizados com $T_A = 13$ e 15 dias, porém com controle de pH acima de 10,0 (Tabela 05). Os ensaios 08 e 13 (Tabela 03) indicaram que $T_A = 11$ dias associado ao controle do pH poderia ser adequado ao crescimento de *A. platensis* e levar à obtenção de altos valores de concentração celular; no entanto, na atual fase da experimentação verificou-se que os mais altos valores de X_m dos ensaios realizados com $T_A = 11$ dias não superaram aqueles obtidos nas condições menos favoráveis de crescimento nos ensaios onde $T_A = 13$ e 15 dias.

Essas mesmas observações e conclusões servem para os resultados referentes à $Y_{X/N}$ (Tabela 05), indicando portanto que $T_A = 13$ e 15 dias possibilitam uma boa conversão de nitrogênio em células. Apesar dos valores de μ_m dos ensaios realizados com $T_A = 13$ e 15 dias, sob condições favoráveis de controle de pH, terem sido equivalentes, os valores de P_X foram maximizados principalmente quando $T_A = 13$ dias (Tabela 05). Levando em consideração todos esses resultados de uma maneira geral, $T_A = 13$ dias foi definitivamente elegido como a melhor condição de disponibilização da fonte amoniacal de nitrogênio para os cultivos de *A. platensis*, dadas as condições experimentais estabelecidas.

Os resultados de X_m obtidos nos ensaios 16 a 18, nos quais CO_2 foi adicionado duas vezes ao dia e os valores de pH foram mantidos no intervalo 8,7 a 9,3 (Tabela 05), apesar de similares a aqueles obtidos nos ensaios 11 a 13, respectivamente, realizados com apenas uma adição de CO_2 e que tiveram variações de pH no intervalo 8,7 a 9,7 (Tabela 03), foram considerados estatisticamente diferentes (Tabela 06). Considerando os 5 % de desvio padrão da metodologia de determinação da concentração celular, os valores de X_m dos ensaios 16 a 18 também podem ser considerados muito próximos daqueles obtidos nos ensaios 19 a 21, nos quais CO_2 foi adicionado uma vez a cada dois dias e os valores de pH foram mantidos no intervalo 9,4 a 10,0 (Tabela 05). No caso de $T_A = 13$ dias, os resultados de X_m obtidos nos ensaios 12 ($pH = 9,2 \pm 0,5$), 17 ($pH = 9,0 \pm 0,3$) e 20 ($pH = 9,7 \pm 0,3$) foram idênticos (Tabelas 03 e 05), assim como os perfis de crescimento celular. Esses resultados sugerem que o controle de pH em valores menores que 10,0 foi favorável ao crescimento celular, e pouca diferença pode ser observada nos resultados de X_m em decorrência das diferentes faixas de pH aqui estudadas.

Tabela 06. Resultados obtidos na análise de variância “ANOVA 2 fatores”, realizada com base nos ensaios preliminares B (ensaios 16 a 24): médias dos resultados experimentais, valor p , com nível de significância 0,05, e valor de R^2 ajustado ao modelo ^a.

Variáveis	X_m (mg L ⁻¹)	P_X (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	μ_m (d ⁻¹)	$Y_{X/N}$ (mg mg ⁻¹)
Tempo de alimentação da fonte amoniacal de nitrogênio, T_A (d)				
11	2289 ^A	158 ^A	0,34 ^A	6,52 ^A
13	2839 ^B	174 ^B	0,39 ^B	8,33 ^B
15	2633 ^C	139 ^C	0,38 ^B	7,64 ^C
p	0,000	0,000	0,000	0,000
pH				
9,0 ± 0,3	2791 ^A	172 ^A	0,40 ^A	8,21 ^A
9,7 ± 0,3	2686 ^B	164 ^B	0,40 ^A	7,85 ^B
10,4 ± 0,3	2284 ^C	135 ^C	0,31 ^B	6,44 ^C
p	0,000	0,000	0,000	0,000
R_2 ajustado	0,9903	0,9887	0,9725	0,9906

^a para cada variável dependente (concentração celular máxima, X_m ; produtividade celular, P_X ; velocidade específica máxima de crescimento, μ_m ; fator de conversão de nitrogênio em células, $Y_{X/N}$), letras diferentes dentro de uma mesma variável independente (T_A , pH) indicam diferença estatística.

Já o controle do pH em valores acima de 10,0 levou à obtenção dos menores resultados no que se diz respeito principalmente a X_m , P_X e μ_m (Tabela 05). Altos valores de pH levam à diminuição da disponibilidade de carbono assimilável – o bicarbonato – no meio de cultivo, e ao aumento da perda de amônia por evaporação (MARKOU; GEORGAKAKIS, 2011). Por tal motivo, os ensaios 22, onde pH > 10,0, por exemplo, apresentaram um valor de X_m médio cerca de 21 e 17 % menor que os obtidos nos ensaios 16 e 19, respectivamente, onde pH < 10,0. A inadequação dessa faixa de pH foi confirmada pelos valores de μ_m – os menores até agora obtidos, e estatisticamente bem diferentes dos outros (Tabela 06).

Os resultados em geral desse grupo de ensaios levou à conclusão de que T_A = 13 dias permite a obtenção de altos valores de X_m e P_X , enquanto o controle de pH na faixa 9,0 ± 0,3 favorece o crescimento celular e a incorporação de nutrientes, e provavelmente reduz as chances de contaminação dos cultivos.

5.1.3 Ensaios principais 25 a 40

A realização dos ensaios 01 a 24 permitiu a otimização prévia de vários parâmetros relacionados com o cultivo de *A. platensis* no dispositivo de cultura selecionado para este trabalho (Quadro 12).

Quadro 12 – Condições otimizadas do cultivo de *A. platensis* em mini-tanques.

Processo de cultivo	descontínuo alimentado
Meio de cultura	Schlösser II (Item 4.1.2)
Fontes de nitrogênio	5,9 mM NaNO ₃ + 7,5 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
Tempo de alimentação do (NH ₄) ₂ SO ₄ , T _A	13 dias
Massa total de nitrogênio, N _T	1463 mg
Concentração do inóculo, X _i	400 ± 20 mg L ⁻¹
pH	protocolo II: 9,0 ± 0,3 (Item 4.1.4.2)

Tendo em vista a importância da luz no crescimento de *A. platensis*, optou-se por avaliar o efeito da intensidade luminosa, IL. Inicialmente, foram realizados ensaios com quatro diferentes valores de IL (Tabela 07), a fim de avaliar o efeito deste parâmetro no comportamento cinético deste microrganismo, principalmente.

Tabela 07. Condições de cultivo e principais resultados dos ensaios principais A, realizados com diferentes valores de intensidade luminosa, IL (ensaios 25 a 28) ^a.

Ensaios	IL ($\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	X _m (mg L ⁻¹)	P _X (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	μ_m (d ⁻¹)	Y _{X/N} (mg mg ⁻¹)	EF _m (%)
25	156	2964	182	0,41	8,73	8,75
26	192	2945	181	0,41	8,87	7,10
27	228	3004	185	0,42	8,66	6,22
28	252	3322	208	0,41	10,0	5,55

^a concentração celular máxima, X_m; produtividade celular, P_X; velocidade específica máxima de crescimento, μ_m ; fator de conversão de nitrogênio em células, Y_{X/N}; eficiência fotossintética máxima, EF_m.

Trabalhos anteriores demonstraram que IL = 156 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ é adequada para o cultivo de *A. platensis* em tanques abertos (BEZERRA et al., 2008; RODRIGUES et al.,

2010), pois permite a obtenção de altos valores de X_m e P_X . Tal valor de IL foi provido ao ensaio 25, que confirma os resultados obtidos nos ensaios 17, e apresentou resultados condizentes (Tabelas 05 e 07).

O aumento de IL de 156 para 192 ou 228 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, nos ensaios 26 e 27, respectivamente, n\u00e3o proporcionou um aumento no crescimento celular; este s\u00f3 pode ser observado no ensaio 28, realizados com $IL = 252 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, no qual $X_m = 3322 \text{ mg L}^{-1}$ (Tabela 07). No entanto, as curvas de crescimento dos ensaios 25 e 28 (Gr\u00e1fico 08) foram bastante similares, principalmente at\u00e9 o d\u00e9cimo primeiro dia de cultivo, o que poderia significar que o excesso de energia provido por $IL = 252 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi provavelmente dissipado como calor at\u00e9 tal dia. Do d\u00e9cimo segundo dia de cultivo em diante, provavelmente em decorr\u00eancia da alta densidade celular, tal excesso de luz foi absorvido e a energia foi utilizada na forma\u00e7\u00e3o de novas c\u00e9lulas.

Gr\u00e1fico 08. Concentra\u00e7\u00e3o celular (X) em fun\u00e7\u00e3o do tempo (t) dos ensaios principais 25 (quadrados) e 28 (c\u00edrculos), realizados com intensidades luminosas de 156 e 252 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente.

Por outro lado, as curvas da velocidade espec\u00edfica de crescimento desses ensaios diferenciaram-se a partir do oitavo dia de cultivo (Gr\u00e1fico 09), confirmando que $IL = 252 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi ben\u00e9fico ao crescimento celular principalmente no final do cultivo.

Gráfico 09. Velocidade específica de crescimento (μ_x) em função do tempo (t) dos ensaios principais 25 (linha completa) e 28 (linha pontilhada), realizados com intensidades luminosas de 156 e 252 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente.

A eficiência fotossint\u00e9tica, EF, \u00e9 a fra\u00e7\u00e3o de energia luminosa convertida em energia qu\u00edmica durante a fotoss\u00edntese. Quando IL \u00e9 mantido constante durante todo o cultivo, EF tende a decrescer devido ao aumento do efeito sombra, causado pelo crescente aumento da densidade celular (BECKER, 1981; QIANG; ZARMI; RICHMOND, 1998; RICHMOND, 1988). Assim, o maior valor de EF \u00e9 geralmente obtido no in\u00edcio dos cultivos, quando a concentra\u00e7\u00e3o celular \u00e9 menor. Altos valores de IL n\u00e3o significam necessariamente altos valores de EF, por causa do mecanismo de regula\u00e7\u00e3o da absor\u00e7\u00e3o de luz das c\u00e9lulas. De fato, os valores m\u00e1ximos de efici\u00eancia fotossint\u00e9tica, EF_m , obtidos nos ensaios 25 a 28 indicam que quanto menor o valor de IL, maior a efici\u00eancia das c\u00e9lulas na convers\u00e3o de energia (Tabela 07). Esses resultados sugerem que altos valores de IL poderiam ser vantajosos quando a concentra\u00e7\u00e3o celular \u00e9 alta, compensando a perda da efici\u00eancia fotossint\u00e9tica pelo aumento do fornecimento de luz ao sistema, com conseq\u00fcente aumento da concentra\u00e7\u00e3o final da biomassa.

Os resultados dos ensaios 25 a 28 considerados no todo sugerem que, apesar de $IL = 156 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ser adequado ao crescimento de *A. platensis*, dadas as condi\u00e7\u00f5es de experimenta\u00e7\u00e3o fixadas, um aumento deste pode levar a um respectivo aumento em X_m . Dado que superiores valores de IL n\u00e3o influenciaram o crescimento celular no come\u00e7o dos cultivos, $IL = 156 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi fixado como intensidade luminosa inicial, IL_1 , para a

próxima parte do trabalho. Os parâmetros $IL = 192$ e $252 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foram selecionados como valores de intensidade luminosa secund\u00e1ria, IL_2 . Finalmente, o oitavo e o d\u00e9cimo primeiro dia de cultivo, devido a aparente import\u00e2ncia nos dados de concentra\u00e7\u00e3o celular e velocidade espec\u00edfica de crescimento, tamb\u00e9m foram levados em considera\u00e7\u00e3o para a realiza\u00e7\u00e3o do pr\u00f3ximo grupo de ensaios.

Foram realizados ent\u00e3o ensaios com di\u00f3xido de carbono proveniente de cilindros (Tabela 08) e da fermenta\u00e7\u00e3o alco\u00f3lica (Tabela 09), divididos cada um em duas fases, conforme a intensidade luminosa aplicada: a primeira desenvolvida com $IL_1 = 156 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e a segunda desenvolvida com $IL_2 = 192$ ou $252 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$; a mudan\u00e7a de intensidade luminosa foi feita nos instantes $t^* = 5^\circ, 8^\circ$ ou 11° dia.

Tabela 08. Condi\u00e7\u00f5es de cultivo e principais resultados dos ensaios principais B, realizados com troca de intensidade luminosa (de 156 para 192 ou 252 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e di\u00f3xido de carbono proveniente de cilindros (ensaios 29 a 34) ^a.

Ensaio	IL_2 ($\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	t^* (d)	X_m (mg L^{-1})	P_X ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$)	μ_{m2} (d^{-1})	$Y_{X/N}$ (mg mg^{-1})	EF_{m2} (%)
29a	192	5 $^\circ$	3541	225	0,16	12,1	7,2
29b			3313	209	0,17	11,3	7,7
30a		8 $^\circ$	3898	251	0,08	13,3	6,4
30b			3954	253	0,09	13,5	7,1
31a		11 $^\circ$	2817	172	0,06	9,63	5,8
31b			2952	182	0,08	10,1	5,7
32a	252	5 $^\circ$	2934	-	-	-	-
32b			2589	-	-	-	-
33a		8 $^\circ$	3699	235	0,06	12,6	4,1
33b			3633	231	0,07	12,4	4,4
34a		11 $^\circ$	2906	180	0,06	9,93	2,8
34b			2894	179	0,08	9,89	1,8

^a intensidade luminosa da segunda fase, IL_2 ; tempo do cultivo no qual ocorre a troca de intensidade luminosa, t^* ; concentra\u00e7\u00e3o celular m\u00e1xima, X_m ; produtividade celular, P_X ; velocidade espec\u00edfica m\u00e1xima de crescimento da segunda fase, μ_{m2} ; fator de convers\u00e3o de nitrog\u00eanio em c\u00e9lulas, $Y_{X/N}$; efici\u00eancia fotossint\u00e9tica m\u00e1xima da segunda fase, EF_{m2} .

-- indica que os dados n\u00e3o foram calculados.

Uma vez que o valor de IL foi o mesmo para todos os ensaios durante a primeira fase de cada um ($IL_1 = 156 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e tal valor foi mantido constante durante os primeiros determinantes dias de cultivo, todos os ensaios apresentaram concentra\u00e7\u00e3o celular semelhante durante tal fase, e a velocidade espec\u00edfica m\u00e1xima de crescimento desta, μ_{m1} , foi de $0,41 \pm 0,02 \text{ d}^{-1}$. O mesmo \u00e9 v\u00e1lido para a efici\u00eancia fotossint\u00e9tica; o valor m\u00e1ximo deste par\u00e2metro antes da aplica\u00e7\u00e3o do valor de IL_2 , referente \u00e0 primeira parte dos cultivos, EF_{m1} , foi de $9,6 \pm 0,9 \%$.

Tabela 09. Condi\u00e7\u00f5es de cultivo e principais resultados dos ensaios principais B, realizados com troca de intensidade luminosa (de 156 para 192 ou 252 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e di\u00f3xido de carbono proveniente da fermenta\u00e7\u00e3o alco\u00f3lica (ensaios 35 a 40) ^a.

Ensaio	IL_2 ($\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	t^* (d)	X_m (mg L^{-1})	P_X ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$)	μ_{m2} (d^{-1})	$Y_{X/N}$ (mg mg^{-1})	EF_{m2} (%)
35a	192	5\u00b0	2783	170	0,08	9,51	3,8
35b			2707	164	0,09	9,25	3,7
36a		8\u00b0	3298	206	0,10	11,3	6,5
36b			3157	197	0,08	10,8	4,6
37a		11\u00b0	3207	200	0,05	11,0	4,8
37b			3352	211	0,04	11,4	6,6
38a	252	5\u00b0	2046	-	-	-	-
38b			2177	-	-	-	-
39a		8\u00b0	3342	209	0,10	11,4	4,7
39b			3293	207	0,08	11,2	3,7
40a		11\u00b0	3293	206	0,07	11,2	4,1
40b			3283	206	0,08	11,2	4,1

^a intensidade luminosa da segunda fase, IL_2 ; tempo do cultivo no qual ocorre a troca de intensidade luminosa, t^* ; concentra\u00e7\u00e3o celular m\u00e1xima, X_m ; produtividade celular, P_X ; velocidade espec\u00edfica m\u00e1xima de crescimento da segunda fase, μ_{m2} ; fator de convers\u00e3o de nitrog\u00eanio em c\u00e9lulas, $Y_{X/N}$; efici\u00eancia fotossint\u00e9tica m\u00e1xima da segunda fase, EF_{m2} .

“-“ indica que os dados n\u00e3o foram calculados.

Analisando-se num primeiro momento apenas os ensaios realizados com adição de dióxido de carbono proveniente de cilindros (Tabela 08), foi possível avaliar a influência da intensidade luminosa no crescimento celular de *A. platensis*, dadas as condições fixas de cultivo.

O aumento da intensidade luminosa no quinto dia de cultivo levou a duas diferentes respostas celulares. Os valores de X_m e P_X obtidos nos ensaios 29 (Tabela 08), realizados com $IL_2 = 192 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, foram superiores a aqueles dos ensaios 25 e 26, realizados inteiramente com $IL = 156$ e $192 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente, o que indica que o aumento em IL em tal instante do cultivo afetou de maneira positiva o crescimento celular. O ensaio 29b, por exemplo, apresentou curva de crescimento sem praticamente fase de adaptação após a mudança de IL (Gráfico 10); o aumento do valor de concentração celular foi de cerca de 450 mg L^{-1} do quinto para o sexto dia de cultivo. Adicionalmente, a curva de velocidade específica de crescimento deste ensaio mostrou que a aplicação do valor de IL_2 levou a um aumento significativo de μ_X (Gráfico 10), de $0,10$ para $0,17 \text{ d}^{-1}$ (Tabela 08) do quinto para o sexto dia de cultivo.

Gráfico 10. Concentração celular (X , quadrados) e velocidade específica de crescimento (μ_X , círculos) em função do tempo (t) do ensaio principal 29b, antes (símbolos cheios) e depois (símbolos vazios) da aplicação da intensidade luminosa $192 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no 5º dia de cultivo; ensaio realizado com dióxido de carbono proveniente de cilindros.

Os valores de X_m e, consequentemente de P_X , obtidos nos ensaios 29 não foram superiores a aqueles obtidos nos ensaios 30 (Tabela 08), realizados com o mesmo valor de IL_2 , porém aplicado no oitavo dia de cultivo. Esses resultados indicam que o quinto dia de cultivo é, provavelmente, um instante muito prematuro para aumento da intensidade luminosa. Pode ter ocorrido fotoinibição, o que, consequentemente, levou ao posterior atraso no crescimento celular, levando a valores de X_m inferiores a aqueles obtidos quando do aumento de IL no oitavo dia de cultivo (Tabela 08).

Nos ensaios 32, a aplicação de $IL_2 = 252 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no quinto dia de cultivo provocou a interrupção do crescimento celular exponencial (Gráfico 11), provavelmente devido a uma fotoinibição mais severa. As concentrações residuais de amônia após o quinto dia de cultivo foram altas (1 a 10 mM), confirmando a inadequação de um aumento em IL tão cedo no cultivo, principalmente a aplicação de tal valor de IL_2 . As células nos ensaios 32 apresentaram coloração amarela, porém a alimentação da fonte amoniacal de nitrogênio foi continuada; ao final dos cultivos, visto que o crescimento não havia se recuperado, as células foram descartadas.

Gráfico 11. Concentração celular (X) em função do tempo (t) dos ensaios principais 32a (quadrados) e 32b (círculos), antes (símbolos cheios) e depois (símbolos vazios) da aplicação da intensidade luminosa $252 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no 5º dia de cultivo; ensaios realizados com dióxido de carbono proveniente de cilindros.

A utilização de $IL_2 = 192$ ou $252 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no oitavo dia de cultivo nos ensaios 30 e 33, respectivamente, proporcionou a obten\u00e7\u00e3o de altos valores de X_m e P_X (Tabela 08). Os maiores valores de concentra\u00e7\u00e3o celular m\u00e1xima m\u00e9dios foram obtidos nos ensaios 30 ($X_m = 3926 \pm 40 \text{ mg L}^{-1}$) e 33 ($X_m = 3666 \pm 47 \text{ mg L}^{-1}$). Nos ensaios 30, realizados com $IL_2 = 192 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por exemplo, foram obtidos quase um grama de c\u00e9lulas por litro de cultura a mais que nos ensaios 25 e 26, realizados respectivamente com $IL = 156$ e $192 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por\u00e9m mantidos constantes durante o decorrer dos ensaios. Esses resultados indicam claramente que a associa\u00e7\u00e3o dos dois valores de $IL - IL_1$ e IL_2 , sendo o segundo maior que o primeiro, proporciona a obten\u00e7\u00e3o de resultados superiores a aqueles obtidos com a utiliza\u00e7\u00e3o de ambos separadamente. Os resultados da an\u00e1lise estat\u00edstica indicaram que X_m , assim como os valores de P_X e $Y_{X/N}$, principalmente, foram influenciados pelo valor da intensidade luminosa da segunda fase, assim como pelo instante do cultivo no qual ocorre a troca deste par\u00e2metro (Tabela 10).

Tabela 10. Resultados obtidos na an\u00e1lise de vari\u00e2ncia “ANOVA 2 fatores”, realizada com base nos ensaios principais 30, 31, 33 e 34: m\u00e9dias dos resultados experimentais, valor p , com n\u00edvel de signific\u00e2ncia 0,05, e valor de R^2 ajustado ao modelo ^a.

Vari\u00e1veis	X_m (mg L^{-1})	P_X ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$)	$Y_{X/N}$ (mg mg^{-1})	EF_{m2} (%)
Intensidade luminosa da segunda fase, IL_2 ($\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)				
192	3405 ^A	214 ^A	11,6 ^A	6,25 ^A
252	3283 ^B	206 ^B	11,2 ^B	3,27 ^B
p	0,038	0,040	0,036	0,001
Instante do cultivo no qual ocorre a troca de intensidade luminosa, t^*				
8 ^o	3796 ^A	242 ^A	12,9 ^A	5,50 ^A
11 ^o	2892 ^B	178 ^B	9,89 ^B	4,02 ^B
p	0,000	0,000	0,000	0,009
R_2 ajustado	0,9868	0,9878	0,9866	0,9403

^a para cada vari\u00e1vel dependente (concentra\u00e7\u00e3o celular m\u00e1xima, X_m ; produtividade celular, P_X ; fator de convers\u00e3o de nitrog\u00eanio em c\u00e9lulas, $Y_{X/N}$; efici\u00eancia fotossint\u00e9tica m\u00e1xima da segunda fase, EF_{m2}), letras diferentes dentro de uma mesma vari\u00e1vel independente (IL_2 , t^*) indicam diferen\u00e7a estat\u00edstica.

As curvas de crescimento dos ensaios 30 e 33 (Gráfico 12, ensaios 30a e 33a como exemplos), mostraram um menor crescimento celular após a aplicação de IL_2 , no oitavo dia de cultivo, quando comparadas a aquelas dos ensaios com $t^* = 5^\circ$ dia (Gráfico 10), provavelmente porque o efeito da intensidade luminosa foi menos pronunciado com o aumento da concentração celular no reator. Isso explica porque o aumento da intensidade luminosa nesses ensaios não levou à grande diferença de valores de μ_X , como aquela observada para os ensaios 29 (Gráfico 10), nos quais IL_2 foi aplicado no quinto dia de cultivo. Por outro lado, a proteção das células às mais altas intensidades luminosas aplicadas na segunda fase do cultivo decorrente do efeito sombra faz com que mesmo após o nono ou décimo dia de cultivo as células não apresentem sinal de diminuição da velocidade de crescimento, evidenciada pela diminuição da inclinação da curva de crescimento; no caso dos ensaios 29, nos quais a aplicação de IL_2 ocorreu no quinto dia de cultivo, esse decréscimo nos valores de concentração celular é evidente (Gráfico 10). Assim, foi possível a obtenção dos maiores valores de X_m quando $t^* = 8^\circ$ dia.

Gráfico 12. Concentração celular (X) em função do tempo (t) dos ensaios principais 30a (quadrados) e 33b (círculos), antes (símbolos cheios) e depois (símbolos vazios) da aplicação das intensidades luminosas 192 e $252 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente, no 8° dia de cultivo; ensaios realizados com di\u00f3xido de carbono proveniente de cilindros.

O atraso no aumento da intensidade luminosa ($t^* > 8^\circ$ dia) levou à redução do crescimento celular, provavelmente em decorrência do período adicional de três dias no qual os cultivos foram limitados pela baixa intensidade luminosa. Assim, a utilização de $IL_2 = 192$ e $252 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no d\u00e9cimo primeiro dia de cultivo, aplicados nos ensaios 31 e 34 (Tabela 08), respectivamente, levou \u00e0 obten\u00e7\u00e3o de valores de X_m e P_X inferiores a aqueles obtidos nos ensaios 30 e 33 ($t^* = 8^\circ$ dia) e similares a aqueles do ensaio 25 ($IL = 156 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). As curvas de crescimento celular desses ensaios (dados n\u00e3o mostrados) s\u00e3o id\u00eanticas a aquelas dos ensaios 25 e 28 (Gr\u00e1fico 08), o que confirma que o aumento de IL ocorreu muito tarde no cultivo para que uma resposta no crescimento celular fosse obtida. A an\u00e1lise estat\u00edstica (Tabela 10) mostrou que todos os resultados (X_m , P_X , $Y_{X/N}$, EF_{m2}) foram influenciados de maneira significativa pelo instante de aumento da intensidade luminosa, e levou \u00e0 conclus\u00e3o de que $t^* = 11^\circ$ dia \u00e9 desvantajoso em rela\u00e7\u00e3o a $t^* = 8^\circ$ dia.

Analizando-se somente os ensaios realizados com adi\u00e7\u00e3o de di\u00f3xido de carbono proveniente da fermenta\u00e7\u00e3o alco\u00f3lica (Tabela 09), foi poss\u00edvel avaliar a influ\u00eancia a fonte de carbono. De acordo com a an\u00e1lise estat\u00edstica de vari\u00e2ncia “ANOVA 2 fatores”, realizada com os dados dos ensaios 36, 37, 39, 40 ($IL_2 = 192$ e $252 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $t^* = 8^\circ$ e 11° dias), os valores de X_m , P_X , $Y_{X/N}$ e EF_{m2} n\u00e3o foram influenciados pelas vari\u00e1veis IL_2 e t^* (R^2 ajustado = 0,5276-0,9357; $p = 0,103$ -0,973). Considerando que todos os cultivos foram realizados em mini-tanques, cuja superf\u00edcie exposta ao meio ambiente \u00e9 ampla, sup\u00f5e-se que nenhum dos ensaios foi de caracter\u00edstica ax\u00eanica. Em decorr\u00eancia da alta evapora\u00e7\u00e3o de gases, o requerimento de di\u00f3xido de carbono dos ensaios foi bastante alto; os ensaios realizados com di\u00f3xido de carbono proveniente da fermenta\u00e7\u00e3o alco\u00f3lica receberam tal g\u00e1s durante 8 a 10 horas continuamente (Item 4.1.4.2). \u00c9 poss\u00edvel que isso tenha levado \u00e0 transfer\u00eancia de subst\u00e2ncias org\u00e2nicas da fermenta\u00e7\u00e3o alco\u00f3lica aos tanques de cultivo de *A. platensis* (BEZERRA, 2011), as quais podem ter interferido no crescimento da cianobact\u00e9ria.

Comparando-se os resultados obtidos nos ensaios realizados com di\u00f3xido de carbono proveniente da fermenta\u00e7\u00e3o alco\u00f3lica (Tabela 09) com aqueles dos ensaios realizados com di\u00f3xido de carbono proveniente de cilindros (Tabela 08), foi poss\u00edvel avaliar a intera\u00e7\u00e3o entre a intensidade luminosa e a fonte de carbono. Os resultados do segundo grupo de ensaios n\u00e3o corresponderam a aqueles do primeiro. O carbono org\u00e2nico da fermenta\u00e7\u00e3o alco\u00f3lica, supostamente carregado pelo g\u00e1s carb\u00f4nico efluente at\u00e9 os mini-tanques de *A. platensis*, pode ter atuado como uma fonte de carbono a mais, o que pode ter sido respons\u00e1vel pela diferen\u00e7a dos valores principalmente de X_m entre esses ensaios e aqueles desenvolvidos com di\u00f3xido de carbono proveniente de cilindros. Esses cultivos s\u00e3o de caracter\u00edstica mixotr\u00f3fica, pois duas

importantes fontes de energia estão presentes: o carbono orgânico e a luz. Geralmente, essa combinação de fontes leva ao desenvolvimento de cultivos com células de alta velocidade de crescimento e com produtividades até três vezes maiores que aquelas obtidas em condições autotróficas (CHEN; ZHANG, 1997; CIFERRI; TIBONI, 1985).

Em um cultivo majoritariamente fotoautotrófico, quando a energia luminosa torna-se limitante para o crescimento celular, a fonte de carbono orgânica influencia de maneira mais acentuada os resultados de X_m e P_X , por exemplo (MARQUEZ et al., 1995). É com base nessa afirmação que se explica porque nos ensaios 37 e 40, realizados com dióxido de carbono proveniente da fermentação alcoólica, foram obtidos valores de X_m e P_X cerca de 14 % maiores que aqueles dos ensaios 31 e 34, realizados com dióxido de carbono proveniente de cilindros. Em ambos os casos, a aplicação de IL_2 no valor de 192 ou 252 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi feita no décimo primeiro dia de cultivo, caracterizando tais ensaios como limitados por energia luminosa. A presença de carbono orgânico nos ensaios 37 e 40 foi provavelmente a responsável pelo melhor crescimento celular (Gráfico 13, ensaios 31b e 37b como exemplos).

Gráfico 13. Concentração celular (X) em função do tempo (t) dos ensaios principais 31b (quadrados) e 37b (círculos), antes (símbolos cheios) e depois (símbolos vazios) da aplicação da intensidade luminosa 192 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no 11º dia de cultivo; ensaios realizados com dióxido de carbono proveniente de cilindros e da fermentação alcoólica, respectivamente.

A utilização de $IL_2 = 192$ ou $252 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no oitavo dia de cultivo nos ensaios 36 e 39, respectivamente, proporcionou a obten\u00e7\u00e3o de valores de X_m e P_X equivalentes a aqueles obtidos nos ensaios 37 e 40, realizados com $t^* = 11^\circ$ dia (Tabela 09), como j\u00e1 evidenciado pela an\u00e1lise de vari\u00e2ncia. Isso pode ter ocorrido pelo fato da car\u00eancia de luz correspondente aos ensaios em que se retardou o aumento de intensidade luminosa (ensaios 37 e 40) ter sido compensada pela adi\u00e7\u00e3o de carbono org\u00e2nico. Em outras palavras, o carbono org\u00e2nico apenas teria sua import\u00e2ncia destacada quando da limita\u00e7\u00e3o por luz (MARQUEZ et al., 1995). Adicionalmente, os valores de X_m e P_X referentes aos ensaios 36 e 39 s\u00e3o inferiores a aqueles obtidos nos respectivos ensaios 30 e 33, realizados com di\u00f3xido de carbono proveniente de cilindros (Tabela 08), provavelmente em decorr\u00eancia da transfer\u00eancia de subst\u00e2ncias da fermenta\u00e7\u00e3o alco\u00f3lica para os cultivos de *A. platensis*, que podem ter comprometido o crescimento celular da cianobact\u00e9ria, direta ou indiretamente.

Nos ensaios 38, a aplica\u00e7\u00e3o de $IL_2 = 252 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no quinto dia de cultivo provocou a interrup\u00e7\u00e3o do crescimento celular exponencial devido a fotoxida\u00e7\u00e3o, assim como nos respectivos ensaios realizados por\u00e9m com di\u00f3xido de carbono proveniente de cilindros, e as curvas de crescimento celular dos ensaios 38 s\u00e3o similares a aquelas dos ensaios 32 (Gr\u00e1fico 11). Novamente, as c\u00e9lulas apresentaram colora\u00e7\u00e3o amarela e foram descartadas ap\u00f3s o t\u00e9rmino da alimenta\u00e7\u00e3o da fonte amoniacal de nitrog\u00eanio.

Os valores de X_m e P_X obtidos nos ensaios 35, realizados com $IL_2 = 192 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aplicado no quinto dia de cultivo (Tabela 09), foram os menores do grupo de ensaios realizados com di\u00f3xido de carbono proveniente da fermenta\u00e7\u00e3o alco\u00f3lica. Tais resultados s\u00e3o compar\u00e1veis a aqueles dos ensaios 31 e 34, nos quais a aplica\u00e7\u00e3o de $IL_2 = 192$ e $252 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ocorreu no d\u00e9cimo primeiro dia de cultivo (Tabela 08), e do ensaio 25, realizados inteiramente com $IL = 156 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Tabela 07). Esses resultados confirmam que $t^* = 5^\circ$ dia \u00e9 um instante muito prematuro para aumento da intensidade luminosa. Al\u00e9m disso, o fato de que os resultados de X_m e P_X obtidos nos ensaios 35 s\u00e3o menores que aqueles obtidos nos respectivos ensaios 29, realizados com di\u00f3xido de carbono proveniente de cilindros (Tabela 08), sugere novamente que o g\u00e1s carb\u00f4nico efluente utilizado, devido a suas impurezas org\u00e2nicas ou condi\u00e7\u00f5es n\u00e3o ax\u00eanicas de cultivo do microrganismo em quest\u00e3o, pode ter comprometido o crescimento celular de *A. platensis*. Por fim, diferentemente dos ensaios 29, o aumento da intensidade luminosa nos ensaios 35 n\u00e3o provocou um aumento significativo nos valores de μ_{m2} e EF_{m2} (Tabela 09). \u00c9 poss\u00edvel notar que as curvas de crescimento celular e de velocidade espec\u00edfica de crescimento do ensaio 35a (Gr\u00e1fico 14), por exemplo, n\u00e3o apresentaram o mesmo perfil que aquelas do ensaio 29b

(Gráfico 10). Esses resultados sugerem mais um vez que a resposta de *A. platensis* às condições de iluminação providas foi a mesma, porém a proveniência do dióxido de carbono interferiu nos resultados finais.

Gráfico 14. Concentração celular (X, quadrados) e velocidade específica de crescimento (μ_X , círculos) em função do tempo (t) do ensaio principal 35a, antes (símbolos cheios) e depois (símbolos vazios) da aplicação da intensidade luminosa $192 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no 5º dia de cultivo; ensaio realizado com dióxido de carbono proveniente da fermentação alcoólica.

Considerando que a concentração celular inicial e a massa total de nitrogênio provida aos cultivos foram as mesmas para todos os ensaios, quanto maior o valor de X_m , maior o valor de $Y_{X/N}$. Portanto, os ensaios 30 e 35 apresentaram respectivamente o maior e o menor valor de $Y_{X/N}$ desse grupo de ensaios (Tabelas 08 e 09).

Em relação à eficiência fotossintética, os valores de EF diários decresceram até o momento do aumento de IL. Embora seja esperado que o aumento da intensidade luminosa leve a uma diminuição da eficiência fotossintética (Tabela 07), esse fato não ocorreu quando do aumento dos valores de IL durante os cultivos. Isso se deve provavelmente ao fato do aumento de intensidade luminosa ter ocorrido em tempos em que o sombreamento estava levando à diminuição da velocidade de crescimento; o aumento da intensidade luminosa compensou o efeito sombra e, como consequência, essa energia adicional foi convertida em biomassa. Como esperado, os valores de EF_{m2} foram estatisticamente maiores nos ensaios

onde $IL_2 = 192 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Tabela 10), em especial quando o di\u00f3xido de carbono proveniente de cilindros foi utilizado. Os ensaios 29, nos quais tal valor de IL_2 foi aplicado no quinto dia de cultivo, apresentaram os maiores valores de EF_{m2} desse trabalho (Tabela 08), valores que foram t\u00e3o altos quanto os de EF_{m1} . No ensaio 29b, por exemplo (Gr\u00e1fico 15), a aplica\u00e7\u00e3o de $IL_2 = 192 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ no quinto dia de cultivo causou um atraso de cerca de tr\u00eas a cinco dias no esperado decr\u00e9scimo nos valores de EF.

Gr\u00e1fico 15. Efici\u00eancia fotossint\u00e9tica (EF) em fun\u00e7\u00e3o do tempo (t) do ensaio principal 29b, antes (s\u00edmbolos cheios) e depois (s\u00edmbolos vazios) da aplica\u00e7\u00e3o da intensidade luminosa $192 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ no 5\u00ba dia de cultivo; ensaio realizado com di\u00f3xido de carbono proveniente de cilindros.

Fica evidente, levando-se em considera\u00e7\u00e3o todos os resultados em geral, que $t^* \leq 8^\circ$ dia definem cultivos com abund\u00e2ncia de luz, e sendo esta a principal fonte de energia de microrganismos fotossint\u00e9ticos, o crescimento celular de *A. platensis* em tais condi\u00e7\u00f5es foi bastante dependente da intensidade luminosa provida ao ensaio. Por outro lado, $t^* > 8^\circ$ dia determina uma condi\u00e7\u00e3o de limita\u00e7\u00e3o do crescimento celular por luz, e quando da presen\u00e7a de uma fonte org\u00e2nica de carbono, esta supre de certa forma uma parte das necessidades energ\u00e9ticas das c\u00e9lulas.

Por fim, esse grupo de ensaios mostrou que \u00e9 poss\u00edvel a utiliza\u00e7\u00e3o do di\u00f3xido de carbono proveniente da fermenta\u00e7\u00e3o alco\u00f3lica como fonte de carbono e como forma de

controle dos valores de pH no cultivo da cianobactéria *A. platensis*. É necessário um estudo mais aprofundado da influência desse gás no metabolismo e crescimento de tal microrganismo fotossintetizante, a fim de possibilitar a obtenção de resultados de X_m e P_X tão altos quanto aqueles obtidos quando do uso de gás carbônico puro.

5.1.4 Análise da biomassa

A biomassa dos ensaios que levaram à obtenção dos mais importantes resultados deste trabalho foram selecionadas para análise do conteúdo de clorofila, proteínas e lipídeos (Tabela 11).

Tabela 11. Condições de experimentação dos ensaios selecionados para análise da biomassa e resultados de teor final de clorofila, CL_f , teor de proteínas, PTN, e de lipídeos, LIP (ensaios 17, 25, 30, 33, 36 e 39) ^a.

Ensaios	Intensidade Luminosa ($\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		Proveniência do CO_2	CL_f (mg g^{-1})	PTN (%)	LIP (%)
	IL / IL_1 ^b	IL_2 ^b				
17a		-		4,3	35	21
17b	156	-	cilindros	4,6	36	24
25		-		4,0	32	22
30a		192		4,0	29	16
30b	156		cilindros	4,2	28	19
33a		252		2,6	35	17
33b				2,8	33	19
36a		192		4,0	28	17
36b	156		fermentação	4,5	29	19
39a		252	alcoólica	3,0	33	18
39b				3,1	34	18

^a processo descontínuo alimentado; fontes de nitrogênio 5,9 mM NaNO_3 + 7,5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; concentração do inóculo de $400 \pm 20 \text{ mg L}^{-1}$; controle do pH em $9,0 \pm 0,3$, conforme o protocolo de adição II (Item 4.1.4.2); os ensaios 17 e 15 foram realizados com intensidade luminosa constante, enquanto que o restante foi realizado com aumento desta no oitavo dia de cultivo.

^b intensidade luminosa, IL; intensidade luminosa da primeira, IL_1 , e da segunda fase, IL_2 .

Os ensaios 17 e 25, realizados com apenas um valor de intensidade luminosa, $IL = 156 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, e com o aux\u00edlio de di\u00f3xido de carbono proveniente de cilindros no controle do pH e como fonte de carbono, podem ser considerados ensaios base para a avalia\u00e7\u00e3o da influ\u00eancia da intensidade luminosa e da proveni\u00eancia do di\u00f3xido de carbono no teor final de clorofila (CL_f) e nos teores de prote\u00ednas (PTN) e lip\u00eddeos (LIP) da biomassa de *A. platensis* cultivada em mini-tanques, dadas as condi\u00e7\u00f5es experimentais fixas dos ensaios selecionados.

Assim, nos ensaios 17 e 25 foram obtidos valores de PTN e LIP que variaram, respectivamente, entre 32 e 36 %, e 21 e 24 %. Sabe-se que o teor de prote\u00ednas e lip\u00eddeos da biomassa de *A. platensis* varia conforme a fonte e a disponibilidade de nitrog\u00e9nio no meio durante o cultivo (RODRIGUES et al., 2010), e que tal nutriente \u00e9 utilizado pelo microrganismo primeiro para o crescimento celular, e posteriormente armazenado como material de reserva na forma de prote\u00ednas, principalmente (SYRETT, 1962). Comparando-se os resultados de teor prot\u00e9ico e lip\u00eddico obtidos nos ensaios 17 e 25 com aqueles de trabalho anterior (RODRIGUES, 2008), que serviu como base para a determina\u00e7\u00e3o da quantidade e da forma de distribui\u00e7\u00e3o das fontes de nitrog\u00e9nio, nota-se uma redu\u00e7\u00e3o de cerca de 35 % no valor m\u00e9dio de PTN e um aumento de cerca de 60 % no valor m\u00e9dio de LIP. Essas diferen\u00e7as podem ser atribu\u00eddas \u00e0 varia\u00e7\u00e3o natural biol\u00f3gica, e a diferen\u00e7as de outras condi\u00e7\u00f5es de cultivo.

Nos ensaios 17 e 25 tamb\u00e9m foram obtidos valores de CL_f que variaram entre 4,0 e 4,6 mg g^{-1} ; tais resultados s\u00e3o bastante inferiores a aqueles j\u00e1 registrados para o cultivo desta cianobact\u00e9ria em mini-tanques (DANESI et al., 2011; RANGEL-YAGUI et al., 2004; RODRIGUES et al., 2010), e similares a aqueles previamente obtidos em fotobiorreatores tubulares (BEZERRA, 2011), onde a absor\u00e7\u00e3o de luz pelas c\u00e9lulas \u00e9 mais eficiente, em decorr\u00eancia da melhor distribui\u00e7\u00e3o da intensidade luminosa provida aos cultivos. Diversos fatores influenciam o teor de clorofila de microrganismos fotossint\u00e9ticos, como o tipo e a concentra\u00e7\u00e3o das fontes de nitrog\u00e9nio, al\u00e9m da concentra\u00e7\u00e3o celular e da intensidade luminosa (LEE; ERICKSON; YANG, 1987; OLAIZOLA; DUERR, 1990; RODRIGUES et al., 2010), e estes podem ter sido respons\u00e1veis pelas discrep\u00e2ncias entre os diversos resultados. A intensidade luminosa \u00e9 o fator mais influente; quanto menor \u00e9 a disponibilidade de luz, maior \u00e9 a produ\u00e7\u00e3o deste pigmento pelas c\u00e9lulas (DANESI et al., 2002; DANESI et al., 2004).

A análise de variância “ANOVA 1 fator”, realizada com os dados de todos os ensaios selecionados para análise da biomassa (Tabela 11), permitiu a avaliação da influência da intensidade luminosa nos teores de clorofila, proteínas e lipídeos (Tabela 12).

Tabela 12. Resultados obtidos na análise de variância “ANOVA 1 fator”, realizada com base nos ensaios selecionados para análise da biomassa (ensaios 17, 25, 30, 33, 36 e 39): médias dos resultados experimentais, valor *p*, com nível de significância 0,05, e valor de R^2 ajustado ao modelo ^a.

Variáveis	CL _f (mg g ⁻¹)	PTN (%)	LIP (%)
Intensidade luminosa, IL / IL ₂ (μmol fótons m ⁻² s ⁻¹)			
156	4,3 ^A	34 ^A	22 ^A
192	4,2 ^A	28 ^B	18 ^B
252	2,9 ^B	34 ^A	18 ^B
<i>p</i>	0,000	0,000	0,003
R ₂ ajustado	0,8807	0,8275	0,7053

^a para cada variável dependente (teor final de clorofila, CL_f; teor de proteínas, PTN; teor de lipídeos, LIP), letras diferentes dentro de uma mesma variável independente (IL/IL₂) indicam diferença estatística.

O aumento da intensidade luminosa durante o cultivo de *A. platensis* afetou de maneira negativa o teor de clorofila da biomassa apenas quando IL₂ = 252 μmol fótons m⁻² s⁻¹, de modo que os valores de CL_f dos ensaios 33 e 39 foram bastante reduzidos quando em comparação com aqueles dos ensaios 17 e 25 (Tabela 11). Esses resultados estão de acordo com anteriores, que determinaram que o aumento da intensidade luminosa levou à redução na produção deste pigmento pelas células de *A. platensis* (DANESI et al., 2002; DANESI et al., 2004; RANGEL-YAGUI et al., 2004). O perfil da curva de teor de clorofila diário, CL, tanto dos ensaios 33 (CO₂ de cilindros) quanto dos ensaios 39 (CO₂ da fermentação alcoólica) mostra que após a aplicação de IL₂, os valores de CL se estabilizaram (Gráfico 16). Isso porque o aumento da intensidade luminosa provoca uma redução na concentração de clorofila, enquanto que o aumento da densidade celular provoca justamente um efeito inverso na produção do pigmento – sabe-se que as cianobactérias aumentam a produção de clorofila na tentativa de aumentar a eficiência de captura de fótons para compensar o efeito sombra (HENDRY, 1996; LEE; ERICKSON; YANG, 1987; OLAIZOLA; DUERR, 1990). É possível

que nesses ensaios, a associação do progressivo aumento na concentração celular e o aumento dos valores de IL tenha anulado um o efeito do outro sob o teor de clorofila.

Gráfico 16. Valores médios do teor de clorofila (CL) em função do tempo (t) dos ensaios principais 33 (quadrados) e 39 (círculos), antes (símbolos cheios) e depois (símbolos vazios) da aplicação da intensidade luminosa $252 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no 8º dia de cultivo; ensaios realizados com dióxido de carbono proveniente de cilindros e da fermentação alcoólica, respectivamente.

Por outro lado, a aplicação de $IL_2 = 192 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ não alterou o aumento esperado dos valores de CL nos ensaios 30 (CO_2 de cilindros) e 36 (CO_2 da fermentação alcoólica), como no caso anterior (Gráfico 17). Provavelmente o efeito do aumento na intensidade luminosa não superou o efeito do aumento da densidade celular na produção de clorofila pelas células. De fato, nos ensaios 30 foram obtidos os maiores valores de X_m deste trabalho (Tabela 08); ou seja, em tais cultivos, a alta densidade celular provavelmente levou a um aumento na concentração de clorofila de forma a compensar a limitada eficiência de captura de fótons das células mais distantes da superfície dos mini-tanques (efeito sombra). Uma vez que o valor de IL_2 aplicado a esses cultivos não apresentou efeito inibitório aparente sobre o crescimento celular, diferentemente de $IL_2 = 252 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nos ensaios 32 e 38 (Tabelas 08 e 09), é possível que seus efeitos sob a produção de clorofila tenham efetivamente sido menores que aqueles da alta densidade celular.

Gráfico 17. Valores médios do teor de clorofila (CL) em função do tempo (t) dos ensaios principais 30 (quadrados) e 36 (círculos), antes (símbolos cheios) e depois (símbolos vazios) da aplicação da intensidade luminosa $192 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no 8º dia de cultivo; ensaios realizados com dióxido de carbono proveniente de cilindros e da fermentação alcoólica, respectivamente.

A variação da intensidade luminosa provocou uma pequena redução no teor lipídico da biomassa de *A. platensis*, de uma média de 22 % para 18 % (Tabela 12); tais valores, no entanto, ainda estão muito próximos de 20 %, valor considerado padrão para o teor lipídico desta cianobactéria quando cultivada em mini-tanques, sob as condições de cultivo fixadas nesse trabalho (RODRIGUES et al., 2010). A aplicação de $IL_2 = 192 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por sua vez, provocou uma pequena redução no teor protéico da biomassa, de uma média de 34 % para 28 % (Tabela 12).

A análise de variância “ANOVA 2 fatores”, realizada apenas com os dados dos ensaios nos quais houve mudança da intensidade luminosa, confirmou a influência desta nos teores de clorofila, proteínas e lipídeos, e determinou que tais variáveis não foram influenciadas pela proveniência do dióxido de carbono (Tabela 13). Trabalhos anteriores relataram que, de fato, a utilização de dióxido de carbono proveniente da fermentação alcoólica não altera a composição da biomassa de *A. platensis* quando comparado com a

utilização de dióxido de carbono proveniente de cilindros (BEZERRA, 2011; MATSUDO, 2010).

Tabela 13. Resultados obtidos na análise de variância “ANOVA 2 fatores”, realizada com base nos ensaios selecionados para análise da biomassa nos quais houve aumento da intensidade luminosa (ensaios 30, 33, 36 e 39): médias dos resultados experimentais, valor p , com nível de significância 0,05, e valor de R^2 ajustado ao modelo ^a.

Variáveis	CL _f (mg g ⁻¹)	PTN (%)	LIP (%)
Intensidade luminosa da segunda fase, IL ₂ (μmol fótons m ⁻² s ⁻¹)			
192	4,2 ^A	28 ^A	18 ^A
252	2,9 ^B	34 ^B	18 ^A
p	0,001	0,001	0,820
Proveniência do dióxido de carbono, f-CO ₂			
cilindros	3,4 ^A	31 ^A	18 ^A
fermentação alcoólica	3,6 ^A	31 ^A	18 ^A
p	0,161	0,725	0,820
R ₂ ajustado	0,9195	0,8960	0,8652

^a para cada variável dependente (teor final de clorofila, CL_f; teor de proteínas, PTN; teor de lipídeos, LIP), letras diferentes dentro de uma mesma variável independente (IL₂, f-CO₂) indicam diferença estatística.

5.2 Fermentação alcoólica (dorna 01 e 02)

Nas duas fermentações alcoólicas desenvolvidas para a produção de dióxido de carbono, os seguintes valores médios foram obtidos durante a fase de regime permanente: concentração celular de 6,11 e 6,08 ± 0,632 g L⁻¹, concentração total de açúcares redutores de 25,5 e 26,2 ± 5,60 g L⁻¹, e concentração de etanol de 70,6 e 70,8 ± 2,64 g L⁻¹. Os rendimentos calculados para ambas as fermentações, 70,6 e 72,5 %, indicam uma alta conversão de substrato (açúcares) em produto (etanol).

Considerando que etanol e dióxido de carbono são produzidos em quantidades quase que equimolares (0,96 g CO₂ g etanol), é seguro afirmar que ambas as fermentações levaram à produção de um total de cerca de 1,36 kg de dióxido de carbono, que foi suficiente para

sustentar o controle de pH de 12 cultivos de *A. platensis* em tanques abertos por 14 dias cada (ensaios 35 a 40).

5.3 Testes de adsorção de íons metálicos (testes 01 a 27)

Foi realizado um total de 54 testes, cujos resultados foram discutidos da seguinte maneira: fator de separação (Item 5.3.2), adsorção nos sistemas $\text{Ni}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ (Item 5.3.3), adsorção nos sistemas $\text{Ni}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ (Item 5.3.4), adsorção nos sistemas $\text{Zn}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ (Item 5.3.5), comparação com sistemas únicos (Item 5.3.6), estudo das isotermas de equilíbrio (Item 5.3.7), adsorção em sistema $\text{Ni}^{2+}/\text{Zn}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ (Item 5.3.8), e caracterização das biomassas (Item 5.3.9). Para a avaliação da capacidade de adsorção da biomassa de *A. platensis* e *C. vulgaris* nos referidos sistemas, foi necessário o estudo de tal fenômeno quando da presença de apenas um único íon metálico; os resultados referentes a sistemas únicos (Item 5.3.1) foram baseados em trabalho anterior, realizado sob as mesmas condições que este (FERREIRA et al., 2011).

5.3.1 Adsorção de Ni^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} em sistemas únicos

Ferreira et al. (2011) estudaram a capacidade de adsorção de níquel, zinco e chumbo das biomassas secas de *A. platensis* e *C. vulgaris* em sistemas únicos, ou seja, quando apenas um dos íons metálicos estava presente em solução. Os resultados mais relevantes de tal trabalho, referentes à capacidade de adsorção, ao estudo cinético e das isotermas de equilíbrio foram resumidos aqui.

De acordo com Ferreira et al. (2011), a biomassa de *A. platensis* foi capaz de adsorver de maneira eficiente os íons bivalentes níquel, zinco e chumbo (Tabela 14). A capacidade de sorção em equilíbrio, q_e , em geral aumentou conforme a concentração inicial do íon metálico, C_0 , provavelmente em decorrência do aumento no número de colisões entre os íons metálicos e a biomassa da cianobactéria em questão. Assim, os maiores valores de q_e entre os dados selecionados foram obtidos quando $C_0 = 2,0 \text{ mM}$ (Tabela 14). Já os valores de eficiência de remoção de metais, Y_R , tendem a decrescer com o aumento de C_0 , em decorrência da progressiva saturação dos sítios de ligação na superfície da biomassa. Por tal razão, os maiores valores de Y_R dentre os dados selecionados foram obtidos quando $C_0 = 0,50 \text{ mM}$ (Tabela 14). De maneira geral, todos os resultados de capacidade de adsorção indicaram que *A. platensis* funcionou como melhor bioissorvente para os íons bivalentes de chumbo e zinco

do que para níquel, e que apresentou menor capacidade de adsorção que a biomassa da microalga *C. vulgaris*.

Tabela 14. Condições de experimentação e principais resultados de adsorção dos testes com as biomassas de *A. platensis* e *C. vulgaris* em sistemas únicos de íons metálicos bivalentes de níquel, zinco e chumbo ^a.

C₀ (mM)	q_{e,Ni} (mmol g⁻¹)	Y_{R,Ni} (%)	q_{e,Zn} (mmol g⁻¹)	Y_{R,Zn} (%)	q_{e,Pb} (mmol g⁻¹)	Y_{R,Pb} (%)
Testes com a biomassa de <i>A. platensis</i>						
0,5	0,088	35,4	0,168	67,3	0,195	78,0
1,0	0,167	33,3	0,285	57,0	0,286	57,2
2,0	0,285	28,5	0,384	38,4	0,385	38,5
Testes com a biomassa de <i>C. vulgaris</i>						
0,5	0,136	54,4	0,182	72,6	0,216	86,5
1,0	0,236	47,2	0,324	64,8	0,430	86,0
2,0	0,436	43,6	0,549	54,9	0,615	61,5

Fonte: Ferreira et al., 2011.

^a concentração inicial do íon metálico, C₀; capacidade de sorção em equilíbrio, q_e; eficiência de remoção de metais, Y_R.

Ferreira et al. (2011) estudaram dois diferentes modelos cinéticos e determinaram que aquele de Ho e McKay (2000), que assume que a capacidade de adsorção de um determinado bioissorvente é proporcional ao número de sítios de ligação ativos e ocupados na superfície do mesmo, representou melhor o fenômeno da adsorção dos selecionados metais na superfície da biomassa de *A. platensis*. De fato, os valores teóricos da capacidade de adsorção, q_c (Tabela 15), foram quase que idênticos aos valores experimentais, q_e (Tabela 14), o que indica que o modelo selecionado representa bem o fenômeno de adsorção. As constantes de velocidade, k₂, dos dados selecionados indicaram que a velocidade de adsorção diminuiu conforme o aumento de C₀, especialmente para os íons bivalentes de chumbo (Tabela 15). Esses dados também indicaram que a adsorção ocorreu mais rapidamente no caso dos íons chumbo e zinco do que níquel, e que a biomassa de *A. platensis* adsorveu todos os íons bivalentes mais lentamente que a biomassa de *C. vulgaris*.

Tabela 15. Condições de experimentação e principais resultados cinéticos dos testes com as biomassas de *A. platensis* e *C. vulgaris* em sistemas únicos de íons metálicos bivalentes de níquel, zinco e chumbo ^a.

C_0 (mM)	$q_{c,Ni}$ (mmol g ⁻¹)	$k_{2,Ni}$ (g mmol ⁻¹ min ⁻¹)	$q_{c,Zn}$ (mmol g ⁻¹)	$k_{2,Zn}$ (g mmol ⁻¹ min ⁻¹)	$q_{c,Pb}$ (mmol g ⁻¹)	$k_{2,Pb}$ (g mmol ⁻¹ min ⁻¹)
Testes com a biomassa de <i>A. platensis</i>						
0,5	0,087	2,04	0,171	5,33	0,193	5,28
1,0	0,169	2,19	0,284	4,25	0,288	3,24
2,0	0,290	1,62	0,389	1,43	0,386	2,30
Testes com a biomassa de <i>C. vulgaris</i>						
0,5	0,135	3,17	0,174	5,62	0,226	6,11
1,0	0,237	3,34	0,327	5,10	0,434	4,45
2,0	0,450	1,01	0,554	2,05	0,612	2,64

Fonte: Ferreira et al., 2011.

^a concentração inicial do íon metálico, C_0 ; capacidade teórica de sorção em equilíbrio, q_c ; constante de velocidade de pseudo-segunda ordem, k_2 .

Os modelos de Langmuir e Freundlich são comumente utilizados na análise da adsorção de íons metálicos em sistemas únicos. O primeiro assume que a superfície do bioissorvente é homogênea, que os sítios de ligação presentes nela são idênticos e possuem a mesma afinidade por um determinado íon, e que durante a adsorção, uma única camada completa de íons é formada sobre a superfície da célula. O segundo assume o contrário – considera que a adsorção ocorre através da ligação dos íons metálicos em sítios ativos distribuídos exponencialmente na superfície heterogênea da célula.

Os resultados do estudo das isotermas de equilíbrio realizado por Ferreira et al. (2011), referentes às constantes de Langmuir, K_L , e Freundlich, K_F , indicaram que tanto a biomassa de *A. platensis* como a de *C. vulgaris* apresentou a seguinte ordem de afinidade: $Pb^{2+} \gg Zn^{2+} > Ni^{2+}$; adicionalmente, os resultados de intensidade de adsorção, n , confirmaram tal afirmação (Tabela 16). Tal afinidade entre o bioissorvente e os íons metálicos é decorrente das diferentes configurações eletrônicas dos três íons; quanto maior o número de elétrons nos orbitais mais distantes do núcleo, maior é a probabilidade de adsorção.

Tabela 16. Condições de experimentação e principais resultados do estudo das isotermas de equilíbrio dos testes com as biomassas de *A. platensis* e *C. vulgaris* em sistemas únicos de íons metálicos bivalentes de níquel, zinco e chumbo ^a.

Íons Metálicos	Langmuir		Freundlich	
	q_m (mmol g ⁻¹)	K_L (L mmol ⁻¹)	K_F (mmol ^{1-1/n} L ^{1/n} g ⁻¹)	n
Testes com a biomassa de <i>A. platensis</i>				
Ni ²⁺	0,740	0,438	0,215	1,36
Zn ²⁺	0,604	1,82	0,367	2,42
Pb ²⁺	0,546	2,84	0,380	3,21
Testes com a biomassa de <i>C. vulgaris</i>				
Ni ²⁺	0,823	0,867	0,366	1,56
Zn ²⁺	0,918	1,60	0,546	1,87
Pb ²⁺	0,668	11,3	0,614	3,66

Fonte: Ferreira et al., 2011.

^a capacidade teórica máxima de sorção em equilíbrio, q_m ; constante de Langmuir, K_L ; constante de Freundlich, K_F ; intensidade de adsorção, n.

Com a finalidade de elucidar os possíveis mecanismos envolvidos na adsorção de íons metálicos em sistemas únicos, Ferreira et al. (2011) aplicaram a técnica de espectrofotometria de infravermelho às biomassas de *A. platensis* e *C. vulgaris*, antes e depois dos testes de adsorção. Os autores foram bem sucedidos na identificação dos grupos funcionais envolvidos na adsorção dos íons bivalentes de níquel, zinco e chumbo, entre eles as carboxilas, hidroxilas e aminas.

5.3.2 Afinidade das biomassas de *A. platensis* e *C. vulgaris* pelos íons metálicos

A preferência de um bioissorvente por um dos dois íons metálicos presentes em um sistema binário foi avaliada pelo fator de separação, α . Os resultados dos cálculos de $\alpha_{Ni,Zn}$, $\alpha_{Ni,Pb}$ e $\alpha_{Zn,Pb}$ foram todos menores que 1 (Gráfico 18), o que significa que a biomassa tanto de *A. platensis* quanto a de *C. vulgaris* apresentam a seguinte ordem de afinidade: Pb²⁺ >> Zn²⁺ > Ni²⁺. Esses resultados indicam que, apesar da presença de outros íons metálicos em solução, a afinidade das biomassas por um determinado íon dentre os estudados foi a mesma daquela

definida no estudo dos modelos de isotermas de equilíbrio em sistemas únicos (FERREIRA et al., 2011).

Gráfico 18. Valores do fator de separação (α) em função da concentração inicial dos íons metálicos (C_0) referentes aos sistemas binários $\text{Ni}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ (quadrados), $\text{Ni}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ (círculos) e $\text{Zn}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ (triângulos) nos quais as biomssas de *A. platensis* (símbolos cheios) e *C. vulgaris* (símbolos vazios) foram utilizadas como bioissorventes.

Nos testes realizados com a maior concentração de C_0 , ou seja, em condições que favoreceram a probabilidade estatística do bioissorvente em se ligar a um íon metálico baseado na sua afinidade por este ($C_0 = 2,0$ mM), o valor de $\alpha_{\text{Zn,Pb}}$ para *A. platensis* (0,82) foi maior que aquele para *C. vulgaris* (0,55), o que sugere que esta última tem uma maior afinidade pelos íons de chumbo, enquanto a primeira, pelos íons de zinco. Esse resultado é condizente com os diferentes valores das constantes de Langmuir, K_L , obtidas em sistemas únicos para ambos os bioissorventes em relação aos íons de chumbo e zinco (Tabela 16). Tal diferença de poder de adsorção entre as biomssas, especialmente para os íons de chumbo, foi provavelmente decorrente do maior tamanho da célula eucariótica da microalga *C. vulgaris*. Nos testes realizados com a menor concentração de C_0 , ou seja, em condições de difusão limitada ($C_0 = 0,50$ mM), o valor do mesmo fator diminuiu para 0,46 no caso de *A. platensis* e 0,27 no caso de *C. vulgaris*, o que sugere que a afinidade dessas biomssas pelos íons

bivalentes de chumbo aumenta conforme a diminuição da concentração total de íons metálicos no meio.

5.3.3 Capacidade e cinética de adsorção nos sistemas Ni^{2+}/Zn^{2+}

Nos sistemas binários Ni^{2+}/Zn^{2+} nos quais a biomassa de *A. platensis* foi utilizada como bioissorvente (testes A01 a A09), o aumento progressivo de $C_{0,Zn}$ de 0,50 para 2,0 mM, dado um valor fixo de $C_{0,Ni}$, levou a um aumento generalizado nos valores de $q_{e,Zn}$ e uma correspondente diminuição nos valores de $q_{e,Ni}$ (Tabela 17). Isso significa que a capacidade de sorção dos íons bivalentes de zinco aumenta quanto maior é a sua concentração no meio, e simultaneamente promove a redução da capacidade de sorção dos íons bivalentes de níquel, principalmente quando $C_{0,Zn} = 2,0$ mM. Esses resultados indicam que os íons zinco são preferencialmente adsorvidos em relação aos íons níquel.

Tabela 17. Condições de experimentação e principais resultados de adsorção dos testes com a biomassa seca de *A. platensis* em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de níquel e zinco ^a.

Testes	$C_{0,Ni}$ (mM)	$C_{0,Zn}$ (mM)	$C_{e,Ni}$ (mM)	$q_{e,Ni}$ (mmol g ⁻¹)	$Y_{R,Ni}$ (%)	$C_{e,Zn}$ (mM)	$q_{e,Zn}$ (mmol g ⁻¹)	$Y_{R,Zn}$ (%)
A01	0,50	0,50	0,333	0,0833	33,4	0,223	0,138	55,4
A02	0,50	1,0	0,330	0,0854	34,0	0,437	0,282	56,3
A03	0,50	2,0	0,357	0,0712	28,6	1,28	0,360	36,0
A04	1,0	0,50	0,713	0,144	28,7	0,230	0,135	53,9
A05	1,0	1,0	0,705	0,148	29,5	0,598	0,201	40,2
A06	1,0	2,0	0,816	0,0924	18,4	1,24	0,380	38,0
A07	2,0	0,50	1,45	0,275	27,5	0,287	0,107	42,7
A08	2,0	1,0	1,58	0,208	20,8	0,616	0,192	38,4
A09	2,0	2,0	1,69	0,155	15,5	1,54	0,228	22,8

^a concentração inicial do íon metálico, C_0 ; concentração do íon metálico em equilíbrio, C_e ; capacidade de sorção em equilíbrio, q_e ; eficiência de remoção de metais, Y_R .

O aumento progressivo de $C_{0,Ni}$, dado um valor fixo de $C_{0,Zn}$, levou a um aumento nos valores de $q_{e,Ni}$ (Tabela 17), ou seja, a capacidade de sorção dos íons bivalentes de níquel aumenta quanto maior é a sua concentração no meio. No entanto, não houve redução na

capacidade de sorção dos íons bivalentes de zinco, indicando que a adsorção deste não depende da quantidade presente de íons bivalentes de níquel.

Nos sistemas binários $\text{Ni}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ nos quais a biomassa de *C. vulgaris* foi utilizada como bioissorvente (testes C01 a C09), o aumento progressivo de C_0 de um íon bivalente levou a um aumento nos valores de q_e do mesmo, dado um valor fixo de C_0 do co-íon (Tabela 18); comportamento este semelhante a aquele observado nos testes com *A. platensis*. No entanto, os valores de q_e de um determinado íon bivalente só foram reduzidos de maneira significativa quando o valor de C_0 do co-íon foi 2,0 mM. Por exemplo, considerando-se os testes C01 a C03, nos quais $C_{0,\text{Ni}} = 0,50$ mM, $C_{0,\text{Zn}} = 2,0$ mM levou a uma redução drástica de $q_{e,\text{Ni}}$ em comparação ao valor de tal parâmetro quando $C_{0,\text{Zn}} = 1,0$ mM (Tabela 18). A influência da presença de íons bivalentes de zinco na adsorção dos de níquel foi muito mais marcante que na situação inversa, e os resultados em geral indicaram uma dependência quantitativa da adsorção dos íons no sistema binário em questão.

Tabela 18. Condições de experimentação e principais resultados de adsorção dos testes com a biomassa seca de *C. vulgaris* em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de níquel e zinco ^a.

Testes	$C_{0,\text{Ni}}$ (mM)	$C_{0,\text{Zn}}$ (mM)	$C_{e,\text{Ni}}$ (mM)	$q_{e,\text{Ni}}$ (mmol g ⁻¹)	$Y_{R,\text{Ni}}$ (%)	$C_{e,\text{Zn}}$ (mM)	$q_{e,\text{Zn}}$ (mmol g ⁻¹)	$Y_{R,\text{Zn}}$ (%)
C01	0,50	0,50	0,233	0,134	53,5	0,200	0,150	60,0
C02	0,50	1,0	0,229	0,136	54,2	0,353	0,323	64,7
C03	0,50	2,0	0,374	0,0633	25,3	0,953	0,524	52,4
C04	1,0	0,50	0,535	0,232	46,5	0,195	0,153	61,1
C05	1,0	1,0	0,551	0,224	44,9	0,456	0,272	54,4
C06	1,0	2,0	0,682	0,159	31,8	1,08	0,460	46,0
C07	2,0	0,50	1,49	0,255	25,5	0,246	0,127	50,7
C08	2,0	1,0	1,49	0,254	25,4	0,493	0,254	50,7
C09	2,0	2,0	1,52	0,238	23,8	1,23	0,384	38,4

^a concentração inicial do íon metálico, C_0 ; concentração do íon metálico em equilíbrio, C_e ; capacidade de sorção em equilíbrio, q_e ; eficiência de remoção de metais, Y_R .

Outro aspecto interessante é referente com o estado de saturação do bioissorvente, que pode ser avaliado através da comparação dos resultados obtidos nos testes nos quais $C_{0,\text{Zn}} = C_{0,\text{Ni}}$ (testes 01, 05 e 09). Quando a concentração inicial total de íons metálicos, C_T , aumentou

de 2,0 (testes 05) para 4,0 mM (testes 09), ambos os valores de $q_{e,Ni}$ e $q_{e,Zn}$ aumentaram menos do que o esperado de uma adsorção livre, indicando portanto uma saturação tanto de *A. platensis* (Tabela 17) quanto de *C. vulgaris* (Tabela 18), em decorrência do excesso de íons metálicos em relação ao número de sítios de adsorção na superfície das biomassas. Ao contrário do que se esperava pelo menor tamanho das células da cianobactéria, tal estado de saturação pareceu mais avançado no caso de *A. platensis*, o que poderia então ser explicado pela diferença na composição de *A. platensis* em relação a *C. vulgaris*, em termos de grupos funcionais disponíveis para ligação com íons metálicos.

Em relação à eficiência de remoção de íons metálicos, é importante lembrar que tal parâmetro aumenta de acordo com a capacidade de sorção do bioissorvente, porém diminui conforme o aumento da concentração inicial de íons metálicos na solução. Tanto nos testes com *A. platensis* (Tabela 17) quanto naqueles com *C. vulgaris* (Tabela 18), os mais altos valores de Y_R foram obtidos nos testes 01 e 02 ($C_{0,Ni} = 0,50$ mM, $C_{0,Zn} = 0,50-1,0$ mM) e 04 ($C_{0,Ni} = 1,0$ mM, $C_{0,Zn} = 0,50$ mM). A maior parte dos valores de Y_R obtidos nos testes realizados com *C. vulgaris* são superiores a aqueles obtidos nos testes realizados com *A. platensis*, e confirmam que a microalga funcionou melhor como bioissorvente que a cianobactéria para os íons metálicos em questão. Nos testes 01, onde $C_{0,Ni} = C_{0,Zn} = 0,50$ mM, a diferença entre os valores de $Y_{R,Zn}$ obtidos com os dois diferentes bioissorventes foi menor que 10 %, enquanto que nos testes 09, onde $C_{0,Ni} = C_{0,Zn} = 2,0$ mM, tal diferença foi maior que 40 % (Tabelas 17 e 18). Esses resultados confirmam que a saturação dos sítios de adsorção na superfície de *A. platensis* foi mais marcante. Em relação à adsorção dos íons bivalentes de níquel, nos testes onde $C_{0,Zn} = C_{0,Ni}$ (testes 01, 05 e 09), o aumento de C_T não implicou em um aumento da diferença entre os valores de $Y_{R,Ni}$ obtidos com os dois diferentes bioissorventes; aqueles obtidos nos testes com *A. platensis* foram em média 36 % menores que aqueles obtidos nos testes com *C. vulgaris* (Tabelas 17 e 18).

O modelo cinético de Ho e McKay (2000) representou bem o fenômeno da adsorção dos selecionados metais na superfície da biomassa de *A. platensis* e *C. vulgaris*, pois os valores teóricos de q_c foram bastante próximos dos valores experimentais de q_e em ambos os casos (Tabelas 19 e 20). Nos sistemas binários Ni^{2+}/Zn^{2+} nos quais a biomassa de *A. platensis* foi utilizada como bioissorvente (testes A01 a A09), o aumento progressivo de C_0 de um íon bivalente levou, em geral, a uma diminuição na velocidade de adsorção de tal íon, dado um valor fixo de C_0 do co-íon (Tabela 19). O maior valor de $k_{2,Ni}$ foi obtido no teste A02 ($C_{0,Ni} = 0,50$ mM, $C_{0,Zn} = 1,0$ mM), enquanto que o maior valor de $k_{2,Zn}$ foi obtido no teste A01 ($C_{0,Ni} = 0,50$ mM, $C_{0,Zn} = 0,50$ mM), confirmando que os íons foram mais rapidamente adsorvidos

quando estavam presentes em pequenas concentrações. No caso dos sistemas binários nos quais a biomassa de *C. vulgaris* foi utilizada como bioissorvente (testes C01 a C09), os resultados de velocidade de adsorção foram mais aleatórios, especialmente para os íons bivalentes de níquel (Tabela 20), o que sugere que tal íon metálico foi mais afetado pela presença dos íons bivalentes de zinco que o contrário.

Tabela 19. Condições de experimentação e principais resultados da cinética de adsorção dos testes com a biomassa seca de *A. platensis* em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de níquel e zinco ^a.

Testes	C _{0,Ni} (mM)	C _{0,Zn} (mM)	q _{c,Ni} (mmol g ⁻¹)	k _{2,Ni} (g mmol ⁻¹ min ⁻¹)	q _{c,Zn} (mmol g ⁻¹)	k _{2,Zn} (g mmol ⁻¹ min ⁻¹)
A01	0,50	0,50	0,0922	1,64	0,137	4,75
A02	0,50	1,0	0,0843	1,85	0,281	4,25
A03	0,50	2,0	0,0970	0,531	0,367	1,19
A04	1,0	0,50	0,149	1,72	0,135	5,05
A05	1,0	1,0	0,146	1,48	0,209	1,29
A06	1,0	2,0	0,101	1,24	0,384	1,17
A07	2,0	0,50	0,277	0,741	0,106	2,02
A08	2,0	1,0	0,178	0,755	0,187	1,81
A09	2,0	2,0	0,148	0,325	0,206	0,530

^a concentração inicial do íon metálico, C₀; capacidade teórica de sorção em equilíbrio, q_c; constante de velocidade de pseudo-segunda ordem, k₂.

Quando C_T aumentou progressivamente de 1,0 (teste A01) para 4,0 mM (teste A09), os valores de k₂ tanto para os íons bivalentes de níquel quanto de zinco diminuíram (Tabela 19), indicando uma saturação rápida de *A. platensis*. No caso de k_{2,Zn}, essa redução é de quase 90 %. No uso de *C. vulgaris* como bioissorvente, quando do aumento de C_T de 2,0 (teste C05) para 4,0 mM (teste C09), os valores de k₂ de ambos os íons se mantiveram quase que inalterados (Tabela 20), o que sugere que não houve saturação completa da biomassa e que esta microalga mostrou-se um melhor bioissorvente que *A. platensis*.

Tabela 20. Condições de experimentação e principais resultados da cinética de adsorção dos testes com a biomassa seca de *C. vulgaris* em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de níquel e zinco ^a.

Testes	C _{0,Ni} (mM)	C _{0,Zn} (mM)	q _{c,Ni} (mmol g ⁻¹)	k _{2,Ni} (g mmol ⁻¹ min ⁻¹)	q _{c,Zn} (mmol g ⁻¹)	k _{2,Zn} (g mmol ⁻¹ min ⁻¹)
C01	0,50	0,50	0,131	2,37	0,154	2,89
C02	0,50	1,0	0,141	1,37	0,323	3,50
C03	0,50	2,0	0,0824	0,576	0,519	1,04
C04	1,0	0,50	0,235	2,33	0,149	2,20
C05	1,0	1,0	0,236	0,728	0,291	0,579
C06	1,0	2,0	0,178	0,379	0,470	0,716
C07	2,0	0,50	0,264	0,935	0,119	2,61
C08	2,0	1,0	0,270	0,962	0,252	1,42
C09	2,0	2,0	0,277	0,788	0,386	0,654

^a concentração inicial do íon metálico, C₀; capacidade teórica de sorção em equilíbrio, q_c; constante de velocidade de pseudo-segunda ordem, k₂.

Em geral, q_{e,Zn} > q_{e,Ni}, Y_{R,Zn} > Y_{R,Ni} e k_{2,Zn} > k_{2,Ni}, tanto para os testes com *A. platensis* (Tabela 17 e 19) quanto para aqueles com *C. vulgaris* (Tabela 18 e 20); tal afirmação está em concordância com os resultados de afinidade obtidos em sistemas únicos (Item 5.3.1) e por aqueles obtidos com os fatores de separação (Item 5.3.2).

5.3.4 Capacidade e cinética de adsorção nos sistemas Ni²⁺/Pb²⁺

Nos sistemas binários Ni²⁺/Pb²⁺ nos quais a biomassa de *A. platensis* foi utilizada como bioissorvente (testes A10 a A18), o aumento progressivo de C_{0,Pb} de 0,50 para 2,0 mM, dado um valor fixo de C_{0,Ni}, levou a um aumento generalizado nos valores de q_{e,Pb} (Tabela 21). O inverso também foi válido; o aumento de C_{0,Ni}, dado um valor fixo de C_{0,Pb}, levou a um aumento de q_{e,Ni}, menos evidenciado quando C_{0,Pb} = 2,0 mM (Tabela 21). Em geral, não houve redução nos valores de q_{e,Pb} em decorrência dos diferentes valores de C_{0,Ni} (Tabela 21), indicando que a adsorção de íons bivalentes de chumbo não dependente da quantidade presente de íons bivalentes de níquel.

Tabela 21. Condições de experimentação e principais resultados de adsorção dos testes com a biomassa seca de *A. platensis* em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de níquel e chumbo ^a.

Testes	C _{0,Ni} (mM)	C _{0,Pb} (mM)	C _{e,Ni} (mM)	q _{e,Ni} (mmol g ⁻¹)	Y _{R,Ni} (%)	C _{e,Pb} (mM)	q _{e,Pb} (mmol g ⁻¹)	Y _{R,Pb} (%)
A10	0,50	0,50	0,421	0,0400	15,8	0,197	0,152	60,7
A11	0,50	1,0	0,421	0,0393	15,8	0,435	0,282	56,5
A12	0,50	2,0	0,415	0,0433	17,0	1,24	0,378	37,8
A13	1,0	0,50	0,807	0,0965	19,3	0,185	0,158	63,1
A14	1,0	1,0	0,806	0,0971	19,4	0,483	0,258	51,7
A15	1,0	2,0	0,807	0,0962	19,2	1,27	0,366	36,6
A16	2,0	0,50	1,49	0,256	25,6	0,203	0,148	59,4
A17	2,0	1,0	1,49	0,256	25,6	0,570	0,215	43,0
A18	2,0	2,0	1,63	0,184	18,4	1,25	0,373	37,3

^a concentração inicial do íon metálico, C₀; concentração do íon metálico em equilíbrio, C_e; capacidade de sorção em equilíbrio, q_e; eficiência de remoção de metais, Y_R.

Nos sistemas binários Ni²⁺/Pb²⁺ nos quais a biomassa de *C. vulgaris* foi utilizada como bioissorvente (testes C10 a C18), a adsorção dos íons bivalentes (Tabela 22) foi similar a aquela observada nos testes realizados com *A. platensis* (Tabela 21), tanto para os íons de níquel quanto para os de chumbo.

Quando os valores de C_T progressivamente aumentaram de 1,0 (teste 01) para 4,0 mM (teste 09), ambos os valores de q_{e,Ni} e q_{e,Pb} aumentaram menos do que o esperado por uma adsorção livre, indicando novamente uma saturação tanto de *A. platensis* (Tabela 21) quanto de *C. vulgaris* (Tabela 22).

Nos sistemas binários Ni²⁺/Pb²⁺ nos quais a biomassa de *A. platensis* foi utilizada como bioissorvente (testes A10 a A18), em decorrência da maior afinidade desta pelos íons bivalentes de chumbo, os valores de Y_{R,Ni} foram todos bastante baixos e similares; percebe-se um aumento discreto dos valores conforme o aumento de C_{0,Ni}, sendo que o valor máximo foi obtido quando C_{0,Ni} > C_{0,Pb} (Tabela 21). Esses resultados indicam que a presença de íons bivalentes de chumbo afeta extensivamente a adsorção dos íons de níquel. O inverso não é verdadeiro; os maiores valores de Y_{R,Pb} foram obtidos quando C_{0,Pb} = 0,50 mM, independentemente de C_{0,Ni} (Tabela 21). Considerando os sistemas binários Ni²⁺/Pb²⁺ nos quais a biomassa de *C. vulgaris* foi utilizada como bioissorvente (testes C10 a C18), os

maiores valores de $Y_{R,Ni}$ e $Y_{R,Pb}$ obtidos com o uso de *C. vulgaris* (Tabela 21) foram respectivamente cerca de 52 e 28 % maiores que aqueles obtidos com o uso de *A. platensis* (Tabela 22), e indicam que, em especial para os íons de níquel, a utilização da biomassa da microalga é muito mais vantajosa na remoção desses íons que a utilização da biomassa da cianobactéria, dado o sistema binário em questão.

Tabela 22. Condições de experimentação e principais resultados de adsorção dos testes com a biomassa seca de *C. vulgaris* em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de níquel e chumbo ^a.

Testes	$C_{0,Ni}$ (mM)	$C_{0,Pb}$ (mM)	$C_{e,Ni}$ (mM)	$q_{e,Ni}$ (mmol g ⁻¹)	$Y_{R,Ni}$ (%)	$C_{e,Pb}$ (mM)	$q_{e,Pb}$ (mmol g ⁻¹)	$Y_{R,Pb}$ (%)
C10	0,50	0,50	0,234	0,133	53,2	0,0621	0,219	87,6
C11	0,50	1,0	0,241	0,130	51,9	0,152	0,424	84,8
C12	0,50	2,0	0,312	0,0944	37,5	0,781	0,610	61,0
C13	1,0	0,50	0,562	0,219	43,8	0,0611	0,219	87,7
C14	1,0	1,0	0,557	0,222	44,3	0,156	0,422	84,4
C15	1,0	2,0	0,690	0,155	31,0	0,801	0,599	59,9
C16	2,0	0,50	1,17	0,415	41,5	0,0685	0,216	86,4
C17	2,0	1,0	1,17	0,413	41,3	0,193	0,403	80,7
C18	2,0	2,0	1,38	0,310	31,0	0,906	0,544	54,4

^a concentração inicial do íon metálico, C_0 ; concentração do íon metálico em equilíbrio, C_e ; capacidade de sorção em equilíbrio, q_e ; eficiência de remoção de metais, Y_R .

Em relação ao estudo cinético do sistema binário em questão, o aumento progressivo dos valores de C_0 de um determinado íon metálico, dado um valor fixo de C_0 do co-íon, levou em geral a uma diminuição na velocidade de adsorção de tal íon, no caso dos íons bivalentes de chumbo nos testes com a biomassa de *A. platensis* (Tabela 23), e no caso dos íons bivalentes tanto de chumbo como de níquel nos testes com a biomassa de *C. vulgaris* (Tabela 24). Já a adsorção de íons bivalentes de níquel nos testes com *A. platensis* apresentou um outro comportamento cinético. No caso dos testes A16 a A18, realizados com *A. platensis* e $C_{0,Ni} = 2,0$ mM, as diferentes concentrações de íons bivalentes de chumbo não alteraram a velocidade de adsorção dos íons de níquel (Tabela 23).

Tabela 23. Condições de experimentação e principais resultados da cinética de adsorção dos testes com a biomassa seca de *A. platensis* em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de níquel e chumbo ^a.

Testes	C _{0,Ni} (mM)	C _{0,Pb} (mM)	q _{c,Ni} (mmol g ⁻¹)	k _{2,Ni} (g mmol ⁻¹ min ⁻¹)	q _{c,Pb} (mmol g ⁻¹)	k _{2,Pb} (g mmol ⁻¹ min ⁻¹)
A10	0,50	0,50	0,0494	1,33	0,155	4,14
A11	0,50	1,0	0,0474	1,14	0,287	2,98
A12	0,50	2,0	0,0521	0,796	0,389	1,25
A13	1,0	0,50	0,0933	1,58	0,161	3,67
A14	1,0	1,0	0,104	1,44	0,263	1,97
A15	1,0	2,0	0,109	0,994	0,374	1,15
A16	2,0	0,50	0,270	0,700	0,149	4,36
A17	2,0	1,0	0,277	0,787	0,223	1,94
A18	2,0	2,0	0,188	0,765	0,375	1,28

^a concentração inicial do íon metálico, C₀; capacidade teórica de sorção em equilíbrio, q_c; constante de velocidade de pseudo-segunda ordem, k₂.

Quando C_T aumentou progressivamente de 1,0 (teste A10) para 4,0 mM (teste A18), os valores de k_{2,Ni} e k_{2,Pb} diminuíram, de certa forma (Tabela 23). A diminuição nos valores de k_{2,Ni} foi maior quando do aumento de C_T de 2,0 para 4,0 mM (Tabela 23), indicando uma saturação rápida dos sítios de ligação na superfície da biomassa de *A. platensis*. Já a diminuição nos valores de k_{2,Pb} foi maior quando do aumento de C_T de 1,0 para 2,0 mM (Tabela 23), indicando uma redução mais precipitada da velocidade de adsorção dos íons bivalentes de chumbo, provavelmente em decorrência do tamanho e da configuração eletrônica de tal íon. No uso de *C. vulgaris* como bioissorvente, os valores de k_{2,Ni} e k_{2,Pb} também diminuíram conforme o aumento de C_T (Tabela 24), porém tal diminuição pareceu mais equilibrada e indicou um menor nível de saturação da biomassa em questão.

Em geral, q_{e,Pb} > q_{e,Ni}, Y_{R,Pb} > Y_{R,Ni} e k_{2,Pb} > k_{2,Ni}, tanto para os testes com *A. platensis* (Tabela 21 e 23) quanto para aqueles com *C. vulgaris* (Tabela 22 e 24); tal afirmação está em concordância com os resultados de afinidade obtidos em sistemas únicos (Item 5.3.1) e por aqueles obtidos com os fatores de separação (Item 5.3.2).

Tabela 24. Condições de experimentação e principais resultados da cinética de adsorção dos testes com a biomassa seca de *C. vulgaris* em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de níquel e chumbo ^a.

Testes	C _{0,Ni} (mM)	C _{0,Pb} (mM)	q _{c,Ni} (mmol g ⁻¹)	k _{2,Ni} (g mmol ⁻¹ min ⁻¹)	q _{c,Pb} (mmol g ⁻¹)	k _{2,Pb} (g mmol ⁻¹ min ⁻¹)
C10	0,50	0,50	0,135	2,55	0,221	6,07
C11	0,50	1,0	0,131	1,92	0,429	3,18
C12	0,50	2,0	0,102	1,40	0,614	0,977
C13	1,0	0,50	0,226	1,42	0,222	5,97
C14	1,0	1,0	0,223	1,40	0,424	3,20
C15	1,0	2,0	0,144	1,52	0,605	0,607
C16	2,0	0,50	0,426	0,808	0,218	6,08
C17	2,0	1,0	0,421	0,601	0,408	3,86
C18	2,0	2,0	0,322	0,598	0,561	0,847

^a concentração inicial do íon metálico, C₀; capacidade teórica de sorção em equilíbrio, q_c; constante de velocidade de pseudo-segunda ordem, k₂.

5.3.5 Capacidade e cinética de adsorção nos sistemas Zn²⁺/Pb²⁺

Nos sistemas binários Zn²⁺/Pb²⁺ nos quais a biomassa de *A. platensis* foi utilizada como bioissorvente (testes A19 a A27), o aumento progressivo de C_{0,Pb} de 0,50 para 2,0 mM, dado um valor fixo de C_{0,Zn}, levou a um aumento generalizado nos valores de q_{e,Pb} e uma correspondente diminuição nos valores de q_{e,Zn} (Tabela 25). O inverso não é verdadeiro, pois a crescente concentração dos íons de zinco não afeta de maneira diferenciada a adsorção dos íons de chumbo; nos testes A19, A22 e A25, por exemplo, q_{e,Pb} independe de C_{0,Zn} (Tabela 25). Em decorrência da maior afinidade da biomassa pelos íons de chumbo, os maiores valores de Y_{R,Pb} foram obtidos quando C_{0,Pb} = 0,50 mM, independentemente de C_{0,Zn} (Tabela 25). As maiores variações nos valores de Y_{R,Zn}, por sua vez, foram observadas quando C_{0,Pb} = 0,5 mM (Tabela 25), resultados estes que confirmam a maior afinidade da biomassa da cianobactéria pelos íons bivalentes de chumbo. No caso dos sistemas binários nos quais a biomassa de *C. vulgaris* foi utilizada como bioissorvente (testes C19 a C27), o mesmo comportamento em relação à capacidade de sorção no equilíbrio pode ser observado (Tabela 26). Os valores de Y_{R,Pb} foram, em geral, maiores que os de Y_{R,Zn} (Tabela 26).

Tabela 25. Condições de experimentação e principais resultados de adsorção dos testes com a biomassa seca de *A. platensis* em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de zinco e chumbo ^a.

Testes	C _{0,Zn} (mM)	C _{0,Pb} (mM)	C _{e,Zn} (mM)	q _{e,Zn} (mmol g ⁻¹)	Y _{R,Zn} (%)	C _{e,Pb} (mM)	q _{e,Pb} (mmol g ⁻¹)	Y _{R,Pb} (%)
A19	0,50	0,50	0,236	0,132	52,9	0,146	0,177	70,7
A20	0,50	1,0	0,270	0,115	45,9	0,430	0,285	57,0
A21	0,50	2,0	0,314	0,0934	37,3	1,23	0,382	38,2
A22	1,0	0,50	0,474	0,263	52,6	0,147	0,177	70,6
A23	1,0	1,0	0,555	0,223	44,5	0,497	0,252	50,3
A24	1,0	2,0	0,633	0,183	36,7	1,23	0,384	38,4
A25	2,0	0,50	1,27	0,365	36,5	0,146	0,177	70,7
A26	2,0	1,0	1,29	0,355	35,5	0,518	0,241	48,2
A27	2,0	2,0	1,34	0,327	32,7	1,258	0,371	37,1

^a concentração inicial do íon metálico, C₀; concentração do íon metálico em equilíbrio, C_e; capacidade de sorção em equilíbrio, q_e; eficiência de remoção de metais, Y_R.

Tabela 26. Condições de experimentação e principais resultados de adsorção dos testes com a biomassa seca de *C. vulgaris* em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de zinco e chumbo ^a.

Testes	C _{0,Zn} (mM)	C _{0,Pb} (mM)	C _{e,Zn} (mM)	q _{e,Zn} (mmol g ⁻¹)	Y _{R,Zn} (%)	C _{e,Pb} (mM)	q _{e,Pb} (mmol g ⁻¹)	Y _{R,Pb} (%)
C19	0,50	0,50	0,153	0,173	69,4	0,0563	0,222	88,8
C20	0,50	1,0	0,188	0,156	62,5	0,150	0,425	85,0
C21	0,50	2,0	0,249	0,125	50,1	0,775	0,613	61,3
C22	1,0	0,50	0,355	0,323	64,5	0,0595	0,220	88,1
C23	1,0	1,0	0,384	0,308	61,6	0,144	0,428	85,6
C24	1,0	2,0	0,475	0,262	52,5	0,773	0,613	61,3
C25	2,0	0,50	0,913	0,543	54,3	0,0601	0,220	88,0
C26	2,0	1,0	0,911	0,545	54,5	0,143	0,424	85,7
C27	2,0	2,0	1,07	0,465	46,5	0,775	0,613	61,3

^a concentração inicial do íon metálico, C₀; concentração do íon metálico em equilíbrio, C_e; capacidade de sorção em equilíbrio, q_e; eficiência de remoção de metais, Y_R.

Quando C_T aumentou progressivamente de 0,50 (testes 19) para 4,0 mM (testes 27), ambos os valores de $q_{e,Zn}$ e $q_{e,Pb}$ aumentaram menos do que o esperado, indicando uma saturação das biomassas de *A. platensis* (Tabela 25) e de *C. vulgaris* (Tabela 26), sendo que para esta última, a saturação foi mais evidente no caso da adsorção dos íons bivalentes de zinco. De fato, a diferença de valores de $Y_{R,Pb}$ nos testes C19 ($C_T = 1,0$ mM) e C23 ($C_T = 2,0$ mM) foi mínima (Tabela 26).

Nos sistemas nos quais a biomassa de *A. platensis* foi utilizada, o aumento progressivo de C_0 de um determinado íon metálico, dado um valor fixo de C_0 do co-íon, levou em geral a uma diminuição na velocidade de adsorção do íon em questão (Tabela 27). Nos sistemas nos quais a biomassa de *C. vulgaris* foi utilizada, o mesmo comportamento de k_2 foi observado apenas para a adsorção dos íons bivalentes de chumbo (Tabela 28). Apesar da eficiência de remoção de íons de chumbo não ter sido afetada de maneira significativa pela presença de um íon metálico competidor, fica evidente que a velocidade de adsorção deste íon foi, o que demonstra o controle cinético do processo de adsorção.

Tabela 27. Condições de experimentação e principais resultados da cinética de adsorção dos testes com a biomassa seca de *A. platensis* em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de zinco e chumbo ^a.

Testes	$C_{0,Zn}$ (mM)	$C_{0,Pb}$ (mM)	$q_{c,Zn}$ (mmol g ⁻¹)	$k_{2,Zn}$ (g mmol ⁻¹ min ⁻¹)	$q_{c,Pb}$ (mmol g ⁻¹)	$k_{2,Pb}$ (g mmol ⁻¹ min ⁻¹)
A19	0,50	0,50	0,133	4,49	0,178	4,01
A20	0,50	1,0	0,118	4,20	0,290	3,01
A21	0,50	2,0	0,0913	3,38	0,378	1,63
A22	1,0	0,50	0,260	3,73	0,181	3,88
A23	1,0	1,0	0,224	3,42	0,251	2,89
A24	1,0	2,0	0,189	1,81	0,381	1,14
A25	2,0	0,50	0,378	1,40	0,176	3,69
A26	2,0	1,0	0,361	1,39	0,243	2,64
A27	2,0	2,0	0,331	1,37	0,352	1,84

^a concentração inicial do íon metálico, C_0 ; capacidade teórica de sorção em equilíbrio, q_c ; constante de velocidade de pseudo-segunda ordem, k_2 .

Em geral, $q_{e,Pb} > q_{e,Zn}$, $Y_{R,Pb} > Y_{R,Zn}$ e $k_{2,Pb} > k_{2,Zn}$, tanto para os testes com *A. platensis* (Tabela 21 e 23) quanto para aqueles com *C. vulgaris* (Tabela 22 e 24); tal afirmação está em concordância com os resultados de afinidade obtidos em sistemas únicos (Item 5.3.1) e por aqueles obtidos com os fatores de separação (Item 5.3.2).

Tabela 28. Condições de experimentação e principais resultados da cinética de adsorção dos testes com a biomassa seca de *C. vulgaris* em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de zinco e chumbo ^a.

Testes	$C_{0,Zn}$ (mM)	$C_{0,Pb}$ (mM)	$q_{e,Zn}$ (mmol g ⁻¹)	$k_{2,Zn}$ (g mmol ⁻¹ min ⁻¹)	$q_{e,Pb}$ (mmol g ⁻¹)	$k_{2,Pb}$ (g mmol ⁻¹ min ⁻¹)
C19	0,50	0,50	0,178	2,09	0,222	6,01
C20	0,50	1,0	0,163	2,01	0,430	2,93
C21	0,50	2,0	0,117	1,90	0,628	0,628
C22	1,0	0,50	0,328	2,48	0,221	5,81
C23	1,0	1,0	0,315	2,18	0,435	2,29
C24	1,0	2,0	0,269	1,54	0,657	0,324
C25	2,0	0,50	0,546	1,09	0,221	5,79
C26	2,0	1,0	0,553	0,868	0,436	2,30
C27	2,0	2,0	0,484	0,733	0,650	0,424

^a concentração inicial do íon metálico, C_0 ; capacidade teórica de sorção em equilíbrio, q_e ; constante de velocidade de pseudo-segunda ordem, k_2 .

5.3.6 Comparação da adsorção em sistemas únicos e múltiplos

Comparando-se os resultados de capacidade de adsorção das biomassas de *A. platensis* e *C. vulgaris* em sistemas únicos e múltiplos contendo os íons bivalentes de níquel, zinco e chumbo, foi possível determinar que tais íons apresentaram comportamento antagônico, pois sua adsorção em sistemas binários foi menos eficiente que quando da ausência de um co-íon, em sistemas únicos. Enquanto que a presença de íons bivalentes de chumbo afetou a adsorção dos íons de níquel e zinco de maneira significativa (Gráfico 19, como exemplo), quase que independentemente da concentração de tais íons, o efeito destes na adsorção de íons de chumbo foi mínimo na maioria dos casos (Gráfico 20, como exemplo), como esperado pela maior afinidade de ambas as biomassas por tal íon metálico.

Gráfico 19. Concentração de íons Zn^{2+} adsorvidos à superfície da biomassa de *A. platensis* em função do tempo (t) em sistemas único (símbolo vazio, FERREIRA et al., 2011) e binários (símbolos cheios) – na presença de 0,50 mM Pb^{2+} (quadrados), 1,0 mM Pb^{2+} (círculos) e 2,0 mM Pb^{2+} (triângulos). Testes com concentração inicial de 1,0 mM Zn^{2+} .

Gráfico 20. Concentração de íons Pb^{2+} adsorvidos à superfície da biomassa de *A. platensis* em função do tempo (t) em sistemas único (símbolo vazio, FERREIRA et al., 2011) e binários

(símbolos cheios) – na presença de 0,50 mM Ni^{2+} (quadrados), 1,0 mM Ni^{2+} (círculos) e 2,0 mM Ni^{2+} (triângulos). Testes com concentração inicial de 1,0 mM Pb^{2+} .

De uma maneira geral, as reduções nas velocidades de adsorção foram muito maiores que as reduções nas capacidades de sorção, indicando que o fenômeno apresentou um controle cinético marcante. Adicionalmente, em decorrência do melhor desempenho, em geral, de *C. vulgaris* como bioissorvente, todas as reduções nos valores de q_e , Y_R e k_2 foram mais pronunciadas nos testes realizados com *A. platensis*.

5.3.7 Isotermas de equilíbrio de sistemas binários

Com o objetivo de avaliar os modelos de isotermas de equilíbrio de sistemas binários, os valores teóricos de capacidade de sorção conforme o modelo de Langmuir, q_L , e Freundlich, q_F , foram comparados aos valores experimentais q_e . Tais valores estimados corresponderam bem aos experimentais quando referentes aos dados coletados da adsorção dos íons bivalentes de níquel e zinco, sendo que o desvio padrão máximo para os modelos de Langmuir e Freundlich foi 9 e 12 %, respectivamente. Esses resultados indicam que ambos os modelos representam bem o fenômeno de adsorção de tais íons metálicos pelas biomassas de *A. platensis* e *C. vulgaris*, e que o fenômeno de adsorção no caso apresentou comportamento intermediário entre os mecanismos camada única (Langmuir) e múltipla (Freundlich). No caso da adsorção dos íons bivalentes de chumbo, os modelos selecionados superestimaram a adsorção em 19 e 13 %, respectivamente para Langmuir e Freundlich, o que sugere que os modelos selecionados não descrevem bem o fenômeno de adsorção competitiva quando os íons metálicos tem uma grande diferença de afinidade.

De acordo com a Tabela 29, o valor teórico de capacidade máxima de sorção, q_m , estimado pelo modelo de Langmuir, para a adsorção de íons bivalentes de níquel por *A. platensis* aumentou conforme a diminuição da concentração inicial do co-íon. Por outro lado, no caso dos íons bivalentes de zinco, não houve influência do tipo nem da concentração do co-íon. Para *C. vulgaris*, os valores de q_m obtidos na adsorção dos íons bivalentes de níquel e zinco diminuíram com o aumento da concentração inicial do co-íon, apenas se chumbo não foi um deles. Os valores da constante de Langmuir, K_L , calculados para todos os sistemas binários, diminuíram com o aumento da concentração inicial do co-íon, o que sugere que a afinidade da biomassa por um íon metálico foi altamente dependente da quantidade de co-íons presentes em solução. Como esperado, a ordem de afinidade definida foi a mesma que aquela

dos sistemas únicos (Item 5.3.1): $\text{Pb}^{2+} \gg \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$, e novamente *C. vulgaris* apresentou maior afinidade por tais íons metálicos que *A. platensis*.

Tabela 29. Condições de experimentação e resultados do estudo das isothermas de equilíbrio de Langmuir dos testes com as biomassas de *A. platensis* e *C. vulgaris* em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de níquel, zinco e chumbo ^a.

Sistemas Binários	<i>Arthrospira platensis</i>		<i>Chlorella vulgaris</i>	
	q_m (mmol g ⁻¹)	K_L (L mmol ⁻¹)	q_m (mmol g ⁻¹)	K_L (L mmol ⁻¹)
Ni^{2+}	+ 0,50 Zn^{2+}	0,633	0,154	0,741
	+ 1,0 Zn^{2+}	0,531	0,104	0,672
	+ 2,0 Zn^{2+}	0,380	0,0475	0,590
	+ 0,50 Pb^{2+}	0,708	0,196	0,745
	+ 1,0 Pb^{2+}	0,569	0,133	0,311
	+ 2,0 Pb^{2+}	0,414	0,0444	0,790
Zn^{2+}	+ 0,50 Ni^{2+}	0,576	0,588	0,906
	+ 1,0 Ni^{2+}	0,580	0,525	0,866
	+ 2,0 Ni^{2+}	0,599	0,400	0,838
	+ 0,50 Pb^{2+}	0,600	0,569	0,920
	+ 1,0 Pb^{2+}	0,612	0,472	0,601
	+ 2,0 Pb^{2+}	0,603	0,207	0,760
Pb^{2+}	+ 0,50 Ni^{2+}	0,507	0,611	0,662
	+ 1,0 Ni^{2+}	0,495	0,468	0,655
	+ 2,0 Ni^{2+}	0,475	0,282	0,662
	+ 0,50 Zn^{2+}	0,537	0,758	0,668
	+ 1,0 Zn^{2+}	0,531	0,666	0,668
	+ 2,0 Zn^{2+}	0,525	0,543	0,661

^a capacidade teórica máxima de sorção em equilíbrio, q_m ; constante de Langmuir, K_L .

De acordo com a Tabela 30, a constante de Freundlich para os íons bivalentes de níquel e zinco foi, em geral, dependente do tipo de co-íon, mas não da concentração inicial deste. Por outro lado, um aumento em $C_{0,\text{Pb}}$ afetou a afinidade da biomassa por íons bivalentes de zinco, mas não pelos de níquel. No entanto, levando em consideração os valores de K_F em

diferentes concentrações como uma média, foi evidente que a afinidade de *A. platensis* por íons bivalentes de chumbo, comparada com os sistemas únicos (Tabela 16), não foi afetada de maneira alguma pela presença dos dois outros íons metálicos, enquanto que aquela de *C. vulgaris* por íons bivalentes de níquel e zinco decresceu 11 e 6 %, respectivamente. Como esperado pelas considerações prévias, as maiores reduções de K_F induzidas pela presença dos íons bivalentes de chumbo foram observadas com *A. platensis* para zinco, 22 %, e com *C. vulgaris* para níquel, 31 %.

Tabela 30. Condições de experimentação e resultados do estudo das isotermas de equilíbrio de Freundlich dos testes com as biomassas de *A. platensis* e *C. vulgaris* em sistemas binários de íons metálicos bivalentes de níquel, zinco e chumbo ^a.

Sistemas Binários		<i>Arthrospira platensis</i>		<i>Chlorella vulgaris</i>	
		K _F (mmol ^{1-1/n} L ^{1/n} g ⁻¹)	n	K _F (mmol ^{1-1/n} L ^{1/n} g ⁻¹)	n
Ni ²⁺	+ 0,50 Zn ²⁺	0,195	1,20	0,319	1,32
	+ 1,0 Zn ²⁺	0,195	1,22	0,336	1,41
	+ 2,0 Zn ²⁺	0,188	1,20	0,345	1,43
	+ 0,50 Pb ²⁺	0,214	1,34	0,257	1,14
	+ 1,0 Pb ²⁺	0,214	1,35	0,266	1,22
	+ 2,0 Pb ²⁺	0,210	1,31	0,235	1,11
Zn ²⁺	+ 0,50 Ni ²⁺	0,338	1,97	0,512	1,59
	+ 1,0 Ni ²⁺	0,299	1,54	0,533	1,74
	+ 2,0 Ni ²⁺	0,317	1,65	0,489	1,55
	+ 0,50 Pb ²⁺	0,333	1,60	0,530	1,71
	+ 1,0 Pb ²⁺	0,287	1,30	0,485	1,52
	+ 2,0 Pb ²⁺	0,240	1,24	0,355	1,18
Pb ²⁺	+ 0,50 Ni ²⁺	0,380	3,20	0,564	2,37
	+ 1,0 Ni ²⁺	0,381	3,03	0,564	2,33
	+ 2,0 Ni ²⁺	0,380	2,76	0,513	1,90
	+ 0,50 Zn ²⁺	0,380	3,14	0,594	2,95
	+ 1,0 Zn ²⁺	0,380	3,12	0,568	2,46
	+ 2,0 Zn ²⁺	0,381	3,12	0,577	2,44

^a constante de Freundlich, K_F ; intensidade de adsorção, n.

O parâmetro n do modelo de Freundlich, que representa a intensidade de adsorção, foi sempre maior que 1, o que significa que os determinados íons metálicos foram eficientemente adsorvidos por ambas as biomassas de *A. platensis* e *C. vulgaris*. No entanto, como esperado, tal intensidade foi muito maior para os íons bivalentes de chumbo. E os valores similares de n para os íons bivalentes de níquel e zinco também significa que esses íons se ligam às biomassas com intensidades similares. Por fim, as maiores reduções em relação ao sistema único (Tabela 16) foram exercidas pela presença de íons bivalentes de chumbo e zinco na adsorção em *A. platensis* (43 %), e de íons níquel e chumbo na adsorção em *C. vulgaris* (40 %).

5.3.8 Adsorção em sistema ternário ($Ni^{2+}/Zn^{2+}/Pb^{2+}$)

Dois testes adicionais simples foram realizados com $C_0 = 1,0$ mM de cada íon metálico selecionado neste trabalho, de forma que $C_T = 3,0$ mM, utilizando cada um as biomassas secas de *A. platensis* e *C. vulgaris* como biossorventes (Gráfico 21).

Gráfico 21. Média dos valores da capacidade de sorção no equilíbrio (q_e) dos íons bivalentes de níquel (quadrados), zinco (círculos) e chumbo (triângulos), nos testes com as biomassas de *A. platensis* (símbolos cheios) e *C. vulgaris* (símbolos vazios): sistemas únicos (a, FERREIRA et al., 2011), sistemas binários (b) e sistema ternário (c).

Os valores de q_e referentes a todos os íons metálicos diminuíram, de certa forma, de acordo com o aumento do número de íons competidores. Por exemplo, o valor de $q_{e,Zn}$ nos testes nos quais *A. platensis* foi utilizada foi de 0,285 mmol g⁻¹ no sistema único (Tabela 14), 0,201 e 0,223 mmol g⁻¹ quando da presença dos íons bivalentes de níquel (teste A05, Tabela 17) e chumbo (teste A23, Tabela 25), respectivamente, e 0,063 mmol g⁻¹ quando da presença de ambos (sistema ternário).

Os mecanismos da adsorção de três íons metálicos simultaneamente é muito mais complexo que aquele característico de sistemas binários, em decorrência das interações químicas entre os íons e entre estes e o bioissorvente; é um fenômeno que é extremamente dependente do rádio iônico e da eletronegatividade dos átomos (AL-RUB et al., 2006). Testes adicionais são necessários para esclarecer os mecanismos de bioadsorção em sistemas ternários.

5.3.9 Caracterização das biomassas de *A. platensis* e *C. vulgaris*

A análise de espectrofotometria de infravermelho das biomassas livres, ou seja, sem íons metálicos adsorvidos, de *A. platensis* e *C. vulgaris* (Gráficos 22 e 23) já foi apresentada em trabalho anterior (FERREIRA et al., 2011), e algumas das características encontradas foram resumidas aqui.

Gráfico 22. Espectro infravermelho (absorbância em função do número de ondas) da biomassa de *A. platensis*, livre (a, FERREIRA et al., 2011) e carregada com íons metálicos: Ni²⁺/Zn²⁺ (b), Ni²⁺/Pb²⁺ (c), Zn²⁺/Pb²⁺ (d), e Ni²⁺/Zn²⁺/Pb²⁺ (e).

Gráfico 23. Espectro infravermelho (absorbância em função do número de ondas) da biomassa de *C. vulgaris*, livre (a, FERREIRA et al., 2011) e carregada com íons metálicos:

$\text{Ni}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ (b), $\text{Ni}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ (c), $\text{Zn}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ (d), e $\text{Ni}^{2+}/\text{Zn}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ (e).

Na região de alta frequência do espectro foram detectados: picos em 2923 e 2852 cm^{-1} , que representam os estiramentos C–H das cadeias alquila; banda fraca em 3010 cm^{-1} , que caracteriza os grupos C–H insaturados relacionados às frações lipídica e fosfolipídica das biomassas; e ombros largo e fraco em 3300 e 3080 cm^{-1} , que representam os estiramentos N–H dos grupos possuidores de aminas ou amidas. Na região de baixa frequência do espectro foram detectadas bandas em: 1742 cm^{-1} , que representa os estiramentos C=O característicos dos ésteres presentes nos glicerídeos; 1280, 1548 e 1650 cm^{-1} , que caracterizam os grupos amida; e 1416 cm^{-1} , que representa o estiramento assimétrico COO– dos grupos carboxila, mascarado pela banda forte das amidas em 1650 cm^{-1} . Bandas largas e complexas também foram detectadas no intervalo 1200-1050 cm^{-1} , e são relacionadas com os estiramentos C–C e C=O dos grupos hidroxila presentes nos polissacarídeos. Os espectros de *A. platensis* e *C. vulgaris* são bastante similares; as bandas relacionadas aos lipídeos são mais evidentes na biomassa da microalga *C. vulgaris* (Gráfico 23), em decorrência do maior conteúdo lipídico das células eucarióticas (triglicérides) em comparação com as células da cianobactéria *A. platensis* (Gráfico 22), de característica procariótica (fosfoglicérides).

Os espectros realizados a partir da biomassa de *C. vulgaris* carregada, ou seja, após os testes de adsorção, apresentaram diferenças nas bandas em relação ao espectro da biomassa livre (Gráfico 23). A adsorção de íons metálicos em sistemas binários levou à diminuição do ombro largo em 3300 cm^{-1} , em decorrência da interação dos íons com os grupos amina e amida. A biomassa carregada com $\text{Zn}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ afetou de maneira menos extensiva as bandas N–

H, provavelmente por causa do efeito antagônico que tais íons metálicos apresentam na adsorção um do outro. Na região de baixa frequência do espectro, especialmente no caso da biomassa carregada com $\text{Ni}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$, houve uma redução geral nas principais bandas de intensidade, e uma diminuição das bandas 1742 cm^{-1} (carbonila) e 1650 cm^{-1} (amida e carboxila). A banda referente ao estiramento assimétrico dos grupos carboxila também sofreu uma redução. Adicionalmente, a adsorção de íons metálicos em sistema ternário levou à diminuição mais evidente da intensidade de todas as bandas em geral. Por outro lado, a detecção de bandas $\text{C}=\text{O}$ quase que não perturbadas sugeriu que a fração lipídica da biomassa de *C. vulgaris* não participou de maneira significativa da adsorção dos íons metálicos.

De maneira geral, a comparação dos espectros realizados a partir da biomassa de *C. vulgaris* livre e carregada possibilitou a conclusão de que a adsorção de íons metálicos afetou os grupos amida e amina, principalmente, além dos ânions carboxilato e os grupos hidroxila. A presença de íons bivalentes de chumbo afetou a fração éster do componente lipídico quando dos sistemas binários, porém não no sistema ternário.

Os espectros realizados a partir da biomassa de *A. platensis* carregada não apresentaram diferenças grandes nas bandas em relação ao espectro da biomassa livre (Gráfico 22). Os mesmos grupos funcionais estão envolvidos na adsorção dos íons metálicos, porém não foi encontrada nenhuma indicação de preferência na adsorção (SUN et al., 2008; SWAYAMPAKULA et al., 2009).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho tratou da avaliação do potencial da utilização do dióxido de carbono proveniente da fermentação alcoólica no cultivo *Spirulina (Arthrospira) platensis*, visando demonstrar a possibilidade da utilização de um gás efluente na produção de biomassa microbiana com valor comercial. A fim de possibilitar a boa avaliação da influência da origem fonte de carbono, foi necessário otimizar uma série de outros parâmetros dos cultivos desta cianobactéria.

Assim, os ensaios padrão (ensaios 01-02) foram realizados com os processos descontínuo e descontínuo alimentado de cultivo, com uma ou duas fontes de nitrogênio, com e sem controle de pH, com o objetivo de avaliar qual conjunto de condições experimentais beneficiaria o crescimento de *A. platensis* em tanques abertos. Como esperado, os resultados indicaram que a associação de fontes de nitrogênio elevou a produtividade celular dos ensaios, pois possibilitou a diminuição do tempo de cultivo e o aumento da concentração celular final. Os ensaios de adaptação (ensaios 03-05) mostraram que o controle dos valores de pH durante o cultivo e o aumento da concentração inicial de células desconfigurou o tempo de alimentação da fonte amoniacal de nitrogênio. Portanto, fez-se necessária a realização dos ensaios preliminares A (ensaios 06-15) e B (ensaios 16-24), nos quais foram estudados diversos tempos de alimentação (7 a 15 dias) e faixas de controle de pH (9,0, 9,7 e 10,4 $\pm$ 0,3). Tais ensaios permitiram a identificação das condições de cultivo que possibilitaram um melhor crescimento celular por parte da cianobactéria *A. platensis*: distribuição da fonte amoniacal de nitrogênio em quantidades exponencialmente crescentes no decorrer de 13 dias, e controle de pH por volta de 9,0. Tais condições foram então fixadas para os próximos grupos de ensaios.

Nos ensaios principais A (ensaios 25-28) foi confirmado que a intensidade luminosa de 156 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ é a melhor opção para ser aplicada ao início dos cultivos. Com a intenção de estimular mais ainda o crescimento da cianobactéria, optou-se então por aumentar tal parâmetro para 192 ou 252 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante os cultivos, nos dias 5, 8 ou 11, com base no fato de que maiores intensidades luminosas seriam mais adequadas para suprir as necessidades energéticas de cultivos com alta densidade celular. Com tais variáveis foram realizados os ensaios principais B (ensaios 29-40), nos quais foram utilizados dióxido de carbono proveniente de cilindros e da fermentação alcoólica, e foi possível avaliar, finalmente, a possibilidade de utilização de gás efluente no cultivo de microrganismos fotossintéticos, em especial *A. platensis*.

Em relação ao estudo da utilização das biomassas de *A. platensis* e *C. vulgaris* na adsorção de íons metálicos de níquel, zinco e chumbo, determinou-se que ambos os bioissorventes apresentaram a seguinte ordem de afinidade: $Pb^{2+} > Zn^{2+} > Ni^{2+}$. Em geral, a biomassa de *A. platensis* é menos eficiente na adsorção de metais que a biomassa de *C. vulgaris*, dado que os resultados de capacidade de sorção obtidos nos testes realizados com a cianobactéria foram menores que aqueles obtidos nos testes com a microalga. A avaliação da adsorção nos sistemas binários Ni^{2+}/Zn^{2+} , Ni^{2+}/Pb^{2+} e Zn^{2+}/Pb^{2+} mostrou que o fenômeno foi de característica antagônica, pois a adsorção de um determinado íon metálico em sistema binário foi menor que aquela do mesmo em sistema único. No entanto, o efeito da presença dos íons bivalentes de níquel e zinco na adsorção dos íons de chumbo não foi, na maioria dos testes, significativo. O estudo cinético mostrou que a velocidade de adsorção de um determinado íon metálico é bastante reduzida quando da presença de um co-íon. O estudo das isotermas de equilíbrio indicou que a adsorção dos íons níquel e zinco, principalmente, se deu de maneira intermediária a um comportamento de uma única ou mais camadas, determinados pelos modelos de Langmuir e Freundlich. Por fim, a caracterização das biomassas de *A. platensis* e *C. vulgaris* após a adsorção sugeriu que os íons metálicos se ligam aos grupos funcionais amina, amida, ésteres e carboxilas presentes na superfície de tais bioissorventes.

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho, a cianobactéria *Spirulina (Arthrospira) platensis* foi cultivada em tanques abertos com a utilização de dióxido de carbono como fonte de carbono e forma de controle de pH. As principais variáveis dos cultivos foram: origem do dióxido de carbono (cilindros ou fermentação alcoólica), intensidade luminosa (156, 192 e 252 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e tempo de alteração da intensidade luminosa (5°, 8° e 11° dia). Os melhores resultados cinéticos (concentração celular máxima de 3954 mg L^{-1} , produtividade celular de 253 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) e de conteúdo da biomassa (teor final de clorofila de 4,2 mg g^{-1} , teor de proteínas de 28 %, teor de lipídeos de 19 %) foram obtidos com aumento da intensidade luminosa de 156 para 192 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no 8° dia de cultivo, nos ensaios realizados com dióxido de carbono proveniente de cilindros. Nos ensaios correspondentes realizados com dióxido de carbono proveniente da fermentação alcoólica, foram obtidos os seguintes resultados: concentração celular máxima de 3298 mg L^{-1} , produtividade celular de 206 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$, teor final de clorofila de 4,0 mg g^{-1} , e teores de proteínas e lipídeos de 28 e 17 %, respectivamente.

Os ensaios de *A. platensis* em tanques abertos com auxílio do dióxido de carbono proveniente da fermentação alcoólica mostraram viável a utilização desse gás efluente no cultivo da selecionada cianobactéria. Sugere-se um estudo mais aprofundado da influência desse gás no metabolismo e crescimento de tal microrganismo fotossintetizante, a fim de possibilitar a obtenção de resultados de concentração e produtividade celulares tão altos quanto aqueles obtidos quando do uso de gás carbônico puro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULQADER, G.; BARSANTI, L.; TREDICI, M. R. Harvest of *Arthrospira platensis* from Lake Kossorom (Chad) and its household usage among the Kanembu. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3-5, p. 493-498, 2000.
- ABEDIN, R. M. A.; TAHA, H. M. Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and green microalgae. Evaluation of medium components by Plackett-Burman design for antimicrobial activity of *Spirulina platensis*. **Global Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 3, n. 1, p. 22-31, 2008.
- ABELIOVICH, A.; AZOV, Y. Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 31, n. 6, p. 801-806, 1976.
- ABOU-SHANAB, R. A. I.; MATTER, I. A.; KIM, A.-N.; OH, Y.-K.; CHOI, J.; JEON, B.-H. Characterization and identification of lipid-producing microalgae species isolated from a freshwater lake. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 3079-3085, 2011.
- AHLGREN, G.; GUSTAFSSON, I.-B.; BOBERG, M. Fatty acid content and chemical composition of freshwater microalgae. **Journal of Phycology**, v. 28, n. 1, p. 37-50, 1992.
- AKSU, Z.; AÇIKEL, Ü. Modelling of a single-staged bioseparation process for simultaneous removal of iron(III) and chromium(VI) by using *Chlorella vulgaris*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, n. 3, p. 229-238, 2000.
- AKSU, Z.; DÖNMEZ, G. Binary biosorption of cadmium(II) and nickel(II) onto dried *Chlorella vulgaris*: co-ion effect on mono-component isotherm parameters. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 860-868, 2006.
- ALGAE ENERGY. Disponível em: <http://algae-energy.co.uk/>. Acessado em: 25 Ago. 2011.
- AL-QUNAIBIT, M.; KHALIL, M.; AL-WASSIL, A. The effect of solvents on metal ion adsorption by the alga *Chlorella vulgaris*. **Chemosphere**, v. 60, n. 3, p. 412-418, 2005.
- AL-RUB, F. A.; EL-NAAS, M. H.; ASHOUR, I.; AL-MARZOUQI, M. Biosorption of copper on *Chlorella vulgaris* from single, binary and ternary metal aqueous solutions. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 457-464, 2006.

- ANAGA, A.; ABU, G. O. A laboratory-scale cultivation of *Chlorella* and *Spirulina* using waste effluent from a fertilizer company in Nigeria. **Bioresource Technology**, v. 58, n. 1, p. 93-95, 1996.
- ANDRICH, G.; ZINNAI, A.; NESTI, U.; VENTURI, F.; FIORENTINI, R. Supercritical fluid extraction of oil from microalga *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Acta Alimentaria**, v. 35, n. 2, p. 195-203, 2006.
- AOAC Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 14 ed. Arlington: AOAC, 1984. 1141 p.
- ARAD, S. (M.); YARON, A. Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 3-4, n. 22, p. 92-97, 1992.
- ATKINSON, B. W.; BUX, F.; KASAN, H. C. Considerations for application of biosorption technology to remediate metal-contaminated industrial effluents. **Water S.A.**, v. 24, n. 2, p. 129-135, 1998.
- BAI, R. S.; ABRAHAM, T. E. Studies on enhancement of Cr(VI) biosorption by chemically modified biomass of *Rhizopus nigricans*. **Water Research**, v. 36, n. 5, p. 1224-1236, 2002.
- BARBOSA, M. J.; JANSSEN, M.; HAM, N.; TRAMPER, J.; WIJFFELS, R. H. Microalgae cultivation in air-lift reactors: modeling biomass yield and growth rate as a function of mixing frequency. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 2, p. 170-179, 2003.
- BARCLAY, W. R.; MEAGER, K. M.; ABRIL, J. R. Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 2, p. 123-129, 1994.
- BECKER, E. W. Algae mass cultivation – production and utilization. **Processes in Biochemistry**, v. 16, n. 5, p. 10-14, 1981.
- BELAY, A. Mass culture of *Spirulina* outdoors: the earthrise farms experience. In: VONSHAK, A. (Ed.). ***Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology***. London: Taylor and Francis, 1997. Cap. 8, p. 131-158.
- BELAY, A. The potential application of *Spirulina (Arthrospira)* as a nutritional and therapeutic supplement in health management. **The Journal of the American Nutraceutical Association**, v. 5, n. 2, p. 27-48, 2002.

- BEN-AMOTZ, A.; SHAISH, A.; AVRON, M. The biotechnology of cultivating *Dunaliella* for production of β -carotene rich algae. **Bioresource Technology**, v. 38, n. 2-3, p. 233-235, 1991.
- BERMEJO, P.; PIÑERO, E.; VILLAR, A. M. Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v. 110, n. 2, p. 436-445, 2008.
- BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Teor de clorofila e perfil de sais minerais de *Chlorella vulgaris* cultivada em solução hidropônica residual. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 54-58, 2008.
- BEZERRA, R. P. **Cultivo descontínuo alimentado de *Arthrospira (Spirulina) platensis* em reator tubular utilizando uréia como fonte de nitrogênio e CO₂ puro ou proveniente de fermentação alcoólica**. 2011. 177 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BEZERRA, R. P. **Influência do tempo de alimentação e da intensidade luminosa no cultivo de *Spirulina platensis* sob alimentação com cloreto de amônio**. 2006. 153 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 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, p. 297-305, 2008.
- BISCHOFF, H. W.; BOLD, H. C. Phycological Studies IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. **University of Texas Publication**, v. 6318, [s.n.], p. 1-95, 1963.
- BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, n. 1-3, p. 313-321, 1999.
- BOROWITZKA, M. A. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, n. 1, p. 3-15, 1995.
- BOUSSIBA, S. Ammonia uptake in the alkalophilic cyanobacterium *Spirulina plantesis*. **Plant and Cell Physiology**, v. 30, n. 2, p. 303-308, 1989.

- BRANGER, B.; CADUDAL, J. L.; DELOBEL, M.; OUOBA, H.; YAMEOGO, P.; OUEDRAOGO, D.; GUERIN, D.; VALEA, A.; CREN; ZOMBRE, C.; ANCEL, P. La spiruline comme complément alimentaire dans la malnutrition du nourrisson au Burkina-Faso. **Archives de pédiatrie**, v. 10, n. 5, p. 424-431, 2003.
- CAICEDO, N. H.; HEYDUCK-SÖLLER, B.; FISCHER, U.; THÖMING, J. Bioproduction of antimicrobial compounds by using marine filamentous cyanobacterium cultivation. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 5, p. 811-818, 2011.
- CAÑIZARES, R. O.; DOMINGUEZ, A. R. Growth of *Spirulina maxima* on Swine Waste. **Bioresource Technology**, v. 45, n. 1, p. 73-75, 1993.
- CARVAJAL, N.; FERNÁNDEZ, M.; RODRIGUEZ, J. P. DONOSO, A. Urease of *Spirulina maxima*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2821-2823, 1982.
- CARVALHO, J. C. M.; FRANCISCO, F. R.; ALMEIDA, K. A.; SATO, S. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Cyanophyceae) by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially increasing feeding rates. **Journal of Phycology**, v. 40, n. 3, p. 589-597, 2004.
- 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. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 110, n. 3, p. 151-164, 2003.
- CHADER, S.; HACENE, H.; AGATHOS, S. N. Study of hydrogen production by three strains of *Chlorella* isolated from the soil in the Algerian Sahara. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 11, p. 4941-4946, 2009.
- CHEN, F.; ZHANG, Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using fed-batch system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, n. 3, p. 221-224, 1997.
- CHEN, T.; WONG, Y.-S. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of selenium-containing phycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 12, p. 4352-4358, 2008.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.
- CHOJNACKA, K. Biosorption and bioaccumulation – the prospects for practical applications. **Environmental International**, v. 36, n. 3, p. 299-307, 2010.

- CHOJNACKA, K.; NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 5, p. 461-465, 2004.
- CHRONAKIS, I. S.; GALATANU, A. N.; NYLANDER, T.; LINDMAN, B. The behavior of protein preparations from blue-green algae (*Spirulina platensis* strain Pacifica) at the air/water interface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 173, n. 1, p. 181-192, 2000.
- 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, [s.n.], p. 503-526, 1985.
- COHEN, Z.; REUNGJITCHACHAWALI, M.; SIANGDUNG, W.; TANTICHAROEN, M. Production and partial purification of γ -linolenic acid and some pigments from *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 1, p. 109-115, 1993.
- COHEN, Z.; VONSHAK, A.; RICHMOND, A. Fatty acid composition of *Spirulina* strains grown under various environmental conditions. **Phytochemistry**, v. 26, n. 8, p. 2255-2258, 1987.
- CONVERTI, A.; CASAZZA, A. A.; ORTIZ, E. Y.; PEREGO, P.; DEL BORGHI, M. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 48, n. 6, p. 1146-1151, 2009.
- COSTA, J. A. V.; COZZA, K. L.; OLIVEIRA, L.; MAGAGNIN, G. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 439-442, 2001.
- CRINI, G. Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: a review. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 9, p. 1061-1085, 2006.
- 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 and Bioenergy**, v. 23, n. 4, p. 261-269, 2002.

- DANESI, E. D. G.; RANGEL-YAGUI, C. O.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Effect of reducing the light intensity in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 26, n. 4, p. 329-335, 2004.
- DANESI, E. D. G.; RANGEL-YAGUI, C. O.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. Growth and content of *Spirulina platensis* biomass chlorophyll cultivated at different values of light intensity and temperature using different nitrogen sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 362-373, 2011.
- DAS, N. Recovery of precious metals through biosorption – a review. **Hydrometallurgy**, v. 103, n. 1-4, p. 180-189, 2010.
- DE, B. K.; CHAUDHURY, S.; BHATTACHARYA, D. K. Effect of nitrogen sources on γ -linolenic acid accumulation in *Spirulina platensis*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 1, p. 153-156, 1999.
- DEEPA, G. L.; SASHIDHAR, R. B.; DESHPANDE, V. Purification and characterization of phycoferritin from the blue-green alga, *Arthrospira (Spirulina) platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 4, p. 359-366, 2008.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.
- DHIAB, R. B.; OUADA, H. B.; BOUSSETTA, H.; FRANCK, F.; ELABED, A.; BROUERS, M. Growth, fluorescence, photosynthetic O₂ production and pigment content of salt adapted cultures of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, n. 4, p. 293-301, 2007.
- DUFOSSÉ, L.; GALAUP, P.; YARON, A.; ARAD, S. M.; BLANC, P.; MURTHY, K. N. C.; RAVISHANKAR, G. A. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, n. 9, 389-406, 2005.
- DUTTA, D.; DE, D.; CHAUDHURI, S.; BHATTACHARYA, S. K. Hydrogen production by cyanobacteria. **Microbial Cell Factories**, v. 4, n. 36, [s.p.], 2005.
- EL-NAAS, M. H.; AL-RUB, F. A.; ASHOUR, I.; AL-MARZOUQI, M. Effect of competitive interference on the biosorption of lead(II) by *Chlorella vulgaris*. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, n. 12, p. 1391-1399, 2007.

- FENG, D.-I.; WU, Z.-C. Culture of *Spirulina platensis* in human urine for biomass production and O₂ evolution. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 7, n. 1, p. 34-37, 2006.
- 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 (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- FERREIRA, L. S.; RODRIGUES, M. S.; CARVALHO, J. C. M.; LODI, A.; FINOCCHIO, E.; PEREGO, P.; CONVERTI, A. Adsorption of Ni²⁺, Zn²⁺ and Pb²⁺ onto dry biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis* and *Chlorella vulgaris*. I. Single metal systems. **Chemical Engineering Journal**, v. 173, n. 2, p. 326-333, 2011.
- FERREIRA, L. S.; RODRIGUES, M. S.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. A new approach to ammonium sulphate feeding for fed-batch *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation in tubular photobioreactor. **Biotechnology Progress**, v. 6, n. 5, p. 1271-1277, 2010.
- FINOCCHIO, E.; LODI, A.; SOLISIO, C.; CONVERTI, A. Chromium (VI) removal by methylated biomass of *Spirulina platensis*: the effect of methylation process. **Chemical Engineering Journal**, v. 156, n. 2, p. 264-269, 2010.
- FREUNDLICH, H. Über die Adsorption in Lösungen. **Zeitschrift für Physikalische Chemie**, v. 57, [s.n.], p. 385-470, 1906.
- GOKHALE, S. V.; JYOTI, K. K.; LELE, S. S. Kinetic and equilibrium modeling of chromium (VI) biosorption on fresh and spent *Spirulina platensis/Chlorella vulgaris* biomass. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3600-3608, 2008.
- GOKHALE, S. V.; JYOTI, K. K.; LELE, S. S. Modeling of chromium(VI) biosorption by immobilized *Spirulina platensis* in packed column. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, n.2-3, p. 735-743, 2009.
- GONZÁLEZ, L. E.; CAÑIZARES, R. O.; BAENA, S. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**, v. 60, n. 3, p. 259-262, 1997.

- GREEN TECH MEDIA. Disponível em: <http://www.greentechmedia.com/>. Acessado em: 25 Ago. 2011.
- HENDRY, G. A. F. Chlorophylls and chlorophyll derivatives. In: HENDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J. D. (Eds.). **Natural food colorants**. London: Blackie Academic Professional, 1996. Cap. 5, p. 131-155.
- HO, Y. S.; MCKAY, G. The kinetics of sorption of divalent metal ions onto sphagnum moss peat. **Water Research**, v. 34, n. 3, p. 735-742, 2000.
- HOLM-HANSEN, O. Ecology, physiology, and biochemistry of blue-green algae. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 22, [s.n.], p. 47-70, 1968.
- HSIEH, C.-H.; WU, W.-T. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 17, p. 3921-3926, 2009.
- JENSEN, S.; KNUTSEN, G. Influence of light and temperature on photoinhibition of photosynthesis in *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 5, p. 495-504, 1993.
- JOSLYN, M. A. Alcoholometry. In: JOSLYN, M. A. (Ed.). **Methods in food analysis: physical, chemical and instrumental methods of analysis**. New York: Academic Press, 1970. p 447-474.
- LANGMUIR, I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. **Journal of the American Chemical Society**, v. 40, n. 9, p. 1361-1403, 1918.
- LEDUY, A.; THERIEN, N. An improved method for optical density measurement of the semimicroscopic blue green alga *Spirulina maxima*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 19, n. 8, p. 1219-1224, 1977.
- LEDUY, A.; ZAJIC, J. E. A geometrical approach for differentiation of an experimental function at a point: applied to growth and product formation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 15, n. 4, p. 805-810, 1973.
- LEE, H. Y.; ERICKSON, L. E.; YANG, S. S. Kinetics and bioenergetics of light-limited photoautotrophic growth of *Spirulina platensis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 29, n. 7, p. 832-843, 1977.
- LEE, J.; LEE, S. Y.; PARK, S.; MIDDELBERG, A. P. J. Control of fed-batch fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 1, p. 29-48, 1999.

- LEE, J.-Y.; KWON, T.-S.; BAEK, K.; YANG, J.-W. Adsorption characteristics of metal ions by CO₂-fixing *Chlorella* sp. HA-1. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 354-358, 2009.
- LEÓN, I. A. A. **Estudo do cultivo de *Spirulina platensis* por processo contínuo com uréia como fonte de nitrogênio**. 2010. 99 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- LI, Q.; WU, S.; LIU, G.; LIAO, X.; DENG, X.; SUN, D.; HU, Y.; HUANG, Y. Simultaneous biosorption of cadmium (II) and lead (II) ions by pretreated biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. **Separation and Purification Technology**, v. 34, n. 1-3, 135-142, 2004.
- LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 7, p. 1043-1049, 2009.
- LV, J.-M.; CHENG, L.-H.; XU, X.-H.; ZHANG, L.; CHEN, H.-L. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 17, p. 6797-6804, 2010.
- MALIK, D. J.; STRELKO JR., V.; STREAT, M.; PUZIY, A. M. Characterisation of novel modified active carbons and marine algal biomass for the selective adsorption of lead. **Water Research**, v. 36, n. 6, 1527-1538, 2002.
- MARKHAM, E. C.; BENTON, A. F. The adsorption of gas mixtures by silica. **Journal of the American Chemical Society**, v. 53, n. 2, p. 497-507, 1931.
- MARKOU, G.; GEORGAKAKIS, D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: a review. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3389-3401, 2011.
- MARQUEZ, F. J.; NISHIO, N.; NAGAI, S.; SASAKI, K. Enhancement of biomass and pigment production during growth of *Spirulina platensis* in mixotrophic culture. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 62, n. 2, p. 159-164, 1995.
- MATA, T. M.; MASTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

- MATSUDO, M. C. **Cultivo contínuo de *Arthrospira (Spirulina) platensis* em fotobiorreator tubular utilizando uréia como fonte de nitrogênio e CO₂ puro ou proveniente de fermentação alcoólica.** 2010. 145 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MATSUDO, M. C. **Cultivo de *Spirulina platensis* por processo descontínuo alimentado repetitivo utilizando uréia como fonte de nitrogênio.** 2006. 103 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MATSUDO, M. C.; BEZERRA, R. P.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M.; CO₂ from alcoholic fermentation for continuous cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in tubular photobioreactor using urea as nitrogen source. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 3, p. 650-656, 2011.
- MCCARTY, M. F. Clinical potential of *Spirulina* as a source of phycocyanobilin. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, n. 4, p. 566-570, 2007.
- MENDIOLA, J. A.; GARCÍA-MARTÍNEZ, D.; RUPÉREZ, F. J.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; REGLERO, G.; CIFUENTES, A.; BARBAS, C.; IBÁÑEZ, E.; SEÑORÁNS, F. J. Enrichment of vitamin E from *Spirulina plantesis* microalga by SFE. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 43, n. 3, p. 484-489, 2008.
- MILLER, A. G.; COLMAN, B. Evidence for HCO₃⁻ transport by the blue-green alga (cyanobacterium) *Coccochloris peniocyctis*. **Plant Physiology**, v. 65, n. 2, p. 397-402, 1980.
- MIYAKE, M.; TAKASE, K.; NARATO, M.; KHATIPOV, E.; SCHNACKENBERG, J.; SHIRAI, M.; KURANE, R.; ASADA, Y. Polyhydroxybutyrate production from carbon dioxide by cyanobacteria. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, n. 1-9, p. 991-1002, 2000.
- 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, 2001.
- MOSULISHVILI, L. M.; KIRKESALI, E. I.; BELOKOBYLSKY, 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, 2002.
- MÜHLING, M.; HARRIS, N.; BELAY, A.; WHITTON, B. A. Reversal of helix orientation in the cyanobacterium *Arthrospira*. **Journal of Phycology**, v. 39, n. 2, p. 360-367, 2003.
- MULITERNO, A.; MOSELE, P. C.; COSTA, J. A. V.; HEMKEMEIER, M.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M. Cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* em batelada alimentada. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 6, p. 1132-1138, 2005.
- MULLER-FEUGA, A. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3-5, p. 527-534, 2000.
- NORSKER, N.-H.; BARBOSA, M. J.; VERMUE, M. H.; WIJFFELS, R. H. Microalgal production – a close look at the economics. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 1, p. 24-27, 2011.
- OGBONNA, J. C.; YOSHIZAWA, H.; TANAKA, H. Treatment of high strength organic wastewater by a mixed culture of photosynthetic microorganisms. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3-5, p. 177-284, 2000.
- OLAIZOLA, M.; DUERR, E. O. Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 2, n. 2, p. 97-104, 1990.
- OLGUÍN, E. J.; GALICIA, S.; ANGULO-GUERRERO, O.; HERNÁNDEZ, E. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. growth on pig waste. **Bioresource Technology**, v. 77, n.1, p.19-24, 2001.
- 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**, v. 2, 1975. p. 845-853.
- 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**. Roma: Consiglio Nazionale delle Ricerche, 1980. p. 111-125.

- 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, n. 4, p. 371-375, 2003.
- PIERCE, W.C.; HAENISCH, E.L. **Quantitative analysis**. 3 ed. New York: John Wiley and Sons, 1948. 519 p.
- 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, 1984.
- PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635-648, 2004.
- QIANG, H.; ZARMI, Y.; RICHMOND, A. Combined effects of light intensity, light-path and culture density on output rate of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). **European Journal of Phycology**, v. 33, n. 2, p. 165-171, 1998.
- QUOC, K. P.; DUBACQ, J.-P. Effect of growth temperature on the biosynthesis of eukaryotic lipid molecular species by the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1346, n. 3, p. 237-246, 1997.
- RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1609-1612, 2008.
- RAMANAN, R.; KANNAN, K.; DESHKAR, A.; YADAV, R.; CHAKRABARTI, T. Enhanced algal CO₂ sequestration through calcite deposition by *Chlorella* sp. and *Spirulina platensis* in a mini-raceway pond. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, p. 2616-2622, 2010.
- 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-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 2, p. 133-141, 2004.
- RAOOF, B.; KAUSHIK, B. D.; PRASANNA, R. Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, n. 6, p. 537-542, 2006.
- RECHTER, S.; KÖNIG, T.; AUEROCHS, S.; THULKE, S.; WALTER, H.; DÖRNENBURG, H.; WALTER, C.; MARSCHALL, M. Antiviral activity of

Arthrospira-derived spirulan-like substances. **Antiviral Research**, v. 72, n. 3, p. 197-206, 2006.

RICHMOND, A. *Spirulina*. In: BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. (Eds.). **Microalgal biotechnology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p. 85-121.

RODRIGUES, M. S. **Avaliação do cultivo de *Spirulina platensis* utilizando simultaneamente nitrato de potássio e cloreto de amônio como fontes de nitrogênio**. 2008. 149 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RODRIGUES, M. S.; FERREIRA, L. S.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. Fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 12, p. 4491-4498, 2010.

RONDA, A. R.; LELE, S. S. Culture conditions stimulating high γ -linolenic acid accumulation by *Spirulina platensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 693-697, 2008.

SAJILATA, M. G.; SINGHAL, R. S.; KAMAT, M. Y. Fractionation of lipids and purification of γ -linolenic acid (GLA) from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v. 109, n. 3, p. 580-586, 2008.

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.

SASSANO, C. E. N.; GIOIELLI, L. A.; FERREIRA, L. S.; RODRIGUES, M. S.; SATO, S.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J. C. M. Evaluation of the composition of continuously-cultivated *Arthrospira (Spirulina) platensis* using ammonium chloride as nitrogen source. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 12, p. 1732-1738, 2010.

SCHLÖSSER, U. G. Sammlung von Algenkulturen Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Göttingen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v. 95, [s.n.], p. 181-276, 1982.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord). **Biotecnologia industrial**, vol. 2, 1ª ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. Cap. 9-12, p. 193-246.

- ŞEKER, A.; SHAHWAN, T.; EROĞLU, A. E.; YILMAZ, S.; DEMIREL, Z.; DALAY, M. C. Equilibrium, thermodynamic and kinetic studies for the biosorption of aqueous lead(II), cadmium(II) and nickel(II) ions on *Spirulina platensis*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 154, n.1-3, p. 973-980, 2008.
- SHARMA, N. K.; TIWARI, S. P.; TRIPATHI, K.; RAI, A. K. Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): facts and challenges. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 6, p. 1059-1081, 2011.
- SHEINDORF, C. H.; REBHUN, M.; SHEINTUCH, M. A Freundlich-type multicomponent isotherm. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 79, n. 1, p. 136-142, 1981.
- SHIMAMATSU, H. Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. **Hydrobiologia**, v. 512, n. 1-3, p. 39-44, 2004.
- SOBCZUK, T. M.; CAMACHO, F. G.; RUBIO, F. C.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; GRIMA, E. M. Carbon dioxide uptake efficiency by outdoor microalgal cultures in tubular airlift photobioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 67, n. 4, p. 465-475, 2000.
- SOLÓRZANO, L. Determination of ammonia in natural waters by the phenylhypochlorite method. **Limnology Oceanography**, v. 14, [s.n.], p. 799-801, 1969.
- SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, n. 1, p. 19-23, 1952.
- SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.
- STANIER, R. Y.; COHEN-BAZIRE, G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 31, [s.n.], p. 225-274, 1977.
- STEWART, C.; HESSAMI, M.-A. A study of methods of carbon dioxide capture and sequestration – the sustainability of a photosynthetic bioreactor approach. **Energy Conversion and Management**, v. 46, n. 3, p. 403-420, 2005.
- SUN, X.-F.; WANG, S.-G.; LIU, X.-W.; GONG, W.-X.; BAO, N.; GAO, B.-Y. Competitive biosorption of zinc(II) and cobalt(II) in single- and binary-metal systems by aerobic granules. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 324, n. 1-2, p. 1-8, 2008.

- SURESH, M.; MISHRA, S. K.; MISHRA, S.; DAS, A. The detection of Hg^{2+} by cyanobacteria in aqueous media. **Chemical Communications**, [s.v.], n. 18, 2496-2498, 2009.
- SWAYAMPAKULA, K.; BODDU, V. M.; NADAVALA, S. K.; ABBURI, K. Competitive adsorption of Cu (II), Co (II) and Ni (II) from their binary and tertiary aqueous solutions using chitosan-coated perlite beads as biosorbent. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, n. 2-3, p. 680-689, 2009.
- SYDNEY, E. B.; STURM, W.; CARVALHO, J. C.; THOMAZ-SOCCOL, V.; LARROCHE, C.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 5892-5896, 2010.
- SYRETT, P. J. Nitrogen assimilation. In: LEWIN, R. A. (Ed.). **Physiology and biochemistry of algae**. New York: Academic Press, 1962. Cap. 10, p. 171-187.
- TAJES-MARTÍNEZ, P.; BACEIRO-GONZÁLEZ, E.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; PRADA-RODRIGUEZ, D. Micro-columns packed with *Chlorella vulgaris* immobilised on silica gel for mercury speciation. **Talanta**, v. 68, n. 5, p. 1489-1496, 2006.
- TIBURCIO, P. C.; GALVEZ, F. C. F.; CRUZ, L. J.; GAVINO, V. C. Determination of shelf life of *Spirulina platensis* (MI₂) grown in the Philippines. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, n. 6, p. 727-731, 2007.
- TING, Y. P.; LAWSON, F.; PRINCE, I. G. Uptake of cadmium and zinc by the alga *Chlorella vulgaris*: II. Multi-ion situation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, n. 5, p. 445-455, 1991.
- TOBIN, J. M.; ROUX, J. C. Mucor biosorbent for chromium removal from tanning effluent. **Water Research**, v. 32, n. 5, p. 1407-1416, 1998.
- TOKUŞOĞLU, Ö.; ÜNAL, M. K. Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 4, p. 1144-1148, 2003.
- 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, 1997. Cap. 1, p. 1-15.

- UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar. Disponível em: <http://www.unica.com.br/>. Acessado em: 26 Nov. 2011.
- UTEX – The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin. Disponível em: <http://web.biosci.utexas.edu/utex/>. Acessado em: 23 Ago. 2011.
- VANNELA, R.; VERMA, S. K. Co^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} accumulation by cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 5, p. 1282-1293, 2006.
- VIJAYARAGHAVAN, K.; YUN, Y. S. Bacterial biosorbents and biosorption. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 3, 266-291, 2008.
- VOGEL, A. I. **Análise química quantitativa**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2002. 462 p.
- VONSHAK, A. (Ed.). *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor and Francis, 1997a. 233 p.
- VONSHAK, A. *Spirulina: growth, physiology and biochemistry*. In: VONSHAK, A. (Ed.). *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor and Francis, 1997b. Cap. 3, p. 43-65.
- WANG, J.; CHEN, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 195-226, 2009.
- WANG, Z. P.; ZHAO, Y. Morphological reversion of *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Cyanophyta): from linear to helical. **Journal of Phycology**, v. 41, n. 3, p. 622-628, 2005.
- WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M. J.; EPPINK, M. H. M. Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 4, n. 3, p. 287-295, 2010.
- XUE, C.; HU, Y.; SAITO, H.; ZHANG, Z.; LI, Z.; CAI, Y.; OU, C.; LIN, H.; IMBS, A. B. Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 9-13, 2002.
- YAN, J.-P.; PENG, J.; YIN, K.; WANG, J.-H. Potential health-promoting effects of astaxanthin: a high-value carotenoid mostly from microalgae. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 55, n. 1, p. 150-165, 2011.

YUAN, X.; KUMAR, A.; SAHU, A. K.; ERGAS, S. J. Impact of ammonia concentration on *Spirulina platensis* growth in an airlift photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3234-3239, 2011.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch. Et. Gardner) Geitler.** 1966. Thesis (Ph. D.) – Université de Paris, Paris.

ANEXOS

ANEXO A
ARTIGO PUBLICADO

Artigo referente ao trabalho desenvolvido, nomeado “**Influence of ammonium sulphate feeding time on fed-batch *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation and biomass composition with and without pH control**”, publicado na revista científica “**Bioresource Technology**” em Abril de 2011.

Referência:

Rodrigues, M. S.; Ferreira, L. S.; Converti, A.; Sato, S.; Carvalho, J. C. M. Influence of ammonium sulphate feeding time on fed-batch *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation and biomass composition with and without pH control. Bioresource Technology, 102 (2011) 6587-6592.

Influence of ammonium sulphate feeding time on fed-batch *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation and biomass composition with and without pH control

Mayla Santos Rodrigues^{a,b}, Lívia Seno Ferreira^{a,b}, Attilio Converti^{b,c}, Sunao Sato^a, João Carlos Monteiro de Carvalho^{a,*}

^a Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, B-16, 05508-900 São Paulo - SP, Brazil

^b Department of Chemical and Process Engineering "G. B. Bonino", University of Genoa, Via Opera Pia, 15, 16145 Genoa, Italy

^c Fellowship of CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 January 2011

Received in revised form 24 March 2011

Accepted 26 March 2011

Available online 1 April 2011

Keywords:

Arthrospira (Spirulina) platensis

Ammonium feeding time

pH control

Kinetic parameters

Biomass composition

ABSTRACT

Previous work demonstrated that a mixture of NH_4Cl and KNO_3 as nitrogen source was beneficial to fed-batch *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation, in terms of either lower costs or higher cell concentration. On the basis of those results, this study focused on the use of a cheaper nitrogen source mixture, namely $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ plus NaNO_3 , varying the ammonium feeding time ($T = 7\text{--}15$ days), either controlling the pH by CO_2 addition or not. *A. platensis* was cultivated in mini-tanks at 30°C , $156\ \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$, and starting cell concentration of $400\ \text{mg L}^{-1}$, on a modified Schlösser medium. $T = 13$ days under pH control were selected as optimum conditions, ensuring the best results in terms of biomass production (maximum cell concentration of $2911\ \text{mg L}^{-1}$, cell productivity of $179\ \text{mg L}^{-1}\text{ d}^{-1}$ and specific growth rate of $0.77\ \text{d}^{-1}$) and satisfactory protein and lipid contents (around 30% each).

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Arthrospira (Spirulina) platensis is a photosynthetic microorganism of industrial interest because of its high contents of amino acids, polyunsaturated fatty acids, vitamins, and pigments, such as beta-carotene and chlorophyll (Ciferri, 1983). *A. platensis* is considered one of the most valuable sources of proteins; up to 74% of its biomass can be constituted by this fraction (Cohen, 1997). One of the most abundant protein present in this cyanobacterium biomass is the phycocyanin, which is a nitrogen reserve involved in photosynthetic reactions (Ciferri, 1983). The most commonly found polyunsaturated fatty acids in *A. platensis* are the palmitic (34–42%), linoleic (19–26%), gamma-linolenic (16–25%) and oleic (3–8%) ones (Piorreck et al., 1984).

A. platensis production is relatively cheap and simple, since it can grow quickly with only inorganic nutrients and light, it is resistant to unfavorable environmental conditions and easily harvested. *A. platensis* biomass is useful, for example, as nutritional supplement for humans and animals (Cohen, 1997), as source of active principles in pharmaceutical and cosmetic industries (Belay et al., 1993), and as adsorbent material for heavy metals (Solisio et al., 2008). For the production of this cyanobacterium, the most widely

used systems are the outdoor ponds that allow obtaining large amounts of biomass at low costs. Nowadays, its commercial production is carried out almost exclusively in open ponds (Vonshak and Richmond, 1988), which do not require rigid control of the environmental conditions.

The cultivation of *A. platensis* depends greatly on nutrient availability, especially the nitrogen source. Although nitrates are commonly used in media (Paoletti et al., 1975; Schlösser, 1982), many studies have reported the benefits of using cheaper sources, such as ammonium salts (Bezerra et al., 2008; Sassano et al., 2007) and urea (Matsudo et al., 2009; Sánchez-Luna et al., 2007). Ammonium salts, mainly NH_4Cl and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, are readily assimilated by *A. platensis* (Carvalho et al., 2004) and reduce the chances of culture contamination by other microorganisms (Borowitzka, 1999). On the other hand, ammonia can be toxic to cyanobacteria and microalgae when present in high concentrations in the medium (Abeliovich and Azov, 1976; Belkin and Boussiba, 1991). Because of its flexibility in supplying nutrients during cultivation, the fed-batch process has recently become one of the most promising for cell growth and metabolites production. For this reason, it is particularly suited to processes where nutrient levels must be adequately controlled. The fed-batch addition of ammonia-based nitrogen sources was shown to effectively prevent any inhibiting effect (Abeliovich and Azov, 1976; Belkin and Boussiba, 1991) on *Arthrospira* sp. cultivation. Moreover, probably due to off-gassing,

* Corresponding author. Tel.: +55 11 30913886; fax: +55 11 38156386.

E-mail address: jcmcarv@usp.br (J.C.M. de Carvalho).

the sole use of ammonium salts as nitrogen source in open tank cultivations usually leads to nitrogen deficient cultures and, consequently, to low final cell concentration. Rodrigues et al. (2010) suggested the simultaneous use of nitrates and ammonium salts as a way to avoid the difficulties encountered in *A. platensis* cultivation with only one nitrogen source: whereas the nitrate ensures high biomass yields, the ammonium salt allows reducing the production costs.

The control of culture pH around optimum values is a way to improve growth (Jiménez et al., 2003; Ogbonda et al., 2007) as much as ammonia and inorganic carbon uptake during cultivation (Azov, 1982). In a medium containing carbonate and bicarbonate, the latter is preferentially assimilated by cyanobacteria (Miller and Colman, 1980) and its formation is ensured at pH in the range 6–10; below this range, CO₂ prevails, while beyond it, carbonate does. During the incorporation of two bicarbonate ions, the cyanobacteria consume one in the form of carbon dioxide and release the other in the form of carbonate, leading to the progressive pH increase (Miller and Colman, 1980). The use of carbon dioxide to control the pH as well as to supply the carbon source (Soletto et al., 2008; Watanabe and Hall, 1995) in *A. platensis* cultivation, among many other cyanobacteria and microalgae, has the additional benefit of combining valuable biomass production and CO₂ emission reduction.

The objective of this work was to study the effects of ammonium feeding time and pH control on growth and biomass composition of *A. platensis*. To this purpose, such a cyanobacterium was grown at 30 ± 1 °C and 156 ± 6 μmol photons m⁻² s⁻¹ using a mixture of nitrogen sources [(NH₄)₂SO₄ plus NaNO₃] that is cheaper than the one suggested by Rodrigues et al. (2010). Five different ammonium feeding times (*T* = 15, 13, 11, 9 and 7 days) were studied in order to establish which one of them would best supply nitrogen to cultivations. The effect of pH control on *A. platensis* growth was observed through the daily addition of pure CO₂ until pH 8.7. Finally, the influence of *T* and pH control on the culture was also evaluated in terms of biomass composition, i.e. chlorophyll, protein, lipid, and carbohydrate contents.

2. Methods

2.1. Microorganism, media and inoculum preparation

The strain *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordstedt) Gomont was obtained from the University of Texas Culture Collection and maintained in standard media (Paoletti et al., 1975; Schlösser, 1982).

The medium of Paoletti et al. contained (g L⁻¹): 2.57 KNO₃; 0.50 K₂HPO₄; 0.92 NaCl; 15.2 NaHCO₃; 8.89 Na₂CO₃; 1.88 Na₂SO₄; 0.05 CaCl₂·2H₂O; 0.25 MgSO₄·7H₂O; 1.0 mL L⁻¹ Fe-EDTA solution (29.8 EDTA-Na₂; 24.9 FeSO₄·7H₂O); and 1.0 mL L⁻¹ of micronutrient solution (2.85 BaCl₂·2H₂O; 0.19 CoCl₂·6H₂O; 0.17 MnCl₄·H₂O; 0.14 SeCl₂·2H₂O; 0.30 SnCl₂·2H₂O; 0.29 LiCl; 0.18 CuSO₄·5H₂O; 0.71 NiSO₄·5H₂O; and 0.12 NaMoO₄·2H₂O).

The medium of Schlösser contained (g L⁻¹): 13.6 NaHCO₃; 4.03 Na₂CO₃; 0.50 K₂HPO₄; 2.50 NaNO₃; 1.00 K₂SO₄; 1.00 NaCl; 0.20 MgSO₄·7H₂O; 0.04 CaCl₂·2H₂O; 6.0 mL L⁻¹ of P-IV metal solution (0.75 Na₂EDTA·2H₂O; 0.097 FeCl₃·6H₂O; 0.041 MnCl₂·4H₂O; 0.005 ZnCl₂; 0.002 CoCl₂·6H₂O; 0.004 Na₂MoO₄·2H₂O); and 1.0 mL L⁻¹ of CHU micronutrient solution (0.020 CuSO₄·5H₂O; 0.044 ZnSO₄·7H₂O; 0.020 CoCl₂·6H₂O; 0.012 MnCl₂·4H₂O; 0.012 Na₂MoO₄·2H₂O; 0.620 H₃BO₃; 0.050 Na₂EDTA·2H₂O).

For the purpose of experimentation, medium of Paoletti et al. (1975) and Schlösser (1982) had their initial nitrate concentration reduced to 20%, and were supplemented with 15.0 mM NH₄Cl and 7.50 mM (NH₄)₂SO₄, respectively. In the runs in which pH was controlled, a 1:33 NaCO₃/NaHCO₃ ratio was used in the medium of

Schlösser (1982) modified as above, in order to start cultivations at pH 8.7.

A. platensis was grown in 500 mL-Erlenmeyer flasks containing 200 mL of standard media on a rotary shaker at 100 rpm, 30 ± 1 °C, and 6.0 ± 0.5 klux (72 ± 6 μmol photons m⁻² s⁻¹). The resulting suspension was harvested during the exponential growth phase, filtered, and washed thrice with physiological solution (0.9% NaCl) to remove adsorbed salts. The recovered cells were then suspended again in the modified media and used to inoculate the cultivation tanks.

2.2. Experiments and cultivation conditions

Experiments were carried out in 68 cm-long mini-tanks (Belay, 1997) made of PVC foils, each having total area of 0.123 m². The cultivation volume was 5 L, which was maintained through the daily addition of distilled water to replace water loss by evaporation. Paddle wheels ensured culture mixing at 18 rpm. Temperature was maintained at 30 ± 1 °C by submersible electronic thermostats (Aristos, São Paulo, SP, Brazil), and light intensity was regulated at 13 ± 0.5 klux (156 ± 6 μmol photons m⁻² s⁻¹) by fluorescent lamps and a light meter, model 250A (Li-Cor, Lincoln, NE, USA).

Four preliminary runs were performed under different conditions to select the best medium for the growth and inoculum level. Run A was performed on the medium proposed by Paoletti et al. (1975) but containing only 20% of KNO₃, supplemented with 15.0 mM NH₄Cl and inoculated with a cell concentration of 50 mg L⁻¹ dry weight (Rodrigues et al., 2010), whereas runs B and C were carried out on the medium of Schlösser (1982) modified in the same way (20% of NaNO₃), supplemented with 7.50 mM (NH₄)₂SO₄, and inoculated with 50 and 400 mg L⁻¹ dry weight, respectively. Ammonium salts were added throughout 17 days in the form of solution, the starting pH value was set at 9.5, and no pH control was done. Run D was carried out on modified Schlösser (1982) medium exactly as run C but with a 1:33 NaCO₃/NaHCO₃ ratio, in order to support pH control by daily addition of CO₂ until pH 8.7.

The medium of Schlösser (1982), modified through the reduction of NaNO₃ amount and with the addition of 7.50 mM of (NH₄)₂SO₄, and a starting cell concentration of 400 mg L⁻¹ dry weight resulted to be the best conditions for *A. platensis* growth and were adopted in runs 1–10, carried out varying the ammonium feeding time from 7 to 15 days. As shown in Table 1, no pH control was done in runs from 1 to 5, whereas runs 6–10 were performed under the same conditions but adjusting the pH by daily addition of CO₂ until pH 8.7.

2.3. Nitrogen source addition and pH control

The addition of nitrate salts was made entirely at the beginning of the runs. In order to avoid any inhibitory effect of ammonia, ammonium salts were added by daily pulse feeding at flow rate exponentially increasing according to the experimental schedule of Table 1 and to the equation:

$$m_t = m_i e^{kt} \quad (1)$$

where *m_i* and *m_t* are the amounts of ammonium salts added per unit reactor volume at the start (*t* = 0) and until the instant “*t*”, respectively.

The initial concentrations of NH₄Cl and (NH₄)₂SO₄ (*m_i*) were 1.70 and 0.85 mM, respectively, and the total feeding time (*T*) was varied from 7 to 17 days. When *t* = *T*, *m_t* = *m_T*, the latter being the total amount of ammonium salt added in the reactor. The choice of this flow rate pattern was suggested by the intention of supporting an exponential growth of biomass (Carvalho et al.,

Table 1

Experimental conditions (pH control and ammonium feeding time, T) and main results of *A. platensis* cultivation (cultivation time, T_C ; maximum cell concentration, X_m ; cell productivity, P_X ; maximum specific growth rate, μ_m ; yield of biomass on nitrogen, $Y_{X/N}$) and biomass contents (chlorophyll, CLH; protein, PTN; lipid, LIP; carbohydrate, CBH; ashes, A).

Run	Experimentation conditions						Main results						
	pH control ^a	T (d)	T _C (d)	X _m (mg L ⁻¹)	P _X (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	μ _m (d ⁻¹)	Y _{X/N} (mg mg ⁻¹)	CLH (mg g ⁻¹)	PTN (%)	LIP (%)	CBH (%)	A (%)	
A ^{b,c}	Free	17	18	2105	114	0.71	7.48	–	–	–	–	–	
B ^c	Free	17	19	2613	135	0.75	8.93	–	–	–	–	–	
C	Free	17	19	2252	97	0.30	7.70	–	–	–	–	–	
D	CO ₂	17	18	2338	108	0.32	7.99	–	–	–	–	–	
1	Free	15	16	2597	138	0.60	8.88	5.3	26	25	40	9	
2	Free	13	14	2637	160	0.76	9.01	5.1	24	26	45	5	
3	Free	11	12	1920	127	0.62	6.56	5.3	25	27	40	8	
4	Free	9	11	2011	147	0.48	5.87	4.9	33	17	43	7	
5	Free	7	10	1820	142	0.50	6.22	4.6	38	16	41	5	
6	CO ₂	15	16	3000	162	0.59	10.2	4.6	22	26	44	7	
7	CO ₂	13	14	2911	179	0.77	9.95	4.6	28	30	35	7	
8	CO ₂	11	12	2516	176	0.64	8.60	4.1	30	25	35	9	
9	CO ₂	9	11	2287	172	0.56	7.82	4.3	29	20	43	7	
10	CO ₂	7	11	2099	154	0.55	7.17	4.7	30	14	50	6	

– analysis not done.

^a pH control, in which runs had pH let run free or reduced once a day to 8.7 by CO₂ addition.

^b Runs carried out on modified Paoletti medium, whereas all other runs were carried out on modified Schlösser medium.

^c Runs starting with 50 mg L⁻¹, whereas all other runs started with 400 mg L⁻¹.

2004), and the initial concentration of each ammonium salt was based on the total amount of nitrogen actually needed in the cultivation (Rodrigues et al., 2010).

The decrease to 1:33 of NaCO₃/NaHCO₃ ratio with respect to that of the original medium of Schlösser (1982) (1:4) allowed reducing the starting pH from 9.5 to 8.7 and made daily pH adjustment by the addition of pure CO₂ easier. Carbon dioxide solubilization in the medium was ensured by circulation of CO₂ and cell suspension in an external hose system (runs D and 6–10).

2.4. Analytical methods

Dry cell mass concentration was determined, as described by Leduy and Therien (1977), by optical density measurement at 560 nm using a calibration curve. The pH was determined by a potentiometer, model 710-A (Orion, Beverly, MA, USA). The concentration of total ammonia was determined by the same potentiometer, but using a selective ammonium ion electrode, model 95-12 (Orion), after preliminary pH adjustment to 13 with NaOH 1.5 M (Carvalho et al., 2004), on medium samples free of cells. Calibration curves were prepared every 2 days, as instructed by the manufacturer of the equipment. The concentration of chlorophyll “a” was determined on cell samples taken on the day corresponding to the maximum cell concentration. For this purpose, it was carried out a methanol-mediated extraction of the biomass pigment, the optical density was measured at 665 nm (Vonshak, 1997), and the concentration values were obtained using a calibration curve.

After harvesting at the end of cultivation, recovered cells were centrifuged, washed with distilled water in order to remove all adsorbed salts, and dried at 55 °C for 12 h (Pelizer et al., 1999). The lipid and protein contents of biomass were analyzed in powdered samples according to Olguín et al. (2001) and the AOAC (2007), respectively. The ash content was determined by calcination of the samples at 450 °C for 6 h in a muffle furnace, and that of carbohydrates was calculated based on lipids, proteins, and ashes percentages.

2.5. Kinetic parameters calculation

The specific growth rate (μ_X), expressed in d⁻¹, was calculated by derivation of experimental growth curves as suggested by

LeDuy and Zajic (1973), and its maximum value found in the exponential growth phase was referred to as μ_m .

The cell productivity (P_X), expressed in mg L⁻¹ d⁻¹, was calculated as the ratio of the variation in cell concentration ($X_m - X_i$), X_m being the maximum value of cell concentration in the reactor and X_i that in the inoculum, respectively, to the cultivation time (T_C):

$$P_X = \frac{X_m - X_i}{T_C} \quad (2)$$

The yield of biomass on nitrogen ($Y_{X/N}$), expressed in mg cells mg⁻¹ N, was calculated as the ratio of the produced cell mass to the amount of nitrogen added to the system:

$$Y_{X/N} = \frac{V(X_m - X_i)}{m_N} \quad (3)$$

V being the tank working volume (5 L) and m_N the total added mass of nitrogen sources expressed as nitrogen.

2.6. Statistical analysis

Comparison of results of runs 1–10 was made by two-way analysis of variance (ANOVA), performed by the program MINITAB 15, and the statistical significance was evaluated by estimation of the descriptive level (p), being the results considered statistically significant when $p < 0.05$ (confidence level > 95%).

3. Results and discussion

3.1. Preliminary tests

Previous study demonstrated that the simultaneous use of potassium nitrate and ammonium chloride in the well-known medium of Paoletti et al. (1975) ensured better *A. platensis* growth compared to the use of separate nitrogen sources (Rodrigues et al., 2010); therefore, one of the best conditions of that study, in terms of nitrogen costs, was selected to carry out the reference run of this study (run A).

To search conditions able to further improve biomass growth, additional runs were done changing medium composition and inoculum concentration with respect to run A. Thus, as shown in Table 1, the medium of Schlösser (1982) modified as described in

Fig. 1. Time behavior of the cell concentration (squares) and specific growth rate (circles) during *A. platensis* cultivations performed on modified Schlösser medium with an inoculum level of 50 mg L⁻¹ (run B, ■ and ●) and 400 mg L⁻¹ (run C, □ and ○).

Section 2.3 was used in run B, the inoculum concentration was increased from 50 to 400 mg L⁻¹ in run C, and the pH was daily adjusted to 8.7 by addition of pure carbon dioxide in run D.

The use of the modified Schlösser (1982) medium resulted in a 24% increase in X_m when compared to the one of Paoletti et al. (1975). Although the nitrogen sources used in runs A and B were different [KNO₃ + NH₄Cl and NaNO₃ + (NH₄)₂SO₄, respectively], they were furnished in equimolar amounts to both cultures and detected in the media in almost the same concentrations, thus suggesting that such an increase should not be ascribed to these sources. Although both media are very similar and well suited for *A. platensis* cultivation, the medium of Schlösser (1982) has lower osmotic pressure than the one of Paoletti et al. (1975), as consequence of its lower salinity. The total monovalent cation concentration in medium of Paoletti et al. (1975) is in fact about 421 mM, whereas in the medium of Schlösser (1982) it is 28.3% lower (302 mM).

Contrary to expectations, the increase in the inoculum concentration from 50 (run B) to 400 mg L⁻¹ (run C) did not promote any significant rise of X_m (Table 1); it accelerated, instead, the occurrence of pseudo-steady-state conditions from around the 12th day forward (Fig. 1), thereby highlighting that the amount of ammonium provided to the cultivation was insufficient to maintain exponential growth. This is confirmed in Fig. 1 by the values of μ_x , as well as in Table 1 by those of μ_m , that were significantly lower in runs started with 400 mg L⁻¹ (runs C and D) than in those

started with 50 mg L⁻¹ (runs A and B). Disappointingly, the control of pH through the daily addition of pure CO₂ did not lead to any statistically significant increase in X_m (runs C and D, Table 1) with respect to the 5% degree of confidence experimentally determined for the biomass concentration methodology. It is likely that, as for run C, the insufficient ammonium availability (long feeding time) hindered the cell growth during run D and masked the positive effect of pH control.

Moreover, according to previous tests (data not shown), it took around 9 h for pH to increase from 8.7 to 9.2 in the medium of Schlösser (1982). Since the addition of ammonium sulphate was done right after daily pH adjustment, cells in run D felt around 9 h of high ammonium availability per day, whereas starting pH in runs A, B and C was already higher than the pK_a of ammonia (9.25). The best ammonium uptake during run D was confirmed by the detectable presence of this ion in the medium only after the 8th day of cultivation, very late in comparison to all the other runs (2nd day).

Conclusively, the increase in the inoculum level could be successful in cultivations of *A. platensis* only alongside with ammonium feeding time decrease, and the pH control could have the potential of increasing X_m , just as well as μ_x , as long as ammonium supply were adequate to support cell growth.

3.2. Influence of the ammonium feeding time and pH control on growth

As it can be observed in Table 1, the reduction of (NH₄)₂SO₄ feeding time from 17 to 15 and to 13 days was enough to reach in runs 1 and 2 (X_i = 400 mg L⁻¹) the same X_m value as in run B (X_i = 50 mg L⁻¹). Since runs 1 and 2 lasted less than run B, their P_x values were also higher. These results indicate that the regulation of the ammonium feeding time was indeed essential to support the increase in the inoculum concentration.

According to the statistical analysis (Table 2), the ammonium feeding time exerted significant influence especially on X_m (p = 0.003) and $Y_{X/N}$ (p = 0.005), indicating that T = 13 and 15 were both adequate to *A. platensis* growth and ammonium uptake. A feeding time of 13 days did in fact lead to the highest μ_m values (0.76–0.77 d⁻¹, Table 1), hence confirming its adequacy for this cyanobacterium cultivation under the conditions studied.

Moreover, despite the sufficient nitrogen source addition, runs 3–5 exhibited low values of both X_m (about 1800–2000 mg L⁻¹) and $Y_{X/N}$ (about 5.9–6.5 mg mg⁻¹), but relatively high values of P_x (127–147 mg L⁻¹ d⁻¹), because of short feeding time (7–11 days). However, since ammonia was detectable in run 5 only from the 4th day forward, but never at inhibitory levels, other environmental factors were likely responsible for this growth

Table 2

Mean values of the results of *A. platensis* cultivation (cultivation time, T_c ; maximum cell concentration, X_m ; cell productivity, P_x ; maximum specific growth rate, μ_m ; yield of biomass on nitrogen, $Y_{X/N}$) and biomass contents (chlorophyll, CLH; protein, PTN; lipid, LIP; carbohydrate, CBH; ashes, A) obtained by the two-way analysis of variance (ANOVA).

	X_m (mg L ⁻¹)	P_x (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	μ_m (d ⁻¹)	$Y_{X/N}$ (mg mg ⁻¹)	CLH (mg g ⁻¹)	PTN (%)	LIP (%)	CBH (%)	A (%)
Ammonium feeding time (d)									
7	1959 ^a	148 ^a	0.53 ^a	6.69 ^a	4.6 ^a	34 ^a	15 ^a	45 ^a	5 ^a
9	2149 ^a	159 ^a	0.52 ^a	6.84 ^a	4.6 ^a	31 ^a	18 ^a	43 ^a	7 ^a
11	2218 ^a	152 ^a	0.66 ^b	7.58 ^a	4.7 ^a	27 ^a	26 ^b	37 ^a	8 ^a
13	2774 ^b	170 ^a	0.77 ^c	9.48 ^b	4.8 ^a	26 ^a	28 ^b	40 ^a	6 ^a
15	2798 ^b	150 ^a	0.60 ^{a,b}	9.54 ^b	4.9 ^a	24 ^a	25 ^{a,b}	42 ^a	8 ^a
p^*	0.003	0.332	0.004	0.005	0.807	0.257	0.010	0.650	0.169
pH control (free or CO₂ addition)									
Free	2197 ^d	143 ^d	0.61 ^d	7.31 ^d	5.0 ^d	29 ^d	22 ^d	42 ^d	7 ^d
CO ₂	2563 ^e	169 ^e	0.63 ^d	8.75 ^e	4.5 ^d	28 ^d	23 ^d	41 ^d	7 ^d
p^*	0.004	0.014	0.004	0.307	0.050	0.608	0.554	0.910	0.587

Different lower-case letters indicate statistical difference in each column, for each experimental condition studied.

* p -values (descriptive level) obtained by the two-way analysis of variance (ANOVA), being the results considered statistically significant when p < 0.05 (confidence level > 95%).

limitation or inhibition. Taking into account also the low μ_m values of runs 4 and 5 (0.48 – 0.50 d^{-1}), one can conclude that $T \leq 11$ days are unsuitable to *A. platensis* cultivation with 7.50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

It is known that *A. platensis* uptakes exclusively bicarbonate and that no significant growth is observed when only carbonate is available to cells; in aqueous solution both ions coexist in chemical equilibrium, and bicarbonate prevails at $\text{pH} < 10.2$ (Binaghi et al., 2003). As explained by Miller and Colman (1980), bicarbonate is actively transported to the inside of cells and converted into carbon dioxide and carbonate, the former being incorporated as carbon source for growth and the latter released into the medium, leading to pH increase. *A. platensis* was shown to reach its optimum growth at pH values around 9.0 (Ogbonda et al., 2007) because of the bicarbonate preponderance in the $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3 =$ equilibrium under these conditions. Runs 6–10 had pH controlled in the range 8.7 – 9.7 with an average daily value of 9.1 , which means that *A. platensis* was maintained at around its optimum pH for the largest duration of the cultivations, contrary to runs 1–5, carried out without any pH control, where pH reached 10.7 .

Table 1 shows that the daily pH adjustment by addition of CO_2 resulted in a X_m increase under all conditions studied. Such a X_m increase led to consequent increases in P_X and $Y_{X/N}$; therefore, these three parameters were the ones statistically influenced by pH control, with $p = 0.004$, 0.014 and 0.005 , respectively (Table 2). Runs 7–9 and 6–7 did in fact exhibit the highest values of P_X (172 – 179 $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$) and $Y_{X/N}$ (9.95 – 10.2 mg mg^{-1}), respectively. The ammonium level in the medium was detectable only after the last $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ addition in runs 6 and 7 ($T = 15$ and 13 days, respectively), whereas it occurred on the 8th day of cultivation in most runs carried out without pH control. These results indicate that pH adjustment is of paramount importance to ammonium uptake, especially at the beginning of *A. platensis* cultivation.

An ammonium feeding time of 13 days either with or without pH control (runs 2 and 7) ensured the highest values of μ_m (0.76 – 0.77 d^{-1}). These values are higher than that reported in the literature for fed-batch cultivation of *A. platensis* in open tanks with, for example, urea as nitrogen source (0.63 d^{-1}) (Sánchez-Luna et al., 2007), and then confirm the advantage of using the mixture of nitrogen sources proposed in this study. Although the pH control did not exert any statistically significant influence on μ_m (Table 2), Fig. 2 shows its positive effect on both the specific growth rate and the cell growth along runs 2 and 7 taken as examples, in that it decelerated μ_X decrease, especially after the 10th day of cultivation.

Fig. 2. Time behavior of the cell concentration (squares) and specific growth rate (circles) during *A. platensis* cultivations in which 7.50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was fed throughout 13 d, with pH control (run 7, $\square$ and $\circ$) and without pH control (run 2, $\blacksquare$ and $\bullet$).

On the basis of these results taken as a whole, $T = 13$ days with pH control (run 7) was considered to be the best condition for *A. platensis* cultivation in open tanks in this work.

3.3. Influence of the ammonium feeding time and pH control on biomass composition

Piorreck et al. (1984) suggested that chlorophyll content of *A. platensis* biomass depends on medium composition. Since nitrogen is a fundamental element in the chlorophyll molecule, it could be influenced by the kind and amount of the nitrogen source. In addition, Hendry (1996) reported that, at high cell concentrations, *A. platensis* increases the production of chlorophyll in order to improve its photon capture efficiency, to compensate the low light intensity received by the inner cells, i.e. the shadowing effect (Richmond and Qiang, 1997).

However, although the nitrogen availability to cells was varied in this study, the chlorophyll content only varied in the range 4.1 – 5.3 mg g^{-1} (Table 1), and it was not statistically influenced by T (Table 2). Such low chlorophyll contents can be ascribed to the fact that the light intensity was not a matter, and cell concentration was not so high in this study. In addition, since the nitrogen fraction addressed to chlorophyll production is very low compared to proteins and other biopolymers, the amount of nitrogen supplied under all the conditions tested in this study was never likely to be a limiting factor for the synthesis of this component.

It is a well-known fact that protein and lipid contents of *A. platensis* biomass vary mainly according to nitrogen supply. Rodrigues et al. (2010) observed that, when two different nitrogen sources are simultaneously supplied to cultivations, the ratio between them, as well as the total amount of nitrogen, has a direct influence on the lipid content. This is evident also in this work, where the lipid content of biomass progressively decreased from 25 – 30% to 14 – 16% with decreasing the feeding time from 15 to 7 d ($p = 0.010$), with no clear influence of the pH control (Table 2). As expected, an opposite behavior was observed for the protein content (Table 1), even if the statistical analysis did not indicate any influence of T and pH control on protein content (Table 2). This fact occurred likely because in the runs with pH control (runs 6–10), the ammonia lost by off-gassing was minimized, and the microorganism met high nitrogen availability, thus leading to similar results. In fact, when comparing only runs carried out without pH control, the p value obtained was only 0.060 (data not shown), indicating that the lower the value of T , the higher the protein content.

As it can be seen in Table 2, neither the feeding time ($p = 0.650$) nor the pH control ($p = 0.910$) exerted any significant effect on the carbohydrate content, which varied from 35% to 50% , not far from 40% , which is the value reported as a standard for biomass of a great number of cyanobacteria and microalgae (Vargas et al., 1998). The ash content varied from 5.31% to 9.48% (Table 1) and, once again, no influence by the experimental conditions was detected (Table 2).

4. Conclusions

A. platensis cultivations were carried out at 156 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in open tanks on Schlösser medium modified using a mixture of sodium nitrate (5.90 mM) and ammonium sulphate (7.50 mM) as nitrogen source and an inoculum of 400 mg L^{-1} , either without pH control or adjusting it at 8.70 by CO_2 addition. The fed-batch exponential supply of ammonium sulphate at a feeding time of 13 d under pH control allowed obtaining the best results in terms of growth parameters: $X_m = 2911$ mg L^{-1} , $P_X = 179$ $\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$ and $\mu_m = 0.77$ d^{-1} . Under these conditions,

protein, lipid and carbohydrate contents were 28%, 30% and 35% respectively.

Acknowledgements

The financial support for the conduct of the research was provided by "Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior" (CAPES), Brazil, and the authors thank Camila Knysak and Laís L.C. Guimarães for the help with the experiments.

References

- Abeliovich, A., Azov, Y., 1976. Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. *Appl. Environ. Microbiol.* 31, 801–806.
- AOAC, 2007. In: Horwitz, W., Latimer, G. (Eds.), *Official Methods of Analysis*, 18th ed., Rev. 2. Association of Official Analytical Chemists, Arlington.
- Azov, Y., 1982. Effect of pH on inorganic carbon uptake in algal cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 1300–1306.
- Belay, A., 1997. Mass culture of *Spirulina* outdoors: the earthrise farms experience. In: Vonshak, A. (Ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology Cell-Biology and Biotechnology*. Taylor and Francis, London, pp. 131–158.
- Belay, A., Ota, Y., Miyakawa, K., Shimamatsu, H., 1993. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *J. Appl. Phycol.* 5, 235–241.
- Belkin, S., Boussiba, S., 1991. High internal pH conveys ammonia resistance in *Spirulina platensis*. *Bioresour. Technol.* 38, 167–169.
- Bezerra, R.P., Matsudo, M.C., Converti, A., Sato, S., Carvalho, J.C.M., 2008. Influence of ammonium chloride feeding time and light intensity on the cultivation of *Spirulina (Arthrospira) platensis*. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 297–305.
- Binaghi, L., Del Borghi, A., Lodi, A., Converti, A., Del Borghi, M., 2003. Batch and fed-batch uptake of carbon dioxide by *Spirulina platensis*. *Process Biochem.* 38, 1341–1346.
- Borowitzka, M.A., 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J. Biotechnol.* 70, 313–321.
- Carvalho, J.C.M., Francisco, F.R., Almeida, K.A., Sato, S., 2004. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis (Cyanophyceae)* by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially increasing feeding rates. *J. Phycol.* 40, 589–597.
- Ciferri, O., 1983. *Spirulina*: the edible microorganism. *Microbiol. Rev.* 47, 551–578.
- Cohen, Z., 1997. The chemicals of *Spirulina*. In: Vonshak, A. (Ed.), *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology Cell-Biology and Biotechnology*. Taylor and Francis, London, pp. 175–204.
- Hendry, G.A.F., 1996. Chlorophylls and chlorophyll derivatives. In: Hendry, G.A.F., Houghton, J.D. (Eds.), *Natural Food Colorants*. Blackie Academic Professional, London, pp. 131–155.
- Jiménez, C., Cossío, B.R., Labella, D., Niell, F.X., 2003. The feasibility of industrial production of *Spirulina (Arthrospira)* in Southern Spain. *Aquaculture* 217, 179–190.
- Leduy, A., Therien, N., 1977. An improved method for optical density measurement of the semimicroscopic blue green alga *Spirulina maxima*. *Biotechnol. Bioeng.* 19, 1219–1224.
- Leduy, A., Zajic, J.E., 1973. A geometrical approach for differentiation of an experimental function at a point: applied to growth and product formation. *Biotechnol. Bioeng.* 15, 805–810.
- Matsudo, M.C., Bezerra, R.P., Sato, S., Perego, P., Converti, A., Carvalho, J.C.M., 2009. Repeated fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* using urea as nitrogen source. *Biochem. Eng. J.* 43, 52–57.
- Miller, A.G., Colman, G., 1980. Evidence for HCO_3^- transport by the blue green alga (cyanobacterium) *Coccochloris penicystis*. *Plant Physiol.* 65, 397–402.
- Ogbona, K.H., Aminigo, R.E., Abu, G.O., 2007. Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. *Bioresour. Technol.* 98, 2207–2211.
- Olguín, E.J., Galicia, S., Angulo-Guerrero, O., Hernández, E., 2001. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. *Bioresour. Technol.* 77, 19–24.
- Paoletti, C., Pushparaj, B., Tomaselli Feroci, L., 1975. Ricerche sulla nutrizione minerale di *Spirulina platensis*. In: *Atti Cong. Naz. Soc. Ital. Microbiol.*, 17, Padova, 2, pp. 845–853.
- Pelizer, L.H., Sassano, C.E.N., Carvalho, J.C.M., Sunao, S., Gioielli, L.A., Moraes, I.O., 1999. Padronização do método de secagem da biomassa de *Spirulina platensis*. *Rev. Farm. Quim.* 32, 37–40.
- Piorreck, M., Baasch, L.H., Pohl, P., 1984. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry* 23, 207–216.
- Richmond, A., Qiang, H., 1997. Principles for efficient utilization of light for mass production of photoautotrophic microorganisms. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63–65, 649–658.
- Rodrigues, M.S., Ferreira, L.S., Converti, A., Sato, S., Carvalho, J.C.M., 2010. Fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. *Bioresour. Technol.* 101, 4491–4498.
- Sánchez-Luna, L.D., Bezerra, R.P., Matsudo, M.C., Sato, S., Converti, A., Carvalho, J.C.M., 2007. Influence of pH, temperature, and urea molar flowrate on *Arthrospira platensis* fed-batch cultivation: a kinetic and thermodynamic approach. *Biotechnol. Bioeng.* 96, 702–711.
- Sassano, C.E.N., Gioielli, L.A., Almeida, K.A., Sato, S., Perego, P., Converti, A., Carvalho, J.C.M., 2007. Cultivation of *Spirulina platensis* by continuous process using ammonium chloride as nitrogen source. *Biomass Bioenerg.* 31, 593–598.
- Schlösser, U.G., 1982. Sammlung von Algenkulturen. *Ber. Deut. Bot. Ges.* 95, 181–276.
- Soletto, D., Binaghi, L., Ferrari, L., Lodi, A., Carvalho, J.C.M., Zilli, M., Converti, A., 2008. Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor. *Biochem. Eng. J.* 39, 369–375.
- Solisio, C., Lodi, A., Soletto, D., Converti, A., 2008. Cadmium biosorption on *Spirulina platensis* biomass. *Bioresour. Technol.* 99, 5933–5937.
- Vargas, M.A., Rodríguez, H., Moreno, J., Olivares, H., Del Campo, J.A., Rivas, J., Guerrero, M.G., 1998. Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. *J. Phycol.* 34, 812–817.
- Vonshak, A., 1997. *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology*. Taylor and Francis, London.
- Vonshak, A., Richmond, A., 1988. Mass production of the blue-green alga *Spirulina*: an overview. *Biomass* 15, 233–247.
- Watanabe, Y., Hall, D.O., 1995. Photosynthetic CO_2 fixation technologies using a helical tubular bioreactor incorporating the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Energy Convers. Manage.* 36, 721–724.

ANEXO B

LISTA DE MANUSCRITOS

Manuscrito:

Rodrigues, M. S.; Ferreira, L. S.; Converti, A.; Sato, S.; Carvalho, J. C. M. Influence of cultivation pH on carbon and nitrogen uptake by *Arthrospira (Spirulina) platensis*.

Enviado para a revista Journal of Biotechnology, sob revisão.

Manuscrito:

Rodrigues, M. S.; Ferreira, L. S.; Converti, A.; Sato, S.; Carvalho, J. C. M. Effects of low cost carbon dioxide and light intensity increase on the cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in open tanks.

Sob redação.

Manuscrito:

Rodrigues, M. S.; Ferreira, L. S.; Lodi, A.; Finocchio, E.; Converti, A.; Carvalho, J. C. M. Metal biosorption onto dry biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis* and *Chlorella vulgaris*: multi-metal systems.

Enviado para a revista Journal of Hazardous Materials, na impressão.

APÊNDICES

FICHA DO ALUNO

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9134 - 5580272/2 - Mayla Santos Rodrigues

Email: mayrod@usp.br
Data de Nascimento: 31/07/1982
Cédula de Identidade: RG - 33.738.475-7 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Farmacêutica-Bioquímica
Universidade Paulista - São Paulo - Brasil - 2006
Mestre em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área: Tecnologia de Fermentações
Mestrado: Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2008

Curso: Doutorado
Programa: Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área: Tecnologia de Fermentações
Data de Matrícula: 21/05/2008
Início da Contagem de Prazo: 21/05/2008
Data Limite: 21/05/2012
Orientador na USP: Prof(a). Dr(a). Joao Carlos Monteiro de Carvalho -
21/05/2008 até o presente.
E.Mail: jcmdcarv@usp.br

Aluno USP em convênio de dupla titulação com instituição estrangeira
Instituição Conveniada: Università degli Studi di Genova
Orientador na Instituição Conveniada: Attilio Converti

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 21/10/2010
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 18/11/2011

Histórico de Ocorrências: Ingressou no Doutorado em 21/05/2008
Matrícula de Acompanhamento em 25/07/2011

Impresso em: 04/12/11 18:54:19

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9134 - 5580272/2 - Mayla Santos Rodrigues

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
QBQ 5744-2/2	Noções Básicas de Segurança em Laboratórios de Pesquisa em Química e Bioquímica (Instituto de Química – USP)	05/08/2008	15/08/2008	15	1	100	A	N	Concluída
FBT 5706-2/1	Estratégias e Gerenciamentos de Processos Farmacêuticos e Biotecnológicos	02/09/2008	03/11/2008	45	3	93.8	A	N	Concluída
FBT 5723-5/1	Conservação de Alimentos por Processos Térmicos	07/04/2009	02/07/2009	90	6	80	A	N	Concluída
FBT 5729-6/1	Liofilização e suas Aplicações a Alimentos e à Medicamentos	08/04/2009	09/06/2009	90	6	100	A	N	Concluída
EDM 5791-5/3	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação – USP)	19/08/2009	30/11/2009	120	8	100	A	N	Concluída
QFL 5816-5/1	Energia e Meio Ambiente (Instituto de Química – USP)	07/10/2009	19/01/2010	120	8	80	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	20	20	32
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	20	20	32
Créditos Atribuídos à Tese: 167			

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito;

B - Bom, com direito a crédito;

C - Regular, com direito a crédito;

R - Reprovado;

T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Impresso em: 04/12/11 18:54:19

CURRICULUM LATTES

Mayla Santos Rodrigues

possui graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Paulista (2005), mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica pela Universidade de São Paulo (2008) e realiza atualmente doutorado na mesma instituição e área (2008-2012), com convênio com a Universidade de Gênova. Tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em Tecnologia de Fermentações.

(Texto informado pelo autor)

Última atualização em 01/02/2012

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2772961682323853>

Dados Pessoais

Nome	Mayla Santos Rodrigues
Filiação	Carlos Alberto Sanches Rodrigues Dirce Maria Corrêa Santos Rodrigues
Nascimento	31/07/1982 - São Paulo/SP - Brasil

Formação Acadêmica/Titulação

Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Orientador: João Carlos Monteiro de Carvalho

com período sanduíche em: Università Degli Studi Di Genova
Orientador: Attílio Converti

2008

Título: Avaliação da utilização do dióxido de carbono proveniente da fermentação alcoólica no cultivo de *Spirulina (Arthrospira) platensis*: uso simultâneo de nitrato de sódio e sulfato de amônio como fontes de nitrogênio em fotobiorreator aberto

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2006 - 2008

Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Orientador: João Carlos Monteiro de Carvalho

Título: Avaliação do cultivo de *Spirulina platensis* utilizando simultaneamente nitrato de potássio e cloreto de amônio como fontes de nitrogênio

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2001 - 2005 Graduação em Farmácia e Bioquímica
Universidade Paulista, UNIP, São Paulo, Brasil

Áreas de atuação

Tecnologia de Fermentações, Engenharia Química, Farmácia

Idiomas

Alemão, Inglês, Italiano

Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Produção em C, T&A

Artigos completos publicados em periódicos

- a) 2010. Ferreira LS, Rodrigues MS, Converti A, Sato S, Carvalho JCM. A new approach to ammonium sulphate feeding for fed-batch *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation in tubular photobioreactor. **Biotechnology Progress**, 26, 1271-1277.
- b) 2010. Rodrigues MS, Ferreira LS, Converti A, Sato S, Carvalho JCM. Fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. **Bioresource Technology**, 101, 4491-4498.
- c) 2010. Sassano CEN, Gioielli LA, Ferreira LS, Rodrigues MS, Sato S, Converti A, Carvalho JCM. Evaluation of the composition of continuously-cultivated *Arthrospira (Spirulina) platensis* using ammonium chloride as nitrogen source. **Biomass and Bioenergy**, 34, 1732-1738.
- d) 2011. Ferreira LS, Rodrigues MS, Carvalho JCM, Lodi A, Finocchio E, Perego P, Converti A. Adsorption of Ni^{2+} , Zn^{2+} and Pb^{2+} onto dry biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis* and *Chlorella vulgaris*. I. Single metal systems. **Chemical Engineering Journal**, 173, 326-333.
- e) 2011. Rodrigues MS, Ferreira LS, Converti A, Sato S, Carvalho JCM. Influence of ammonium sulphate feeding time on fed-batch *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation and biomass composition with and without pH control. **Bioresource Technology**, 102, 6587-6592.
- f) 2012. Ferreira LS, Rodrigues MS, Converti A, Sato S, Carvalho JCM. Kinetic and growth parameters of *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivated in tubular photobioreactor under different cell circulation systems. **Biotechnology and Bioengineering**, 109, 444-450.

- g) 2012. Ferreira LS, Rodrigues MS, Converti A, Sato S, Carvalho JCM. *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation in tubular photobioreactor: Use of no-cost CO₂ from ethanol fermentation. **Applied Energy**, 92, 379-385.
- h) 2012. Rodrigues MS, Ferreira LS, Carvalho JCM, Lodi A, Finocchio E, Converti A. Metal biosorption onto dry biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis* and *Chlorella vulgaris*: multi-metal systems. **Journal of Hazardous Materials**, *in press*.

Apresentação de Trabalho

- a) Ferreira LS, Rodrigues MS, Carvalho JCM. **Avaliação da biomassa de *Arthrospira platensis* em cultivos com diferentes intensidades luminosas e fontes de nitrogênio**, 2008. (Seminário)
- b) Rodrigues MS, Ferreira LS, Carvalho JCM. **Avaliação da biomassa de cultivos de *Spirulina platensis* com nitrato de potássio e cloreto de amônio**, 2008. (Seminário)
- c) Rodrigues MS, Ferreira LS, Carvalho JCM. **Avaliação de custos com fonte de nitrogênio em cultivos de *Spirulina platensis* com nitrato de potássio e cloreto de amônio**, 2008. (Seminário)
- d) Ferreira LS, Rodrigues MS, Carvalho JCM. **Influência da intensidade luminosa no crescimento de *Arthrospira platensis* em cultivos realizados em fotobiorreator tubular utilizando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio**, 2008. (Seminário)
- e) Faria POR, Rodrigues MS, Carvalho JCM. **Avaliação de cultivos de *Spirulina platensis* com cloreto de amônio e nitrato de potássio**, 2007. (Seminário)
- f) Folino BB, Vieira DCM, Rodrigues MS, Sato S, Carvalho JCM. **Avaliação de parâmetros cinéticos para cultivo de *Spirulina platensis* utilizando uréia como fonte de nitrogênio**, 2006. (Simpósio)
- g) Vieira DCM, Rodrigues MS, Sato S, Carvalho JCM. **Avaliação do cultivo de *Spirulina platensis* utilizando uréia como fonte de nitrogênio**, 2006. (Seminário)
- h) Rodrigues MS, Vieira DCM, Carvalho JCM, Sato S. **Cultivo de *Spirulina platensis* utilizando nitrato de potássio e cloreto de amônio**, 2006. (Seminário)
- i) Rodrigues MS, Ferreira LS, Carvalho JCM, Sato S. **Determinação de nitrato em meio de cultivo de *Spirulina platensis***, 2006. (Seminário)