

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

**Influência do tempo de alimentação e da intensidade
luminosa no cultivo de *Spirulina platensis* sob alimentação
com cloreto de amônio**

Raquel Pedrosa Bezerra

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. João Carlos Monteiro de
Carvalho

São Paulo

2006

Raquel Pedrosa Bezerra

Influência do tempo de alimentação e da intensidade luminosa no cultivo de *Spirulina platensis* sob alimentação com cloreto de amônio

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

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

Eliana Dalva Godoy Danesi

1.^a examinadora

Sunao Sato

2.^o examinador

São Paulo, 27 de outubro de 2006.

À minha família, principalmente a minha mãe, Irene V. P. Bezerra e ao meu namorado, Paulo Claudino Vêras.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho pela orientação, dedicação, apoio, amizade, incentivo e paciência que recebi ao longo do meu mestrado.

Ao Prof. Dr. Sunao Sato, chefe do setor de Tecnologia de Fermentações, do Departamento Bioquímico-Farmacêutica da Universidade de São Paulo-Brasil.

Ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior, Prof. Dr. Ana Lúcia Figueiredo Porto, e Prof. Dr. Adilson de Castro Chaves pela indicação do laboratório e confiança depositada em meu trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro que permitiu a execução desse trabalho.

Ao meu amigo Marcelo Chuei Matsudo e sua família, pela colaboração, amizade, atenção, trocas de informações, apoio emocional dentre várias outras coisas boas que tem me proporcionado.

Ao Bruno Folino Brandão pela colaboração na execução da parte prática, aos técnicos do laboratório Kleber Albuquerque Almeida e Dante Augusto Moraes e a todas as pessoas que de alguma forma, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Irene V. P. Bezerra e Adesson P. Bezerra, a minha irmã, Soraya Pedrosa Bezerra e ao meu namorado, Paulo Claudino Vêras, pelo incentivo, apoio, confiança e felicidade durante todo esse tempo.

Aos meus amigos pernambucanos, Fernanda Borba, Eduardo Correia, Anne Priscila Crócia e Anabel Helena que mesmo distante sempre me incentivaram e a minha amiga Célia Bolognesi pelos conselhos e palavras de conforto nos momentos difíceis.

A todos os amigos, Mayla Rodrigues, Livia Seno, Edna Astolfi, Lucas Campana e André Moreni pelo apoio e carinho que me proporcionou durante a pós-graduação, e principalmente a Cíntia Hoch, que além de me acompanhar nas atividades profissionais, tive o prazer de conviver na mesma república recebendo o apoio emocional e me proporcionando momentos de alegrias.

As secretárias da pós-graduação do Deptº. Bioquímico-Farmacêutico (FCF-USP) pela dedicação, apoio e por estarem sempre disponível para ajudar e aos secretários da pós-graduação, Elaine Midori Ychico e Jorge Alves de Lima.

Aos funcionários da Biblioteca do Conjunto das Químicas, pela atenção e disponibilidade de ajuda sempre que precisei.

*"Você precisa fazer aquilo que pensa que
não é capaz de fazer."
(Eleanor Roosevelt)*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Spirulina platensis</i> (UTEX 1926).	26
Figura 2. Proporção de gás carbônico, bicarbonato e carbonato em função dos valores de pH.	40
Figura 3. Concentração de amônia e amônio em relação ao pH	41
Figura 4. Curva de calibração da <i>S. platensis</i> – correlação entre a concentração de biomassa (mg/L) e logaritmo da transmitância.....	52
Figura 5. Foto do cultivo de <i>S. platensis</i> em minitanque	53
Figura 6. Curva de calibração para determinação da concentração de amônia total em meio de cultivo.	55
Figura 7. Relação das variáveis codificadas do planejamento experimental inicial (♦) e adicional (◇) para a otimização da concentração celular máxima (X_m).....	60
Figura 8 . Concentração celular (X) e valor de pH referentes ao experimento 1 ($T_a = 10$ dias, $I = 5$ klux).	65
Figura 9. Concentração de carbonato total referente ao experimento 1 ($T_a = 10$ dias, $I = 5$ klux).....	65
Figura 10. Concentração celular (X) e valor de pH referentes ao experimento 2 ($T_a = 16$ dias, $I = 5$ klux).	67
Figura 11. Concentração de carbonato total referente ao experimento 2 ($T_a = 16$ dias, $I = 5$ klux).	67
Figura 12. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 3 ($T_a = 10$ dias, $I = 11$ klux).	69
Figura 13. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 3 ($T_a = 10$ dias, $I = 11$ klux).	69
Figura 14. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 4 ($T_a = 16$ dias, $I = 11$ klux).	71
Figura 15. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 4 ($T_a = 16$ dias, $I = 11$ klux).	71

Figura 16. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 5 (Ta = 13 dias, I = 3,8 klux).	73
Figura 17. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 5 (Ta = 13 dias, I = 3,8 klux).	73
Figura 18. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 6 (Ta = 8,8 dias, I = 8 klux).	75
Figura 19. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 6 (Ta = 8,8 dias, I = 8 klux).	75
Figura 20. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 7 (Ta = 13 dias, I = 12,2 klux).	77
Figura 21. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 7 (Ta = 13 dias, I = 12,2 klux).	77
Figura 22. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 8 (Ta = 17,2 dias, I = 8 klux).	79
Figura 23. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 8 (Ta = 17,2 dias, I = 8 klux).	79
Figura 24. Concentração celular (X) referente aos experimentos 9 ao 14 (Ta = 13 dias, I = 8 klux)	82
Figura 25. Valores de pH referente aos experimentos 9 ao 14 (Ta = 13 dias, I = 8 klux).....	82
Figura 26. Concentração de carbonato total referentes aos experimentos 9 ao 14 (Ta = 13 dias, I = 8 klux)	83
Figura 27. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 15 (Ta = 13 dias, I = 14 klux).	85
Figura 28. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 15 (Ta = 13 dias, I = 14 klux).	85
Figura 29. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 16 (Ta = 16 dias, I = 12,2 klux).	87
Figura 30. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 16 (Ta = 16 dias, I = 12,2 klux).	87

Figura 31. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 17 (Ta = 16 dias, I = 14 klux).	89
Figura 32. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 17 (Ta = 16 dias, I = 14 klux).	89
Figura 33. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 18 (Ta = 17,2 dias, I = 14 klux)	91
Figura 34. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 18 (Ta = 17,2 dias, I = 14 klux).	91
Figura 35. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 19 (Ta = 19 dias, I = 12,2 klux).	93
Figura 36. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 19 (Ta = 19 dias, I = 12,2 klux).	93
Figura 37. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 20 (Ta = 19 dias, I = 14 klux).	95
Figura 38. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 20 (Ta = 19 dias, I = 14 klux).	95
Figura 39. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 21 (Ta = 19 dias, I = 8 klux).	97
Figura 40. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 21 (Ta = 19 dias, I = 8 klux).	97
Figura 41. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 22 (Ta = 8,8 dias, I = 14 klux).	99
Figura 42. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 22 (Ta = 8,8 dias, I = 14 klux).	99
Figura 43. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 23 (Ta = 10 dias, I = 14 klux).	101
Figura 44. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 23 (Ta = 10 dias, I = 14 klux).	101
Figura 45. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 24 (Ta = 10 dias, I = 12,2 klux)	103

Figura 46. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 24 (Ta = 10 dias, I = 12,2 klux)	103
Figura 47. Concentração celular (X) referente aos experimentos 25 ao 29 (Ta = 17,2 dias, I = 13 klux)	106
Figura 48. Valores de pH referente aos experimentos 25 ao 29 (Ta = 17,2 dias, I = 13 klux).....	106
Figura 49. Concentração de carbonato total referentes aos experimentos 25 ao 29 (Ta = 17,2 dias, I = 13 klux).....	107
Figura 50. Desenho esquemático da assimilação do nitrogênio pela <i>S. platensis</i> . A - representa a enzima nitrato redutase; B – representa a nitrito redutase.....	112
Figura 51. Superfície de resposta para a concentração celular máxima (X_m) em função dos valores codificados do tempo de alimentação (X_1) e da intensidade luminosa (X_2).....	127
Figura 52. Relação linear entre os valores calculados e experimentais da concentração celular máxima (X_m) nos cultivos de <i>S. platensis</i>	129
Figura 53. Superfície de resposta para a produtividade em células (P_x) em função dos valores codificados do tempo de alimentação (X_1) e da intensidade luminosa (X_2).	132
Figura 54. Relação linear entre os valores calculados e experimentais da produtividade em células (P_x) nos cultivos de <i>S. platensis</i>	132
Figura 55. Superfície de resposta para o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função dos valores codificados do tempo de alimentação (X_1) e da intensidade luminosa (X_2).....	135
Figura 56. Relação linear entre os valores calculados e experimentais do fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) nos cultivos de <i>S. platensis</i>	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valor da constante calculado em seu respectivo tempo de alimentação e a concentração de cloreto de amônio total adicionada até o instante "t".....	59
Tabela 2 - Condições experimentais de cada experimento (em valores codificados e em valores reais).....	61
Tabela 3 - Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total referentes ao experimento 1 (Ta = 10 dias, I = 5 klux).....	64
Tabela 4 - Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total referentes ao experimento 2 (Ta = 16 dias, I = 5 klux).....	66
Tabela 5 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 3 (Ta = 10 dias, I = 11 klux).....	68
Tabela 6 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 4 (Ta = 16 dias, I = 11 klux).....	71
Tabela 7 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 5 (Ta = 13 dias, I = 3,8 klux).....	72
Tabela 8 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 6 (Ta = 8,8 dias, I = 8 klux).....	74
Tabela 9 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 7 (Ta = 13 dias, I = 12,2 klux).....	76
Tabela 10 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 8 (Ta = 17,2 dias, I = 8 klux).....	79
Tabela 11 - Concentração celular (X) referentes aos experimentos 9 ao 14 (Ta = 13 dias, I = 8 klux).....	80
Tabela 12. Valores de pH referentes aos experimentos 9 ao 14 (Ta = 13 dias, I = 8 klux).....	81
Tabela 13 - Concentração de carbonato total referentes aos experimentos 9 ao 14 (Ta = 13 dias, I = 8 klux).....	83
Tabela 14 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 15 (Ta = 13 dias, I = 14 klux).....	84
Tabela 15 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 16 (Ta = 16 dias, I = 12,2 klux).....	86

Tabela 16 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 17 (Ta = 16 dias, I = 14 klux).	89
Tabela 17 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 18 (Ta = 17,2 dias, I = 14 klux).	91
Tabela 18 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 19 (Ta = 19 dias, I = 12,2 klux).	92
Tabela 19 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 20 (Ta = 19 dias, I = 14 klux).	94
Tabela 20 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 21 (Ta = 19 dias, I = 8 klux).	96
Tabela 21 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 22 (Ta = 8,8 dias, I = 14 klux).	98
Tabela 22 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 23 (Ta = 10 dias, I = 14 klux).	100
Tabela 23 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 24 (Ta = 10 dias, I = 12,2 klux).	102
Tabela 24 - Concentração celular (X) referentes aos experimentos 25 ao 29 (Ta = 17,2 dias, I = 13 klux).	104
Tabela 25 - Valores de pH referentes aos experimentos 25 ao 29 (Ta = 17,2 dias, I = 13 klux).	105
Tabela 26 - Concentração de carbonato total referentes aos experimentos 25 ao 29 (Ta = 17,2 dias, I = 13 klux).	107
Tabela 27 - Custo do nitrogênio proveniente do nitrato de potássio e do cloreto de amônio.	113
Tabela 28 - Conteúdo de lipídios e proteínas nas biomassas obtidas.	117
Tabela 29 - Valores de X_m (concentração celular máxima), P_x (produtividade em células) e $Y_{X/N}$ (fator de conversão de nitrogênio em células) relacionados com as variáveis independentes.	124
Tabela 30 - Análise da regressão multivariável para a concentração celular máxima (X_m) em função do tempo de alimentação e intensidade luminosa.	126

Tabela 31 - Análise de variância do modelo de regressão multivariável para concentração celular máxima (X_m).	126
Tabela 32 - Análise da regressão multivariável para a produtividade em células (P_x) em função do tempo de alimentação e intensidade luminosa.	130
Tabela 33 - Análise de variância do modelo de regressão multivariável para produtividade em células (P_x).	130
Tabela 34 - Análise da regressão multivariável para o fator de conversão de nitrogênio em celular em células ($Y_{X/N}$) em função do tempo de alimentação e intensidade luminosa.	133
Tabela 35 - Análise de variância do modelo de regressão multivariável para o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$).	133

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

e	base do logaritmo neperiano
I	intensidade luminosa (klux)
K	constante de tempo (dia^{-1})
M_c	quantidade de NH_4Cl adicionada por unidade de volume até instante t (Mm)
M_{ci}	quantidade inicial de NH_4Cl adicionada por unidade de volume (mM)
M_{ct}	quantidade total de NH_4Cl adicionada por unidade de volume = 21 mM, correspondendo a M_c para $t = T_a$
t	tempo (dia)
T_a	tempo de alimentação (dia)
X_1	valor codificado da variável tempo de alimentação
X_2	valor codificado da variável intensidade luminosa
X_m	concentração celular máxima (mg/L)
P_x	produtividade em células (mg/L.dia)
$Y_{X/N}$	fator de conversão da fonte de nitrogênio em células (mg/mg)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2. 1. HISTÓRICO.....	21
2. 2. COMERCIALIZAÇÃO	22
2. 3. CLASSIFICAÇÃO	26
2. 4. IMPORTÂNCIA.....	27
2. 5. PROPRIEDADES	31
2. 6. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO.....	34
2. 6. 1. Efeito da fonte de carbono	35
2. 6. 2. Efeito da fonte de nitrogênio	36
2. 6. 3. Efeito do pH	39
2. 6. 4. Efeito da temperatura.....	42
2. 6. 5. Efeito da intensidade luminosa.....	43
2. 6. 6. Cultivos em tanques abertos.....	45
2. 7. PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO DE CULTIVO	45
3. OBJETIVOS	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
4. 1. Microrganismo	50
4. 2. Manutenção da <i>S. platensis</i>	50
4. 3. Preparação do inóculo	51
4. 4. Construção da curva de calibração	51
4. 5. Descrição de um experimento típico.....	52
4. 6. Técnicas Analíticas.....	54
4. 6. 1. Acompanhamento dos cultivos	54
4. 6. 1. 1. Determinação da concentração celular	54
4. 6. 1. 2. Determinação da concentração de amônia total.....	54
4. 6. 1. 3. Determinação da concentração de carbonato total	55
4. 6. 1. 4. Determinação do pH.....	56
4. 6. 2. Avaliação da biomassa obtida.....	56
4. 6. 2. 1. Proteínas totais.....	56
4. 6. 2. 2. Lipídios totais.....	57
4. 6. 3. Cálculo dos parâmetros cinéticos.....	57

4. 6. 3. 1. Produtividade em células.....	57
4. 6. 3. 2. Fator de conversão de nitrogênio em células	57
5. PLANO DE TRABALHO	58
5.1. Processo de cultivo.....	58
5. 2. Experimentos realizados.....	60
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
6. 1. Avaliação do crescimento microbiano.....	64
6. 2. Avaliação do conteúdo de proteínas e lipídios.....	117
6. 3. Avaliação dos parâmetros cinéticos pelo modelo estatístico de regressão multivariável.....	123
6. 3. 1. Concentração celular máxima	125
6. 3. 2. Produtividade em células	130
6. 3. 3. Fator de conversão de nitrogênio em células.....	133
7. CONCLUSÕES	137
8. REFERÊNCIAS.....	139

RESUMO

A Cianobactéria *Spirulina platensis* representa uma fonte de proteínas e ácidos graxos que a tornam importante como suplemento alimentar. A fonte de nitrogênio é um nutriente que exerce influência em seu metabolismo. Neste trabalho, observou-se o crescimento de *S. platensis* e a composição da biomassa obtida, com a utilização de cloreto de amônio como fonte de nitrogênio por processo descontínuo alimentado. Com a utilização de planejamento fatorial, foi realizado o estudo do tempo de alimentação do cloreto de amônio e da intensidade luminosa no cultivo da *S. platensis*. Os resultados foram avaliados com auxílio da metodologia de superfície de resposta. Menores teores de proteínas e lipídios na biomassa final foram encontrados nos cultivos submetidos a maiores intensidades luminosas. A condição ótima calculada, obtida pela análise estatística, para a obtenção da concentração celular máxima (X_m) e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) foi encontrada no cultivo sob intensidade luminosa de 13 klux e tempo de alimentação de 17,2 dias. Nessas condições foram obtidos X_m igual $1771 \pm 2,3$ mg/L e $Y_{X/N}$ igual a $5,7 \pm 0,17$ mg/mg, 3,4 % e 4,0 % menores que os valores máximos estimados pelo modelo matemático, respectivamente. Maiores produtividades foram obtidas nos cultivos submetidos a maiores intensidades luminosas e menores tempos de alimentação.

Palavras-chave: *Spirulina platensis*; processo descontínuo alimentado; intensidade luminosa; cloreto de amônio.

ABSTRACT

Cyanobacterium *Spirulina platensis* represents a protein and fatty acid source that becomes it important as food supplement. The nitrogen source is a nutrient that influences in its metabolism. In this work, it was observed the *S. platensis* growth and biomass composition using ammonium chloride as nitrogen source in fed-batch process. Using factorial experimental design, it was carried out the study of the ammonium chloride feeding time and light intensity in the *S. platensis* culture. The results were evaluated by response surface methodology (RSM). Lower protein and lipids contents were found in cell cultures cultivated at higher light intensity. The predictive optimal condition, obtained by statistic analysis, for maximum cellular concentration (X_m) and nitrogen-cell conversion factor ($Y_{X/N}$) was obtained in the culture grown at 13 klux and feeding time of 17.2 days. In these conditions, X_m of 1771 ± 2.3 mg/L and $Y_{X/N}$ of 5.7 ± 0.17 mg/mg were obtained. These values are 3.4 % and 4.0 % lower than that ones predicted by mathematical model, respectively. Higher productivities were observed in the culture grown at higher intensity light and lower feeding time.

Key words: *Spirulina platensis*; fed-batch process; light intensity; ammonium chloride.

1. INTRODUÇÃO

Spirulina platensis são cianobactérias filamentosas fotossintetizantes caracterizadas por tricomas cilíndricos multicelulares com formas espiraladas. Devido a sua morfologia, taxa de crescimento celular relativamente alta e a característica das células se agregarem, o custo operacional para a recuperação de biomassa é reduzido, tornando-a economicamente viável para a produção industrial (PHAM QUOC & DUBACQ, 1997).

O interesse na biotecnologia e na produção comercial da *Spirulina* spp. aumentam devido a algumas propriedades particulares como alta digestibilidade protéica (90%), baixa concentração de ácidos nucléicos (4%), alto teor de proteínas (50 - 70% da massa seca), e uma importância quantitativa de aminoácidos essenciais, melhorando seu alto valor nutricional (MORIST *et al.*, 2001). Nesta biomassa, encontram-se também vitaminas, polissacarídeos e pigmentos como a ficocianina, clorofila a, β -caroteno. Além das propriedades nutricionais e medicinais, a *Spirulina* spp. pode ser usada como prebióticos, recuperação de água em vôos espaciais, alimentação em aquacultura e no tratamento de águas residuais domésticas e industriais, produzindo, neste caso, biomassa para alimentação animal.

O meio de cultura convencional para a obtenção da biomassa utiliza sais de nitrato como fonte de nitrogênio, como, por exemplo, nitrato de potássio e nitrato de sódio. Fontes alternativas de nitrogênio, como uréia e sais de amônio, estão sendo pesquisadas com a finalidade de diminuir os custos na produção industrial. Ambos, o tipo e a quantidade da fonte de nitrogênio no meio de cultura influenciam no crescimento e composição da biomassa (STANCA & POPOVICI, 1996).

Faintuch (1989) estudando diferentes fontes de nitrogênio para cultivo de *Spirulina maxima* por processo descontínuo verificou que a utilização de fontes alternativas de nitrogênio em vez de nitrato, como cloreto de amônio e uréia, só foi viável com reduzidos níveis de concentração do nutriente, com conseqüente diminuição da quantidade de biomassa produzida. Por outro lado, há estudos indicando que durante depleção de nitrato o crescimento pára e apoproteínas e ficocianinas são degradadas para suprir as necessidades de nitrogênio (CORNET *et al.*, 1998), o que poderia ser estendido para outras fontes, uma vez que o nitrogênio incorporado nos aminoácidos é o amoniacal.

Com a utilização do processo descontínuo alimentado, faz-se possível a adição de nutrientes sem prejudicar o crescimento microbiano, prevenindo o acúmulo de substrato e diminuindo sua perda por evaporação quando for utilizar nutrientes voláteis em cultivos em tanques abertos. Além disso, o custo operacional em relação a um cultivo descontínuo não seria alterado no caso de se alimentar o cultivo por meio de pulsos diários.

O tempo de alimentação no cultivo descontínuo alimentado é de extrema importância por determinar o fornecimento mínimo do nutriente limitante de modo que não prejudique na velocidade de crescimento e não permita elevadas concentrações no meio de cultura se o nutriente for tóxico, como é o caso da amônia, íon predominante no meio de cultivo quando do emprego de cloreto de amônio como fonte de nitrogênio.

Fatores ambientais também influenciam na produção das microalgas fotossintetizantes. Entre os principais, encontramos a intensidade luminosa e a disponibilidade de nitrogênio. O cultivo de *Spirulina platensis* possui dois processos limitantes na qual baixa intensidade luminosa e baixa concentração de nitrogênio

podem limitar o crescimento celular. Por outro lado, altas intensidades luminosas e altas concentrações de nitrogênio podem inibir o crescimento celular. Essas características implicam que o processo descontínuo alimentado pode ser usado para o crescimento da *Spirulina* spp. a fim de aumentar a densidade celular e o conteúdo de proteínas e lipídios, desde que a concentração de nitrogênio adicionada possa ser gradativamente aumentada sem resultar na inibição do crescimento.

Neste trabalho, uma estratégia particular foi selecionada para produzir uma maior quantidade de biomassa, enriquecida de proteínas e lipídios, a partir dos efeitos da intensidade luminosa e do tempo de alimentação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. 1. HISTÓRICO

Foi no México, em 1521, que se teve notícia das primeiras cianobactérias, retiradas do lago Texcoco, na região da atual cidade do México. Desempenhava importante papel na alimentação dos Astecas, que a chamavam de “Tecuitlatl”, antes dos espanhóis conquistarem o México atual. Acredita-se que o prato mexicano, junto com o milho e tabaco tenha sido levado à África nas viagens de ida, em navios que transportavam escravos africanos para a América, tornando-se um alimento para o povo Kanembu, na África Central, que cultivam essa cianobactéria no Lago Chade. Após a conquista, os espanhóis consumiam o Tecuitlatl com milho e outros cereais sob a forma de um molho denominado “chimalli”, o qual era preparado com tomate, pimenta e vários temperos. Os espanhóis levaram o alimento para a Índia, onde foi comercializado e consumido em grandes quantidades (CIFERRI & TIBONI, 1985; DURAND-CHASTEL, 1980; PANIAGUA-MICHEL *et al.*, 1993).

Spirulina foi uma fonte alimentar para muitas culturas durante toda a história. Os Astecas e os Maias usaram *Spirulina* como uma parte central de sua dieta. Na África, os povos de Kanembu, que vivem ao longo das costas do lago República do Chade, alimentam-se dessas algas até hoje. Essas cianobactérias são retiradas dos lagos, estendidas sobre pedras e secas ao sol, resultando no alimento conhecido como “Dihé”. (PANIAGUA-MICHEL *et al.*, 1993).

Apesar de ter sido utilizada como alimento pela população da África e Ásia há muito tempo, cientistas constataram os benefícios dessa microalga somente no final do século passado, em que começou a ser usada como suplemento nutricional por conter diversas substâncias benéficas para o ser humano, entre elas todos os

aminoácidos conhecidos e uma ampla variedade de minerais e vitaminas, inclusive a B12, cuja fonte habitual é o tecido animal.

2. 2. COMERCIALIZAÇÃO

Algas aquáticas são um grupo de organismos geneticamente diversos com amplas características bioquímicas e fisiológicas e, para crescerem, requerem apenas água, luz, CO₂ e nutrientes inorgânicos. Essas características, juntamente com sua alta taxa de crescimento, fazem algumas algas uma fonte atrativa de biomassa, com significativa vantagem técnica e comercial (CHRONAKIS *et al.*, 2000).

O cultivo comercial em larga escala de microalgas iniciou por volta de 1960 no Japão com o cultivo de *Chlorella* (TSUKADA *et al.*, 1977). Posteriormente, em 1970, a *Spirulina* sp. começou a ser comercializada devido a sua facilidade de cultivo e recolhimento no Lago Texcoco, México, por Sosa Texcoco S.A (DURAND-CHASTEL, 1980). Desde então, as indústrias de biotecnologia de microalgas vêm crescendo e se diversificando consideravelmente.

Esta explosão de atividades relacionadas com a produção de microalga tem conduzido para o desenvolvimento de muitos aspectos de sua ecologia, fisiologia e bioquímica. As três principais espécies de microalgas que têm atraído, até agora, a atenção de cientistas e indústrias são *Dunaliella*, *Chlorella* e *Spirulina*, mas muitas outras estão sendo pesquisadas para a produção de componentes de alto valor (LI & QI, 1997).

Uma atenção particular tem sido dada para a *Spirulina platensis* por causa de suas propriedades nutricionais e terapêuticas (ESTRADA *et al.*, 2001). Ela pode ser utilizada para a produção de alimentos saudáveis com valor no mercado por

apresentar algumas substâncias químicas particulares, em muitos casos encontradas em concentrações relativamente altas como ácido graxo γ -linolênico, ficocianina, xantofila e zeaxantina (DILLON *et al.*, 1995; HIRATA *et al.*, 2000; SÁNCHEZ, 2003; COHEN, 1997).

A simples tecnologia de cultivo e a alta qualidade e quantidade de proteínas, bem como ausência de efeitos tóxicos (SALAZAR *et al.*, 1998) favorecem a produção dessa cianobactéria em larga escala (LI *et al.*, 2003).

As *Spirulina* spp. são comercializadas internacionalmente como suplemento dietético para humanos e alimento animal (BELAY *et al.*, 1993). Numerosos estudos ressaltam seus valores terapêuticos, destacado pela ausência de efeitos secundários (SÁNCHEZ *et al.*, 2005; MCKASLE, 2005).

Na atualidade, há várias companhias no mundo que produzem biomassa de *Spirulina* spp., e o principal destino de seus produtos são lojas de produtos naturais e farmácias, onde a biomassa seca é vendida como suplemento alimentar. Além disso, são utilizadas na alimentação animal e extração de pigmentos para uso em alimentos no Japão (BELAY, 1997). Podem servir como complemento alimentar para camarões, mamíferos, aves e aumentando a pigmentação dos peixes ornamentais (MCKASLE, 2005). A produção da biomassa ainda pode ser utilizada industrialmente para produção de biogás por digestão anaeróbica (SAMSON & LUDDY, 1982) e na produção de emulsificantes e agente gelatinizantes (CHRONAKIS *et al.*, 2000).

Entre várias algas do gênero, *Spirulina* spp é a única cianobactéria que se destaca no âmbito industrial pela sua capacidade de crescer em grande escala, tendo uma produção anual no mundo de aproximadamente 3000 toneladas (SHIMAMATSU, 2004) e por ser recolhida mais facilmente devido a sua morfologia filamentosa (PIORRECK *et al.*, 1984), o que diminui os custos de produção quando

comparadas ao cultivo em larga escala das microalgas *Chlorella* sp. e *Oscillatoria* sp.

A produção de microalgas fotossintetizantes obteve uma grande ascensão no mundo em função da possibilidade de utilização de culturas de algas como renovadoras de oxigênio e fonte de proteína alimentar em vôos espaciais (BOROWITZKA, 1999). No final dos anos 70, Sosa Texcoco Co., localizada no México, foi a primeira indústria a produzir a *Spirulina* em larga escala. Posteriormente, diversos países como Taiwan, Índia, Estados Unidos, México e Japão iniciaram a produção dessa microalga em biorreatores abertos (SHIMAMATSU *et al.*, 2004). Essa microalga pode também crescer naturalmente em lagos salgados da América do Sul e Central e na África devido a suas condições climáticas.

Os resultados dos primeiros testes utilizando *Chlorella* spp. para consumo humano não foram satisfatórios (POWELL *et al.*, 1961), devido aos problemas com a digestibilidade da biomassa algal. Apresentam parede celulósica altamente resistente e a autólise só ocorre depois extração butanólica que remove a parede celulósica, e acentua o forte gosto de espinafre característicos da biomassa, tornando-a não competitiva em relação às proteínas vegetais (MITSUDA, 1962). Diversas técnicas para a determinação do rompimento da parede celular mais eficientes têm sido aplicadas, como secagem ao sol (*sun drying*), liofilização (*freeze drying*), atomização (*spray drying*) e cocção. Morist *et al.* (2001) estudando a recuperação e o tratamento de cultivo de *S. platensis* para fins alimentares conclui que a técnica de “*freeze-dryer*” é a mais recomendada porque a degradação do produto foi pequena, e evita a deterioração dos constituintes mais frágeis tais como vitaminas, ácidos graxos essenciais, podendo a biomassa ser consumida por inteira

e, conseqüentemente, permanecendo a alta qualidade do produto. Por outro lado, a técnica “*spray-drying*” é utilizada comercialmente em outras áreas tendo vantagem adicional por manter uniformidade na aparência do produto e ser relativamente fácil de embalar. Por outro lado, Becker & Venkataraman (1984) relatou que o “*sun drying*” (secagem ao sol) é a melhor técnica para romper a parede celular das cianobactérias, e no caso da *S. platensis*, essa técnica é suficiente para o seu aproveitamento no consumo humano, aumentando a digestibilidade de 74-76% para 91-95%.

O gênero *Spirulina* supera as dificuldades de digestibilidade citadas em relação às microalgas por apresentar a parede celular de natureza peptidoglicano (TOMASELLI, 1997), tornando-a uma interessante escolha para cultivo em larga escala.

Na produção comercial da *Spirulina* spp., fatores como a composição do meio de cultura devem ser levados em consideração. Sabe-se que 15-25% do gasto total com a produção de microalga é devido ao meio de cultura exigido para o desenvolvimento (BELAY, 1997).

O sucesso para a produção comercial em larga escala da microalga depende de muitos fatores, e um desses fatores é o desenvolvimento de um cultivo eficaz e econômico, mas isso é um processo gradual.

2. 3. CLASSIFICAÇÃO

O gênero *Arthrospira* (ordem *Oscillatoriales*, família *Cyanophyceae*) contém o grupo de cianobactérias fotossintetisantes filamentosas cilíndricas, de cor verde azulada, caracterizadas por uma cadeia de células na forma de espiral e envolvida por uma bainha fina, cujas paredes transversas podem ser vistas sob microscopia

ótica (GUGLIELMI *et al.*, 1993). O conjunto de células filamentosas cilíndricas é denominado tricoma (Figura 1). Estes possuem comprimentos de aproximadamente 500 μm e diâmetro variando de 6-12 μm (TOMASELLI, 1997), mas dependendo das condições de cultivo podem adquirir morfologias diferentes. Os filamentos não possuem ramificações nem heterocistos. Sua reprodução é por fissão binária, produzindo vários descendentes semelhantes geneticamente. Também pode ocorrer a fragmentação dos tricomas, com a correspondente formação dos necrídeos. Esses fragmentos, também denominados de hormogônias, dão origem a um novo tricoma.



Figura 1. *Spirulina platensis* (UTEX 1926).
Fonte: Universidade do Texas, 2006.

Embora o gênero *Arthrospira* tenha sido oficialmente incluído no Bergey's Manual of Systematic Bacteriology em 1989 (CASTENHOLZ), as espécies *Arthrospira maxima* e *Arthrospira platensis*, que são cultivadas em nível industrial em diversas regiões do mundo, são freqüentemente referidas como *Spirulina maxima* e *Spirulina platensis*, e a biomassa destas cianobactérias é comercializada com a denominação de 'spirulina'. Esta denominação é ainda uma influência do tratado taxonômico publicado por Geitler em 1932, que propôs que todas as espécies da ordem *Oscillatoriales* que formam filamentos helicoidais fossem incluídas no gênero *Spirulina*. Entretanto, em 1892 os gêneros *Arthrospira* e *Spirulina* já haviam sido

separados por Gomont (1893), que foi citado por GUGLIELMI *et al.* (1993). Atualmente, o posicionamento de *Arthrospira* e *Spirulina* em dois gêneros separados é adotado por diversos autores (GUGLIELMI *et al.*, 1993; RIPPKA *et al.*, 1981; SCHELDEMAN *et al.*, 1999) e a separação entre os dois gêneros tem sido confirmada repetidamente com base em muitas características morfológicas e genéticas (TOMASELLI, 1997). Mas mesmo assim a denominação *Spirulina* tem sido usada para designar a biomassa das cianobactérias do gênero *Arthrospira*.

2. 4. IMPORTÂNCIA

As algas marinhas são muitas vezes vistas pela imprensa como os “futuros salvadores” da fome mundial, apesar de este problema ser a má distribuição e não a falta de produção de alimentos (GUIRY & BLUNDEN, 1991).

Diversas microalgas têm sido amplamente estudadas devido aos grandes interesses industriais. No entanto, poucas possuem tantas vantagens nutricionais como as *Spirulina* spp. Entre alguns exemplos de microalga com importância nutricional temos o *Haematococcus pluvialis* Flotow, que acumula grande quantidade de astaxantina, o qual é usado como fonte de pigmentação para peixes em aquicultura (especialmente em salmonídeos) e para ovos de indústria de criação de aves, e é também reconhecido por ter uma maior atividade antioxidante que outros pigmentos (MIKI, 1991; KOBAYASHI *et al.*, 1997). A *Chlorella vulgaris* é uma microalga alaranjada, que produz astaxantina, cantaxantina e, em menor quantidade β -caroteno e luteína (PRATT, 1992). A *Dunaliella salina* é também um produtor de β -caroteno, mas com um rendimento maior que a *Chlorella vulgaris* (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Este composto está presente na pro-vitamina A e tem propriedades antioxidantes (MENDES *et al.*, 2003).

Das microalgas e cianobactérias que tem sido usadas na alimentação humana e animal em muitas partes do mundo, a *Spirulina platensis* é a mais popular (ANUPAMA, 2000). O uso da *Spirulina* spp. como complemento protéico em populações com carências alimentares mostra-se viável (PHAM QUOC, 1997). A *Spirulina* sp destaca-se como suplemento alimentar por possuir grande quantidade de proteínas (BELAY *et al.*, 1997), lipídios, vitaminas, minerais e pigmentos (PHAM QUOC, 1997).

Pesquisas feitas desde os anos 80 indicam que produz bons resultados quando usada como complemento dietético em pacientes com afecções intestinais, renais (FAROOQ *et al.*, 2004), diabetes mellitus, hiperglicemia (PARIKH P *et al.*, 2001), hiperlipidemia (SAMUELS *et al.*, 2002; NAGAOKA *et al.*, 2005), anemia (CHAMORRO *et al.*, 2002), hipertensão (SUETSUNA & CHEN, 2001), atua como anti-inflamatório (SUBHASHINI *et al.*, 2004), atribuindo a esta cianobactéria um conjunto de propriedades que dificilmente podem ser encontradas concomitantemente em um único produto natural. Em virtude destes possíveis efeitos, a biomassa de *Spirulina* spp. foi apontada como sendo de grande interesse para a pesquisa de moléculas bioativas (CHRONAKIS *et al.*, 2000).

A ficocianina, um dos pigmentos que compõem a alga, reduz a predisposição para o desenvolvimento de células cancerosas (SUBHASHINI *et al.*, 2004). Extrato celular de *Spirulina maxima* e *Chlorella vulgaris* apresentam atividade antioxidante e antiproliferativa nas células cancerosas hepáticas nos seres humanos. No entanto, extrato celular de *Spirulina* apresentou um efeito inibitório na proliferação das células cancerosas hepáticas maior que a *Chlorella* (WU *et al.*, 2005).

Foi comprovado que as *Spirulina* spp. pode ser usada como prébióticos para o crescimento das bactérias lácticas *Lactobacillus lactis* C2, *Lactobacillus delbrueckii*

subsp. Gasson, e *Lactobacillus bulgaricus* YL1, in vitro, (PARADA *et al.*, 1998) melhorando na digestão e absorção de alimentos protegendo o intestino contra infecção bacteriana e estimulando o sistema imune (SÀNCHEZ *et al.*, 2005; BLINKOVA *et al.*, 2001).

Ultimamente, interesses têm surgido em relação às propriedades farmacológicas de substâncias presentes na biomassa de *Spirulina* spp., como o ácido γ -linolénico (KATAOKA *et al.*, 1983), polissacarídeos e devido a presença de compostos com potencial antioxidante (DILLON & PHAN, 1993). Em trabalhos de revisão publicado por Belay *et al.*, (1993) e Chamorro *et al.*, (2002), são citados vários estudos cujos resultados indicam um grande potencial para o uso farmacológico desta cianobactéria.

Em geral, biomassas microbianas possuem elevados teores de ácidos nucléicos. Devido à inabilidade do organismo humano para metabolizar o ácido úrico proveniente do metabolismo das purinas, o aumento no consumo de ácidos nucléicos pode levar a altos níveis de ácido úrico no soro. Desta forma poderia culminar no desenvolvimento de moléstias como a gota. Neste contexto, as microalgas e cianobactérias são os microrganismos que apresentam os menores teores de ácidos nucléicos em suas biomassas (cerca de 4–6 %), contra 8–12 % para leveduras e 20 % para bactérias (ARAÚJO *et al.*, 2003), fazendo das microalgas e cianobactérias, em relação a ácidos nucléicos, os microrganismos com maior tolerância de consumo diário.

Além da importância nutricional, as *Spirulina* spp. apresentam outras finalidades como:

1. A Agência Espacial Européia considera *Spirulina* spp. ideal para ser usada em vôos espaciais a longo prazo por ser um microrganismo que possui

bom rendimento energético da fotossíntese, tempo de geração relativamente curto, baixo risco de contaminação devido ao pH ótimo de crescimento ser bastante elevado (pH 8 a 11), sendo um alimento com alto valor nutricional, boa digestibilidade e atóxico (BARÒ, 2003).

2. As proteínas da *Spirulina pacifica* podem ser usadas com estabilizantes de emulsões e espumas, pois apresentam pequena tensão interfacial entre ar/água (CHRONAKIS *et al.*, 2000).
3. Olguín (2000) relatam um sistema integrado no qual usa água do mar não tratada com efluentes anaeróbicos da criação de porcos como um processo atrativo que tem 2 finalidades: produção da *Spirulina* a baixo custo e tratamento de resíduo animal. Tam & Wong (1990) sugerem a utilização da cianobactéria como um processo alternativo de tratamento secundário para remoção simultânea de nutrientes e compostos orgânicos de esgoto.
4. Chuntapa *et al.*, (2003) integraram a produção de camarão e recolhimento semi-contínuo de *S. platensis* demonstrando um controle satisfatório na qualidade da água e, ao mesmo tempo, obtendo uma alta quantidade de camarão (83 camarões/m²).
5. Na Etiópia, vaqueiros fazem seus rebanhos beberem água dos lagos contendo *Spirulina* spp. uma vez por mês, acreditam que tem efeitos terapêuticos e compensa alguma falha na alimentação diária (KEBEDE, 1997).

2. 5. PROPRIEDADES

A composição química da *Spirulina* spp. indica ter um alto valor nutricional devido a ampla variedade de nutrientes essenciais, como vitaminas, minerais e

proteínas (DILLON & PHAN, 1993). O conteúdo de proteínas oscila entre 50 e 70 % de sua massa seca. No entanto, deve-se considerar uma variação de 10 a 15 %, dependendo do fotoperíodo no momento da coleta; assim, os valores mais altos que se tem obtido é no começo do período luminoso (AYCHUNIE *et al.*, 1996).

Do ponto de vista qualitativo, as proteínas de *Spirulina* são completas e contém todos os aminoácidos essenciais, que representam 47 % do peso total das proteínas (DILLON *et al.*, 1995). Entre esses aminoácidos encontram-se os oito aminoácidos essenciais (Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Treonina, Triptófano e Valina) (COHEN, 1997).

Entre os aminoácidos, os que se encontram em concentrações menores são os sulfurados: Metionina e Cisteína, que estão presentes em 60% do valor ideal recomendado pela FAO/WHO/ONU (com base na albumina do ovo) (DILLON *et al.*, 1995; SVS/MS, portaria nº 222). Os teores de lisina na *Spirulina* spp. apresentam 68 % em relação a albumina do ovo, de acordo com a FAO/WHO/UNU (1985) (DILLON *et al.*, 1995; SVS/MS, portaria nº 222), contendo teores suficientes para consumo, segundo Clément *et al.*, (1967). Este espectro de aminoácidos mostra que o valor biológico das proteínas de *Spirulina* spp. é muito alto, e bom para o consumo.

Spirulina spp. é rica em vitaminas como Cianocobalamina (B12), Pirodoxina (B6), Riboflavina (B2), Tiamina (B1), Tocoferol (E) e Filoquinona ou Fitonadiona (K) (BRANGER *et al.*, 2003). A presença da vitamina B12 evita transtornos no sistema nervoso e anemias provocadas por uma dieta vegetariana desbalanceada ou carencial. A vitamina B12 que praticamente só existe em fontes de origem animal, apresenta no caso da *Spirulina* spp. um conteúdo de 0,11 mg / 100 g de

biomassa (SHIMAMATSU, 2004), sendo portanto, um alimento de vital importância para os vegetarianos.

Apresenta os principais ácidos graxos polinsaturados como ácido Linolêico e linolênico ω -3 (α -linolênico) e quantidades substanciais do raro ácido linolênico ω -6 (γ -linolênico), que varia de 8 a 31 % no total de ácidos graxos, dependendo de como ela é cultivada (HIRANO *et al.*, 1990) e é encontrado em quantidades significativas somente no leite materno, no óleo das sementes da Prímula-da-Noite (Evening Primrose), frutos de groselhas pretas e borragem, sendo possível encontrá-lo em fungos e cianofíceas (COHEN, 1993). Este ácido graxo poliinsaturado tem uma importante função no metabolismo humano e tem sido aplicado em vários tratamentos farmacêuticos tais como esquizofrenia, esclerose múltipla, diabetes e artrite reumática (KENNEDY *et al.*, 1993).

Recentemente, numerosos estudos epidemiológicos têm indicado que a ingestão de vegetais verdes e amarelos trazem benefícios à saúde. Esses estudos sugerem que as substâncias efetivas para esses efeitos são compostos fitoquímicos, carotenóides e outros antioxidantes (GOMES-CORONADO *et al.*, 2004; HERRERO *et al.*, 2004). Estudos nutricionais de *Spirulina* spp. apontam evidências científicas mostrando que a cianobactéria é rica em compostos fitoquímicos típicos de vegetais verdes e amarelos, e que sua ingestão tem efeito benéfico sobre a saúde. Este resultado faz possível a produção de compostos fitoquímicos típicos de plantas pelo método de cultivo industrial.

Há um interesse atual em encontrar antioxidantes novos e seguros das fontes naturais tais como materiais de plantas para impedir a deterioração oxidativa do alimento e para minimizar os danos oxidativos às células vivas (PRATT, 1992). Portanto, o consumo de antioxidantes na dieta por apresentarem benefício na saúde

humana (KEHRER, 1994). O uso de antioxidantes sintéticos diminuiu devido a uma rejeição geral do consumidor de aditivos sintéticos (NAMIKI, 1990). Componentes com atividades antioxidantes e compostos fenólicos podem ser encontrados em poucas espécies de algas (SAKATA, 1992). Enquanto a ocorrência de compostos fenólicos em plantas é bem conhecida, e estes grupos possuem atividade antioxidante em sistemas biológicos (HO, 1992), as características antioxidantes de algas são pouco conhecidas. Miranda *et al.* (1998) encontraram atividade antioxidante em extratos de *Spirulina* spp. tanto in vitro como in vivo. Estrada *et al.* (2001) relataram a presença da ficocianina como responsável da atividade antioxidante do extrato protéico da *Spirulina platensis*.

S. platensis contém altos níveis de carotenóides (ANNAPURNA *et al.*, 1991), especialmente β -caroteno (CARERI *et al.*, 2001); clorofila (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004); ficobilinas, que constituem 20% da proteína celular e são quantitativamente os pigmentos dominantes em *Spirulina* sp (RICHMOND, 1989; REDDY *et al.*, 2000). Entre os outros carotenóides, encontram-se em menor quantidade a β -criptoxantina e a zeaxantina (CARERI *et al.*, 2001).

Apresentam quantidades apreciáveis de fibras e minerais como ferro, cálcio, potássio, fósforo, manganês, cobre, zinco, magnésio (BRANGER *et al.*, 2003), boro, molibidênio, selênio e zinco (SEDYKH *et al.*, 2005).

Outra importante propriedade das *Spirulina* spp. é que, por ter envoltório celular mais parecido com uma bactéria do que com uma alga, suas paredes celulares são mais digeríveis do que outras, uma vez que são constituídas por peptideoglicano (TOMASELLI, 1997) e não por celulose. Deste ponto de vista nutricional significa uma grande vantagem, pois o homem a digere facilmente, e seus constituintes são assimilados sem necessidade de cocção nem de qualquer outro

tipo de tratamento. Desta maneira, os constituintes mais frágeis (vitaminas, ácidos graxos essenciais, etc.) estão disponíveis sem degradação alguma, podendo sua biomassa ser consumida por inteira.

2. 6. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

O gênero *Spirulina* spp. diferencia-se do resto das cianobactérias particularmente devido ao seu nicho ecológico. Estes microrganismos proliferam em águas muito mineralizadas, extremamente alcalinas e quentes. Estas condições excluem a maioria dos seres vivos. O desenvolvimento das *Spirulina* spp. nesses tipos de meios reforça a diminuição da contaminação devido principalmente a dois fenômenos:

1. Ao consumir os carbonatos e bicarbonatos de seu meio, as *Spirulina* spp. tendem a aumentar mais a alcalinidade do líquido, chegando a alcançar um valor de pH de 12,5.

2. Altamente pigmentados, freqüentemente os filamentos de *Spirulina* spp. formam uma camada muito eficaz que priva de luz solar de penetrar dificultando o desenvolvimento do outras algas como por exemplo a *Chlorella*, uma microalga comestível que pode se proliferar, às vezes, nos cultivos de *Spirulina* spp.

O Lago Chade, no continente Africano, é o ambiente natural mais propício para o desenvolvimento das microalgas. Em função das chuvas e evaporação, a salinidade varia de 8,5-200 g/L. A temperatura média é de 25,5 °C, pH alcalino (9,5 - 11,0), índice pluviométrico baixo; sódio, bicarbonato e carbonato são íons predominantes (ILTS, 1980; BECKER & VENKATARAMAN, 1987). São extensos e rasos, proporcionado geografia perfeita para a proliferação das microalgas, já que a

baixa profundidade facilita a captação de luz necessária para a realização do processo fotossintético.

É possível que fatores como intensidade de luz, temperatura e composição do meio de cultivo, que podem variar de uma região produtora para outra, além do estágio de crescimento celular, possam resultar no acúmulo de diferentes metabólitos, e proporcionar atividades biológicas distintas em função de tais condições.

2. 6. 1. Efeito da fonte de carbono

Tradicionalmente a *Spirulina* spp. é cultivada autotroficamente na presença de altos níveis de carbonatos e bicarbonatos como fontes de carbono por serem de baixo custo e proporcionarem pH elevado no meio, ideal para o desenvolvimento desse microrganismo. A fonte de carbono principal é o íon bicarbonato que entra na célula por transporte ativo, posteriormente a enzima anidrase carbônica presente no meio intracelular e/ou na membrana periplasmática age sobre o bicarbonato liberando o dióxido de carbono. Este é incorporado no ciclo de Calvin produzindo moléculas orgânicas, tais como carboidratos, proteínas e lipídios (KAPLAN & REINHOLD, 1999).

Em baixa concentração extracelular de bicarbonato, as cianobactérias têm a capacidade de acumular o bicarbonato no meio intracelular (CORNET *et al.*, 1998) e utilizar o dióxido de carbono como fonte de carbono para seu metabolismo. No meio contendo apenas carbonato não ocorre um aumento da biomassa e o pH mantém-se praticamente invariável, salientando a importância do bicarbonato no metabolismo das cianobactérias (BINAGHI *et al.*, 2003).

Spirulina spp. crescem em condições mixotrófica e heterotrófica. Em condições heterotróficas possuem uma longa fase lag de crescimento e uma pequena velocidade específica de crescimento. Em contraste, a cultura mixotrófica não apresenta uma fase lag. No entanto, em cultura mixotrófica há dois fatores que podem limitar o crescimento celular, a baixa intensidade luminosa e baixa concentração de carbono orgânico (CHEN & ZHANG, 1997).

Em condições autotróficas, *Spirulina* spp. necessitam apenas de água, luz, fonte de carbono e nutrientes inorgânicos obtendo uma alta taxa de crescimento e tornando-se uma fonte atrativa para obtenção de biomassa que possui uma particularidade atrativa como fontes de biomoléculas naturais ativas (CHRONAKIS *et al.*, 2000).

2. 6. 2. Efeito da fonte de nitrogênio

O meio de cultura convencional para a obtenção da biomassa utiliza sais de nitrato como fonte de nitrogênio, como, por exemplo, nitrato de potássio (PAOLLETTI *et al.*, 1975) e nitrato de sódio (ZARROUK *et al.*, 1966). Fontes alternativas de nitrogênio, como uréia e sais de amônio, estão sendo pesquisadas com a finalidade de diminuir os custos na produção industrial. Ambos, os tipos e a quantidade da fonte de nitrogênio no meio de cultura influenciam no crescimento e composição da biomassa (STANCA & POPOVICI, 1996).

O consumo de nitrato pelo fitoplâncton envolve vários passos mediados por enzimas para reduzir o nitrogênio em uma forma assimilável. Esses passos consecutivos são o transporte do nitrato para dentro da célula por uma proteína transportadora de nitrato, redução do nitrato para nitrito pela nitrato redutase, e, posteriormente, para amônia pela nitrito redutase. Essas reduções do nitrogênio

envolvem gasto energético (HATORY & MYERS, 1966). A amônia, por sua vez, é incorporada ao metabolismo do nitrogênio, através da ação de transaminases, para a formação de aminoácidos (HUNG *et al.*, 2000). A utilização de fontes de nitrogênio inorgânico na forma reduzida como sais de amônio é energeticamente favorável em comparação com nitratos e nitritos, disponibilizando energia para o crescimento celular.

A proteína transportadora de nitrato é associada à membrana citoplasmática, enquanto que a nitrato redutase e nitrito redutase são componentes da membrana tilacoidal (SINGH *et al.*, 2002)

Fontes de nitrogênio a partir de moléculas orgânicas (aminoácidos), por já estarem na forma reduzida, deveriam proporcionar um crescimento mais rápido da biomassa por necessitarem de menos energia, especialmente quando a intensidade luminosa é limitante. No entanto, Pustizzi *et al.* (2004), estudando o crescimento da *Aureococcus anophagefferens* em diferentes proporções de ácido glutâmico e nitrato como fontes de nitrogênio observou que o crescimento mais rápido não foi em cultivos com apenas ácido glutâmico como fonte de nitrogênio quando comparados com cultivos contendo nitrato. Uma possível explicação para isso é um maior gasto energético para a metabolização de moléculas orgânicas. Explicam que uma vez transportados para dentro da célula, os aminoácidos são diretamente incorporados em proteínas, mas sua degradação até amônio provavelmente exige um metabolismo mais energético que outros compostos nitrogenados.

O cultivo de *Spirulina* spp. utilizando uréia obteve um aumento de 37% na produção de biomassa e menor custo quando comparado com as culturas cultivadas com KNO_3 (DANESI *et al.*, 2002). Uréia é hidrolisada formando amônia em condições alcalinas e é tóxica para as microalgas em altas concentrações. Em

concentrações acima de 2mM, a amônia inibe a fotossíntese e o crescimento de algumas microalgas como *Scenedesmus obliquus*, *Chorella pyrinoidosa*, *Anacystis nidulans*, *Plectonema borynum* (ABELIOVICH & AZOV, 1976). Carvalho *et al.* (2004) detectaram 1,6 mM de cloreto de amônio como inibitório no cultivo de *Spirulina platensis* utilizando o processo descontínuo.

Estudos revelaram que o aumento do nível de nitrogênio nos cultivos de *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquous*, *Anacustis nidulans*, *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria rubescens* e *Spirulina platensis* levaram a uma maior quantidade de biomassa, proteínas e clorofila (PIORRECK *et al.*, 1984). Em algas verdes (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquous*) levou a uma maior porcentagem de lipídios (45% da biomassa), mas nas algas verdes-azuladas (*Spirulina platensis*) a quantidade de lipídios não variou (PIORRECK *et al.*, 1984).

Na *Spirulina platensis*, a deficiência de nitrogênio durante o período de crescimento leva a um decréscimo na produção de ficocianina e clorofila e a composição de ácidos graxos pode ser afetada pela falta desse nutriente (FUNTEU *et al.*, 1997). Ficocianinas são cromoproteínas que constituem o principal pigmento na captação de luz em cianobactérias e representa 1/2 das proteínas celulares. Na falta de nitrogênio e enxofre, essas cromoproteínas são consumidas reduzindo a eficiência fotossintética (CORNET *et al.*, 1992).

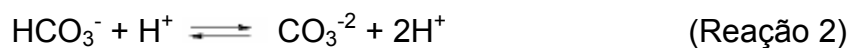
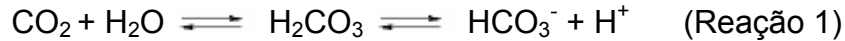
Com a adição da fonte de nitrogênio em cultivos deficientes em nitrogênio, ocorre um rápido aumento na quantidade de proteínas, tais como ficocianinas e, com menos intensidade, outras proteínas celulares são produzidas (CORNET *et al.*, 1998).

O nitrogênio, juntamente com o fósforo, no meio de cultura tem também uma significativa influência sobre a capacidade de flotação no gênero *Spirulina* (RAMÍREZ *et al.*, 1999).

2. 6. 3. Efeito do pH

As reações bioquímicas estão relacionadas com a concentração dos íons H^+ no meio de cultura. O pH interfere na estrutura e atividade das proteínas, em particular de proteínas enzimáticas.

O valor do pH no meio de cultivo de *S. platensis* situa-se na faixa de 9,5. No entanto, esse valor pode variar em decorrência de diferentes proporções de carbonato e bicarbonato no meio de cultivo. As formas em que fonte de carbono é disponibilizada no meio de cultura podem ser observadas nas reações 1 e 2.



A partir da constante de equilíbrio da equação 1 e equação 2, pode-se correlacionar o pH com as proporções de CO_2 , HCO_3^- e CO_3^{2-} (Figura 2), de acordo com a equação de Hendersen-Hasselbalch (SASSANO, 2004):

$$[HCO_3^-]/[CO_3^{2-}] = 10^{pH - 10,25} \quad (\text{Equação 1})$$

$$[HCO_3^-]/[CO_2] = 10^{pH - 6,38} \quad (\text{Equação 2})$$

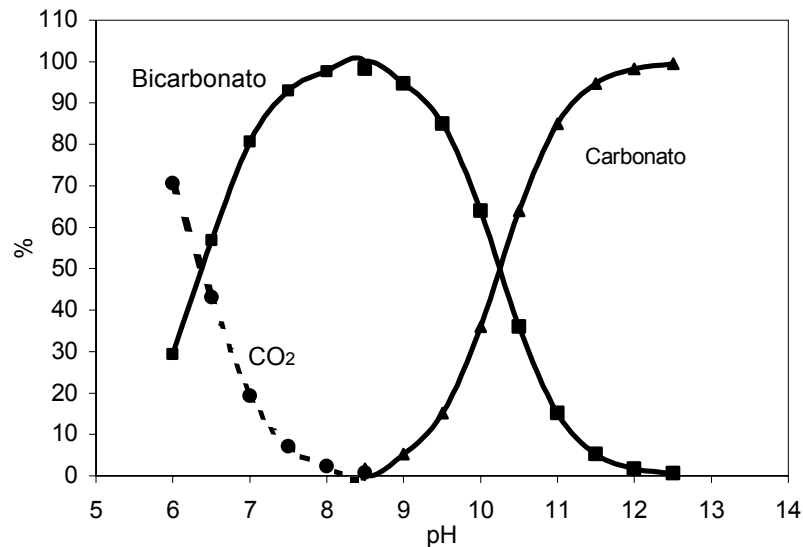
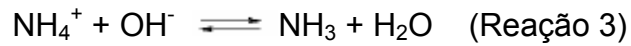


Figura 2. Proporção de gás carbônico, bicarbonato e carbonato em função dos valores de pH.

Binaghi *et al.* (2003) observaram que o crescimento da *S. platensis* depende mais do pH do meio do que da fonte de carbono inorgânico, uma vez que, em pH entre 6,0-10,0 há uma predominância de íons bicarbonato sendo esse a fonte de carbono assimilável pela *S. platensis*. Acima do pH 10,3, a forma de carbono se apresenta como carbonato e por isso seu crescimento é reduzido (SANCHEZ-LUNA, 2004).

O pH também influencia na disponibilidade de nitrogênio para a célula, visto que com pH abaixo de 8,0 há uma predominância de íon amônio. Em pH acima de 11,0, o nitrogênio encontra-se na forma não protonada de amônia que é a forma que tem passagem livre pela membrana celular (BOUSSIBA, 1989; BELKIN & BOUSSIBA, 1991).

Entre esses valores de pH, há as duas formas no meio de cultivo (Figura 3). O equilíbrio entre a amônia e os íons amônio é dependente do pH da solução (Reação 3).



A partir da constante de equilíbrio da reação 3 e da equação de Hendersen-Hasselbalch (SASSANO, 2004), pode-se obter a relação entre as concentrações dos compostos para um determinado pH, sendo que em valores de pH acima de 9,3 o equilíbrio é deslocado para a direita e a amônia é predominante. Entretanto, o aumento na força iônica do meio, desfavorece a razão de concentração amônia/amônio, implicando na necessidade de um aumento no pH para a manutenção das mesmas relações.

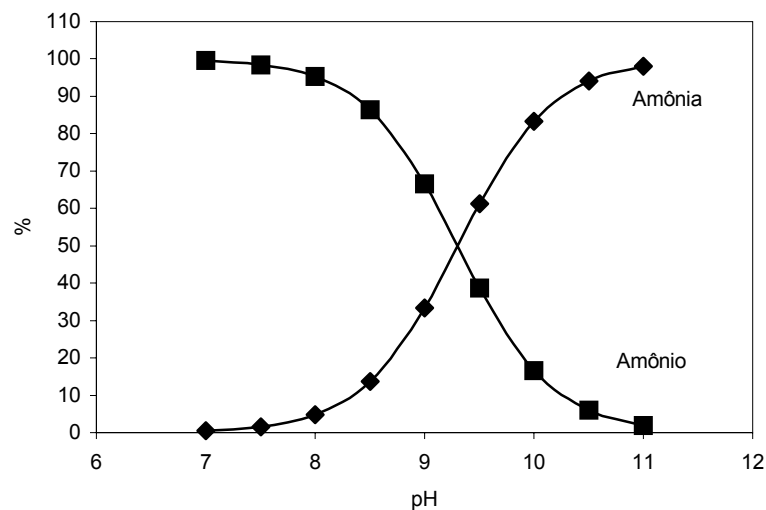


Figura 3. Concentração de amônia e amônio em relação ao pH

Tam & Wong, 1996 relataram que, quando em pH baixo, há uma redução na formação do gás amônia e a maior parte do nitrogênio existirá na forma de íons amônio, na qual é menos tóxica para a alga. No entanto, pH abaixo de 8,7 ocorre uma diminuição na formação da biomassa produzida (SANCHEZ-LUNA, 2004).

2. 6. 4. Efeito da temperatura

A temperatura afeta a concentração celular, a natureza do metabolismo, as necessidades nutricionais e a composição da biomassa. O efeito da temperatura no crescimento é explicado em termos de dois fatores: pela ação da temperatura na estrutura dos componentes celulares (principalmente proteínas e lipídios) e outro relacionando os coeficientes de temperatura com a taxa de reação os quais dependem das energias de ativação das reações (FAINTUCH, 1989).

As *Spirulina* spp. são algas mesofílicas tendo como temperatura ótima para o crescimento 30 °C (SANCHEZ-LUNA, 2004). Em cultivos em tanques abertos, a temperatura pode chegar a 40 °C por poucas horas e, portanto, não tendo efeito prejudicial. A temperatura mínima permitida para o crescimento das *Spirulina* spp. é de 18 °C (JIMÉNEZ *et al.*, 2003). Em geral, o conteúdo do perfil dos lipídios (KATES & HAGEN, 1964; WADA & WADA, 1990) e ácidos graxos varia com a mudança da temperatura, especialmente os polinsaturados (MORIST *et al.*, 2001). A temperatura em culturas em tanques abertos, durante o dia iluminado, exerce efeito predominante sobre a produtividade (RICHMOND *et al.*, 1990).

Em relação à temperatura de cultivo da *Spirulina maxima*, observou-se que a variação de 30 °C para 42 °C promoveu um aumento de 7,4 % para 11,5 % no conteúdo de lipídios, um decréscimo de 58,6 % para 45 % no conteúdo de proteínas e um aumento de 29,9 % para 38,7 % no conteúdo de carboidratos (TOMASELLI *et al.*, 1993).

Pham Quoc & Dubacq (1997) observaram que a composição de lipídios é afetada pela temperatura de crescimento do cultivo e a adição de linoleato de

amônio, à temperatura de 24 °C, proporciona um aumento na quantidade de ácido linolênico na *Spirulina platensis*.

2. 6. 5. Efeito da intensidade luminosa

A intensidade e duração dos feixes luminosos são importantes fatores ambientais no crescimento dos microrganismos fotossintetizantes por ser uma importante fonte de energia da *Spirulina platensis*. Alta quantidade de energia radiante é absorvida para garantir o crescimento da microalga, mas com o aumento da concentração de biomassa, há diminuição da profundidade de penetração da luz no cultivo, resultando no processo denominado de sombreamento. A dispersão da luz no cultivo de microalgas depende do tamanho e da concentração de células em suspensão no meio e a absorção luminosa depende da concentração de ficocianina e clorofila presentes nas células (CORNET *et al.*, 1998). Microrganismos localizados na superfície são altamente iluminados, e os localizados em profundidades maiores não recebem energia luminosa suficiente para garantir uma boa condição fotossintética. Somente as culturas na parte intermediária são idealmente iluminadas. Por isso, a constante agitação durante o cultivo permite uma distribuição uniforme da luminosidade.

Vonshak *et al.* (2000) observou um efeito inibitório da luz, a $150 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (12,5 klux) no crescimento da *Spirulina platensis*, sendo esta inibição mais acentuada em culturas fotoautotróficas que mixotróficas. Esse fenômeno, denominado de fotoinibição, é definido como perda da atividade fotossintética provocada pelo excesso da densidade de fluxo de fótons prejudicando a eficiência das enzimas no sistema fotossintético.

Além de fornecer energia para o crescimento microbiano, estudos indicam que a intensidade luminosa influencia na assimilação de carbono. Quando a luminosidade é reduzida, ou pelo sombreamento ou pela diminuição da intensidade luminosa, a atividade fotossintética diminui propiciando o consumo de bicarbonato como principal fonte de carbono. No entanto, em meio de cultura contendo uréia, esta pode ser uma fonte de carbono significativa em cultivo mixotrófico limitado por luz (LOMAS, 2003).

A produtividade e a taxa de crescimento das cianobactérias dependem da intensidade luminosa e temperatura (RICHMOND, 1992). No entanto, a intensidade luminosa parece exercer mais forte influência na produtividade que a temperatura quando culturas de *S. platensis* foram avaliadas durante 4 anos sob condições tropicais (OLGUÍN *et al.*, 2003).

A intensidade luminosa também afeta o conteúdo de ácidos graxos. Na fase estacionária o conteúdo total de ácidos graxos é reduzido bem como a soma relativa de ácidos graxos polinsaturados (COHEN *et al.*, 1997). Nos cultivos submetidos a alta intensidade luminosa, $144 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (12 klux), aumenta a quantidade de polissacarídeos, e de ácido γ -linolênico, entre os ácidos graxos totais, reduzindo a quantidade de lipídios totais e proteínas (OLGUÍN *et al.*, 2001). O processo térmico bem como a exposição da luz pode afetar o conteúdo de ácidos graxos insaturados e polinsaturados por causa do processo de oxidação.

Há evidências que a irradiância possa regular o metabolismo de lipídios. Khotimchenko & Yakovleva (2005) relatou que há variação no conteúdo de lipídios estruturais e de reserva, e na composição de ácidos graxos da microalga *Tichocarpus crinitus* exposta a diferentes irradiações. Altas intensidades luminosas estimulam o acúmulo de lipídios de reserva, como o triacilglicerol, enquanto que baixas

intensidades luminosas induzem um aumento na quantidade de lipídios estruturais, como fosfatilglicerol, fosfatidilcolina, monogalactosildiacylglicerol.

A taxa específica de crescimento e a concentração da ficocianina aumentam com a intensidade luminosa, chegando numa estabilidade na faixa de 2 a 4 klux em culturas mixotróficas de *Spirulina platensis*. Nessas culturas, a concentração do componente fotossintético celular depende da relação do tempo entre o metabolismo heterotrófico e autotrófico. Em altas concentrações celulares, a luz é limitada e o intervalo de crescimento autotrófico é muito menor quando comparada com o heterotrófico. Sob essas condições, o conteúdo de clorofila por célula é muito maior que em cultivos autotróficos. Em culturas mixotróficas, há um aumento na quantidade de pigmentos, que são utilizados, principalmente, como receptores de radiação e não tanto como função fotoprotetora, desde que esses pigmentos sejam acumulados devido a baixa intensidade luminosa disponível. A disponibilidade luminosa favorece o aumento do número de células, que, por sua vez, diminui a média da irradiância dentro do reator. Este processo implica que as células devem sintetizar mais pigmentos receptores de radiação para manter o crescimento (CERÓN GARCIA *et al.*, 2004).

A incidência luminosa como um importante fator de crescimento tem sido amplamente investigada em termos da densidade do fluxo de fótons (IQBAL & ZARFAR, 1993). A densidade de fluxo de fótons está associada com a mudança na atividade metabólica, como notado pelo aumento da quantidade de proteínas a baixa densidade de fluxo de fóton e grande quantidade de polissacarídeos extracelulares a maior intensidade luminosa em cultivos de *Porphyridium cruentum* (WANG *et al.*, 1998).

2. 6. 6. Cultivos em tanques abertos

Cultivos em tanques abertos de microalgas têm sido estudados por muitos anos e têm revelado resultados satisfatórios a respeito da produtividade e qualidade da biomassa (SANSAWA & ENDO, 2004). Apurados estudos foram efetuados sobre a *Spirulina* spp., revelando seu poder de produzir substâncias que podem promover ou inibir o crescimento de outros microrganismos (DE CAIRE, 1987, DE CANO *et al.*, 1990, KULIK, 1995). Em cultivos fotossintéticos em tanques abertos, por apresentarem luz como fatores limitantes para a produção algal, tanques com amplas áreas iluminadas têm sido construídos (SANSAWA & ENDO, 2004).

A produção comercial da *Spirulina* spp. é hoje baseada quase que exclusivamente em tanques abertos (PULZ, 2001), embora algumas indústrias usem bioreatores tubulares fechados (SPECKTOROVA *et al.*, 1997). Duas principais vantagens de sistemas em tanques abertos são o menor custo de instalação e o uso da fonte de energia solar (CHAUMONT, 1993). Em cultivos em tanques abertos iluminados, a temperatura exerce um efeito predominante sobre a produtividade (RICHMOND *et al.*, 1990).

2. 7. PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO DE CULTIVO

Diversos processos de cultivo têm sido desenvolvidos com o a finalidade de aumentar a produtividade do material desejado. Segundo Sassano (1999), a forma de adição do substrato nas dornas pode interferir na qualidade da biomassa produzida.

No processo descontínuo, todo o substrato é adicionado no início do cultivo, enquanto no processo descontínuo alimentado o substrato é adicionado em determinados intervalos de tempo durante todo o processo. É uma técnica em

processos microbianos, onde um ou mais nutrientes são adicionados ao biorreator durante o cultivo e em que os produtos aí permanecem até o final do cultivo (CARVALHO & SATO, 2001). Em casos particulares, como por exemplo a necessidade de utilização de nutriente viscoso no cultivo, este processo geralmente reduz a viscosidade do meio, e o efeito dos componentes tóxicos é também limitado pela diluição (WARD, 1989). Entre outras vantagens desse processo pode-se encontrar: desvia o metabolismo celular para via de interesse de formação do produto, evita repressão catabólica, evita formação de produtos tóxicos no metabolismo microbiano e controla a velocidade de crescimento microbiano. O melhor procedimento operacional para esse sistema é iniciar com pequena quantidade de biomassa e substrato, e adicionar mais substrato quando a maior parte do substrato inicial ter sido consumida pelo microrganismo (GREGERSEN & JORGENSEN, 1999).

No processo descontínuo alimentado, a alimentação pode ser de forma intermitente ou contínua. O modo de operação da alimentação em bioprocessos permite prevenir o acúmulo ou a falta do substrato no cultivo. Em processo microbiano, uma apropriada taxa de alimentação exponencialmente crescente resulta na manutenção da concentração do substrato limitante residual, controlando a taxa de formação do produto. Estratégias de alimentações têm sido estudadas em bioprocessos recombinantes para aumentar a produtividade do sistema (D'ANJOU & DAUGULIS, 2000).

OLGUÍN *et al.* (2001) observaram que no cultivo descontínuo, usando uma concentração inicial de amônia de 1 mM, incubada a 32 °C, ocorre uma grande perda desse íon para a atmosfera além de ser consumida pelo microrganismo tornando-se deficiente depois de poucos dias, especificamente 12 dias.

A baixa intensidade luminosa ou a baixa concentração de nitrogênio no cultivo limita o crescimento celular. Por outro lado, a alta intensidade luminosa ou a alta concentração de nitrogênio inibem o crescimento celular. Estas características implicam que o processo descontínuo alimentado deve ser usado para melhorar a densidade celular no crescimento da *S. platensis*, desde que a intensidade luminosa e a concentração de nitrogênio solúvel possam ser alternativamente aumentadas até alcançar a produção máxima de biomassa sem resultar na inibição do crescimento. Um dos objetivos deste estudo foi explorar esta possibilidade.

3. OBJETIVOS

- Avaliar a utilização de cloreto de amônio para cultivo de *S. platensis*: estudo da influência das variáveis tempo de alimentação e intensidade luminosa na concentração celular máxima obtida;
- Analisar o conteúdo de lipídios e proteínas na biomassa obtida;
- Avaliar os parâmetros cinéticos, produtividade em células e fator de conversão de nitrogênio em células, do crescimento microbiano.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. 1. Microrganismo

A cultura do microrganismo *S. platensis* UTEX 1926 foi proveniente da coleção de cultura da Universidade do Texas.

4. 2. Manutenção da *S. platensis*

A microalga foi mantida assepticamente em meio de PAOLETTI *et al.*, 1975.

O pH do meio de cultura padrão apresentou um valor de $9,5 \pm 0,2$.

O meio padrão para cultivo de *S. platensis* (PAOLETTI *et al.*, 1975) contém a seguinte composição, por litro de água destilada:

Composição química	
NaCl.....	0,92 g g/L
Na ₂ SO ₄	1,88 g
K ₂ HPO ₄	0,50 g
Na ₂ CO ₃	8,89 g
NaHCO ₃	15,15 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,05 g
KNO ₃	2,57 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,25 g
Fe-EDTA*.....	1,0 ml
Solução de microelementos**....	1,0 ml

*Solução de Fe-EDTA (g/L):

EDTA-Na ₂	29,8
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	24,9

**Solução de microelementos (mg/L):

SnCl ₂ .2H ₂ O.....	304
MnCl ₂ .4H ₂ O.....	173
CoCl ₂ .6H ₂ O.....	194
SeCl ₂ .2H ₂ O.....	146
BaCl ₂ .2H ₂ O.....	2846
LiCl.....	293
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	186
NiSO ₄ .5H ₂ O.....	717
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O.....	121

4. 3. Preparação do inóculo

A *S. platensis*, foi inoculada em 10 mL de meio líquido (em tubo de ensaio). Depois de 15 dias, esse material foi utilizado para inocular frascos Erlenmeyer de 500 mL, com 200 mL de meio de cultivo padrão (PAOLETTI *et al.*, 1975), previamente esterilizado por filtração.

Os frascos de Erlenmeyer após os repiques foram imediatamente levados a agitador rotativo, a 100 rpm (FERRAZ, 1986), temperatura ambiente de 30 °C e iluminação provida por 6 lâmpadas fluorescentes de 40 Watts, dispostas a uma distância de 30 cm dos frascos de modo que forneçam uma iluminância de 6 klux (DANESI, 2001).

O crescimento celular foi acompanhado, sendo utilizada para inóculo uma suspensão de *S. platensis* após de 6 a 8 dias de cultivo (PELIZER *et al.*, 2003), em crescimento exponencial, isenta de contaminação. Essa suspensão foi filtrada, lavada com solução fisiológica para retirada do KNO₃ e ressuspensa em meio de cultivo padrão isento de KNO₃. Esta suspensão foi o inóculo para o cultivo em minitanques.

4. 4. Construção da curva de calibração

A curva de calibração foi obtida tomando-se um volume de 25 mL de uma suspensão concentrada, de células em fase de crescimento exponencial, que foi filtrada e lavada, com água destilada, em uma membrana de acetato de celulose de 1,2 µm, previamente seca a 70 °C por 12 horas, e previamente pesada. A amostra foi levada à estufa à 100–105 °C por um período de 5 horas, suficiente para que mantivesse uma massa constante. A massa das células foi calculada por diferença dos valores das massas das membranas antes e depois da filtração, e dividido pelo

volume filtrado para obter-se a concentração celular na suspensão. A partir desta mesma suspensão, foram preparadas diferentes diluições, e alíquotas dessas diluições foram levadas ao espectrofotômetro para leitura da transmitância a 560nm de comprimento de onda e caminho óptico de 1 cm, com água destilada como branco. Dessa forma, foi obtida uma curva que relaciona concentração celular com o logaritmo da transmitância (Figura 4).

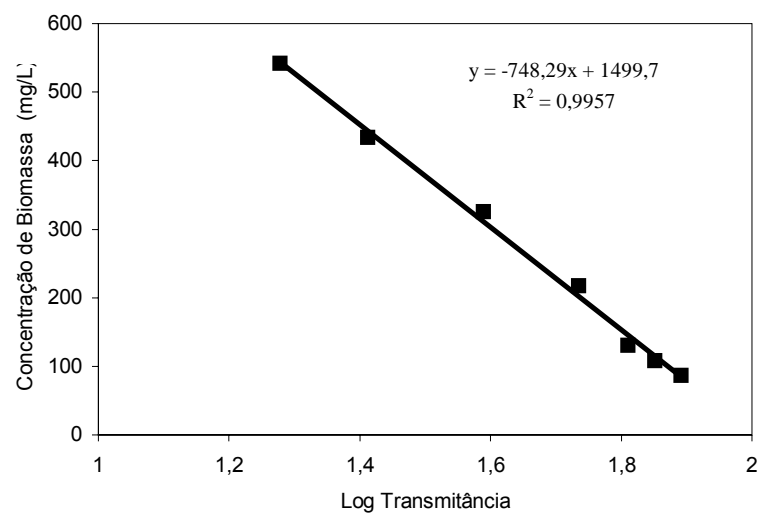


Figura 4. Curva de calibração da *S. platensis* – correlação entre a concentração de biomassa (mg/L) e logaritmo da transmitância.

4. 5. Descrição de um experimento típico

Dentre os inúmeros sistemas de algacultura descritos na literatura, foram adotados os minitanques abertos de forma alongada (BELAY, 1997). Estes tanques são construídos de lâminas de PVC (cloreto de polivinila) de cor branca, moldadas de forma a propiciar um circuito hídrico de forma geométrica elíptica. A movimentação da cultura foi executada por pás rotativas com frequência de 18 rotações por minuto a fim de obter homogeneização da cultura (Figura 5). As iluminações foram medidas com luxímetro da marca MINOLTA®, e controladas

regulando a distância entre as lâmpadas fluorescentes e os minitanques. A temperatura foi mantida a 30 ± 1 °C (VONSHAK, 1997) pelos aquecedores providos de termostatos da marca ARISTOS®.



Figura 5. Minitanques utilizados no cultivo de *S. platensis*.

Foram adicionados nos minitanques, 5 litros do meio de cultura com substituição do nitrato de potássio por cloreto de amônio, onde foram realizados os estudos da adição de cloreto de amônio como fonte de nitrogênio, de acordo com o planejamento experimental de trabalho (item 5.2). A massa total de cloreto de amônio adicionada por unidade de volume foi equivalente a 21,5 mM (CARVALHO *et al.*, 2004), alimentada diariamente por períodos que variaram de 10 a 16 dias, de acordo com o plano de trabalho (item 5.2). Para suprir a retirada do potássio através da fonte convencional do nitrogênio (KNO_3), o sulfato de sódio foi substituído por sulfato de potássio uma vez que o sódio encontra-se em vários constituintes do meio de cultura. Nos cultivos abertos, ocorre perda de água por evaporação, sendo necessário corrigir o volume através de adição de água destilada, diariamente, para manter o volume de cultivo constante em 5 litros.

Um volume apropriado de suspensão de *S. platensis* (Inóculo – item 4.6.1.1) foi adicionado ao minitanque e o volume de meio completado até 5,0 litros, de tal forma que a concentração celular inicial foi de 50 mg/L (em massa seca) (PELIZER *et al.*, 2003).

Os níveis de intensidade luminosa estudados, de 3,8 a 12,2 klux, foram obtidos por meio de lâmpadas fluorescentes de 20 Watts, bem como pelo ajuste da distância destas à superfície dos tanques de cultivo. Uma melhor visualização dos experimentos realizados pode ser obtida no item 5.

4. 6. Técnicas Analíticas

Os experimentos foram acompanhados por técnicas analíticas descritas a seguir:

4. 6. 1. Acompanhamento dos cultivos

4. 6. 1. 1. Determinação da concentração celular

O acompanhamento do crescimento celular foi realizado diariamente por turbidimetria, a 560 nm (LEDUY & THERIEN, 1977), sendo a concentração celular calculada pela equação apresentada no item 4.4, obtida de acordo com o descrito por Borzani, (1972).

4. 6. 1. 2. Determinação da concentração de amônia total.

A amônia total foi quantificada no meio isento de células de 2 em 2 dias pela metodologia de fenol hipoclorito (SOLORZANO, 1969). A amônia presente no meio reage com o fenol e o hipoclorito de sódio na presença do catalisador nitroprussiato de sódio, resultando em indofenol. Este produto apresenta uma coloração azul a qual é detectada pelo espectrofotômetro (640 nm). Na Figura 6 é apresentada uma

curva de calibração utilizada na determinação de amônia. Para cada solução reagente preparada foi feita uma nova curva.

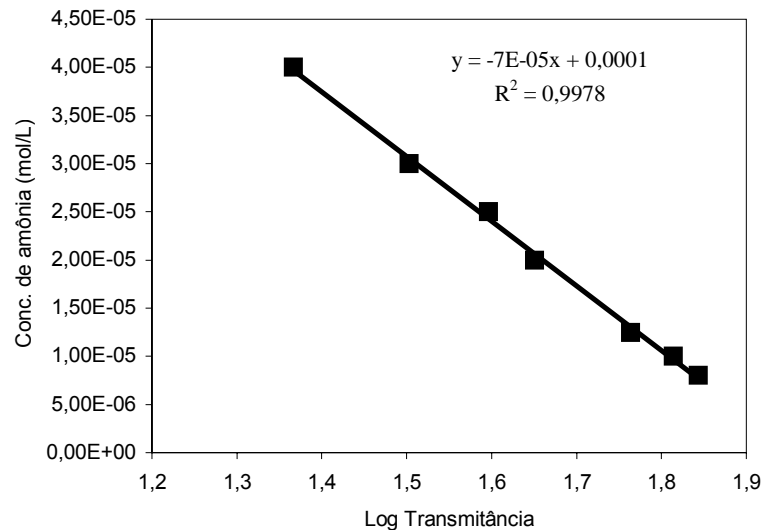
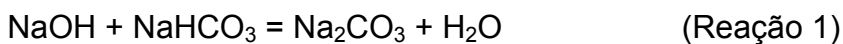


Figura 6. Curva de calibração para determinação da concentração de amônia total em meio de cultivo.

4. 6. 1. 3. Determinação da concentração de carbonato total

No meio isento de células, o acompanhamento da concentração de fonte de carbono, na forma de carbonato total, foi através de titulometria. Inicialmente, adiciona-se hidróxido de sódio na amostra (Reação 1) e titula-se com ácido clorídrico (Reação 2) na presença do indicador fenolftaleína para a conversão de carbonato em bicarbonato. Posteriormente foi titulada novamente com ácido clorídrico (Reação 3) na presença do indicador alaranjado de metila para que todo o bicarbonato transforme-se em ácido carbônico, por deslocamento de equilíbrio. O carbonato total foi quantificado pelos dois intervalos de viragem (PIERCE & HAENISCH, 1948).



4. 6. 1. 4. Determinação do pH

O pH foi acompanhado diariamente por potenciometria, com um aparelho ORION, modelo 710^A.

4. 6. 2. Avaliação da biomassa obtida

Ao final do cultivo, os 5 litros de meio contendo a *Spirulina platensis* foram centrifugados, com 3 lavagens sucessivas com água destilada para retirada do sal adsorvido às células, e, após secagem a 55 °C por 12 horas (PELIZER *et al.*, 1999), foi avaliado o teor de proteína e de lipídio da biomassa.

4. 6. 2. 1. Proteínas totais

O teor protéico total na biomassa seca foi determinado pelo clássico método de KJELDHAL, adotando-se o fator de 6,25 para a conversão a partir dos teores de nitrogênio total (OFFICIAL METHODS OF FOOD ANALYSIS, 1984). Esse método caracteriza-se pela destruição da matéria orgânica com ácido sulfúrico concentrado, em presença de um catalizador e aquecimento, com formação de nitrogênio inorgânico, na forma de sulfato de amônio. A seguir, em aparelho destilador de nitrogênio, adiciona-se hidróxido de sódio no tubo proveniente da digestão, para alcalinização do meio, e, desta forma, o sal de amônio é convertido à amônia, que é destilada para uma solução saturada de ácido bórico. Posteriormente, titula-se essa

solução com ácido clorídrico 0,02N fatorada para se quantificar a concentração de nitrogênio (FERRAZ, 1986).

4. 6. 2. 2. Lipídios totais

A fração lipídica total foi obtida por extração com solvente orgânico (FERRAZ, 1986). A amostra foi triturada em gral e então transferida para um extrator contínuo de Soxhlet com refluxo da mistura de solventes clorofórmio-metanol (2:1 v/v) até o líquido ficar límpido (PIORRECK, 1984, OLGUÍN *et al.*, 2001). A fração lipídica total juntamente com os solventes foram tratados em sistema evaporador rotativo a vácuo. O material obtido reúne ácidos graxos, triglicerídeos, fosfolipídios, carotenóides, pigmentos fotossintetizantes, esteróides e hidrocarbonetos, sendo chamados de fração lipídica total (GIOIELLI, 1997).

4. 6. 3. Cálculo dos parâmetros cinéticos

4.6.3.1. Produtividade em células:

$$P_x = (X_m - X_i) / T_c \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde: P_x = produtividade em células (mg/L.d)
 X_m = concentração celular máxima obtida (mg/L)
 X_i = concentração celular inicial (mg/L)
 T_c = tempo de cultivo (dias)

4.6.3.2. Fator de conversão de nitrogênio em células:

$$Y_{X/N} = (X_m - X_i) \cdot V / N_t \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde: $Y_{X/N}$ = Fator de conversão de nitrogênio em células (mg/mg)
 X_m = concentração celular máxima obtida (mg/L)
 X_i = concentração celular inicial (mg/L)
 V = volume do meio (L)
 N_t = quantidade total de nitrogênio adicionado (mg)

5. PLANO DE TRABALHO

5. 1. Processo de cultivo

Para alimentação do cloreto de amônio, o processo utilizado foi o descontínuo alimentado com vazão de alimentação exponencialmente crescente, de acordo com a seguinte equação:

$$M_c = M_{ci} \cdot e^{K \cdot t} \quad (\text{Equação 1})$$

Escolhendo o experimento 6 para exemplificar a equação acima, temos $t = T_a = 8,8$ dias, $M_{ci} = 1,7$ mM e $M_c = M_{ct} = 21,5$ mM. Com esses valores calcula-se a constante de tempo (K), cujo resultado é de $0,28834 \text{ h}^{-1}$. Tendo o valor de K, M_{ci} e M_{ct} , pode-se calcular a massa de cloreto de amônio adicionada por unidade de volume até o instante “t” (M_c). A massa adicionada diariamente será dada pela diferença entre M_c adicionada até o instante “t” (dias) e M_c adicionada até o instante t-1. Na Tabela 1 está descrito o valor da constante calculado em seu respectivo tempo de alimentação e a concentração de cloreto de amônio total adicionada até o instante “t”.

Para os valores de T_a de 8,8 e 17,2 dias, calcula-se também a hora da alimentação com o cloreto de amônio. No caso do T_a de 8,8 dias, a última alimentação foi 19,2 horas após o 8º dia de alimentação, e para 17,2 dias, a última alimentação foi de 4,8 horas após o 17º dia de alimentação.

Tabela 1 - Valor da constante calculado em seu respectivo tempo de alimentação e a concentração de cloreto de amônio total adicionada até o instante "t".

Ta (dias)	8,8	10	13	16	17,2	19
K (dias ⁻¹)	0,28834	0,25374	0,19518	0,15858	0,14752	0,13354
Tempo (dias)	Concentração de cloreto de amônio (mM)					
0	1,70	1,70	1,70	1,70	1,70	1,70
1	2,27	2,19	2,07	1,99	1,97	1,94
2	3,03	2,82	2,51	2,33	2,28	2,22
3	4,04	3,64	3,05	2,74	2,65	2,54
4	5,39	4,69	3,71	3,21	3,07	2,90
5	7,19	6,05	4,51	3,76	3,55	3,31
6	9,59	7,79	5,48	4,40	4,12	3,79
7	12,79	10,04	6,67	5,16	4,77	4,33
8	17,07	12,94	8,10	6,05	5,53	4,95
8,8	21,50	*	*	*	*	*
9	*	16,68	9,85	7,08	6,41	5,66
10	*	21,50	11,97	8,30	7,43	6,46
11	*	*	14,55	9,73	8,61	7,39
12	*	*	17,69	11,40	9,98	8,44
13	*	*	21,50	13,36	11,57	9,65
14	*	*	*	15,66	13,41	11,03
15	*	*	*	18,35	15,54	12,60
16	*	*	*	21,50	18,01	14,40
17	*	*	*	*	20,87	16,46
17,2	*	*	*	*	21,50	*
18	*	*	*	*	*	18,81
19	*	*	*	*	*	21,50

* Alimentação não realizada

5. 2. Experimentos realizados

As variáveis tempo de alimentação de cloreto de amônio e intensidade luminosa foram estudadas, com seus níveis discriminados na Tabela 2.

O planejamento experimental inicial (Tabela 2, parte A) realizado foi baseado na metodologia denominada planejamento em estrela, apresentado por Box *et al.* (1978), que resulta em 5 níveis das variáveis independentes. As escolhas dos pontos centrais de intensidade luminosa e tempos de alimentação foram baseadas nos resultados de Torzillo & Vonshak, 1994, e Carvalho *et al.*, 2004, respectivamente.

Na Tabela 2, Parte B, estão descritos os experimentos adicionais para a otimização do processo, de acordo com justificativa apresentada no item 6.3.1. Nesta mesma Tabela, Parte C, estão descritos os testes da confirmação do resultado obtido pela metodologia de superfície de resposta.

Na Figura 7 estão representados os experimentos iniciais (Parte A) (◆) e os experimentos adicionais para otimização da concentração celular máxima (Parte B) (◇).

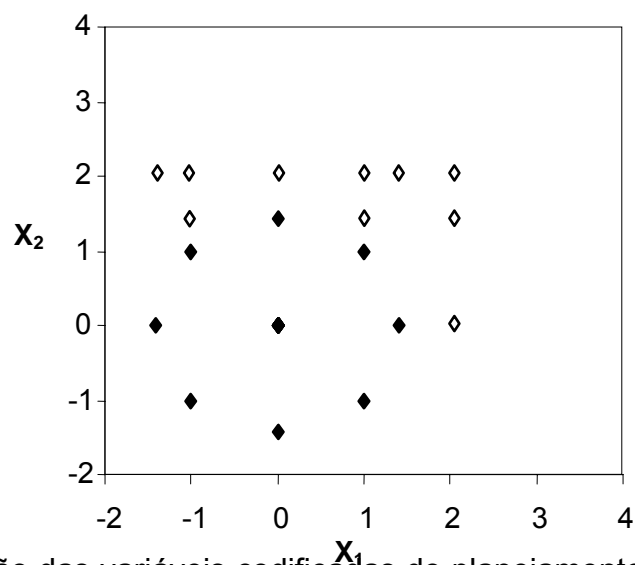


Figura 7. Relação das variáveis codificadas do planejamento experimental inicial (◆) e adicional (◇) para a otimização da concentração celular máxima (X_m).

Tabela 2 - Condições experimentais de cada experimento (em valores codificados e em valores reais).

	X_1^a	X_2^b	Ta (dias)	I (klux)
Parte A: Planejamento experimental inicial				
1	-1	-1	10,0	5,0
2	1	-1	16,0	5,0
3	-1	1	10,0	11,0
4	1	1	16,0	11,0
5	0	-1,414	13,0	3,8
6	-1,414	0	8,8	8,0
7	0	1,414	13,0	12,2
8	1,414	0	17,2	8,0
9	0	0	13,0	8,0
10	0	0	13,0	8,0
11	0	0	13,0	8,0
12	0	0	13,0	8,0
13	0	0	13,0	8,0
14	0	0	13,0	8,0
Parte B: Testes adicionais para otimização do processo				
15	0	2	13,0	14,0
16	1	1,414	16,0	12,2
17	1	2	16,0	14,0
18	1,414	2	17,2	14,0
19	2	1,414	19,0	12,2
20	2	2	19,0	14,0
21	2	0	19,0	8,0
22	-1,414	2	8,8	14,0
23	-1	2	10,0	14,0
24	-1	1,414	10,0	12,2
Parte C: Experimento para confirmação da otimização				
25	1,414	1,667	17,2	13
26	1,414	1,667	17,2	13
27	1,414	1,667	17,2	13
28	1,414	1,667	17,2	13
29	1,414	1,667	17,2	13

^a valor codificado da variável tempo de alimentação (T_a)

^b valor codificado da variável intensidade luminosa (I)

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No item 6.1 são apresentados os resultados referentes aos acompanhamentos dos cultivos ao longo do tempo. Nos resultados referentes aos acompanhamentos dos experimentos em que o planejamento experimental não determina sua repetição, foram apresentados os resultados de cada experimento individualmente. Dessa forma, nestes experimentos, a concentração celular, valor de pH e concentração de carbonato foram apresentados distintamente no item correspondente ao experimento em questão, como se observa nas Tabela 3 a 10 e Tabela 14 a 23 e, nas Figura 8 a 23 e Figura 27 a 46. Nos experimentos com repetições (experimentos 9 ao 14, responsáveis pela determinação da variabilidade experimental, e experimentos 25 ao 29, realizados com o intuito de confirmar os resultados estimados pelo modelo de otimização da concentração celular máxima), procurando uma melhor comparação entre os dados, adotou-se um critério diferenciado para a apresentação dos resultados. Nestes ensaios, foram agrupados os resultados de cada um dos parâmetros acompanhados (concentração celular, pH e concentração de carbonato) com os correspondentes valores obtidos em cada experimento conduzido na mesma condição experimental. Isso pode ser visualizado observando as Tabela 11 a 13 e Tabela 24 a 26, bem como as Figura 24 a 26 e Figura 47 a 49.

As determinações da concentração celular e dos valores de pH foram feitas diariamente, enquanto que as medidas de concentração de amônia e de carbonato total no meio de cultura, em função dos relativos grandes volumes de amostra necessários para a execução das técnicas, foram realizadas de dois em dois dias.

Os valores dos tempos marcados em negrito nas Tabelas 3 a 26 representam os tempos em que se considerou o final dos cultivos, correspondentes às

concentrações celulares máximas. A concentração celular máxima, também marcada em negrito na mesma tabela, foi considerada quando as diferenças entre as concentrações foram menor que 4,7 % (valor da variabilidade da metodologia de determinação de concentração celular, determinada experimentalmente).

Os conteúdos de proteínas e lipídios foram determinados a partir de biomassa seca obtida no final de cada experimento, e seus valores estão discriminados no item 6.2 em forma de tabela (Tabela 28).

Os parâmetros cinéticos concentração celular máxima, produtividade em células e fator de conversão de nitrogênio em células (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**9) foram avaliados pelo modelo estatístico de regressão multivariável, apresentada no item 6.3 e a partir da equação ajustada determinada pela regressão multivariável, foi feita a análise de variância do modelo com a finalidade de confirmar se o modelo obtido explica satisfatoriamente os resultados experimentais obtidos.

6. 1. Avaliação do crescimento microbiano

Planejamento experimental inicial**Experimento 1**

Tabela 3 - Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total referentes ao experimento 1 (Ta = 10 dias, I = 5 klux).

Tempo (dias)	X (mg/L)	pH	Carbonato total (g/L)
0	50	9,50	15,85
1	98	9,58	-
2	162	9,65	14,74
3	203	9,76	-
4	289	9,87	11,98
5	357	9,89	-
6	420	10,00	11,36
7	519	10,08	-
8	696	10,11	11,20
9	734	10,17	-
10	803	10,23	11,20
11	894	10,22	-
12	1027	10,24	11,20
13	1139	10,29	-
14	1143	10,30	10,57
15	1149	10,27	-

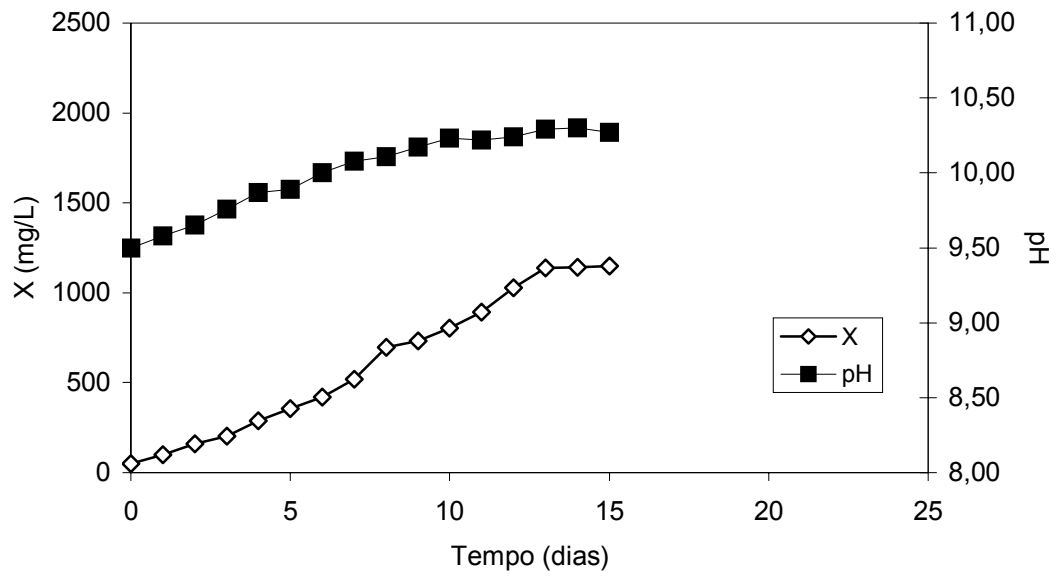


Figura 8 . Concentração celular (X) e valor de pH referentes ao experimento 1 ($T_a = 10$ dias, $I = 5$ klux).

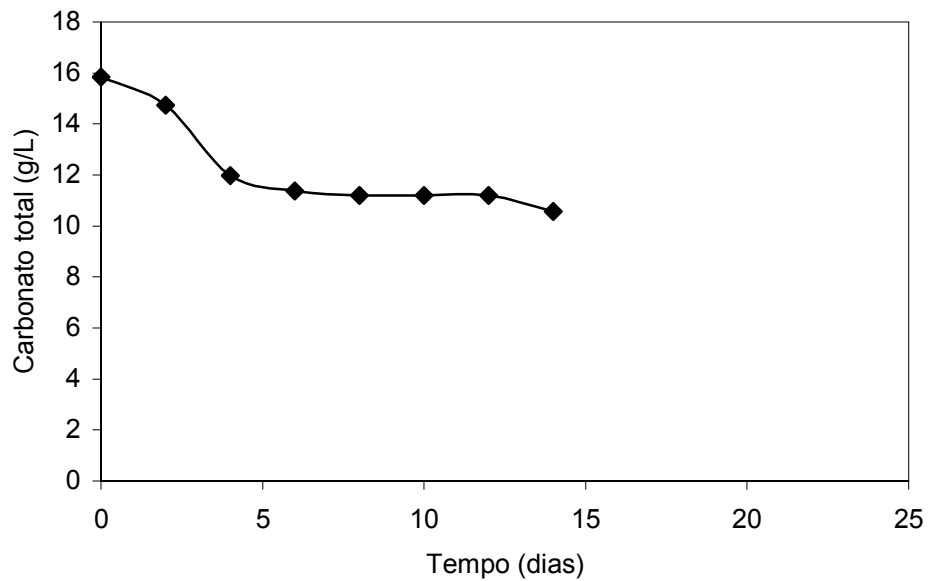


Figura 9. Concentração de carbonato total referente ao experimento 1 ($T_a = 10$ dias, $I = 5$ klux).

Experimento 2

Tabela 4 - Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total referentes ao experimento 2 (Ta = 16 dias, I = 5 klux).

Tempo (dias)	X (mg/L)	pH	Carbonato total (g/L)
0	50	9,50	15,85
1	90	9,58	-
2	125	9,65	13,82
3	159	9,78	-
4	262	9,88	12,29
5	316	9,94	-
6	385	10,03	11,97
7	425	10,12	-
8	528	10,16	10,57
9	601	10,24	-
10	750	10,34	11,20
11	846	10,33	-
12	955	10,21	10,88
13	1005	10,25	-
14	1080	10,25	10,88
15	1149	10,29	-
16	1157	10,31	9,95
17	1171	10,29	-

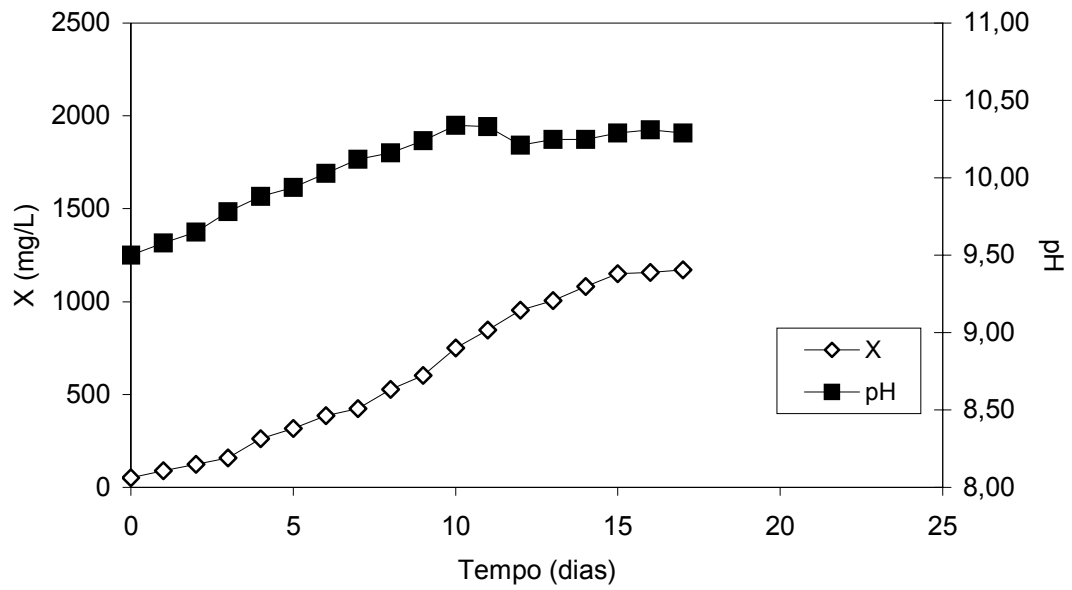


Figura 10. Concentração celular (X) e valor de pH referentes ao experimento 2 ($T_a = 16$ dias, $I = 5$ klux).

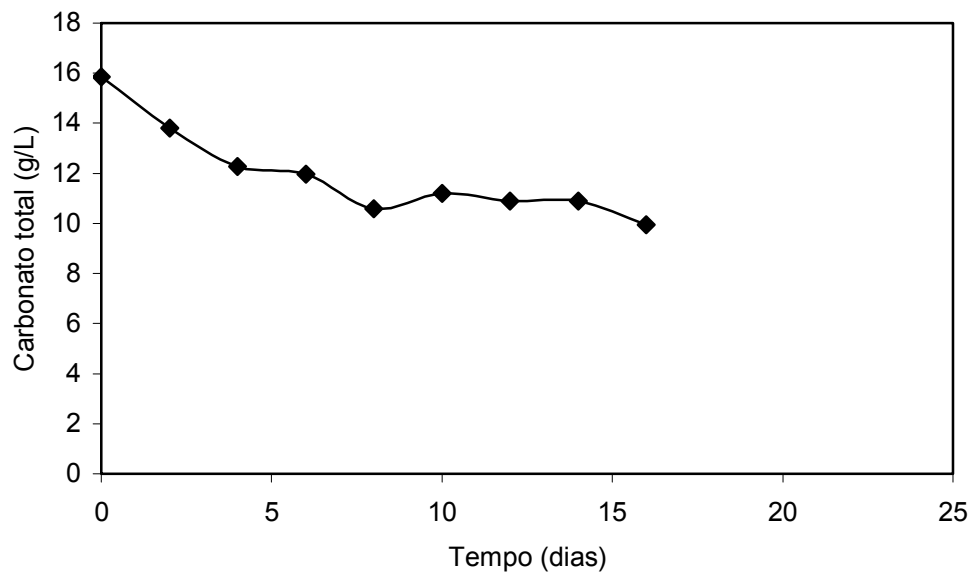


Figura 11. Concentração de carbonato total referente ao experimento 2 ($T_a = 16$ dias, $I = 5$ klux).

Experimento 3

Tabela 5 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 3 (Ta = 10 dias, I = 11 klux).

Tempo (dias)	X (mg/L)	pH	Carbonato total (g/L)
0	50	9,50	15,85
1	78	9,57	-
2	151	9,67	14,43
3	218	9,81	-
4	318	9,95	10,13
5	408	10,03	-
6	516	10,16	9,88
7	687	10,29	-
8	845	10,34	9,95
9	1140	10,39	-
10	1336	10,47	9,64
11	1396	10,47	-
12	1492	10,47	8,90
13	1680	10,49	-
14	1796	10,51	9,83
15	1857	10,62	-
16	1868	10,69	9,21

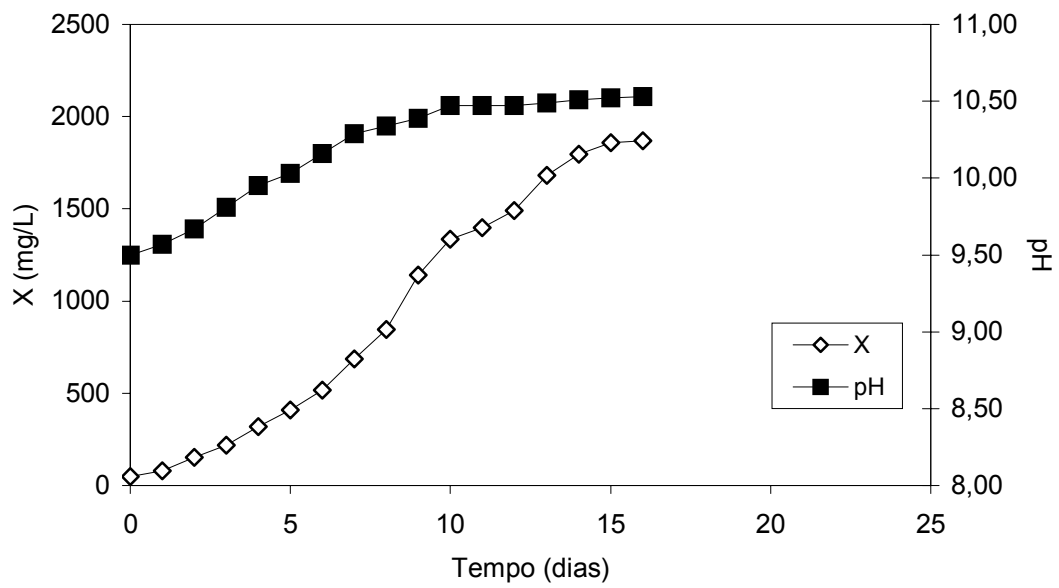


Figura 12. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 3 ($T_a = 10$ dias, $I = 11$ klux).

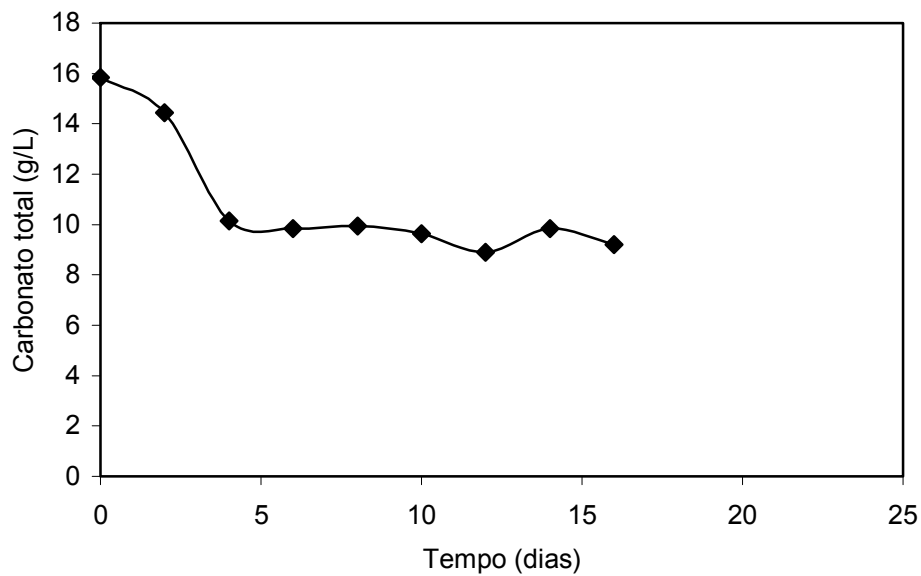


Figura 13. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 3 ($T_a = 10$ dias, $I = 11$ klux).

Experimento 4

Tabela 6 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 4 (Ta = 16 dias, I = 11 klux).

Tempo (dias)	X (mg/L)	pH	Carbonato total (g/L)
0	50	9,50	15,85
1	113	9,76	-
2	159	9,84	13,99
3	245	9,99	-
4	332	10,09	11,82
5	473	10,23	-
6	534	10,34	11,51
7	537	10,45	-
8	652	10,55	10,30
9	781	10,62	-
10	827	10,69	10,30
11	879	10,76	-
12	969	10,78	9,09
13	1094	10,77	-
14	1267	10,70	9,39
15	1306	10,65	-
16	1445	10,67	8,48
17	1588	10,67	-
18	1676	10,67	8,79
19	1715	10,74	-
20	1746	10,73	8,79

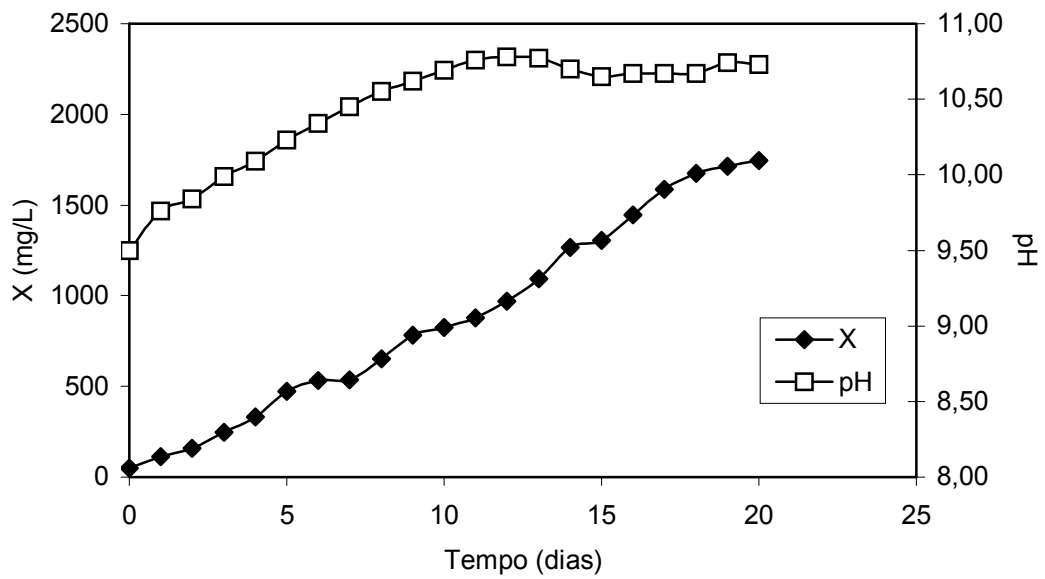


Figura 14. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 4 ($T_a = 16$ dias, $I = 11$ klux).

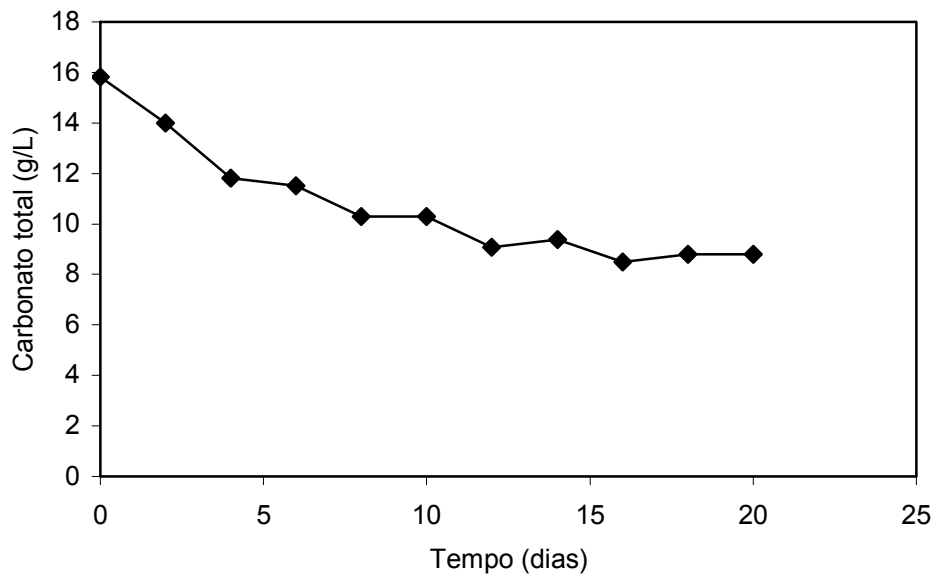


Figura 15. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 4 ($T_a = 16$ dias, $I = 11$ klux).

Experimento 5

Tabela 7 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 5 (Ta = 13 dias, I = 3,8 klux).

Tempo (dias)	X (mg/L)	pH	Carbonato total (g/L)
0	50	9,50	15,85
1	51	9,57	-
2	88	9,61	13,82
3	110	9,72	-
4	193	9,82	12,60
5	236	9,88	-
6	305	9,94	11,98
7	388	10,03	-
8	448	10,08	10,56
9	549	10,14	-
10	582	10,23	10,26
11	606	10,22	-
12	695	10,20	10,88
13	736	10,19	-
14	771	10,19	10,88
15	759	10,14	-

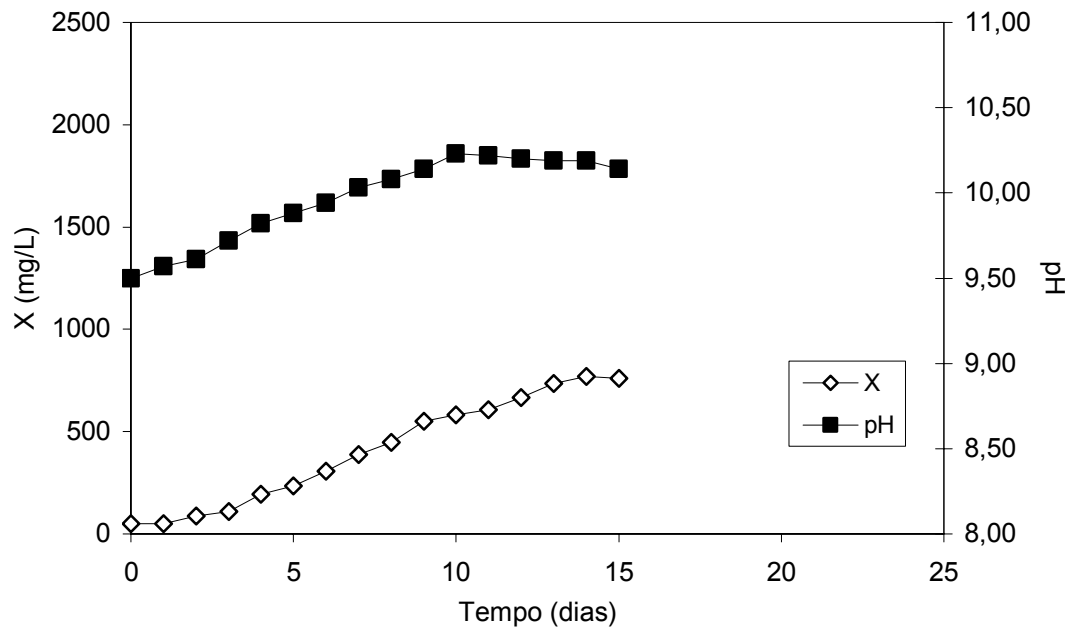


Figura 16. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 5 ($T_a = 13$ dias, $I = 3,8$ klux).

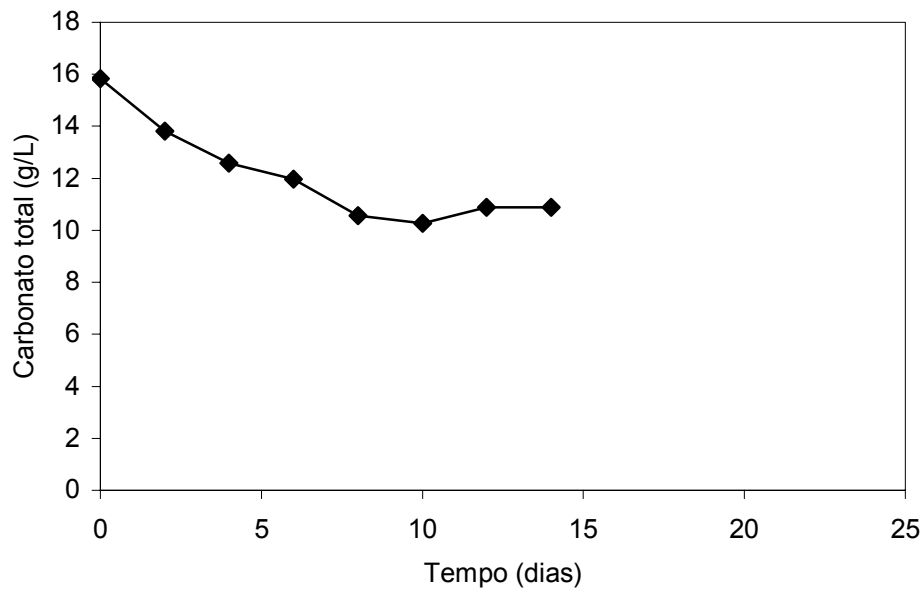


Figura 17. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 5 ($T_a = 13$ dias, $I = 3,8$ klux).

Experimento 6

Tabela 8 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 6 (Ta = 8,8 dias, I = 8 klux).

Tempo (dias)	X (mg/L)	pH	Carbonato total (g/L)
0	50	9,50	15,85
1	56	9,57	-
2	118	9,65	13,81
3	191	9,78	-
4	297	9,90	12,28
5	393	9,96	-
6	508	10,06	11,97
7	802	10,17	-
8	912	10,23	9,95
9	1021	10,25	-
10	1111	10,36	9,64
11	1139	10,44	-

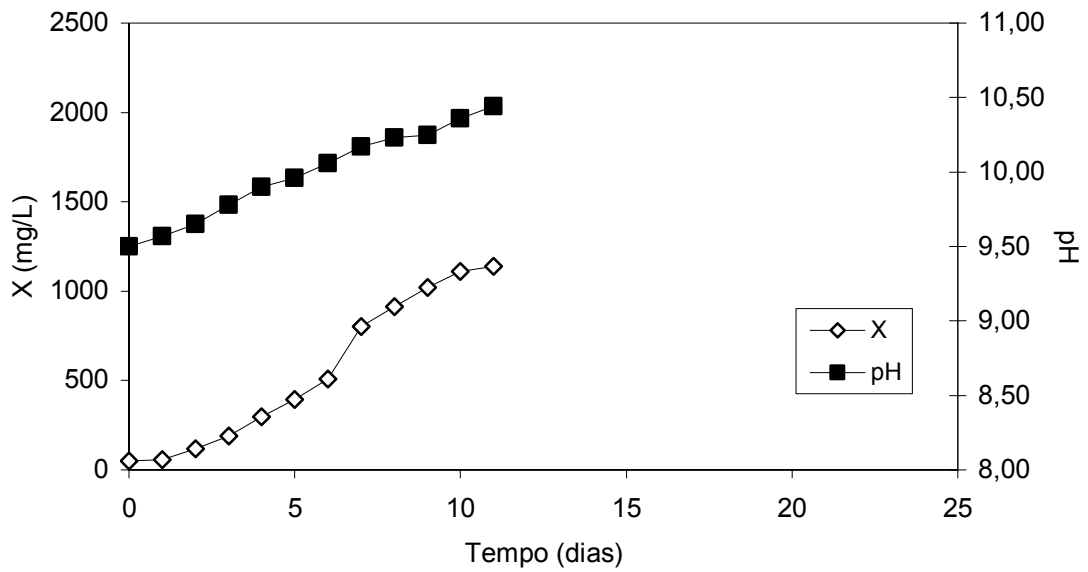


Figura 18. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 6 ($T_a = 8,8$ dias, $I = 8$ klux).

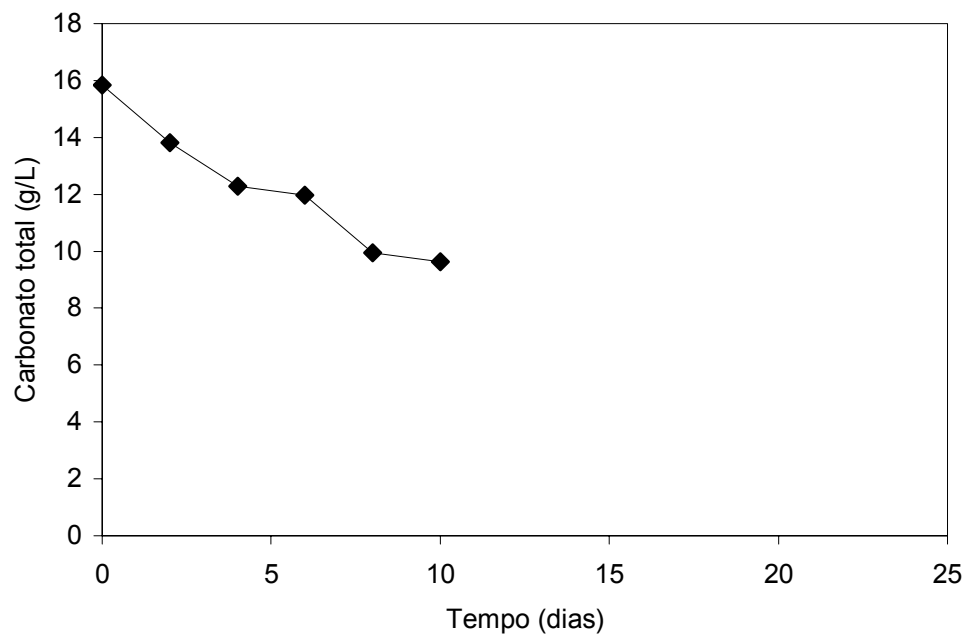


Figura 19. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 6 ($T_a = 8,8$ dias, $I = 8$ klux).

Experimento 7

Tabela 9 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 7 (Ta = 13 dias, I = 12,2 klux).

Tempo (dias)	X (mg/L)	pH	Carbonato total (g/L)
0	50	9,50	15,85
1	140	9,76	-
2	214	9,90	15,05
3	303	10,11	-
4	372	10,19	13,51
5	490	10,33	-
6	609	10,54	11,98
7	633	10,55	-
8	789	10,62	10,60
9	977	10,82	-
10	1126	10,80	10,60
11	1247	10,81	-
12	1308	10,74	9,69
13	1342	10,81	-
14	1464	10,81	9,09
15	1504	10,82	-
16	1667	10,87	8,78
17	1712	10,85	-
18	1903	10,90	8,18
19	1945	10,92	-

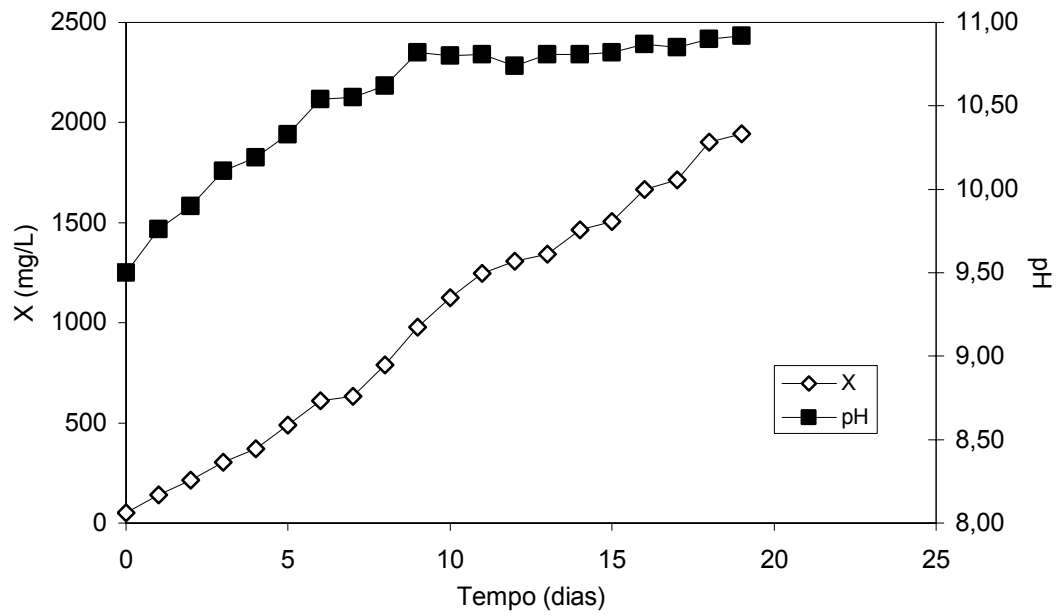


Figura 20. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 7 ($T_a = 13$ dias, $I = 12,2$ klux).

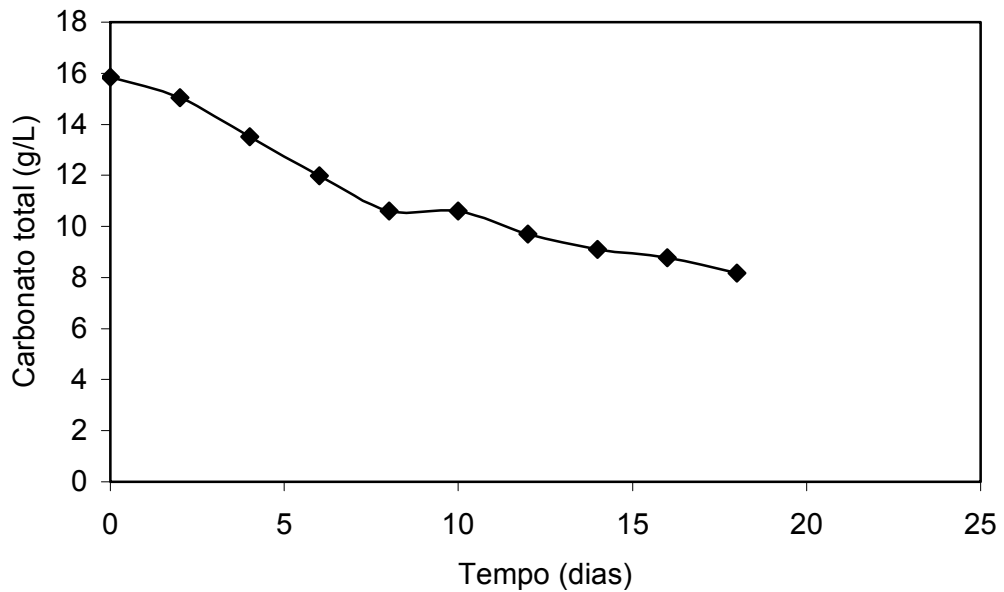


Figura 21. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 7 ($T_a = 13$ dias, $I = 12,2$ klux).

Experimento 8

Tabela 10 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 8 (Ta = 17,2 dias, I = 8 klux).

Tempo (dias)	X (mg/L)	pH	Carbonato total (g/L)
0	50	9,50	15,85
1	64	9,58	-
2	123	9,66	13,81
3	179	9,78	-
4	219	9,91	11,05
5	284	9,98	-
6	348	10,07	8,90
7	408	10,21	-
8	545	10,27	8,70
9	619	10,35	-
10	732	10,37	8,40
11	774	10,37	-
12	874	10,35	7,15
13	1045	10,33	-
14	1192	10,34	9,95
15	1281	10,35	-
16	1486	10,34	9,95
17	1558	10,31	-
18	1633	10,29	9,64
19	1640	10,25	-

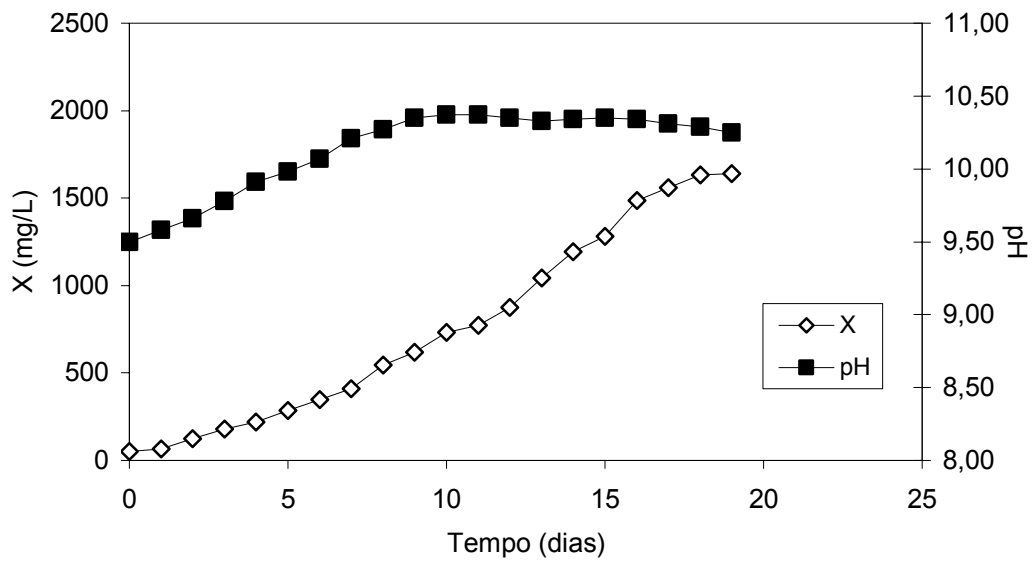


Figura 22. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 8 ($T_a = 17,2$ dias, $I = 8$ klux).

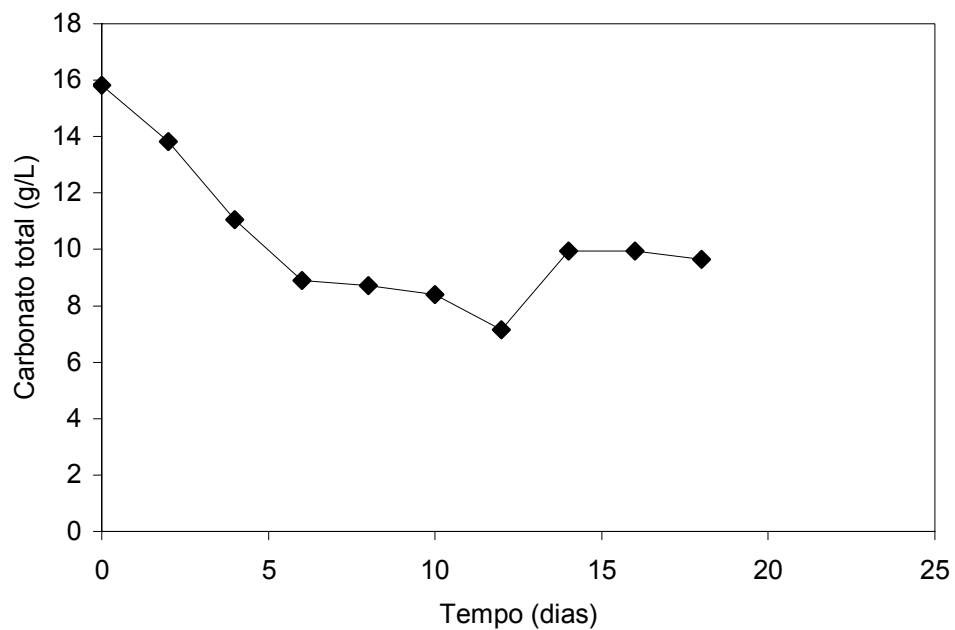


Figura 23. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 8 ($T_a = 17,2$ dias, $I = 8$ klux).

Experimentos 9 ao 14

Tabela 11 - Concentração celular (X) referentes aos experimentos 9 ao 14 (Ta = 13 dias, I = 8 klux).

Experimento	9	10	11	12	13	14
Tempo (dias)	X (mg/L)					
0	50	50	50	50	50	50
1	69	74	51	51	61	152
2	131	144	105	99	119	246
3	171	208	163	148	176	272
4	276	271	263	229	255	340
5	351	361	307	295	334	477
6	426	438	419	421	401	558
7	602	600	465	486	506	589
8	652	649	612	680	648	778
9	835	811	794	791	796	901
10	914	932	984	936	924	936
11	1023	1086	1048	1003	1047	1039
12	1205	1139	1185	1183	1102	1074
13	1350	1359	1265	1305	1253	1160
14	1508	1430	1359	1454	1390	1335
15	1500	1464	1402	1504	1395	1425
16	1527	1498	1429	1496	1391	1504
17	-	-	-	-	-	1517
18	-	-	-	-	-	1576
19	-	-	-	-	-	1590

Tabela 12. Valores de pH referentes aos experimentos 9 ao 14 ($T_a = 13$ dias, $I = 8$ klux).

Experimento	9	10	11	12	13	14
Tempo (dias)	pH					
0	9,50	9,50	9,50	9,50	9,50	9,5
1	9,57	9,58	9,57	9,56	9,58	9,68
2	9,65	9,66	9,66	9,63	9,66	9,87
3	9,78	9,78	9,79	9,76	9,79	9,9
4	9,92	9,93	9,92	9,89	9,91	10,01
5	9,99	9,99	9,99	9,97	9,99	10,05
6	10,10	10,09	10,10	10,07	10,09	10,25
7	10,23	10,23	10,23	10,22	10,22	10,42
8	10,32	10,29	10,30	10,28	10,26	10,53
9	10,38	10,36	10,32	10,36	10,32	10,5
10	10,37	10,36	10,33	10,38	10,40	10,44
11	10,35	10,33	10,34	10,36	10,40	10,44
12	10,31	10,31	10,30	10,37	10,37	10,45
13	10,32	10,30	10,31	10,36	10,30	10,56
14	10,29	10,30	10,30	10,42	10,35	10,56
15	10,38	10,36	10,39	10,42	10,35	10,56
16	10,45	10,44	10,47	10,49	10,44	10,58
17	-	-	-	-	-	10,59
18	-	-	-	-	-	10,55
19	-	-	-	-	-	10,55

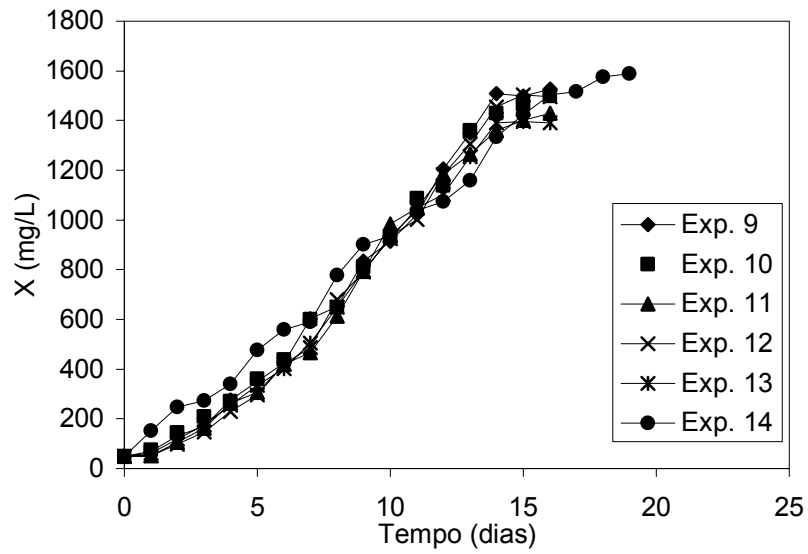


Figura 24. Concentração celular (X) referente aos experimentos 9 ao 14 ($T_a = 13$ dias, $I = 8$ klux)

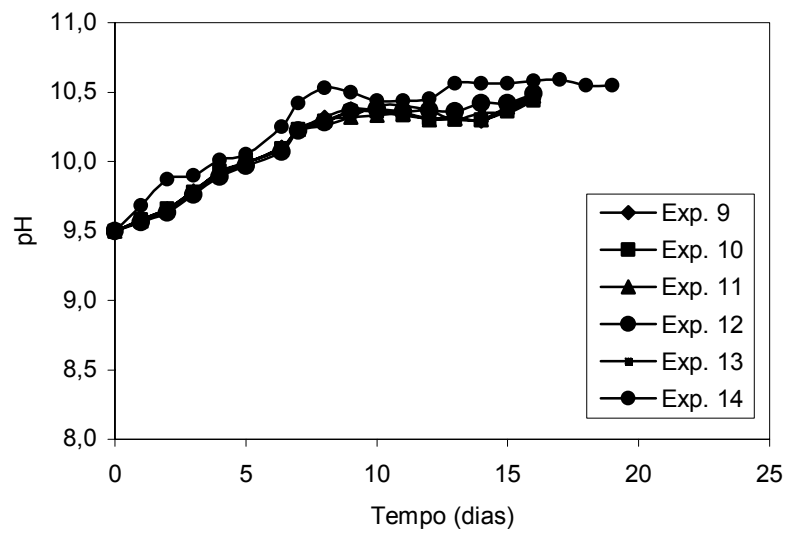


Figura 25. Valores de pH referente aos experimentos 9 ao 14 ($T_a = 13$ dias, $I = 8$ klux)

Tabela 13 - Concentração de carbonato total referentes aos experimentos 9 ao 14 (Ta = 13 dias, I = 8 klux).

Experimento	9	10	11	12	13	14
Tempo (dias)	Carbonato (g/L)					
0	15,85	15,85	15,85	15,85	15,85	15,85
3	-	-	-	-	-	-
4	12,90	10,20	13,82	12,90	13,20	14,77
6	10,26	9,33	10,26	9,64	10,57	14,38
8	9,64	9,02	9,64	9,95	10,88	13,03
10	9,33	9,02	9,64	9,64	9,95	10,91
12	9,64	9,02	9,64	9,33	10,26	10,60
14	9,33	9,33	9,64	9,02	9,32	10,91
16	9,02	9,33	9,33	9,33	9,33	10,60
18	-	-	-	-	-	8,79

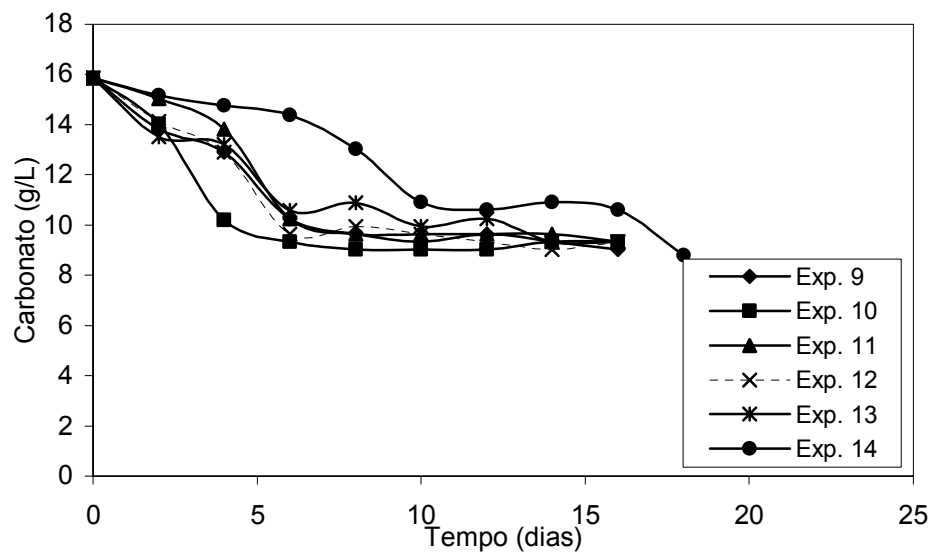


Figura 26. Concentração de carbonato total referentes aos experimentos 9 ao 14 (Ta = 13 dias, I = 8 klux)

Testes adicionais para otimização do processo

Experimento 15

Tabela 14 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 15 (Ta = 13 dias, I = 14 klux).

Tempo (dias)	X (mg/L)	pH	Carbonato total (g/L)
0	50	9,50	15,85
1	134	9,76	-
2	222	9,93	14,13
3	320	10,13	-
4	382	10,22	11,36
5	485	10,36	-
6	629	10,55	11,36
7	687	10,59	-
8	857	10,67	10,90
9	1029	10,90	-
10	1145	10,86	10,00
11	1170	10,95	-
12	1317	10,87	9,69
13	1408	10,92	-
14	1537	10,91	9,39
15	1636	10,90	-
16	1676	10,95	9,09
17	1689	10,95	-

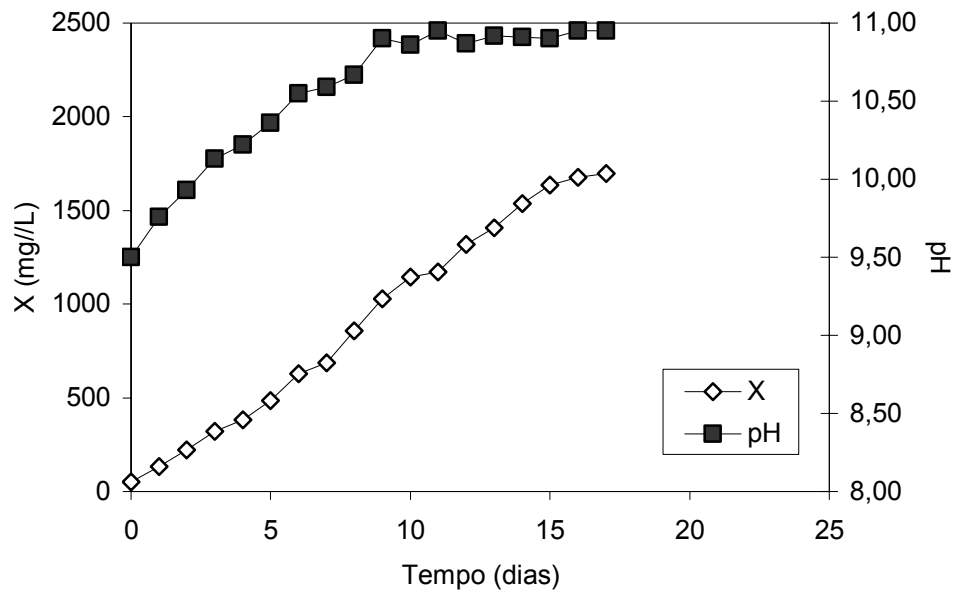


Figura 27. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 15 ($T_a = 13$ dias, $I = 14$ klux).

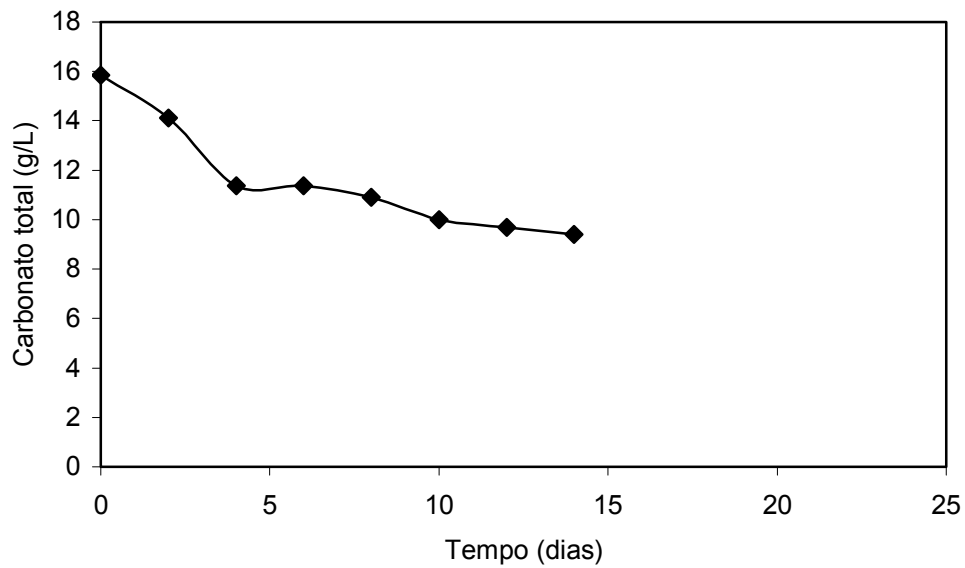


Figura 28. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 15 ($T_a = 13$ dias, $I = 14$ klux).

Experimento 16

Tabela 15 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 16 (Ta = 16 dias, I = 12,2 klux).

Tempo (dias)	X (mg/L)	pH	Carbonato total (g/L)
0	50	9,50	15,85
1	115	9,74	-
2	202	9,88	14,93
3	298	10,09	-
4	375	10,16	12,13
5	461	10,33	-
6	535	10,48	10,57
7	544	10,49	-
8	618	10,57	9,09
9	725	10,73	-
10	767	10,70	9,39
11	861	10,79	-
12	993	10,82	9,39
13	1014	10,83	-
14	1097	10,82	7,88
15	1242	10,81	-
16	1445	10,76	7,87
17	1482	10,80	-
18	1625	10,86	7,57
19	1799	10,84	-
20	1845	10,82	8,00
21	1860	10,82	-
22	1890	10,83	8,18

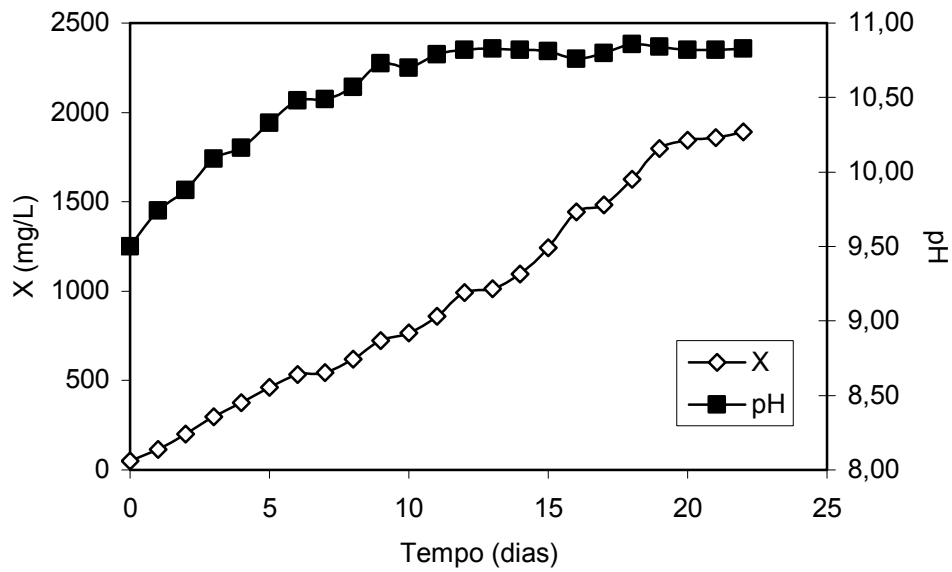


Figura 29. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 16 ($T_a = 16$ dias, $I = 12,2$ klux).

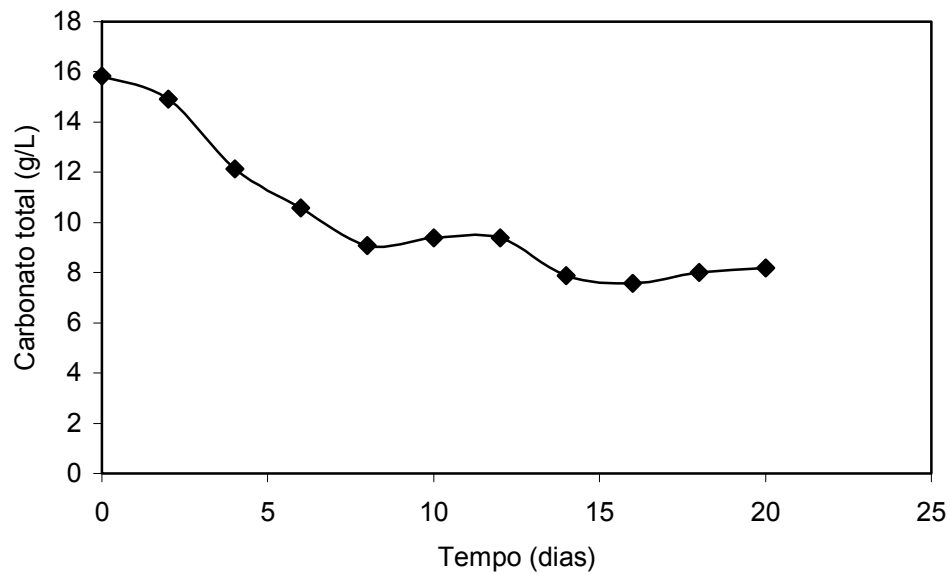


Figura 30. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 16 ($T_a = 16$ dias, $I = 12,2$ klux).

Experimento 17

Tabela 16 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 17 (Ta = 16 dias, I = 14 klux).

Tempo (dias)	X (mg/L)	pH	Carbonato total (g/L)
0	50	9,50	15,85
1	105	9,92	-
2	165	10,11	15,15
3	189	10,22	-
4	304	10,34	13,25
5	344	10,38	-
6	425	10,52	12,87
7	446	10,63	-
8	513	10,67	11,51
9	777	10,79	-
10	888	10,81	10,60
11	977	10,91	-
12	1248	10,89	10,30
13	1348	10,85	-
14	1562	10,83	9,99
15	1605	10,82	-
16	1717	10,80	9,69
17	1870	10,79	-
18	1924	10,82	9,99
19	1972	10,85	-
20	1977	10,90	8,48

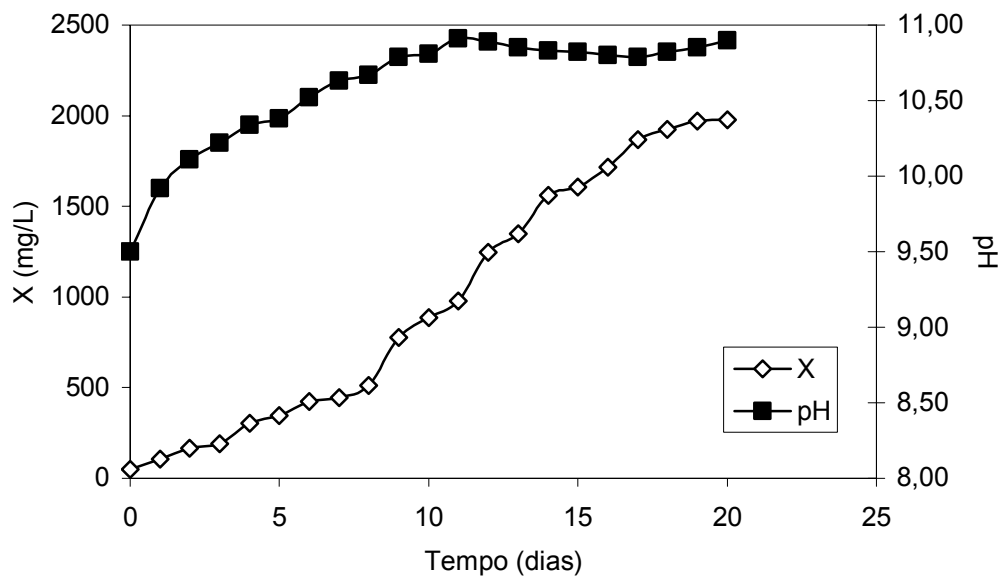


Figura 31. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 17 ($T_a = 16$ dias, $I = 14$ klux).

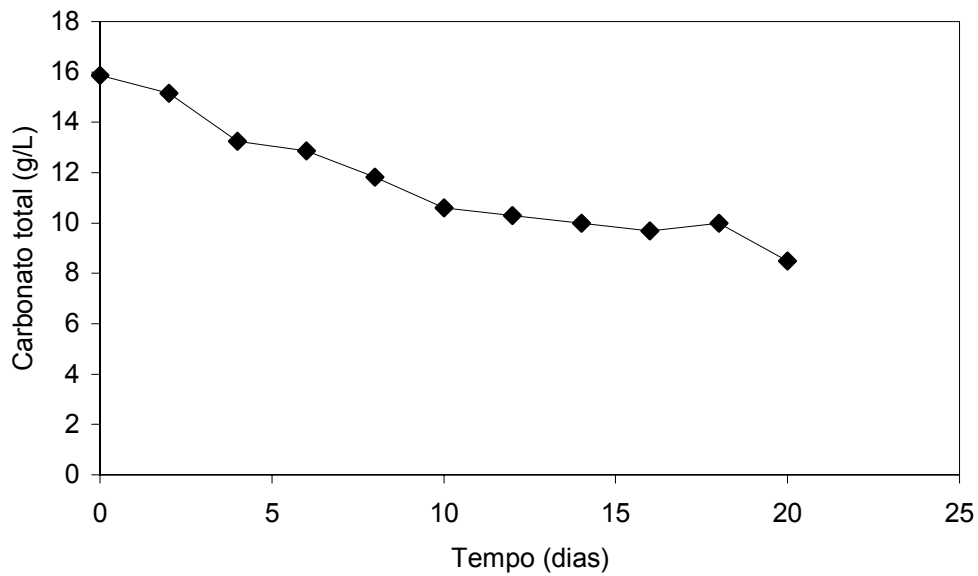


Figura 32. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 17 ($T_a = 16$ dias, $I = 14$ klux).

Experimento 18

Tabela 17 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 18 (Ta = 17,2 dias, I = 14 klux).

Tempo (dias)	X (mg/L)	pH	Carbonato total (g/L)
0	50	9,50	15,85
1	97	9,91	-
2	173	10,11	13,93
3	221	10,20	-
4	285	10,34	10,90
5	354	10,45	-
6	438	10,54	9,39
7	525	10,61	-
8	602	10,65	9,09
9	788	10,84	-
10	895	10,86	9,09
11	994	10,93	-
12	1212	10,98	9,69
13	1324	11,01	-
14	1494	10,96	9,39
15	1614	10,94	-
16	1680	10,97	9,08
17	1783	10,96	-
18	1857	10,90	8,78
19	1872	10,94	-
20	1898	10,90	8,48

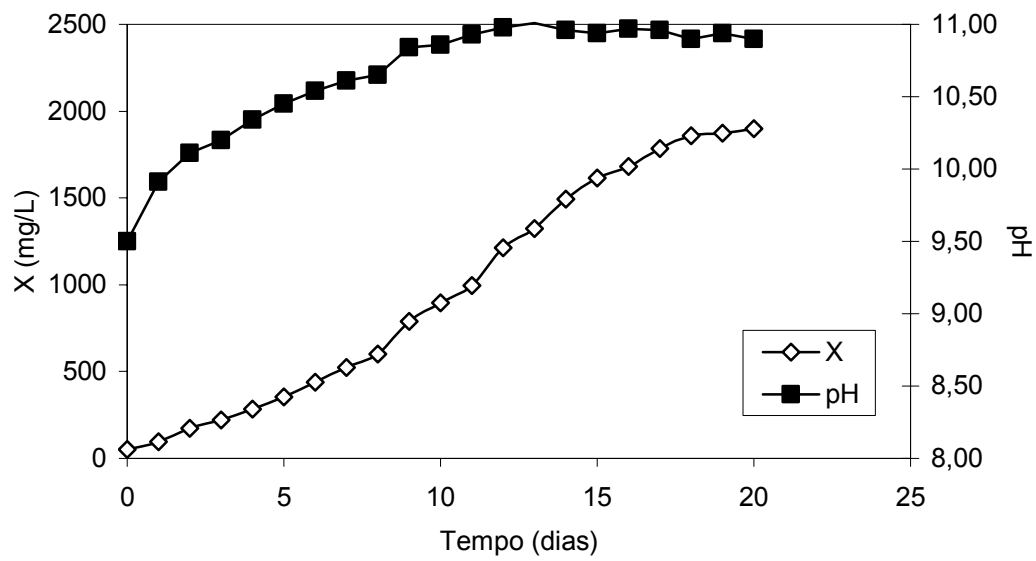


Figura 33. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 18 ($T_a = 17,2$ dias, $I = 14$ klux)

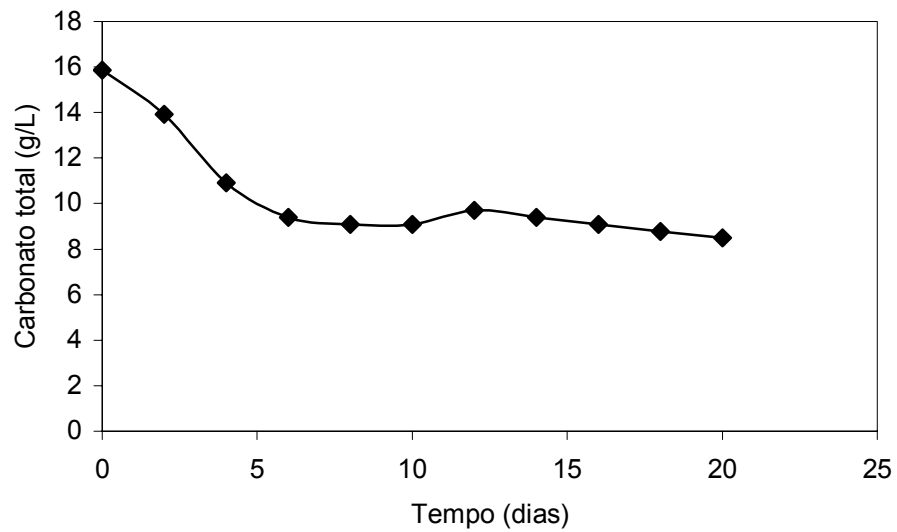


Figura 34. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 18 ($T_a = 17,2$ dias, $I = 14$ klux).

Experimento 19

Tabela 18 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 19 (Ta = 19 dias, I = 12,2 klux).

Tempo (dias)	X (mg/L)	pH	Carbonato total (g/L)
0	50	9,50	15,85
1	124	9,76	-
2	226	9,95	15,54
3	269	10,10	-
4	303	10,16	11,19
5	391	10,32	-
6	482	10,43	10,88
7	510	10,42	-
8	586	10,48	9,99
9	644	10,63	-
10	672	10,63	10,30
11	685	10,67	-
12	749	10,73	9,69
13	824	10,71	-
14	901	10,68	9,00
15	1075	10,71	-
16	1126	10,70	10,00
17	1186	10,69	-
18	1504	10,58	9,69
19	1611	10,61	-
20	1697	10,59	9,39
21	1701	10,60	-

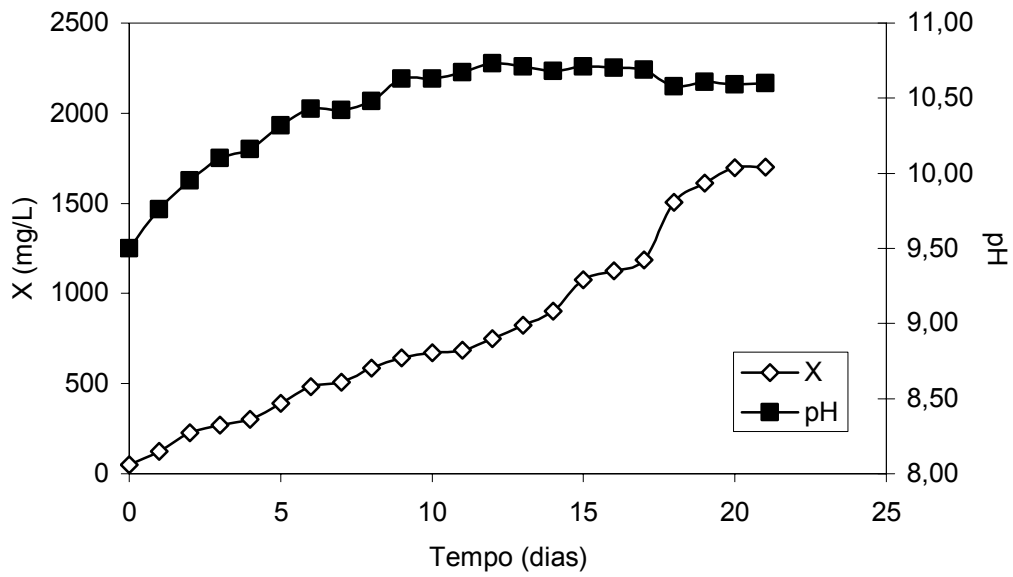


Figura 35. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 19 ($T_a = 19$ dias, $I = 12,2$ klux).

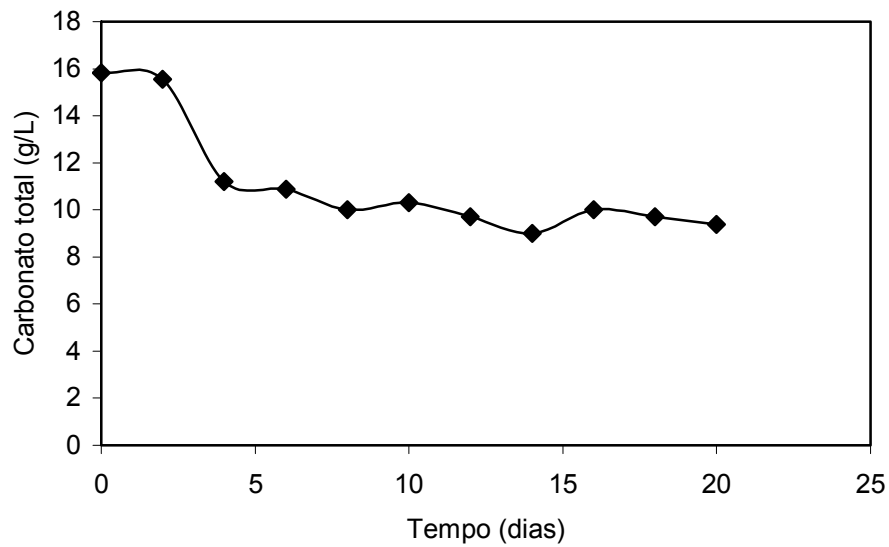


Figura 36. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 19 ($T_a = 19$ dias, $I = 12,2$ klux).

Experimento 20

Tabela 19 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 20 (Ta = 19 dias, I = 14 klux).

Tempo (dias)	X (mg/L)	pH	Carbonato total (g/L)
0	50	9,50	15,85
1	172	9,77	-
2	239	10,00	13,06
3	312	10,15	-
4	347	10,23	12,13
5	493	10,37	-
6	555	10,46	11,19
7	575	10,51	-
8	672	10,55	10,60
9	826	10,60	-
10	850	10,73	8,48
11	948	10,91	-
12	956	10,98	8,78
13	1050	10,98	-
14	1188	10,93	8,48
15	1232	10,93	-
16	1464	10,93	8,17
17	1647	10,89	-
18	1842	10,76	8,79
19	1858	10,65	-
20	1869	10,56	8,18

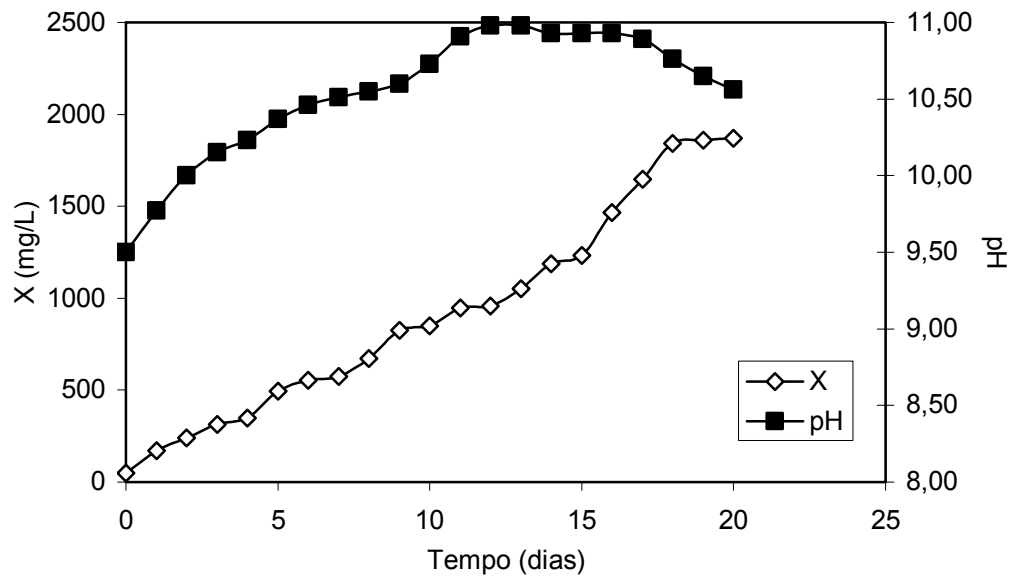


Figura 37. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 20 ($T_a = 19$ dias, $I = 14$ klux).

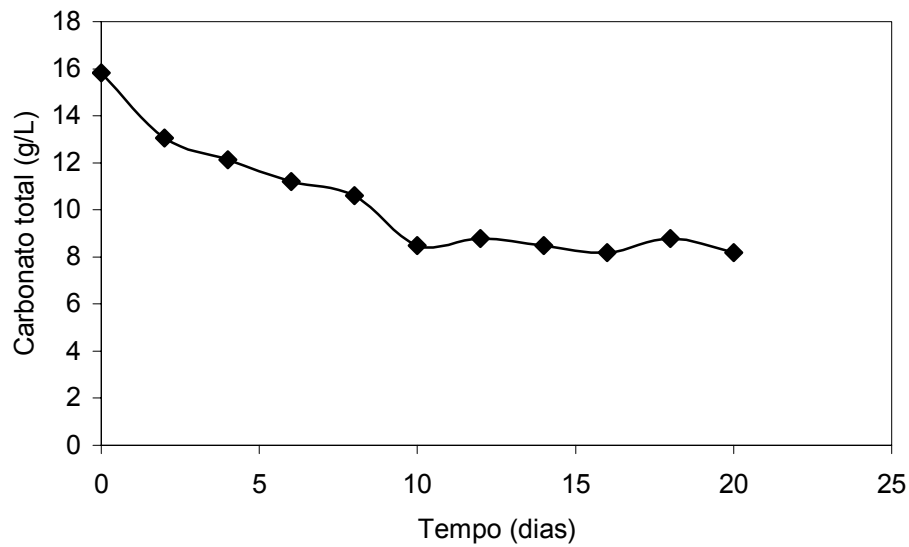


Figura 38. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 20 ($T_a = 19$ dias, $I = 14$ klux).

Experimento 21

Tabela 20 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 21 (Ta = 19 dias, I = 8 klux).

Tempo (dias)	X (mg/L)	pH	Carbonato total (g/L)
0	50	9,50	15,85
1	151	9,77	-
2	240	9,95	13,99
3	275	10,05	-
4	303	10,12	13,99
5	436	10,26	-
6	517	10,40	12,13
7	519	10,41	-
8	683	10,43	11,82
9	755	10,63	-
10	787	10,45	11,51
11	824	10,58	-
12	840	10,58	10,91
13	880	10,55	-
14	1046	10,55	10,30
15	1094	10,57	-
16	1198	10,54	10,60
17	1304	10,52	-
18	1561	10,52	10,30
19	1559	10,43	-
20	1575	10,43	10,00

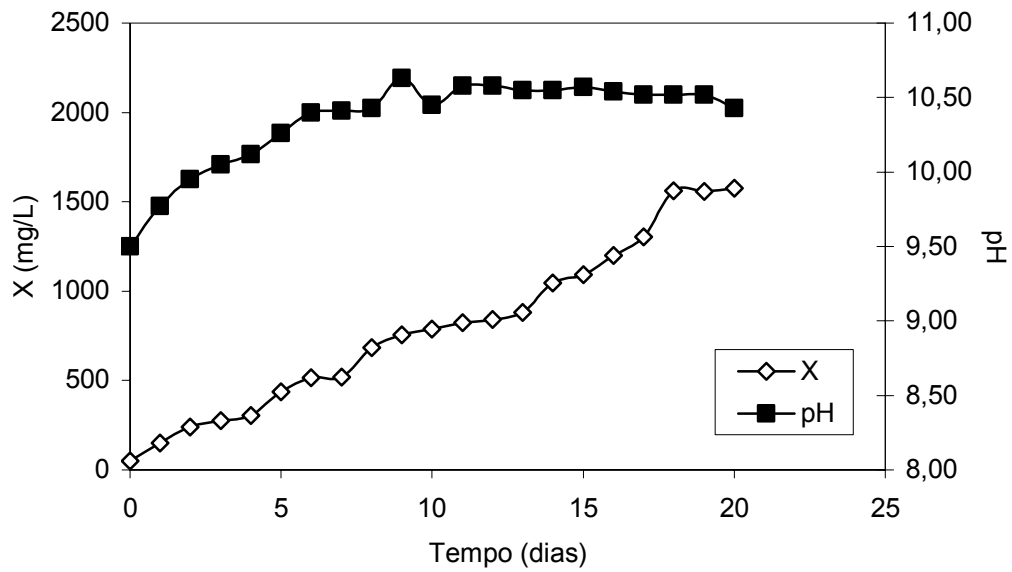


Figura 39. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 21 ($T_a = 19$ dias, $I = 8$ klux).

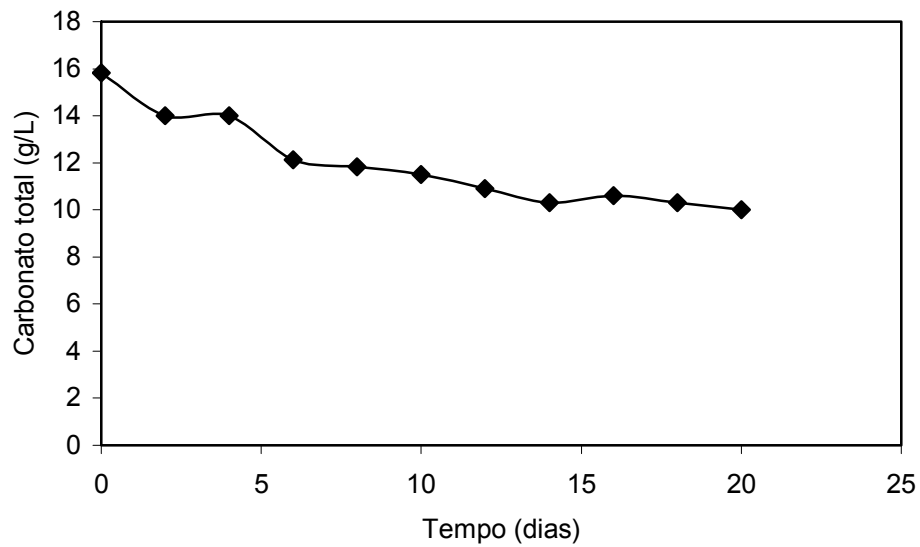


Figura 40. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 21 ($T_a = 19$ dias, $I = 8$ klux).

Experimento 22

Tabela 21 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 22 (Ta = 8,8 dias, I = 14 klux).

Tempo (dias)	X (mg/L)	pH	Carbonato total (g/L)
0	50	9,50	15,85
1	73	9,90	-
2	143	10,04	12,72
3	225	10,16	-
4	342	10,35	12,12
5	480	10,48	-
6	601	10,54	11,21
7	777	10,63	-
8	946	10,65	10,91
9	1178	10,69	-
10	1350	10,74	10,60
11	1434	10,79	-
12	1484	10,78	8,48
13	1487	10,79	-

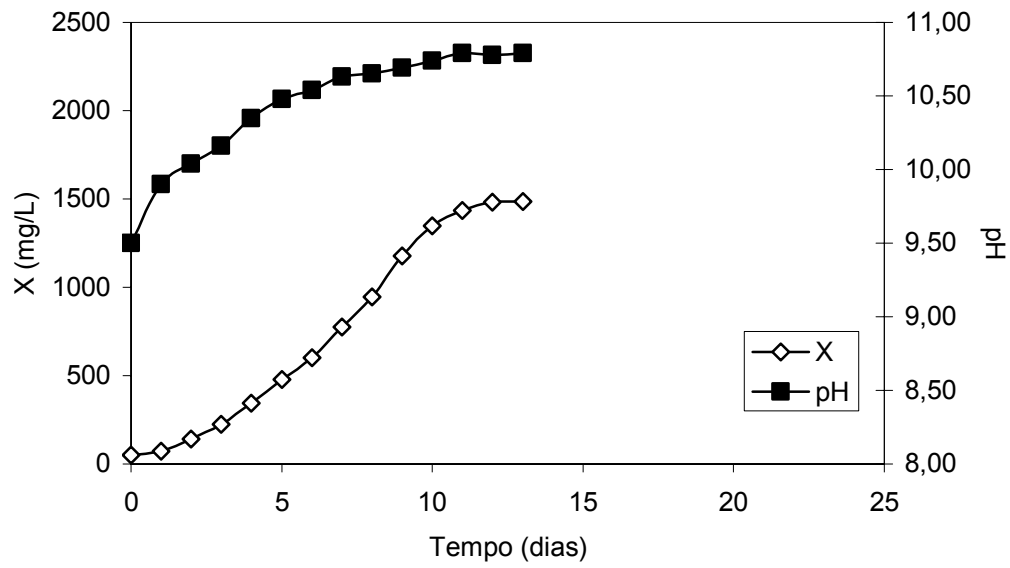


Figura 41. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 22 ($T_a = 8,8$ dias, $I = 14$ klux).

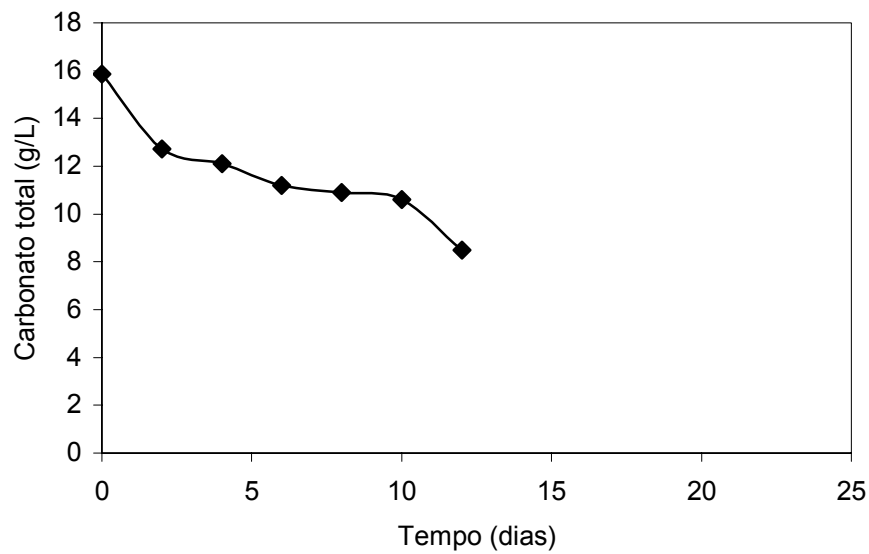


Figura 42. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 22 ($T_a = 8,8$ dias, $I = 14$ klux).

Experimento 23

Tabela 22 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 23 (Ta = 10 dias, I = 14 klux).

Tempo (dias)	X (mg/L)	pH	Carbonato total (g/L)
0	50	9,50	15,85
1	87	9,93	-
2	163	10,09	12,12
3	231	10,18	-
4	328	10,34	11,81
5	450	10,47	-
6	602	10,5	10,91
7	676	10,64	-
8	833	10,64	10,60
9	1090	10,72	-
10	1270	10,73	10,30
11	1415	10,76	-
12	1450	10,78	10,00
13	1527	10,85	-
14	1573	10,91	9,69
15	1586	10,82	-

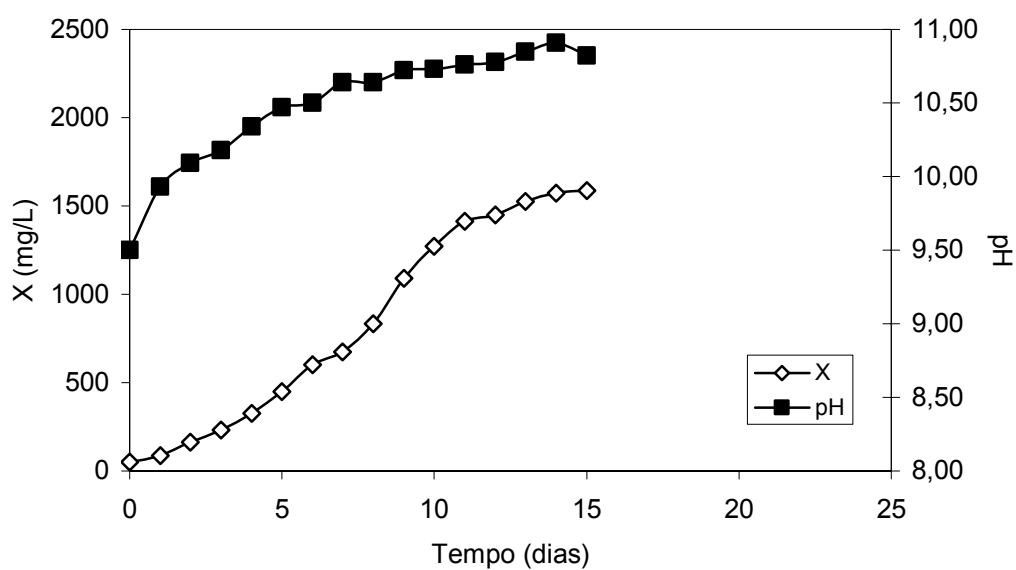


Figura 43. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 23 ($T_a = 10$ dias, $I = 14$ klux).

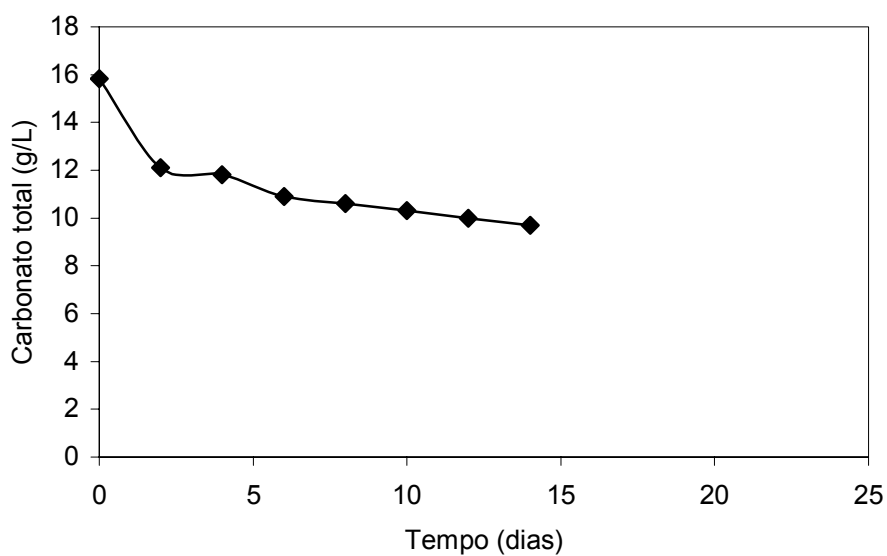


Figura 44. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 23 ($T_a = 10$ dias, $I = 14$ klux).

Experimento 24

Tabela 23 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de carbonato total referentes ao experimento 24 (Ta = 10 dias, I = 12,2 klux).

Tempo (dias)	X (mg/L)	pH	Carbonato total (g/L)
0	50	9,50	15,85
1	82	9,93	-
2	146	10,08	14,31
3	235	10,18	-
4	332	10,34	12,75
5	405	10,45	-
6	601	10,54	12,13
7	728	10,61	-
8	898	10,61	10,30
9	1080	10,72	-
10	1381	10,66	9,69
11	1434	10,65	-
12	1468	10,69	9,39
13	1562	10,69	-
14	1567	10,68	9,69
15	1569	10,68	

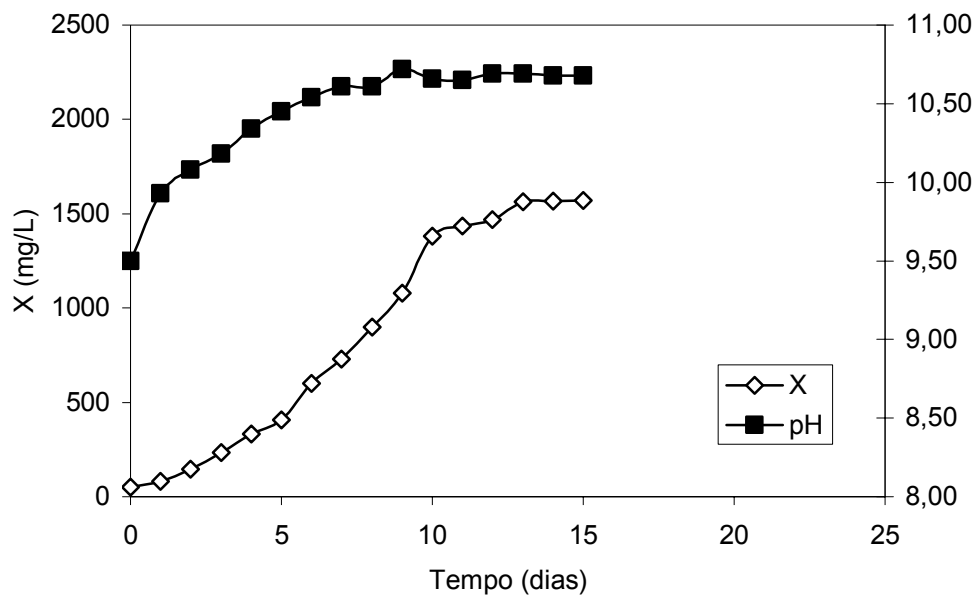


Figura 45. Concentração celular (X) e valor de pH referente ao experimento 24 ($T_a = 10$ dias, $I = 12,2$ klux)

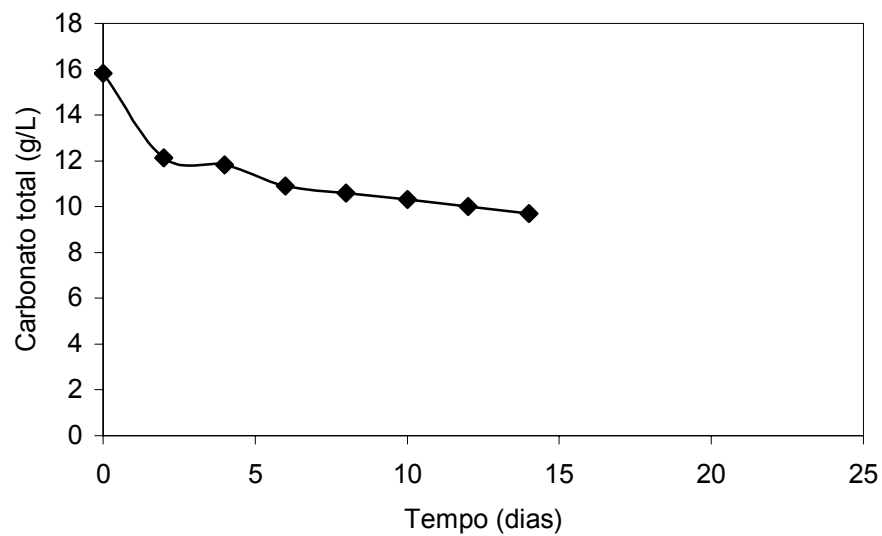


Figura 46. Concentração de carbonato total referentes ao experimento 24 ($T_a = 10$ dias, $I = 12,2$ klux)

Experimentos para a confirmação da otimização do processo

Experimentos 25 ao 29

Tabela 24 - Concentração celular (X) referentes aos experimentos 25 ao 29 ($T_a = 17,2$ dias, $I = 13$ klux).

Experimento	25	26	27	28	29
Tempo (dias)	X (mg/L)				
0	50	50	50	50	50
1	126	142	126	131	128
2	198	252	203	198	197
3	255	276	274	254	267
4	299	357	327	317	316
5	318	395	369	372	385
6	394	490	452	436	463
7	496	502	552	522	513
8	562	614	576	581	602
9	612	667	660	648	689
10	879	867	820	823	822
11	944	968	941	915	957
12	996	1010	1035	987	996
13	1110	1135	1191	1188	1135
14	1165	1317	1272	1236	1249
15	1387	1462	1402	1423	1395
16	1437	1612	1462	1441	1504
17	1576	1669	1587	1620	1620
18	1742	1842	1750	1769	1745
19	1786	1870	1791	1810	1752
20	1805	1890	1845	1880	1805

Tabela 25 - Valores de pH referentes aos experimentos 25 ao 29 ($T_a = 17,2$ dias, $I = 13$ klux).

Experimento	25	26	27	28	29
Tempo (dias)	pH				
0	9,5	9,5	9,5	9,5	9,5
1	10,216	10,16	10,16	10,18	10,18
2	10,31	10,32	10,33	10,32	10,32
3	10,35	10,43	10,40	10,30	10,30
4	10,41	10,50	10,47	10,47	10,47
5	10,49	10,48	10,50	10,49	10,49
6	10,54	10,36	10,59	10,56	10,56
7	10,62	10,72	10,66	10,65	10,65
8	10,65	10,77	10,73	10,72	10,72
9	10,65	10,77	10,73	10,76	10,76
10	10,80	10,96	10,94	10,94	10,94
11	10,99	10,95	10,95	10,97	10,97
12	10,88	10,97	10,97	10,99	10,99
13	10,89	10,94	10,93	10,95	10,95
14	10,77	10,89	10,90	10,95	10,95
15	10,87	10,87	10,90	10,87	10,87
16	10,65	10,87	10,79	10,84	10,81
17	10,70	10,81	10,81	10,87	10,83
18	10,73	10,82	10,80	10,81	10,82
19	10,82	10,90	10,90	10,90	10,90
20	10,94	10,92	10,92	10,93	10,95

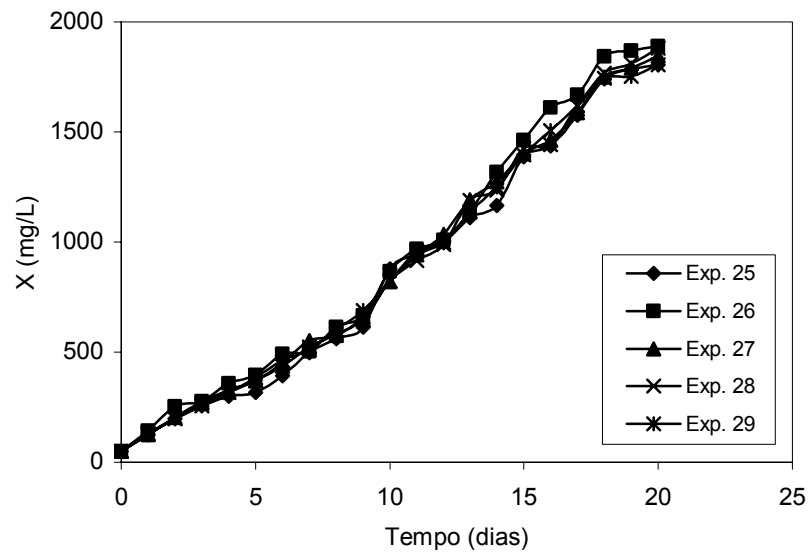


Figura 47. Concentração celular (X) referente aos experimentos 25 ao 29 ($T_a = 17,2$ dias, $I = 13$ klux)

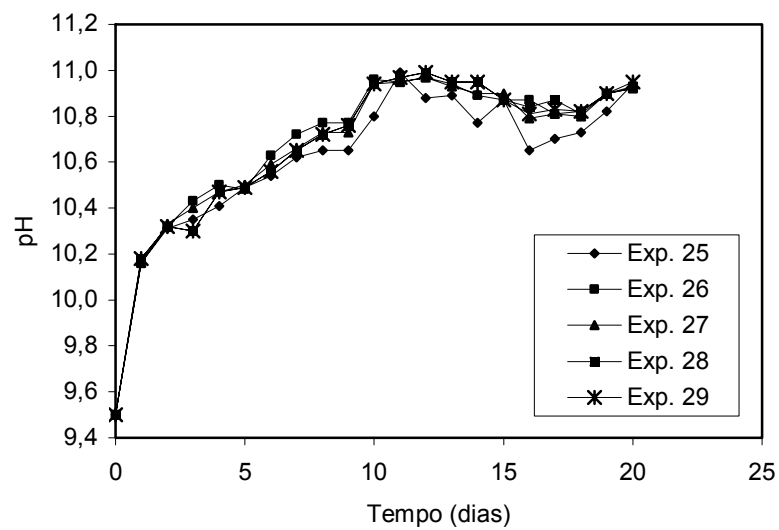


Figura 48. Valores de pH referente aos experimentos 25 ao 29 ($T_a = 17,2$ dias, $I = 13$ klux)

Tabela 26 - Concentração de carbonato total referentes aos experimentos 25 ao 29 (Ta = 17,2 dias, I = 13 klux).

Experimento	25	26	27	28	29
Tempo (dias)	Concentração de carbonato total (g/L)				
0	15,85	15,85	15,85	15,85	15,85
2	14,39	13,63	11,81	12,44	12,44
4	12,87	12,12	12,12	11,81	13,37
6	12,50	12,12	11,51	12,12	11,82
8	11,21	11,51	11,51	10,91	11,81
10	10,30	10,91	10,6	10,91	10,91
12	9,69	9,69	9,09	8,79	8,79
14	9,69	9,09	10,91	10,00	9,39
16	8,48	9,39	10,00	10,00	9,69
18	8,18	8,79	9,39	9,09	8,79
20	8,18	8,18	8,79	8,79	8,48

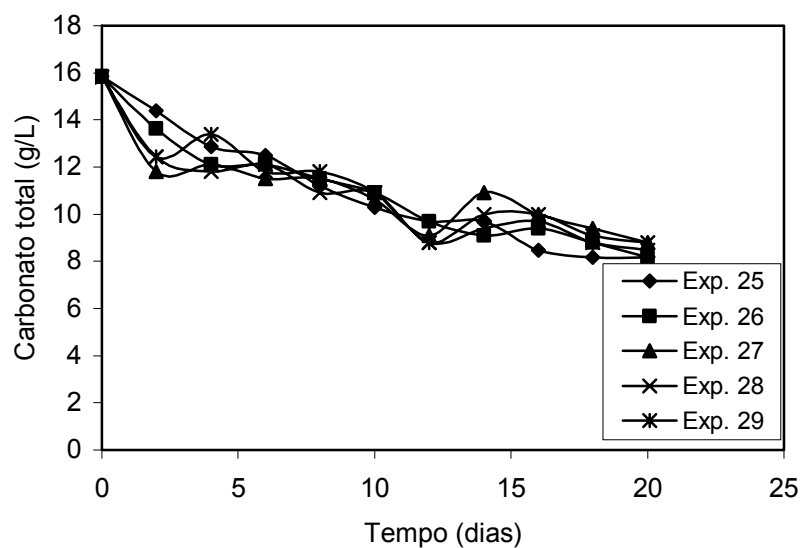


Figura 49. Concentração de carbonato total referentes aos experimentos 25 ao 29 (Ta = 17,2 dias, I = 13 klux)

O modelo de crescimento da *S. platensis* expresso como o aumento da concentração celular durante o cultivo foi similar em todas as condições, com a ausência da fase lag, ou fase de adaptação, seguindo com a fase exponencial, como pode ser observado nas Figuras correspondentes às curvas de crescimento. Isso se deve a semelhança nas condições de cultivo, tais como composição química do meio de cultura e temperatura de crescimento entre a preparação do inóculo e o cultivo. Outro fator é que as células para a preparação do inóculo estavam na fase exponencial de crescimento, isto é, o inóculo era um cultivo jovem constituído de células ativas. De fato, Pelizer *et al.* (2003), que trabalharam com KNO_3 como fonte de nitrogênio, relataram a influência da idade do inóculo no crescimento da *S. platensis*, comprovando que a utilização de inóculo no 6º dia de cultivo, com concentração de 50 mg/L, proporcionou maiores valores no crescimento celular. Nessas condições, também não detectaram fase lag de crescimento. Fenômeno semelhante foi observado por Pinto *et al.* (2005), em cultivo de *Streptomyces clavuligerus*. Adicionalmente, este autor assinala que a presença de fase lag ocorre quando o inóculo de cultivo consiste de amostras de células em cultivo em fase estacionária. Autores como Danesi *et al.* (2002), trabalhando com uréia como fonte de nitrogênio, também não observaram a presença de fase lag no cultivo de *S. platensis*. De fato, mesmo em cultivos onde o inóculo foi cultivado em meio com nitrato, como é o caso do presente trabalho, seria esperado que o uso de fontes de nitrogênio que levem à presença de amônia no meio de cultivo não apresentasse fase lag de crescimento celular, pois a amônia é a fonte de nitrogênio preferencialmente utilizada pela *S. platensis* (BOUSSIBA, 1989; BELKIN & BOUSSIBA, 1991).

Em cultivos heterotróficos, o microrganismo alcança a fase estacionária ou quando algum nutriente se esgota, ou pela excreção de metabólitos tóxicos, ou pelo acúmulo de matéria orgânica devido a decomposição e morte celular (BELAY, 1997). Neste estudo, por se tratar de um cultivo fotoautotrófico, o alcance da fase estacionária pode ter sido devido à limitação da intensidade luminosa. Outro fator que pode ter determinado a parada do crescimento celular foi a falta da fonte de nitrogênio amoniacal após o término do período de alimentação do cloreto de amônio.

Maiores tempos de cultivos para atingir a fase estacionária de crescimento foram obtidos nos experimentos submetidos a maiores tempos de alimentação e intensidades luminosas. Isso pode ser observado no experimento 19, onde foi encontrado o maior tempo para atingir a fase estacionária, 20 dias. Por outro lado, o menor tempo de cultivo (10 dias) ocorreu no experimento alimentado durante 8,8 dias sob intensidade luminosa de 8 klux (experimento 5). Como a massa total de nitrogênio adicionado em todos os experimentos foi igual, em menores tempos de alimentação, a fonte de nitrogênio em estudo (íon amônio) foi adicionada em tempos muito curtos, com desacoplamento entre o período potencial de crescimento microbiano e taxa de adição deste nutriente. Então, o nitrogênio não consumido pelas células durante o período de alimentação é volatilizado e a quantidade de nitrogênio disponível no decorrer do cultivo após o tempo de alimentação torna-se insuficiente para o desenvolvimento celular. Logo, o tempo de alimentação curto proporciona menor tempo de cultivo.

Comparando o experimento 24 ($T_a = 10$ dias), o experimento 16 ($T_a = 16$ dias) e o experimento 19 ($T_a = 19$ dias), todos sob a mesma intensidade luminosa ($I = 12,2$ klux) e não limitados por luz, pode-se observar uma diferença nas

concentrações celulares máximas, que foram de 1562, 1845 e 1697 mg/L, respectivamente.

A concentração celular máxima (X_m) aumentou de 1562 mg/L (Experimento 24) para 1845 mg/L (Experimento 16) com o aumento do tempo de alimentação. Nesse caso (Experimento 24), o crescimento pode ter sido limitado após o término do período de alimentação, devido à evaporação da amônia, como descrito anteriormente. Por outro lado, um aumento no tempo de alimentação de 16 dias (Experimento 16) para 19 dias (Experimento 19) levou a uma redução da concentração celular máxima de 1845 mg/L para 1697 mg/L, respectivamente. O emprego de maiores tempos de alimentação do substrato limitante (NH_4^+) implica na adição do nutriente em menor concentração durante todo o tempo de cultivo. Isso pode limitar o crescimento do microrganismo durante a fase exponencial de crescimento. No presente trabalho, o crescimento não pode ter sido limitado pela fonte de nitrogênio no primeiro dia de cultivo por que a concentração inicial do cloreto de amônio (1,7 mM) é considerada satisfatória para o crescimento de *S. platensis*, como concentração celular inicial de 50 mg/L, em minitanques (CARVALHO *et al.*, 2004).

Carvalho *et al.*, (2004) sugeriram um tempo de alimentação ótimo de 16 dias para o cultivo de *S. platensis* quando cultivados em minitanques a 6 klux, obtendo um X_m de 1282 mg/L. O X_m reduziu para 746 mg/L nos cultivos com o tempo de alimentação maior ($T_a = 20$ dias) e para 852 mg/L com o tempo de alimentação menor ($T_a = 12$ dias). Isso demonstra a importância do tempo de alimentação no processo descontínuo alimentado, como assinalado por Carvalho & Sato (2001).

Durante o período de alimentação da fonte de nitrogênio, as concentrações de amônia residuais sempre apresentaram uma concentração não inibitória (inferior a

$7,2 \times 10^{-6}$ M) (resultados não mostrados), consideradas não tóxicas, pois esta torna-se tóxica numa concentração acima de 2 mM (ABELIOVICH & AZOV, 1976; CARVALHO *et al.*, 2004). Portanto, não foi observado o efeito tóxico da amônia nos experimentos realizados no presente trabalho. Carvalho *et al.*, (2004) cultivaram células em frascos de Erlenmeyer, utilizando processo descontínuo, com a concentração celular inicial de 50 mg/L e observaram que houve limitação do crescimento celular por nitrogênio nos cultivos com concentrações de cloreto de amônio menores que 1,6 mM, enquanto que nos cultivos com concentrações de cloreto de amônio acima desse valor, o crescimento celular foi inibido pelo excesso de amônia.

O nitrogênio é um nutriente fundamental para o metabolismo do microrganismo por ser constituinte de proteínas celulares, alguns lipídios e ácidos nucléicos. O cloreto de amônio é uma fonte de nitrogênio alternativa para o cultivo de *S. platensis*, pois essas células utilizam a amônia que é incorporada diretamente no metabolismo celular do nitrogênio. No entanto, esta substância torna-se tóxica para as células quando presente em altas concentrações.

Em solução aquosa, a amônia, existe tanto na forma de íon NH_4^+ como na forma gasosa NH_3 dependendo do pH e da temperatura do meio. A forma iônica é altamente solúvel em água e é geralmente considerada menos tóxica para microalgas (MANNING *et al.*, 1996). Mais de 90 % da amônia encontra-se na forma gasosa no pH 10,5 e 20 °C (NURDOGAN & OSWALD, 1995). Então, em cultivos a 30 °C e pH acima de 10 foram esperados ter uma grande perda desse nutriente para a atmosfera.

Convencionalmente, utilizam-se nitratos como fontes de nitrogênio (SCHLÖSSER, 1982; PAOLLETTI, 1975). No entanto, Carvalho *et al.* (2004), em

cultivos utilizando meio de Paolleti (PAOLLETI, 1975), substituindo KNO_3 por NH_4Cl , verificaram que os cultivos de *S. platensis* utilizando processo descontínuo alimentado, com alimentação exponencial de cloreto de amônio, levaram a níveis de biomassa final praticamente coincidentes àqueles cultivos onde se utilizou KNO_3 como fonte de nitrogênio. Isso demonstra que a utilização do NH_4Cl como fonte de nitrogênio não prejudica o crescimento microbiano.

Do ponto de vista energético, a utilização de NH_4^+ no cultivo de *Spirulina* spp. é preferencial por levar à presença de NH_3 no meio de cultivo alcalino, que entra por difusão na célula (BOUSSIBA, 1989; BELKIN & BOUSSIBA, 1991), não necessitando sofrer nenhuma alteração dentro da célula para que possa ser usada quando da sua incorporação no alfa-cetoácido para formação do correspondente aminoácido. Por outro lado, o NO_3^- precisa ser reduzido até amônia para poder ser utilizado pela célula (HATTORI & MYERS, 1967). Esse efeito pode ser melhor visualizado

Figura NO_3^- NH_4^+ entre o pH, amônia e íon amônio está descrito no item 2.6.3.

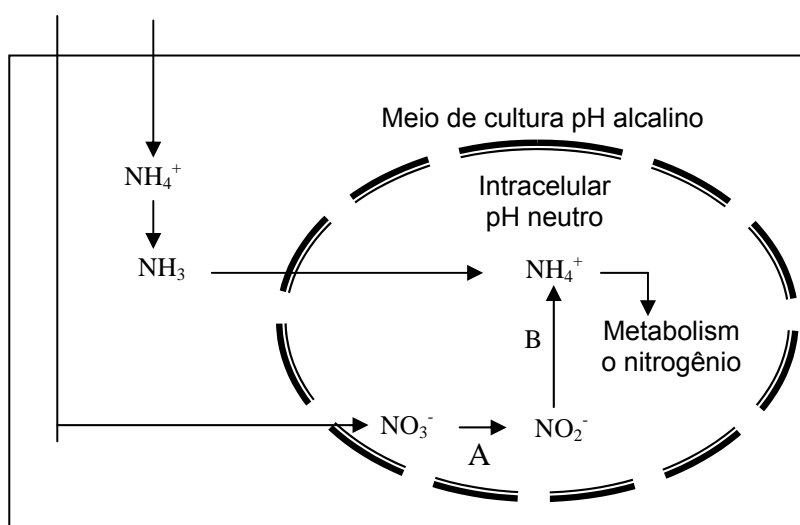


Figura 50. Desenho esquemático da assimilação do nitrogênio pela *S. platensis*. A - representa a enzima nitrito redutase; B - representa a nitrito redutase

Durante a fase inicial de crescimento, quando a concentração celular é baixa, a intensidade luminosa é suficiente para promover o crescimento e a energia adicional para redução do KNO_3 é desprezível. Portanto, nessas condições o nitrato pode se apresentar como melhor fonte de nitrogênio que o cloreto de amônio. Por outro lado, próximo da fase estacionária, a concentração celular alcança o máximo e essa disponibilidade de energia proveniente da luz é reduzida pelo efeito do sombreamento (RICHMOND & QIANG, 1997). Por causa da conseqüente limitação luminosa, a energia adicional requerida para a assimilação de KNO_3 provavelmente torna-se significativa e o crescimento da *S. platensis* é favorecido pelo uso do cloreto de amônio (BOUSSIBA, 1989; CARVALHO *et al.*, 2004).

O emprego do cloreto de amônio como uma fonte alternativa de nitrogênio, além de propiciar uma vantagem energética para célula, apresenta menor custo comercial como pode ser observado na Tabela 27. Nesta Tabela, foram consideradas as médias dos preços de nitrogênio do nitrato de potássio e do cloreto de amônio de grau analítico em diferentes empresas.

Tabela 27 - Custo do nitrogênio proveniente do nitrato de potássio e do cloreto de amônio.

Fonte de nitrogênio	grau	Preço por Kilograma	Preço por Kilograma de nitrogênio (R\$)
KNO_3	analítico	95,2	667,4
NH_4Cl	analítico	19,5	74,5

Pode-se observar que, menores concentrações de biomassas foram obtidas nos cultivos submetidos a menores intensidades luminosas ($I < 8$ klux). Isso pode ser explicado pelo efeito de sombreamento, uma vez que pelo aumento da concentração celular, menores iluminâncias tornam-se insuficientes como fontes de

energia, fazendo com que a luz seja um fator limitante. Isso pode ser observado no experimento 8, uma vez que, mesmo apresentando o maior tempo de alimentação ($T_a = 17,2$ dias), o crescimento celular foi limitado devido a baixa intensidade luminosa. Tem sido mostrado previamente que em culturas sob altas concentrações de nutrientes, o crescimento é limitado pela disponibilidade luminosa (GARCÍA-MALEA *et al.*, 2006, CHOI *et al.*, 2003). Enquanto que maiores concentrações da cianobactéria foram obtidas quando cultivadas em maiores intensidades luminosas, atingindo concentrações celulares de 1903 mg/L (experimento 7, $I = 12,2$ klux). Não foi detectado um aumento na concentração celular máxima. No entanto, houve uma limitação do crescimento nos cultivos sob intensidade luminosa de 14 klux. Isso pode ser devido ao fato de ter sido atingida a zona de saturação luminosa.

Alguns autores como Chojnacka & Noworyta (2004) relataram que, a fotoinibição, em cultivos autotróficos de *S. platensis*, foi observada a intensidade luminosa acima de 50 W m^{-2} (19,1 klux) e o ponto de saturação luminosa está entre 30 W m^{-2} (11,5 klux) e 50 W m^{-2} (19,1 klux).

O crescimento da *S. platensis* em frascos de Erlenmeyer foi saturada a intensidade luminosa de $100\text{-}150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Maior intensidade luminosa limitou o crescimento e reduziu a eficiência do uso da energia luminosa pelos pigmentos celulares (VONSHAK *et al.*, 2000) devido a inibição do transporte de elétrons pelo fotossistema II (LU & VONSHAK, 2002). Exposição durante muito tempo a alta intensidade luminosa resulta na inibição da fotossíntese, destruição do aparato fotossintético e eventualmente, morte celular (LONG *et al.*, 1994).

Adicionalmente, Iqbal & Zarfar (1993) demonstraram que o aumento da intensidade luminosa no cultivo da microalga *Porphyridium cruentum* interferiu na habilidade fotossintética das células, resultando em uma maior taxa de crescimento

celular. Acima do ponto de saturação luminosa, o efeito inibitório no crescimento celular foi observado. Isso pode ser atribuído ao rompimento das lamelas do cloroplasto, causada pela exposição a alta intensidade luminosa, ou inativação de enzimas envolvidas na fixação do dióxido de carbono.

Como pode ser observado nas Figuras referentes aos valores de pH, ocorreu um aumento deste no decorrer do crescimento celular, sendo que o pH inicial foi da ordem de 9,5 e quando atingiu aproximadamente 10,5, notou-se uma tendência de diminuição da velocidade de crescimento celular. Resultados similares também têm sido observados por Belay (1997). Isso pode ser explicado pelo fato que, acima de pH 10,2, a fonte de carbono predominante é o carbonato (RUSSEL, 1982) (item 2.6.3, Figura 2) e para a *S. platensis*, a fonte de carbono preferencial é o bicarbonato (BINAGHI *et al.*, 2003).

Nos experimentos 1, 2 e 5 (Figura 8, Figura 10 e Figura 16) o pH alcançou um valor máximo de 10,3 devido a limitação do crescimento celular pela intensidade luminosa, conseqüentemente menor foi o consumo de bicarbonato do meio de cultura e menor o valor do pH atingido. No experimento 6 (Figura 18), o pH máximo atingido também foi relativamente alto (da ordem de 10,4). Isso foi devido a uma limitação do crescimento celular pelo tempo de alimentação ($T_a = 8,8$ dias) utilizado que, por sua vez, em função de um desacoplamento entre taxa de adição da fonte de nitrogênio e capacidade de crescimento da microalga, limitou o crescimento celular após o término da alimentação do sistema. Nos experimentos com maiores concentrações celulares (Experimentos 7, 16, 17, 18, 20) foram observados maiores valores de pH, atingindo um máximo de 11. Essa tendência do aumento do pH final e a concentração celular máxima está de acordo com o obtido por Pelizer *et al.* (2002). Nesses casos, após os cultivos alcançarem um valor de pH de 10,5, os

valores destes aumentaram lentamente devido ao deslocamento químico em direção a formação de carbonato (Figura 2, item 2.6. 3).

O aumento do pH com o crescimento celular pode ser explicado pelo consumo da fonte de carbono durante os cultivos. Os íons bicarbonato são transportados ativamente para o interior celular, convertidos a carbonato e gás carbônico, que é utilizado na fotossíntese. Para cada molécula de CO₂ utilizada pela célula ocorre a liberação de um íon carbonato (RUSSEL, 1982).

A variação do pH já era esperada já que a tendência durante o processo é que o pH se eleve devido a utilização da fonte de carbono pela célula (bicarbonato), deslocando o equilíbrio para a formação de compostos básicos como carbonato. Nas Figuras referentes à concentração de carbonato total no meio de cultivo, os consumos das fontes de carbono podem ser observados, e da mesma forma que o pH, também acompanharam o crescimento.

Comparando a concentração de carbonato total no final do cultivo, observa-se uma menor concentração de carbonato residual no meio de cultura nos experimentos onde foram obtidas as maiores concentrações de biomassa, com valores médios de 8,18 g/L (Experimento 7) e 8,48 g/L (Experimento 17 e 18). De fato, tendo em vista que a biomassa necessita de carbono para seu desenvolvimento (TORRE *et al.*, 2003), seria esperado que a quantidade residual de carbono fosse uma função decrescente da concentração de biomassa alcançada.

6. 2. Avaliação do conteúdo de proteínas e lipídios

A fração de lipídios e proteínas analisadas na biomassa de *S. platensis* no final dos cultivos estão apresentadas na Tabela 28.

Tabela 28 - Conteúdo de lipídios e proteínas nas biomassas secas obtidas.

Experimento	Tempo de alimentação (dias)	Intensidade luminosa (klux)	Lipídios ^a (%)	Proteínas ^b (%)
1	10	5	22,87	41,11
2	16	5	23,41	43,71
3	10	11	17,90	37,59
4	16	11	18,01	33,05
5	13	3,8	20,82	41,19
6	8,8	8	17,98	40,07
7	13	12,2	15,33	28,01
8	17,2	8	17,04	39,10
9	13	8	17,37	38,37
10	13	8	18,15	38,09
11	13	8	17,14	38,72
12	13	8	16,29	40,14
13	13	8	16,52	41,74
14	13	8	16,89	39,96

Continuação Tabela 28.

Parte B: Testes adicionais para otimização do processo				
15	13	14	14,68	29,84
16	16	12,2	16,08	29,34
17	16	14	17,77	30,43
18	17,2	14	11,91	28,14
19	19	12,2	16,23	35,48
20	19	14	14,03	31,69
21	19	8	18,91	39,39
22	8,8	14	18,79	32,12
23	10	14	19,48	30,58
24	10	12,2	15,71	33,71
Parte C: Experimentos para confirmação da otimização				
25	17,2	13	14,96	37,49
26	17,2	13	13,31	36,57
27	17,2	13	14,95	34,22
28	17,2	13	14,08	36,55
29	17,2	13	14,72	34,60

^a Porcentagem de lipídios por biomassa seca

^b Porcentagem de proteína por biomassa seca

O conteúdo de lipídios de muitas microalgas é afetado pelos fatores nutricionais e ambientais (OLGUÍN *et al.*, 2001). A Intensidade luminosa é um fator ambiental importante que influencia no conteúdo de lipídios e na composição de ácidos graxos das células, devido ao seu efeito no fornecimento de energia ao

metabolismo fotossintético, bem como na ultraestrutura de organelas celulares onde os lipídios são um importante componente na composição de suas membranas (KHOTIMCHENKO & YAKOVLEVA, 2005).

De acordo com a Tabela 28, pode ser observado que o conteúdo total de lipídios parece ter aumentado a baixas intensidades luminosas ($I < 5$ klux) e reduzido a intensidades luminosas maiores ($I > 8$ klux). Nos cultivos com a intensidade luminosa a 5 klux, o teor de lipídios encontrado na biomassa final foi de 22,87 % (experimento 1, $T_a = 10$) e 23,41 % (experimento 2, $T_a = 16$). Nos cultivos com maior intensidade luminosa, como, por exemplo, 12,2 klux, observam-se uma redução nos teores de lipídios para 15,71 % (experimento 24, $T_a = 10$) e 16,08 % (experimento 16, $T_a = 16$).

Em cultivos de *Tichocarpus crinitus* sob baixas irradiâncias, 8-10 % de radiação fotossintética ativa (PAR) foi obtido um conteúdo relativamente maior de lipídios totais comparando com a biomassa exposta a alta irradiância, 70-80 % de PAR (KHOTIMCHENKO & YAKOVLEVA, 2005).

Resultados similares foram relatados para a alga vermelha *Grateloupia turuturu* (KHOTIMCHENKO, 2002), para microalga *Porphyridium cruentum* (KLYACHKO-GURVICH *et al.*, 1999) e *Dunaliella viridis* (GORDILLO *et al.*, 1998). Isso também foi observado por Olguín *et al.* (2001) estudando a composição da *S. platensis* cultivada em meio sintético e em meio complexo e submetida a diferentes intensidades luminosas, 66 e 122 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (5,5 e 12 klux).

M\u00fclhing *et al.* (2005) sugerem que nos cultivos de *Arthrospira* sp. a 20 °C, a irradiação superior a 60 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (5 klux) favorece a desnatura\u00e7\u00e3o dos \u00e1cidos graxos da membrana. Essa desnatura\u00e7\u00e3o pode ser explicada pela

danificação da membrana celular e/ou aparato fotossintético causado pelo efeito fotoinibitório.

Típico de cianobactérias, *Spirulina sp.* contém 6-13 % de lipídios, sendo que metade são ácidos graxos. Tatchareon *et al.* (1994) observaram que os lipídios e ácidos graxos de *Spirulina sp.* dependem da cepa e das condições do meio ambiente. Rafiikul *et al.* (2005), estudando as condições ambientais ótimas tais como luz, temperatura e pH obtidas por experimentos prévios em laboratório para a produção de biomassa de *Spirulina sp.*, observaram que o teor de lipídios totais de *S. platensis* é de 7,2 %. No entanto, a cepa de *S. platensis* utilizada no presente trabalho, apresentou teores de lipídios totais de 13-23 %, valores da mesma ordem de grandeza que aqueles obtidos por Danesi *et al.*, (2002), Danesi *et al.*, (2004) e Babadzhanov *et al.*, (2004).

Os teores de lipídios não apresentaram diferenças significativas nos diferentes tempos de alimentação, sob a mesma intensidade luminosa. Nos cultivos a 8 klux, as biomassas finais apresentaram de 16,29 a 18,91 % de lipídios nos diferentes tempos de alimentação, como apresentado na Tabela 28 (Experimentos 6, 8, 9 a 14 e 21). Isso indica que provavelmente não houve carência de nitrogênio durante os experimentos realizados, uma vez que os resultados obtidos foram da mesma ordem de grandeza do que aqueles em cultivos não limitados por nitrogênio (DANESI *et al.*, 2002; TORNABENE *et al.*, 1985).

A quantidade de nitrogênio total adicionada nos cultivos do presente trabalho é igual em todos os experimentos, e isso pode ter contribuído para a semelhança nos teores de lipídios nos diferentes tempos de alimentações estudados. Fidalgo *et al.* (1998) relataram que os lipídios presentes na microalga *Isochrysis galbana* podem ser utilizados como reserva de nitrogênio. No entanto, no presente estudo, o

nitrogênio fornecido nos cultivos limitados por luz não foi acumulado na forma de lipídios.

Autores como Piorreck *et al.* (1984), estudando diferentes níveis iniciais de fontes de nitrogênio, encontraram que em cultivos de *S. platensis* realizados sob limitação de nitrogênio ocorria uma diminuição do teor lipídico da biomassa. Nos cultivos com limitação de nitrogênio e luz em excesso resulta na limitação do crescimento, mas a síntese de compostos não nitrogenados continua, devido a fixação fotossintética do carbono. Com isso, a relação C/N na célula aumenta e a energia é direcionada para a síntese desses compostos não nitrogenados, na qual serve como reservatório do carbono fixado fotossinteticamente (ZHEKISHEVA *et al.*, 2002).

Assim como os lipídios, os teores de proteínas obtidos nas biomassas finais mostraram ser influenciados pela intensidade luminosa, independentemente do tempo de alimentação (Tabela 28). Nos cultivos submetidos a menores intensidades luminosas ($I \leq 5$ klux) houve um aumento no teor protéico, atingindo um máximo de 43 % (Experimento 2). Esse efeito também foi observado por Olguín *et al.* (2001) e Tadros *et al.* (1993).

Quigg & Beardall (2003) também observaram uma redução na quantidade de proteínas totais de 15,8 para 8,37 pg proteína célula⁻¹ em cultivos de *Dunaliella tertiolecta* sob 30 e 130 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (2,5 e 10,8 klux), respectivamente. Esses autores sugerem que essa microalga use diferentes estratégias de fotoaclimação, modificando as quantidades de lipídios, carboidratos e proteínas.

Syrett (1962) descreve que o nitrogênio assimilado pela microalga é utilizado primeiro para o crescimento celular, e, posteriormente para formação de nitrogênio orgânico como material de reserva. Similarmente, no presente trabalho, o nitrogênio

disponibilizado nos cultivos a menores intensidades luminosas ($I \leq 5$ klux) foi inicialmente utilizado no crescimento celular e, devido à limitação do crescimento celular pela baixa intensidade luminosa, uma parte do nitrogênio adicionado foi, provavelmente, convertido a nitrogênio orgânico na forma de proteína como uma fonte de reserva. Bermúdez *et al.*, (2004) observou que um acúmulo de proteína na microalga *Chroomonas ssp.* foi estimulado pela disponibilidade de nitrogênio no meio de cultivo.

6.3. Avaliação dos parâmetros cinéticos pelo modelo estatístico de regressão multivariável.

Os parâmetros cinéticos X_m (concentração celular máxima), P_x (produtividade em células) e $Y_{X/N}$ (fator de conversão de nitrogênio em células) dos experimentos de 1 a 24 foram avaliados por análises de regressão multivariáveis, com o objetivo de facilitar a compreensão da influência das variáveis independentes em estudo (tempo de alimentação e intensidade luminosa), nas respostas de interesse (variáveis dependentes).

Para cada variável dependente foi feita uma análise de regressão quadrática multivariável, onde foram consideradas as duas variáveis independentes codificadas (X_1 e X_2), bem como suas formas quadráticas e, suas interações, e, ainda, foi obtida uma equação referente a um modelo de superfície de resposta que mais se adequou aos resultados obtidos.

Junto às análises que foram realizadas, encontram-se os chamados níveis descritivos (p), que indicam os erros. Na análise de regressão, os valores de p indicam o menor erro em que se incorre ao afirmar que um determinado coeficiente associado a um determinado fator tem influência na determinação do parâmetro estimado. Em outras palavras, testando o coeficiente correspondente a uma variável independente é possível verificar se esta tem importância na determinação do parâmetro estimado. Na análise de variância da regressão, por sua vez, o valor de p indica se houve um bom ajuste da equação obtida através da regressão, ou seja, se a regressão realizada foi satisfatória (RODRIGUES, 1998).

Na análise de regressão, considerou-se $p = 0,1$ como o maior erro para o teste dos coeficientes angulares, desde que a consideração destes fatores levassem a um melhor ajuste do modelo, caracterizado pelo aumento do valor do coeficiente

de determinação da equação de ajuste (CARVALHO *et al.*, 2004). No entanto, na análise de variância da regressão o maior valor aceitável de p foi 0,05.

Os valores cinéticos de X_m (concentração celular máxima), P_x (produtividade em células) e $Y_{X/N}$ (fator de conversão de nitrogênio em células) estão apresentados na Tabela 29.

Tabela 29 - Valores de X_m (concentração celular máxima), P_x (produtividade em células) e $Y_{X/N}$ (fator de conversão de nitrogênio em células) relacionados com as variáveis independentes.

Experimento	X_1	X_2	X_m (mg/L)	P_x (mg/L.d)	$Y_{X/N}$ (mg/mg)
1	-1	-1	1139	84	3,6
2	1	-1	1149	73	3,7
3	-1	1	1796	125	5,8
4	1	1	1715	88	5,5
5	0	-1,414	736	53	2,3
6	-1,414	0	1111	106	3,5
7	0	1,414	1903	103	6,2
8	1,414	0	1633	88	5,3
9	0	0	1458	104	4,8
10	0	0	1380	99	4,6
11	0	0	1309	94	4,3
12	0	0	1404	100	4,7
13	0	0	1390	96	4,5
14	0	0	1517	86	4,9

Continuação da Tabela 28

Parte B: Testes adicionais para otimização do processo					
15	0	2	1636	106	5,3
16	1	1,414	1845	90	6,0
17	1	2	1924	104	6,2
18	1,414	2	1857	100	6,0
19	2	1,414	1697	82	5,5
20	2	2	1842	100	6,0
21	2	0	1561	84	5,0
22	-1,414	2	1434	126	4,6
23	-1	2	1527	114	4,9
24	-1	1,414	1562	116	5,0
Parte C: Experimentos para confirmação da otimização					
25	1,414	1,667	1742	94	5,6
26	1,414	1,667	1842	100	6,0
27	1,414	1,667	1750	94	5,6
28	1,414	1,667	1769	96	5,7
29	1,414	1,667	1745	94	5,6

X_1 = Valor codificado da variável tempo de alimentação (T_a)

X_2 = Valor codificado da variável intensidade luminosa (I)

6. 3. 1. Concentração celular máxima

Nas Tabela 30 e Tabela 31 estão apresentados os resultados da análise de regressão quadrática multivariável para concentração celular máxima (X_m) em função dos fatores estudados, bem como os resultados da análise de variância

dessa regressão, respectivamente. Essa regressão foi feita com os experimentos 1 a 24 (Tabela 9, partes A e B).

Tabela 30 - Análise da regressão multivariável para a concentração celular máxima (X_m) em função do tempo de alimentação e intensidade luminosa.

Fator	Coefficiente de regressão	Erro padrão	Valor de t	p
Constante	1482	37,98	39,02	0,0000
X_1	113,4	26,25	4,32	0,0004
X_2	320,7	34,78	9,22	0,0000
X_1^2	-40,71	22,41	-1,82	0,0852
X_2^2	-94,58	23,04	-4,10	0,006

R^2 ajustado= 0,8439

X_1 = Valor codificado da variável tempo de alimentação (T_a)

X_2 = Valor codificado da variável intensidade luminosa (I)

Tabela 31 - Análise de variância do modelo de regressão multivariável para concentração celular máxima (X_m).

Fator de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F – calculado	p
Modelo	1683836	4	420959	32,0879	0,0000
Erro	249260	19	13118,9		
Total	1933096	23			

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

$$X_m = 1482 + 113,4 X_1 + 320,7 X_2 - 40,71 X_1^2 - 94,58 X_2^2$$

Os resultados da Tabela 30 foram usados para estimar o efeito dos fatores avaliados na concentração máxima de biomassa. A partir das análises de regressão quadrática múltipla, observaram-se os níveis descritivos dos coeficientes e o coeficiente de determinação do modelo. No ajuste do modelo, eliminou-se o coeficiente de interação entre as variáveis independentes, pois este se mostrou não significativo ($p > 0,1$). A análise estatística (Tabela 30) mostra que a concentração celular máxima é uma função quadrática do tempo de alimentação e da intensidade luminosa. Também mostra que o modelo obtido explicou satisfatoriamente os resultados experimentais obtidos ($p < 0,0001$, Tabela 31).

Na Figura 1 pode ser confirmada a influência da iluminância e do tempo de alimentação no crescimento celular. De fato, as maiores concentrações celulares foram obtidas quando o cultivo foi submetido as maiores intensidades luminosas e tempos de alimentação (Tabela 29).

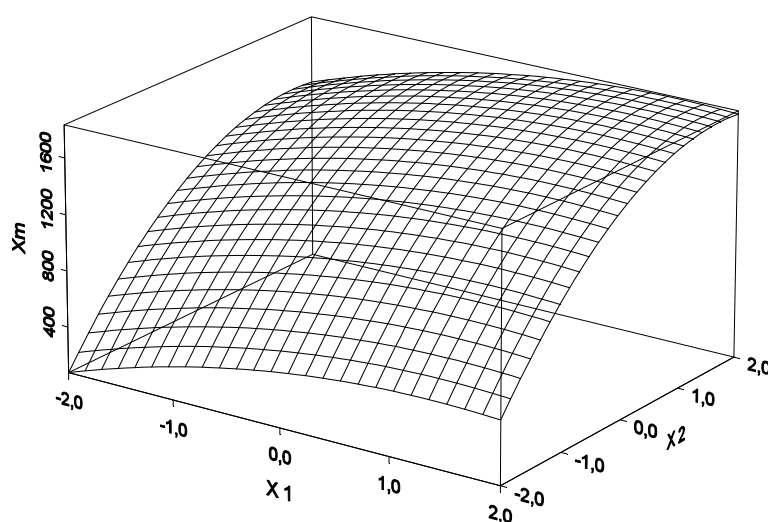


Figura 1. Superfície de resposta para a concentração celular máxima (X_m) em função dos valores codificados do tempo de alimentação (X_1) e da intensidade luminosa (X_2).

Observando os valores de X_m na Tabela 29, Parte A, nota-se que X_m aumenta com a intensidade luminosa (I) e o tempo de alimentação (T_a), o que foi comprovado por regressão múltipla, indicando que nessa faixa de estudo X_m apresentava-se como uma função linear crescente tanto de I como T_a (regressão não apresentada). De fato, a concentração celular máxima aumenta proporcionalmente com o tempo de alimentação e a intensidade luminosa, obtendo valores de 1715 mg/L (Experimento 4) e 1903 mg/L (Experimento 7) nos cultivos submetidos a 16 dias de alimentação e intensidade luminosa de 11 klux e com 13 dias de alimentação e intensidade luminosa de 12,2 klux, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Danesi *et al.* (2004) estudando o cultivo de *S. platensis* com utilização de uréia com fonte de nitrogênio sob intensidades luminosas de 2 e 5 klux.

Então, experimentos adicionais foram feitos com a finalidade de encontrar a condição ótima para a obtenção da concentração celular máxima, de acordo com a proposta de Fratelli *et al.* (2005). Esses experimentos podem ser melhor visualizados na Figura 7 do item 5.2, correspondendo aos experimentos 15 a 24 (Tabela 29, parte B). Com a realização destes experimentos, foi possível a obtenção de uma equação quadrática para expressar a relação entre X_m e as variáveis independentes estudadas, como se viu anteriormente (Tabelas 30 e 31).

A comparação entre os valores calculados pelo modelo e os valores experimentais demonstram uma boa relação do modelo (Figura 2) e conseqüentemente sua validação para estimar as condições ótimas para a produção de biomassa.

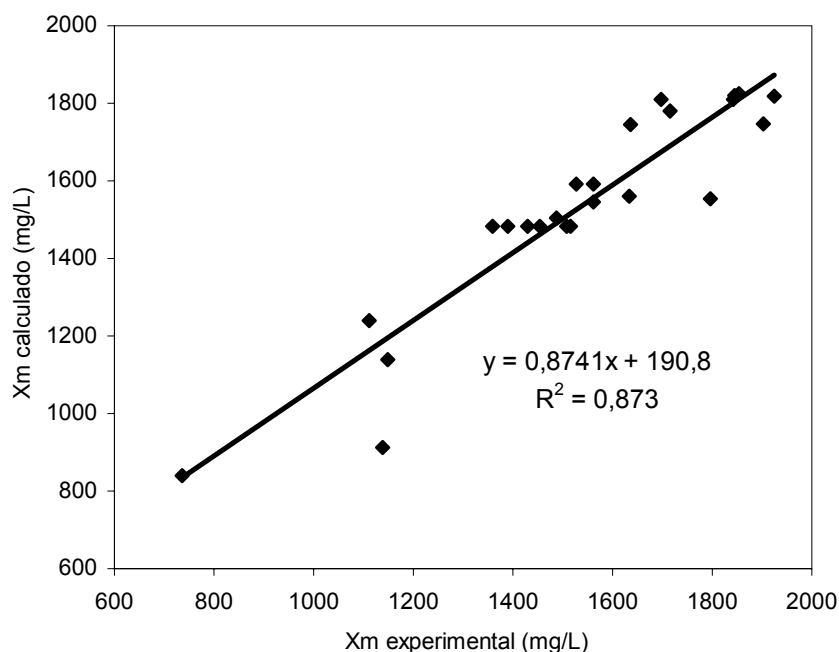


Figura 2. Relação linear entre os valores calculados e experimentais da concentração celular máxima (X_m) nos cultivos de *S. platensis*.

O valor da intensidade luminosa e do tempo de alimentação necessários para obter o valor da concentração celular máxima calculados pelo modelo é de 13 klux e 17,2 dias, respectivamente. Esse valor de intensidade luminosa está entre o valor de saturação luminosa para a produção autotrófica de *S. platensis* (CHOJNACKA & NOWORYTA, 2004).

O ponto ótimo de concentração celular máxima calculado pelo modelo foi de 1833 mg/L ($I = 13$ klux; $T_a = 17,2$ dias). Aplicando as condições experimentais ótimas obtidas pela metodologia de superfície de resposta, obteve-se uma concentração celular máxima experimental de $1771 \pm 2,3$ mg/L (Experimentos 25 a 29, Tabela 29, parte C), considerado satisfatório, uma vez que é apenas 3,4 % menor que o estimado pelo modelo.

6. 3. 2. Produtividade em células

Nas Tabelas 32 e 33 estão apresentados os resultados da análise de regressão quadrática multivariável para produtividade em células (P_x) em função dos fatores estudados, bem como os resultados da análise de variância dessa regressão, respectivamente.

Tabela 32 - Análise da regressão multivariável para a produtividade em células (P_x) em função do tempo de alimentação e intensidade luminosa.

Fator	Coefficiente de regressão	Erro padrão	Valor de t	p
Constante	95,67	2,06	46,45	0,0000
X_1	-8,57	1,37	-6,28	0,0000
X_2	16,25	2,10	7,74	0,0000
X_2^2	-4,94	1,40	-3,51	0,0022

R^2 ajustado = 0,8132

X_1 = Valor codificado da variável tempo de alimentação (Ta)

X_2 = Valor codificado da variável intensidade luminosa (I)

Tabela 33 - Análise de variância do modelo de regressão multivariável para produtividade em células (P_x).

Fator de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F – calculado	p
Modelo	5039,4	3	1679,8	34,37	0,0000
Erro	977,51	20	48,875		
Total	6016,96	23			

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

$$P_x = 95,67 - 8,57 X_1 + 16,25 X_2 - 4,94 X_2^2$$

De acordo com os níveis descritivos dos coeficientes obtidos na Tabela 2, observou-se que o efeito principal das variáveis independentes e o efeito quadrático da variável intensidade luminosa interferem na produtividade em células. O coeficiente quadrático da variável tempo de alimentação e o coeficiente de interação mostraram-se não significantes estatisticamente, apresentado um p de 0,2936 e 0,5371, respectivamente, sendo, portanto, retirados do modelo para um melhor ajuste da equação. O sinal negativo no coeficiente linear dessa variável significa que a produtividade diminui com o aumento do tempo de alimentação e o valor de p para essa variável é menor que 0,01%. Isso é justificado, pois quanto menor o tempo de alimentação maior é o fornecimento de nitrogênio. Então as células aproveitam da disponibilidade do nitrogênio e da luminosidade para se multiplicarem mais rapidamente. Sendo a produtividade inversamente proporcional ao tempo de cultivo, também corrobora para o efeito do tempo de alimentação na produtividade o fato dos cultivos alimentados por menores tempos de alimentação levarem ao término do cultivo em tempo mais curto. O mesmo foi observado por Carvalho *et al.* (2004) estudando diferentes tempos de alimentações e diferentes concentrações de nitrogênio inicial e final na forma de cloreto de amônio em cultivos de *S. platensis*.

O coeficiente quadrático da variável codificada X_2 (intensidade luminosa) é negativo, indicando que há um ponto máximo de produtividade em células entre as diferentes intensidades luminosas analisadas. Isso pode ser melhor observado na Figura de superfície de resposta (Figura 3).

O valor de R^2 ajustado da regressão (R^2 ajustado = 0,8132) indica ser o ajuste do modelo adequado aos dados experimentais.

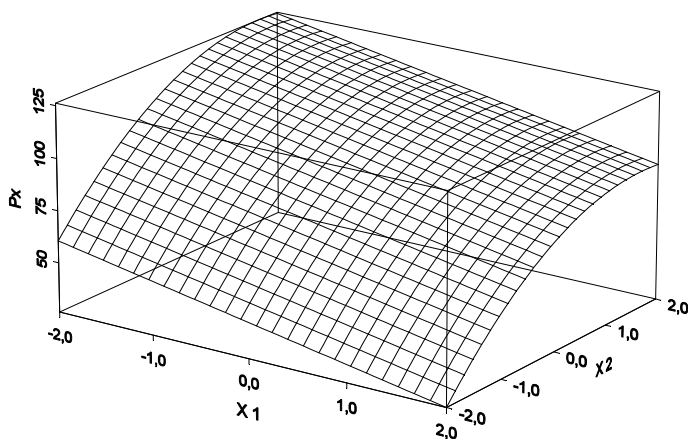


Figura 3. Superfície de resposta para a produtividade em células (P_x) em função dos valores codificados do tempo de alimentação (X_1) e da intensidade luminosa (X_2).

A relação entre os valores experimentais e calculados (Figura 4) mostrou-se satisfatória, apresentando um coeficiente de determinação de 83 %.

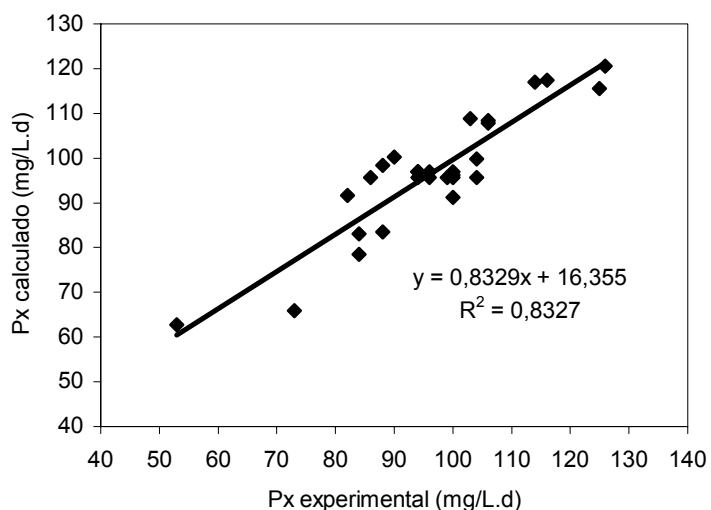


Figura 4. Relação linear entre os valores calculados e experimentais da produtividade em células (P_x) nos cultivos de *S. platensis*.

6. 3. 3. Fator de conversão de nitrogênio em células

Nas Tabelas 34 e 35 estão apresentados os resultados da análise de regressão quadrática multivariável para o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função dos fatores estudados, bem como os resultados da análise de variância dessa regressão, respectivamente.

Tabela 34 - Análise da regressão multivariável para o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função do tempo de alimentação e intensidade luminosa.

Fator	Coefficiente de regressão	Erro padrão	Valor de t	p
Constante	4,76	0,127	37,50	0,0000
X_1	0,39	0,088	4,424	0,0003
X_2	1,06	0,116	9,115	0,0000
X_1^2	-0,14	0,075	-1,867	0,0775
X_2^2	-0,31	0,077	-4,014	0,0007

R^2 ajustado = 0,8428

X_1 = Valor codificado da variável tempo de alimentação (Ta)

X_2 = Valor codificado da variável intensidade luminosa (I)

Tabela 35 - Análise de variância do modelo de regressão multivariável para o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$).

Fator de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F – calculado	p
Modelo	18,67	4	4,669	31,83	0,0000
Erro	2,787	19	0,146		
Total	21,46	23			

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

$$Y_{X/N} = 4,76 + 0,39 X_1 + 1,06 X_2 - 0,14 X_1^2 - 0,31 X_2^2$$

Para investigar o efeito das variáveis independentes e sua interação sobre o fator de conversão de nitrogênio em células, os termos insignificantes estatisticamente no modelo quadrático foram removidos a fim de se trabalhar com um modelo mais simples. Na Tabela 4 é apresentada a análise de regressão quadrática múltipla do modelo reduzido. Na Figura 55 pode ser visualizada a Figura que representa esse modelo.

Pela análise da regressão multivariável (Tabela 4), pode-se confirmar a influência da iluminância e do tempo de alimentação em $Y_{X/N}$ pela avaliação dos níveis descritivos ($p < 0,1$). Os valores negativos dos coeficientes associados aos termos quadráticos indicam que $Y_{X/N}$ é função quadrática de X_1 e X_2 , existindo um ponto ótimo das variáveis independentes para a obtenção do $Y_{X/N}$.

O fator de conversão de nitrogênio em células, da mesma forma que a concentração celular máxima e a produtividade, aumenta com o aumento da quantidade de energia fornecida ao cultivo. Por ser uma célula fotoautotrófica, a *Spirulina platensis* precisa de energia luminosa para se multiplicar. Como observado nos experimentos 1, 2 e 5, menores energias fornecidas pelas mais baixas luminosidades empregadas nos cultivos restringem as células de consumirem o nitrogênio disponível, levando a menores valores de $Y_{X/N}$ (Tabela 9). Pelo mesmo princípio, o $Y_{X/N}$ aumenta com o aumento da intensidade luminosa.

O perfil da relação entre $Y_{X/N}$ e as variáveis X_1 e X_2 (Figura 55) é muito semelhante ao perfil da relação entre X_m e essas variáveis independentes (Figura 51).

Essa similaridade já era esperada, pois o $Y_{X/N}$ é uma função de X_m (item 4.6.3.2), pois em todos os ensaios foi adicionada a mesma quantidade de nitrogênio.

Maior tempo de alimentação e maior intensidade luminosa proporcionam maiores valores de $Y_{X/N}$. Isso pode ser justificado porque quanto maior o tempo de alimentação, menor é a quantidade diária de NH_4^+ adicionada no cultivo e, em cultivos não limitados por luz, a célula aproveita a disponibilidade de NH_4^+ e energia para sua multiplicação, reduzindo a perda do nitrogênio na forma de NH_3 para a atmosfera.

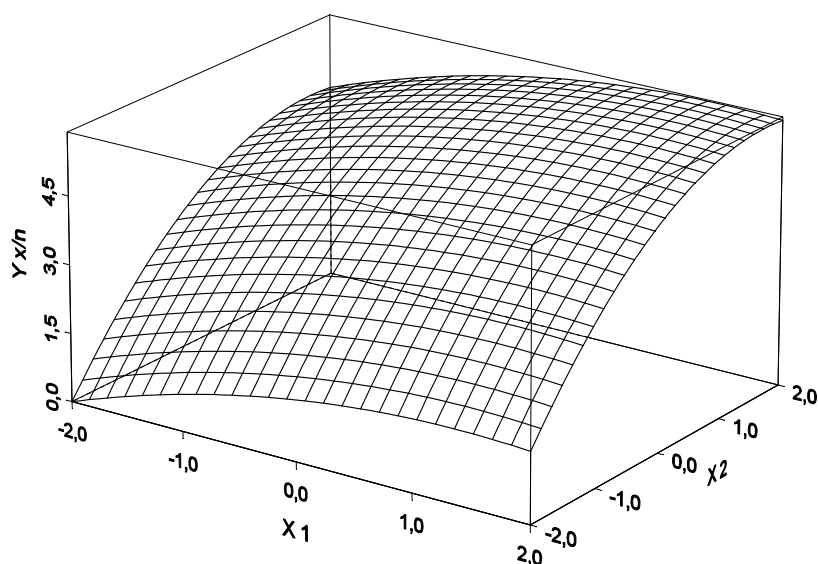


Figura 5. Superfície de resposta para o fator de conversão de nitrogênio em células em função dos valores codificados do tempo de alimentação (X_1) e da intensidade luminosa (X_2).

Da mesma forma que o X_m , o valor experimental do ponto ótimo de $Y_{X/N}$ encontrado é de $5,7 \pm 0,17$ mg/mg, no cultivo com tempo de alimentação de 17,2 dias e intensidade luminosa de 13 klux. Estes resultados são maiores que os obtidos

por Carvalho *et al.*, 2004, que obtiveram um $Y_{X/N}$ de 4,39 mg/mg em cultivos de *S. platensis* com 16 dias de tempo de alimentação e intensidade luminosa de 9 klux.

A relação entre os valores experimentais e calculados (Figura 6) mostrou-se satisfatória, apresentando um coeficiente de determinação de 79%.

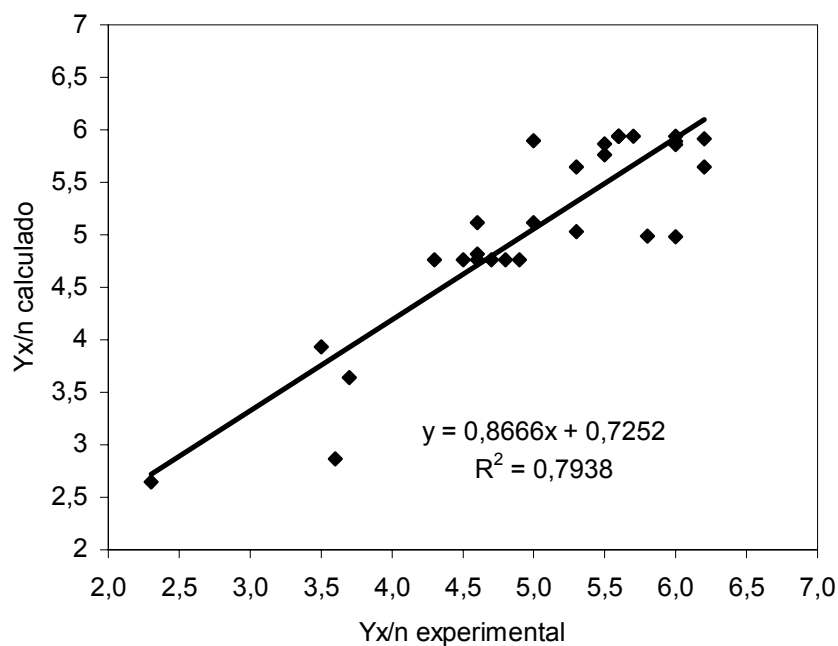


Figura 6. Relação linear entre os valores calculados e experimentais do fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) nos cultivos de *S. platensis*.

7. CONCLUSÕES

As variáveis tempo de alimentação (T_a) e a intensidade luminosa (I) influenciaram na obtenção da concentração celular máxima. O emprego do cloreto de amônio como fonte de nitrogênio pode ser uma alternativa viável para o cultivo de *S. platensis*.

Os teores de lipídios e proteínas obtidos nas biomassas finais foram influenciados pelas condições estudadas. Cultivos submetidos a menores intensidades luminosas conduziram a um aumento no conteúdo total de lipídios e de proteínas. No entanto, o tempo de alimentação parece não ter influenciado nos teores protéicos e lipídicos da biomassa.

Os cultivos submetidos a maiores intensidades luminosas e tempos de alimentação levaram a maiores concentrações celulares máximas e valores do fator de conversão de nitrogênio em células. No entanto, maiores produtividades foram alcançadas nos cultivos submetidos aos menores tempos de alimentação e maiores intensidades luminosas.

As regressões quadráticas das variáveis dependentes (concentração celular máxima, X_m ; produtividade em células, P_x ; fator de conversão de nitrogênio em células, $Y_{X/N}$) em função dos valores codificados do tempo de alimentação (X_1) e da intensidade luminosa (X_2) levaram a equações que explicaram satisfatoriamente os resultados experimentais. Os modelos matemáticos obtidos para esses parâmetros foram:

$$X_m = 1482 + 113,4 X_1 + 320,7 X_2 - 40,71 X_1^2 - 94,58 X_2^2$$

$$P_x = 95,67 - 8,57 X_1 + 16,25 X_2 - 4,94 X_2^2$$

$$Y_{X/N} = 4,76 + 0,39 X_1 + 1,06 X_2 - 0,14 X_1^2 - 0,31 X_2^2$$

As condições experimentais estimadas pelos modelos para maximização de X_m e $Y_{X/N}$ foram o tempo de alimentação de 17,2 dias e a intensidade luminosa de 13 klux, com valores dessas variáveis dependentes estimadas em 1833 mg/L e $Y_{X/N}$ 5,94 mg/mg, respectivamente. Os valores de X_m e $Y_{X/N}$ obtidos em experimentos realizados nas condições experimentais ótimas foram $1771 \pm 2,3$ mg/L e $5,7 \pm 0,17$ mg/mg, respectivamente, comprovando a aplicabilidade da metodologia de superfície de resposta nesse processo de otimização.

8. REFERÊNCIAS¹

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.

ANNAPURNA, V.V.; DEOSTHALE, Y.G.; BAMJI, M.S. *Spirulina* as a source of vitamin A. *Plant foods for human nutrition*, v.41, p.125-134, 1991.

ANUPAMA, P.R. Value-added food: single cell protein. *Biotechnology Advances*, v.18, p.459-479, 2000.

ARAÚJO, K.G.L.; FACCHINETTI, A.D.; SANTOS, C.P. Influência da ingestão de biomassas de spirulina (*Arthrospira* sp.) sobre o peso corporal e consumo de ração em ratos. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, v.23, n.1, 2003.

AYCHUNIE, S.; BELAY, A.; HU, Y.; BABA, T.; RUPRECHT, R. Inhibition of HIV-1 replication by an aqueous extract of *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*). International Association of Applied Algology, 7th International Conference. 16 april 1996, Knysna, South Africa. 1996.

BABADZHANOV, A.S; ABDUSAMATOVA N.; YUSUPOVA, F.M.; FAIZULLAEVA, N.; MEZHLYMYAN, L.G.; MALIKOVA, M.Kh. Chemical composition of *Spirulina platensis* cultivated in Uzbekistan. *Chemistry of Natural Compounds*, v.40, n.3, 2004.

BARÒ, N. C. **Estudi D'un Bucle di bioreactores pel desenvolupament d'un sistema de suport de vida biològic**. Tese de doutorado. Departament d' Enginyeria Química, Escola Técnica Superior d'Enginyeria. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, 2003.

BECKER, E.W.; VENKATARAMAN, L.V. Production and utilization of the blue-green alga *Spirulina* in India. *Biomass*, v. 4, n. 22, p.105-125, 1984.

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 & Francis, 1997. p.131-158.

BELAY, A.; OTA, Y.; MIYKAWA, K.; SHIMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *Journal of Applied Phycology*, v.5, n.2, p.235-241, 1993.

BELKIN, S.; BOUSSIBA, S. High internal pH conveys ammonium resistance in *Spirulina platensis*. *Biosource Technology*, v.38, p. 167-169, 1991.

BERMÚDEZ, J.; ROSALES, N.; LORETO, C.; BRICEÑO, B.; MORALES, E. Exopolysaccharide, pigment and protein production by the marine microalga *Chroomonas* sp. in semicontinuous cultures. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 20, p.179–183, 2004.

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

BINAGHI, L.; DEL BORGHI, A.; LODI, A.; CONVERTI, A.; DEL BORGHI, M. Batch ad fe-batch uptake of carbon dioxide by *Spirulina platensis*. *Process Biochemistry*, v.38, p.1341-1346, 2003.

BLINKOVA, L.P.; GOROBETS, O.B.; BATURO, A.P. Biological activity of *Spirulina*. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii*, v.2, p.114-118, 2001.

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

BORZANI, W. O método turbidimétrico na medida de concentrações e de velocidades de reprodução de microrganismos. *Revista de Microbiologia*. São Paulo, v.3, n.3, p.153-156, 1972.

BOUSSIBA, S. Ammonia uptake in the alkalophilic cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant and Cell Physiology*, Kyoto, v.30, p.303-308, 1989.

BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters**. John Wiley & Sons, New York, 1978.

BRANGER, B.; CADUDAL, J.L.; DELOBEL, M.; OUOBA, H.; YAMEOGO, P.; OUEDRAOGO, D.; GUERIN, D.; VALEA, A.; les personnels des CREN, ZOMBRE, C.; ANCEL, P. *Spirulina* as a food supplement in case of infant malnutrition in Burkina-Faso. *Archives de pédiatrie*, Paris, v.10, p.424-431, 2003.

Brasil, SVS/MS - Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico referente a Alimentos para Praticantes de Atividade Física. Portaria n ° 222, de 24 de março de 1998. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 25 de março de 1998. <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=56>. Acesso em 13 de setembro de 2006.

CARERI, M.; FURLATTINI, L.; MANGIA, A.; MUSC, M.; ANKLAM, E.; THEOBALD, A.; VON HOLST C. Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina pacifica* algae: a chemometric approach. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v.912, n.1, p.61-71, 2001.

CARVALHO, J.C.M.; FRANCISCO, F.R.; ALMEIDA, K.A.; SATO, S.; CONVERTI, A. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially-increasing feeding rate. *Journal of Phycology*, New York, v.40, p.589-597, 2004.

CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Fermentação descontínua alimentada. In: SCHMIDELL NETTO, W.; ALMEIDA-LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., coord. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p.205-218.

CASTENHOLZ, R.W. Subsection III, Order *Oscillatoriales*. In: STANLEY, J.T.; BRYANT, M.P.; PFENNING, N. AND HOLT, J.G. ed. **Bergey's manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: William and Wilkins, 1989. v.3, p.1771.

CERÓN GARCIA, M.C.; SÁNCHEZ MIRÓN, A.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J.M.; MOLINA GRIMA, E.; GARCIA CAMACHO, F. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum* Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. *Process Biochemistry*, v.40, n.1, p.297-305, 2005.

CHAMORRO, G.; SALAZAR, M.; ARAUJO, K.G.; DOS SANTOS, C.P.; CEBALHOS, G.; CASTILLO, L.F. Update on the pharmacology of *Spirulina* (*Arthrospira*), an unconventional food. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v.52, n.3, p.232-240, 2002.

CHAUMONT, D. Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. *Journal Applied Phycology*, v.5, p.593-604, 1993.

CHEN, F. & ZHANG, Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. *Enzyme and Microbial Technology*, v.20, p.221-224, 1997.

CHOI, S.L.; SUH, I.S.; LEE, C.G. Lumostatic operation of bubble column photobioreactors for *Haematococcus pluvialis* cultures using a specific light uptake rate as a control parameter. *Enzyme and Microbial Technology*, v.33, p.403-409, 2003.

CHOJNACKA, K. & NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, v.34, p. 461-465, 2004.

CHRONAKIS, I.S.; GALATANU, A.N.; NYLANDER, T.; LINDMAN, B. The behaviour of protein preparation from blue-green algae (*Spirulina platensis* strain Pacifica) at the air/water interface. *Colloid Surfaces A*, v.173, p.181-192, 2000.

CHUNTAPA, B.; POWTONGSOOK, S.; MENAAVETA, P. Water quality control using *Spirulina platensis* in shrimp culture tanks. *Aquaculture*, v.220, p.355-366, 2003.

CIFERRI, O.; TIBONI, O. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. *Annual Review of Microbiology*, v.39, p.503-526, 1985.

CLÉMENT, G.; GIDDEY, C.; ET MENZI R. Amino Acid Composition and Nutritive Value of the Alga *Spirulina maxima*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.18, p.497-501, 1967.

COHEN, Z. The chemical of *Spirulina*. In: VONSHAK, A., ed. ***Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology***. London: Taylor and Francis, 1997. p.175-204.

COHEN, Z. V.; NORMANN, H. A.; HEIMER, Y. Potencial Use of Substituted Pyridazinones for Selecting Polysaturated Fatty Acid Overproducing Cell Lines of Algae, *Phytochemistry*, v.33, n.2, p.259-264, 1993.

COHEN, Z.; VONSHAK, A.; RICHMOND A. Fatty acid composition of *Spirulina* strains grown under various environmental conditions. *Phytochemistry*, v.26, p.2255-2258, 1987.

CORNET, J.F. A structured Model for Simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in Photobioreactors: II. Identification of kinetic parameters under light and mineral limitations. *Biotechnology and Bioengineering*, v.40, p.526-834, 1992.

CORNET, J.F.; DUSSAP, C. G.; GROS, S. B. Kinetics and energetics of Photosynthetic microorganisms in photobioreactors. Application to *Spirulina* growth. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. v.59, p.155-223, 1998

D'ANJOU, M.C. & DAUGULIS, A. Mixed-feed exponential feeding for fed-batch culture of recombinant methylotrophic yeast . *Biotechnology Letters*, v.22, p.341-346, 2000.

DANESI, E.D.G. **Cultivo de *Spirulina platensis* por processo descontínuo para obtenção de clorofila.** Dissertação de doutorado, Faculdade de Ciência Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2001.

DANESI, E.D.G.; RANGEL-YAGUI, C.O.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass & Bioenergy*, v.23, p.261-269, 2002.

DANESI, E.D.G.; RANGEL-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 & Bioenergy*, v.26, p.329-335, 2004.

DE CAIRE, G.Z.; DE CANO, M.S.; DE MULE, M.C.Z.; DE HALPERIN, D.R.; GALVAGNO, M.A. Action of cell-free extracts and extracellular products of *Nostoc muscorum* on growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phyton (Buenos Aires)*, v.47, n.1-2, p.43-46, 1987.

DE CANO, M.S.; DE CAIRE, G.Z.; DE MULE, M.C.Z.; DE HALPERIN, D.R. Inhibition of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* by phenolic compounds from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *Journal of Applied Phycology*, v.2, p.79-81, 1990.

DILLON, J.C. & PHAN, P.A. *Spirulina* as source of protein in human nutrition. *Bulletin of the Institute of Oceanography*, v.12, p.103-107, 1993.

DILLON, J.C.; PHUN, A.P.; DUBACQ, J.P. Nutritional Value of the Alga *Spirulina*. *World Review of Nutrition and Dietetics*, v.77, p.32-46, 1995.

DURAND-CHASTEL, H. Production and use of *Spirulina* in Mexico. In: SHELEF, G.; SOEDER, C.J., eds. **Algae biomass: production and use**. Amsterdam: Elsevier; New York: North Holland Biochemical Press, 1980. p.51-64. (International Symposium on the Production and Use of Micro-algae Biomass, 1978, Acre - Israel).

ESTRADA, J.E.; BESCOS, P.; VILLAR DEL FRESNO, A.M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina plantensis* protean extract. II *Farmaco*, Pavia, v.56, p.497-500, 2001.

FAINTUCH, B. L. **Análise comparativa da produção de biomassa a partir de três cianobactérias empregando distintas fontes nitrogenadas.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. São Paulo, 1989

FAROOQ, S.M.; ASOKAN, D.; KALAISELVI, P.; SAKTHIVEL, P.; VARALAKSMI, P. Prophylactic role of phycocyanin: a study of oxalate mediated renal cell injury. *Chemico-Biological Interactions*, Amsterdam, v.149, n.1, p.1-7, 2004.

FERRAZ, C. A. M. Produção de *Spirulina maxima*: Influência de ecofatores e uso de um sub produto da indústria alcooeira. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.17, n.1, p.70-4, 1986.

FIDALGO, J.P.; CID. A.; TORRES. E.; SUKENIK, A.; HERRERO, C. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*, v. 166, p.105 – 116, 1998.

FRATELLI, F., SIQUINI, T.J., PRADO, S.M.A., HIGASHI, H.G., CONVERTI, A.; CARVALHO, J.C.M. Effect of Medium Composition on the Production of Tetanus Toxin by *Clostridium tetani*. *Biotechnology Progress*, v.21, n.3, p. 756 - 761, 2005.

FUKINO, H.; TAKAGI, Y.; YAMANE, Y.; KAGAKU, E. Effect of *Spirulina* on the renal toxicity induced by inorganic mercury and cisplatin. *Eisei Kagaku*, v.36, n.5, 1990.

FUNTEU, F.; GUËT, C.; WU B.; TREMOLIERES, A. Effects of environmental factors on the lipid metabolism in *Spirulina platensis*. *Plant physiology and biochemistry*, v. 35, n. 1, p. 63-71, 1997.

GARCÍA-MALEA, M.C.; ACIÉN, F.G.; FERNÁNDEZ, M.C.; MOLINA, E. Continuous production of green cells of *Haematococcus pluvialis*: Modeling of the irradiance effect . *Enzyme and Microbial Technology*, v.38, n.7, p.981-989, 2006.

GEITLER, L. Cyanophyceae. In: RABENHORST, L. ed. **Kryptogamenflora Deutschland, österreich und der Schweiz.** Leipzig: Akad. Verlag, 1932. p.916.

GIOIELLI, J.A. **Modificação Industrial de óleos e gorduras.** Curso de pós-graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, São Paulo, 1997.

GOMES-CORONADO, D.J.; IBANEZ, E.; RUPEREZ, F.J.; BARBAS, C. Carotenoids and Tocopherol measurement in edible products of vegetable origin. *Journal Chromatography A*, v.1054, n.1-2, p.227-233, 2004.

GOMONT, M. Monographie des *Oscillariées*. *Annual Sciences Naturelles-Botanique et Biologie Vegetale*, v.15, p.263, 1892.

GORDILLO, F.J.L.; JIMÉNEZ, C.; FIGUEROA, F.L.; XAVIER NIELL, F. Effects of increased atmospheric CO₂ and N supply on photosynthesis, growth and cell composition of the cyanobacterium *Spirulina platensis* (*Arthrospira*). *Journal of Applied Phycology*, v.10, p. 461 – 469, 1999.

GREGERSEN, L.; JORGENSEN, S.B. Supervision of fed-batch fermentations. *Canadian Journal of Chemical Engineering*, v.75, p.69 - 76, 1999.

GUGLIELMI, G., RIPPKA, R.; TANDEAU DE MARSAC, N. Main properties that justify the different taxonomic position of *Spirulina* spp and *Arthrospira* spp. among Cyanobacteria. *Bulletin of the Institute of Oceanography*, v.12, p.13, 1993.

GUIRY, M.D.; BLUNDEN, G. **Seaweed Resources in Europe: Uses and Potential**. England: John Wiley & Sons, Ltd., 1991.

HATTORI, A. & MYERS, J. Reduction of nitrate and nitrite by subcellular preparations of *Anabaena cylindrica*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.8, p.327-337, 1967.

HERRERO, M.; IBÁÑEZ, E.; SIÑORÁNS, J.; CIFUENTES, A. Pressurized liquid extracts from *Spirulina platensis* microalga determination of their antioxidant activity and preliminary analysis by micellar eletrokinetic chromatography. *Journal Chromatography A*, v.1047, p.195-203, 2004.

HIRANO, M.; MORI, H.; MIURA, Y.; MATSUNAGA; NAKAMURA, N. γ -Linolênic acid production by microalgae. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.24/25, p.183-191, 1990.

HIRATA, T.; TANAKA, M.; OOIKE, M.; TSUNOMURA, T.; SAKAGUCHI, M. Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, v.12, p.435 – 439, 2000.

HO, C.T. Phenolic compounds in food: an overview. In: HUANG, M.T.; HO, C.T.; LEE, C.Y. Ed. **Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health. II**. Washington: American Chemical Society (ACS Symposium Series, 507), p.2-7, 1992.

HUNG, C.C.; WONG, G.T.F.; LIU, K.K.; SHIAH, F.K.; GONG, G.C. The effects of light and nitrate levels on the relationship between nitrate reductase activity and NO₃⁻ uptake: field observations in the East China Sea. *Limnology and Oceanography*, v.45, n.4, p.836-848, 2000.

ILTS, A. Ecologie de *Spirulina platensis* dans le milieux natronés d'Afrique Sahélienne. In: MATTERASI, F. **Prospettive dekka ciltura di Spirulina in Italia**. Firenze. Att. 1980. p.41 - 48.

IONOV, V.A. & BASOVA, M.M. Use of blue-green micro-seaweed *Spirulina platensis* for the correction of lipid and hemostatic disturbances in patients with ischemic heart disease. *VOPROSY Pitaniia*, v.72, n.6, p.28-31, 2003.

IQBAL, C.H. & ZARFAR, S.I. Effects of photon flux density, CO₂, aeration rate, and inoculum density on growth and extracellular polysaccharide production by *Porphyridium cruentum*. *Folia Microbiologica*, v.38, n.6, p.509-514, 1993.

JIMENEZ C.; COSSO B.R.; LABELLA D.; XAVIER NIELL F. **The Feasibility of industrial production of Spirulina (Arthrospira) in Southern Spain**. *Aquaculture*, v. 217, n. 1, p. 179 – 190, 2003.

Join FAO/WHO/UNU Expert Consultation: Energy and Protein Requirements. Tech Rep Ser WHO, p. 724, 1985.

KAPLAN, A.; REINHOLD, L. CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular*, v.50, p.539–570, 1999.

KATAOKA, et al. Glycolipids isolated from *Spirulina*. *Agricultural and Biological Chemistry*, v.47, n.10, 2349 - 2355, 1983.

KATES, M., HAGEN, P.O. Influence of temperature of fatty acid composition of Psychrophilic and Mesophilic *Serratia* species. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v.42, p.481-488, 1964.

KEBEDE, E. Response of *Spirulina platensis* (*Arthrospira fusiformis*) from Lake Chitu Ethiopia, to salinity stress from sodium salts. *Journal Applied Phycology*, v.9, p.551-558, 1997.

KEHRER, J.P & SMITH, C.V. Free radical in biology: sources, reactivities, and roles in the etiology of human disease. In: Frei B. Ed. **Natural Antioxidants in Human Health and Disease**. San Diego:Academic Press, 1994. p.25-62.

KENNEDY, M.J.; READER, S.L.; DAVIES, R.J. .Fatty acid production characteristics of fungi with particular emphasis on gamma linolenic acid production. *Biotechnology and Bioengineering*, v.42, p.625-624, 1993.

KHOTIMCHENKO, S. Fatty acid composition of marine algae from habitat with different solar irradiance. *Russian Journal of Marine Biology*, v.28, 232–234, 2002.

KHOTIMCHENKO, S.V.; YAKOVLEVA, I.M. Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. *Phytochemistry*, v.66, p.73–79, 2005.

KLYACHKO-GURVICH, G.; TSOGLIN, L.; DOUCHA, J.; KOPETSKII, J.; SHEBALINA, I.; SEMENENKO, V. Desaturation of fatty acids as an adaptive response to shifts in light intensity. *Plant Physiology*, v.107, p.240 – 249, 1999.

KOBAYASHI, M.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N.; NAGAI, S.; KUKIMURA, Y.; TSUJI, Y. Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.48, p.351 - 356, 1997.

KULIK, M.M. The potential for using cyanobacteria (blue-green algae) and algae in the biological control of plant pathogenic bacteria and fungi. *European Journal of plant Pathology*, v.101, p.585 – 599, 1995.

LEDUY A.; THERIEN, N. An improved method for optical density measurement of the semicroscopic blue algae *Spirulina maxima*. *Biotechnology and Bioengineering*, v.19, p.1219 - 1224, 1977.

LI, D.M. & QI, Y.Z. *Spirulina* industry in China: Present status and future prospects. *Journal of Applied Phycology*, v. 9, p.25–28, 1997.

LI, Z.Y.; GUO, S.Y.; LI, L. Bioeffects of selenite on the growth of *Spirulina platensis* and its biotransformation. *Bioresource Technology*, v.89, p.171 - 176, 2003.

LOMAS, M.W. Does urea-carbon contribute significantly to *Aureococcus anophagefferens* carbon nutrition? "inpress", In: STEIDINGER, K.A.; LANDSBERG, J.H.; TOMAS, C.R.; VARGO, G.A. eds Harmful Algae, Amsterdam, 2002, Florida Fish and wildlife conservation commission, Florida Institute of Oceanography, and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO. 2003.

LONG, S.P.; HUMPHRIES, S.; FALKOWSKI, P.G. Photoinhibition of Photosynthesis in Nature. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v.45, p.633-662, 1994.

LU, C. & VONSHAK, A. Effects of salinity stress on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. *Physiologia plantarum*, v.114, p. 405–413, 2002.

MANNING, T.M.; WILSON, S.P.; CHAPMAN, J.C. Toxicity of chlorine and other chlorinated compounds to some Australian aquatic organisms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. v.56, p.971–976, 1996.

MCKASLE, A. Human utilization of algal biomass from *Spirulina*. www.ag.arizona.edu/azaqua/algaeclass/spiro2.htm. Acesso em 23 de maio de 2006.

MENDES, R.L.; NOBRE, B.P.; CARDOSO, M.T.; PERREIRA, A.P.; PALAVRA, A.F. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorganic Chimica Acta*, v.356, p.328-334, 2003.

MIKI, W. Biological functions and activities of animal carotenoids. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, v.63, p.141-146, 1991.

MIRANDA, M.S.; CINTRA, R.G.; BARROS, S.B.; MANCINI FILHO, J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.31, n.8, p.1075-1079, 1998.

MITSUDA, H. Utilization of *Chorella* for food. In: Internacional Congress of Science and Technology, London, 1962.

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, p.535-547, 2001.

MÜHLING, M.; BELAY, A.; WHITTON, B.A. Variation in fatty acid composition of *Arthrospira* (*Spirulina*) strains. *Journal of Applied Phycology*, v.17, p.137–146, 2005

NAGAOKA, S.; SHIMIZU, K.; KANEKO, H.; SHIBAYAMA, F.; MORIKAWA, K.; KANAMARU, Y.; OTSUKA, A.; HIRAHASHI, T.; KATO, T. A Novel Protein C-Phycocyanin Plays a Crucial Role in the Hypocholesterolemic Action of *Spirulina platensis* Concentrate in Rats. *Nutrition Journal*, v.135, n.10, p.2425-2430, 2005.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagenics in food. *Critical reviews in food science and nutrition*, v.29, p. 273-300, 1990.

NURDOGAN, Y. & OSWALD, W.J. Enhanced nutrient removal in high-rate ponds. *Water Science and Technology*, v. 31, n.12, p. 33 – 43, 1995.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. Williams, S. (editor). Association of official analytical chemistry Inc., 14 th edition, Arlington, 1141p., 1984.

OLGUÍN, E.J. Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnology advances*, v. 22, p. 81-91, 2003.

OLGUÍN, E.J.; GALICIA, S.; HERNÁNDEZ, E. ANGULO, O. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. growth on pig waste. *Bioresource Technology*, v. 77, p. 19 - 24, 2001.

OLGUÍN, E.J.; GALICIA, S.; MERCADO, G.; PÉREZ, T. Annual productivity of *Spirulina* (*Arthrospira*) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process, under tropical conditions. *Journal Applied Phycology*, v.15, p.249 - 257, 2003.

OLGUÍN. E.J. The cleaner production strategy applied to animal production. In: OLGUÍN. E.J.; SÁNCHEZ, G.; HERNÁNDEZ, E. Eds. **Environmental biotechnology and cleaner bioprocesses**. Taylor & Francis, London, p. 227-241, 2000.

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

PAOLETTI, C.; PUSHPARAJ, B.; TOMASELLI, L. Ricerche swulla nutrizione minerale di *S. platensis*. In: **Atti Congr. Naz. Soc. Ital. Microbiol.**, Padova, v.17, 1975.

PAOLETTI, C.; VICENZINI, M.; BOCCI, F. Composizione bichimica generale delle biomasse di *Spirulina platensis* e *Spirulina maxima*. eds. In: MATERASSI, R. *Prospettive della Ricerche*. Accademia Del Oceanografic, Firenze, p.111-115, 1986.

PARADA, J.L.; CAIRE, G.Z.; MULE, M.C. Z.; CANO, M.M.S. Lactic acid bacteria growth promoters from *Spirulina platensis*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 45, p. 225 – 228, 1998.

PARIKH, P.; MANI, U.; IYER, U. Role of *Spirulina* in the Control of Glycemia and Lipidemia in Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal Medicinal Food*, v.4, n.4, p.193-199, 2001.

PELIZER, L.H.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S.; MORAES, I.O. *Spirulina platensis* growth estimation by pH determination at different cultivations conditions. *Electronic Journal of Biotechnology* [on line], v.5, n.3, p.251-257, 2002. <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol5/issue3/full/8/8.pdf>

PELIZER, L.H.; DANESI, E.D.G.; RANGEL, C.O.; SASSANO, C.E.N.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S.; MORAES, I.O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. *Journal of Food Engineering*, v.56, p.371 - 375, 2003.

PELIZER, L.H.; SASSANO, C.E.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S.; GIOIELLI, L.A.; MORAIS, I.O. Padronização do método de secagem da biomassa de *Spirulina platensis*. *Revista de Farmácia e Bioquímica*, v.32, n.1, p.37-40, 1999.

PHAM QUOC, K.; 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, p.237-246, 1997.

PIERCE, W. C.; HAENISCH, E. L. **Quantitative Analysis**, 3ed., John Willey & Sons Inc., New York. 1948.

PINTO, L.S.; VIERA, L.M.; PONS, M.N.; FONSECA, M.M.R.; MENEZES, J.C. Monitorização de Processos Biológicos: III. Análise Digital de Imagem. Boletim de Biotecnologia. http://dequim.ist.utl.pt/bbio/70/pdf/Analise_Digital_de_Imagem.pdf. Acessado em 26 de setembro de 2005.

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, p.207-216, 1984.

POWELL, R.C.; NEVELS, E.M. & McDOWELL, M.E. Algae feeding in humans. *Nutrition Journal*, v.75, p.7-12, 1961.

PRATT D.E. Natural antioxidants from plant material. In: HUANG M.T.; HO C.T.; LEE C.Y. ed. **Phenolic Compounds in Food and their Effects on Health. II**. American Chemical Society, Washington (ACS Symposium Series, 507)., p. 54-71, 1992.

PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.57, p.287–293, 2001.

PUSTIZZI, F.; MACINTYRE, H.; WARNER, M.E.; HUTCHINS, D.A. Interaction of nitrogen source and light intensity on the growth and photosynthesis of the brown tide alga *Aureococcus anophagefferens*. *Harmful algae*, v.3, n.4, p.343-360, 2004.

QUIGG, A.; BEARDALL, J. Protein turnover in relation to maintenance metabolism at low photon flux in two marine microalgae *Plant, Cell and Environment*, v.26, p.693-703, 2003

RAFIQUL, I.M.; JALAL, K.C.A.; ALAM, M.Z. Environmental Factors for Optimisation of *Spirulina* Biomass in Laboratory Culture. *Biotechnology*, v.4, n.1, p.19-22, 2005.

RAMÍREZ, M.E.; OLGUÍN, E.J.; GUITIÉRREZ, M.; SALAZAR, M. The effect of nitrogen concentration on the flotation capacity of *Spirulina* sp. In: PICCARDI, R.; MATERASSI, R.; TREDICI, M.R. Eds. Proceedings of the 8th International Conference on Applied Algology. Montecatini Terme (Italy): Università degli Studi di Firenze, p.27, 1999.

RANGEL-YAGUI, C.A.; 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, p. 133-141, 2004.

REDDY, C.M.; BHAT, V.B.; KIRANMAI, G.; REDDY, M.N.; REDDANNA, P.; MADYASTHA, K.M. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by Cphycocyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.277, p.599-603, 2000.

RICHMOND, A. Open system for the mass production of photoautotrophic microalgae outdoors: physiological principles. *Journal Applied Phycology*, v.4, p.281-286, 1992.

RICHMOND, A.; In: BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. (Eds.) *Micro-Algae Biotechnology*, Cambridge University Press, 1989.

RICHMOND, A.; QUIANG, H. Principles for efficient utilization of light for mass production of photoautotrophic microorganisms. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v.63-65, p.649-658, 1997.

RICHMOND, T.; LICHTENBERG, B.; STAHL, B.; VONSHAK, A. Quantitative assessment of the major limitations on productivity of *Spirulina platensis* in open raceways. *Journal Applied Phycology*, Dordrecht, v.2, p. 195-206, 1990.

RIPPKA, R.; WATERBURY, J.B.; STANIER, R.Y. Provisional generic assignments for Cyanobacteria in pure culture. In: STARR, M.P.; STOLP, H.; TRUPER, H.G.; BALOWS, A.; SCHLIGEL, H.G. ed. **The Prokaryotes**, Berlin: Springer-Verlag, v.1, p.247, 1981.

RODRIGUES, A. Contribuição ao estudo do processo descontínuo alimentado de fermentação alcoólica. São Paulo, 1998. 171p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

RUSSEL, J.B. **Química geral**. McGraw-Hill do Brasil, São Paulo, 1982.

SAKATA, K., YAMAMOTO, K.; WATANABLE, N. Antioxidative compounds from marine organisms. In: HO, C.T.; OSAWA, T.; HUANG, M.T. & ROSE, R.T. Ed. **Food Phytochemicals for Cancer Prevention. II**. American Chemical Society (ACS Symposium Series 547), Washington, p. 165-182, 1992.

SALAZAR, M.; MARTÍNEZ, E.; MADRIGAL, E.; RUIZ, L.E.; CHAMORRO, G.A. Subchronic toxicity study in mice fed *Spirulina maxima*. *Journal of Ethnopharmacology*, Lausanne, v.62, p.235-241, 1998.

SAMSON, R. & LEDUY, A. Biogas production from anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algal biomass *Biotechnology and Bioengineering*, v.24, p.1919-1924, 1982.

SAMUELS, R.; MANI, U.V.; IYER, U.M.; NAYAK, U.S. Hypocholesterolemic effect of spirulina in patients with hyperlipidemic nephrotic syndrome. *Journal of medicinal food*, Larchmont, v.5, n.2, p.91-96, 2002.

SÁNCHEZ, M.; BERNAL-CASTILHO, J.; ROZO, C.; RODRÍGUEZ, I. *Spirulina* (Arthrospira): An edible microorganism. A review. *Revista de la Facultad de Ciencias*, v. 8, n.1, 2003. www.javeriana.edu.co/universitas_scientiarum/vol8n1. Acesso em 13 de julho de 2005.

SANCHEZ-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*, Seattle, v.31, n.3-4, p.237-245, 2004.

SANSAWA, H. & ENDO, H. Production of intracellular Phytochemicals in *Chlorella* under heterotrophic Conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Osaka, v.98, n.6, p.437-444, 2004.

SASSANO, C.E.N. **Cultivo de *Spirulina platensis* por proceso contínuo utilizando cloreto de amônio como fonte de nitrogênio**. São Paulo, 2004, 116p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo

SASSANO, C.E.N. **Influência da uréia no crescimento e no teor do ácido graxo γ -linolênico na biomassa de *Spirulina platensis***. São Paulo, 1999. 144p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

SCHELDEMAN, P.; BAURAIN, D.; BOUHY, R.; SCOTT, M.; MÜHLING, M.; WHITTON, B.A.; BELAY, A.; WILMOTTE, A. *Arthrospira* ('*Spirulina*') strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed spacer. *FEMS Microbiology Letters*, v.172, n.2, p.213-222, 1999.

SCHLÖSSER, U.G. Sammlung von Algenkulturen. *Berlin Deutsche Botanische Gesellschaft*, v.95, p.181-276, 1982.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA / MINISTÉRIO DA SAÚDE, Portaria nº 222, de 24 de março de 1998 www.e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php 56 - 39k

SEDYKH, E.M.; LYABUSHEVA, O.A.; TAMBIEV, A.K.; BANNYKH L.N. Determination of the Elemental Composition of Cyanobacteria Cells and Cell Fractions by Atomic Emission and Atomic Absorption Spectrometry. *Analytical Chemistry*, v.60, n.1, p.29-33, 2005.

SHIMAMATSU, H. Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. *Hydrobiologia*, v.512, p.39-44, 2004.

SINGH, S.C.; SINHA, R.P.; HÄDER, D.P. Role of Lipids and Fatty Acids in Stress Tolerance in Cyanobacteria. *Acta Protozoologica*, v.41, p. 297 – 308, 2002.

SOLORZANO, L. Determination of ammonia in natural waters by the phenol hypochloride method. *Limnology and Oceanography*, v.14, p.799-801, 1969.

SPECKTOROVA, L.; LEROY CRESWELL, R.; VAUGHAN, D. Closed tubular cultivators: an innovative system for commercial culture of microalgae. *Journal of the World Aquaculture Society*, v.28, p.39-43, 1997.

STANCA, D.; POPOVIC, E. Urea as nitrogen source in modified zarrouk medium. *Review Roumain de Biologie Animals*, v.41, n.1, p.25-31, 1996.

SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S.V.; REDDY, M.C.; MALLIKARJUNA REDDY, M.; RACHAMALLU, A.; REDDANNA, P. Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Biochemical Pharmacology*, Oxford, v.68, n.3, p.453-62, 2004.

SUETSUNA, K.; CHEN, J.R. Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. *Marine Biotechnology*, v. 3, n.4, p.305-309, 2001.

SYRETT, P.J. Nitrogen assimilation. In: **Physiology and Biochemistry**. Ed. LEWIN, R.A. Academic press, New York and London, p. 171-187, 1962.

TADROS, M.G.; SMITH, W.; JOSEPH, B.; PHILLIPS J. Yield and quality of cyanobacteria – *Spirulina maxima* in continuous culture in response to light intensity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 39, p.337-347, 1993.

TAM, N.F.Y.; WONG, Y.S. Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. *Bioresource Technology*, v.57, p.54-50, 1996.

TAM, N.F.Y.; WONG, Y.S. The comparison of growth and nutrient removal efficiency of *Chlorella pyrenoidosa* in settle and activated sewages. *Environmental Pollution*, v.65, p.93-108, 1990.

TANTICHAROEN, M.; REUNGJITCHACHAWALI, M.; BOONAG, B.; VONKTAVEESUK, P.; VONSHAK, A.; COHEN, Z. Optimization of γ -linolenic acid

(GLA) production in *Spirulina platensis* *Journal of Applied Phycology*, v.6, n.3, p.295-300, 1994.

TOMASELLI, L. Morphology, Ultrastructure and Taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*) *maxima* and *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. In: VONSHAK, A., ed. ***Spirulina platensis* (*Arthrospira*): physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor and Francis, 1997. p.79-99.

TOMASELLI, L.; GIOVANNETTI, L.; TORZILLO, G. Physiology of stress response in *Spirulina* spp. In: DOUMENOE, F.; DURAND-CHASTEL, H. & TOULEMONT, A. Eds. ***Spiruline* Ague de Vie Salletin de Insitut Occeanographique**. Monaco, n.2, p. 65-75, 1993.

TORNABENE, T.G.; BOURNE, T.F.; RAZIUDDIN, S.; BEM-AMOTZ, A. Lipid and lipopolysaccharide constituents of cyanobacterium *Spirulina platensis* (*Cyanophyceae*, *Nostocales*). *Marine Ecology*, Progress Series v. 22, p. 121-125, 1985.

TORRE, P.; SASSANO, C.E.N.; SATO, S.; CONVERTI, A.; GIOIELLI, L.A.; CARVALHO, J.C.M. Fed-batch addition of urea for *Spirulina platensis* cultivation: thermodynamics and material and energy balances. *Enzyme and Microbiology Technology*, v.33, p.698-707, 2003.

TORRES, C.G. **Influência da concentração de nitrogênio na produção de lipídios e ácido gama-linolênico em *Spirulina maxima***. Mestrado do curso de Pós-graduação em Ciências de Tecnologia de Alimentos (UFRJ), p.77, 1994.

TORZILLO, G.; VONSHAK, A. Effect of light and temperature on the photosynthetic activity of cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, Aberdeen, v.6, p.399-403, 1994.

TREDICI, M.; CHINI ZITELLI, G.; BIAGIOLINI, S.; MATERASSI, R. Novel photobioreactors for the mass cultivation os *Spirulina* spp. *Bulletin of the Institute of Oceanography and Fisheries*. Monaco, v.12, p.89-96, 1993.

TSUKADA, O.; KAWAHARA, T.; MIYACHI, S. Mass culture *Chlorella* in Asian coutris. In: MITSUI, A.; MIYACHI, S.; SAN PIETRO, A.; TAMURA, S. Eds. **Biological Solar Energy Conversion**. Academic Press, New York, p.363-365, 1977.

VONSHAK, A. *Spirulina*: Growth, Physiology and Biochemistry. In: VONSHAK, A., ed. ***Spirulina platensis* (*Arthrospira*): physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor and Francis, p.43-66, 1997.

VONSHAK, A.; CHEUNG, S.M.; CHEN, F. Mixotrophic growth modifies the response of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* (Cyanobacteria) cells to light. *Journal Phycology*, v.36, p.675-679, 2000.

WADA, H.; WADA, N. Temperature-Induced Changes in the Fatty Acid Composition of the Cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803. *Plant Physiology*, v.92, n.4, p.1062-1069, 1990.

WANG, C.H.; LI, X.F.; JU, B.; OU, Y.F.; ZHOU, B.C. Studies on *Porphyridium cruentum* and its application. *Bulletin Marine Science*, v.17, n.3, p.79-84, 1998.

WARD, O. **Biotecnologia de la Fermentacion**. Zaragoza. Editorial Acribia, 1989.

WU, S.; YU, S.; LIN, L. Effect of culture conditions on docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp. S31. *Process Biochemistry*, Barking, (2005) *in press*.

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**. Paris, 1966. Dissertação de Doutorado – Universidade de Paris.

ZHEKISHEVA, M.; BOUSSIBA, S.; KHOZIN-GOLDBERG, I.; ZARKA, A.; COHEN, Z. Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. *Journal of Phycology*, v.38, p.325-331, 2002.