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

# INFLUÊNCIA DA LUZ E URÉIA NO CRESCIMENTO E CONTEÚDO DE CLOROFILA DA BIOMASSA DE *Spirulina platensis*

CARLOTA DE OLIVEIRA RANGEL

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Tit. Sunao Sato

São Paulo
2000

**CARLOTA DE OLIVEIRA RANGEL**

# INFLUÊNCIA DA LUZ E URÉIA NO CRESCIMENTO E CONTEÚDO DE CLOROFILA DA BIOMASSA DE *Spirulina platensis*

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Prof. Dr. Sunao Sato
Orientador/Presidente

Profa. Dra. Telma Mary Kaneko
1° Examinador

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho
2° Examinador

São Paulo, 21 de janeiro de 2000.

*"Aquele que rejeita a correção despreza a sua alma;*
*Mas o que se submete às repreensões é possuidor do seu coração.*
*O temor do Senhor é sábia disciplina, e a humildade precede a honra."*

*(Provérbios, 15: 32-33)*

*Aos meus pais queridos, Vera e Renato, por todo o esforço e dedicação com a minha educação*

*Ao Paulo, meu grande amor, por depositar em mim tanta confiança e admiração; pelo carinho, apoio e estímulo sempre presentes.*

# AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Tit. Sunao Sato, pelo constante estímulo, confiança e orientação durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho, por seus ensinamentos, sugestões e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Orlando Zancanaro Jr., pelo estímulo, amizade e por todos os ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. Engº Renato Nunes Rangel, meu pai, pelo incentivo, por todo conhecimento transmitido, e sobretudo pelo amor.

Às grandes amigas Eliane D. G. Danesi, Lúcia Helena Pelizer e Mitzi M. M. Assis, pela proveitosa convivência, discussões, sugestões, troca de conhecimentos, e sobretudo pelo estímulo e carinho sempre demonstrados.

Ao amigo Dante Augusto Moraes, pelo apoio, ajuda e sugestões.

Aos funcionários e amigos Mauro Sérgio Cândido e Kléber A. de Almeida, pelo auxílio na parte experimental; e à Cândida C. Maciel e Irene B. Ferreira, pelos cuidados com o laboratório e pela agradável convivência.

Às estagiárias Giuliana Tessarin e Almeida e Gabriela Cristina Tonini, pela grande colaboração na parte experimental.

Ao Juarez Vieira de Souza, Maria do Rosário P. Chamon e Miriam Bernardes Lopes, da Secretaria do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, pela colaboração, gentileza e amizade.

À CAPES - Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO


| | página |
|---|---|
| RESUMO | i |
| ABSTRACT | ii |
| LISTA DE FIGURAS | iii |
| LISTA DE TABELAS | ix |
| LISTA DE NOMENCLATURA E ABREVIATURAS | xiii |
| 1- INTRODUÇÃO | 1 |
| 2- OBJETIVOS | 3 |
| 3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 4 |
| 3.1- Histórico | 4 |
| 3.2- Classificação e morfologia | 7 |
| 3.3-Composição química | 9 |
| 3.4- Propriedades terapêuticas e aspectos toxicológicos | 12 |
| 3.5- Pigmentos e fotossíntese | 13 |
| 3.6- Sistemas de cultivo | 22 |
| 3.7- Condições de cultivo | 23 |
| 3.8- Usos diversos da *Spirulina platensis* | 28 |
| 4- MATERIAL E MÉTODOS | 30 |
| 4.1- Material | 30 |

4.2- Métodos 33

4.2.1- Condições de cultivo 33

4.2.2- Inóculo e manutenção da cepa 33

4.2.3- Método de cultivo utilizado 34

4.2.4- Experimentos realizados 36

4.2.4.1- Ensaios preliminares 36

4.2.4.1.1- Micrografia da *Spirulina platensis* 36

4.2.4.1.2- Construção da curva de calibração para determinação da concentração celular 36

4.2.4.1.3- Construção da curva de crescimento padrão de *Spirulina platensis* e análise de composição centesimal 37

4.2.4.1.4- Determinação da massa de uréia a ser utilizada como valor central no planejamento estatístico 37

4.2.4.1.5- Verificação do intervalo de alimentação a ser utilizado 37

4.2.4.2- Planejamento experimental 38

4.2.5- Descrição de um ensaio 40

4.2.6- Técnicas analíticas 41

4.2.6.1- Determinação de pH 41

4.2.6.2- Determinação de concentração celular 41

4.2.6.3- Determinação de carbonato total 41

4.2.6.4- Determinação de amônia livre 42

4.2.6.5- Determinação de clorofila 43

4.2.6.6- Composição centesimal 43

4.2.6.6.1- Determinação de lipídeos totais 43

4.2.6.6.2- Determinação de proteínas totais 44

4.2.6.6.3- Determinação de fibras 44

4.2.6.6.4- Determinação de cinzas 44

4.2.6.6.5- Determinação de umidade 45

4.2.7- Cálculos realizados 45

4.2.8- Fluxograma do processo 47

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO 48

5.1- Ensaios preliminares 48

5.1.1- Micrografia da *Spirulina platensis* 48

5.1.2- Curvas de calibração para determinação de concentração celular 51

5.1.3- Curva de crescimento padrão de *Spirulina platensis* e análise de composição centesimal 52

5.1.4- Ensaios de definição da massa de uréia relativa ao ponto central 54

5.1.5- Ensaios de verificação do modo de alimentação com uréia 55

5.1.6- Padronização do método de determinação de clorofila 56

5.2- Resultados do planejamento experimental 59

5.2.1- Resultados referentes ao Grupo 1 60

5.2.1.1- Cultivo padrão $P_{A,B}$ 60

5.2.1.2- Ensaio A 62

5.2.1.3- Ensaio B 64

5.2.2- Resultados referentes ao Grupo 2 66

5.2.2.1- Cultivo padrão $P_{C,D}$ 66

5.2.2.2- Ensaio C 68

5.2.2.3- Ensaio D 70

5.2.3- Resultados referentes ao Grupo 3 72

5.2.3.1- Cultivo padrão $P_E$ 72

5.2.3.2- Ensaio E 74

5.2.4- Resultados referentes ao Grupo 4 76

5.2.4.1- Cultivo padrão $P_{F,G,H,I}$ 76

5.2.4.2- Ensaio F 78

5.2.4.3- Ensaio G 80

5.2.4.4- Ensaio H 82

5.2.4.5- Ensaio I 84

5.2.5- Resultados referentes ao Grupo 5 86

5.2.5.1- Cultivo padrão $P_J$ 86

5.2.5.2- Ensaio J 88

5.2.6- Resultados referentes ao Grupo 6 90

5.2.6.1- Cultivo padrão $P_K$ 90

5.2.6.2- Ensaio K 92

5.3- Discussão Geral 95

5.4- Análise de regressão multivariável 100

5.4.1- Regressão multivariável para concentração celular máxima ($X_{máx.}$) 101

5.4.2- Regressão multivariável para produtividade em células ($P_X$) 104

5.4.3- Regressão multivariável para o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) 108

5.4.4- Regressão multivariável para a concentração de clorofila na biomassa ([Cl$a$]) 111

5.4.5- Regressão multivariável para a produtividade em clorofila ($P_{Cla}$) 115

6- CONCLUSÕES 119

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 120

APÊNDICE 129

# RESUMO

A microalga *Spirulina platensis* fornece uma biomassa rica em proteínas, ácidos graxos polinsaturados, vitaminas e outros componentes de alto valor como a clorofila, a qual pode ser utilizada como corante em medicamentos, cosméticos e alimentos. No presente trabalho, estudou-se a influência da iluminação, simultaneamente com a utilização de uréia como fonte de nitrogênio por meio de processo descontínuo alimentado, no crescimento de *Spirulina platensis* e conteúdo de clorofila da biomassa. Foram utilizados tanques abertos, com volume de cultivo de 5L.

Dentre os ensaios realizados, o melhor crescimento ocorreu com a utilização de 2500mg de uréia a 5600lux de iluminância, e o pior com 2500mg de uréia a 1400lux de iluminância. O maior conteúdo de clorofila na biomassa, por sua vez, foi obtido com 2500mg de uréia a 1400lux de iluminância, e o menor com 2500mg de uréia a 5600lux de iluminância. Uma regressão estatística para a produtividade em clorofila ($mg.L^{-1}.dia^{-1}$) foi realizada, a partir de valores codificados para os parâmetros em estudo, obtendo-se a seguinte equação de regressão:

$$P_{Cla} = 1,53 - 0,16.Mutc^2 - 0,28.Ec^2 + 0,2.Mutc + 0,13.Ec$$

A partir da derivada da equação, calculou-se os valores dos parâmetros estudados correspondentes ao ponto ótimo de produtividade em clorofila para as condições deste trabalho, os quais foram 2902mg de uréia e 3845lux de iluminância, o que mostra que valores intermediários de iluminância promovem um equilíbrio entre crescimento celular e biossíntese de clorofila.

# ABSTRACT

The microalga *Spirulina platensis* gives a high protein, fatty acids and vitamins contents biomass, besides other high value components like chlorophyll, that can be produced and used like a color in medicines, cosmetics and food. In this work, the influence of illuminance and utilization of urea as nitrogen source by fed-batch system in the *Spirulina platensis* growth and chlorophyll content was studied. Cultivates were carried out in open ponds with a 5L fermentation volume.

The best growth result happened with the utilization of 2500mg of urea at 5600lux of illuminance, and the worst with 2500mg of urea at 1400lux of illuminance. The highest biomass chlorophyll content, otherwise, was observed with 2500mg of urea and 1400lux of illuminance, and the lowest with 2500mg of urea at 5600lux of illuminance. Statistical regression for chlorophyll productivity ($mg.L^{-1}.dia^{-1}$), using the studied parameters codified values was done, giving the equation below:

$$P_{Cl\alpha} = 1{,}53 - 0{,}16.Mutc^2 - 0{,}28.Ec^2 + 0{,}2.Mutc + 0{,}13.Ec$$

From the derivative of the function, the studied parameters values correspondents to the optimal chlorophyll productivity point was calculated, concerning to the conditions of this work, being obtained 2902mg of urea and 3845lux of illuminance. This shows that intermediate illuminance values provides equilibrium between cellular growth and chlorophyll biosynthesis.

# LISTA DE FIGURAS


| | página |
|---|---|
| FIGURA 1- Regiões de absorção dos pigmentos da *Spirulina* sp. | 16 |
| FIGURA 2- Estrutura molecular da clorofila *a* | 17 |
| FIGURA 3- Tanques de cultivo de *Spirulina platensis* | 32 |
| FIGURA 4- Esquema técnico dos tanques de cultivo de *Spirulina platensis* | 32 |
| FIGURA 5- Cultivos em frascos Erlenmeyers | 34 |
| FIGURA 6- Planejamento experimental em estrela | 38 |
| FIGURA 7- Exemplo de curva de calibração do eletrodo de determinação de amônia | 42 |
| FIGURA 8- Micrografia da *S. platensis* cultivada em frascos Erlenmeyers – A: 100 x | 48 |
| FIGURA 9- Micrografia da *S. platensis* cultivada em frascos Erlenmeyers – A: 400 x | 49 |
| FIGURA 10- Micrografia da *S. platensis* cultivada em tanque – A: 100 x | 49 |
| FIGURA 11- Micrografia da *S. platensis* cultivada em tanque – A: 400 x | 50 |
| FIGURA 12- Curva de calibração do crescimento de *S. platensis* em frascos Erlenmeyers | 51 |
| FIGURA 13- Curva de calibração do crescimento celular de *S. platensis* em tanque | 52 |

FIGURA 14- Curva de crescimento padrão da *S. platensis* 53

FIGURA 15- Diagrama de composição centesimal realizada com a biomassa de *S. platensis* 53

FIGURA 16- Cultivos de *S. platensis* com 2250, 2500 e 2750mg de uréia respectivamente, para definição do ponto central 54

FIGURA 17- Cultivos com alimentação de uréia em dias alternados e diariamente 55

FIGURA 18- Curva de calibração da concentração de clorofila *a* em acetona 58

FIGURA 19- Gráficos de X e pH para o padrão $P_{A,B}$ correspondente aos ensaios A e B 61

FIGURA 20- Gráfico de consumo de carbonato para o padrão $P_{A,B}$ correspondente aos ensaios A e B 61

FIGURA 21- Gráficos de X e pH para o ensaio A (Mut = 1900mg ; E = 2000lux) 62

FIGURA 22- Gráfico de consumo de carbonato para o ensaio A (Mut = 1900mg ; E = 2000lux) 63

FIGURA 23- Gráfico de concentração de amônia livre para o ensaio A (Mut = 1900mg ; E = 2000lux) 63

FIGURA 24- Gráficos de X e pH para o ensaio B (Mut = 3100mg ; E = 2000lux) 64

FIGURA 25- Gráfico de consumo de carbonato para o ensaio B (Mut = 3100mg ; E = 2000lux) 65

FIGURA 26- Gráfico de concentração de amônia livre para o ensaio B (Mut = 3100mg ; E = 2000lux) 65

FIGURA 27- Gráficos de X e pH para o padrão $P_{C,D}$ correspondente aos ensaios C e D 67

FIGURA 28- Gráfico de consumo de carbonato para o padrão $P_{C,D}$ correspondente aos ensaios C e D 67

FIGURA 29- Gráficos de X e pH para o ensaio C (Mut = 1900mg ; E = 5000lux) 68

FIGURA 30- Gráfico de consumo de carbonato para o ensaio C (Mut = 1900mg ; E = 5000lux) 69

FIGURA 31- Gráfico de concentração de amônia livre para o ensaio C (Mut = 1900mg ; E = 5000lux) 69

FIGURA 32- Gráficos de X e pH para o ensaio D (Mut = 3100mg ; E = 5000lux) 70

FIGURA 33- Gráfico de consumo de carbonato para o ensaio D (Mut = 3100mg ; E = 5000lux) 71

FIGURA 34- Gráfico de concentração de amônia livre para o ensaio D (Mut = 3100mg ; E = 5000lux) 71

FIGURA 35- Gráficos de X e pH para o padrão $P_E$ correspondente ao ensaio E 73

FIGURA 36- Gráfico de consumo de carbonato para o padrão $P_E$ correspondente ao ensaio E 73

FIGURA 37- Gráficos de X e pH para o ensaio E (Mut = 2500mg ; E = 3500lux) 74

FIGURA 38- Gráfico de consumo de carbonato para o ensaio E (Mut = 2500mg ; E = 3500lux) 75

FIGURA 39- Gráfico de concentração de amônia livre para o ensaio E (Mut = 2500mg ; E = 3500lux) 75

FIGURA 40- Gráficos de X e pH para o padrão $P_{F,G,H,I}$ correspondente aos ensaios F, G, H e I 77

FIGURA 41- Gráfico de consumo de carbonato para o padrão $P_{F,G,H,I}$ correspondente aos ensaios F, G, H e I 77

FIGURA 42- Gráficos de X e pH para o ensaio F (Mut = 2500mg ; E = 3500lux) 78

FIGURA 43- Gráfico de consumo de carbonato para o ensaio F (Mut = 2500mg ; E = 3500lux) 79

FIGURA 44- Gráfico de concentração de amônia livre para o ensaio F (Mut = 2500mg ; E = 3500lux) 79

FIGURA 45- Gráficos de X e pH para o ensaio G (Mut = 2500mg ; E = 3500lux) 80

FIGURA 46- Gráfico de consumo de carbonato para o ensaio G (Mut = 2500mg ; E = 3500lux) 81

FIGURA 47- Gráfico de concentração de amônia livre para o ensaio G (Mut = 2500mg ; E = 3500lux) 81

FIGURA 48- Gráficos de X e pH para o ensaio H (Mut = 1660mg ; E = 3500lux) 82

FIGURA 49- Gráfico de consumo de carbonato para o ensaio H (Mut = 1660mg ; E = 3500lux) 83

FIGURA 50- Gráfico de concentração de amônia livre para o ensaio H (Mut = 1660mg ; E = 3500lux) 83

FIGURA 51- Gráficos de X e pH para o ensaio I (Mut = 3340mg ; E = 3500lux) 84

FIGURA 52- Gráfico de consumo de carbonato para o ensaio I (Mut = 3340mg ; E = 3500lux) 85

FIGURA 53- Gráfico de concentração de amônia livre para o ensaio I (Mut = 3340mg ; E = 3500lux) 85

FIGURA 54- Gráficos de X e pH para o padrão $P_J$ correspondente ao ensaio J 87

FIGURA 55- Gráfico de consumo de carbonato para o padrão $P_J$ correspondente ao ensaio J 87

FIGURA 56- Gráficos de X e pH para o ensaio J (Mut = 2500mg ; E = 5600lux) 88

FIGURA 57- Gráfico de consumo de carbonato para o ensaio J (Mut = 2500mg ; E = 5600lux) 89

FIGURA 58- Gráfico de concentração de amônia livre para o ensaio J (Mut = 2500mg ; E = 5600lux) 89

FIGURA 59- Gráficos de X e pH para o padrão $P_K$ correspondente ao ensaio K 91

FIGURA 60- Gráfico de consumo de carbonato para o padrão $P_K$ correspondente ao ensaio K 91

FIGURA 61- Gráficos de X e pH para ensaio K (Mut = 2500mg ; E = 1400lux) 92

FIGURA 62- Gráfico de consumo de carbonato para o ensaio K (Mut = 2500mg ; E = 1400lux) 93

FIGURA 63- Gráfico de concentração de amônia livre para o ensaio K (Mut = 2500mg ; E = 1400lux) 93

FIGURA 64- Curvas de nível para concentração celular máxima ($X_{máx.}$^) em função de Mutc e Ec 102

FIGURA 65- Superfície de resposta para concentração celular máxima ($X_{máx.}$^) em função de Mutc e Ec 102

FIGURA 66- Xmáx,^ (estimada) em função de Xmáx. (experimental), considerando-se uma faixa de erro de 5% (linhas em vermelho) em relação à curva média 104

FIGURA 67- Curvas de nível para a produtividade em células ($P_X$^) em função de Mutc e Ec 105

FIGURA 68- Superfície de resposta para a produtividade em células ($P_X$^) em função de Mutc e Ec 106

FIGURA 69- $P_X$^ (estimada) em função de $P_X$ (experimental), considerando-se uma faixa de erro de 5% (linhas em vermelho) em relação à curva média 107

FIGURA 70- Curvas de nível para o fator de conversão de nitrogenio em células ($Y_{X/N}$^) em função de Mutc e Ec 109

FIGURA 71- Superfície de resposta para o fator de conversão de nitrogenio em células ($Y_{X/N}$^) em função de Mutc e Ec 109

FIGURA 72 - $Y_{X/N}$^ (estimado) em função de $Y_{X/N}$ (experimental), considerando-se uma faixa de erro de 5% (linhas em vermelho) em relação à curva média 111

FIGURA 73- Curvas de nível para a concentração de clorofila *a* na biomassa ([Cl*a*]^) em função de Mutc e Ec 112

FIGURA 74- Superfície de resposta para a concentração de clorofila *a* na biomassa ([Cl*a*]^) em função de Mutc e Ec 113

FIGURA 75 - [Cl*a*]^ (estimada) em função de [Cl*a*] (experimental), considerando-se uma faixa de erro de 5% (linhas em vermelho) em relação à curva média 114

FIGURA 76- Curvas de nível para a produtividade em clorofila ($Pr_{Cla}$^) em função de Mutc e Ec 116

FIGURA 77- Superfície de resposta para a produtividade em clorofila ($Pr_{Cla}$^) em função de Mutc e Ec 116

FIGURA 78- $Pr_{Cla}$^ (estimada) em função de $Pr_{Cla}$ (experimental), considerando-se uma faixa de erro de 5% (linhas em vermelho) em relação à curva média 118

# LISTA DE TABELAS


| | página |
|---|---|
| TABELA 1- Composição aproximada (% de peso seco) de *S. platensis*, *S. maxima* e farinha de soja | 9 |
| TABELA 2- Composição de aminoácidos de proteínas de *Spirulina* (mg/g proteína bruta Nx6,25) em comparação com o sugerido pela FAO para crianças em idade pré-escolar | 10 |
| TABELA 3- Matriz de ensaios do planejamento fatorial em estrela das variáveis massa de uréia total (Mut) e iluminância (E) e seus valores codificados (Mutc e Ec) | 39 |
| TABELA 4- Influência do tempo de extração na determinação de clorofila de *S. platensis* | 57 |
| TABELA 5- Comparação das análises de clorofila de espinafre (*Spinacia oleraceae* L.) e *S. platensis* realizadas com os valores encontrados na literatura | 58 |
| TABELA 6- Agrupamento dos ensaios realizados | 59 |
| TABELA 7- Valores de X, pH e concentração de carbonato total referentes ao cultivo padrão $P_{A,B}$ correspondente aos ensaios A e B | 60 |
| TABELA 8- Valores de X, pH, concentração de carbonato total e amônia livre referentes ao ensaio A (Mut = 1900mg ; E = 2000lux) | 62 |
| TABELA 9- Valores de X, pH, concentração de carbonato total e amônia livre referentes ao ensaio B (Mut = 3100mg ; E = 2000lux) | 64 |

TABELA 10- Valores de X, pH e concentração de carbonato total referentes ao cultivo padrão $P_{C,D}$ correspondente aos ensaios C e D 66

TABELA 11- Valores de X, pH, concentração de carbonato total e amônia livre referentes ao ensaio C (Mut = 1900mg ; E = 5000lux) 68

TABELA 12- Valores de X, pH, concentração de carbonato total e amônia livre referentes ao ensaio D (Mut = 3100mg ; E = 5000lux) 70

TABELA 13- Valores de X, pH e concentração de carbonato total referentes ao cultivo padrão $P_E$ correspondente ao ensaio E 72

TABELA 14- Valores de X, pH, concentração de carbonato total e amônia livre referentes ao ensaio E (Mut = 2500mg ; E = 3500lux) 74

TABELA 15- Valores de X, pH e concentração de carbonato total referentes ao cultivo padrão $P_{F,G,H,I}$ correspondente aos ensaios F, G, H e I 76

TABELA 16- Valores de X, pH, concentração de carbonato total e amônia livre referentes ao ensaio F (Mut = 2500mg ; E = 3500lux) 78

TABELA 17- Valores de X, pH, concentração de carbonato total e amônia livre referentes ao ensaio G (Mut = 2500mg ; E = 3500lux) 80

TABELA 18- Valores de X, pH, concentração de carbonato total e amônia livre referentes ao ensaio H (Mut = 1660mg ; E = 3500lux) 82

TABELA 19- Valores de X, pH, concentração de carbonato total e amônia livre referentes ao ensaio I (Mut = 3340mg ; E = 3500lux) 84

TABELA 20- Valores de X, pH e concentração de carbonato total referentes ao cultivo padrão $P_J$ correspondente ao ensaio J 86

TABELA 21- Valores de X, pH, concentração de carbonato total e amônia livre referentes ao ensaio J (Mut = 2500mg ; E = 5600lux) 88

TABELA 22- Valores de X, pH e concentração de carbonato total referentes ao cultivo padrão $P_K$ correspondente ao ensaio K 90

TABELA 23- Valores de X, pH, concentração de carbonato total e amônia livre referentes ao ensaio K (Mut = 2500mg ; E = 1400lux) 92

TABELA 24- Resultados referentes à análises de clorofila, proteínas totais e lipídeos totais 94

TABELA 25- Valores de $X_{máx.}$, $P_X$, $P_{Cl\alpha}$ e $Y_{X/N}$ para os ensaios realizados 95

TABELA 26- Análise de regressão multivariável para concentração celular máxima ($X_{máx.}$) em função das variáveis em estudo na forma codificada 101

TABELA 27- Análise de variância do modelo de regressão multivariável para concentração celular máxima ($X_{máx.}$) 101

TABELA 28- Valores de concentração celular máxima ($X_{máx.}$) experimentais e estimados a partir da equação de regressão multivariável 103

TABELA 29- Análise de regressão multivariável para produtividade em células ($P_X$) em função das variáveis em estudo na forma codificada 104

TABELA 30- Análise de variância do modelo de regressão multivariável para produtividade em células ($P_X$) 105

TABELA 31- Valores de produtividade em células ($P_X$) experimentais e estimados a partir da equação de regressão multivariável 107

TABELA 32- Análise de regressão multivariável para o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função das variáveis em estudo na forma codificada 108

TABELA 33- Análise de variância do modelo de regressão multivariável para o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) 108

TABELA 34- Valores do fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) experimentais e estimados a partir da equação de regressão multivariável 110

TABELA 35- Análise de regressão multivariável para a concentração de clorofila *a* na biomassa ([Cl*a*]) em função das variáveis em estudo na forma codificada 111

TABELA 36- Análise de variância do modelo de regressão multivariável para a concentração de clorofila *a* na biomassa ([Cl*a*]) 112

TABELA 37- Valores de concentração de clorofila *a* na biomassa ([Cl*a*]) experimentais e estimados a partir da equação de regressão multivariável 114

TABELA 38- Análise de regressão multivariável para a produtividade em clorofila ($Pr_{Cla}$) em função das variáveis em estudo na forma codificada 115

TABELA 39- Análise de variância do modelo de regressão multivariável para a produtividade em clorofila ($Pr_{Cla}$) 115

TABELA 40- Valores de produtividade em clorofila ($Pr_{Cla}$) experimentais e estimados a partir da equação de regressão multivariável 117

TABELA 41- Esquema de adição de uréia para o ensaio H (Mut = 1660mg) 130

TABELA 42- Esquema de adição de uréia para os ensaios A e C (Mut = 1900mg) 130

TABELA 43- Esquema de adição de uréia para os ensaios E, F, G, J e K (Mut = 2500mg) 131

TABELA 44- Esquema de adição de uréia para os ensaios B e D (Mut = 3100mg) 131

TABELA 45- Esquema de adição de uréia para o ensaio I (Mut = 3340mg) 132

# NOMENCLATURA E ABREVIAÇÕES

| | |
|---|---|
| A | Absorbância |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| [Cl$a$] | Concentração de clorofila $a$ (mg.g biomassa$^{-1}$) |
| [Cl$a$]^ | Concentração de clorofila $a$ (mg.g biomassa$^{-1}$) estimada pela equação obtida na análise de regressão multivariável |
| $e$ | Base do logaritmo neperiano |
| E | Iluminância (lux) |
| Ec | Iluminância – valor codificado |
| i | Intervalo (entre o valor real e o ponto central da variável) |
| k | Constante de tempo (dias$^{-1}$) |
| Mo | Massa inicial de uréia (mg) |
| Mu | Massa de uréia acumulada (mg) |
| Mut | Massa de uréia total (mg) |
| Mutc | Massa de uréia total – valor codificado |
| NADPH | Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-reduzido |
| NADP Redutase | Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato redutase |
| $N_t$ | Quantidade total de nitrogênio no substrato utilizado (mg) |
| $P_{A,B}$ | Padrão dos ensaios A e B |

| | |
|---|---|
| $P_{C,D}$ | Padrão dos ensaios C e D |
| $P_E$ | Padrão do ensaio E |
| $P_{F,G,H,I}$ | Padrão dos ensaios F, G, H e I |
| $P_J$ | Padrão do ensaio J |
| $P_K$ | Padrão do ensaio K |
| Pc | Valor real da variável em estudo, referente ao ponto central |
| $P_{Cl\alpha}$ | Produtividade em clorofila ($mg.L^{-1}.dia^{-1}$) |
| $P_{Cl\alpha}$^ | Produtividade em clorofila ($mg.L^{-1}.dia^{-1}$) estimada pela equação obtida na análise de regressão multivariável |
| $P_X$ | Produtividade em células ($mg.L^{-1}.dia^{-1}$) |
| $P_X$^ | Produtividade em células($mg.L^{-1}.dia^{-1}$) estimada pela equação obtida na análise de regressão multivariável |
| T | Tempo (dias) |
| Ta | Tempo de alimentação (dias) |
| $T_{10}$ | Tempo referente ao décimo dia de cultivo, no qual foi realizada a análise de clorofila (dias) |
| $T_f$ | Tempo de fermentação relativo à concentração celular máxima (dias) |
| Vc | Valor codificado para a variável em estudo |
| Vr | Valor real da variável em estudo |
| X | Concentração celular ($mg.L^{-1}$) |
| $X_{máx.}$ | Concentração celular máxima ($mg.L^{-1}$) |
| $X_{máx.}$^ | Concentração celular máxima ($mg.L^{-1}$) estimada pela equação obtida na análise de regressão multivariável |
| $Y_{X/N}$ | Fator de conversão de nitrogênio em células expresso em função da quantidade de N no substrato (uréia ou $KNO_3$) |

| | |
|---|---|
| $Y_{X/N}$^ | Fator de conversão de nitrogênio em células (em função da quantidade de N no substrato) estimado pela equação obtida na análise de regressão multivariável |
| $\lambda$ | Comprimento de onda (nm) |
| DBO | Demanda Bioquímica de Oxigênio |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético |
| FAO | Food and Agriculture Organization |
| RSM | Response Surface Methodology |

# 1- INTRODUÇÃO

Inúmeros testes têm demonstrado que a cor é importante na aceitação de produtos, sendo uma das primeiras características perceptíveis que predeterminam a expectativa do consumidor.

De uma forma geral, os corantes classificam-se em naturais e artificiais, sendo estes últimos utilizados em maior escala. Entretanto, a tendência mundial tem direcionado estudos visando a obtenção de substâncias naturais, devido a conhecimentos recentes que mostram aspectos toxicológicos destas aliados ao fato de que as pessoas usualmente acreditam que produtos naturais sejam mais seguros para o consumo. Corantes naturais são obtidos de vegetais, animais, insetos e microrganismos (TAYLOR, 1984).

A biotecnologia tem demonstrado um interesse especial pela obtenção de corantes, sendo que os processos fermentativos apresentam uma série de vantagens quando comparados com as fontes vegetais e animais, pois não geram problemas ecológicos, são mais flexíveis e facilmente controlados, podem ser operados de forma contínua, proporcionam rápida multiplicação de microrganismos em curto espaço de tempo e não estão sujeitos às variações ambientais (ANTUNES s.d.; TAYLOR, 1984).

Dentre os microrganismos utilizados nos processos fermentativos, os maiores avanços têm ocorrido com as microalgas, pois estas combinam fotossíntese com alta taxa de crescimento (HENDRY, 1996).

A microalga *Spirulina* sp. vem sendo cultivada fotoautotroficamente para a produção de biomassa com alto conteúdo de proteínas, ácidos graxos polinsaturados e vitaminas para alimentação

humana e animal e para fins farmacêuticos. Recentemente, maior atenção tem sido dispensada a outros componentes de alto valor sintetizados pela alga como os pigmentos. Dentre estes pigmentos, a clorofila *a* pode ser obtida em proporções consideráveis para aplicação em medicamentos, cosméticos e alimentos.

Estudos referentes a culturas de microalgas sob condições controladas revelaram que a composição do meio de cultura, intensidade luminosa e idade celular são os principais fatores que influenciam a concentração de clorofila na biomassa. A quantidade de clorofila na biomassa obtida de culturas pouco iluminadas é maior do que em culturas sob iluminação intensa, sugerindo que a relação entre o conteúdo de clorofila e a intensidade luminosa seja inversamente proporcional (BOGORAD, 1962; ELORANTA, 1986).

A fonte convencional de nitrogênio utilizada para o cultivo de *Spirulina* sp. é o nitrato de potássio. A utilização de uréia como fonte de nitrogênio, em substituição ao nitrato de potássio apresenta-se como uma alternativa bastante interessante, pois acarretaria em uma diminuição de custos significativa, dado que o preço do nitrato de potássio grau analítico é cerca de vinte vezes maior do que o da uréia. O nitrato de potássio também apresenta o inconveniente de ser um produto controlado pelo Ministério da Defesa, devido à sua utilização na fabricação de explosivos, e portanto de difícil acesso. Em contrapartida, a uréia é bastante difundida para utilização em agricultura e em cultivo de microrganismos, e portanto facilmente adquirida.

## 2- OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi verificar a influência da iluminação e utilização de uréia como fonte de nitrogênio no crescimento de *Spirulina platensis*, bem como no conteúdo de clorofila da biomassa obtida, através da realização de ensaios com diferentes valores de iluminância e quantidades de uréia.

# 3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 3.1- HISTÓRICO

O uso de microrganismos como fonte de alimentos e bebidas para consumo humano transcende a era cristã. A partir do último século, microrganismos passaram a ser utilizados também como fontes de antibióticos, aminoácidos, enzimas, vitaminas, solventes, agentes flavorizantes, fármacos, intermediários de sínteses orgânicas e biomassa para produção de metano. Recentemente, as algas começaram a ser consideradas como uma fonte potencial para obtenção de várias substâncias, incluindo algumas destas para as quais outros microrganismos mostraram-se úteis no passado. Nos últimos quarenta anos, a atenção científica foi direcionada ao cultivo de microalgas, devido ao potencial de uso desta biomassa para energia e como fonte de proteínas para alimentação animal (AARONSON et al., 1980).

Mais recentemente, na última década, a procura por microalgas para serem utilizadas como fontes de antibióticos e compostos farmacologicamente ativos, especialmente as cianobactérias, recebeu uma atenção ainda maior. Um grande número de antibióticos têm sido isolados e caracterizados. Similarmente, muitas cianobactérias têm se mostrado produtoras de compostos antivirais e antineoplásicos. Muitos destes compostos bioativos podem encontrar aplicações em medicina humana e veterinária ou na agricultura. As microalgas são particularmente atrativas como fonte natural de moléculas bioativas, pois estas apresentam o potencial de produzir compostos difíceis ou impossíveis de serem sintetizados quimicamente (BOROWITZKA, 1995).

A primeira unidade comercial de produção de microalgas foi instalada no Japão, com o cultivo de *Clorella* sp., cuja biomassa foi utilizada para produzir alimento dietético. A *Spirulina* sp., uma microalga tradicionalmente utilizada como alimento em vários países, vem sendo produzida no México e Estados Unidos. No Japão, a ficocianina, um pigmento azul extraído deste microrganismo, tem sido utilizada como corante em alimentos (O'CALLAGHAN, 1996).

A história da *Spirulina* sp. como componente da dieta humana é única. Há evidências nos anais espanhóis da conquista do México, no século XVI, de que os astecas colhiam esta alga no lago Texcoco e preparavam alimentos que consumiam regularmente (DILLON et al., 1995). Quando os conquistadores espanhóis chegaram ao México, encontraram muitos alimentos exóticos como cacau, tomate, batata e o "tecuitlatl", uma substância verde colhida do Lago Texcoco e comercializada por todo o país, que constituía-se basicamente de biomassa de *Spirulina* sp.. Este alimento era comumente consumido com milho e outros cereais sob a forma de um molho denominado "chimolli", o qual era preparado com tomate, pimenta e vários temperos (CIFERRI & TIBONI, 1955; DURAND-CHASTEL, 1980).

Em 1940, o ficologista francês Dangeard descreveu, em uma comunicação à Linnean Society of Bordeaux, uma amostra recebida do farmacêutico Créach que se encontrava com as tropas francesas no Forte Lamy, atual República do Chad. Segundo Dangeard, este material, denominado "dihé" (ou dié) na língua local, fazia parte da alimentação da população nativa, os Kanembous, e consistia em biomassa de *Spirulina platensis* colhida em pequenos lagos ao redor do lago Chad. Os Kanembous esperavam que os ventos empurrassem as algas para as margens dos lagos, formando aglomerados então coletado pelas mulheres e secos ao sol. O "dihé" era preparado com esta biomassa, acrescida de molho picante composto de tomate, pimenta e vários temperos (AARONSON et al.; 1980, CIFERRI & TIBONI, 1985; DILLON et al.; 1995, RUIZ & MÓS,1990).

A semelhança entre o "dihé" e o molho asteca "chimolli" é evidente. A pimenta e o tomate são naturais do México, ambos tiveram sua introdução

no continente africano através do tráfico de escravos. O "tecuitlatl" provavelmente percorreu a mesma rota. Os navios que transportavam escravos ao Novo Mundo retornavam à África levando milho e tabaco. Sendo o "tecuitlatl" compacto e de alto valor energético, deve ter chegado à África como alimento para os escravos nestas viagens. Possivelmente a alga passou pela rota do comércio dos escravos, indo da Costa Guiné para o Lago Chad, porém não existem evidências concretas de que isto tenha realmente acontecido (DURANT-CHASTEL, 1980).

De acordo com relatos recentes, o "tecuitlatl" continuou a ser consumido após a conquista espanhola. No século seguinte, ele desapareceu do mercado da Cidade do México, porém não deixou de fazer parte da dieta dos índios residentes nos arredores do Lago Texcoco.

Durante os anos 50's, o crescimento demográfico gerou um interesse mundial pela descoberta de novas fontes protéicas para alimentação humana, conduzindo pesquisas para a investigação das possibilidades da cultura de algas em larga escala (DURAND-CHASTEL, 1980).

Em 1963, Mis Geneviève Clèment do Instituto Francês de Petróleo estudou o efeito de vários fatores físicos e químicos no crescimento de *Spirulina platensis* oriunda do Chad, sob condições laboratoriais. Várias unidades piloto foram construídas a fim de estudar a produção de algas com gases combustíveis contendo 10 a 13% de $CO_2$ como fonte de carbono. Uma planta de colheita e processamento em larga escala também foi desenvolvida (CLÉMENT,1975). Ao mesmo tempo, Jean Leonard, um botânico belga, estudou a *Spirulina* africana, adquirida na região do Forte Lamy durante a expedição Trans-Saárica em 1965 (DILLON et al., 1995; DURAND-CHASTEL, 1980).

Em 1972, foi construída uma planta em escala industrial em Sosa Texcoco, capaz de produzir 1 tonelada de *S. maxima* por dia. O processo adotado incluía filtração, fluidização, pasteurização, homogeneização e secagem (CIFERRI & TIBONI, 1985; DILLON et al., 1995).

No início dos anos 80's, a fazenda Earthrise tornou-se a primeira planta de produção de *Spirulina maxima* em larga escala no Estados Unidos, sob o controle de uma junta comercial japonesa (BENEMANN, 1990).

Existem trinta e cinco espécies do gênero *Spirulina*, proliferando em vários lagos alcalinos do mundo, tanto em áreas subtropicais como tropicais (Lago Chad, Lago Texcoco, Lago Turkana) (DILLON et al., 1995).

A espécie mexicana tem o nome científico de *Spirulina maxima* e a africana, muito similar, é a *Spirulina platensis* (RICHMOND, 1988).

## 3.2- CLASSIFICAÇÃO E MORFOLOGIA

O gênero *Spirulina*, pertencente à família *Oscillatoriaceae*, contida no grupo das cianobactérias filamentosas (microalgas verdes-azuladas), é caracterizado por cadeias de células em forma de espiral (tricomas), cujos diâmetros celulares variam de 1 a 12μm. Os tricomas são móveis e giram ao redor de seus eixos. As dimensões celulares, o grau de ondulação e o comprimento dos filamentos variam de espécie para espécie. Esta última característica também pode variar conforme as condições ambientais de crescimento.

Há discordâncias em relação à constância da forma helicoidal, podendo-se observar mutantes de *Spirulina* sp. com tricomas retos, em condições laboratoriais. Os tricomas parecem sofrer uma metamorfose espontânea, dependendo do pH e dos nutrientes (RICHMOND, 1982; CIFERRI & TIBONI, 1985; DILLON et al., 1995). A forma helicoidal se mantém somente em meio líquido, sendo que em meio sólido os filamentos tornam-se espirais acentuados.

A transição de uma hélice para um espiral é um processo lento, que depende da porcentagem de água na superfície do ágar. Entretanto, o processo inverso ocorre quase que instantaneamente quando, por exemplo, uma gota de água é colocada na superfície do ágar. A transição de hélice para espiral provavelmente relaciona-se à necessidade de redução da superfície exposta ao ar em meio sólido. É possível que estas transições sejam causadas pela hidratação ou desidratação dos oligopeptídeos

presentes na camada de peptideoglicano, resultando em mudanças na rigidez das células (CIFERRI, 1983).

Entre as várias espécies pertencentes ao gênero *Spirulina* ocorrem variações morfológicas significativas. Mesmo em organismos da mesma espécie, ocorrem variações conforme as condições de cultivo. A *S. platensis* tem como sinônimos: *Spirulina jenneri* var. *platensis* e *Arthrosphira platensis*. Suas principais características são cor verde-brilhante, tricomas azuis-esverdeados, levemente constritos na parede celular, formando espirais regulares. Em análise microscópica, os espirais aparecem como filamentos verdes-azulados devido a presença de dois pigmentos, a clorofila, verde e a ficocianina, azul. Os espirais variam de 26 a 36μm de largura e 43 a 57μm de comprimento (RICHMOND, 1988; DILLON et al., 1995).

A reprodução da *Spirulina* sp. ocorre por divisão binária, sendo que periodicamente tem-se a quebra do tricoma em uma célula intercalária que perde seu citoplasma e é convertida em um necrídio. Esta quebra origina cadeias curtas de células denominadas hormogônias, que diferem dos tricomas maduros devido à falta de motilidade, tamanho celular reduzido e morfologia diferenciada (CIFERRI & TIBONI, 1985).

Esta alga é capaz de colonizar ambientes extremos, inadequados para muitos outros organismos; cresce abundantemente em certos lagos alcalinos da América Central e do Norte, Ásia e África em latitudes entre 35°S e 35°N, áreas com uma irradiação solar incidente de 600 a 850kJ.cm$^{-2}$.ano$^{-1}$ e insolação total de 3.000 a 4.000horas.ano$^{-1}$. Em lagos alcalinos com altas concentrações salinas, a população de cianobactérias é dominante. Medidas comparativas de pH e salinidade realizadas em vários lagos alcalinos mostraram que quanto mais acentuados forem estes parâmetros mais marcante é a predominância da *Spirulina* sp.. Os principais sais presentes nestes lagos alcalinos são os carbonatos e os bicarbonatos (RICHMOND, 1988; SANTILLAN, 1988).

Assim como outros microrganismos, a *Spirulina* sp. tem uma taxa de crescimento específico maior que a das plantas superiores e tem sido

cultivada em sistemas semi-contínuos e colhida durante todo o ano (SANTILLAN, 1982).

### 3.3- COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A utilização da *Spirulina* sp. como alimento humano, ração animal e fonte de vários produtos naturais está fundamentada em sua composição química. A tabela a seguir mostra a proporção dos componentes individuais desta microalga.

**TABELA 1**- Composição aproximada ( % de peso seco) de *S. platensis*, *S. maxima* e farinha de soja.

| Amostra | Umidade | Cinzas | Proteína bruta | Lipídeos | Carboi-dratos | Fibra bruta |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *S.platensis* | 9 | 10 | 62 | 3,9 | 8,5 | 3 |
| *S.maxima* | 4-7 | 6-9 | 60-71 | 4 | 8-13 | 1 |
| Soja | 7-10 | 4 | 34-40 | 16-20 | 19-35 | 3-5 |

Fonte: DILLON **et al.**, 1995

As proteínas representam 60% a 70% do peso seco da *Spirulina* sp., sendo esta portanto uma das mais ricas fontes protéicas de origem não animal, colocando-se bem acima das carnes (15-25%) e da soja. O espectro de aminoácidos é satisfatório sendo que todos os aminoácidos estão próximos dos padrões estabelecidos pela Food and Agriculture Organization (FAO), como pode ser observado na tabela 2 (DILLON et al., 1995).

A alta taxa de proteínas presente na *Spirulina* sp. é incomum até mesmo no mundo microbiano, sendo superada apenas por algumas bactérias. Porém, nestas o conteúdo protéico é acompanhado por uma grande quantidade de ácidos nucléicos (superior a 30% do peso seco para produção em escala industrial). O catabolismo das purinas (bases nitrogenadas presentes nos ácidos nucléicos) em mamíferos, incluindo o homem, gera ácido úrico o qual em altas concentrações no sangue pode conduzir à condições patológicas como gota. A quantidade de ácidos

nucléicos presentes na *Spirulina* sp. não ultrapassa 5% do peso seco (BECKER,1981; CIFERRI & TIBONI, 1985).

**TABELA 2**- Composição de aminoácidos de proteínas de *Spirulina* ( mg/g proteína bruta Nx6,25) em comparação com o sugerido pela FAO para crianças em idade pré-escolar.

| **Aminoácido** | ***S.platensis*** | ***S.maxima*** | **FAO/WHO** |
|---|---|---|---|
| Histidina | 22 | 17 | 19 |
| Isoleucina | 67 | 60 | 28 |
| Leucina | 98 | 87 | 66 |
| Valina | 71 | 63 | 35 |
| Fenilalanina | 53 | 49 | - |
| Tirosina | 53 | 40 | 63 |
| Lísina | 48 | 41 | 58 |
| Metionina | 25 | 20 | 25 |
| Cisteína | 9 | - | - |
| Triptofano | 3 | 12 | 11 |
| Treonina | 62 | 49 | 34 |
| Alanina | 95 | 77 | - |
| Arginina | 73 | 72 | - |
| Ácido aspártico | 118 | 99 | - |
| Ácido glutâmico | 103 | 135 | - |
| Glicina | 57 | 47 | - |
| Prolina | 42 | 39 | - |
| Serina | 51 | 45 | - |

Fonte: DILLON **et. al.**, 1995

A utilização de proteínas vegetais tem sido fortemente criticada por muitas razões, porém nenhuma delas aplica-se à proteína de *Spirulina* sp.. Usualmente, a proteína animal é considerada mais nutritiva que a vegetal, porém não há diferenças entre a composição destas, mas sim na concentração em que são encontradas. Outra objeção é relativa à natureza das substâncias associadas às proteínas. De fato, proteínas animais são puras e encontram-se em geral ligadas a lipídeos facilmente digeríveis e metabolizáveis. Ao contrário, proteínas vegetais são normalmente acompanhadas de material lignocelulósico não digerível pelo homem e por produtos que reduzem a absorção de minerais, como os taninos. No caso da *Spirulina* sp., as paredes celulares são compostas por mucoproteínas,

facilmente digeríveis e não associadas a produtos tóxicos (DURAND-CHASTEL, 1980; BECKER, 1981; DILLON et al., 1995).

Como via de regra, as proteínas das algas são pouco absorvidas quando as células intactas são utilizadas como alimento para animais e humanos. O efeito de vários métodos de processamento e secagem na sua digestibilidade tem sido extensivamente estudado. Cianobactérias em geral, e *Spirulina* sp. em particular, são as únicas algas que apresentam alta digestibilidade sem requerer processamentos especiais, sendo que pouquíssima diferença foi observada entre a *Spirulina* sp. seca ao sol ou por "spray-drying", sendo obtidos 65% e 70% de digestibilidade, respectivamente (DURAND-CHASTEL, 1980; RICHMOND, 1982).

Em adição ao conteúdo excepcionalmente alto de proteínas, a *Spirulina* sp. apresenta um conteúdo de vitaminas do complexo B (principalmente B12) maior que alguns alimentos vegetais e animais não processados, e possui altas taxas de vitaminas E e H (biotina). Além disso, 10g de biomassa contém aproximadamente 25.000UI de vitamina A (SANTILLAN,1982; RICHMOND, 1988).

As microalgas, de um modo geral, contêm grandes quantidades de gorduras e óleos, que podem ser utilizados na fabricação de detergentes, borracha, compostos graxos nitrogenados, graxa, tecidos, aditivos de alimentos, cosméticos e medicamentos. O emprego de lipídeos provenientes de algas na indústria pode reduzir o uso de derivados de petróleo para propostas energéticas e de gordura animal e vegetal para consumo humano (AARONSON & DUBINSKY, 1982). A *Spirulina* sp. apresenta um alto conteúdo de lipídeos e lipopolissacarídeos (em torno de 16,6% do peso seco), constituídos basicamente de ácidos graxos polinsaturados. Do ponto de vista nutricional, os ácidos graxos mais importantes são o linoléico e o $\gamma$-linolênico, produzidos por esta microalga nas proporções de 1,24% e 1,04% do peso seco, respectivamente (AARONSON, 1980; RICHMOND, 1988; DILLON et al., 1995).

Segundo RICHMOND (1988), os carboidratos constituem aproximadamente 15% do peso seco, e a hidrólise produz glicose, levulose,

sacarose, glicerol e vários polióis. Glicosana e particularmente ramnosana, ambos contendo glicosamina, foram verificados serem os principais produtos de armazenagem de carboidratos.

## 3.4- PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS E ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

Várias propriedades terapêuticas da *Spirulina* sp. têm sido relatadas, podendo-se citar:

- compostos farmacêuticos contendo *Spirulina* sp. como ingrediente ativo produziram acelerada cicatrização de ferimentos;
- a ficocianina, pigmento presente na alga, pode estimular o sistema imunológico, protegendo contra uma variedade de doenças;
- estudos epidemiológicos sugerem que dietas baseadas em alimentos com altos conteúdos de vitamina A intacta, como a biomassa de *Spirulina* sp., diminuem os riscos de câncer;
- o ácido γ-linolênico, encontrado na *Spirulina* sp. em grande quantidade, estimula a síntese de prostaglandinas, as quais estão envolvidas na regulação da pressão sanguínea, síntese de colesterol, resposta inflamatória e proliferação celular;
- extratos de *Spirulina* sp. restauram parte da atividade de colinesterase de eritrócitos humanos que foram inibidos por pesticidas organofosforados;
- tem-se observado que esta alga reduz sintomas de tensão pré-menstrual e ressaca (RICHMOND, 1988; HENRICKSON,1989);
- tem sido relatado um efeito antioxidante e antimutagênico da clorofila e alguns de seus derivados, como a clorofilina (ONG, 1986; AZIZAN, 1995; HIGASHI, 1998; TUTOUR, 1998; KUMAR, 1999).

Diversos estudos nutricionais foram realizados em diferentes animais (camundongos, ratos, porcos, galinhas, bezerros) submetidos a dietas alimentares nas quais a fonte protéica foi substituída totalmente ou em parte por *Spirulina* sp.. Tanto *S. platensis* quanto *S.maxima* foram bem aceitas pelos animais, fornecendo em geral ganhos de peso e deposição corporal de nitrogênio comparáveis, senão melhores, àqueles obtidos com a maioria das fontes protéicas vegetais (CIFERRI, 1983). Testes com humanos têm sido

conduzidos em vários países. Na cidade do México, foram realizados experimentos em crianças com desnutrição de 3º grau. Após 320 dias de administração de *S. maxima*, resultados revelaram que a absorção de nitrogênio foi mais baixa em comparação com o leite e a soja, mas o nitrogênio retido da quantidade ingerida foi levemente inferior ao leite e melhor do que a soja (DURAND-CHASTEL, 1980; CIFERRI & TIBONI, 1985).

Em um outro estudo, dietas nas quais mais de 50% da fonte protéica constituía-se de *S. maxima* foram aplicadas em 5 adultos subnutridos, por períodos variando de 4 a 5 dias. Ganho de peso significante e balanço de nitrogênio positivo foram observados, sem presença de efeitos colaterais (CIFERRI, 1983). Além disto, estudos multigeracionais realizados em camundongos e testes de mutagenicidade forneceram resultados negativos (DURAND-CHASTEL, 1980; SANTILLAN, 1982; CIFERRI, 1983).

### 3.5- PIGMENTOS E FOTOSSÍNTESE

Os pigmentos presentes no gênero *Spirulina* se dividem em 3 classes:

1- Clorofila $a$, compreendendo cerca de 1,7% do peso celular

2- Carotenóides e xantofilas, compreendendo aproximadamente 0,5% do peso celular

3- Duas ficobiliproteínas, c-ficocianina e aloficocianina, as quais normalmente contribuem com cerca de 20% da proteína celular e são os pigmentos quantitativamente dominantes (TELLOR et al., 1980; RICHMOND, 1982).

Os carotenóides ocorrem universalmente em organismos fotossintéticos mas esporadicamente em bactérias não fotossintéticas e eucariontes, encontram-se amplamente difundidos na natureza e apresentam uma grande diversidade de estrutura e função. As principais funções dos carotenóides nos organismos fotossintetizantes são armazenamento de luz, como pigmentos acessórios, e proteção contra foto-oxidação catalisada por porfirinas. Em organismos não fotossintetizantes, o

papel dos carotenóides é seqüestrar espécies químicas contendo oxigênio tóxico, mais especificamente o $O_2$, a partir do metabolismo ou do ambiente. A diversidade de carotenóides está relacionada com os requerimentos nutricionais, porém eles têm sido depositados em animais através da disponibilidade na cadeia alimentar. Assim como os hormônios e esteróis, eles ocorrem em alguns organismos inicialmente pela necessidade, mas em outros espontaneamente (GROSS, 1991; JOHNSON & SCROEDER, 1996).

Os carotenóides foram sintetizados inicialmente por bactérias fototróficas anoxigênicas e procariotos fotossintéticos oxigênicos (cianobactérias) e não são sintetizados por animais, apesar de carotenos poderem ser alterados por oxidação e isomerização, e pela conversão a vitamina A e retinóides (JOHNSON & SCROEDER, 1996).

Devido ao fato de muitos animais de interesse conterem carotenóides e os requererem como nutrientes, estes pigmentos são significantes industrialmente como componentes de rações animais, porque possivelmente conferem resistência à doenças e promovem uma pigmentação brilhante aos animais e às gemas de ovos de aves.

Estudos sugerem que os carotenóides beneficiam a saúde em humanos e animais por prevenirem ou retardarem o aparecimento de doenças como arteriosclerose, catarata, câncer e outras (JOHNSON & SCROEDER, 1996; SCHIEDT & LIAAEN-JENSEN,1996).

Os carotenóides são isoprenóides contendo uma cadeia característica de ligações duplas conjugadas (polieno) (JOHNSON & SCHROEDER, 1996). Os dois grupamentos básicos destes pigmentos são os hidrocarbonetos (carotenos) e os derivados oxigenados (xantofilas) (LICHTENTHALER, 1987). A região responsável pela absorção de luz na molécula de carotenóide é a cadeia poliênica, constituída da série de duplas ligações conjugadas. O comprimento de onda de máxima absorção é diretamente relacionado ao número de duplas ligações conjugadas.

Os carotenóides absorvem principalmente na região azul do espectro (430 – 470nm), mas também apresentam picos de absorção nas regiões verde-azulada (470 – 500) e verde (500 – 530) (GROSS, 1991).

Apesar de mais de 600 carotenóides terem sido identificados de várias fontes, apenas 40% são ingeridos por humanos, e somente uma parte destes tem utilização industrial como corante de alimentos, ração animal, produtos farmacêuticos e cosméticos. Atualmente, os carotenóides para fins industriais são obtidos quase que exclusivamente por síntese química ou por extração de plantas, apesar de ocorrerem naturalmente em espécies de microalgas, bactérias e fungos. Recentemente, maior interesse tem sido dado à obtenção de carotenóides por microorganismos (JOHNSON & SCHROEDER, 1996).

As clorofilas são pigmentos de ocorrência natural, presentes em plantas, algas e algumas bactérias fotossintéticas. São responsáveis pela fotossíntese, processo vital que converte energia luminosa em energia química (GROSS,1991). Sendo componentes dos alimentos vegetais fazem parte da dieta natural de animais, incluindo o homem. Uma vez que as plantas são colhidas, as clorofilas degradam-se em algumas espécies em questão de horas e em outras apenas após semanas. O armazenamento prolongado geralmente completa a destruição das clorofilas das folhas. O processamento destas, particularmente o aquecimento, resulta na quebra da clorofila remanescente.

As clorofilas são praticamente os únicos pigmentos naturais verdes e certamente os únicos em abundância. Infelizmente, a instabilidade inerente ao isolamento das clorofilas tem impedido maior utilização destas como corantes de alimentos. Entretanto, bilhões de toneladas de clorofilas são produzidas a cada ano na terra e nos oceanos (HENDRY, 1996).

Estas moléculas são fotorreceptoras muito eficazes porque contêm redes de ligações simples e duplas alternadas. Têm faixas de absorção muito fortes na região visível do espectro, onde também é máximo o fluxo solar que atinge a Terra. Os espectros de absorção das clorofilas $a$ e $b$ são diferentes, sendo que os dois complementam-se na absorção da luz solar incidente. A região do espectro de 500 a 600nm é fracamente absorvida pelas clorofilas (MIMURO & FUJITA, 1977). A coloração verde deve-se ao

fato de estas absorverem fortemente nas regiões azul e vermelha do espectro visível (GROSS, 1991).

As clorofilas podem ser determinadas por métodos espectrofotométricos ou espectrofluorimétricos. Os métodos espectrofotométricos (colorimétricos) baseiam-se na lei de Lambert-Beer, que relaciona a concentração de uma substância com a sua absorbância. A absorbância medida, ou densidade ótica, é proporcional ao coeficiente de absorção específica, ao comprimento do caminho *ótico* ***b***, em centímetros, e à concentração ***C***. O coeficiente de absorção específica $A_{1cm}^{1\%}$ é a absorção de uma solução a 1% peso/volume em um caminho ótico de 1cm. A absorbância geralmente é medida em comprimento de onda correspondente à absorção máxima da substância (GROSS,1991).

Devido ao fato de que carotenóides também absorvem na região azul do espectro, valores de comprimentos de onda correspondentes à região do vermelho são a escolha lógica para análise de clorofilas (MACKINNEY, 1941).

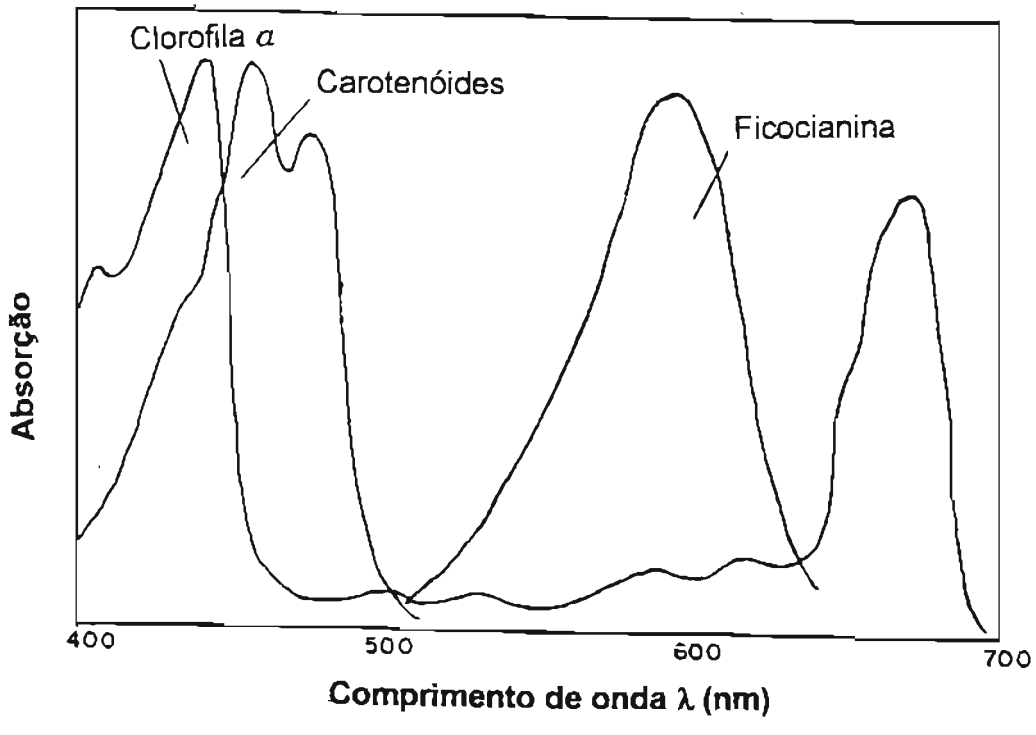



**FIGURA 1**- Regiões de absorção dos pigmentos da *Spirulina* sp. - Fonte: FOX, 1983

As clorofilas, assim como todos os pigmentos contendo grupamentos prenil, são compostos lipossolúveis que podem ser extraídos de tecidos ou células vivas utilizando-se solventes orgânicos como acetona, metanol ou etanol, através da trituração com grãos de areia ou utilização de homogenizador (LICHTENTHALER, 1987).

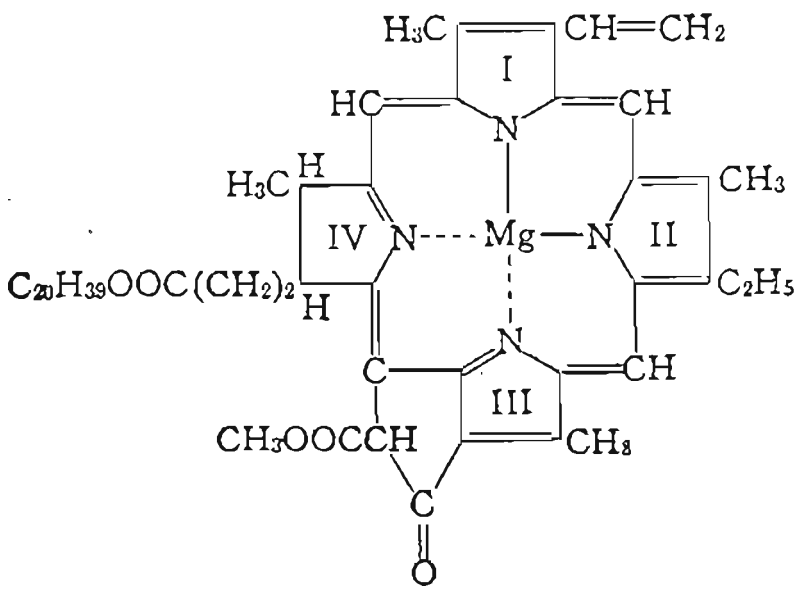



**FIGURA 2**- Estrutura molecular da clorofila *a* – Fonte: FIESER & FIESER, 1960

A rota biossintética da clorofila é complexa e sua regulação envolve controle interno por moléculas inorgânicas simples, pelas próprias porfirinas (moléculas intermediárias de síntese da clorofila) e por estímulo luminoso. Além disto, muitos passos desta via operam em associação com a síntese de outras moléculas relacionadas. A formação de clorofila *a* é correlacionada à síntese de vários polipeptídeos tilacóides, aos tocoferóis, fitol e carotenos (HENDRY, 1996).

A maior parte da clorofila utilizada no mercado de corantes alimentares, senão toda, é obtida de plantas terrestres. Uma exceção

notável é o uso do excremento verde (borra) do bicho da seda quando a larva é alimentada com folhas de amora e portanto excreta clorofila, entre outros pigmentos (HENDRY, 1996).

É possível obter clorofilas com características espectrais variando de verde-amarelado a azul-esverdeado a partir de algas. Derivados destas clorofilas são capazes de produzir cores laranjas e até vermelhas, sob condições químicas drásticas.

A diferença entre as clorofilas naturais e sintéticas (produção humana) torna-se mais clara quando consideramos a função destes pigmentos na natureza. No organismo fotossintetizante, diferentes grupos de clorofilas estão associados estruturalmente à proteínas particulares ou polipeptídeos. A grande parte das moléculas de clorofila individuais encontram-se arranjadas fisicamente para capturar partículas de luz que chegam na forma de fótons ou de energia luminosa visível. Sob iluminação solar intensa, moléculas de clorofila capturam em torno de 40 a 45 fótons por segundo (BOGORAD, 1962; HENDRY, 1996).

A quantidade de clorofila $a$ em células de algas varia de acordo com determinados fatores como concentração de nutrientes, temperatura da água e condições de iluminação, sendo que o aumento da radiação solar leva a uma diminuição da contribuição da clorofila $a$ no extrato total de pigmentos. Além disto, a quantidade de clorofila é maior em células jovens, devido à depleção de nutrientes em células velhas (ELORANTA, 1986).

Uma das propriedades características de várias espécies de algas é a sua habilidade de produzir diferentes proporções de pigmentos em resposta à diferentes qualidades de luz. Esta fotorregulação responsável pela síntese de pigmentos é conhecida como adaptação cromática. Iluminação tipicamente vermelha em $\lambda$ acima de 600nm, por exemplo, leva à produção de ficocianina e aloficocianina (HENDRY, 1996).

O sistema fotossintetizante das cianobactérias é muito parecido com aquele encontrado nas plantas superiores. Entretanto, devido ao fato de serem procariontes, seu aparato fotossintetizante não está organizado em organelas específicas (cloroplastos), mas sim disperso pela célula.

De uma maneira bastante simplificada, a fotossíntese pode ser esquematizada pela reação:

$$6H_2O + 6CO_2 \xrightarrow{luz} \underset{\text{(glicose)}}{C_6H_{12}O_6} + 6O_2$$

A fotossíntese é feita por dois fotossistemas localizados nas membranas tilacóides. A iluminação leva à geração de um gradiente de prótons transmembrana para a formação de ATP e à criação de poder redutor para a produção de NADPH. A luz que chega ao fotossistema II é absorvida em um centro de reação. Um elétron é transferido deste centro excitado para a feofitina, e daí, para plastoquinonas ligadas aos centros protéicos $Q_A$ e $Q_B$, formando plastoquinona reduzida, $QH_2$. O centro da reação recupera elétrons da água pela ação de uma proteína contendo manganês, o que causa desprendimento de $O_2$. Portanto, a reação global catalisada pelo fotossistema II é a transferência de elétrons, induzida pela luz, da água para a plastoquinona. O evento crítico em todos os centros de reação de fotossíntese é a transferência induzida pela luz de um elétron para um aceptor, contra um gradiente de potencial eletroquímico.

Os elétrons do fotossistema II fluem para o fotossistema I através do complexo citocromo *bf*, que bombeia prótons para dentro do espaço tilacóide quando os elétrons são transferidos de $QH_2$ para a plastocianina, uma proteína hidrossolúvel. No fotossistema I temos a transferência de elétrons da plastocianina para o centro de reação P700 e daí para a ferredoxina, um redutor poderoso.

A ferredoxina (=NADPredutase) catalisa então a formação de NADPH. Portanto, a interação dos fotossistemas I e II leva à transferência de elétrons da água para o NADPH e à concomitante geração de um gradiente de prótons para síntese de ATP. O ATP e o NADPH formados são usados para converter $CO_2$ em hexose e outros compostos orgânicos. Três ATP e dois NADPH são consumidos para cada $CO_2$ convertido em hexose. Quatro fótons são absorvidos pelo fotossistema I e outros quatro pelo fotossistema II

para gerar dois NADPH e um gradiente de prótons suficiente para impelir a síntese de três ATP (STRYER, 1992; HENDRY, 1996).

Os fatores internos limitantes do processo fotossintético são teor de clorofila, acúmulo de produtos da fotossíntese, influência de enzimas protoplasmáticas e presença de pequenas quantidades de constituintes minerais. Os fatores externos, por sua vez, são qualidade e quantidade de luz, temperatura, concentração de gás carbônico e de oxigênio (HALL & RAO, 1977).

O papel das clorofilas no processo fotossintetizante é central, porém, os pigmentos auxiliares como carotenóides e ficobiliproteínas exercem funções essenciais (HENDRY, 1996).

Pouca luz azul ou vermelha, ou seja, contida no espectro de absorção das clorofilas, alcança as algas que vivem a uma profundidade de 1metro ou mais no mar. Esta luz é absorvida pela água e por moléculas de clorofila em organismos que vivem acima.

As cianobactérias contêm complexos protéicos denominados ficobilissomos, os quais contém pigmentos acessórios (ficobiliproteínas), que as tornam capazes de colher a luz verde e amarela. Os ficobilissomos ligam-se à face externa das membranas tilacóides, onde servem de antenas de absorção de luz para encaminhar a energia de excitação para os centros de reação do fotossistema II. Têm absorção máxima na região de 470 a 650nm, no vale entre os picos de absorção no azul e no vermelho pela clorofila *a* (CIFERRI &TIBONI, 1985; STRYER, 1992).

As ficobiliproteínas absorvem energia solar através de grupos lineares tetrapirrólicos, os quais são ligados covalentemente à apoproteínas e não são associados a íons metálicos. Existem três classes principais de ficobiliproteínas: ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina (MAcCOLL, 1982).

Ficobilissomos são complexos bem grandes (vários milhões de dáltons) com muitas subunidades de ficobiliproteínas. Nestes complexos, a energia de excitação gerada pela luz absorvida é transferida de uma ficobiliproteína para outra, na seguinte sequência:

ficoerítrina → ficocianina → aloficocianina → clorofila do centro de reação do fotossistema II (CIFERRI & TIBONI, 1985; STRYER, 1992).

A ficocianina é o principal pigmento fotossintetizante acessório e pode ser usada como nutriente para animais e humanos e como corante natural (BOUSSIBA & RICHMOND, 1979). Em várias espécies de algas, quando as células são cultivadas sem limitação de fonte de nitrogênio, as ficobiliproteínas compreendem uma porção significante do total protéico celular (HENDRY, 1996).

A iluminação muito forte dos cultivos de algas gera dois efeitos prejudiciais:

- fotoinibição, que leva à um decréscimo no rendimento máximo do crescimento;
- fotoxidação, que tem efeitos letais nas células, podendo levar à perda total da cultura (JENSEN & KNUTSEN, 1993).

O fenômeno de inibição do crescimento pelo excesso de luz é comum a todos os organismos fotossintéticos que envolvem oxigênio e o alvo primário a ser atingido é o fotossistema II, responsável pela catálise da reação de quebra da molécula de água. Deste modo, a luz deve inibir um dos processos chaves na conversão fotossintética de energia (BARBER & ANDERSSON, 1992).

A fotoinibição ocorre com o aumento da intensidade luminosa acima do nível de saturação da taxa fotossintética. Entretanto, este fenômeno também pode ocorrer sob intensidades luminosas moderadas se a taxa fotossintética estiver limitada por fatores estressantes, como baixas temperaturas por exemplo (SAMUELSON et al., 1985).

Em um estudo realizado com microalgas, JENSEN & KNUTSEN (1993) verificaram que a fotoinibição é maior a 20-25°C, intermediária a 30°C e não aparente a 35-38°C.

VONSHAK et al. (1994) demonstraram que altas intensidades luminosas rapidamente conduziam à fotoinibição em cianobactérias, não apenas em condições laboratoriais, mas também em cultivos abertos, causando perdas, atingindo 30% do potencial produtivo.

A *Spirulina* sp. requer muito mais luz para fotossíntese e crescimento do que as outras cianofíceas. A demanda energética dos processos fisiológicos na alga cultivada em pH e salinidade altos provavelmente aumenta a taxa de respiração em relação à taxa de crescimento. Isto inclui atividades reguladas por enzimas, como osmoregulação em meio hipertônico e captação e conversão de bicarbonato em gás carbônico para fotossíntese. Sob condições de iluminação limitadas, o alto conteúdo de pigmentos aumenta a capacidade das células de absorverem fótons. Porém, um conteúdo máximo de clorofila deve ser encontrado em níveis de iluminação intermediários, nos quais o ganho pelo investimento em clorofila nova balanceia o custo da síntese (KEBEDE & AHLGREN, 1996).

### 3.6- SISTEMAS DE CULTIVO

Convencionalmente, microalgas são desde longo tempo cultivadas fotoautotroficamente em tanques abertos para produção de alimentos. Esta forma de cultivo possui algumas desvantagens como baixa densidade de células, contaminação potencial por outros microrganismos e dificuldade para controlar fatores ambientais como intensidade luminosa e temperatura. Recentemente, têm sido propostas várias técnicas alternativas incluindo fotobiorreatores e processos heterotróficos (CHEN et al., 1996; CHEN & ZHANG, 1996).

São conhecidos três diferentes sistemas para cultivo de *Spirulina* sp., dependendo da matéria-prima usada e do destino da biomassa obtida:

1 – Sistema no qual uma cultura de alga selecionada é cultivada em um processo denominado "limpo", usando água fresca, nutrientes minerais e fonte adicional de carbono. A alga produzida é utilizada principalmente para alimentação humana.

2 – Sistemas usando águas residuárias industriais e de esgoto como meio de cultura sem a adição de minerais e carbono. Nestas plantas a população de algas compreende várias espécies na presença de uma grande quantidade de bactérias. O mais importante deste sistema é o tratamento das águas residuárias e a obtenção de biomassa que pode ser usada para

ração animal se não contiver substâncias tóxicas, ou como substrato para produção de energia.

3 – Cultivo da alga em sistemas fechados – fermentador - através de luz solar ou artificial, sendo realizado em modo completamente autotrófico (BECKER, 1981).

O cultivo de algas usualmente é feito em tanques rasos construídos de vários materiais, como plástico, concreto, fibra de vidro, alvenaria ou laminados. O tamanho varia de alguns metros quadrados a milhares, com formas variando de circular a longos canais (BECKER, 1981).

No inverno, em regiões temperadas e subtropicais, os tanques para a produção de *Spirulina* sp. devem ser cobertos para evitar oscilações de temperatura, evitando congelamento do sistema durante a noite. Além disso, este procedimento reduz perdas por evaporação e contaminação por sujeiras e insetos. O sistema fechado tem como principais desvantagens diminuir a penetração da luz solar e ocorrência de condensação de água na superfície interna da cobertura, reduzindo ainda mais a penetração da luz (RICHMOND,1988).

## 3.7- CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os principais fatores que influenciam na produção de *Spirulina* sp. são nutrientes, temperatura e luminosidade (BECKER, 1981; SANTILLAN 1982; RICHMOND, 1988).

Nitratos são a principal fonte de nitrogênio assimilada pela *Spirulina* sp., mas sais de amônio também podem ser usados contanto que a concentração seja inferior a 100 mg $N.L^{-1}$. A uréia também pode ser usada a um pH de 8,4 com concentrações inferiores a 1,5 $g.L^{-1}$ (RICHMOND, 1988). Segundo BOUSSIBA (1989), quando tanto nitrato quanto amônia estão presentes no meio de cultura, a amônia é utilizada preferencialmente. A ficocianina pode servir como reservatório de nitrogênio quando a alga é cultivada sob concentrações favoráveis de nitrogênio (BOUSSIBA & RICHMOND, 1979).

De acordo com PIORRECK et al. (1984), o conteúdo de clorofila na biomassa de algas aumenta com o incremento na concentração de nitrogênio no meio de cultura.

ABELIOVICH & AZOV (1976), em experimento realizado com microalgas verdes-azuladas em culturas com amônia, observaram inibição do crescimento por esta substância. A amônia demonstrou um efeito inibitório na fotoassimilação de $CO_2$ em pH alcalino. A concentração de amônia necessária para inibição da fotossíntese mostrou-se inversamente proporcional ao pH da mistura reacional.

A captação de amônia por *S. platensis* parece ser pH dependente. Sob pH ótimo (meio alcalino), a entrada de amônia na célula é primeiramente um processo de difusão direcionado pelo gradiente de pH e pela assimilação de amônia intracelular, dependente da enzima glutamato sintetase. Seguindo esta rápida entrada inicial, a atividade contínua da glutamato sintetase mantém a captação de amônia através da redução de sua concentração interna (BOUSSIBA, 1989).

Segundo relatos de STANCA & POPOVICI (1996), a utilização de uréia como fonte de nitrogênio no cultivo de *S. platensis* aumenta a produção de biomassa, além de acarretar em um incremento na quantidade de clorofila nesta.

ALLISON et al. (1954) observaram que quando uréia foi utilizada para alimentar a alga *Nostoc muscorum*, esta substância foi primeiramente hidrolisada por urease gerando amônia e gás carbônico, que foram então utilizados pela alga. BERNS et al. (1966), por sua vez, demonstraram a presença de urease em culturas e extratos de células de algas, sendo que a maior taxa de atividade enzimática foi encontrada nas cianofíceas.

O cultivo de *Spirulina* sp. com uréia também pode causar intoxicação, se a quantidade utilizada não for adequada, devido à hidrólise da mesma a amônia em meio alcalino. A utilização de processo descontínuo alimentado com vazão exponencialmente crescente é um modo de superar este inconveniente da utilização de uréia, uma vez que torna-se possível o ajuste da velocidade de adição à velocidade de consumo pelo microrganismo

(PIRT, 1974). CEZZARE (1998) realizou cultivo de *S. platensis* utilizando uréia em processo descontínuo alimentado com vazão de alimentação exponencialmente crescente e observou crescimentos melhores que o obtido com o meio de cultura padrão com $KNO_3$.

Segundo relatos de CHEN et al. (1996), a utilização de meios de cultura suplementados com carbono solúvel em reatores estéreis pode favorecer a produção de ficocianina. A *S. platensis* é capaz de utilizar carbono orgânico como substrato para crescimento heterotrófico e mixotrófico. Porém, o crescimento heterotrófico não é adequado para produção de ficocianina dado que este é um pigmento fotossintético acessório. Posteriormente, foi observado que esta alga cresce muito mais em meio suplementado com glicose do que sob condições fotoautotróficas. Em uma cultura foto-heterotrófica a fonte de carbono e a intensidade luminosa são os fatores mais importantes que influenciam o crescimento e a composição celular da microalga.

MARQUEZ et al. (1995) observaram que as quantidades de biomassa algal e de pigmentos produzidos sob condições mixotróficas foram aproximadamente 1,5 a 2,0 vezes maiores que o obtido em culturas autotróficas.

Tanto o sódio quanto o potássio são indispensáveis no meio de cultura. Quando a razão $K^+$:$Na^+$ é maior do que 5 ocorre inibição do crescimento (RICHMOND, 1988).

Estudos utilizando água do mar para cultivar *Spirulina* sp. foram realizados visando diminuição de custos. FAUCHER et al. (1979) verificaram que a água do mar apresenta deficiência de sais de fosfato, nitrato e bicarbonato, sendo necessária a suplementação deste meio com estes nutrientes. Porém, com a suplementação ocorre precipitação dos íons carbonato e fosfato com os cátions de cálcio e magnésio, presentes em grandes quantidades na água do mar. O meio resultante, turvo, reduz e limita o crescimento da alga. Portanto, deve-se remover o excesso destes cátions antes de realizar-se o cultivo. A água do mar devidamente tratada constitui um meio de cultura tão bom quanto os meios sintético conhecidos

para *S. máxima*, sendo que uréia pode ser utilizada no lugar de $NaNO_3$, em quantidades menores, produzindo o mesmo rendimento.

A *Spirulina* sp. é um alga mesofílica, tendo sua temperatura ótima entre 35-37°C, sendo que a 40°C já ocorrem danos à célula. A temperatura mínima que ainda permite algum crescimento da alga é de aproximadamente de 18°C (RICHMOND, 1988). Alta alcalinidade é essencial para o crescimento, sendo que a taxa de pH ótimo é de 8,3 a 11.

Quando temperatura e nutrientes não estão limitando o crescimento da *Spirulina* sp., a luminosidade disponível torna-se o fator limitante dominante. A disponibilidade de luz para cada célula em culturas fotoautotróficas é função da intensidade e duração da irradiação, assim como da concentração de células que afeta a extensão de sombra (BECKER, 1981; RICHMOND, 1988).

A densidade populacional tem sido considerada fator relevante na produção desta microalga. Isto deve-se ao fato de que, sob condições de iluminação limitada, a manipulação da densidade populacional representa o único meio pelo qual a quantidade de energia disponível para a célula individual na cultura pode ser influenciada.

Medidas do efeito da densidade populacional sobre a atividade potencial fotossintética, revelam uma relação inversa entre a taxa de potencial fotossintético específico e a densidade populacional no tanque. Portanto, quanto maior a densidade, menor é a taxa fotossintética.

Em culturas densas, as células são expostas a radiações intermitentes que impõem um ciclo de claro-escuro ao qual a maioria dos filamentos de *Spirulina* sp. são continuamente expostos. Este ciclo pode ser realizado em alguns segundos ou alguns décimos de segundos e se dá em função da velocidade com que as células se movimentam de um lado para o outro e da penetração da luz no tanque.

Uma baixa densidade populacional e um alto crescimento específico são também esperados em sistemas em que primariamente a luz é limitada. O efeito relativo do decréscimo da densidade populacional e o aumento da taxa de utilização de luz pela célula são mais pronunciados no verão, e

muito menos no inverno, quando a temperatura é o fator ambiental mais importante, limitando a taxa de crescimento. No verão, a luz é o principal fator limitante no crescimento e a cultura responde muito mais marcadamente à mudanças.

A relação entre densidade populacional e alta produtividade de *Spirulina* sp. através das estações do ano, tem sido investigada. O declínio na taxa de produtividade foi sempre associado com uma densidade populacional acima de 500-600 $mg.L^{-1}$, diminuindo aparentemente com o incremento da energia de manutenção relativa à atividade fotossintética como um todo. Um decréscimo da densidade populacional abaixo do ponto ótimo também resulta em um decréscimo significante na taxa de produtividade. Isto indica que altas taxas de irradiação solar por unidade de área não podem ser interpretadas como pico de eficiência quando a densidade populacional é relativamente baixa. Um ponto essencial é que a máxima taxa de produtividade é obtida a densidades populacionais relativamente altas exibindo taxas de crescimento específicas de aproximadamente 50% do máximo (RICHMOND, 1988).

Um fator básico que modifica o efeito da densidade populacional em culturas de *Spirulina* sp. é a agitação. Observações indicam que um regime turbulento é muito importante para a produção máxima, sendo que a função mais importante da agitação é garantir que um regime favorável de iluminação seja mantido (BECKER, 1981; BENEMANN, et al., 1987; RICHMOND & QIANG, 1997).

Fluxos essencialmente laminares e lentos resultam em uma baixa eficiência de conversão de energia solar não apenas por exposição insuficiente em algumas partes da cultura, mas também porque a camada superior do tanque é exposta a uma irradiação tão intensa que pode causar danos às células, levando à fotoinibição e foto-oxidação. Por esta mesma razão, uma mudança abrupta na concentração celular, como uma grande diluição, também é prejudicial à cultura (RICHMOND, 1988).

A profundidade do tanque é importante para garantir adequada capacidade de armazenamento de $CO_2$. A perda desta substância aumenta

com alta alcalinidade e altas velocidades de agitação (BENEMANN et al., 1987).

Uma das principais dificuldades na produção comercial de microalgas é a coleta da biomassa, isto é, a remoção das células do meio de cultura, devido ao seu reduzido tamanho, sendo necessário recorrer à processos que elevam muito o custo de produção, como a centrifugação por exemplo. No caso da *Spirulina* sp., este problema não ocorre porque os filamentos possuem dimensões que permitem sua remoção do meio de cultura por filtração (BECKER, 1981; RICHMOND, 1982).

Após a coleta, a biomassa deve ser submetida a uma homogeneização, sendo o fluido obtido pasteurizado para eliminação de contaminação microbiana e destinado a secagem ao sol, em secadores tipo tambores ou por "spray-drying". A secagem em secadores tipo tambores promove uma ruptura da parede celular da célula, aumentando a digestibilidade das proteínas, e ao mesmo tempo uma descontaminação do produto. Devido à ausência de celulose na parede celular, *Spirulina* sp. não necessita de tratamentos químicos e físicos para melhorar a sua digestibilidade. A remoção da umidade através de uma simples secagem ao sol é suficiente como tratamento pós-colheita (BECKER, 1981; SANTILLAN, 1982; DILLON et al., 1995).

### 3.8- USOS DIVERSOS DA *Spirulina platensis*

Mais de 50 produtos feitos com *Spirulina* sp. têm sido explorados comercialmente, destacando-se o uso como suplemento em dietas na forma de cápsulas, tabletes e pós, ou incorporados à composição de cereais, biscoitos e confeitos nutritivos nos quais é possível incrementar o conteúdo de proteína em até 18%. Atualmente, nos Estados Unidos, estes produtos são usado em larga escala por pessoas que desejam perder peso sem sofrer fome ou desnutrição (SANTILLAN, 1982).

Quando o objetivo da produção de *Spirulina* sp. é a obtenção de componentes químicos diversos como por exemplo vitaminas, pigmentos, enzimas e outros, a biomassa é submetida a processos de extração e

purificação para isolamento destes componentes e o material remanescente pode ainda ser utilizado como ração animal (CIFERRI & TIBONI, 1985; BOROWITZKA, 1995).

A biomassa de *Spirulina* sp. tem sido utilizada em estudos pilotos como um agente de tratamentos de águas residuárias e recuperação de efluentes. Assim como os outros organismos fotossintetizantes, esta alga tem a capacidade não só de produzir oxigênio, levando a uma redução da DBO (demanda bioquímica de oxigênio), mas também de remover nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo, diminuindo o potencial de eutroficação do meio. A biomassa recuperada devidamente sanitizada pode ser utilizada como ração ou destinada à extração de componentes químicos. Alternativamente, a biomassa ou o resíduo, após extração de produtos químicos, pode fornecer uma fonte de combustível ou para a produção de metano (CIFERRI & TIBONI, 1985; BENEMANN et al., 1987; AARONSON et al., 1980; BECKER, 1981).

Ultimamente, maior atenção tem sido dada ao desenvolvimento potencial de *S. platensis* para obtenção de produtos químicos e farmacêuticos de alto valor como ficocianinas, carotenóides, clorofilas e ácido $\gamma$-linolênico, e à tentativa de selecionar organismos que possam acumular grandes quantidades destas substâncias e melhoramento de meios e condições de cultivo (BOROWITZKA, 1995; CHEN et al., 1996; CHEN & ZHANG, 1996).

Dentre estes componentes sintetizados por microalgas, a clorofila tem sido pouco investigada. Estudos referentes a culturas de microalgas sob condições controladas em laboratório revelaram que conteúdo de minerais no meio de cultura, intensidade luminosa e idade celular são os principais fatores que influenciam a concentração de clorofila na biomassa. A quantidade de clorofila obtida em culturas pouco iluminadas é maior do que em culturas sob iluminação intensa, sugerindo que a relação entre o conteúdo de clorofila e a iluminância seja inversamente proporcional. Interação entre os efeitos da temperatura e iluminância no acúmulo de clorofila tem sido observada (BOGORAD,1962; ELORANTA, 1986).

# 4- MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Fermentações do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - FCF/USP.

## 4.1- MATERIAL

O microrganismo utilizado, *Spirulina platensis*, foi cedido pelo Prof. Dr. Rogério Lacaz Ruiz, do Laboratório de Microbiologia Zootécnica da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga.

O meio de cultura utilizado foi o de PAOLETTI et al. (1975) adaptado, conforme composição a seguir.

Composição do meio padrão de PAOLETTI adaptado ($g.L^{-1}$):

$NaCl$.....0,92

$Na_2SO_4$.....1,88

$K_2HPO_4$.....0,50

$Na_2CO_3$.....8,89

$NaHCO_3$.....15,15

$CaCl_2.2H_2O$.....0,05

$KNO_3$.....2,57

$MgSO_4.4H_2O$.....0,25

Solução de Fe-EDTA*.....1,0mL

Solução de microelementos**.....1,0mL

*Solução de Fe-EDTA ($g.L^{-1}$):

| | |
|---|---|
| $EDTA\text{-}Na_2$ | 29,8 |
| $FeSO_4.7H_2O$ | 24,9 |

**Solução de microelementos ($g.L^{-1}$):

| | |
|---|---|
| $Na_2MoO_4.2H_2O$ | 0,39 |
| $MnCl_2.4H_2O$ | 1,54 |
| $H_3BO_3.4H_2O$ | 2,86 |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | 0,02 |
| $CuSO_4.5H_2O$ | 0,08 |
| $CoCl_2.6H_2O$ | 0,04 |

O preparo do meio consistiu na dissolução dos sais em água destilada, com agitação.

Os ensaios foram realizados em tanques abertos, representados na figura 3. Devido à alta alcalinidade e salinidade do meio de cultura, tornou-se possível o trabalho em tanques abertos, dado que estas condições são adversas ao crescimento de outros microrganismos.

Foram utilizados somente reagentes de grau analítico. Os utensílios de laboratório utilizados nas análises já encontravam-se disponíveis no laboratório.

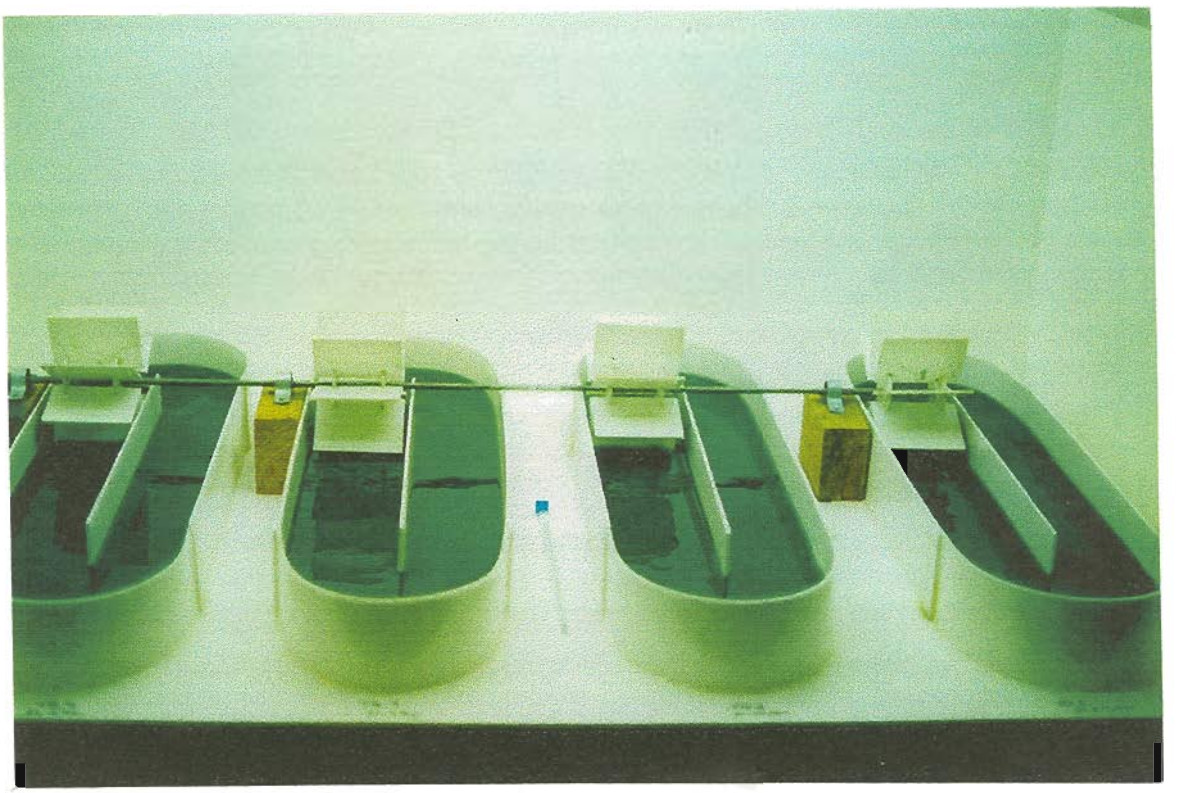


**FIGURA 3-** Tanques de cultivo de *Spirulina platensis*.

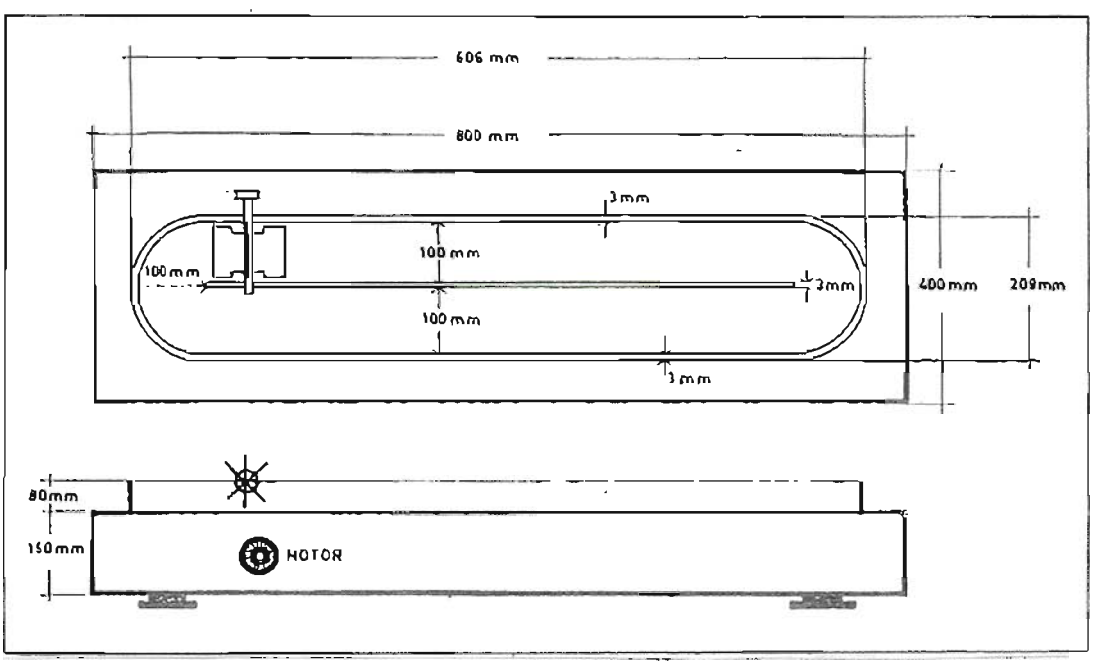



**FIGURA 4-** Esquema técnico dos tanques de cultivo de *Spirulina platensis*

## 4.2- MÉTODOS

### 4.2.1- CONDIÇÕES DE CULTIVO

Utilizou-se um volume de cultivo de 5L e agitação por meio de pás giratórias com uma frequência de 18rpm, nos tanques abertos (figura 3). A temperatura ambiente foi mantida em 30 ± 2°C por meio de aparelho condicionador de ar. O pH inicial dos cultivos foi 9,5 ± 0,2, ocasionado pela própria composição do meio de cultura, sendo que não houve correção do mesmo ao longo crescimento. A concentração celular inicial dos cultivos foi sempre de $50mg.L^{-1}$. A iluminação dos cultivos variou segundo o planejamento experimental (item 4.2.4.2). Foram utilizadas lâmpadas fluorescentes de 40W de potência, posicionadas sobre os tanques de cultivo, sedo variada a distância de modo a fornecer o valor de iluminância desejado em cada cultivo.

### 4.2.2- INÓCULO E MANUTENÇÃO DA CEPA

Os cultivos para preparo de inóculos e manutenção da cepa foram realizados em frascos Erlenmeyers de 500mL previamente esterilizados em estufa a 150°C por 2 horas, contendo um volume de aproximadamente 250mL, sob agitação em agitador rotatório tipo "Shaker" (figura 5), a 30°C e iluminamento de 3500lux. Antes da inoculação, realizava-se uma filtração do meio de cultura em membrana de acetato de celulose de 47mm de diâmetro e 0,45μm de porosidade, pois a autoclavagem provoca turvação do mesmo (CEZARE, 1998). Os cuidados com assepsia visaram uma redução da carga microbiana contaminante inicial. Os cultivos em frascos Erlenmeyers foram repicados periodicamente para manutenção da cepa.

Para o preparo de inóculo, quando estes cultivos encontravam-se em fase de máxima velocidade de crescimento, realizava-se a filtração dos mesmos através de uma tela filtrante de 50μm de porosidade. As células eram então lavadas com água destilada e ressuspensas em meio de cultura padrão sem nitrato de potássio. Esta suspensão celular era utilizada como inóculo dos cultivos em tanque, tomando-se sempre um volume que

fornecesse células suficientes para garantir a concentração celular inicial nos tanques de $50mg.L^{-1}$. Este procedimento teve como finalidade a eliminação do nitrato de potássio, no inóculo, que poderia influenciar os cultivos realizados com uréia como fonte de nitrogênio.

**FIGURA 5**- Cultivos em frascos Erlenmeyers

### 4.2.3- MÉTODO DE CULTIVO UTILIZADO

Os cultivos de *S. platensis* com nitrato de potássio como fonte de nitrogênio (ensaios padrões) – meio de PAOLETTI et al. (1975) - foram realizados utilizando-se processo descontínuo (bateladas clássicas).

A uréia, em meio aquoso alcalino, sofre hidrólise liberando amônia e gás carbônico.

$$NH_2CONH_2(aq.) + H_2O \xrightarrow{OH^-} 2NH_3(aq.) + CO_2(g)$$

A amônia, em concentrações elevadas, apresenta toxicidade à *Spirulina* sp.. Para contornar este problema, nos cultivos realizados com meio de PAOLETTI et al. (1975) com substituição do nitrato de potássio por uréia utilizou-se o processo descontínuo alimentado com vazão de alimentação exponencialmente crescente, de acordo com a equação a seguir:

$$Mu = Mo \cdot e^{kT}$$

Onde: Mu = massa de uréia acumulada (mg)
Mo = massa inicial de uréia (mg)
$e$ = base do logaritmo neperiano
T = tempo (dias)
k = constante de tempo ($dias^{-1}$)

A massa inicial de uréia foi fixa em 400mg. Dado que a massa de uréia total a ser utilizada no cultivo (Mut) é equivalente à Mu correspondente ao T=Ta (tempo de alimentação), conhecendo-se os valores de Mut e Ta é possível calcular o valor de k ($Mut = Mo \cdot e^{kTa}$), que será utilizado na equação acima para o cálculo de Mu em cada tempo. Foi utilizado um Ta de 14 dias, de acordo com SASSANO (1999). A alimentação foi realizada com intervalos de um dia, de modo que a adição de uréia ocorreu sempre nos tempos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 (CEZARE, 1998). As tabelas de adição de uréia relativas às massas utilizadas estão expressas no Apêndice.

### 4.2.4- EXPERIMENTOS REALIZADOS

#### 4.2.4.1- ENSAIOS PRELIMINARES

##### 4.2.4.1.1- MICROGRAFIA ÓTICA DA *Spirulina platensis*

Para comparação da microalga cultivada em frascos Erlenmeyers e em tanques, foram feitas lâminas "a fresco", as quais foram analisadas em microscópio óptico OLYMPUS – BX60. As micrografias obtidas estão apresentadas nas figuras 8, 9, 10 e 11 (item 5.1.1).

##### 4.2.4.1.2-CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

O crescimento celular ao longo dos cultivos foi acompanhado por turbidimetria, sendo portanto necessária a construção de uma curva de calibração. Retirou-se uma alíquota de 50mL de um cultivo em fase exponencial de crescimento e filtrou-se em membrana de acetato de celulose previamente pesada (0,8μm de porosidade). A biomassa filtrada foi lavada com água destilada para remoção de sais provenientes do meio de cultura e então a membrana foi levada à secagem em estufa a 105°C até peso constante. O peso da biomassa foi calculado por diferença dos valores das pesagens da membrana antes e depois da filtração, e então dividido pelo volume filtrado de modo a obter-se a concentração celular do cultivo. A partir deste valor, foram preparadas diferentes diluições desta mesma suspensão celular. Alíquotas destas diluições foram retiradas para leitura de transmitância em comprimento de onda de 560nm, utilizando-se água destilada como branco. Deste modo, obteve-se uma curva relacionando concentração celular com o logaritmo da transmitância. Foram construídas duas curvas, uma relativa ao crescimento em frascos Erlenmeyers (figura 12 - item 5.1.2), e outra para os cultivos realizados em tanques (figura 13 - item 5.1.2).

**4.2.4.1.3- CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO PADRÃO DE *Spirulina platensis* E ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO CENTESIMAL**

A fim de observar o comportamento típico de uma cultura de *S. platensis*, foi construída uma curva de crescimento padrão em tanque, por meio de processo descontínuo (batelada clássica), utilizando-se iluminação de 3500lux, e meio de cultura padrão de PAOLETTI et al. (1975). A curva obtida está apresentada na figura 14 do item 5.1.3. Com a biomassa obtida, foram realizadas análises de composição centesimal, sendo que o resultado destas está expresso na figura 15 do item 5.1.3.

**4.2.4.1.4- DETERMINAÇÃO DA MASSA DE URÉIA A SER UTILIZADA COMO VALOR CENTRAL NO PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO**

Para a determinação do valor central de massa de uréia a ser utilizado no planejamento estatístico, realizou-se um ensaio prévio composto de três cultivos contendo 2250, 2500 e 2750mg de uréia em 5L de cultivo respectivamente, e iluminação de 3500lux, com base nos trabalhos de CEZARE (1998) e SASSANO (1999). As curvas de crescimento obtidas estão expressas na figura 16 do item 5.1.4.

**4.2.4.1.5- VERIFICAÇÃO DO INTERVALO DE ALIMENTAÇÃO A SER UTILIZADO**

Para verificar-se as possíveis influências da utilização de alimentação diária com uréia, foi realizado um ensaio prévio que consistiu em dois cultivos com massa de uréia e valor de iluminância correspondentes ao ponto central (2500mg e 3500lux, respectivamente), sendo em um deles feita a adição do modo anteriormente descrito, ou seja, em dias alternados, e no outro, diariamente (com tempo de alimentação também de 14 dias). Os resultados obtidos estão apresentados na figura 17 do item 5.1.5.

#### 4.2.4.2- PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O estudo da influência da luz e utilização de uréia no cultivo de *S. platensis* foi realizado através de um planejamento estatístico denominado Metodologia de Superfície de Resposta (ou RSM, *de Response Surface Methodology*), o qual permite uma redução do número de ensaios realizados.

A metodologia de superfície de resposta é uma técnica de otimização baseada no emprego de planejamentos fatoriais, introduzida por G. E. P. Box, na década de 1950, e que desde então tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais. A modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos lineares ou quadráticos a resultados experimentais obtidos a partir de planejamentos fatoriais (NETO et al., 1996).

Foi utilizado um modelo denominado "planejamento em estrela", que consiste em um modelo linear de duas variáveis em dois níveis ($2^2$) mais o ponto central, adicionado de um planejamento idêntico porém girado de 45 graus em relação à orientação de partida, resultando em uma distribuição octogonal, como mostra a figura 6.

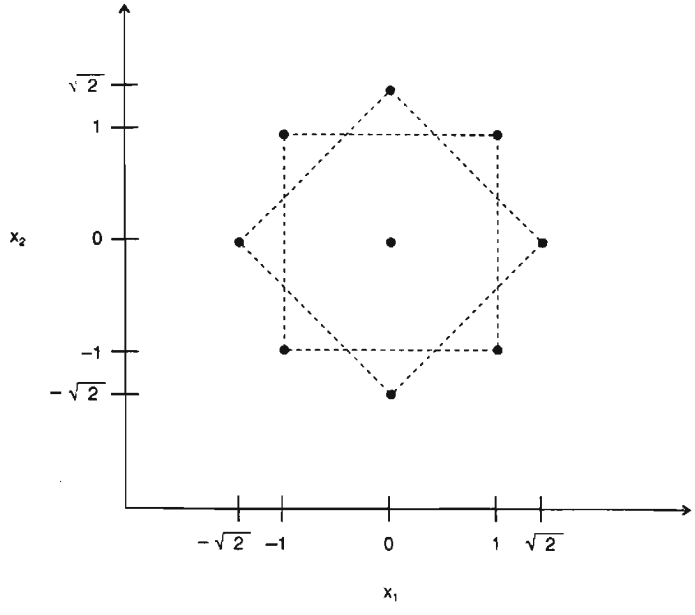



**FIGURA 6-** Planejamento experimental em estrela - FONTE: BARROS NETO et al., 1996.

Considerando-se Mutc a variável codificada para massa total de uréia adicionada (Mut), e Ec a variável codificada para iluminância (E), obtém-se a combinação de experimentos a serem realizados, expressa na tabela 3. Os valores codificados são obtidos a partir da equação:

$$Vc = \frac{Vr - Pc}{i}$$

onde: *Vr* = valor real da variável

*Vc* = valor codificado da variável

*Pc* = valor real referente ao ponto central

*i* = intervalo (entre o valor real e o ponto central)

**TABELA 3-** Matriz de ensaios do planejamento fatorial em estrela das variáveis massa de uréia total (Mut) e iluminância (E) e seus valores codificados (Mutc e Ec)

| ENSAIO | Mut (mg) | E (lux) | Mutc | Ec |
|---|---|---|---|---|
| A | 1900 | 2000 | -1 | -1 |
| B | 3100 | 2000 | 1 | -1 |
| C | 1900 | 5000 | -1 | 1 |
| D | 3100 | 5000 | 1 | 1 |
| E | 2500 | 3500 | 0 | 0 |
| F | 2500 | 3500 | 0 | 0 |
| G | 2500 | 3500 | 0 | 0 |
| H | 1660 | 3500 | -1,4 | 0 |
| I | 3340 | 3500 | 1,4 | 0 |
| J | 2500 | 5600 | 0 | 1,4 |
| K | 2500 | 1400 | 0 | -1,4 |

Os ensaios F e G são apenas repetições do ponto central E, realizados para verificação da reprodutibilidade do mesmo.

Os ensaios foram agrupados de acordo com a iluminância a ser utilizada, devido à dificuldade de se obter um valor específico de iluminância em cada tanque, sendo mais viável o controle deste parâmetro em todo o conjunto de tanques. Em cada grupo, foi incluído um ensaio padrão utilizando meio de PAOLETTI et al. (1975) original (tabela 6 - item 5.2).

Vários trabalhos referentes à *S. platensis* foram realizados com iluminação de 3500lux como padrão (FERRAZ, 1985; CEZARE, 1998; FAINTUCH, 1989; SASSANO, 1999). Portanto, este valor foi escolhido como ponto central de iluminância, sendo variado, de acordo com o planejamento estatístico, dois níveis acima e dois níveis abaixo.

### 4.2.5- DESCRIÇÃO DE UM ENSAIO

O tanque contendo meio de cultura era inoculado de modo a apresentar uma concentração celular inicial de $50mg.L^{-1}$, como mencionado anteriormente, com as condições de cultivo referentes ao ensaio em questão ajustadas. A iluminância estabelecida era verificada diariamente através de leitura em Luxímetro da marca SEKONIC, modelo 246.

Diariamente, eram retiradas alíquotas de 20mL para medidas de concentração celular e pH. Devido ao fato de os tanques serem abertos, ocorre perda significativa de água por evaporação. Portanto, antes da retirada das amostras, era necessário corrigir o volume de cultivo através da adição de água (no início do crescimento, anota-se a altura do líquido no tanque, correspondente aos 5L de cultivo). Nos dias em que se realizava a alimentação com uréia, retirava-se volumes maiores de amostras (50mL) para análise de consumo de carbonato e determinação de concentração de amônia livre. Estas análises eram realizadas com o cultivo filtrado, ou seja, isento de células. A amostragem era feita antes da adição de uréia, para que não ocorresse interferência na determinação da amônia livre. Quando atingia-se 10 dias, ou seja, com o cultivo em fase de crescimento máximo, a análise de conteúdo de clorofila era realizada.

Ao final da fase exponencial (início da fase estacionária), o crescimento era interrompido, a biomassa era então filtrada em membranas com poros de 50μm de diâmetro e seca em estufa a 55°C por 12horas. Com a biomassa seca realizava-se análises de fração lipídica e proteínas.

### 4.2.6- TÉCNICAS ANALÍTICAS

#### 4.2.6.1- DETERMINAÇÃO DE pH

Para o acompanhamento diário do pH, utilizou-se um potenciômetro da marca ANALYSER, modelo pH ION 400. Antes de realizar as leitura referentes às amostras dos cultivos, uma calibração era feita com auxílio de soluções-tampão de pH 9 e 12.

#### 4.2.6.2- DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO CELULAR

O crescimento dos cultivos foi acompanhado por turbidimetria, como mencionado anteriormente, utilizando-se espectrofotômetro da marca "CELM", modelo E-225D. Realizava-se a leitura de transmitância da amostra em comprimento de onda de 560nm e caminho ótico de 10mm. A partir da curva de calibração de crescimento celular previamente construída, calculava-se a concentração celular referente ao cultivo naquele momento. Para a realização das leituras foi utilizada água destilada como branco, uma vez que o meio de cultura apresenta-se praticamente transparente à semelhança da água. Quando necessário, as amostras eram diluídas para que o valor de trasmitância obtido se enquadrasse na curva de calibração.

#### 4.2.6.3- DETERMINAÇÃO DE CARBONATO TOTAL

O acompanhamento de consumo de carbonato/bicarbonato durante os cultivos foi realizado através de titulometria. Inicialmente, adicionava-se hidróxido de sódio à amostra a ser titulada para a conversão de todo o bicarbonato a carbonato, por deslocamento de equilíbrio. Então titulava-se o carbonato total com ácido clorídrico sendo observados dois intervalos de viragem (ALEXEYEV, s.d.).

#### 4.2.6.4- DETERMINAÇÃO DE AMÔNIA LIVRE

O teor de amônia foi acompanhado durante os cultivos visando-se a observação e prevenção de possíveis níveis desta substância, formada pela hidrólise da uréia, que pudessem ser tóxicos ao microrganismo. Foi utilizado um eletrodo de amônia da marca ORION conectado à um potenciômetro da mesma marca, modelo 710 A, no qual eram realizadas as leituras de corrente elétrica. Devido à existência do equilíbrio entre amônia e o íon amônio no meio de cultivo e ao fato de o eletrodo ser sensível somente à amônia, antes da realização das leituras das amostras, foi necessário adicionar solução de hidróxido de sódio, causando um deslocamento do equilíbrio no sentido de conversão do íon à amônia. As leituras obtidas eram correlacionadas com uma curva de calibração de concentração de amônia versus corrente elétrica. O eletrodo utilizado exige a construção de uma curva de calibração a cada utilização. As curvas foram feitas através de leituras de soluções de cloreto de amônio de concentrações $10^{-1}$, $10^{-2}$, $10^{-3}$, $10^{-4}$ e $10^{-5}$ molar (LEDUY & SAMSON, 1982). A figura 7 apresenta uma das curvas de calibração realizadas, como exemplo, sendo que não foram observadas diferenças significativas entre todas as curvas.

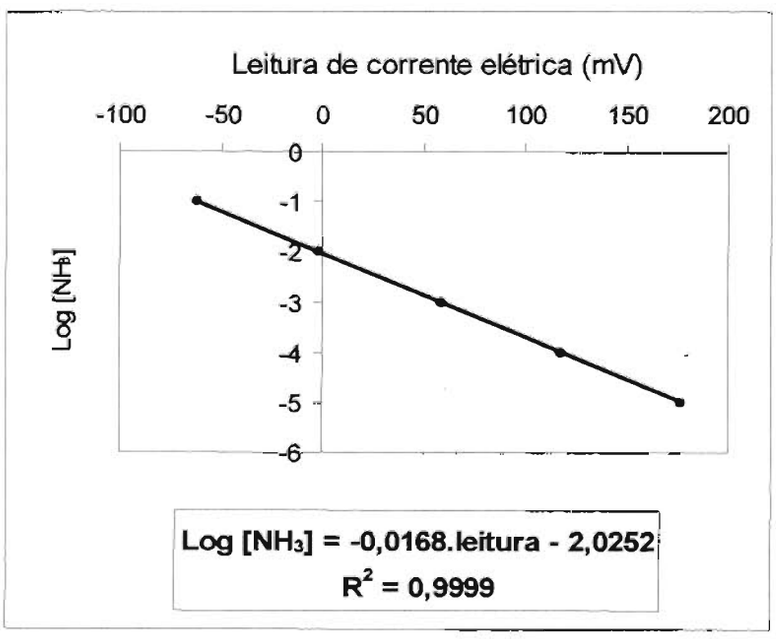



**FIGURA 7**- Exemplo de curva de calibração do eletrodo de determinação de amônia

#### 4.2.6.5- DETERMINAÇÃO DE CLOROFILA

O conteúdo de clorofila das amostras foi determinado por espectrofotometria, sendo desenvolvido um método adequado para a análise de clorofila de *Spirulina platensis*. Um volume equivalente a 5mg de biomassa seca era coletado e filtrado em membrana de acetato de celulose de 0,45μm de diâmetro de porosidade. A membrana contendo a biomassa era então colocada em um tubo imerso em banho de gelo, adicionava-se 10mL de acetona pura e realizava-se a extração com auxílio de um "desintegrador" constituído de um agitador elétrico com a hélice substituída por uma terminação de formato semelhante ao do tubo utilizado na extração. Filtrava-se o extrato de clorofila em acetona através de membrana de politetrafluoretileno de 25mm de diâmetro e 1μm de porosidade, para então realizar-se a leitura espectrofotométrica da solução obtida em $\lambda$ = 661,7nm. A concentração de clorofila $a$ na amostra era calculada através de correlação com uma curva de calibração previamente construída, expressa na figura 18 (item 5.1.6) .

#### 4.2.6.6- COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

As análises de composição centesimal foram realizadas de acordo com as NORMAS ANALÍTICAS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1976).

##### 4.2.6.6.1- DETERMINAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAIS

Utilizou-se o método de Soxhlet, o qual baseia-se na atuação de um solvente orgânico sobre a amostra, a fim de retirar, por solubilização, toda a gordura. Deve-se ter em mente que a fração lipídica engloba ácidos graxos, triglicerídeos, fosfolipídeos, esteróides, hidrocarbonetos, carotenóides e outros pigmentos fotossintéticos (GIOIELLI, 1997).

A amostra (previamente triturada em gral para fornecer maior superfície de contato com o solvente) era transferida para um extrator contínuo de Soxhlet para extração utilizando-se uma mistura de clorofórmio-metanol (2:1 v/v). Ao final da extração, o solvente era recuperado em

aparelho rota-evaporador e a fração lipídica resultante no balão determinada por diferença de pesagem do mesmo antes e depois da extração.

#### 4.2.6.6.2- DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

Para determinação do teor protéico total foi utilizado o método de micro-Kjeldahl, que caracteriza-se pela destruição da matéria orgânica com ácido sulfúrico concentrado, em presença de um catalisador e aquecimento, com posterior destilação e titulação do nitrogênio proveniente da amostra. A digestão é responsável pela transformação do nitrogênio da amostra em sal de sulfato de amônio em solução. Na segunda etapa, após adição de hidróxido de sódio para alcalinização do meio, destila-se a solução com o objetivo de transferir a amônia para uma solução ácida de concentração conhecida (no presente trabalho utilizou-se solução de ácido bórico). A quantificação das proteínas é realizada por titulação da solução contendo o sal de amônio. Foi utilizado o fator de 6,25 para a relação proteína/N.

#### 4.2.6.6.3- DETERMINAÇÃO DE FIBRAS

Esta análise foi realizada através de hidrólise ácida, seguida de hidrólise alcalina, método que simula a digestão "in vivo" causando a digestão de todas as substâncias contidas na amostra com exceção das fibras, as quais são quantificadas no final. As fibras são constituídas em grande parte por celulose (que pode ou não ser acompanhada de lignina), sílica e outros compostos minerais insolúveis.

#### 4.2.6.6.4- DETERMINAÇÃO DE CINZAS

Na determinação de cinzas busca-se conhecer a quantidade total de elementos inorgânicos contidos na amostra (sem pesquisar quais são estes elementos). Esta análise foi realizada através de calcinação completa da amostra previamente dessecada em mufla a 550°C.

#### 4.2.6.6.5- DETERMINAÇÃO DE UMIDADE

Foi utilizado o método termogravimétrico ou dessecação até peso constante, sendo adotada uma temperatura de 105°C. A quantidade de umidade é dada por diferença de peso entre a amostra úmida e seca.

### 4.2.7- CÁLCULOS REALIZADOS

Para cada cultivo, foram realizados cálculos de produtividade ($P_X$), fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) e produção de clorofila ($Pr_{Cla}$), conforme as equações a seguir.

- PRODUTIVIDADE EM CÉLULAS:

$$P_X = \frac{X_{máx.}}{T_f}$$

onde: $P_X$ = produtividade obtida em células ($mg.L^{-1}.dia^{-1}$)

$X_{máx.}$ = concentração celular máxima obtida ($mg.L^{-1}$)

$T_f$ = tempo de fermentação, relativo à concentração celular máxima (dias)

- FATOR DE CONVERSÃO DE NITROGÊNIO EM CÉLULAS:

$$Y_{X/N} = \frac{(X_{máx.} - X_i).V_f}{N_t}$$

onde: $Y_{X/N}$ = fator de conversão de nitrogênio em células expresso em função da quantidade de nitrogênio no substrato (uréia ou $KNO_3$)

$X_{máx.}$ = concentração celular máxima obtida ($mg.L^{-1}$)

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

$V_f$ = volume de fermentação (L)

$N_t$ = quantidade to.tal de nitrogênio no substrato utilizado (mg)

- PRODUTIVIDADE EM CLOROFILA:

$$P_{Cla} = \frac{[Cla] \, . \, X_{máx.}}{T_{10}}$$

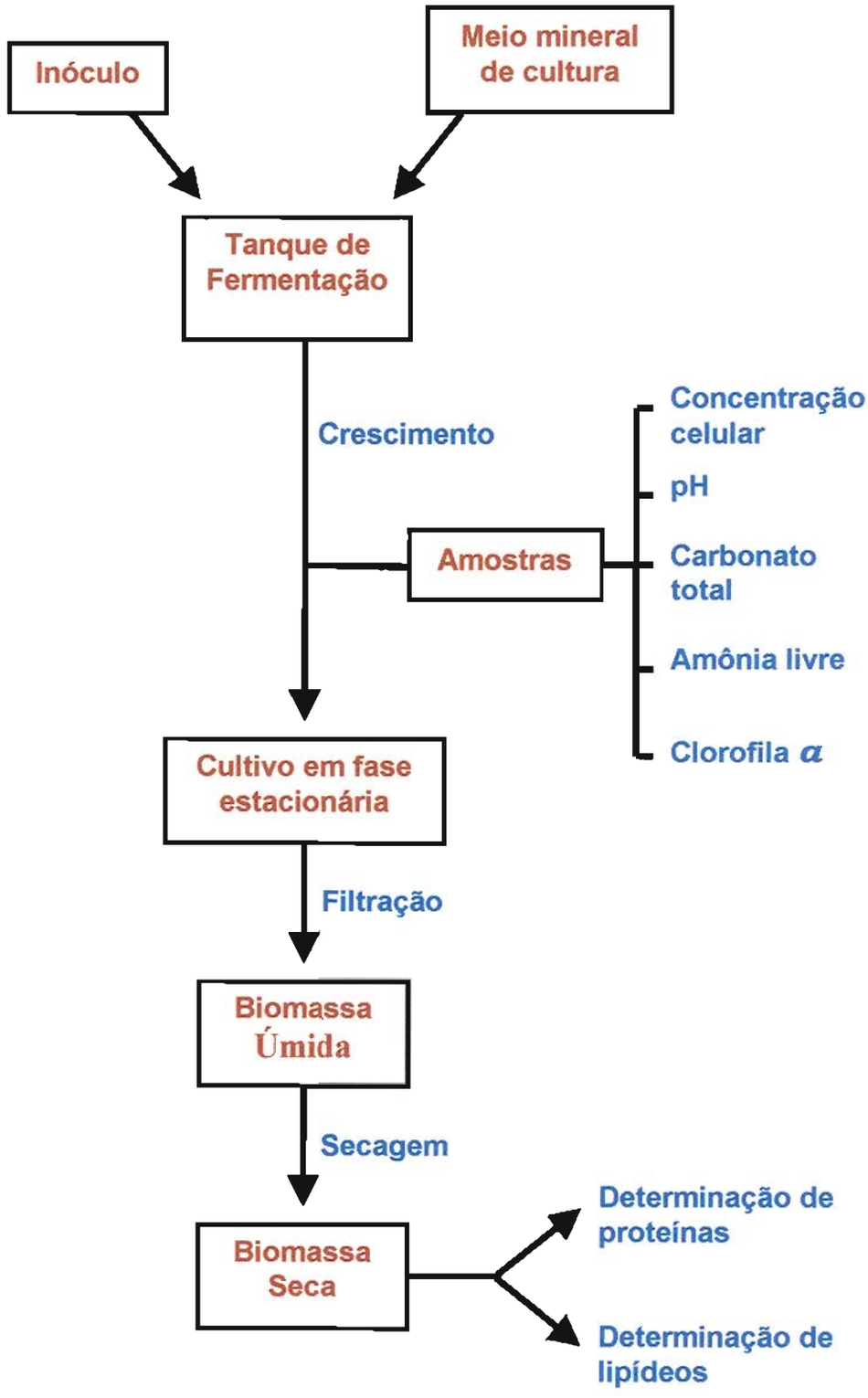
onde: $P_{Cla}$ = produtividade em clorofila ($mg.L^{-1}.dia^{-1}$)

[Cl*a*] = concentração de clorofila *a* na biomassa – referente ao décimo dia de cultivo (mg.g biomassa$^{-1}$)

$X_{máx.}$ = concentração celular máxima obtida ($g.L^{-1}$)

$T_{10}$ = tempo referente ao décimo dia de cultivo, no qual foi realizada a análise de clorofila (dias)

### 4.2.8- FLUXOGRAMA DO PROCESSO



# 5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5.1- ENSAIOS PRELIMINARES

### 5.1.1- MICROGRAFIA DA *Spirulina platensis*

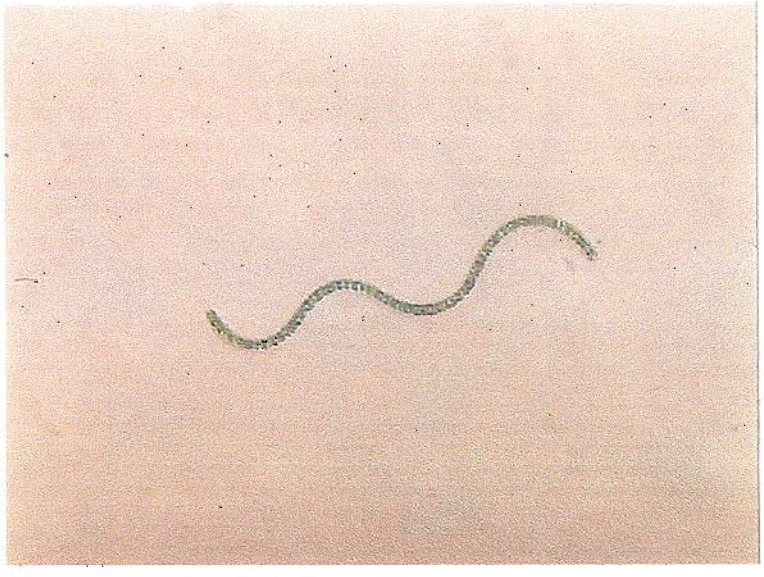


**FIGURA 8**- Micrografia da *S. platensis* cultivada em frascos Erlenmeyers – A: 100 x

**FIGURA 9**- Micrografia da *S. platensis* cultivada em frascos Erlenmeyers – A: 400 x

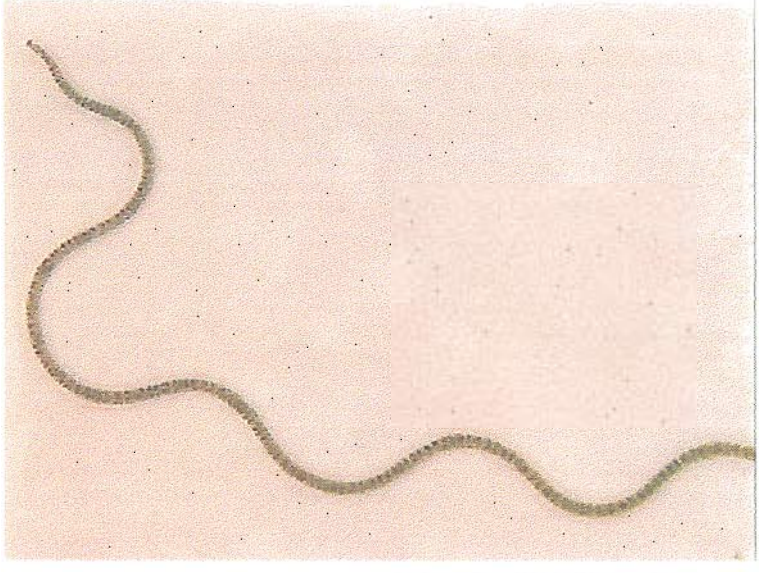


**FIGURA 10**- Micrografia da *S. platensis* cultivada em tanque – A: 100 x

**FIGURA 11** - Micrografia da *S. platensis* cultivada em tanque – A: 400 x

As figura 8 e 10 mostram que existem diferenças quanto às dimensões dos tricomas de *S. platensis* cultivada em frascos Erlenmeyers e em tanques, sendo que estes últimos apresentam comprimento maior. Este fato deve-se à existência de parâmetros diferentes para as duas formas de cultivo, podendo-se destacar a agitação, a qual é acentuada nos cultivos em Erlenmeyers (agitação rotatória em "Shaker"), o que pode causar maior rompimento das cadeias de células.

Não foram observadas diferenças quanto às dimensões celulares da microalga cultivada em Erlenmeyers ou em tanques (figuras 9 e 11).

### 5.1.2- CURVAS DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO CELULAR

Devido às observações feitas a partir das micrografias obtidas, foi realizada a construção de uma curva de calibração de crescimento para o cultivo em frascos Erlenmeyers e outra específica para os cultivos em tanques.

Estas curvas foram utilizadas toda vez que desejou-se determinar a concentração celular dos cultivos, através da correlação entre este parâmetro e o logaritmo da transmitância da suspensão celular.

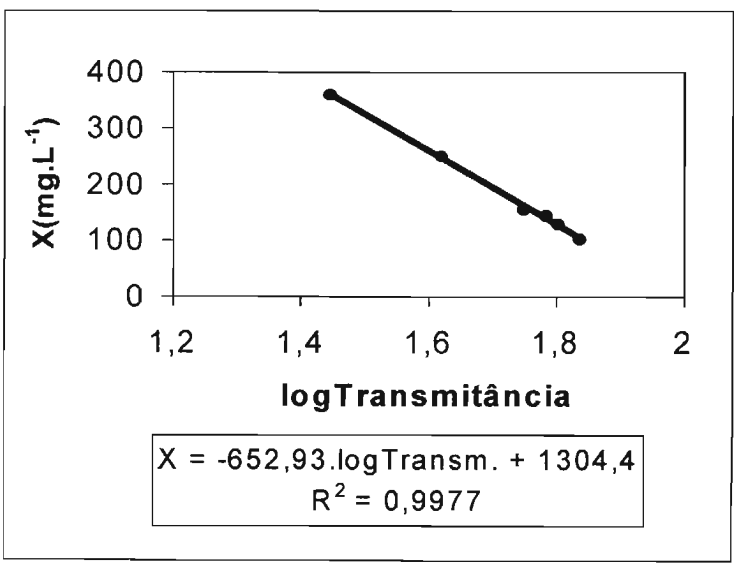



**FIGURA 12-** Curva de calibração do crescimento de *S. platensis* em frascos Erlenmeyers

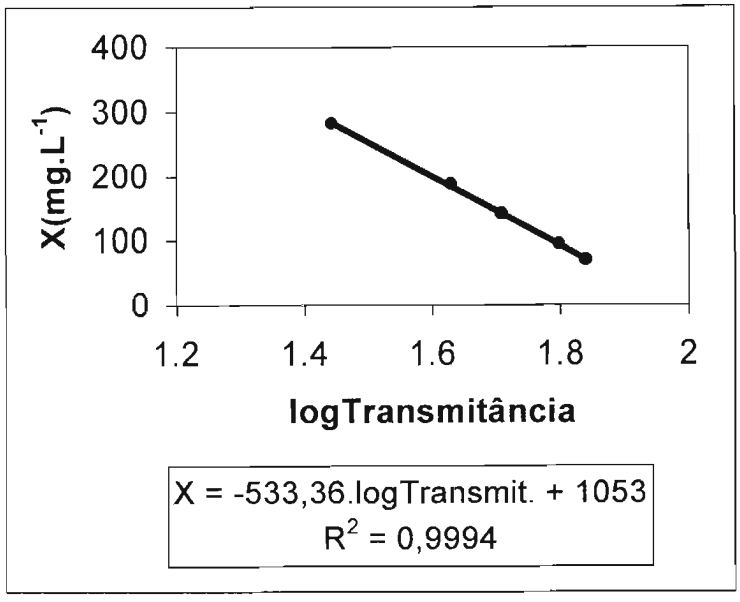



**FIGURA 13-** Curva de calibração do crescimento de *S. platensis* em tanque

### 5.1.3- CURVA DE CRESCIMENTO PADRÃO DE *Spirulina platensis* E ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Nesta curva (figura 14) observa-se a presença da fase de crescimento máximo, seguida da fase estacionária. A fase "lag", de adaptação do microrganismo, praticamente não ocorre, pois as condições de cultivo são semelhantes às do ínóculo quanto à composição do meio de cultura, temperatura e iluminação, além de o inóculo constituir-se de células em fase de crescimento máximo. O crescimento menos acentuado no início do cultivo refere-se, de fato, à fase de aceleração da velocidade de crescimento. A fase de declínio ou morte celular não pode ser observada pois o cultivo foi interrompido na fase estacionária para análise de composição centesimal da biomassa (figura 15).

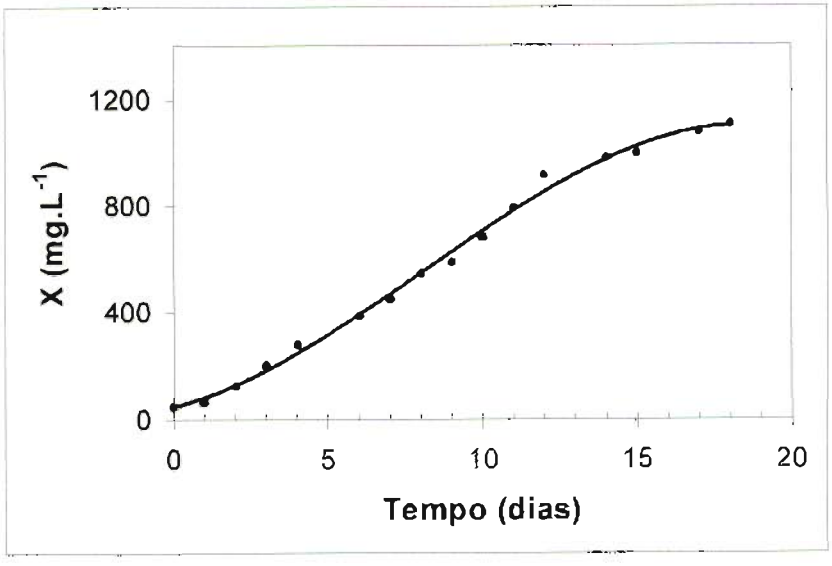



**FIGURA 14** – Curva de crescimento padrão da *S. platensis*

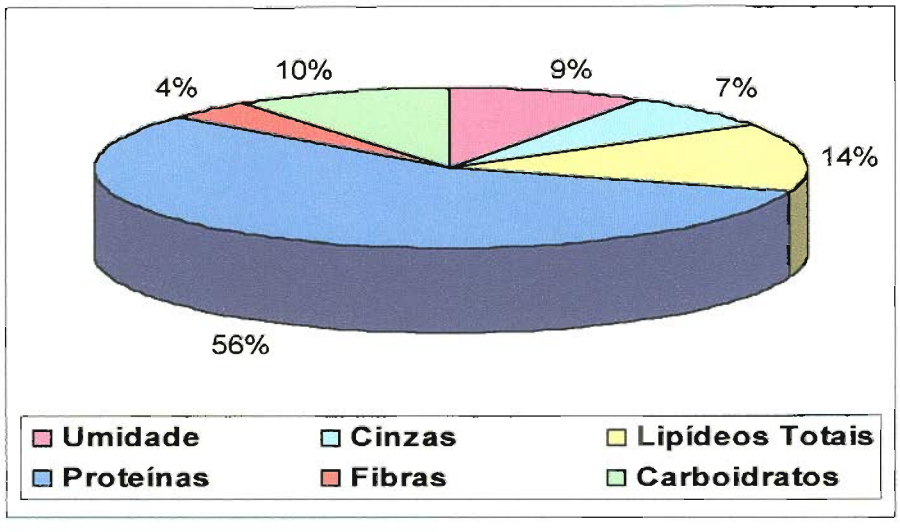



**FIGURA 15**- Diagrama de composição centesimal realizada com a biomassa de *S. platensis*

### 5.1.4- ENSAIOS DE DEFINIÇÃO DA MASSA DE URÉIA RELATIVA AO PONTO CENTRAL

A figura 16 apresenta as curvas de crescimento obtidas com 2250, 2500 e 2750mg de uréia a 3500lux, as quais foram feitas para determinação do ponto central. Pode-se observar que o melhor resultado foi obtido com 2500mg, sendo este, portanto, o valor de escolha para o ponto central.

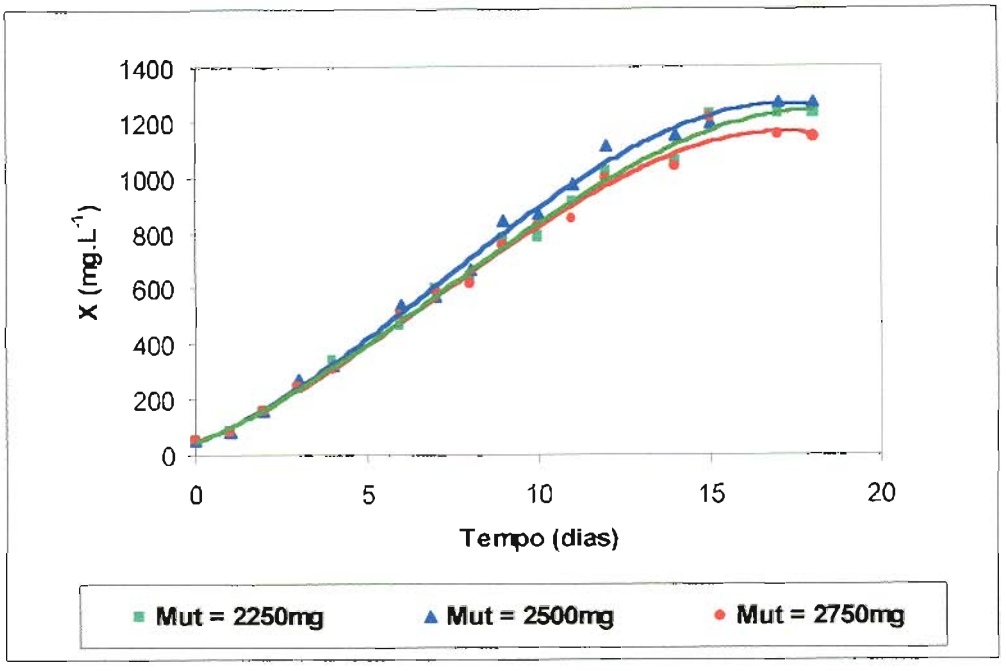



**FIGURA 16**- Cultivos de *S. platensis* com 2250, 2500 e 2750mg de uréia respectivamente, para definição do ponto central

### 5.1.5- ENSAIOS DE VERIFICAÇÃO DO MODO DE ALIMENTAÇÃO COM URÉIA

As curvas de crescimento expostas na figura 17, referentes aos cultivos alimentados em dias alternados e diariamente, não apresentam diferenças consideráveis sendo praticamente sobreponíveis. Deste modo, a utilização de alimentação em dias alternados foi utilizada por questão de praticidade.

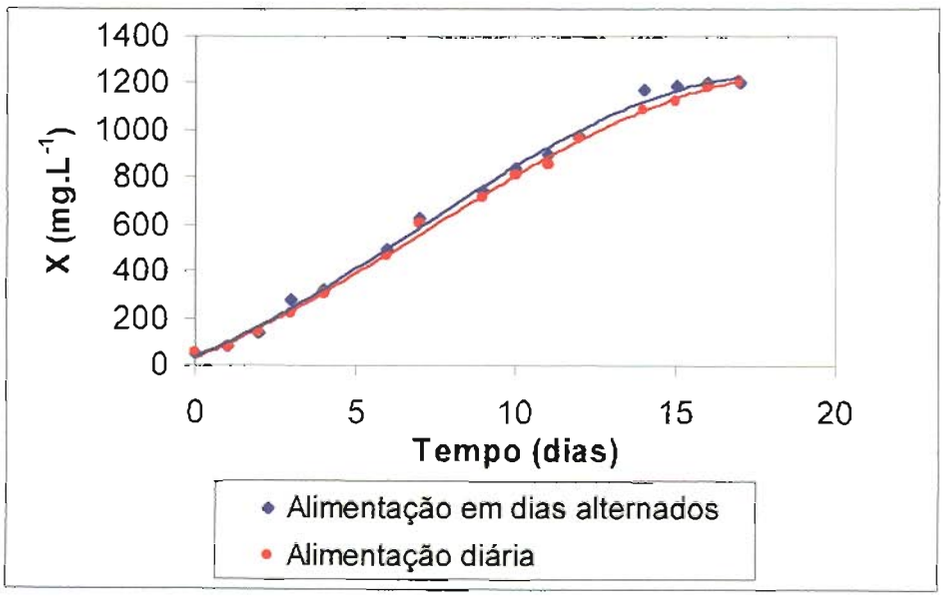



**FIGURA 17-** Cultivos com alimentação de uréia em dias alternados e diariamente

### 5.1.6- PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE CLOROFILA

Primeiramente, procurou-se estabelecer a melhor forma de extração da clorofila da biomassa. Vários solventes orgânicos têm sido utilizados para extração de clorofila, podendo-se citar metanol, éter (HARTMUT & LICHTENTHALER, 1987; MACKINNEY, 1941), solução aquosa de acetona a 80% (HARTMUT & LICHTENTHALER, 1987; MACKINNEY, 1941; MYERS & KRATZ, 1955; TELES et al., 1977), acetona pura (JEFFREY & HUMPHREY, 1975; MACKINNEY, 1941; MYERS & KRATZ, 1955), solução aquosa de acetona a 90% (JEFFREY & HUMPHREY, 1975; SPEZIALE et al., 1984), N,N-dimetilformamida e dimetilsulfóxido (SPEZIALE et al., 1984). Baseando-se em fatores como toxicidade, custo e disponibilidade no laboratório, optou-se por trabalhar com acetona.

De acordo com HARTMUT & LICHTENTHALER (1987), o método utilizado para extrair cloroplastos isolados com solução aquosa de acetona a 80% não extrai completamente a clorofila *a*, menos polar. Uma etapa de extração adicional com acetona pura (100%) é necessária para garantir a extração completa. Portanto, as extrações foram realizadas utilizando-se acetona pura, o que foi favorável também ao acerto de volume do extrato (no caso de evaporação).

A extração de clorofila de *Spirulina* sp. através de trituração com solvente em gral é relatada em diversos trabalhos (HARTMUT & LICHTENTHALER, 1987; OLAIZOLA & DUERR, 1990; VONSHAK et al., 1981). Devido à necessidade de trabalhar-se sob resfriamento (alta volatilidade da acetona), optou-se por realizar a extração por meio de um "desintegrador" constituído de um agitador elétrico com a hélice substituída por uma terminação de formato semelhante ao do tubo utilizado na extração. Deste modo, pôde-se realizar o processo com o tubo imerso em banho de gelo, minimizando a perda do solvente por evaporação.

TELLES et al. (1977), estudando um método para análise industrial de clorofila total utilizando folhas de mangueira (*Mangifera indica L.*),

observaram que o tempo de extração influenciava na quantidade de pigmento extraído. A fim de verificar este fato, foi realizado um ensaio variando-se o tempo de contato da amostra de *S. platensis* com acetona de 1 a 5 horas. Os resultados, expressos na tabela 4, revelaram não haver correlação entre tempo de contato com o solvente e quantidade extraída, o que possibilitou a realização de análises mais rápidas através da leitura de absorbância logo após a extração.

**TABELA 4**- Influência do tempo de extração na determinação de clorofila de *S. platensis*

| **Tempo (horas)** | **Absorbância lida ($\lambda$ = 661,7)** |
|---|---|
| 0 | 0,497 |
| 1 | 0,545 |
| 2 | 0,482 |
| 3 | 0,539 |
| 4 | 0,532 |
| 5 | 0,545 |

Para o cálculo da quantidade de clorofila extraída, foi construída uma curva de calibração da concentração de clorofila *a* em acetona 100%, a partir de soluções de concentrações conhecidas, preparadas com um padrão adquirido da Sigma (figura 18).

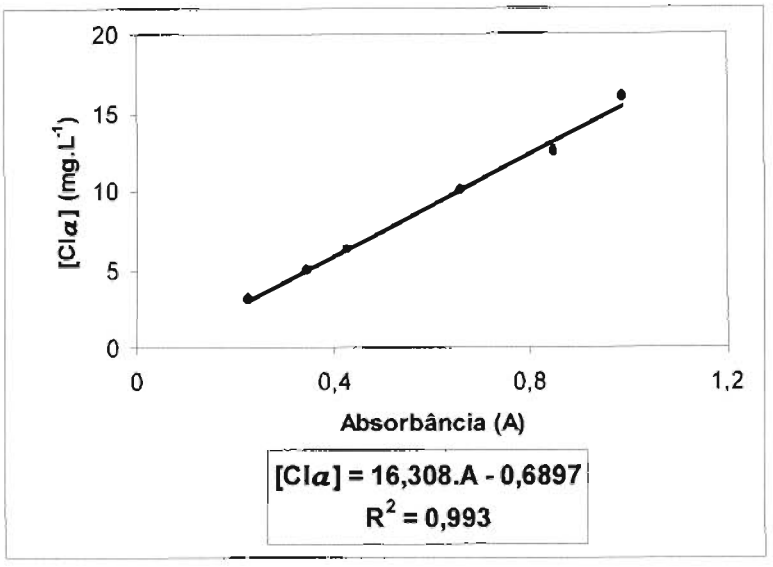



**FIGURA 18** - Curva de calibração da concentração de clorofila *a* em acetona

Com o protocolo de determinação de clorofila estabelecido, foi feita dosagem de clorofila de uma amostra de espinafre fresco (GROSS, 1991) e de biomassa de *S. platensis* a fim de se comprovar a precisão e exatidão da metodologia desenvolvida. Na tabela 5 estão expressos os resultados obtidos neste ensaio, bem como os valores encontrados na literatura, mostrando ser o método desenvolvido adequado aos propósitos deste trabalho.

**TABELA 5**- Comparação das análises de clorofila de espinafre (*Spinacia oleracea* L.) e *S. platensis* realizadas com os valores da literatura

| | **Conteúdo obtido (mg/g)** | **Segundo literatura (mg/g)** |
|---|---|---|
| Espinafre fresco | 0,812 | 0,576[a] |
| Biomassa de *S. platensis* | 11,9 | 11,5[b] |

[a] GROSS (1991) / [b] HENRIKSON (1989)

## 5.2- RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Nesta seção, estão expostos os resultados dos ensaios de A a K, nos quais foram variados a quantidade de uréia e a luminosidade. Para cada ensaio foi atribuído um item, no qual são expressos os resultados referentes à crescimento celular, medidas de pH, consumo de carbonato e concentração de amônia livre. Os resultados referentes aos padrões com nitrato de potássio como fonte de nitrogênio também estão expressos a seguir. A tabela 6 apresenta a divisão dos ensaios em grupos.

**TABELA 6-** Agrupamento dos ensaios realizados

| GRUPO | ILUMINÂNCIA (lux) | ENSAIOS* |
|---|---|---|
| 1 | 2000 | A, B, $P_{A,B}$ |
| 2 | 5000 | C, D, $P_{C,D}$ |
| 3 | 3500 | E, $P_E$ |
| 4 | 3500 | F, G, H, I, $P_{F,G,H,I}$ |
| 5 | 5600 | J, $P_J$ |
| 6 | 1400 | K, $P_K$ |

* Onde $P_{A,B}$, $P_{C,D}$, $P_E$, $P_{F,G,H,I}$, $P_J$ e $P_K$ representam os cultivos padrões (meio com $KNO_3$ como fonte de nitrogênio), executados com os mesmos inóculos que os ensaios dos respectivos grupos.

## 5.2.1- RESULTADOS REFERENTES AO GRUPO 1

### 5.2.1.1- CULTIVO PADRÃO $P_{A,B}$

**TABELA 7-** Valores de X, pH e concentração de carbonato total referentes ao cultivo padrão $P_{A,B}$ correspondente aos ensaios A e B

| Tempo (dias) | X ($mg.L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $Na_2CO_3.L^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,40 | - |
| 1 | 39 | 9,69 | - |
| 2 | 74 | 9,78 | 23,6 |
| 3 | 100 | 9,85 | - |
| 4 | 137 | 9,97 | 22,3 |
| 5 | 185 | 9,97 | - |
| 6 | 216 | 9,99 | 21,2 |
| 7 | 236 | 10,16 | - |
| 8 | 289 | 10,10 | 21,2 |
| 9 | - | - | - |
| 10 | 352 | 10,15 | 21,2 |
| 11 | 371 | 10,26 | - |
| 12 | 436 | 10,16 | 20,1 |
| 13 | - | - | - |
| 14 | 520 | 10,16 | 19,0 |
| 15 | 513 | 10,14 | - |
| 16 | 564 | 10,42 | 18,8 |
| 17 | 606 | 10,26 | - |
| 18 | 623 | 10,30 | - |

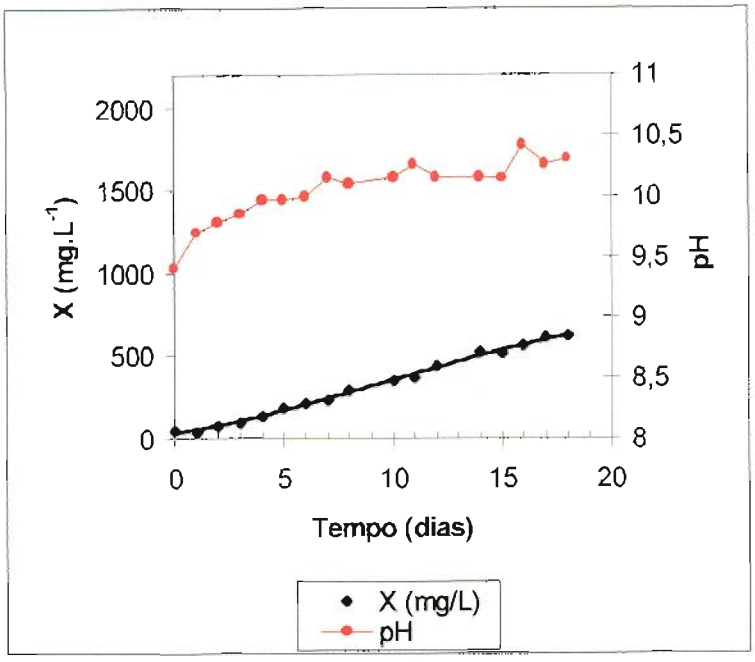



**FIGURA 19**- Gráficos de X e pH para o padrão $P_{A,B}$ correspondente aos ensaios A e B

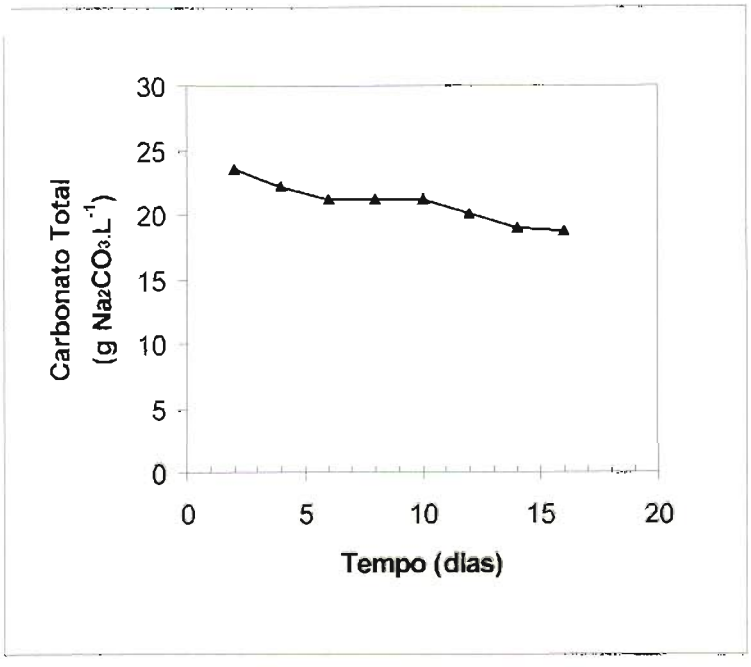



**FIGURA 20**- Gráfico de consumo de carbonato para o padrão $P_{A,B}$ correspondente aos ensaios A e B

### 5.2.1.2- ENSAIO A

**TABELA 8-** Valores de X, pH, concentração de carbonato total e amônia livre referentes ao ensaio A (Mut = 1900mg ; I = 2000lux)

| Tempo (dias) | X ($mg.L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $Na_2CO_3.L^{-1}$) | Amônia Livre ($mol.L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,50 | - | - |
| 1 | 41 | 9,75 | - | - |
| 2 | 77 | 9,79 | 23,6 | $1,5x10^{-4}$ |
| 3 | 111 | 9,86 | - | - |
| 4 | 150 | 9,98 | 22,8 | $6,0x10^{-5}$ |
| 5 | 210 | 10,00 | - | - |
| 6 | 220 | 10,02 | 21,2 | $1,2x10^{-5}$ |
| 7 | 296 | 10,15 | - | - |
| 8 | 335 | 10,11 | 21,4 | $1,0x10^{-5}$ |
| 9 | - | - | - | - |
| 10 | 383 | 10,13 | 21,2 | $9,8x10^{-6}$ |
| 11 | 436 | 10,25 | - | - |
| 12 | 479 | 10,16 | 20,1 | $2,1x10^{-5}$ |
| 13 | - | - | - | - |
| 14 | 542 | 10,14 | 19,6 | $4,6x10^{-6}$ |
| 15 | 597 | 10,11 | - | - |
| 16 | 633 | 10,36 | 18,6 | $1,3x10^{-5}$ |
| 17 | 659 | 10,26 | - | - |
| 18 | 661 | 10,26 | - | - |

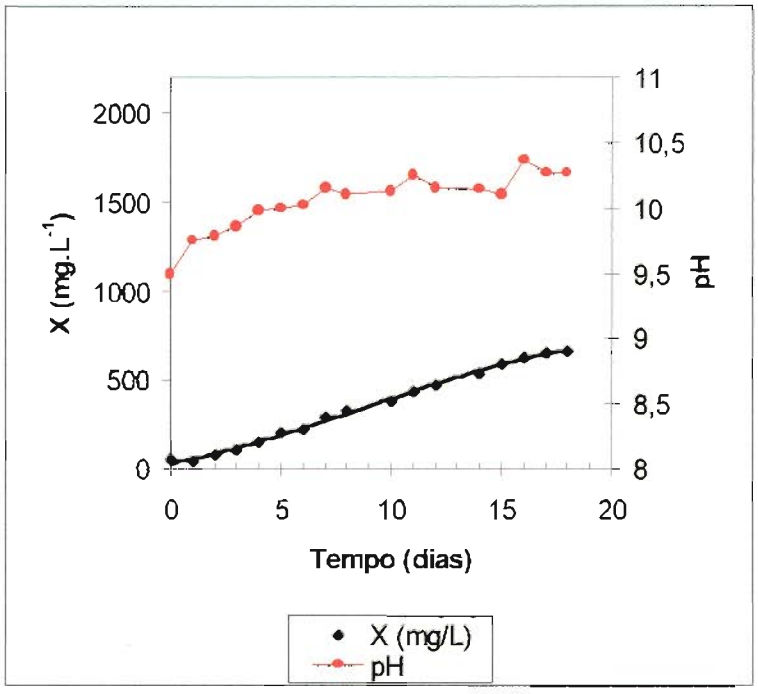



**FIGURA 21-** Gráficos de X e pH para o ensaio A (Mut = 1900mg ; I = 2000lux)

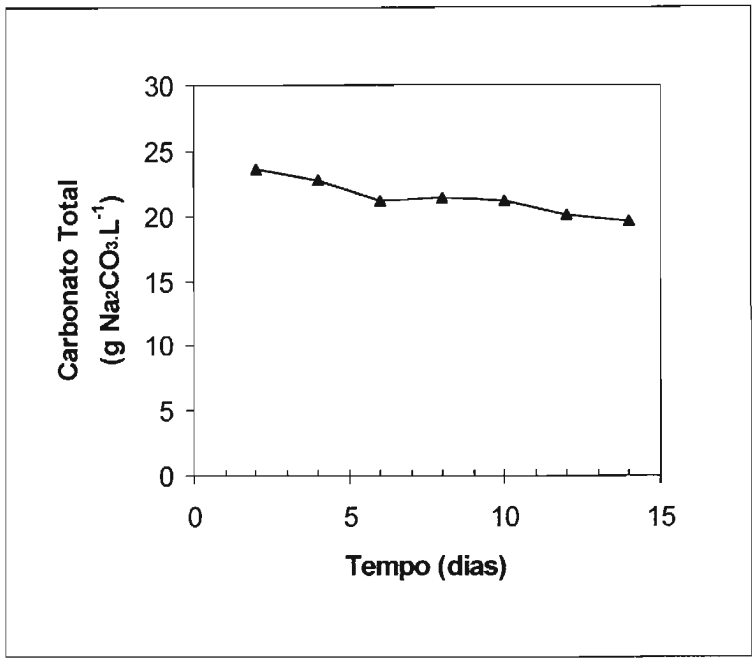



**FIGURA 22-** Gráfico de consumo de carbonato para o ensaio A (Mut = 1900mg ; I = 2000lux)

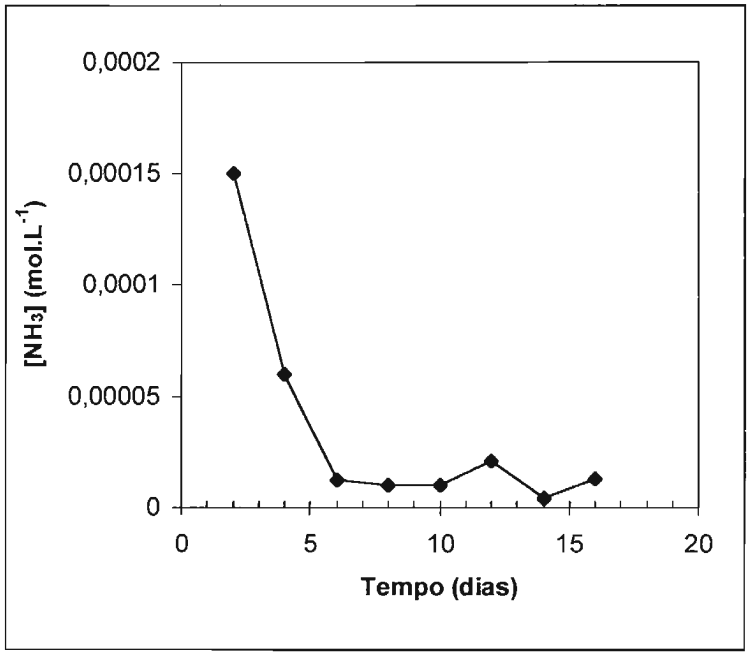



**FIGURA 23-** Gráfico de concentração de amônia livre para o ensaio A (Mut = 1900mg ; I = 2000lux)

### 5.2.1.3- ENSAIO B

**TABELA 9-** Valores de X, pH, concentração de carbonato total e amônia livre referentes ao ensaio B (Mut = 3100mg ; I = 2000lux)

| Tempo (dias) | X ($mg.L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $Na_2CO_3.L^{-1}$) | Amônia Livre ($mol.L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,50 | - | - |
| 1 | 42 | 9,72 | - | - |
| 2 | 78 | 9,79 | 24,0 | $1,8x10^{-4}$ |
| 3 | 116 | 9,87 | - | - |
| 4 | 143 | 9,98 | 22,6 | $4,1x10^{-5}$ |
| 5 | 205 | 9,98 | - | - |
| 6 | 262 | 10,00 | 21,6 | $5,5x10^{-6}$ |
| 7 | 310 | 10,17 | - | - |
| 8 | 347 | 10,11 | 21,7 | $8,9x10^{-6}$ |
| 9 | - | - | - | - |
| 10 | 409 | 10,14 | 21,2 | $2,3x10^{-5}$ |
| 11 | 457 | 10,24 | - | - |
| 12 | 511 | 10,15 | 20,3 | $1,7x10^{-5}$ |
| 13 | - | - | - | - |
| 14 | 558 | 10,14 | 20,1 | $4,1x10^{-6}$ |
| 15 | 635 | 10,11 | - | - |
| 16 | 659 | 10,34 | 19,6 | $3,9x10^{-6}$ |
| 17 | 649 | 10,23 | - | - |
| 18 | 671 | 10,26 | - | - |

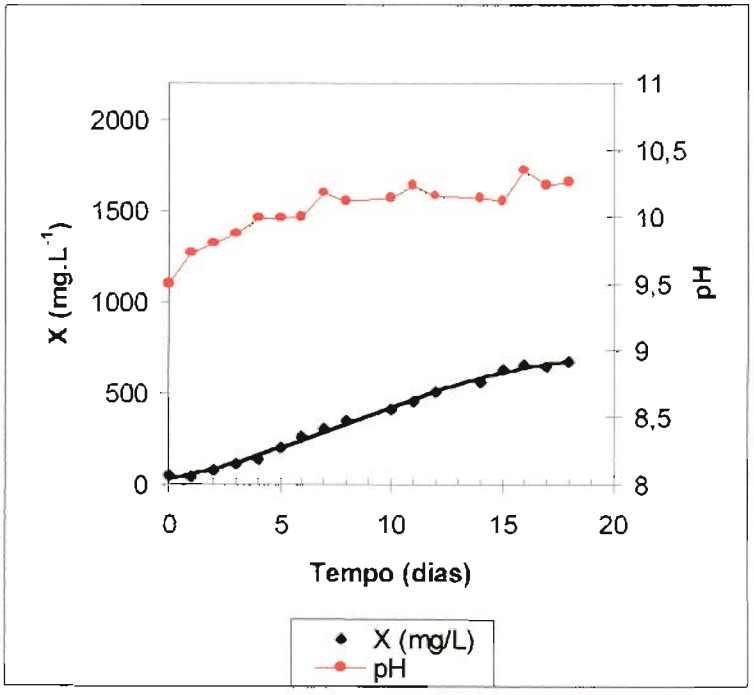



**FIGURA 24-** Gráficos de X e pH para o ensaio B (Mut = 3100mg ; I = 2000lux)

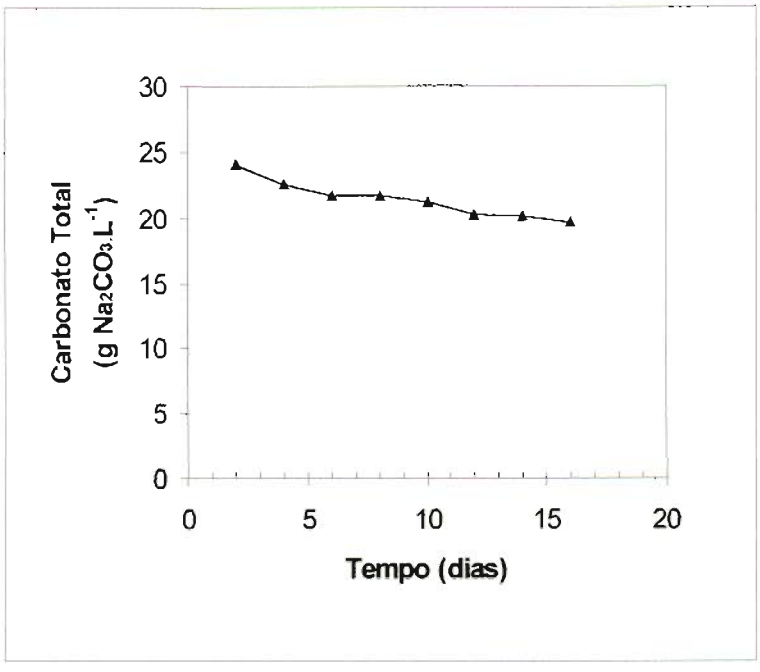



**FIGURA 25**- Gráfico de consumo de carbonato para o ensaio B (Mut = 3100mg ; I = 2000lux)

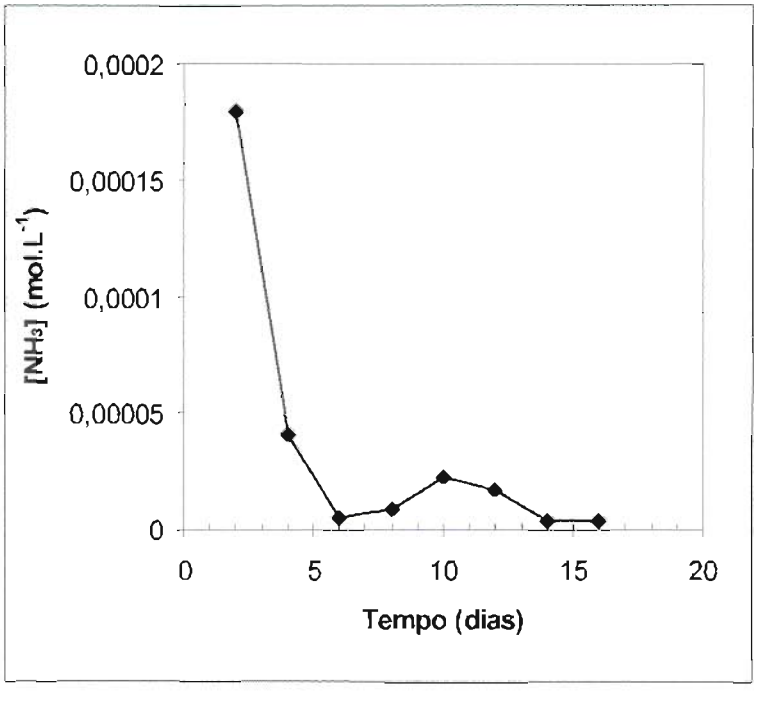



**FIGURA 26**- Gráfico de concentração de amônia livre para o ensaio B (Mut = 3100mg ; I = 2000lux)

## 5.2.2- RESULTADOS REFERENTES AO GRUPO 2

### 5.2.2.1- CULTIVO PADRÃO $P_{C,D}$

**TABELA 10-** Valores de X, pH e concentração de carbonato total referentes ao cultivo padrão $P_{C,D}$ correspondente aos ensaios C e D

| Tempo (dias) | X ($mg.L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $Na_2CO_3.L^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,60 | - |
| 1 | 89 | 9,96 | - |
| 2 | 143 | 10,16 | 24,0 |
| 3 | 242 | 10,34 | - |
| 4 | 334 | 10,35 | 22,9 |
| 5 | 417 | 10,57 | - |
| 6 | 523 | 10,31 | 21,2 |
| 7 | - | - | - |
| 8 | 671 | 10,44 | 19,6 |
| 9 | 833 | 10,72 | - |
| 10 | 870 | 10,81 | 20,1 |
| 11 | 1164 | 10,73 | - |
| 12 | 1019 | 10,73 | 21,7 |
| 13 | 1081 | 10,83 | - |
| 14 | 1189 | 10,75 | 20,7 |
| 15 | 1320 | 10,86 | - |
| 16 | 1423 | 10,96 | 16,9 |
| 17 | 1418 | 10,85 | - |

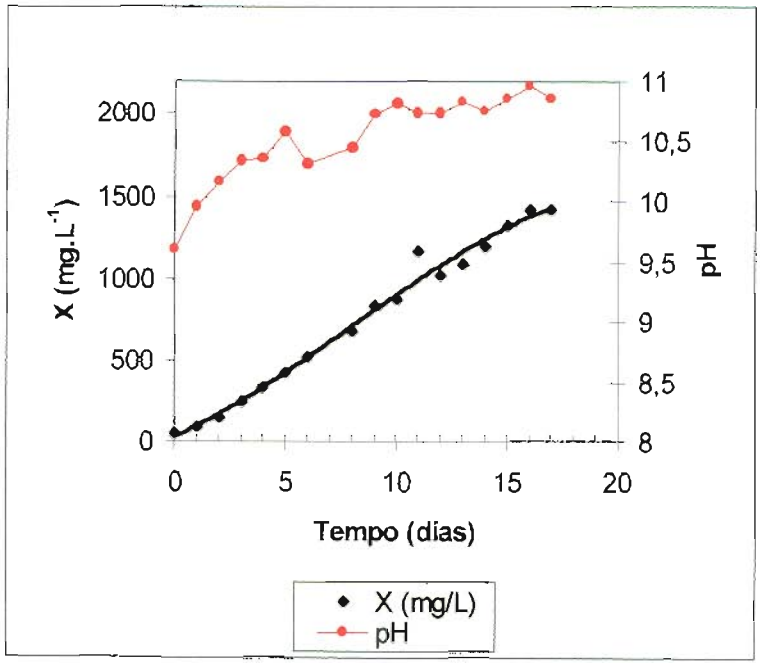



**FIGURA 27-** Gráficos de X e pH para o padrão $P_{C,D}$ correspondente aos ensaios C e D

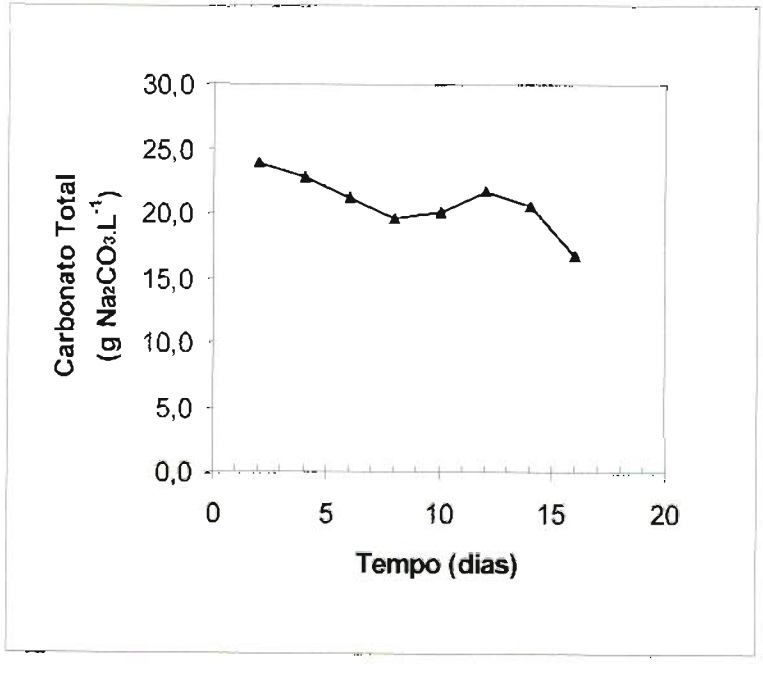



**FIGURA 28-** Gráfico de consumo de carbonato para o padrão $P_{C,D}$ correspondente aos ensaios C e D

### 5.2.2.2- ENSAIO C

**TABELA 11-** Valores de X, pH, concentração de carbonato total e amônia livre referentes ao ensaio C (Mut = 1900mg ; I = 5000lux)

| Tempo (dias) | X ($mg.L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $Na_2CO_3.L^{-1}$) | Amônia Livre ($mol.L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,60 | - | - |
| 1 | 106 | 9,70 | - | - |
| 2 | 178 | 9,85 | 24,5 | $9,1x10^{-6}$ |
| 3 | 293 | 10,05 | - | - |
| 4 | 426 | 10,06 | 22,5 | $8,8x10^{-6}$ |
| 5 | 545 | 10,31 | - | - |
| 6 | 663 | 10,11 | 21,5 | $3,0x10^{-5}$ |
| 7 | - | - | - | - |
| 8 | 831 | 10,36 | 19,0 | $4,1x10^{-6}$ |
| 9 | 1025 | 10,56 | - | - |
| 10 | 1028 | 10,67 | 18,8 | $1,5x10^{-4}$ |
| 11 | 1107 | 10,60 | - | - |
| 12 | 1198 | 10,60 | 17,4 | $7,8x10^{-6}$ |
| 13 | 1395 | 10,70 | - | - |
| 14 | 1329 | 10,65 | 16,9 | $1,2x10^{-5}$ |
| 15 | 1529 | 10,69 | - | - |
| 16 | 1553 | 10,78 | 15,8 | $9,4x10^{-6}$ |
| 17 | 1478 | 10,78 | - | - |

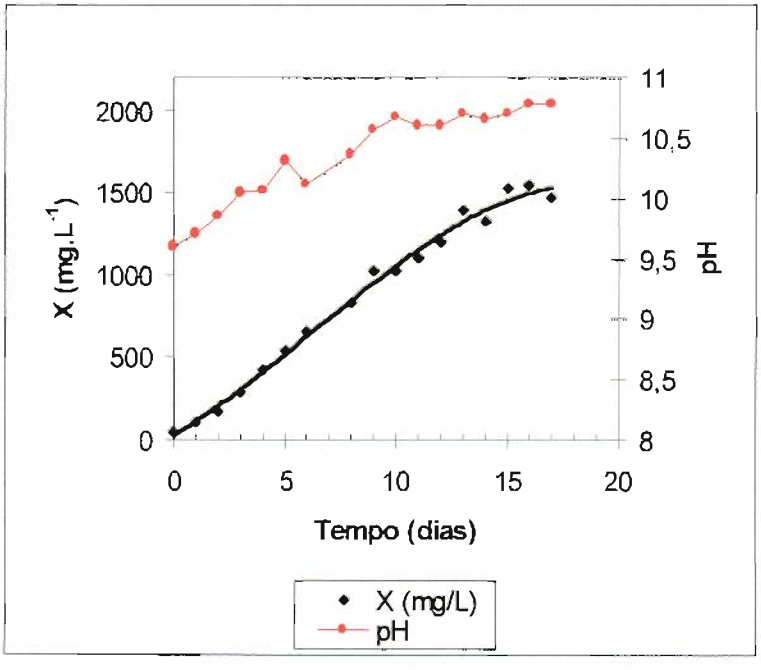



**FIGURA 29-** Gráficos de X e pH para o ensaio C (Mut = 1900mg ; I = 5000lux)

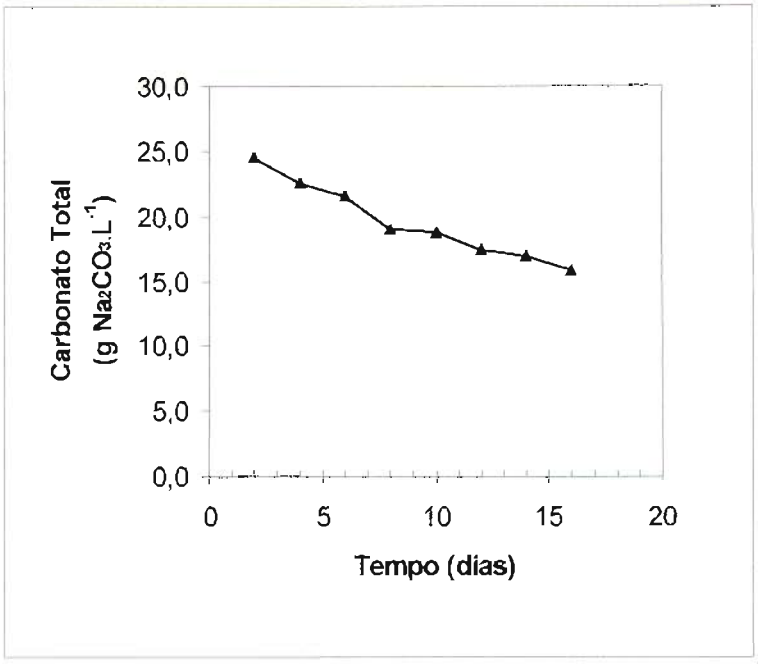



**FIGURA 30**- Gráfico de consumo de carbonato para o ensaio C (Mut = 1900mg ; I = 5000lux)

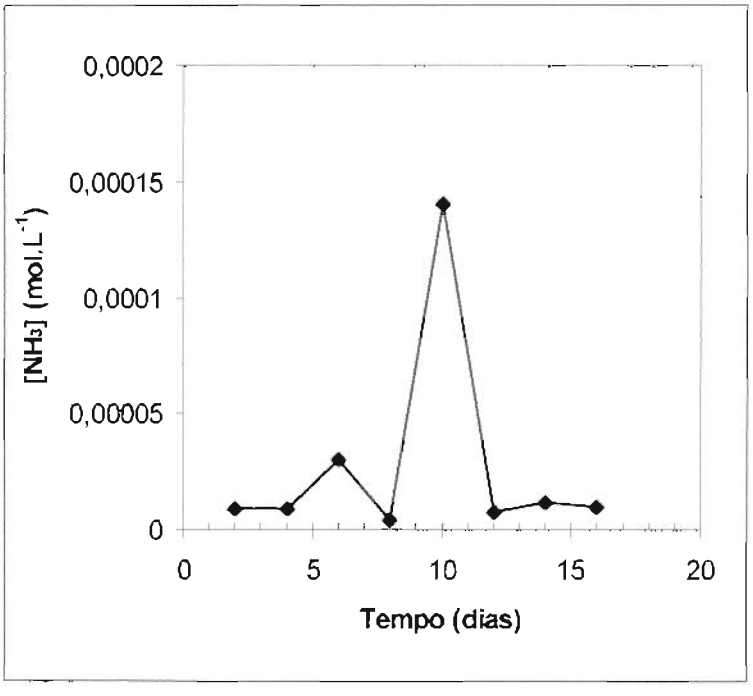



**FIGURA 31**- Gráfico de concentração de amônia livre para o ensaio C (Mut = 1900mg ; I = 5000lux)

### 5.2.2.3- ENSAIO D

**TABELA 12-** Valores de X, pH, concentração de carbonato total e amônia livre referentes ao ensaio D (Mut = 3100mg ; I = 5000lux)

| Tempo (dias) | X ($mg.L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $Na_2CO_3.L^{-1}$) | Amônia Livre ($mol.L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,60 | - | - |
| 1 | 105 | 9,74 | - | - |
| 2 | 177 | 9,85 | 24,4 | $9,7x10^{-6}$ |
| 3 | 306 | 10,06 | - | - |
| 4 | 401 | 10,06 | 20,8 | $5,3x10^{-6}$ |
| 5 | 517 | 10,33 | - | - |
| 6 | 637 | 10,10 | 19,6 | $2,2x10^{-5}$ |
| 7 | - | - | - | - |
| 8 | 849 | 10,32 | 18,6 | $3,9x10^{-6}$ |
| 9 | 1067 | 10,55 | - | - |
| 10 | 1059 | 10,64 | 17,9 | $4,1x10^{-5}$ |
| 11 | 1288 | 10,54 | - | - |
| 12 | 1303 | 10,51 | 17,4 | $5,7x10^{-6}$ |
| 13 | 1515 | 10,60 | - | - |
| 14 | 1573 | 10,52 | 16,3 | $4,7x10^{-6}$ |
| 15 | 1558 | 10,60 | - | - |
| 16 | 1818 | 10,73 | 15,5 | $5,7x10^{-6}$ |
| 17 | 1632 | 10,69 | - | - |

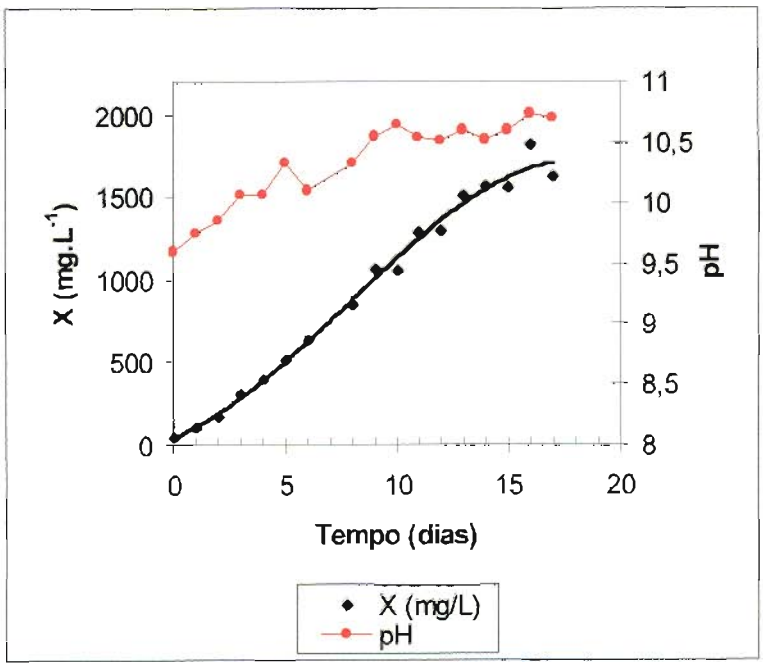



**FIGURA 32-** Gráficos de X e pH para o ensaio D (Mut = 3100mg ; I = 5000lux)

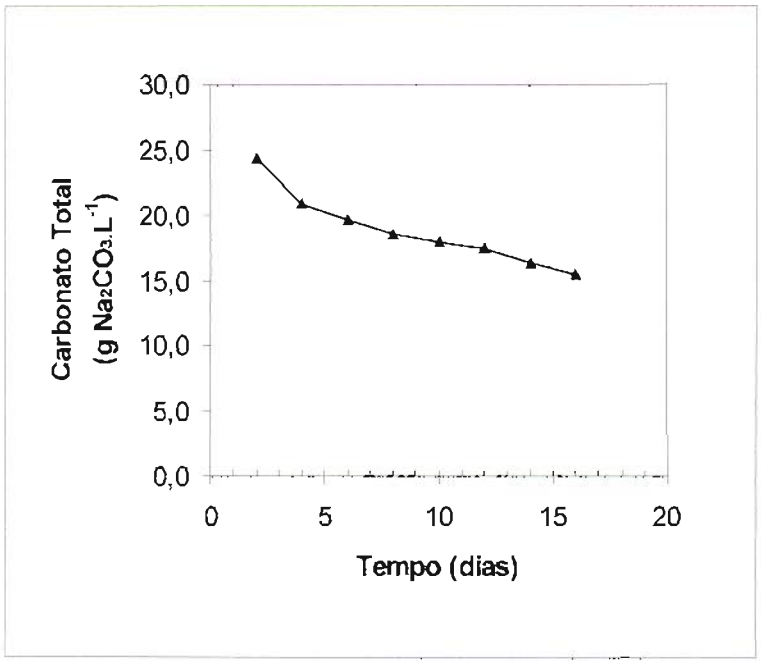



**FIGURA 33-** Gráfico de consumo de carbonato para o ensaio D (Mut = 3100mg ; I = 5000lux)

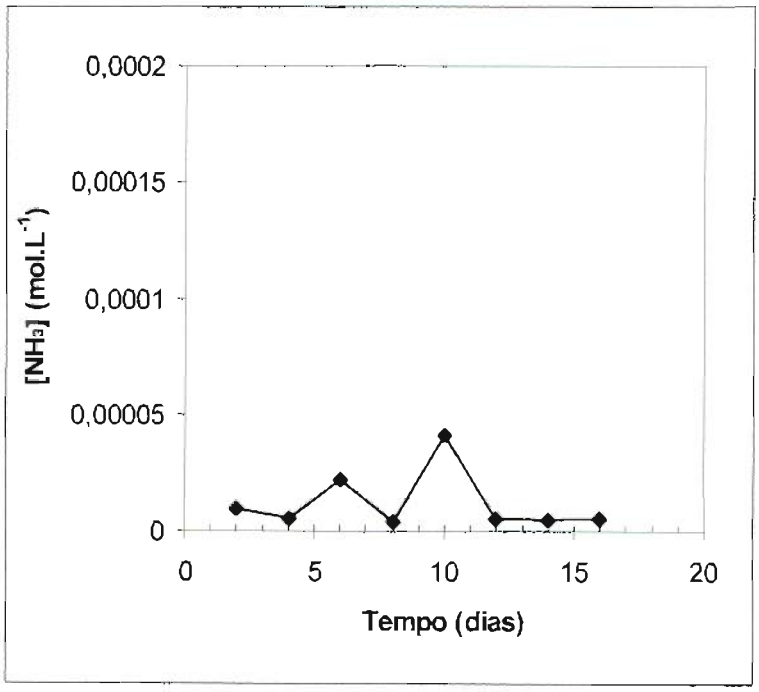



**FIGURA 34-** Gráfico de concentração de amônia livre para o ensaio D (Mut = 3100mg ; I = 5000lux)

## 5.2.3- RESULTADOS REFERENTES AO GRUPO 3

### 5.2.3.1- CULTIVO PADRÃO $P_E$

**TABELA 13**- Valores de X, pH e concentração de carbonato total referentes ao cultivo padrão $P_E$ correspondente ao ensaio E

| Tempo (dias) | X ($mg.L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $Na_2CO_3.L^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,60 | - |
| 1 | 65 | 9,74 | - |
| 2 | 127 | 9,84 | 26,0 |
| 3 | 203 | 9,86 | - |
| 4 | 269 | 9,98 | 22,1 |
| 5 | - | - | - |
| 6 | 391 | 10,10 | 22,3 |
| 7 | 440 | 10,03 | - |
| 8 | 552 | 10,22 | 21,5 |
| 9 | 627 | 10,18 | - |
| 10 | 639 | 10,28 | 21,5 |
| 11 | 739 | 10,32 | - |
| 12 | 906 | 10,42 | 20,1 |
| 13 | - | - | - |
| 14 | 829 | 10,32 | 19,0 |
| 15 | 918 | 10,37 | - |
| 16 | - | - | - |
| 17 | 929 | 10,40 | - |
| 18 | 1081 | 10,45 | - |

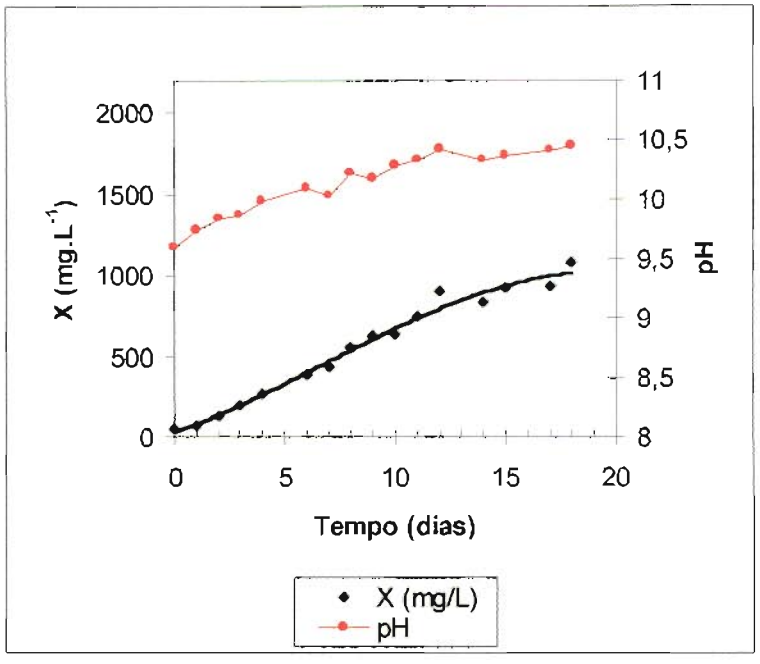



**FIGURA 35-** Gráficos de X e pH para o padrão $P_E$ correspondente ao ensaio E

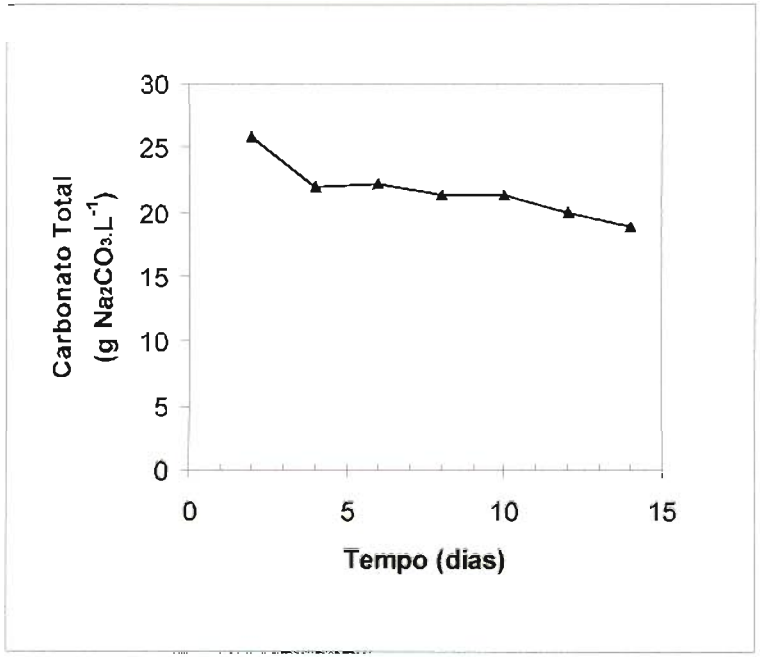



**FIGURA 36-** Gráfico de consumo de carbonato para o padrão $P_E$ correspondente ao ensaio E

### 5.2.3.2- ENSAIO E

**TABELA 14-** Valores de X, pH, concentração de carbonato total e amônia livre referentes ao ensaio E (Mut = 2500mg ; I = 3500lux)

| Tempo (dias) | X ($mg.L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $Na_2CO_3.L^{-1}$) | Amônia Livre ($mol.L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,60 | - | - |
| 1 | 84 | 9,73 | - | - |
| 2 | 157 | 9,82 | 25,0 | $3,6x10^{-5}$ |
| 3 | 268 | 9,76 | - | - |
| 4 | 321 | 9,98 | 22,1 | $6,8x10^{-5}$ |
| 5 | - | - | - | - |
| 6 | 538 | 10,08 | 21,4 | $2,1x10^{-5}$ |
| 7 | 572 | 10,12 | - | - |
| 8 | 667 | 10,29 | 21,9 | $1,4x10^{-6}$ |
| 9 | 839 | 10,21 | - | - |
| 10 | 869 | 10,29 | 19,4 | $2,9x10^{-6}$ |
| 11 | 976 | 10,25 | - | - |
| 12 | 1114 | 10,43 | 19,6 | $3,0x10^{-6}$ |
| 13 | - | - | - | - |
| 14 | 1147 | 10,24 | 18,4 | $5,2x10^{-6}$ |
| 15 | 1195 | 10,34 | - | - |
| 16 | - | - | - | - |
| 17 | 1266 | 10,31 | - | $4,5x10^{-6}$ |
| 18 | 1266 | 10,41 | - | - |

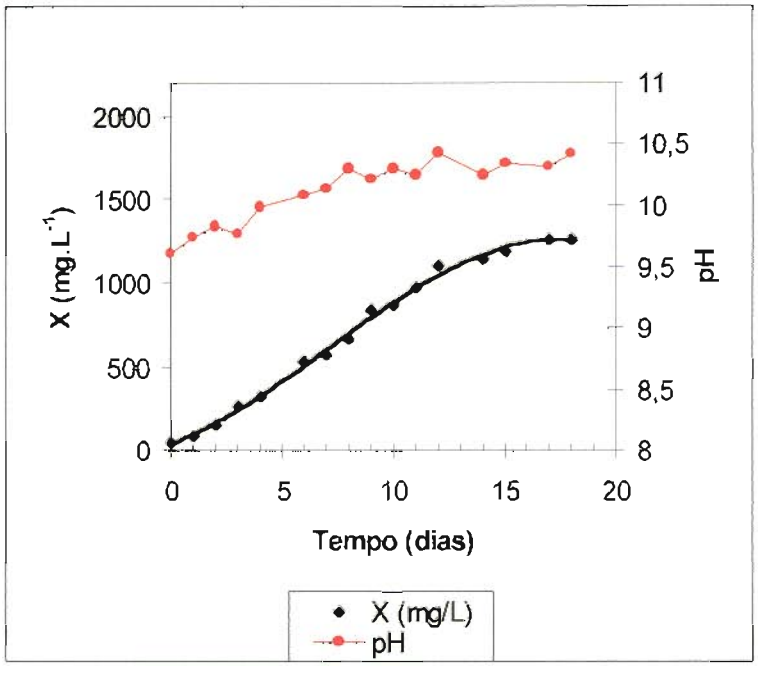



**FIGURA 37-** Gráficos de X e pH para o ensaio E (Mut = 2500mg ; I = 3500lux)

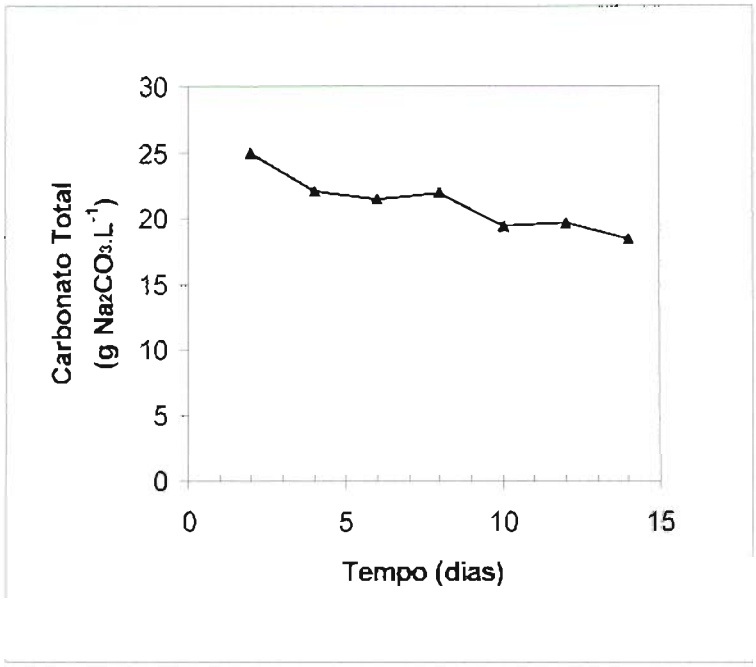



**FIGURA 38-** Gráfico de consumo de carbonato para o ensaio E (Mut = 2500mg ; I = 3500lux)

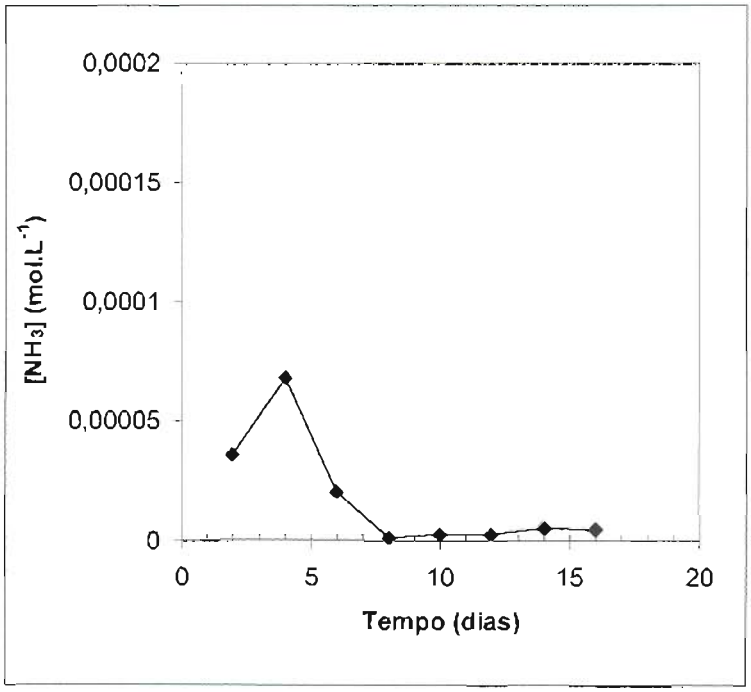



**FIGURA 39-** Gráfico de concentração de amônia livre para o ensaio E (Mut = 2500mg ; I = 3500lux)

## 5.2.4- RESULTADOS REFERENTES AO GRUPO 4

### 5.2.4.1- CULTIVO PADRÃO $P_{F,G,H,I}$

**TABELA 15-** Valores de X, pH e concentração de carbonato total referentes ao cultivo padrão $P_{F,G,H,I}$ correspondente aos ensaios F, G, H e I

| Tempo (dias) | X ($mg.L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $Na_2CO_3.L^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,70 | - |
| 1 | 71 | 9,83 | - |
| 2 | 118 | 9,86 | 25,2 |
| 3 | 203 | 9,98 | - |
| 4 | 246 | 10,04 | 22,9 |
| 5 | - | - | - |
| 6 | 393 | 10,16 | 20,7 |
| 7 | 504 | 10,37 | - |
| 8 | 609 | 10,55 | - |
| 9 | 644 | 10,57 | - |
| 10 | 732 | 10,47 | 20,7 |
| 11 | 799 | 10,57 | - |
| 12 | 856 | 10,70 | 17,9 |
| 13 | - | - | - |
| 14 | 1027 | 10,55 | 17,6 |
| 15 | 1049 | 10,60 | - |
| 16 | 1073 | 10,63 | 18,7 |
| 17 | 1193 | 10,74 | - |
| 18 | 1177 | 10,73 | - |

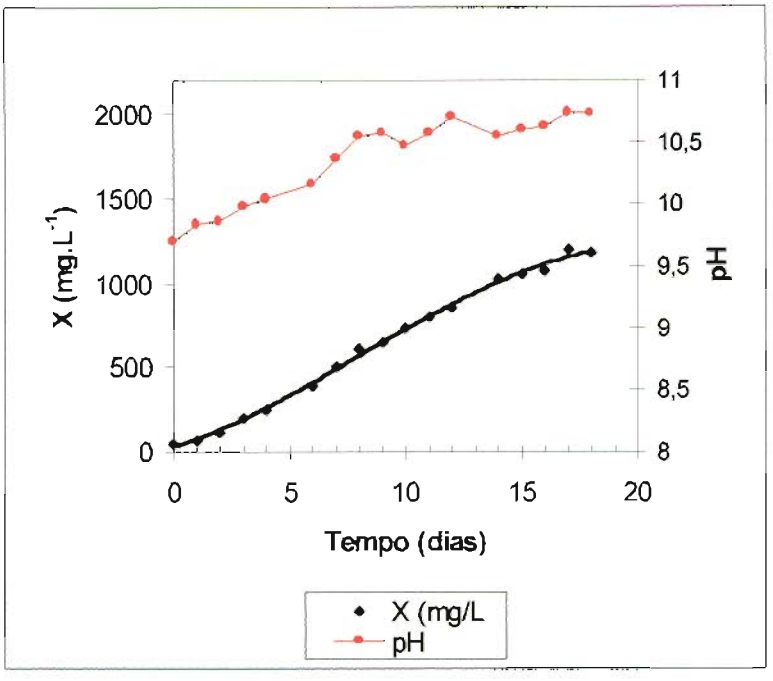



**FIGURA 40-** Gráficos de X e pH para o padrão $P_{F,G,H,I}$ correspondente aos ensaios F, G, H e I

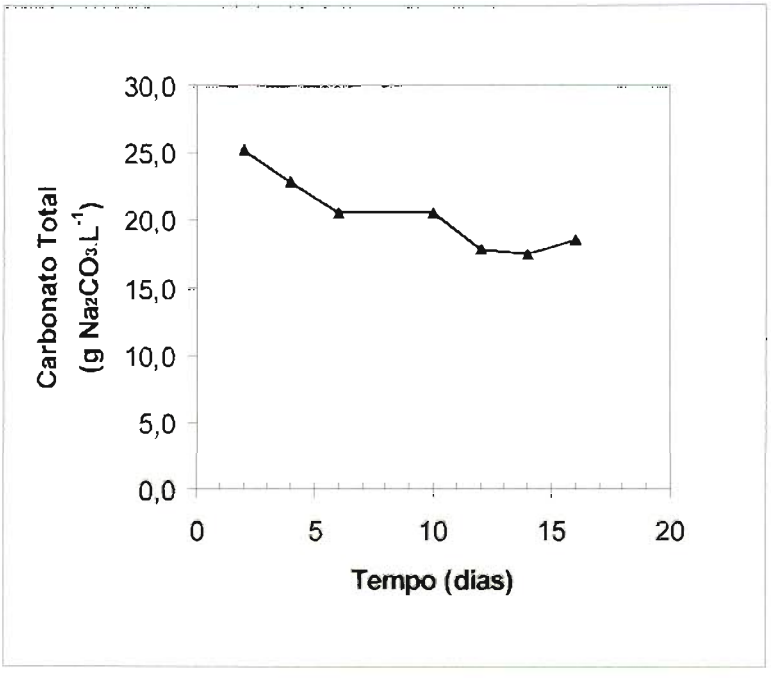



**FIGURA 41-** Gráfico de consumo de carbonato para o padrão $P_{F,G,H,I}$ correspondente aos ensaios F, G, H e I

### 5.2.4.2- ENSAIO F

**TABELA 16-** Valores de X, pH, concentração de carbonato total e amônia livre referentes ao ensaio F (Mut = 2500mg ; I = 3500lux)

| Tempo (dias) | X ($mg.L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $Na_2CO_3.L^{-1}$) | Amônia Livre ($mol.L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,70 | - | - |
| 1 | 79 | 9,89 | - | - |
| 2 | 153 | 9,89 | 25,1 | $1,0x10^{-4}$ |
| 3 | 273 | 9,99 | - | - |
| 4 | 316 | 10,05 | 21,0 | $6,3x10^{-6}$ |
| 5 | - | - | - | - |
| 6 | 461 | 10,15 | 21,0 | $3,6x10^{-6}$ |
| 7 | 593 | 10,46 | - | - |
| 8 | 553 | 10,53 | 21,2 | $5,0x10^{-6}$ |
| 9 | 760 | 10,59 | - | - |
| 10 | 831 | 10,45 | 20,7 | $3,7x10^{-6}$ |
| 11 | 975 | 10,56 | - | - |
| 12 | 1028 | 10,66 | 18,4 | - |
| 13 | - | - | - | - |
| 14 | 1170 | 10,40 | 17,9 | $3,3x10^{-6}$ |
| 15 | 1198 | 10,49 | - | - |
| 16 | 1180 | 10,50 | 18,4 | $4,2x10^{-6}$ |
| 17 | 1222 | 10,62 | - | - |
| 18 | 1222 | 10,62 | - | - |

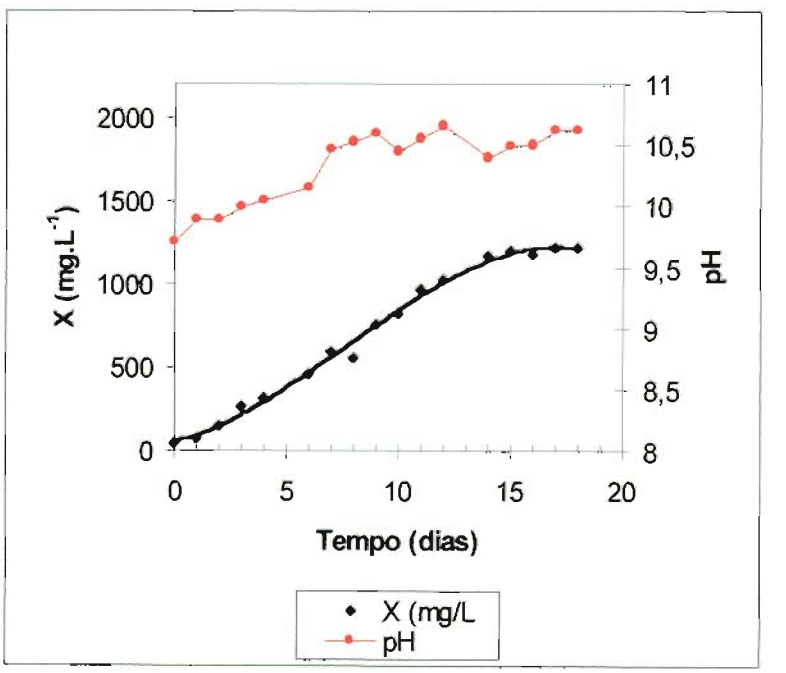



**FIGURA 42-** Gráficos de X e pH para o ensaio F (Mut = 2500mg ; I = 3500lux)

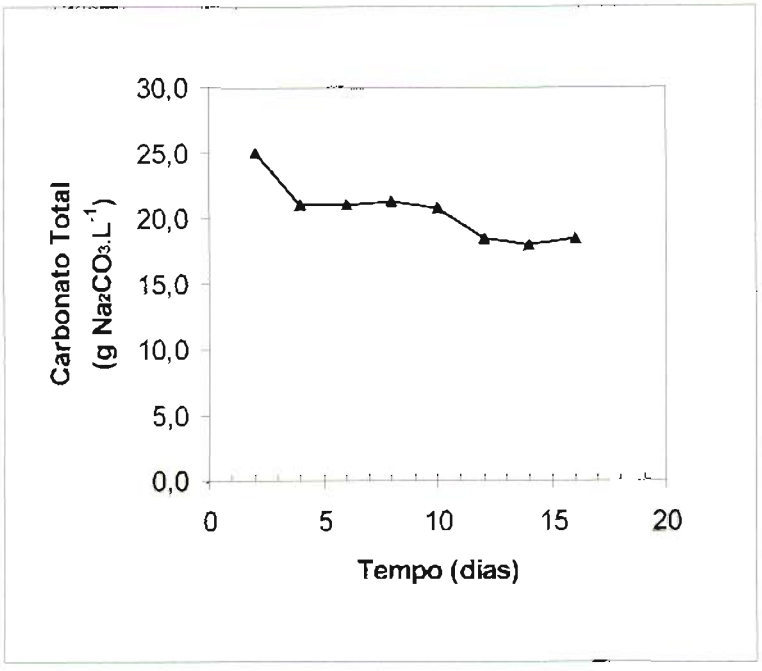



**FIGURA 43-** Gráfico de consumo de carbonato para o ensaio F (Mut = 2500mg ; I = 3500lux)

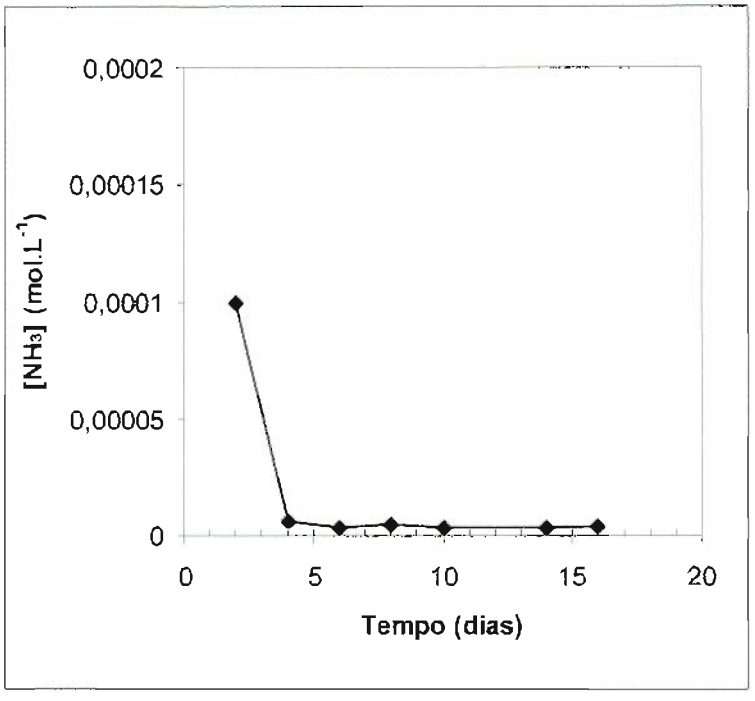



**FIGURA 44-** Gráfico de concentração de amônia livre para o ensaio F (Mut = 2500mg ; I = 3500lux)

### 5.2.4.3- ENSAIO G

**TABELA 17-** Valores de X, pH, concentração de carbonato total e amônia livre referentes ao ensaio G (Mut = 2500mg ; I = 3500lux)

| Tempo (dias) | X ($mg.L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $Na_2CO_3.L^{-1}$) | Amônia Livre ($mol.L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,70 | - | - |
| 1 | 80 | 9,87 | - | - |
| 2 | 137 | 9,88 | 25,0 | $1,1x10^{-4}$ |
| 3 | 276 | 10,02 | - | - |
| 4 | 323 | 10,03 | 22,4 | $1,1x10^{-5}$ |
| 5 | - | - | - | - |
| 6 | 499 | 10,16 | 21,0 | $2,8x10^{-6}$ |
| 7 | 625 | 10,52 | - | - |
| 8 | - | - | - | - |
| 9 | 785 | 10,58 | 19,8 | $4,0x10^{-6}$ |
| 10 | 836 | 10,63 | 23,2 | - |
| 11 | 981 | 10,51 | - | - |
| 12 | 1040 | 10,60 | 17,4 | - |
| 13 | - | - | - | - |
| 14 | 1174 | 10,70 | 17,1 | $3,9x10^{-6}$ |
| 15 | 1230 | 10,35 | - | - |
| 16 | 1290 | 10,50 | 16,8 | $3,8x10^{-6}$ |
| 17 | 1289 | 10,51 | - | - |

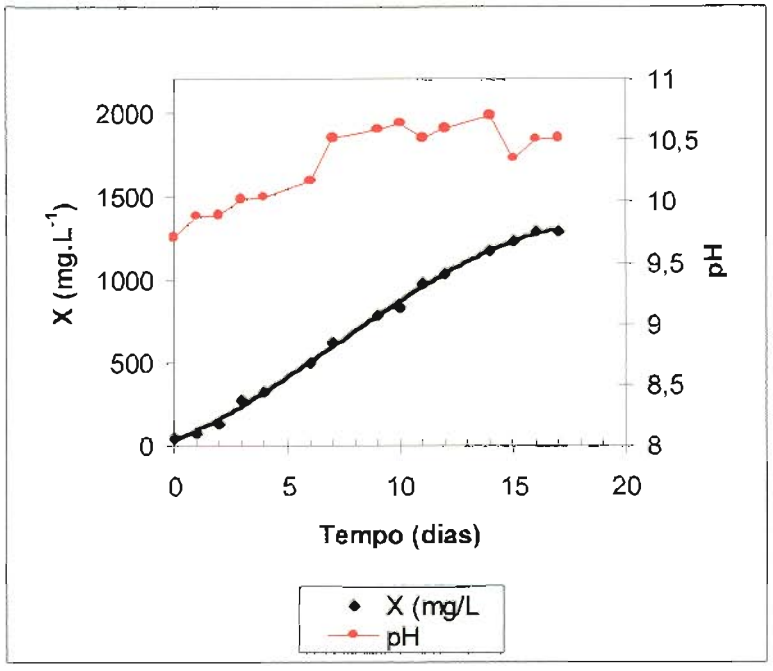



**FIGURA 45-** Gráficos de X e pH para o ensaio G (Mut = 2500mg ; I = 3500lux)

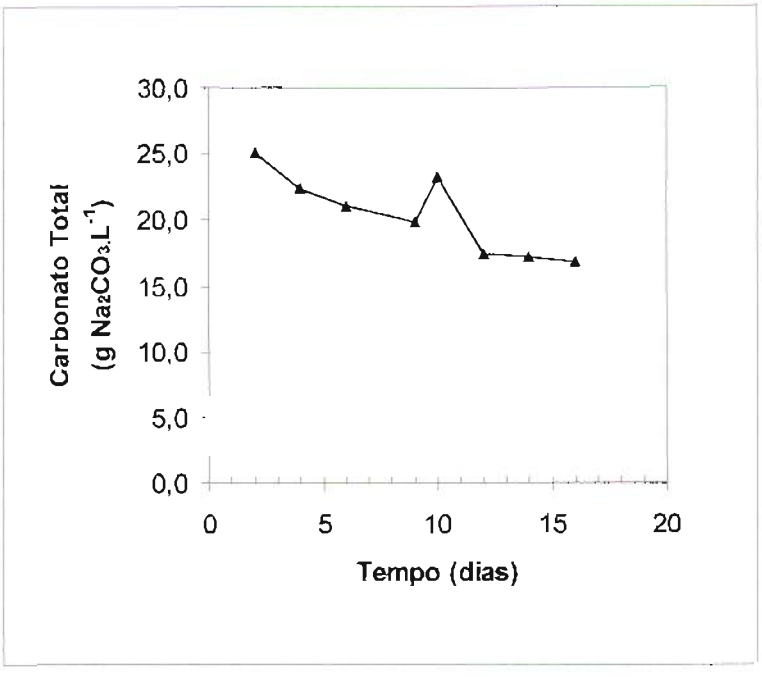



**FIGURA 46**- Gráfico de consumo de carbonato para o ensaio G (Mut = 2500mg ; I = 3500lux)

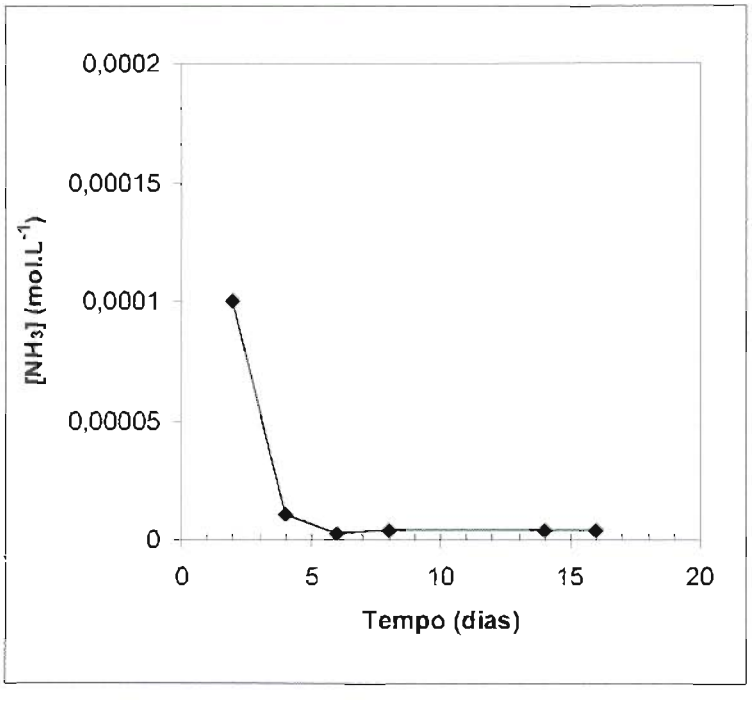



**FIGURA 47**- Gráfico de concentração de amônia livre para o ensaio G (Mut = 2500mg ; I = 3500lux)

### 5.2.4.4- ENSAIO H

**TABELA 18-** Valores de X, pH, concentração de carbonato total e amônia livre referentes ao ensaio H (Mut = 1660mg ; I = 3500lux)

| Tempo (dias) | X ($mg.L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $Na_2CO_3.L^{-1}$) | Amônia Livre ($mol.L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,70 | - | - |
| 1 | 80 | 9,87 | - | - |
| 2 | 146 | 9,87 | 25,0 | $9,5x10^{-5}$ |
| 3 | 257 | 10,00 | - | - |
| 4 | 313 | 10,05 | 21,3 | $2,5x10^{-6}$ |
| 5 | - | - | - | - |
| 6 | 448 | 10,16 | 21,8 | $3,2x10^{-6}$ |
| 7 | 569 | 10,45 | - | - |
| 8 | 568 | 10,59 | 19,3 | $5,8x10^{-6}$ |
| 9 | 689 | 10,64 | - | - |
| 10 | 803 | 10,51 | 21,3 | $3,5x10^{-6}$ |
| 11 | 874 | 10,60 | - | - |
| 12 | 914 | 10,66 | 17,9 | - |
| 13 | - | - | - | - |
| 14 | 1091 | 10,46 | 16,5 | $7,7x10^{-7}$ |
| 15 | - | - | - | - |
| 16 | 1189 | 10,55 | - | - |
| 17 | 1214 | 10,67 | - | $2,0x10^{-6}$ |
| 18 | 1189 | 10,66 | - | - |

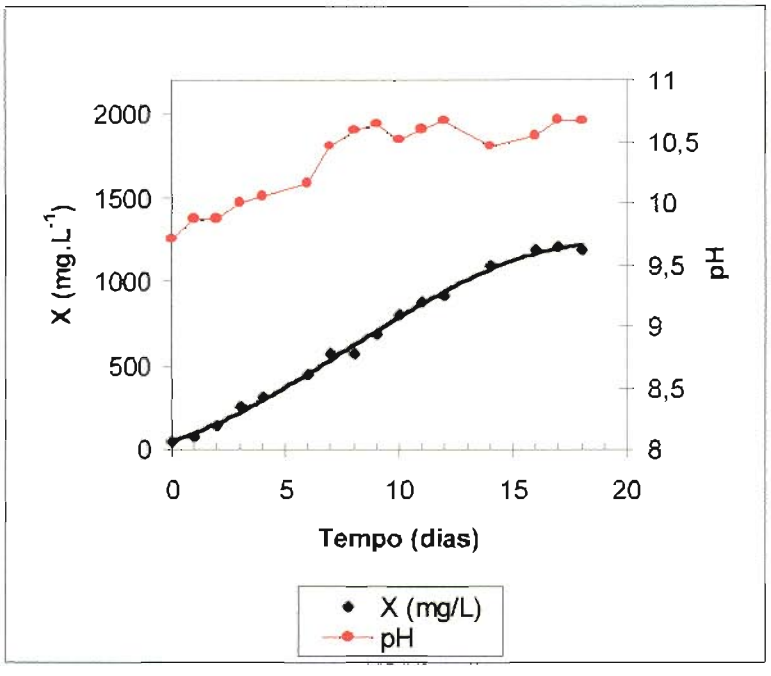



**FIGURA 48-** Gráficos de X e pH para o ensaio H (Mut = 1660mg ; I = 3500lux)

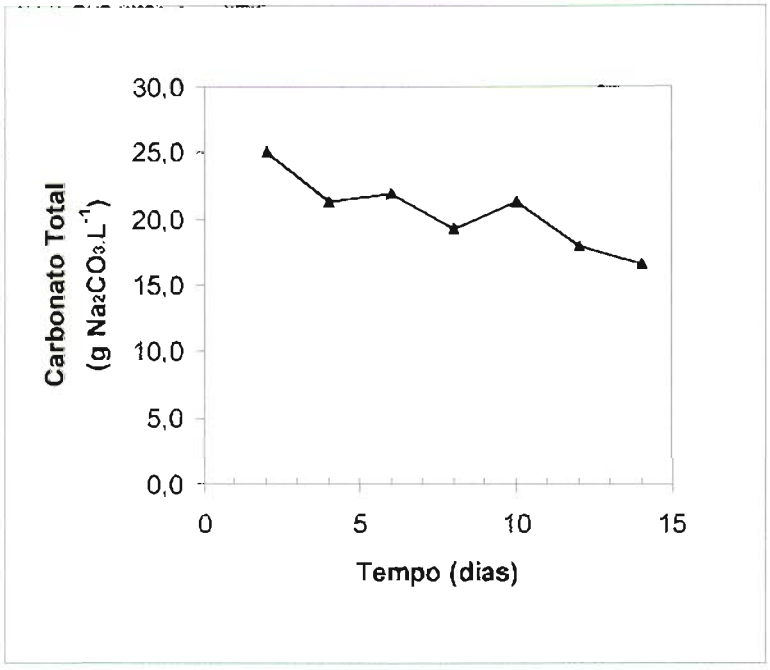



**FIGURA 49-** Gráfico de consumo de carbonato para o ensaio H (Mut = 1660mg ; I = 3500lux)

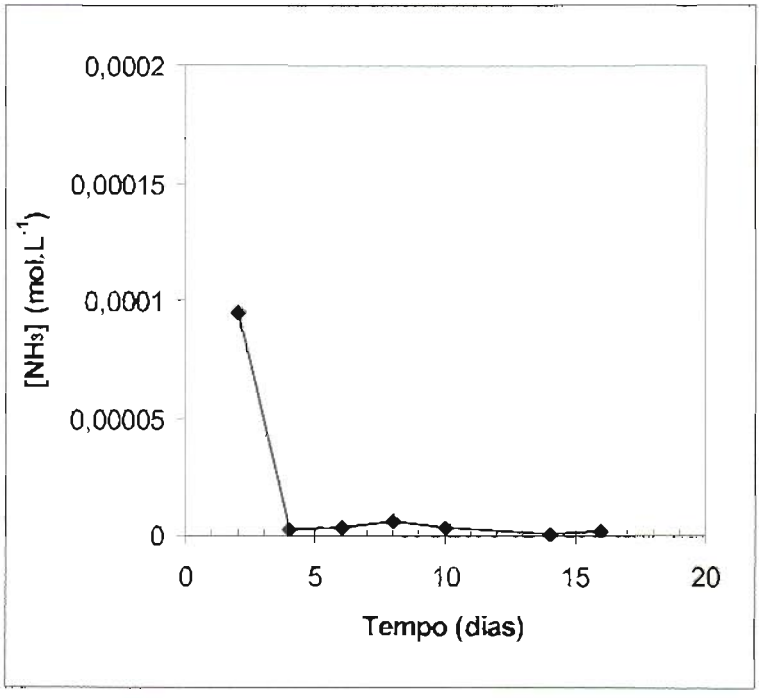



**FIGURA 50-** Gráfico de concentração de amônia livre para o ensaio H (Mut = 1660mg ; I = 3500lux)

### 5.2.4.5- ENSAIO I

**TABELA 19-** Valores de X, pH, concentração de carbonato total e amônia livre referentes ao ensaio I (Mut = 3340mg ; I = 3500lux)

| Tempo (dias) | X ($mg.L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $Na_2CO_3.L^{-1}$) | Amônia Livre ($mol.L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,70 | - | - |
| 1 | 81 | 9,89 | - | - |
| 2 | 146 | 9,89 | 24,8 | $1,0x10^{-4}$ |
| 3 | 240 | 10,01 | - | - |
| 4 | 305 | 10,01 | 21,2 | $6,1x10^{-6}$ |
| 5 | - | - | - | - |
| 6 | 469 | 10,09 | 21,0 | $2,9x10^{-6}$ |
| 7 | 599 | 10,44 | - | - |
| 8 | 649 | 10,52 | 20,7 | $3,5x10^{-6}$ |
| 9 | 710 | 10,54 | - | - |
| 10 | 836 | 10,39 | 19,8 | $3,5x10^{-6}$ |
| 11 | 942 | 10,54 | - | - |
| 12 | 950 | 10,64 | 18,2 | - |
| 13 | - | - | - | - |
| 14 | 1009 | 10,30 | 18,2 | $2,8x10^{-6}$ |
| 15 | 1084 | 10,43 | - | - |
| 16 | 1081 | 10,43 | 17,4 | $3,5x10^{-6}$ |
| 17 | 1185 | 10,56 | - | - |
| 18 | 1161 | 10,51 | - | - |

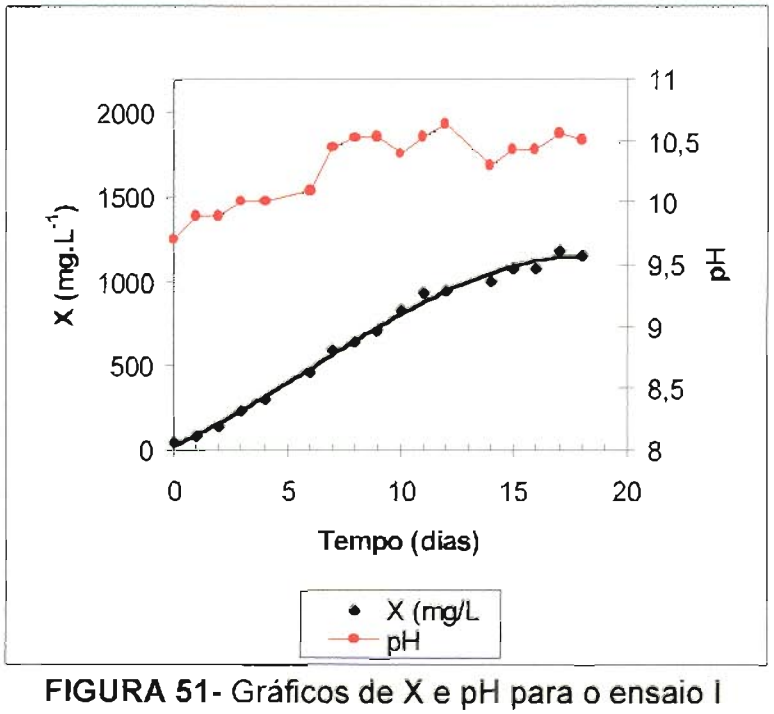



**FIGURA 51-** Gráficos de X e pH para o ensaio I (Mut = 3340mg ; I = 3500lux)

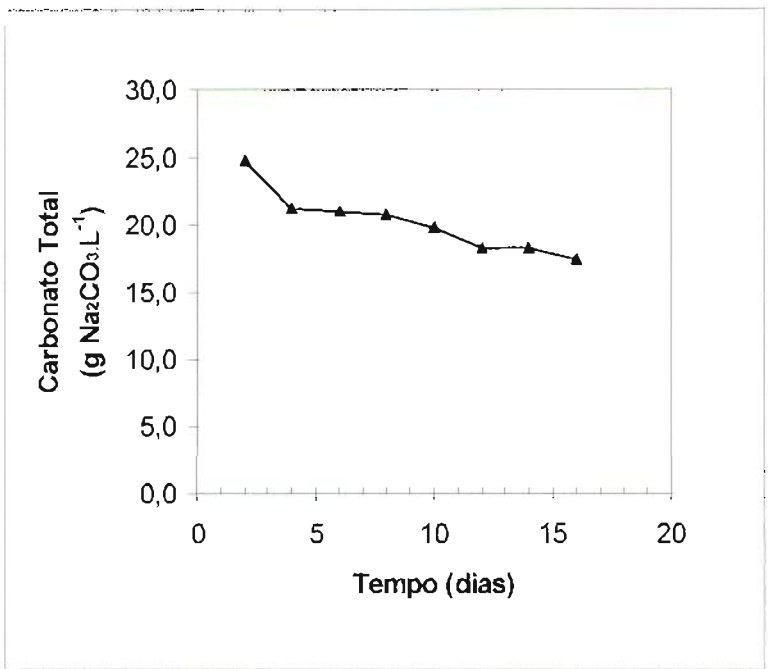



**FIGURA 52-** Gráfico de consumo de carbonato para o ensaio I (Mut = 3340mg ; I = 3500lux)

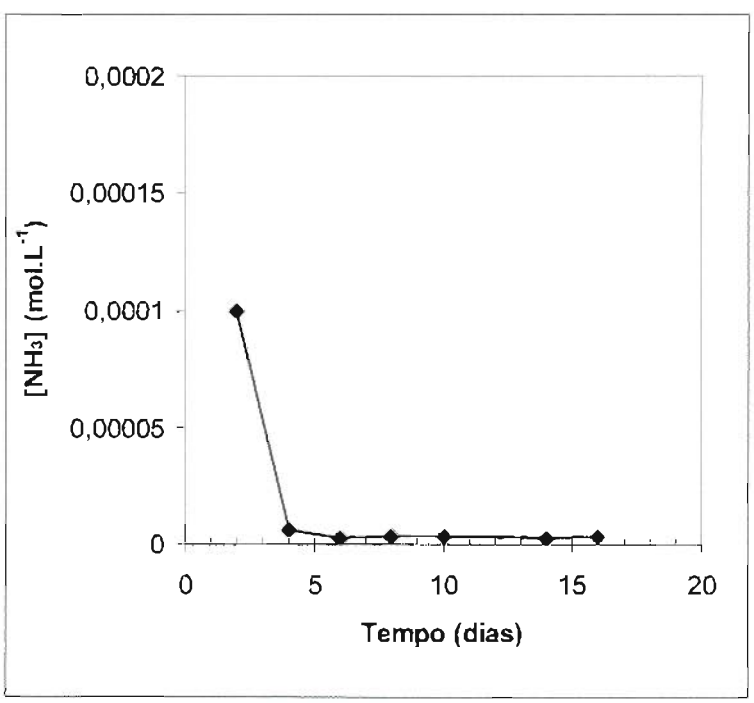



**FIGURA 53-** Gráfico de concentração de amônia livre para o ensaio I (Mut = 3340mg ; I = 3500lux)

## 5.2.5- RESULTADOS REFERENTES AO GRUPO 5

### 5.2.5.1- CULTIVO PADRÃO $P_J$

**TABELA 20-** Valores de X, pH e concentração de carbonato total referentes ao cultivo padrão $P_J$ correspondente ao ensaio J

| Tempo (dias) | X ($mg.L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $Na_2CO_3.L^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,55 | 25,4 |
| 1 | 75 | 9,76 | - |
| 2 | 175 | 9,87 | 19,4 |
| 3 | 345 | 10,09 | - |
| 4 | 448 | 10,11 | 20,8 |
| 5 | - | - | - |
| 6 | 721 | 10,36 | 17,1 |
| 7 | 915 | 10,49 | - |
| 8 | 961 | 10,42 | 16,8 |
| 9 | 1147 | 10,78 | - |
| 10 | 1288 | 10,88 | 18,0 |
| 11 | 1391 | 10,90 | - |
| 12 | 1602 | 10,85 | 18,1 |
| 13 | - | - | - |
| 14 | - | - | - |
| 15 | 1520 | 10,86 | 18,8 |
| 16 | 1823 | 10,86 | - |
| 17 | 1878 | 10,91 | - |

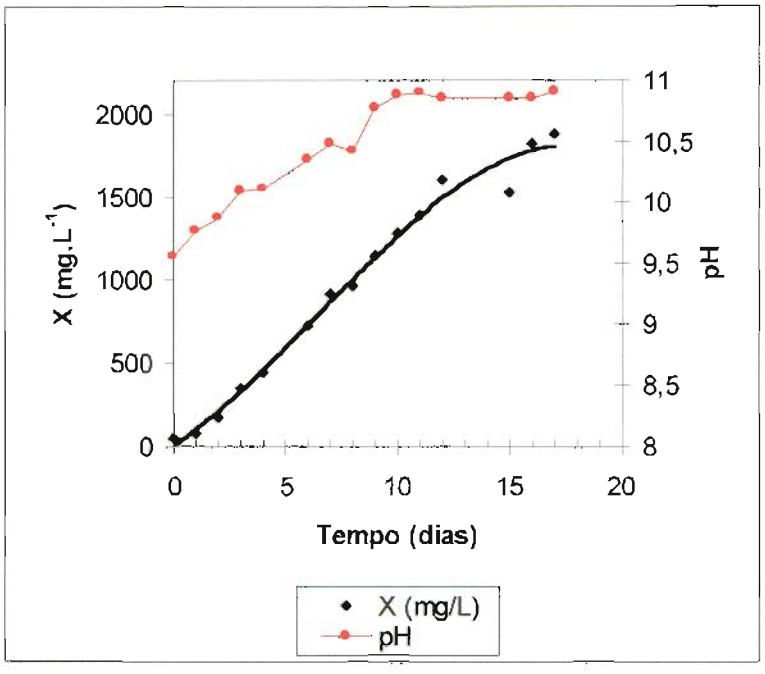



**FIGURA 54**- Gráficos de X e pH para o padrão $P_J$ correspondente ao ensaio J

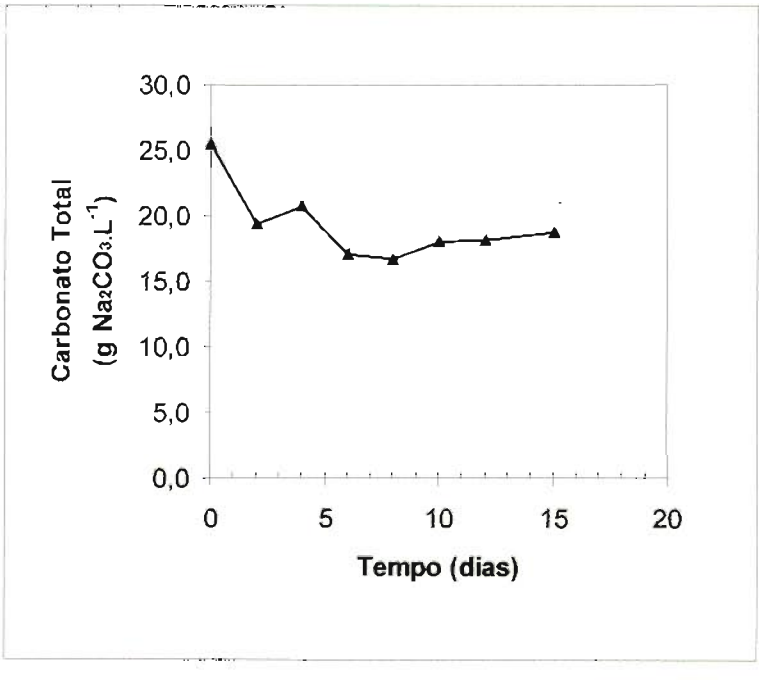



**FIGURA 55**- Gráfico de consumo de carbonato para o padrão $P_J$ correspondente ao ensaio J

### 5.2.5.2- ENSAIO J

**TABELA 21-** Valores de X, pH, concentração de carbonato total e amônia livre referentes ao ensaio J (Mut = 2500mg ; I = 5600lux)

| Tempo (dias) | X ($mg.L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $Na_2CO_3.L^{-1}$) | Amônia Livre ($mol.L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,55 | 25,4 | - |
| 1 | 89 | 9,74 | - | - |
| 2 | 223 | 9,86 | 23,0 | $2,4x10^{-6}$ |
| 3 | 396 | 10,09 | - | - |
| 4 | 493 | 10,14 | 20,0 | $1,0x10^{-5}$ |
| 5 | - | - | - | - |
| 6 | 671 | 10,42 | 17,3 | $1,3x10^{-5}$ |
| 7 | 873 | 10,45 | - | - |
| 8 | 932 | 10,46 | 19,5 | $1,8x10^{-5}$ |
| 9 | 1137 | 10,75 | - | - |
| 10 | 1181 | 10,90 | 17,6 | $4,5x10^{-6}$ |
| 11 | 1269 | 10,82 | - | - |
| 12 | 1320 | 10,77 | 16,2 | $1,3x10^{-5}$ |
| 13 | - | - | - | - |
| 14 | 1602 | 10,75 | 17,3 | $8,0x10^{-6}$ |
| 15 | 1856 | 10,62 | - | - |
| 16 | 1934 | 10,66 | - | - |
| 17 | 1945 | 10,81 | - | - |

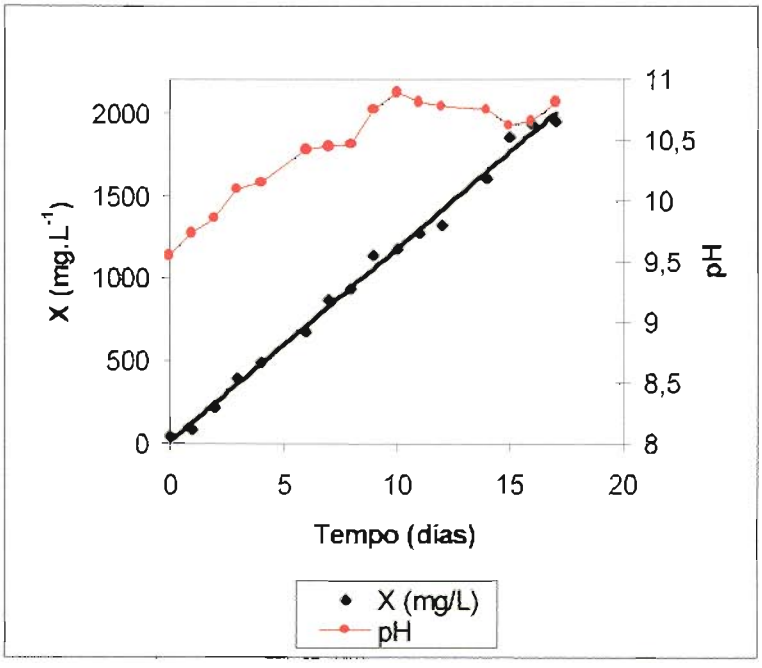



**FIGURA 56-** Gráficos de X e pH para o ensaio J (Mut = 2500mg ; I = 5600lux)

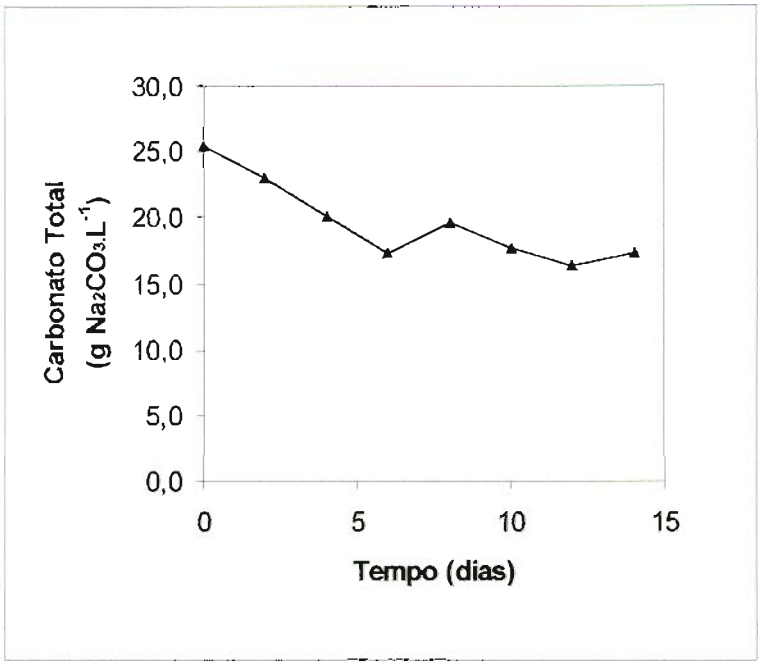



**FIGURA 57**- Gráfico de consumo de carbonato para o ensaio J (Mut = 2500mg ; I = 5600lux)

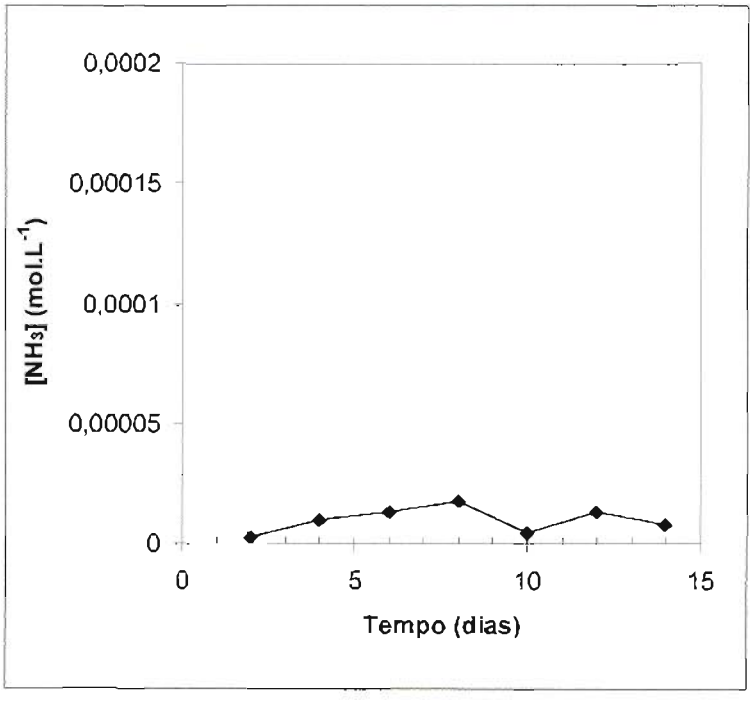



**FIGURA 58**- Gráfico de concentração de amônia livre para o ensaio J (Mut = 2500mg ; I = 5600lux)

## 5.2.6- RESULTADOS REFERENTES AO GRUPO 6

### 5.2.6.1- CULTIVO PADRÃO $P_K$

**TABELA 22-** Valores de X, pH e concentração de carbonato total referentes ao cultivo padrão $P_K$ correspondente ao ensaio K

| Tempo (dias) | X ($mg.L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $Na_2CO_3.L^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,60 | - |
| 1 | - | - | - |
| 2 | 58 | 9,86 | - |
| 3 | 75 | 9,97 | 21,5 |
| 4 | 99 | 9,95 | - |
| 5 | 123 | 9,90 | 25,0 |
| 6 | 145 | 9,93 | - |
| 7 | 201 | 9,95 | 22,9 |
| 8 | 214 | 9,97 | - |
| 9 | 231 | 10,10 | 21,2 |
| 10 | 235 | 10,01 | - |
| 11 | 265 | 10,12 | 20,1 |
| 12 | 337 | 10,11 | - |
| 13 | - | - | - |
| 14 | 355 | 10,14 | 21,2 |
| 15 | 369 | 10,36 | - |
| 16 | 401 | 10,19 | 20,1 |
| 17 | 391 | 10,21 | - |
| 18 | 446 | 10,28 | 19,3 |
| 19 | 455 | 10,38 | - |

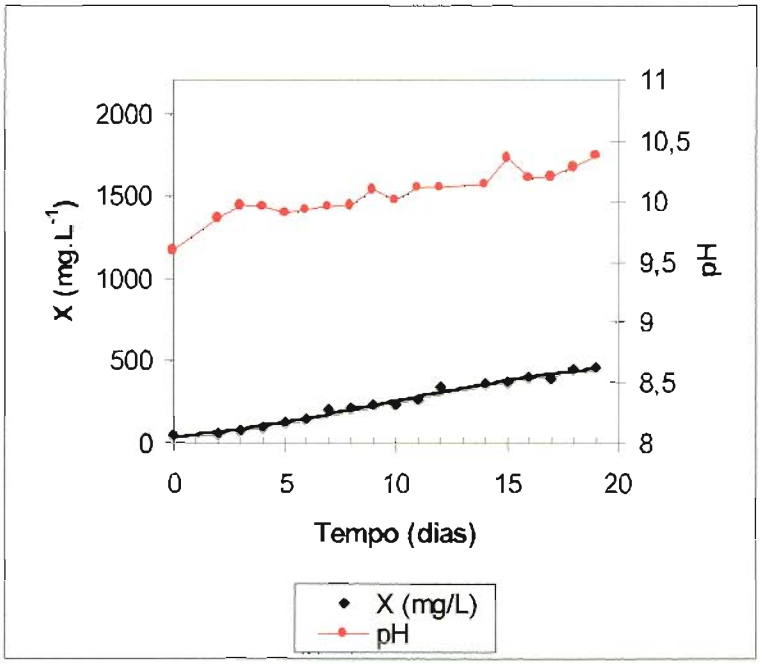



**FIGURA 59**- Gráficos de X e pH para o padrão $P_K$ correspondente ao ensaio K

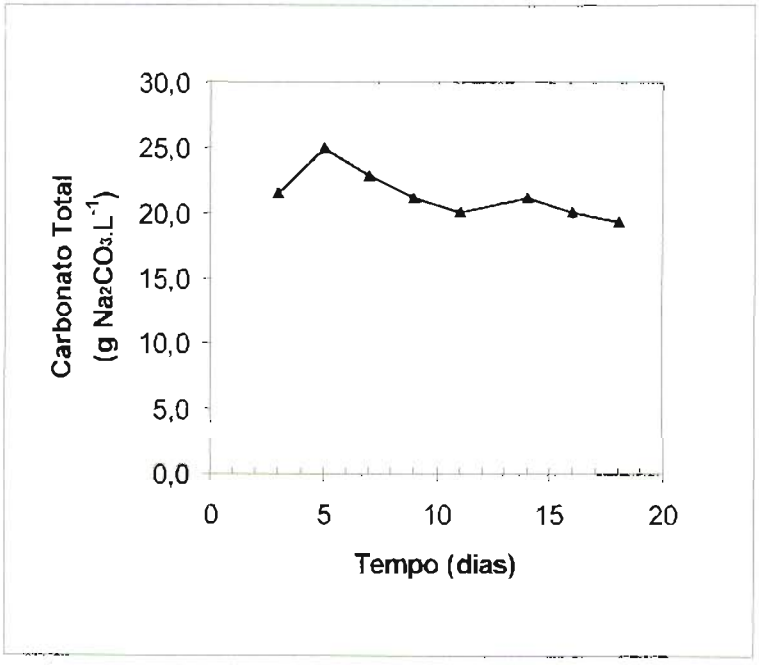



**FIGURA 60**- Gráfico de consumo de carbonato para o padrão $P_K$ correspondente ao ensaio K

### 5.2.6.2- ENSAIO K

**TABELA 23-** Valores de X, pH, concentração de carbonato total e amônia livre referentes ao ensaio K (Mut = 2500mg ; I = 1400lux)

| Tempo (dias) | X ($mg.L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $Na_2CO_3.L^{-1}$) | Amônia Livre ($mol.L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,60 | - | - |
| 1 | - | - | - | - |
| 2 | 46 | 9,90 | - | $1,2x10^{-4}$ |
| 3 | 71 | 9,98 | 24,0 | - |
| 4 | 96 | 9,98 | - | $7,2x10^{-5}$ |
| 5 | 121 | 9,95 | 24,0 | - |
| 6 | 144 | 9,92 | - | $4,2x10^{-5}$ |
| 7 | 191 | 9,96 | 23,3 | - |
| 8 | 200 | 10,00 | - | $7,2x10^{-6}$ |
| 9 | 210 | 10,08 | 21,7 | - |
| 10 | 247 | 10,02 | - | $7,5x10^{-6}$ |
| 11 | 256 | 10,10 | 21,2 | - |
| 12 | 308 | 10,13 | - | $2,2x10^{-5}$ |
| 13 | 315 | 10,22 | 19,8 | - |
| 14 | 334 | 10,15 | - | $1,0x10^{-5}$ |
| 15 | 366 | 10,30 | 19,3 | - |
| 16 | 377 | 10,18 | - | $2,0x10^{-5}$ |
| 17 | 404 | 10,16 | 19,6 | - |
| 18 | 408 | 10,25 | - | - |
| 19 | 406 | 10,34 | - | - |

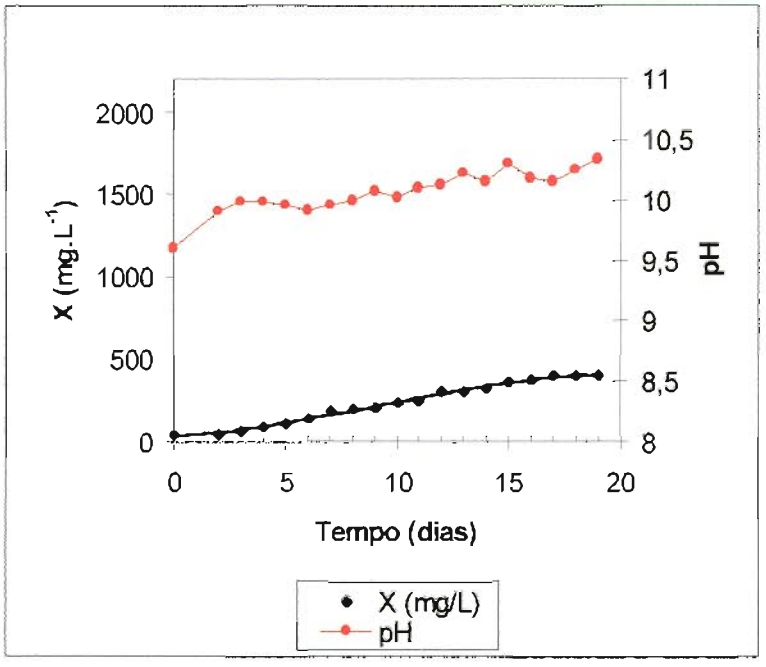



**FIGURA 61-** Gráficos de X e pH para o ensaio K (Mut = 2500mg ; I = 1400lux)

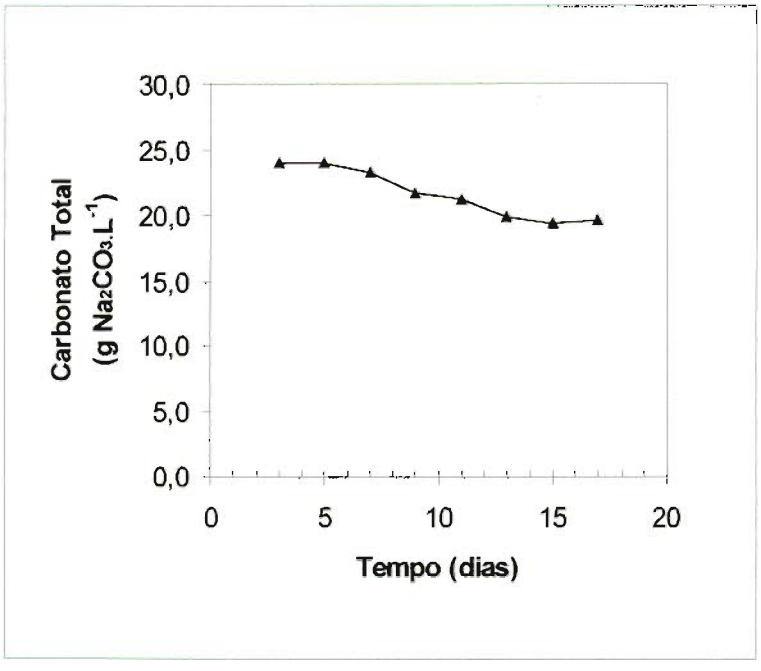



**FIGURA 62**- Gráfico de consumo de carbonato para o ensaio K (Mut = 2500mg ; I = 1400lux)

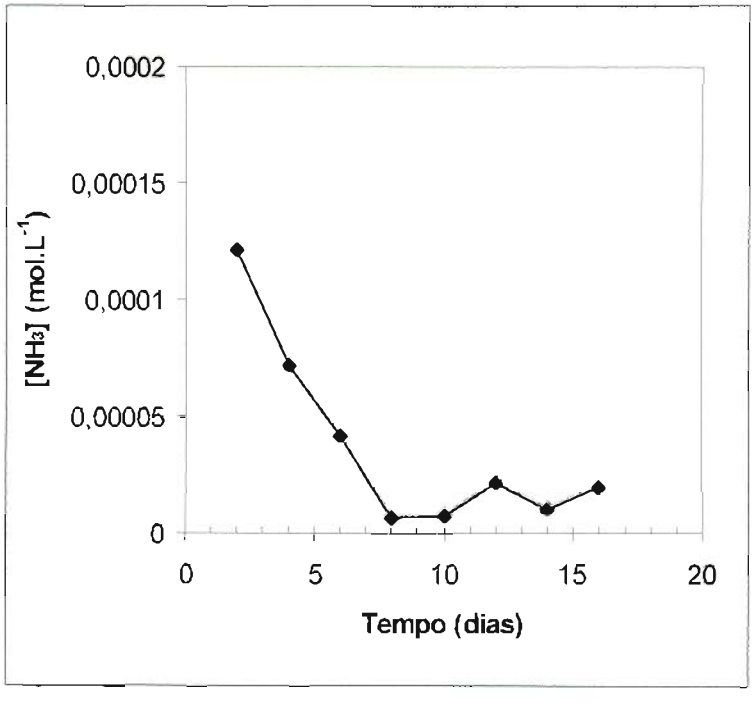



**FIGURA 63**- Gráfico de concentração de amônia livre para o ensaio K (Mut = 2500mg ; I = 1400lux)

**TABELA 24-** Resultados referentes à análises de clorofila, proteínas totais e lipídeos totais

| ENSAIO | Mut (mg) | E (lux) | [Cl *a*] (mg . g biom.$^{-1}$) | Proteínas Totais (%) | Lipídeos Totais (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| **A** | 1900 | 2000 | 13,1 | 71,4 | 14,5 |
| **B** | 3100 | 2000 | 15,5 | 70,5 | 14,7 |
| **$P_{A,B}$** | - | 2000 | 14,2 | 66,2 | 14,0 |
| **C** | 1900 | 5000 | 6,2 | 67,3 | 12,5 |
| **D** | 3100 | 5000 | 9,16 | 72,3 | 13,3 |
| **$P_{C,D}$** | - | 5000 | 14,9 | 70,3 | 13,1 |
| **E** | 2500 | 3500 | 13,9 | 71,5 | 15,0 |
| **$P_E$** | - | 3500 | 13,1 | 68,4 | 15,5 |
| **F** | 2500 | 3500 | 10,1 | 60,8 | 16,2 |
| **G** | 2500 | 3500 | 12,5 | 58,9 | 15,0 |
| **H** | 1660 | 3500 | 7,5 | 52,6 | 18,0 |
| **I** | 3340 | 3500 | 13,1 | 58,0 | 16,5 |
| **$P_{F,G,H,I}$** | - | 3500 | 12,1 | 63,0 | 16,8 |
| **J** | 2500 | 5600 | 6,0 | 61,9 | 14,0 |
| **$P_J$** | - | 5600 | 11,6 | 69,7 | 15,0 |
| **K** | 2500 | 1400 | 19,9 | 69,3 | 16,5 |
| **$P_K$** | - | 1400 | 19,0 | 60,9 | 17,7 |

TABELA 25- Valores de $X_{máx.}$, $P_X$, $P_{Cl\alpha}$ e $Y_{X/N}$ para os ensaios realizados

| ENSAIO | Mut (mg) | E (lux) | $X_{máx.}$ ($mg.L^{-1}$) | $P_X$ ($mg.L^{-1}.dia^{-1}$) | $P_{Cl\alpha}$ ($mg.L^{-1}.dia^{-1}$) | $Y_{X/N}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 1900 | 2000 | 661 | 36,7 | 0,87 | 3,4 |
| B | 3100 | 2000 | 671 | 37,2 | 1,04 | 2,1 |
| $P_{A,B}$ | - | 2000 | 623 | 34,6 | 0,88 | 1,5 |
| C | 1900 | 5000 | 1553 | 97,1 | 0,96 | 8,5 |
| D | 3100 | 5000 | 1632 | 113,6 | 1,49 | 5,5 |
| $P_{C,D}$ | - | 5000 | 1423 | 88,9 | 2,12 | 3,5 |
| E | 2500 | 3500 | 1266 | 74,5 | 1,76 | 5,0 |
| $P_E$ | - | 3500 | 1081 | 60,1 | 1,42 | 2,6 |
| F | 2500 | 3500 | 1222 | 71,9 | 1,23 | 5,0 |
| G | 2500 | 3500 | 1290 | 80,6 | 1,61 | 5,3 |
| H | 1660 | 3500 | 1214 | 71,4 | 0,91 | 7,5 |
| I | 3340 | 3500 | 1185 | 69,7 | 1,55 | 3,6 |
| $P_{F,G,H,I}$ | - | 3500 | 1193 | 70,2 | 1,44 | 2,9 |
| J | 2500 | 5600 | 1945 | 114,4 | 1,17 | 8,1 |
| $P_J$ | - | 5600 | 1878 | 110,5 | 2,18 | 4,6 |
| K | 2500 | 1400 | 408 | 22,7 | 0,81 | 1,5 |
| $P_K$ | - | 1400 | 455 | 23,9 | 0,86 | 1,0 |

## 5.3- DISCUSSÃO GERAL

Os resultados expostos mostram que o melhor crescimento ocorreu no ensaio J (2500mg de uréia / 5600lux) e o pior no ensaio K (2500mg de uréia / 1400lux).Para os ensaios realizados, pode-se afirmar que, quanto maior a iluminância do cultivo, maior é o crescimento celular. Porém, sabe-se que existe um limite para esta relação devido à um ponto de saturação luminosa, a partir do qual observa-se fotoxidação das células (SAMUELSON et al., 1985; VONSHAK, 1988).

Nos ensaios A e B, observa-se uma diminuição aparente na concentração celular no primeiro dia de cultivo em relação ao tempo zero. Este comportamento pode ser explicado pela variabilidade dos inóculos e

adaptação das células à condições novas (iluminação baixa, transferência para o tanque), dado que o fenômeno também ocorreu no padrão $P_{A,B}$ referente à estes ensaios. As concentrações de amônia superiores à $1,2 \times 10^{-4}$ mol.L$^{-1}$ também podem ter influenciado o crescimento celular, devido à toxicidade desta substância às células.

No ensaio C (1900mg de uréia / 5000lux), observa-se um comportamento semelhante no décimo dia de cultivo, com um pico de concentração de amônia livre associado ao fato de praticamente não haver crescimento celular. No ensaio K (2500mg de uréia / 1400lux) também ocorreu uma diminuição aparente do crescimento do tempo zero para o tempo 1, simultaneamente com uma concentração de amônia livre de $1,2 \times 10^{-4}$ mol.L$^{-1}$.

A utilização de uréia como fonte de nitrogênio no cultivo de *S. platensis* acarreta em um ganho do ponto de vista energético. A uréia sofre hidrólise espontânea no meio de cultivo altamente alcalino, dando origem a amônia, que pode então ser utilizada pelas células. No caso do nitrato, o microrganismo precisa reduzir este íon a nitrito (reação catalisada pela enzima nitrato redutase), e posteriormente a amônia (reação catalisada pela enzima nitrito redutase) para que esta então possa ser utilizada. Este processo de redução do nitrito a amônia envolve gastos celulares energéticos (HATTORI & MYERS, 1966).

$$\underset{\text{uréia}}{NH_2CONH_2} + H_2O \longrightarrow \underset{\text{amônia}}{2NH_3} + CO_2$$

Com base nos valores de $Y_{X/N}$ calculados, pode-se dizer que o aproveitamento da uréia como fonte de nitrogênio foi superior ao do nitrato de potássio, para todos os grupos de ensaios realizados.

Os gráficos de amônia livre referentes aos cultivos realizados com uréia mostram que esta substância foi sempre rapidamente convertida em amônia, devido à alcalinidade do meio de cultivo, e em parte liberada para o ar, dado que os cultivos foram realizados em tanques abertos. A alternativa de cultivo em tanques fechados torna-se interessante, pela possibilidade de

redução da massa de uréia a ser utilizada em função de menores perdas por evaporação.

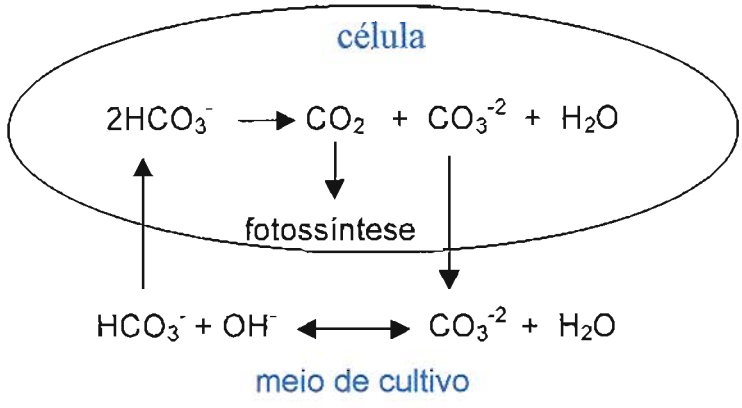
Com exceção dos ensaios K (2500mg de uréia / 1400lux) e I (1660mg de uréia / 3500lux), todos os cultivos realizados com uréia forneceram $X_{máx.}$ e produtividade maiores ou semelhantes aos obtidos com $KNO_3$ nas referidas iluminâncias. O maior crescimento do padrão do grupo 6, $P_K$, em comparação ao ensaio K pode ter ocorrido devido à iluminância muito baixa dificultar o crescimento celular e expor uma quantidade menor de células à amônia produzida pela hidrólise da uréia em meio alcalino. Com relação ao ensaio I, a quantidade de uréia foi o fator limitante para o crescimento celular.

No grupo 4, realizado à 3500lux, observa-se que existe uma quantidade máxima de uréia favorável ao crescimento, acima da qual tem-se formação de amônia em níveis tóxicos às células no final do período de alimentação. Os ensaios F e G (2500mg de uréia) apresentaram maior crescimento que os ensaios H (1660mg de uréia) e I (3340mg de uréia). Portanto, baixas quantidades de uréia também são prejudiciais ao crescimento, pois ocasionam morte celular pelo decréscimo do conteúdo de nitrogênio nas células e acúmulo de compostos de carbono, ou seja, polissacarídeos e gorduras (SYRETT,1962).

O efeito da utilização de uréia como fonte de nitrogênio parece ser acentuado em cultivos sob iluminâncias maiores. Isto pode ser percebido quando comparamos os ensaios A (1900mg de uréia / 2000lux) e B (3100mg de uréia / 2000lux) com os ensaios C (1900mg de uréia / 5000lux) e D (3100mg de uréia / 5000lux), e vemos que a diferença de crescimento para as duas massas de uréia utilizadas é maior quando trabalhamos à 5000lux, ou seja, nos ensaios C e D.

Os cultivos com uréia realizados à 5000lux e 5600lux apresentaram-se mais claros (verde-amarelado) do que os respectivos padrões. Esta coloração surge quando tem-se falta de nitrogênio para o crescimento, o que sugere que, a altos valores de iluminância, seja possível trabalhar com massas maiores de uréia obtendo rendimentos superiores aos observados.

Para todos os cultivos, observa-se um aumento do pH acompanhando o crescimento celular sendo que, quanto maior o crescimento, maior o acréscimo no pH. Este fenômeno é explicado pelo consumo da fonte de carbono durante o crescimento, ou seja, os íons bicarbonato provenientes do equilíbrio entre os sais carbonato de sódio e bicarbonato de sódio presentes no meio de cultura. Os íons bicarbonato são transportados ativamente para o interior celular, convertidos à carbonato e gás carbônico que é então utilizado na fotossíntese. Deste modo, além do pH, o consumo de íons bicarbonato também tende a aumentar ao longo do crescimento.




O teor protéico das biomassas obtidas variou de 52,6 a 72,3%. A utilização de uréia como fonte de nitrogênio não causou mudanças significativas no conteúdo de proteínas em relação aos cultivos com $KNO_3$. É importante porém notar que o ensaio H (1660mg de uréia / 3500lux), no qual utilizou-se a menor massa de uréia, foi o que apresentou a menor porcentagem de proteínas totais (52,6%).

O conteúdo de lipídeos variou de 12,5% a 18%, sendo que o maior valor foi observado no ensaio H (1660mg de uréia / 3500lux), no qual tem-se a menor massa de uréia adicionada, confirmando o acúmulo de substâncias de carbono em cultivos com escassez de nitrogênio.

As análises de clorofila revelam uma relação inversa entre iluminância e conteúdo celular de clorofila. Esta relação é mais facilmente visualizada nos valores extremos de iluminância, como no ensaio J ( 2500mg de uréia / 5600lux) que apresenta 6,0mg de clorofila $a$ por grama de biomassa seca, e

no ensaio K (2500mg de uréia / 1400lux) que apresenta 19,9mg de clorofila *a* por grama de biomassa seca. Portanto, em células de *S. platensis* cultivadas sob iluminação fraca observa-se uma biossíntese maior de moléculas de clorofila para que a captação da luz disponível possa ser otimizada pela presença de um número maior de fotorreceptores.

Entre os ensaios A (1900mg de uréia / 2000lux) e B (3100mg de uréia / 2000lux) e entre os ensaios C (1900mg de uréia / 5000lux) e D (3100mg de uréia / 5000lux), observa-se um conteúdo de clorofila maior nos cultivos realizados com adição de maiores quantidades de uréia (B e D, respectivamente). Do mesmo modo, no grupo 4, o menor teor de clorofila ocorreu no ensaio H (1660mg de uréia / 3500lux), relativo à menor massa de uréia utilizada. Portanto, pode-se afirmar que maiores quantidades de uréia são favoráveis à produção de maiores quantidades de clorofila pelas células de *S. platensis*, o que está de acordo com o observado por PIORRECK et al. (1984). Este fato pode estar associado ao maior crescimento celular observado com maiores quantidades de uréia, o que acarreta na necessidade de uma quantidade maior de moléculas de clorofila para captação da luz devido a altas densidades celulares originarem regiões de sombra. Além disso, a molécula de clorofila possui em sua estrutura átomos de nitrogênio, como pode ser observado na figura 2 (item 3.5), e podem ocorrer clorofilas associadas estruturalmente à proteínas, como descrito por BOGORAD (1962).

O alto conteúdo celular de clorofila observado nos cultivos pouco iluminados ocorre às custas de um crescimento muito baixo e, deste modo, acaba não apresentando vantagens em relação aos cultivos mais iluminados. Deste modo, a produtividade em clorofila (calculada levando-se em consideração o crescimento até o décimo dia de cultivo, no qual as análises de clorofila foram realizadas) para o ensaio K (2500mg de uréia / 1400lux) é de $8,1 mg.L^{-1}.dia^{-1}$, enquanto que no ensaio J (2500mg de uréia / 5600lux) temos $11,7 mg.L^{-1}dia^{-1}$, apesar deste ensaio apresentar o menor conteúdo celular de clorofila.

Entretanto, as maiores produtividades em clorofila foram obtidas com valores de iluminância intermediários, confirmando a observação de KEBEDE & AHLGREN (1996), de que conteúdos máximos de clorofila ocorrem em níveis de iluminação intermediários, nos quais o ganho pelo investimento em clorofila nova balanceia o custo da síntese.

Atualmente, praticamente toda a clorofila produzida no Brasil é obtida de espinafre. A obtenção de clorofila a partir de *Spirulina* sp. apresenta-se como uma alternativa bastante atrativa. Segundo dados encontrados na literatura, expostos na tabela 5 da seção 5.1.5, a biomassa de *S. platensis* possui aproximadamente 20 vezes mais clorofila que o espinafre. Além disto, no espinafre temos a presença de clorofilas $a$ e $b$, sendo necessário converter toda clorofila para $a$, forma na qual esta é utilizada comercialmente.

A utilização de clorofila de *Spirulina* sp. como corante torna-se ainda mais interessante no caso de produtos alimentares. O alto valor nutricional desta alga, aliado aos aspectos de segurança em seu consumo sugerem a incorporação da biomassa integral em alimentos, proporcionando não apenas cor aos mesmos mas também um incremento do ponto de vista nutricional. Dentro deste contexto, deve-se ressaltar a importância das propriedades organolépticas dos alimentos, as quais devem ser consideradas no caso de incorporação da biomassa integral.

## 5.4- ANÁLISE DE REGRESSÃO MULTIVARIÁVEL

A partir dos resultados obtidos para os ensaios referentes ao planejamento estatístico, foram realizadas análises de regressão multivariável para os parâmetros $X_{máx.}$, $P_X$, $Y_{X/N}$, [Cl$a$] e $P_{Cla}$ em função das variáveis independentes estudadas, em suas formas codificadas, Mutc e Ec.

Para cada parâmetro (variável dependente), obteve-se uma equação, referente à um modelo de superfície de resposta que mais se adequasse aos resultados obtidos.

Na análise de regressão, considerou-se como maior erro para o teste de um coeficiente angular associado a um fator (p - nível descritivo) o valor

de 0,15 (15%). Para cada análise de regressão foi feita uma análise de variância para certificar-se de que o modelo ajustado foi adequado. A fim de se ter uma idéia mais concreta das equações ajustadas, foram realizadas análises de regressão entre os valores experimentais das variáveis dependentes e os valores estimados pelas equações, considerando-se uma faixa de erro de ± 5%.

### 5.4.1- REGRESSÃO MULTIVARIÁVEL PARA CONCENTRAÇÃO CELULAR MÁXIMA ($X_{máx.}$)

**TABELA 26**-Análise de regressão multivariável para concentração celular máxima ($X_{máx.}$) em função das variáveis em estudo na forma codificada

| Variável independente | Coeficiente de regressão | Erro padrão | t-value | p |
|---|---|---|---|---|
| Constante | 1260,096893 | 35,808063 | 35,1903 | 0,0000 |
| $Mutc^2$ | -45,525697 | 26,458694 | -1,7206 | 0,1290 |
| $Ec^2$ | -57,260391 | 26,458694 | -2,1641 | 0,0672 |
| Ec | 505,656566 | 22,041337 | 22,9413 | 0,0000 |

$r^2$ = 0,9815

**TABELA 27**- Análise de variância do modelo de regressão multivariável para concentração celular máxima ($X_{máx.}$)

| Fonte de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | F-calculado | p |
|---|---|---|---|---|---|
| Modelo | 2048183,0 | 3 | 682728,0 | 177,438 | 0,0000 |
| Erro | 26933,9 | 7 | 3847,7 | | |
| Total: | 2075117,0 | 10 | | | |

$r^2$ = 0,987021

Com base na análise de regressão, pode-se escrever a seguinte equação:

$$X_{máx.}\hat{} = 1260,1 - 57,3.Ec^2 - 45,5.Mutc^2 + 505,7.Ec$$

As figuras 64 e 65 representa a variação de $X_{máx.}\hat{}$ em função de Mutc e Ec conforme a análise de regressão realizada.

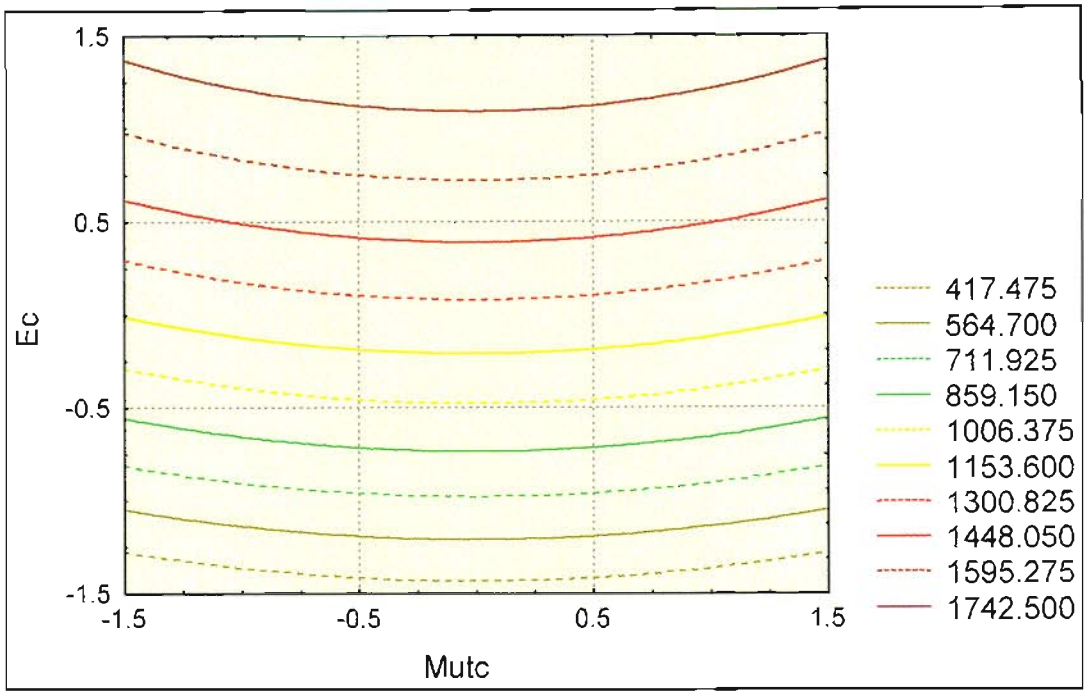



**FIGURA 64**– Curvas de nível para concentração celular máxima ($X_{máx.}$^) em função de Mutc e Ec

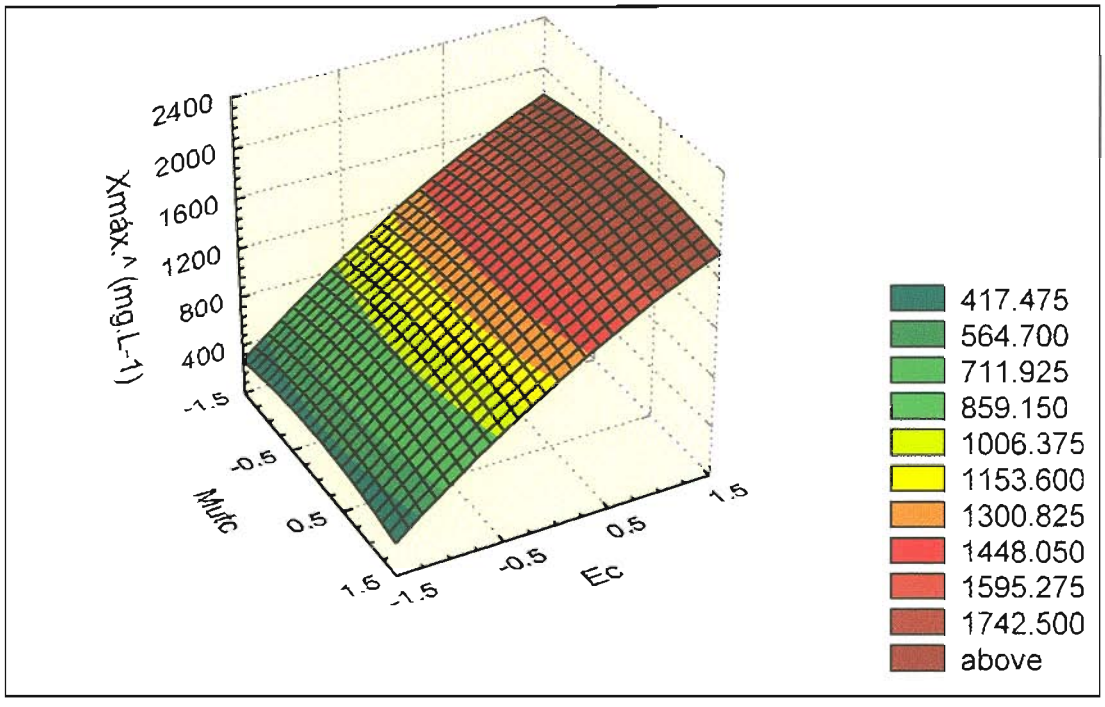



**FIGURA 65**– Superfície de resposta para concentração celular máxima ($X_{máx.}$^) em função de Mutc e Ec

A superfície de resposta obtida para $X_{máx.}$ confirma a influência significativa da iluminância no crescimento de *S. platensis*, anteriormente mencionada. Pode-se observar também um efeito da uréia no crescimento, porém não tão acentuado, sendo que quantidades intermediárias desta substância parecem ser mais adequadas.

**TABELA 28-** Valores de concentração celular máxima ($X_{máx.}$) experimentais e estimados a partir da equação de regressão multivariável

| **Mutc** | Ec | **$X_{máx.}$ (experimental)** | **$X_{máx.}$^ (estimado)** | **Erro (%)** |
|---|---|---|---|---|
| -1 | -1 | 661 | 651,7 | -1,41 |
| 1 | -1 | 671 | 651,7 | -2,9 |
| -1 | 1 | 1553 | 1663,0 | +7,08 |
| 1 | 1 | 1632 | 1663,0 | +1,90 |
| 0 | 0 | 1266 | 1260,1 | -0,47 |
| 0 | 0 | 1222 | 1260,1 | +3,12 |
| 0 | 0 | 1290 | 1260,1 | -2,32 |
| -1,4 | 0 | 1214 | 1170,9 | -3,55 |
| 0 | 1,4 | 1945 | 1855,8 | -4,59 |
| 1,4 | 0 | 1185 | 1170,9 | -1,19 |
| 0 | -1,4 | 408 | 439,9 | +7,82 |

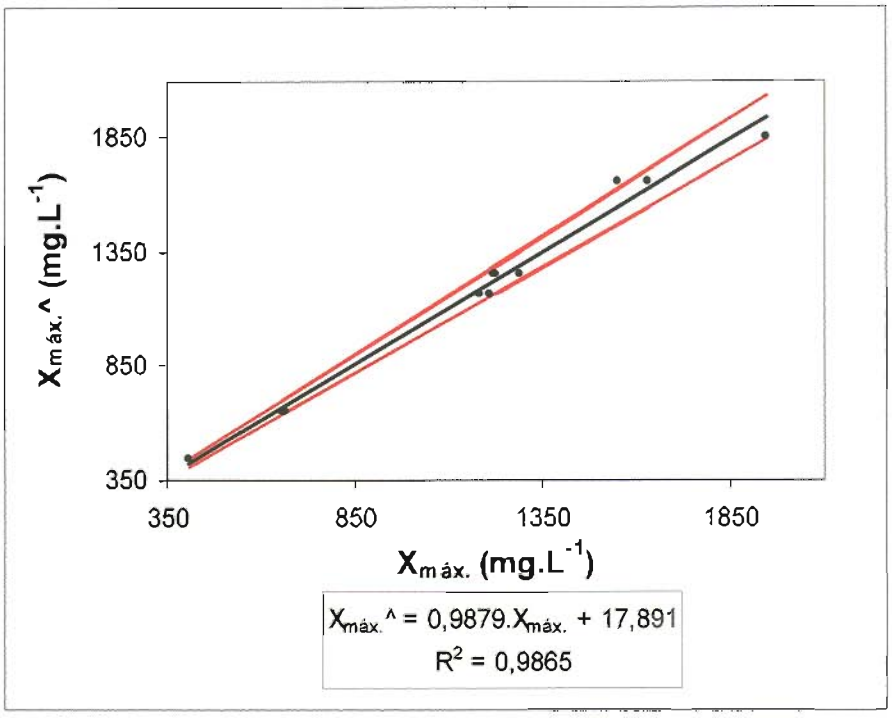



**FIGURA 66**- $X_{máx.}$^ (estimada) em função de $X_{máx.}$ (experimental), considerando-se uma faixa de erro de 5% (linhas em vermelho) em relação à curva média

## 5.4.2- REGRESSÃO MULTIVARIÁVEL PARA PRODUTIVIDADE EM CÉLULAS ($P_X$)

**TABELA 29**-Análise de regressão multivariável para produtividade em células ($P_X$) em função das variáveis em estudo na forma codificada

| Variável independente | Coeficiente de regressão | Erro padrão | t-value | p |
|---|---|---|---|---|
| Constante | 71,800000 | 1,463719 | 49,0531 | 0,0000 |
| Ec | 33,482323 | 1,725009 | 19,4099 | 0,0000 |
| Ec.Mutc | 4,000000 | 2,427303 | 1,6479 | 0,1380 |

$r^2$ = 0,9742

**TABELA 30-** Análise de variância do modelo de regressão multivariável para produtividade em células ($P_X$)

| Fonte de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | F-calculado | p |
|---|---|---|---|---|---|
| Modelo | 8942,84 | 2 | 4471,42 | 189,731 | 0,0000 |
| Erro | 188,538 | 8 | 23,5672 | | |
| Total: | 8150,69 | 10 | | | |

$r^2$ = 0,979353

Com base na análise de regressão, pode-se escrever a seguinte equação:

$$P_X\hat{} = 71,8 + 33,5.Ec + 4.Ec.Mutc$$

As figuras 67 e 68 representam a variação de $P_X\hat{}$ em função de Mutc e Ec conforme a análise de regressão realizada.

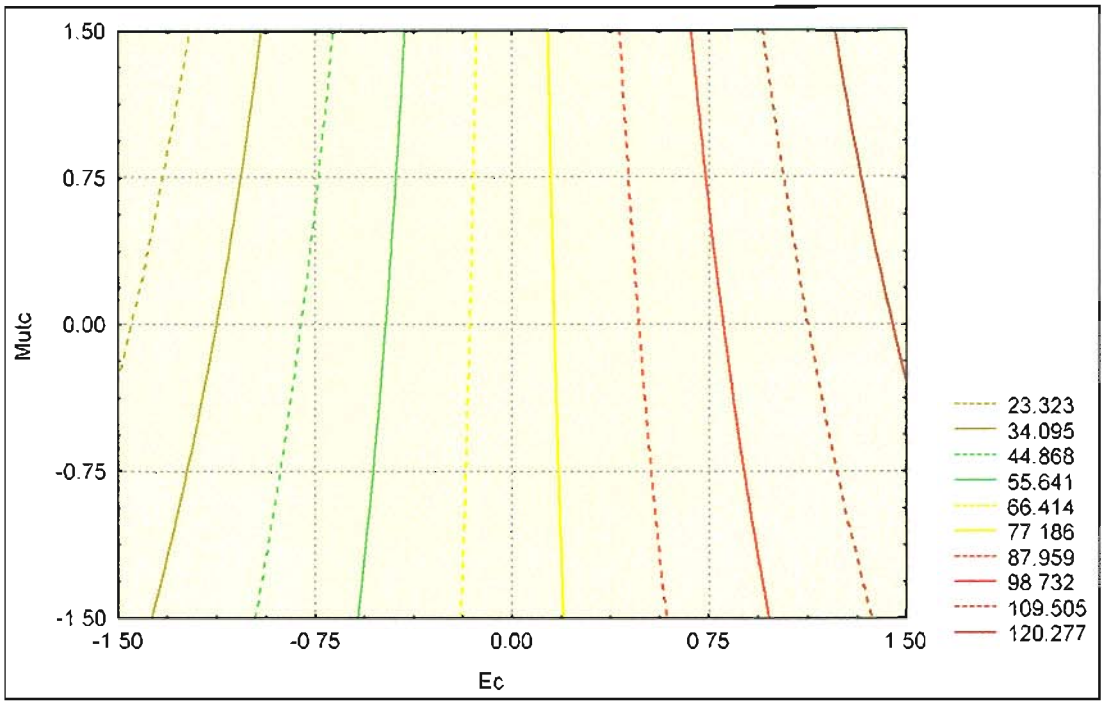



**FIGURA 67-** Curvas de nível para a produtividade em células ($P_X$ ^) em função de Mutc e Ec

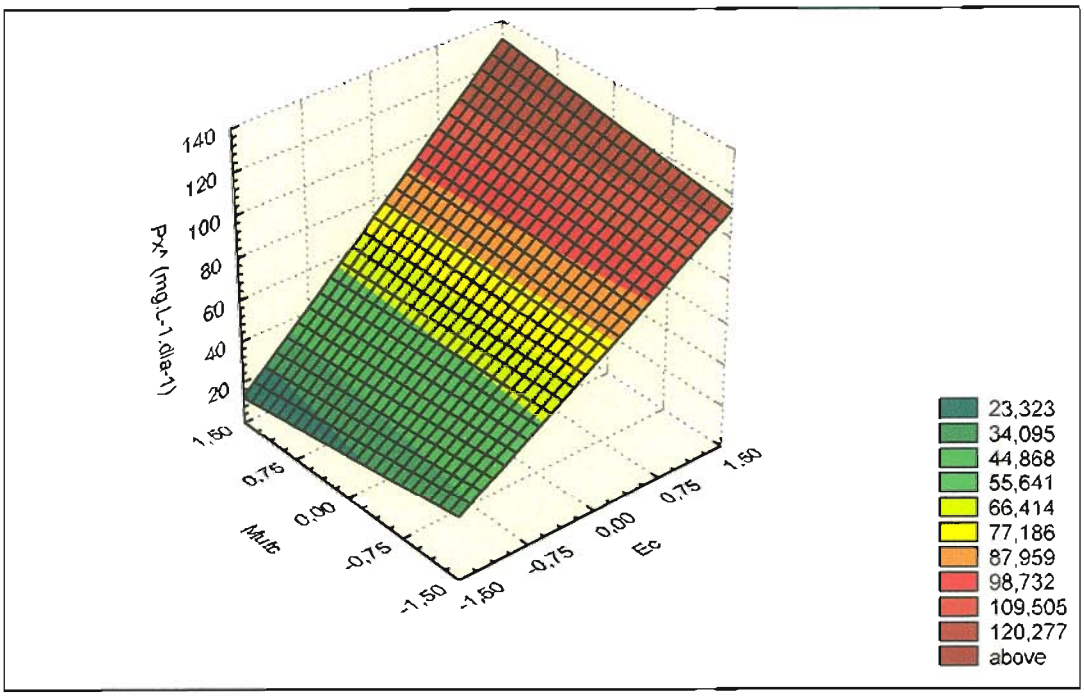



**FIGURA 68-** Superfície de resposta para a produtividade em células ($P_X$ ^) em função de Mutc e Ec

A produtividade em células, da mesma forma que a concentração celular, aumenta com o aumento da iluminância fornecida. Observa-se um decréscimo deste parâmetro conforme o aumento de uréia, o que sugere que quantidades de uréia excessivas apenas ocasionem uma maior perda de amônia para o ambiente, além de poderem atingir níveis tóxicos às células.

**TABELA 31-** Valores de produtividade em células ($P_X$) experimentais e estimados a partir da equação de regressão multivariável

| Mutc | Ec | Px (experimental) | Px^ (estimado) | Erro (%) |
|---|---|---|---|---|
| -1 | -1 | 36,7 | 42,3 | +15,26 |
| 1 | -1 | 37,2 | 34,3 | -7,80 |
| -1 | 1 | 97,1 | 101,3 | +4,33 |
| 1 | 1 | 113,6 | 109,3 | -3,79 |
| 0 | 0 | 74,5 | 71,8 | -3,62 |
| 0 | 0 | 80,6 | 71,8 | -10,92 |
| 0 | 0 | 71,4 | 71,8 | +0,56 |
| -1,4 | 0 | 69,7 | 71,8 | +3,01 |
| 0 | 1,4 | 114,4 | 118,7 | +3,76 |
| 1,4 | 0 | 70,2 | 71,8 | +2,28 |
| 0 | -1,4 | 22,7 | 24,9 | +9,69 |

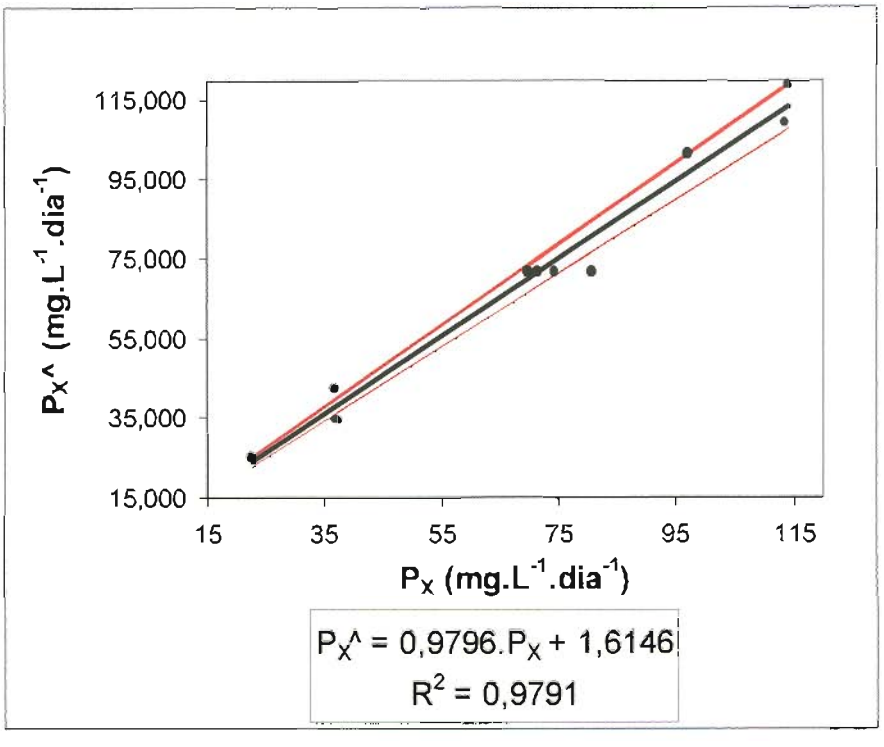



**FIGURA 69-** $P_X$^ (estimada) em função de $P_X$ (experimental), considerando-se uma faixa de erro de 5% (linhas em vermelho) em relação à curva média

### 5.4.3- REGRESSÃO MULTIVARIÁVEL PARA O FATOR DE CONVERSÃO DE NITROGÊNIO EM CÉLULAS ($Y_{X/N}$)

**TABELA 32**-Análise de regressão multivariável para o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função das variáveis em estudo na forma codificada

| Variável independente | Coeficiente de regressão | Erro padrão | t-value | p |
|---|---|---|---|---|
| Constante | 5,045455 | 0,120685 | 41,8069 | 0,0000 |
| Mutc | -1,232323 | 0,142228 | -8,6644 | 0,0001 |
| Ec | 2,239899 | 0,142228 | 15,7486 | 0,0000 |
| Mutc.Ec | -0,425000 | 0,200133 | -2,1236 | 0,0713 |

$r^2$ = 0,9701

**TABELA 33-** Análise de variância do modelo de regressão multivariável para o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$)

| Fonte de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | F-calculado | p |
|---|---|---|---|---|---|
| Modelo | 52,4858 | 3 | 17,4953 | 109,2000 | 0,0000 |
| Erro | 1,12149 | 7 | 0,160213 | | |
| Total: | 11,5959 | 10 | | | |

$r^2$ = 0,97908

Com base na análise de regressão, pode-se escrever a seguinte equação:

$$Y_{X/N}\hat{} = 5,0 + 2,2.Ec - 1,2.Mutc - 0,4.Mutc.Ec$$

As figuras 70 e 71 representam a variação de $Y_{X/N}\hat{}$ em função de Mutc e Ec conforme a análise de regressão realizada.

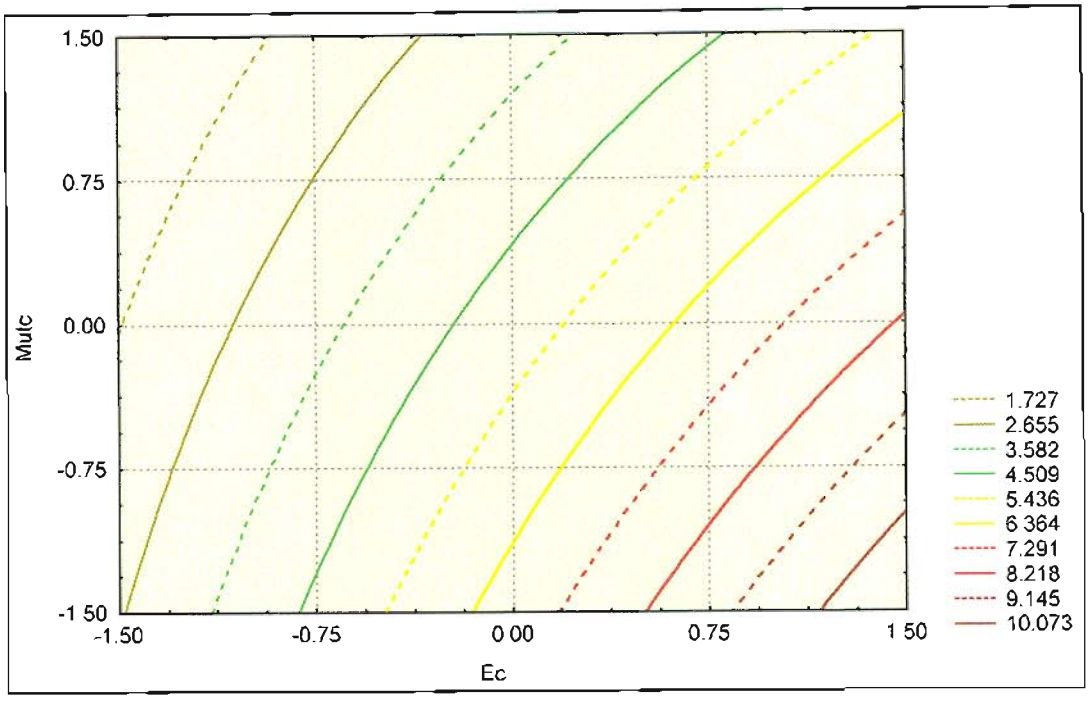



**FIGURA 70-** Curvas de nível para o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$^) em função de Mutc e Ec

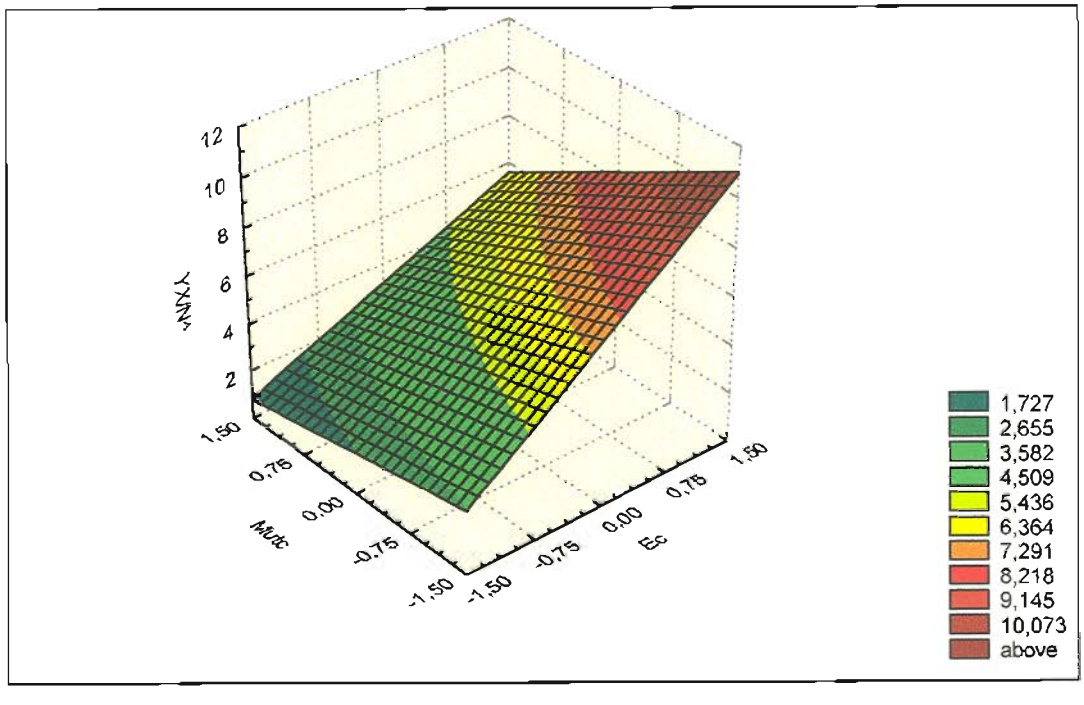



**FIGURA 71-** Superfície de resposta para o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$^) em função de Mutc e Ec

O fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$), da mesma forma que o crescimento celular e a produtividade, também aumenta com o aumento da quantidade de luz fornecida para o cultivo. Porém, o gráfico obtido mostra que, para quantidades crescentes de uréia, ocorre um menor aproveitamento do nitrogênio fornecido. Portanto, como mencionado anteriormente, para as maiores quantidades de uréia utilizadas, deve ocorrer maior perda de nitrogênio por dispersão da amônia do meio de cultura para o ambiente.

**TABELA 34-** Valores do fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) experimentais e estimados a partir da equação de regressão multivariável

| Mutc | Ec | $Y_{x/N}$ (experimental) | $Y_{x/N}$^ (estimado) | Erro (%) |
|---|---|---|---|---|
| -1 | -1 | 3,4 | 3,6 | +5,88 |
| 1 | -1 | 2,1 | 2,0 | -4,76 |
| -1 | 1 | 8,5 | 8,8 | +3,53 |
| 1 | 1 | 5,5 | 5,6 | +1,82 |
| 0 | 0 | 5,0 | 5,0 | +0,00 |
| 0 | 0 | 5,0 | 5,0 | +0,00 |
| 0 | 0 | 5,3 | 5,0 | -5,66 |
| -1,4 | 0 | 7,5 | 6,7 | -10,67 |
| 0 | 1,4 | 8,1 | 8,1 | +0,00 |
| 1,4 | 0 | 3,6 | 3,3 | -8,33 |
| 0 | -1,4 | 1,5 | 1,9 | +26,67 |

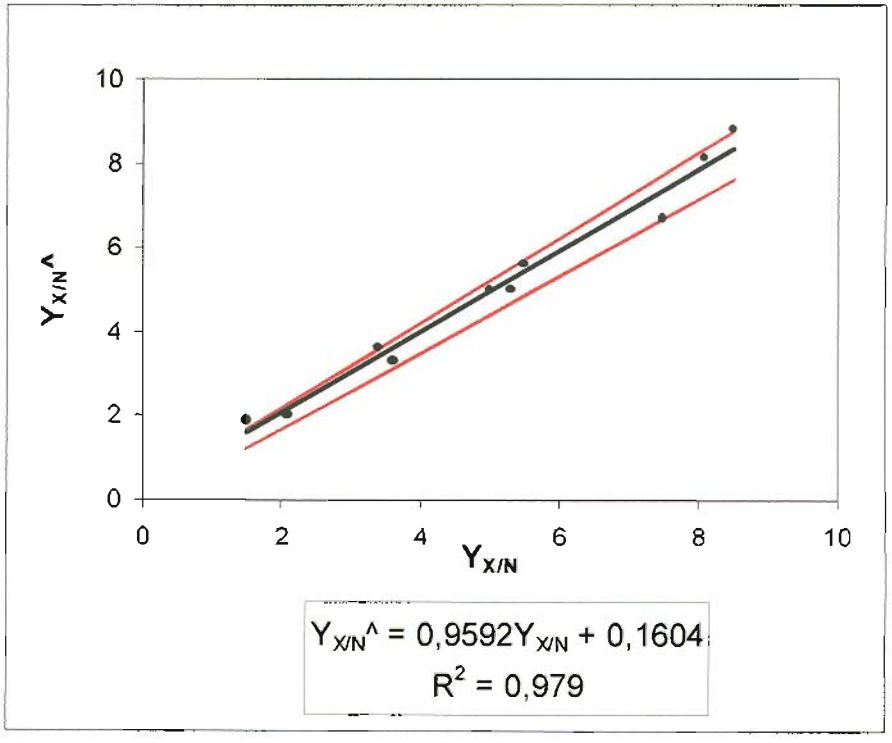



**FIGURA 72**- $Y_{X/N}$^ (estimado) em função de $Y_{X/N}$ (experimental), considerando-se uma faixa de erro de 5% (linhas em vermelho) em relação à curva média

### 5.4.4- REGRESSÃO MULTIVARIÁVEL PARA A CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA *a* NA BIOMASSA ([Cl*a*])

**TABELA 35**-Análise de regressão multivariável para a concentração de clorofila *a* na biomassa ([Cl*a*]) em função das variáveis em estudo na forma codificada

| Variável independente | Coeficiente de regressão | Erro padrão | t-value | p |
|---|---|---|---|---|
| Constante | 12,031315 | 0,503456 | 23,8974 | 0,0000 |
| $Mutc^2$ | -0,942483 | 0,488514 | -1,9293 | 0,0950 |
| Mutc | 1,673232 | 0,424516 | 3,9415 | 0,0056 |
| Ec | -3,772727 | 0,424516 | -8,8871 | 0,0000 |

$r^2$ = 0,9050

**TABELA 36-** Análise de variância do modelo de regressão multivariável para a concentração de clorofila *a* na biomassa ([Cl*a*])

| Fonte de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | F-calculado | p |
|---|---|---|---|---|---|
| Modelo | 140,215 | 3 | 46,7385 | 32,7462 | 0,0002 |
| Erro | 9,99107 | 7 | 1,42730 | | |
| Total: | 150,206 | 10 | | | |

$r^2$ = 0,933484

Com base na análise de regressão, pode-se escrever a seguinte equação:

$$[Cl\alpha]^{\wedge} = 12,0 - 0,9.Mutc^2 + 1,7.Mutc - 3,8.Ec$$

As figuras 73 e 74 representam a variação de [Cl*a*]^ em função de Mutc e Ec conforme a análise de regressão realizada.

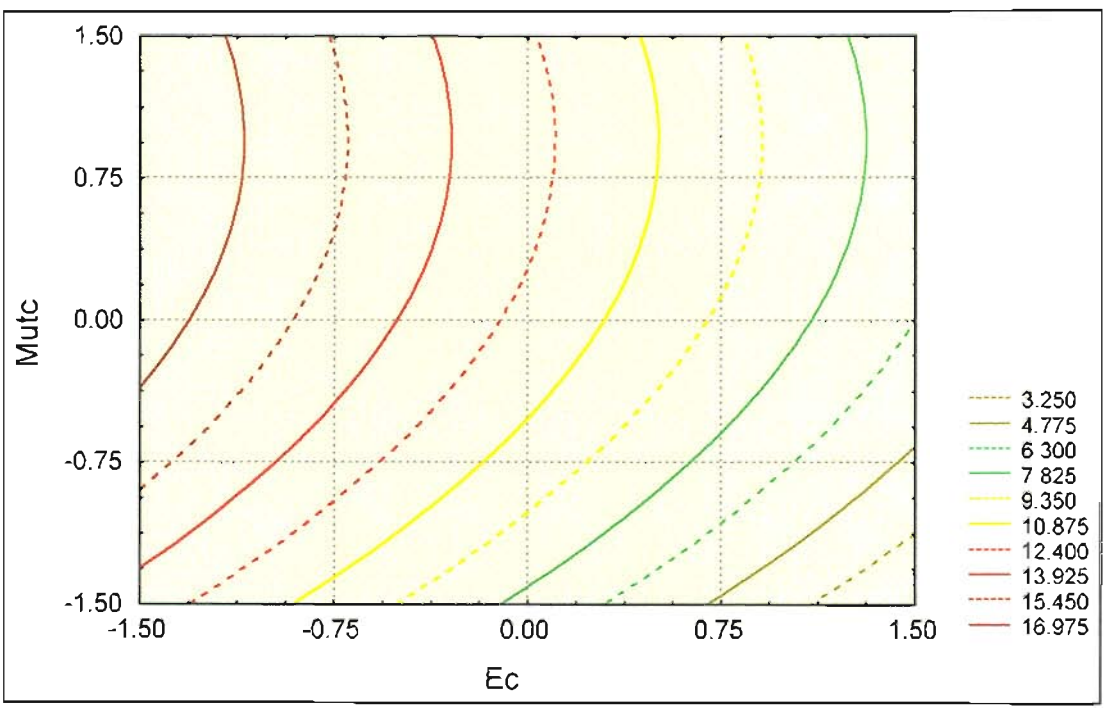



**FIGURA 73-** Curvas de nível para a concentração de clorofila *a* na biomassa ([Cl*a*]^) em função de Mutc e Ec

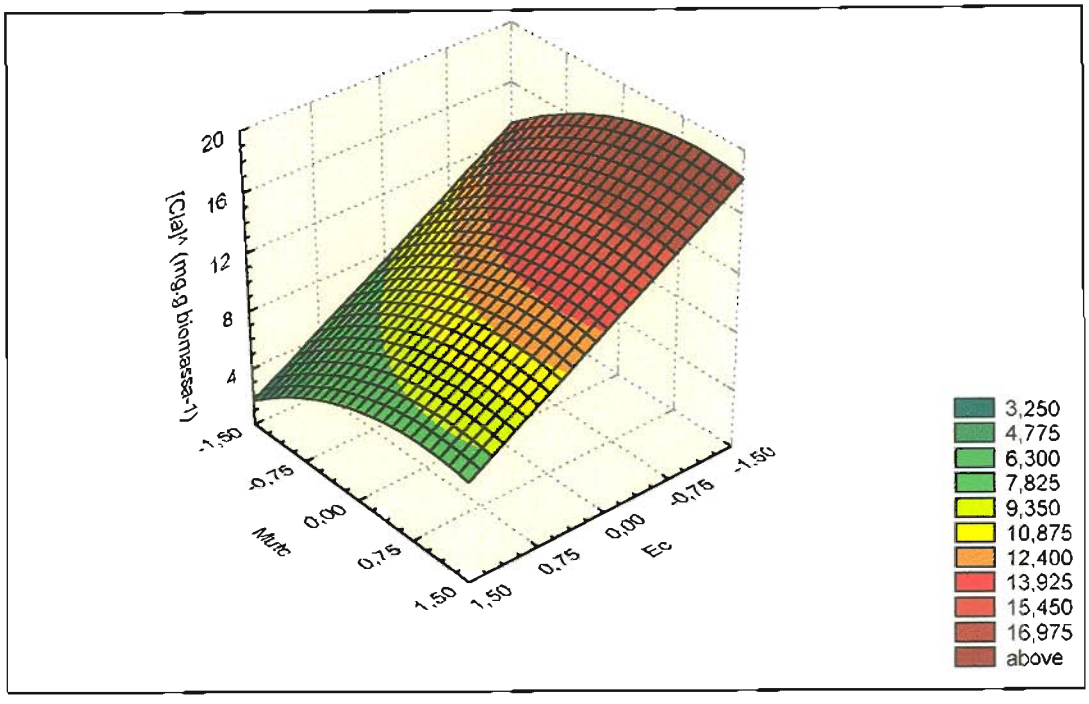



**FIGURA 74-** Superfície de resposta para a concentração de clorofila *a* na biomassa ([Cl*a*]^) em função de Mutc e Ec

A partir da superfície de resposta obtida, pode-se dizer que, quanto menor a iluminância, maior a concentração de clorofila na biomassa de *S. platensis*. Quanto à uréia, observa-se maiores concentrações de clorofila na biomassa com a utilização de quantidades intermediárias desta substância, ou seja, por volta de 2500mg para os 5L de cultivo (correspondente ao ponto central).

**TABELA 37**- Valores de concentração de clorofila *a* na biomassa ([Cl*a*]) experimentais e estimados a partir da equação de regressão multivariável

| Mutc | Ec | [Cl*a*] (experimental) | [Cl*a*]^ (estimado) | Erro (%) |
|---|---|---|---|---|
| -1 | -1 | 13,1 | 13,2 | +0,76 |
| 1 | -1 | 15,5 | 16,5 | +6,45 |
| -1 | 1 | 6,2 | 5,6 | -9,68 |
| 1 | 1 | 9,16 | 9,0 | -1,75 |
| 0 | 0 | 13,9 | 12,0 | -13,67 |
| 0 | 0 | 10,1 | 12,0 | +18,81 |
| 0 | 0 | 12,5 | 12,0 | -4,00 |
| -1,4 | 0 | 7,5 | 7,8 | +4,00 |
| 0 | 1,4 | 6 | 6,7 | +11,67 |
| 1,4 | 0 | 13,1 | 12,5 | -4,58 |
| 0 | -1,4 | 17,9 | 17,3 | -3,35 |

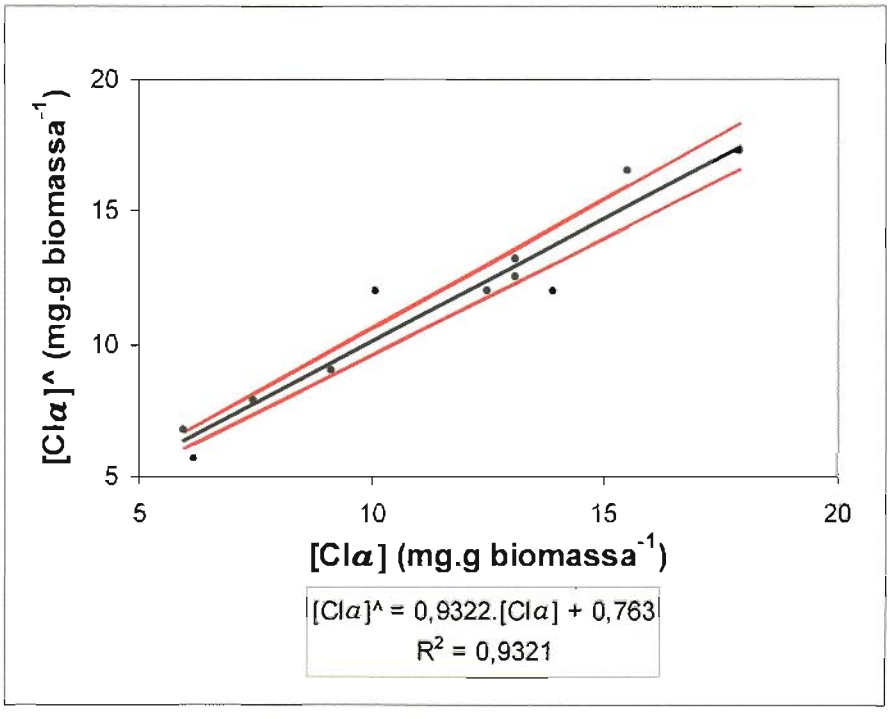



**FIGURA 75**- [Cl*a*]^ (estimada) em função de [Cl*a*] (experimental), considerando-se uma faixa de erro de 5% (linhas em vermelho) em relação à curva média

### 5.4.5- REGRESSÃO MULTIVARIÁVEL PARA PRODUTIVIDADE EM CLOROFILA ($P_{Cla}$)

**TABELA 38**-Análise de regressão multivariável para a produtividade em clorofila ($P_{Cla}$) em função das variáveis em estudo na forma codificada

| Variável independente | Coeficiente de regressão | Erro padrão | t-value | p |
|---|---|---|---|---|
| Constante | 1,533485 | 0,102098 | 15,0197 | 0,0000 |
| $Mutc^2$ | -0,157736 | 0,075441 | -2,0909 | 0,0815 |
| Mutc | 0,201515 | 0,062846 | 3,2065 | 0,0184 |
| $Ec^2$ | -0,280185 | 0,075441 | -3,7140 | 0,0099 |
| Ec | 0,131818 | 0,062846 | 2,0975 | 0,0808 |

$r^2 = 0,7194$

**TABELA 39**- Análise de variância do modelo de regressão multivariável para a a produtividade em clorofila ($P_{Cla}$)

| Fonte de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | F-calculado | p |
|---|---|---|---|---|---|
| Modelo | 0,9271 | 4 | 0,23177 | 7,40941 | 0,0167 |
| Erro | 0,1877 | 6 | 0,03128 | | |
| Total: | 1,11476 | 10 | | | |

$r^2 = 0,831639$

Com base na análise de regressão, pode-se escrever a seguinte equação:

$$P_{Cla}\,\hat{} = 1,53 - 0,16.Mutc^2 - 0,28.Ec^2 + o,20.Mutc + 0,13.Ec$$

As figuras 76 e 77 representam a variação de $P_{Cla}\,\hat{}$ em função de Mutc e Ec conforme a análise de regressão realizada.

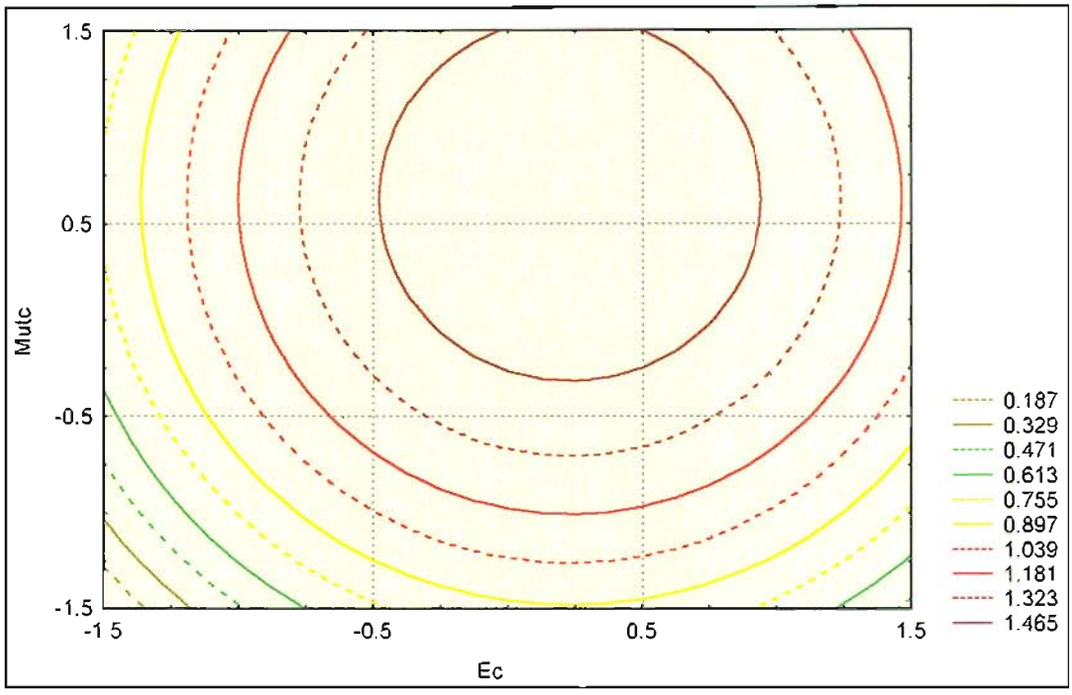



**FIGURA 76**- Curvas de nível para a produtividade em clorofila ($P_{Cla}$) em função de Mutc e Ec

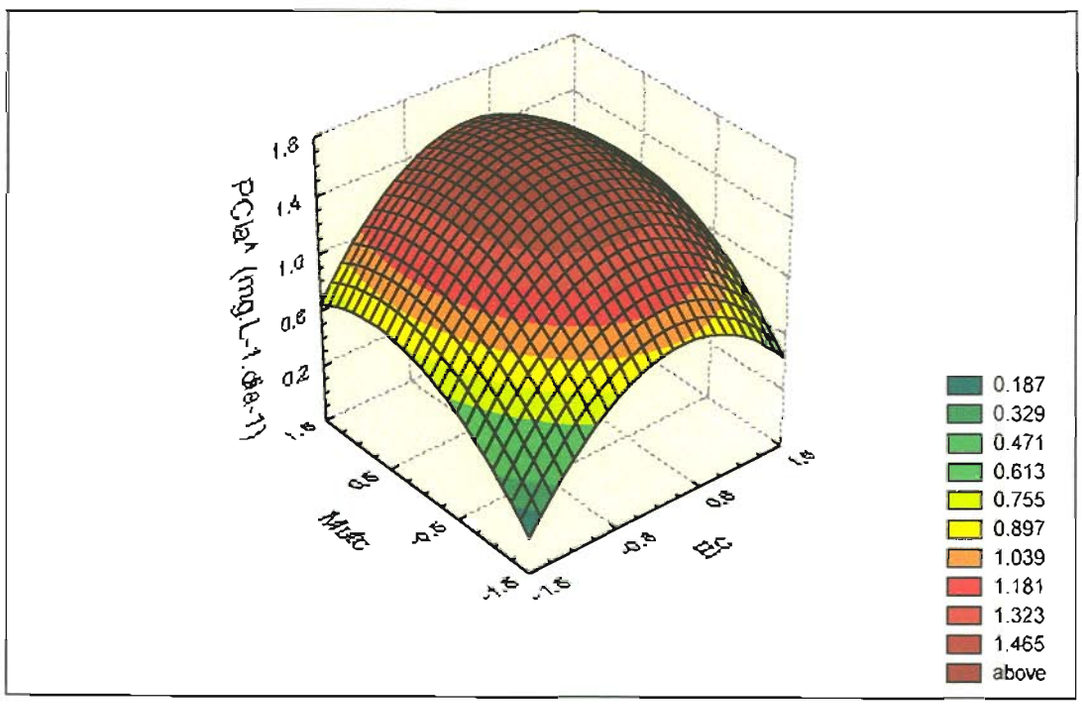



**FIGURA 77**- Superfície de resposta para a produtividade em clorofila ($P_{Cla}$) em função de Mutc e Ec

A superfície de resposta obtida confirma a observação feita na discussão geral de que, para o cultivo de *S. platensis* visando a obtenção de clorofila, valores intermediários de iluminância são os mais adequados, sendo que pode-se dizer o mesmo quanto à quantidade de uréia a ser utilizada. Por meio do cálculo da derivada da equação obtida para esta superfície de resposta, obteve-se o ponto ótimo de produtividade em clorofila, para as condições deste trabalho, equivalente a 2902mg de uréia (para 5L de cultivo) e 3845lux.

**TABELA 40-** Valores de produtividade em clorofila ($P_{Cla}$) experimentais e estimados a partir da equação de regressão multivariável

| Mutc | Ec | $P_{Cla}$ (experimental) | $P_{Cla}$ ^ (estimado) | Erro (%) |
|---|---|---|---|---|
| -1 | -1 | 0,87 | 0,76 | -12,64 |
| 1 | -1 | 1,04 | 1,16 | +11,54 |
| -1 | 1 | 0,96 | 1,02 | +6,25 |
| 1 | 1 | 1,49 | 1,42 | -4,70 |
| 0 | 0 | 1,76 | 1,53 | -13,07 |
| 0 | 0 | 1,23 | 1,53 | +24,39 |
| 0 | 0 | 1,61 | 1,53 | -4,97 |
| -1,4 | 0 | 0,91 | 0,94 | +3,30 |
| 0 | 1,4 | 1,17 | 1,16 | -0,85 |
| 1,4 | 0 | 1,55 | 1,50 | -3,23 |
| 0 | -1,4 | 0,81 | 0,80 | -1,23 |

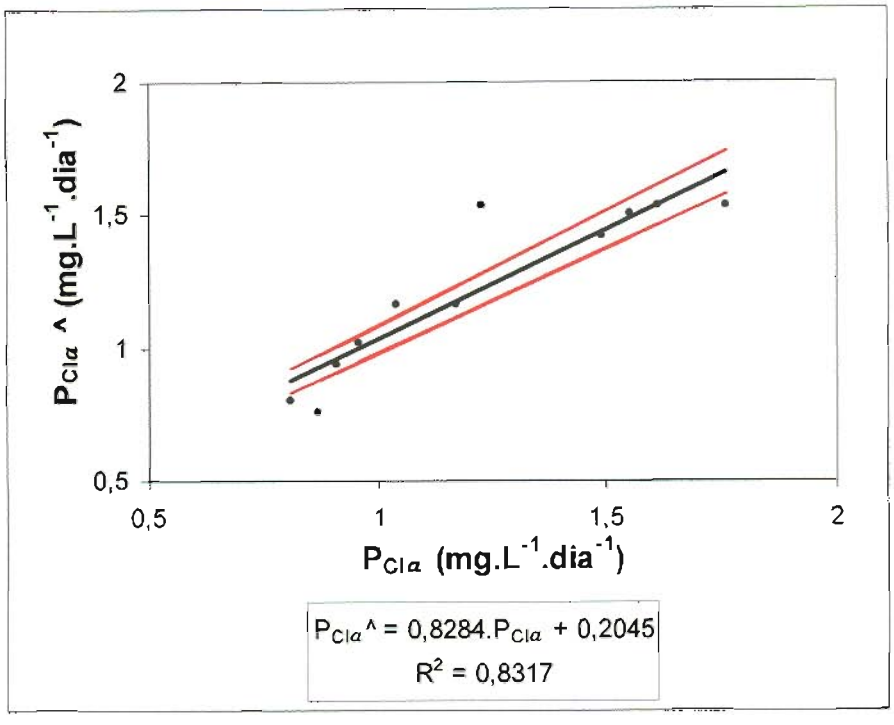



**FIGURA 78** $P_{Cla}$^ (estimada) em função de $P_{Cla}$ (experimental), considerando-se uma faixa de erro de 5% (linhas em vermelho) em relação à curva média

## 6- CONCLUSÕES

Considerando-se as condições experimentais em que foi realizado este trabalho, pode-se concluir que:

- A utilização de uréia como fonte de nitrogênio em substituição ao nitrato de potássio foi favorável ao crescimento da *S. platensis* e ao acúmulo de clorofila na biomassa. Observou-se que quantidades muito pequenas de uréia acarretaram em diminuição do crescimento celular e teor de clorofila na biomassa e quantidades muito grandes de uréia, por sua vez, causam intoxicação das células e perdas na forma de amônia para o ambiente.

- Foi observado um aumento do crescimento com o aumento da luminosidade fornecida ao cultivo, porém com uma diminuição na concentração de clorofila na biomassa. O melhor crescimento, 1945mg.$L^{-1}$, foi obtido com 2500mg de uréia por 5L de cultivo, a 5600lux de iluminância. A maior concentração de clorofila na biomassa, 19,9mg.g biomassa$^{-1}$, foi observada com 2500mg de uréia por 5L de cultivo, porém a 1400lux de iluminância.

- Para o cultivo de *S. platensis* visando a obtenção de clorofila, valores de iluminância intermediários são mais adequados, pois o ganho pelo investimento em clorofila nova balanceia o custo da síntese. O ponto ótimo de produtividade em clorofila a partir de *S. platensis,* para as condições deste trabalho, calculado a partir da derivada da equação da superfície de resposta, foi de 2902mg de uréia por 5L de cultivo e 3845lux de iluminância.

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


AARONSON, S., DUBINSKY, Z. Mass production of microalgae. Experientia, Basel, v.38, p.36-39, 1982.

AARONSON, S., BERNER, T., DUBINSKY, Z. Microalgae as a source of chemicals and natural products. In: SHELEF,G., SOEDER, C. J. Algae Biomass. Great Britain: 1980. p.576-601.

ABELIOVICH, A., AZOV, Y. Toxicity of amonia to algae in sewage oxidation ponds. Appl. Environ. Microbiol., Washington , v.31, n.6, p.801-806, 1976.

ALEXEYEV, V. N. Quantitative analylis. Moscow: Mir Publishers, s.d. 524p.

ALLISON, R. K., SKIPPER, H. E., REID, M. R., SHORT, W. A., HOGAN, G. L. Studies on the photosynthetic reaction. II. Sodium formate and urea feeding experiments with *Nostoc muscorum*. Plant physiol., Bethesda, v.29, p.164-168, 1954.

ANTUNES, A. J., CANHOS, V. P. Aditivos em alimentos. São Paulo: Coordenadoria da Indústria e Comércio, s.d. 178 p.


---

De acordo com a norma NBR6023/89 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (abnt). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 1994.

AZIZAN, A.; BLEVINS, R. D. Mutagenicity and antimutagenicity testing of six chemicals associated with the pungent properties of specific spices as revealed by the Ames *Salmonella/*microssomal assay. Arch. Environ. Contam. Toxicol., New York, v.2, n.8, p.248-258, 1995.

BARBER, J., ANDERSSON, B. Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. Trends Biochem. Sci., Amsterdan, v.17, p.61-66, 1992.

BARROS NETO, B., SCARMINO, I. S., BRUNS, R. E. Planejamento e otimização de experimentos, 2ed. Campinas: Ed. da UNICAMP,1996. 299p.

BECKER, E. W. Algae mass cultivation - Production and utilization. Process Biochem.. , s.l., v.16, n.5, p.10-14, 27, 1981.

BENEMANN, J. R. Microalgae products and production: an overview. Dev. Ind. Microbiol., (Journal of Industrial Microbiology, suppl. Nº 5), Fort Pierce, v.31, p.247-256, 1990.

BENEMANN, J. R., TILLET, D. M., WEISSMAN, J. C. Microalgae biotechnology, Amsterdan, p.47-53, 1987.

BERNS, D. S., HOLOHAN, P., SCOTT, E. Urease activity in blue-green algae. Science, Washington, v.152, p.1077-1078, 1966.

BOGORAD, L. Chlorophylls. In: LEWIN, R. A. Physiology and Biochemistry of Algae. New York: Academic Press Inc., 1962. p.385-408.

BOROWITZKA, M. A. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. J. Appl. Phycol., Dordrecht, Neth., v.7, p.3-15, 1995.

BOUSSIBA, S. Ammonia uptake in the alkalophilic cyanobacterium *Spirulina platensis*. Plant Cell Physiol, Kyoto, v.30, n.2, p.303-308, 1989.

BOUSSIBA, S., RICHMOND, A. E. Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. Arch. Microbiol., Berlin, v.120, p.155-159, 1979.

BRITTON, G. Carotenoids. In: HENDRY, G. A. F., HOUGHTON, J. D. Natural food colorants. 2nded. London: Blackil Academic Professional, 1996. p.197-240.

CEZARE, E. A. Contribuição ao estudo da produção de biomassa de *Spirulina platensis* empregando uréia como fonte de nitrogênio por meio de processo descontínuo alimentado. São Paulo, 1998. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP). 166p.

CHEN, F., ZHANG, Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. Enzyme Microb. Technol., New York, v.20, p. 221-224, 1996.

CHEN, F., ZHANG, Y., GUO, S. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. Biotechnol. Lett., Kew, Engl., v.18, n.5, p.603-608, 1996.

CIFERRI, O. *Spirulina*, the edible microrganism. Microbiol. Rev., Washington, D.C., v.47, n.4, 1983.

CIFERRI, O., TIBONI, O. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. Ann. Rev. Microb., Italy, v.39, p.503-526, 1985.

CLEMENT, G. Production et constitutants characteristiques des algues *Spirulina platensis* et *maxima*. Ann. Nutr. Alim., Basel, v.29, p.477-485, 1975.

DILLON, J. C., PHUC, A. P., DUBACQ, J. P. Nutritional value of the alga *Spirulina*. Plants in Human Nutr., France, v.77, p.32-46, 1995.

DURAND-CHASTEL H. Production and use of *Spirulina* in México. In: Algae Biomass. Elsevier: North-Holland Biomedical Press, 1980. p.51-63.

ELORANTA, P. Paper chromatography as a method of phytoplankton community analysis. Ann. Bot. Fennici, Helsinki, v.23, p.153-159, 1986.

FAINTUCH, B. L. Análise comparativa da produção de biomassa a partir de três cianobactérias empregando distintas fontes nitrogenadas. São Paulo, 1989. (Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP). 192p.

FAUCHER, O., COUPAL, B., LEDUY, A. Utilization of seawater – urea as a culture medium for *Spirulina maxima*. Can. J. Microbiol., Ottawa, v.25, p.752-759, 1979.

FERRAZ, C. A. M., AQUARONE, E., KRAUTER, M. Efeito da luz e do pH no crescimento de *Spirulina maxima*. Rev. Microbiol, São Paulo, v.16, n.2, p.132-137, 1985.

FIESER, L. F., FIESER, M. Organic Chemistry, 3ed. New York: Reinhold Publishing Corporation, 1958. 1330p.

FOX, R. D. The microalgae *Spirulina* (*Cyanophyceae*) – A study of the conditions necessary for their growth. Development of original production systems, particularly with reference to a village ecosystem. Strasbourg, 1983. (Tese de Doutorado - Universidade Louis Pasteur). 336p.

GIOIELLI, L. A. Modificação industrial de óleos e gorduras. Apostila do curso de pós-graduação em Tecnologia Bioquímico- Farmacêutica da FCF/USP, São Paulo, 1997. 253p.

GROSS, J. Chlorophylls. In: REINHOLD, V. N. Pigments in vegetables – Chlorophylls and Carotenoids. New York: AVI, 1991. p. 3-74

HALL, D. O., RAO, K. K. Fotossíntese – Coleção Temas de Biologia, v.10. São Paulo: EDUSP, 1980. 89p.

HENDRY, G. A. F. Chlorophylls and chlorophyll derivatives. In: HENDRY, G. A. F., HOUGHTON, J. D. Natural food colorants. 2nded. London: Blackil Academic Professional, 1996. p.131-155.

HENRIKSON, R. Earth Food *Spirulina*. California: Ronore Enterprises, Inc., 1989. 180p.

HENRY, B. S. Natural food colours. In: HENDRY, G. A. F., HOUGHTON, J. D. Natural food colorants. 2nded. London: Blackil Academic Professional, 1996. p.40-79.

HIGASHI, O. K.; OKAI, Y. Potent supressive activity of chlorophyll *a* and *b* fhom green tea (*Camellia sinensis*) against tumor promotion in mouse skin. J. UOEH, Kytakyushu, v.20, n.3, p.181-188, 1998.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL. "Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz." Métodos físicos e químicos para análise de alimentos. 2.ed. São Paulo: IAL, 1976, v.1, s.p.

JEFREY, S. W., HUMPHREY, G. F. New Spectrophotometric Equations for determining chlorophylls *a*, *b*, $c_1$ and $c_2$ in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochem. Physiol. Pflanzen, Jena, v.167, p.191-194, 1975.

JENSEN, S., KNUTSEN, G. Influence of light and temperature on photoinibition of photosynthesis in *Spirulina platensis*. J. Appl. Phycol., Dordrecht, Neth., v.5, p.495-504,1993.

JOHNSON E. A., SCHROEDER, W. A. Microbial Carotenoids. Adv. Biochem. Eng. Biothechnol., Berlim, v. 53, p.119-178, 1996.

KEBEDE, E., AHLGREN, G. Optimum growth conditions and light utilization efficiency of *Spirulina platensis* (= *Arthrospira fusiformis*) (*Cyanophyta*) from Lake Chitu, Ethiopia. Hydrobiologya, Boston, v.332, p.99-109,1996.

KUMAR, S. S.; CHAUBEY, R. C.; DEVASAGAYAM, T. P. A.; PRIYADARSINI, K. I.; CHAUHAN, P. S. Inhibition of radiation–iduced DNA damage in plasmid pBR322 by chlorophyllin and posible mechanism(s) of action. Mutat. Res., Amsterdam, v.425, n.1, p.71-79, 1999.

LEDUY, A., SAMSON, R. Testing of an ammonia ion selective electrode for ammonia nitrogen measurement in the methanogenic sludge. Biotechnol. Lett., Kew, Engl., v.4, n.5, p.303-306, 1982.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. Methods Enzymol., New York, v.148, p.350-382, 1987.

MAcCOLL, R. Phycobilisomes and biliproteins (Yearly review). Photochem. Photobiolo., Oxford, v.35, p.899-904, 1982.

MACKINNEY, G. Absortion of light by chlorophyll solutions. J. Biol. Chem., Baltimore, v.140, p.315-322, 1941.

MARQUEZ, F. J., NISHIO, N., NAGAI, S. Enhancement of biomass and pigment production during growth of *Spirulina platensis* in mixotrophic culture. J. Chem. Tech. Biotechnol., Oxford, v.62, p.159-164, 1995.

MIMURO, M., FUJITA. Y. Estimation of chlorophyll *a* Distribution in the photosynthetic pigments systems I and II of the blue-green alga *Anabaena variabilis*. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdan, v.459, p.376-389, 1977.

MYERS, J., KRATZ, W. A. Relations between pigment content and photosynthetic characteristics in a blue green alga. J. Gen. Physiol., New York, v.39, p.11-22, 1955.

O' CALLAGHAN M. C. Biotchnology in natural food colours: The role of bioprocessing. In: HENDRY, G. A. F., HOUGHTON, J. D. Natural food colorants. 2nd ed. London: Blackil Academic Professional, 1996. p.80-108.

OLAIZOLA, M., DUERR, E. Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. J. Appl. Phycol., Dordrecht, Neth., v.2, p.97-104, 1990.

ONG, T.; WHONG, W. Z.; STEWART, J.; BROCKMAN, H. E. Chlorophyllin: a potent antimutagen against enviromental and dietary complex mixtures. Mutat. Res. Lett., Amsterdam, v.173, n.2, p.111-115, 1986.

PAOLETTI, C., PUSHPARAJ, B., TOMASELLI, L. Ricerche sulla nutrizione minerale di *Spirulina platensis*. In: Atti Congr. Naz. Soc. Ital. Microbiol., 17°, Padova, 1975.

PIORRECK, M., BAASCH, K., POHL, P. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. Phytochemistry, New York, v.23, n.2, p.207-216, 1983.

PIRT, S. J. The theory of fed batch culture with reference to the penicilin fermentation. J. appl. Chem. Biotechnol., London, v.24, p.415-424, 1974.

RICHMOND, A. *Spirulina*. In: BOROWITZKA, M. A., BOROWITZKA, L. J. Micro-algal Biotechnology. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p.85-121.

RICHMOND, A., QUIANG,H. Principles for efficient utilization of light for mass production of photoautotrophic microorganisms. Appl. Biochem. Biotechnol., Chifton, v.63-65, p.649-658, 1997.

RUIZ, R. L., MÓS, E. N. Produção de biomassa de *Spirulina maxima* para alimentação humana e animal. Rev. Microbiol., São Paulo, v.21, n.1, p.85-97, 1990.

SAMUELSSON, G., LÖNNEBORG, A., ROSENQVIST, E., GUSTAFSSON, P., ÖQUIST, G. Photoinhibition and reactivation of photosynthesis in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. Plant Physiol., New York, v.79, p.992-995, 1985.

SANTILLAN, C. Mass production of *Spirulina*. Experientia, Basel, v. 38, p.40-43, 1982.

SASSANO, C. E. N. Influência da uréia no cresciemento e no teor do ácido graxo γ-linolênico da biomassa de *Spirulina platensis*, São Paulo, 1999. (Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP). 144p.

SPEZIALE, B. J., SCHREINER, S. P., GIAMMATTEO, P. A., SCHINDLER, J. E. Comparison of N,N-dimethylformamide, dymethyl sulfoxide, and acetone for extraction of phytoplankton chlorophyll. Can. J. Fish. Aquat. Sci., Ottawa, v.41, p.1519-1522, 1984.

STANCA, D., POPOVICI, E. Urea as nitrogen source in modified Zarrouk medium. Rev. Roum. Biol. Ser. Biol. Veg., Bucharest, v.41, n.1, p.25-31, 1996.

STRYER, L. Bioquímica, 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1992, 881p.

TAYLOR, A. J. Natural colours in food. In: WALFORD, J. Developments in food colours, v.2. Manchester: Elsevier Applied Science Publishers, 1984. p.159-206.

TELES, F. F. F., BARBOSA, F. F., PINHEIRO, P. A. A simple techinique for industrial analysis of total chlorophyll. Rev. Ceres, Viçosa, v.24, n.133, p.338-340, 1977.

TELOR, E. S., BOUSSIBA, S., RICHMOND, A. Products and chemicals from *Spirulina platensis*. In:SHELEF, G., SOEDER, C. J. Algae Biomass. Great Britain: Elsevier-North Holand, Biomedical Press, 1980. p.611-617.

TUTOUR, B. L.; BENSLIMANE, F.; GOULEAU, M. P.; GOUYGOU, J. P.; SAADAN, B.; QUEMENEUR, F. Antioxidant and pro-oxidant activities of the brown algae, *Laminaria digitata*, *Himanthalia elongata*, *Fucus vesticulosus*, *Fucus serratus* and *Ascophyllum nodosum*. J. Appl. Phycol., Dordrecht, Neth., v.10, n.2, p.121-129, 1998.

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

VONSHAK, A., TORZILLO, G., TOMASELI, L. Use of chlorophyll fluorescence to estimate the effect of photoinhibition in outdoor cultures of *Spirulina platensis*. J. Appl. Phycol., Dordrecht, Neth., v.6, p.31-34, 1994.

# APÊNDICE

**TABELA 41** - Esquema de adição de uréia para o ensaio H (Mut = 1660mg)

| Tempo (dias) | Mu (mg) | Massa de uréia adicionada (mg) |
|---|---|---|
| 0 | 400,0 | 400,0 |
| 2 | 490,2 | 90,2 |
| 4 | 600,7 | 110,5 |
| 6 | 736,1 | 135,4 |
| 8 | 902,1 | 166,0 |
| 10 | 1105,4 | 203,4 |
| 12 | 1354,6 | 249,2 |
| 14 | 1660,0 | 305,4 |

**TABELA 42-** Esquema de adição de uréia para os ensaios A e C (Mut = 1900mg)

| Tempo (dias) | Mu (mg) | Massa de uréia adicionada (mg) |
|---|---|---|
| 0 | 400,0 | 400,0 |
| 2 | 499,7 | 99,7 |
| 4 | 624,3 | 124,6 |
| 6 | 780,0 | 155,6 |
| 8 | 974,4 | 194,5 |
| 10 | 1217,3 | 242,9 |
| 12 | 1520,8 | 303,5 |
| 14 | 1900,0 | 379,2 |

**TABELA 43** – Esquema de adição de uréia para os ensaios E, F, G, J e K (Mut = 2500mg)

| Tempo (dias) | Mu (mg) | Massa de uréia adicionada (mg) |
|---|---|---|
| 0 | 400,0 | 400,0 |
| 2 | 519,7 | 119,7 |
| 4 | 675,2 | 155,5 |
| 6 | 877,31 | 202,1 |
| 8 | 1139,9 | 262,6 |
| 10 | 1481,0 | 341,1 |
| 12 | 1924,2 | 443,2 |
| 14 | 2500,0 | 575,8 |

**TABELA 44-** Esquema de adição de uréia para os ensaios B e D (Mut = 3100mg)

| Tempo (dias) | Mu (mg) | Massa de uréia adicionada (mg) |
|---|---|---|
| 0 | 400,0 | 400,0 |
| 2 | 535,9 | 135,9 |
| 4 | 718,0 | 182,1 |
| 6 | 962,0 | 244,0 |
| 8 | 1288,9 | 326,9 |
| 10 | 1726,9 | 438,0 |
| 12 | 2313,8 | 586,8 |
| 14 | 3100,0 | 786,2 |

**TABELA 45-** Esquema de adição de uréia para o ensaio I (Mut = 3340mg)

| Tempo (dias) | Mu (mg) | Massa de uréia adicionada (mg) |
|---|---|---|
| 0 | 400,0 | 400,0 |
| 2 | 541,7 | 141,7 |
| 4 | 733,5 | 191,8 |
| 6 | 993,3 | 259,8 |
| 8 | 1345,1 | 351,8 |
| 10 | 1821,4 | 476,4 |
| 12 | 2466,5 | 645,1 |
| 14 | 3340,0 | 873,5 |