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

AVALIAÇÃO DO CULTIVO DE *Spirulina platensis*
UTILIZANDO SIMULTANEAMENTE NITRATO DE POTÁSSIO E
CLORETO DE AMÔNIO COMO FONTES DE NITROGÊNIO

MAYLA SANTOS RODRIGUES

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

São Paulo
2008

Mayla Santos Rodrigues

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

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção de grau de Mestre

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

Orientador/Presidente

Prof. Tit. Adalberto Pessoa Junior

1º Examinador

Profa. Dra. Eliane Dalva Godoy Danesi

2º Examinador

São Paulo, Maio de 2008.

„Arbeit macht das Leben süß“

*Aos meus amados pais, Carlos Alberto e Dírce Maria,
que anteciparam cada desejo meu e apoiaram
toda e qualquer decisão minha.
Obrigada.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho e Prof. Dr. Sunao Sato, pela oportunidade de realização do curso de mestrado, e principalmente pela atenção única, extrema dedicação e incansável apoio durante o processo de orientação.

Ao Prof. Dr. Dante Augusto de Moraes, que, nos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual; pelas portas abertas e oportunidades dadas, pela ajuda técnica e moral, e pela amizade.

Ao técnico Kleber Almeida, aos estagiários Bruno Folino e Lícia Raduan, e aos colegas Edna Astolfi, Livia Seno, Raquel Pedrosa, Marcelo Matsudo e Denise Vieira, pelo apoio no desenvolvimento do trabalho e no decorrer do curso de mestrado.

Ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior, Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel-Yagui, Prof. Dr. José Abrahão Neto, Prof. Dr. Michele Vitolo e Prof. Dr. Mauri Sérgio Alves Palma, pelas aulas de pós-graduação do departamento, que contribuíram para a realização da dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

„Wer nicht wagt, der nicht gewinnt“

(Proverbio alemão)

RESUMO

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

Spirulina (Arthrospira) platensis (Cyanophyceae) é uma cianobactéria de grande potencial econômico para a produção de proteínas, principalmente. A utilização simultânea de duas fontes de nitrogênio no cultivo deste microrganismo pode aumentar a quantidade final de biomassa produzida e possibilitar resultados interessantes do ponto de vista de processo de produção. Esta pesquisa teve como principal objetivo verificar o efeito da adição de nitrato de potássio (KNO_3) em cultivos de *S. platensis* realizados com cloreto de amônio (NH_4Cl). Através da utilização de planejamento fatorial completo (2^2 mais configuração estrela), foram verificadas proporções de concentrações iniciais de KNO_3 e totais de NH_4Cl que variaram de 5,10 a 24,9 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. Foram realizados oito cultivos experimentais e seis cultivos de ponto central, com a utilização de processo descontínuo alimentado e vazões exponencialmente crescentes de adição do sal de amônio. As variáveis independentes (quantidade das fontes de nitrogênio) foram avaliadas simultaneamente através de metodologia de superfície de resposta (regressão multivariável) quanto a sua influência nas variáveis dependentes: concentração celular máxima (X_m), expressa em massa seca por litro de meio, produtividade em células (P_x) e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{x/N}$). A otimização dos cultivos em relação à concentração celular resultou nos seguintes valores: $\text{KNO}_3 = 15,4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ e $\text{NH}_4\text{Cl} = 14,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, com X_m esperado de 4450 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. O maior valor de concentração celular obtido sob essas condições foi de 4327 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, valor este equivalente ao obtido em cultivo de referência para KNO_3 ($\text{KNO}_3 = 25,4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 4318 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e superior ao obtido em cultivo de referência para NH_4Cl ($\text{NH}_4\text{Cl} = 21,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 2125 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Concluiu-se que a adição de KNO_3 em cultivos com NH_4Cl contribuiu para que não houvesse deficiência de nitrogênio no decorrer dos cultivos, proporcionando maiores valores finais de biomassa, com maior conteúdo de clorofila, lipídios e proteínas. A utilização de NH_4Cl permitiu a redução dos custos com o meio de cultura, tornando cultivos com associação de tais fontes de nitrogênio uma alternativa vantajosa para a produção desta cianobactéria.

Palavras-chave: *Arthrospira (Spirulina) platensis*. Microalgas. Fontes de nitrogênio. Biomassa microbiana. Processo descontínuo alimentado.

ABSTRACT

RODRIGUES, M. S. **Evaluation of *Spirulina platensis* cultivation using simultaneously potassium nitrate and ammonium chloride as nitrogen sources.** 2008. 149 p. Master Thesis – Pharmaceutical Science College, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Spirulina (*Arthrospira*) *platensis* (Cyanophyceae) is a cyanobacterium which has a great economic potential to protein production, particularly. The simultaneous use of two nitrogen sources can increase the final amount of produced biomass and provide interesting results from the production process point of view. This research had as main goal to evaluate the effect of potassium nitrate (KNO_3) addition to *S. platensis* cultures performed with ammonium chloride (NH_4Cl). Through the use of full factorial design (2^2 plus star configuration), proportions of initial KNO_3 and total NH_4Cl concentrations, which varied from 5.10 to 24.9 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, were validated. Eight experimental cultures and six central point cultures were carried out using fed-batch process and exponentially-increasing ammonium salt feeding rates. The independent variables (nitrogen sources amount) were simultaneously assessed by response surface methodology (multivariable regression) as to their influence on dependent variables: maximum cell concentration (X_m), expressed in dry mass per liter of medium, cell productivity (P_X) and conversion yield of nitrogen to biomass ($Y_{X/N}$). The cultures optimization regarding cell concentration resulted in the following values: $\text{KNO}_3 = 15.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and $\text{NH}_4\text{Cl} = 14.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, with an expected X_m of 4450 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The highest cell concentration value obtained under these conditions was 4327 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, which is comparable to the cell concentration obtained in KNO_3 reference culture ($\text{KNO}_3 = 25.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 4318 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and superior to the one obtained in NH_4Cl reference culture ($\text{NH}_4\text{Cl} = 21.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; 2125 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$). It was drawn that the addition of KNO_3 to NH_4Cl cultures contributed to avoid nitrogen deficiency during cultivation, providing higher final biomass values with higher chlorophyll, lipid and protein contents. The utilization of NH_4Cl allowed the reduction of culture medium costs, turning cultures developed with such nitrogen sources association into an advantageous alternative to the production of this cyanobacterium.

Keywords: *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. Microalgae. Nitrogen sources. Microbial biomass. Fed-batch process.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 01 –	<i>Spirulina platensis</i> UTEX1926 (FONTE: UTEX, 2006)	40
Figura 02 –	Cultivo de <i>S. platensis</i> em mini-tanque	43

GRÁFICOS

Gráfico 01 –	Valores codificados do planejamento experimental (X_1 , KNO_3 ; X_2 , NH_4Cl) referentes aos cultivos experimentais (E_1 a E_{14})	45
Gráfico 02 –	Curva de calibração para determinação da concentração celular de suspensões de <i>S. platensis</i>	52
Gráfico 03 –	Curva de calibração para determinação da concentração de amônia total em amostras isentas de células de <i>S. platensis</i>	53
Gráfico 04 –	Curva de calibração para determinação da concentração de clorofila em amostras de células de <i>S. platensis</i>	54
Gráfico 05 –	Curva de crescimento média dos cultivos de <i>S. platensis</i> referentes ao ponto central do planejamento experimental (■); barras de erro correspondentes ao desvio padrão	84
Gráfico 06 –	Curva de crescimento média dos cultivos de <i>S. platensis</i> referentes ao ponto de ótimo em relação à concentração celular máxima (●); barras de erro correspondentes ao desvio padrão	85
Gráfico 07 –	Curvas modelo de crescimento dos cultivos de <i>S. platensis</i> contendo duas fontes de nitrogênio – cultivos E_8 (■), E_{14} (●) e O_2 (▲)	86
Gráfico 08 –	Curvas modelo de crescimento dos cultivos de <i>S. platensis</i> contendo uma fonte de nitrogênio – cultivos de referência R_{N2} (●) e R_{A2} (■)	87
Gráfico 09 –	Valores de pH (□) e da concentração de carbonato total (Δ) em função do tempo para o cultivo de referência para nitrato de potássio R_{N1}	88
Gráfico 10 –	Valores de pH em função do tempo para o cultivo de referência para cloreto de amônio R_{A1} (□)	89

Gráfico 11 –	Concentração de nitrato em função do tempo para o cultivo experimental referente ao ponto central do planejamento E_{11} ($\times$)	90
Gráfico 12 –	Concentração de nitrato em função do tempo para o cultivo de referência para nitrato de potássio R_{N1} ($\times$)	91
Gráfico 13 –	Concentração de amônia adicionada ($\diamond$) e residual ($\blacklozenge$) em função do tempo para o cultivo experimental referente ao ponto central do planejamento E_{10}	92
Gráfico 14 –	Conteúdo de clorofila dos cultivos experimentais (E_1 a E_8), e média dos teores dos cultivos do ponto central (E_9 - E_{14}), do ponto ótimo (O_1 - O_5) e de referência para cloreto de amônio (R_A) e nitrato de potássio (R_N)	94
Gráfico 15 –	Porcentagens de proteínas e lipídios da biomassa recuperada dos cultivos experimentais (E_1 a E_8), e média dos teores dos cultivos do ponto central (E_9 - E_{14}), do ponto ótimo (O_1 - O_5) e de referência para cloreto de amônio (R_A) e nitrato de potássio (R_N)	95
Gráfico 16 –	Superfície de resposta para a concentração celular máxima (X_m) em função de X_1 (valor codificado da quantidade inicial de KNO_3 por unidade de volume) e X_2 (valor codificado da quantidade total de NH_4Cl adicionado por unidade de volume de reator)	99
Gráfico 17 –	Superfície de resposta para a produtividade em células (P_X) em função de X_1 (valor codificado da quantidade inicial de KNO_3 por unidade de volume) e X_2 (valor codificado da quantidade total de NH_4Cl adicionado por unidade de volume de reator)	101
Gráfico 18 –	Superfície de resposta para o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função de X_1 (valor codificado da quantidade inicial de KNO_3 por unidade de volume) e X_2 (valor codificado da quantidade total de NH_4Cl adicionado por unidade de volume de reator)	103
Gráfico 19 –	Cultivo E_1 – concentração celular ($\bullet$) e valor de pH ($\blacktriangle$) em função do tempo	116
Gráfico 20 –	Cultivo E_1 – concentração de carbonato total ($\blacklozenge$) e nitrato ($\blacksquare$) em função do tempo	116
Gráfico 21 –	Cultivo E_1 – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo	117

Gráfico 22 –	Cultivo E ₂ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo	117
Gráfico 23 –	Cultivo E ₂ – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo	118
Gráfico 24 –	Cultivo E ₂ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo	118
Gráfico 25 –	Cultivo E ₃ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo	119
Gráfico 26 –	Cultivo E ₃ – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo	119
Gráfico 27 –	Cultivo E ₃ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo	120
Gráfico 28 –	Cultivo E ₄ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo	120
Gráfico 29 –	Cultivo E ₄ – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo	121
Gráfico 30 –	Cultivo E ₄ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo	121
Gráfico 31 –	Cultivo E ₅ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo	122
Gráfico 32 –	Cultivo E ₅ – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo	122
Gráfico 33 –	Cultivo E ₅ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo	123
Gráfico 34 –	Cultivo E ₆ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo	123
Gráfico 35 –	Cultivo E ₆ – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo	124
Gráfico 36 –	Cultivo E ₆ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo	124

Gráfico 37 –	Cultivo E ₇ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo	125
Gráfico 38 –	Cultivo E ₇ – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo	125
Gráfico 39 –	Cultivo E ₇ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo	126
Gráfico 40 –	Cultivo E ₈ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo	126
Gráfico 41 –	Cultivo E ₈ – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo	127
Gráfico 42 –	Cultivo E ₈ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo	127
Gráfico 43 –	Cultivo E ₉ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo	128
Gráfico 44 –	Cultivo E ₉ – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo	128
Gráfico 45 –	Cultivo E ₉ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo	129
Gráfico 46 –	Cultivo E ₁₀ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo	129
Gráfico 47 –	Cultivo E ₁₀ – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo	130
Gráfico 48 –	Cultivo E ₁₀ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo	130
Gráfico 49 –	Cultivo E ₁₁ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo	131
Gráfico 50 –	Cultivo E ₁₁ – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo	131
Gráfico 51 –	Cultivo E ₁₁ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo	132

Gráfico 52 –	Cultivo E ₁₂ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo	132
Gráfico 53 –	Cultivo E ₁₂ – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo	133
Gráfico 54 –	Cultivo E ₁₂ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo	133
Gráfico 55 –	Cultivo E ₁₃ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo	134
Gráfico 56 –	Cultivo E ₁₃ – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo	134
Gráfico 57 –	Cultivo E ₁₃ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo	135
Gráfico 58 –	Cultivo E ₁₄ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo	135
Gráfico 59 –	Cultivo E ₁₄ – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo	136
Gráfico 60 –	Cultivo E ₁₄ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo	136
Gráfico 61 –	Cultivo O ₁ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo	137
Gráfico 62 –	Cultivo O ₁ – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo	137
Gráfico 63 –	Cultivo O ₁ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo	138
Gráfico 64 –	Cultivo O ₂ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo	138
Gráfico 65 –	Cultivo O ₂ – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo	139
Gráfico 66 –	Cultivo O ₂ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo	139

Gráfico 67 –	Cultivo O ₃ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo	140
Gráfico 68 –	Cultivo O ₃ – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo	140
Gráfico 69 –	Cultivo O ₃ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo	141
Gráfico 70 –	Cultivo O ₄ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo	141
Gráfico 71 –	Cultivo O ₄ – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo	142
Gráfico 72 –	Cultivo O ₄ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo	142
Gráfico 73 –	Cultivo O ₅ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo	143
Gráfico 74 –	Cultivo O ₅ – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo	143
Gráfico 75 –	Cultivo O ₅ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo	144
Gráfico 76 –	Cultivo R _{A1} – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo	144
Gráfico 77 –	Cultivo R _{A1} – concentração de carbonato total (◆) em função do tempo	145
Gráfico 78 –	Cultivo R _{A1} – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo	145
Gráfico 79 –	Cultivo R _{A2} – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo	146
Gráfico 80 –	Cultivo R _{A2} – concentração de carbonato total (◆) em função do tempo	146
Gráfico 81 –	Cultivo R _{A2} – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo	147

Gráfico 82 –	Cultivo R _{N1} – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo	147
Gráfico 83 –	Cultivo R _{N1} – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo	148
Gráfico 84 –	Cultivo R _{N2} – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo	148
Gráfico 85 –	Cultivo R _{N2} – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 –	Aplicações potenciais das algas e cianobactérias produzidas comercialmente	26
Tabela 02 –	Composição de aminoácidos estritamente essenciais de <i>S. platensis</i> e <i>S. maxima</i>	29
Tabela 03 –	Teor de alguns dos ácidos graxos poliinsaturados encontrados em <i>S. platensis</i>	30
Tabela 04 –	Composição do meio de cultura mineral Paoletti	41
Tabela 05 –	Valores codificados e reais para as fontes de nitrogênio KNO ₃ e NH ₄ Cl (variáveis do planejamento experimental), referentes aos experimentos realizados	44
Tabela 06 –	Somatória das adições de cloreto de amônio e valor de k para cada valor real desta fonte de nitrogênio utilizado nos cultivos	47
Tabela 07 –	Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E ₁ (KNO ₃ , 8,0 mmol · L ⁻¹ ; NH ₄ Cl, 8,0 mmol · L ⁻¹)	59
Tabela 08 –	Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E ₂ (KNO ₃ , 22,0 mmol · L ⁻¹ ; NH ₄ Cl, 8,0 mmol · L ⁻¹)	60
Tabela 09 –	Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E ₃ (KNO ₃ , 8,0 mmol · L ⁻¹ ; NH ₄ Cl, 22,0 mmol · L ⁻¹)	61
Tabela 10 –	Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E ₄ (KNO ₃ , 22,0 mmol · L ⁻¹ ; NH ₄ Cl, 22,0 mmol · L ⁻¹)	62
Tabela 11 –	Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E ₅ (KNO ₃ , 15,0 mmol · L ⁻¹ ; NH ₄ Cl, 5,1 mmol · L ⁻¹)	63

Tabela 12 –	Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E ₆ (KNO ₃ , 5,1 mmol · L ⁻¹ ; NH ₄ Cl, 15,0 mmol · L ⁻¹)	64
Tabela 13 –	Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E ₇ (KNO ₃ , 15,0 mmol · L ⁻¹ ; NH ₄ Cl, 24,9 mmol · L ⁻¹)	65
Tabela 14 –	Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E ₈ (KNO ₃ , 24,9 mmol · L ⁻¹ ; NH ₄ Cl, 15,0 mmol · L ⁻¹)	66
Tabela 15 –	Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E ₉ (KNO ₃ , 15,0 mmol · L ⁻¹ ; NH ₄ Cl, 15,0 mmol · L ⁻¹)	67
Tabela 16 –	Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E ₁₀ (KNO ₃ , 15,0 mmol · L ⁻¹ ; NH ₄ Cl, 15,0 mmol · L ⁻¹)	68
Tabela 17 –	Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E ₁₁ (KNO ₃ , 15,0 mmol · L ⁻¹ ; NH ₄ Cl, 15,0 mmol · L ⁻¹)	69
Tabela 18 –	Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E ₁₂ (KNO ₃ , 15,0 mmol · L ⁻¹ ; NH ₄ Cl, 15,0 mmol · L ⁻¹)	70
Tabela 19 –	Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E ₁₃ (KNO ₃ , 15,0 mmol · L ⁻¹ ; NH ₄ Cl, 15,0 mmol · L ⁻¹)	71
Tabela 20 –	Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E ₁₄ (KNO ₃ , 15,0 mmol · L ⁻¹ ; NH ₄ Cl, 15,0 mmol · L ⁻¹)	72

Tabela 21 –	Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo de ótimo O ₁ (KNO ₃ , 15,4 mmol · L ⁻¹ ; NH ₄ Cl, 14,1 mmol · L ⁻¹)	73
Tabela 22 –	Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo de ótimo O ₂ (KNO ₃ , 15,4 mmol · L ⁻¹ ; NH ₄ Cl, 14,1 mmol · L ⁻¹)	74
Tabela 23 –	Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo de ótimo O ₃ (KNO ₃ , 15,4 mmol · L ⁻¹ ; NH ₄ Cl, 14,1 mmol · L ⁻¹)	75
Tabela 24 –	Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo de ótimo O ₄ (KNO ₃ , 15,4 mmol · L ⁻¹ ; NH ₄ Cl, 14,1 mmol · L ⁻¹)	76
Tabela 25 –	Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo de ótimo O ₅ (KNO ₃ , 15,4 mmol · L ⁻¹ ; NH ₄ Cl, 14,1 mmol · L ⁻¹)	77
Tabela 26 –	Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo de referência para cloreto de amônio R _{A1} (NH ₄ Cl, 21,5 mmol · L ⁻¹)	78
Tabela 27 –	Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo de referência para cloreto de amônio R _{A2} (NH ₄ Cl, 21,5 mmol · L ⁻¹)	79
Tabela 28 –	Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de nitrato, em função do tempo, para o cultivo de referência para nitrato de potássio R _{N1} (KNO ₃ , 25,4 mmol · L ⁻¹)	80
Tabela 29 –	Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de nitrato, em função do tempo, para o cultivo de referência para nitrato de potássio R _{N2} (KNO ₃ , 25,4 mmol · L ⁻¹)	81
Tabela 30 –	Teor de clorofila, lipídios e proteínas nas biomassas obtidas nos cultivos realizados, com suas respectivas concentrações de nitrogênio	82

Tabela 31 –	Concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_X) e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) – parâmetros referentes aos cultivos, com as respectivas concentrações de nitrogênio	83
Tabela 32 –	Análise da regressão multivariável para X_m	97
Tabela 33 –	Análise de variância do modelo de regressão para X_m	97
Tabela 34 –	Análise da regressão multivariável para P_X	100
Tabela 35 –	Análise de variância do modelo de regressão para P_X	100
Tabela 36 –	Análise da regressão multivariável para $Y_{X/N}$	102
Tabela 37 –	Análise de variância do modelo de regressão para $Y_{X/N}$	102
Tabela 38 –	Quantidade de fonte de nitrogênio, concentração celular máxima média, e custos com as fontes de nitrogênio e por massa de células	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	aminoácido
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Co.	(do inglês <i>Company</i>) Empresa
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
lag	fase de adaptação do crescimento microbiano
NBR	Normas Brasileiras
PTN	proteína
PVC	cloreto de polivinila
S.A.	Sociedade Anônima
SCO	(do inglês <i>single cell oil</i>) lipídio obtido a partir de microrganismos
SCP	(do inglês <i>single cell protein</i>) proteína obtida a partir de microrganismos
sp.	(do latim <i>specie</i>) espécie
UTEX	(do inglês <i>University of Texas</i>) Universidade do Texas

LISTA DE SÍMBOLOS

£\$	moeda européia Euro
cl	clorofila
E	cultivos referentes ao planejamento experimental
e	base do logaritmo neperiano
EC ₅₀	concentração efetiva 50% (unidade: mg · L ⁻¹)
F	valor do Teste F da análise de variância da regressão multivariável
k	constante de determinação do perfil de alimentação do sistema
m ₀	quantidade inicial adicionada de cloreto de amônio (unidade: mmol · L ⁻¹)
m _{T1}	quantidade total adicionada de nitrato de potássio (unidade: mmol · L ⁻¹)
m _{T2}	quantidade total adicionada de cloreto de amônio (unidade: mmol · L ⁻¹)
N	nitrogênio
N _T	massa total de nitrogênio (unidade: mg)
O	cultivos de ótimo referentes à concentração celular
<i>p</i>	nível descritivo correspondente ao erro
pH	potencial hidrogeniônico
P _X	produtividade em células (unidade: mg · L ⁻¹ · d ⁻¹)
R\$	moeda brasileira Real
R ²	coeficiente de determinação
R _A	cultivos de referência para cloreto de amônio
R _N	cultivos de referência para nitrato de potássio
<i>t</i>	instante de adição de cloreto de amônio (unidade: d)
<i>t</i>	valor do Teste t da regressão multivariável
T	tempo total de alimentação de cloreto de amônio (unidade: d)
T _C	tempo de cultivo (unidade: d)
U\$	moeda norte-americana Dólar
V	volume total de cultivo (unidade: L)
X ₁	valores codificados do planejamento experimental referentes a nitrato de potássio
X ₂	valores codificados do planejamento experimental referentes a cloreto de amônio
X _i	concentração celular inicial (unidade: mg · L ⁻¹)
X _m	concentração celular máxima (unidade: mg · L ⁻¹)
Y _{X/N}	fator de conversão de nitrogênio em células (unidade: mg células · mg N ⁻¹)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 Cultivo de cianobactérias	25
2.2 <i>Spirulina</i> sp.	27
2.2.1 <i>Morfologia, classificação, histórico e ocorrência</i>	27
2.2.2 <i>Composição química, propriedades e aplicações</i>	29
2.2.3 <i>Produção, comercialização e condições de cultivo</i>	33
2.3 Fontes de nitrogênio	35
3 OBJETIVO	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Microrganismo	40
4.2 Meios de cultura	40
4.3 Inóculo	42
4.4 Dispositivo de cultura	42
4.5 Experimentos realizados	43
4.6 Técnicas analíticas	48
4.6.1 <i>Acompanhamento do cultivo</i>	48
4.6.1.1 <u>Determinação da concentração celular</u>	48
4.6.1.2 <u>Determinação da concentração de amônia total</u>	48
4.6.1.3 <u>Determinação da concentração de nitrato</u>	49
4.6.1.4 <u>Determinação da concentração de carbonato total</u>	49
4.6.1.5 <u>Determinação do pH</u>	50
4.6.2 <i>Avaliação da biomassa obtida</i>	50
4.6.2.1 <u>Determinação da concentração de clorofila</u>	50
4.6.2.2 <u>Determinação do teor de lipídios</u>	51
4.6.2.3 <u>Determinação do teor de proteínas</u>	51

4.7 Curvas de calibração	52
4.7.1 Para determinação da concentração celular	52
4.7.2 Para determinação da concentração de amônia total	53
4.7.3 Para determinação da concentração de clorofila	54
4.8 Análise dos resultados	55
4.8.1 Cálculo de parâmetros	55
4.8.2 Análise estatística	56
4.9 Descrição de um experimento	56
5 RESULTADOS	58
6 DISCUSSÃO	84
6.1 Avaliação do crescimento celular e do consumo de nutrientes	84
6.2 Análise dos teores da biomassa obtida	93
6.3 Avaliação estatística	96
6.3.1 Concentração celular máxima (X_m)	97
6.3.2 Produtividade em células (P_X)	99
6.3.3 Fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$)	101
6.4 Substituição do cloreto de amônio ou nitrato de potássio pela associação dos sais e suas ramificações no processo de produção de <i>Spirulina platensis</i>	104
7 CONCLUSÕES	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
APÊNDICE	116

1 INTRODUÇÃO

Cianobactérias são bactérias fotossintetizantes que requerem apenas nutrientes inorgânicos, água e luz para seu crescimento, caracterizado este por altas velocidades (CHRONAKIS *et al.*, 2000). Apresentam biomassa de alto conteúdo protéico, ácidos graxos poliinsaturados e pigmentos de alto valor comercial, aplicáveis na indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos; recentemente, sua aplicação no tratamento de resíduos, efluentes e emissões industriais vem ganhando destaque.

As espécies do gênero *Spirulina* (*Arthrospira*), em especial *S. platensis*, são de grande interesse comercial, e o seu potencial econômico está se tornando amplamente reconhecido. Algumas particularidades de *S. platensis*, como alta digestibilidade protéica, baixo custo de extração de componentes e secagem da biomassa, tolerância a ambientes alcalinos e o tamanho relativamente grande dos agregados de células também são fatores positivos que incentivam a produção e estudo desta espécie de cianobactéria (HENRIKSON, 1989; MORIST *et al.*, 2001).

Quando se trata de cultivo com meio de cultura sintético, este é um dos fatores limitantes para a produção de *Spirulina*; o custo dos nutrientes representa um fator importante na viabilização da produção em larga escala (TROTТА, 1978). Dentre os componentes do meio de cultivo, um que merece destaque é a fonte de nitrogênio, pois o nitrogênio é o segundo elemento mais abundante da biomassa (CORNET *et al.*, 1992). Os cultivos convencionais utilizam sais de nitrato como fonte de nitrogênio, e estudos vem sendo desenvolvidos para otimização da utilização de fontes alternativas, como os sais de amônio e a uréia, que possibilitam uma diminuição do custo de produção. Uma vez que tais fontes alternativas de nitrogênio se apresentam como potencialmente tóxicas à cianobactéria quando em altas concentrações, devido à presença de amônia no meio líquido, a utilização do processo descontínuo alimentado é necessária para obtenção de resultados bastante satisfatórios quanto ao crescimento celular máximo.

A utilização conjunta de uma fonte amoniacal (NH_4Cl) e um nitrato (KNO_3) tem o potencial para aumentar a produção de biomassa de *S. platensis*, pois associa uma fonte prontamente utilizável (sal de amônio) ao nitrato, fonte da qual a *Spirulina* tem um controle total da geração de amônia. Dessa forma, a adição continuada do cloreto de amônio em cultivos com diferentes níveis iniciais de nitrato de potássio possibilita resultados interessantes do ponto de vista de processo de produção.

Dentro desse contexto, foi proposta para este trabalho a avaliação da adição de nitrato de potássio em cultivos de *S. platensis* realizados com cloreto de amônio, com base na consideração de que a associação de fontes auxilia no contorno das dificuldades encontradas quando da utilização exclusiva e isolada de tais fontes em cultivos em tanques abertos. Foram obtidos resultados inéditos na literatura sobre o uso conjunto dessas fontes, utilizando uma associação de dois processos (descontínuo e descontínuo alimentado) para um determinado nutriente limitante; esses resultados trazem o conhecimento científico necessário para o desenvolvimento posterior de projetos aplicáveis à produção comercial atual de cianobactérias.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cultivo de cianobactérias

Cianobactérias são microrganismos que apresentam estrutura morfológica semelhante à das bactérias e um sistema fotossintetizante semelhante ao das algas, e constituem, portanto, um grupo de bactérias fotossintetizantes que compreende uma grande diversidade de organismos com amplas características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas (ASHBY; HOUMARD, 2006). Tais organismos requerem apenas nutrientes inorgânicos, água e luz para seu crescimento, caracterizado por altas velocidades (CHRONAKIS *et al.*, 2000); essa relativa facilidade de cultivo e a alta produtividade em células fazem de algumas espécies de cianobactérias uma fonte atrativa de biomassa.

Essa biomassa é, de maneira geral, de alto valor protéico. A produção de proteínas a partir de microrganismos (*single cell protein* – SCP), inclusive cianobactérias, é uma das alternativas estudadas para os problemas mundiais relacionados à fome, à limitação de terras cultiváveis e à crescente necessidade de novas matérias-primas para a indústria (REED; NAGODAWITHANA, 1995). Essa alternativa é bastante viável, pois implica na produção de grandes quantidades de proteínas por área útil em função do tempo, sem promoção de danos ambientais.

O cultivo de cianobactérias também é vantajoso, principalmente, para obtenção de pigmentos (carotenóides e clorofila) e lipídios (ácidos graxos poliinsaturados); a produção de óleo a partir de microrganismos (*single cell oil* – SCO) é um dos mais novos focos da indústria e pesquisa relacionada a organismos unicelulares (DERNER *et al.*, 2006). Outras vantagens do cultivo de tais microrganismos incluem a capacidade de incorporação tanto de carbono orgânico quanto inorgânico, tempo curto de geração em condições ótimas, facilidade de produção contínua em pequenas áreas, e susceptibilidade à manipulação genética; adicionalmente, as cianobactérias são microrganismos de eficiência fotossintética similar às das plantas superiores (AARONSON; DUBINSKY, 1982), flexíveis e resistentes às condições adversas ou não ideais de cultivo, que não afetam drasticamente o meio ambiente, e cujos cultivos são fáceis de serem controlados (BENEMAN, 1990).

O cultivo de cianobactérias é um ramo da biotecnologia moderna, embora haja registros de cultivo de *Chlorella vulgaris* já em 1890 (BOROWITZA, 1999). Na década de

50 foram estudados principalmente os gêneros *Chlorella* e *Scenedesmus*, que apresentaram dificuldade de secagem da biomassa, elevado custo de extração de componentes, e baixa digestibilidade da parede celulósica (RICHMOND, 1989). O cultivo comercial em larga escala iniciou-se por volta de 1960, no Japão, também com *Chlorella* (TSUKADA; KAWAHARA; MIYACHI, 1977). Na década seguinte foi introduzida a comercialização de *Spirulina* (DURAND-CHASTEL, 1980); tal gênero foi considerado um avanço por não apresentar nenhuma das dificuldades mencionadas.

Desde então, as indústrias de biotecnologia de microalgas e cianobactérias vêm crescendo consideravelmente. Esse crescimento é bem ilustrado pela produção global de *Spirulina*, que passou de apenas algumas toneladas em 1975 para mais de 2500 toneladas em 1998 (BOROWITZA, 1999). Atualmente, a maior empresa produtora desta cianobactéria em particular está localizada na cidade de Hainan, na China, e produz anualmente 200 toneladas de pó de tal microrganismo (SPOLAORE *et al.*, 2006). Apesar das plantas industriais atuais serem restritas ao Oriente e à América do Norte, e se focarem principalmente em *Spirulina*, *Chlorella* e *Scenedesmus*, diversos estudos estão sendo realizados atualmente acerca do cultivo de microrganismos fotossintetizantes, que têm atraído muita atenção em decorrência de suas potenciais aplicações (TAB. 01) nos setores industriais e de serviços (SUKAN, 2000).

Tabela 01 – Aplicações potenciais das algas e cianobactérias produzidas comercialmente

Aplicações	Componentes e usos específicos
Alimentação	Proteínas e vitaminas, para alimentação humana e animal
Fins terapêuticos	Beta-caroteno nos tratamentos de pele; enzimas; substâncias com propriedades antibióticas; ácido gama-linolênico como estimulante da prostaglandina; regulação da síntese do colesterol; compostos isotópicos em pesquisa médica
Fonte de pigmentos	Beta-caroteno, xantofilas e ficobilinas como corantes, em diagnóstico, cosméticos e reagentes analíticos
Produtos agregados	Glicerol, ácidos graxos, lipídios, esteróis, hidrocarbonetos, aminoácidos, enzimas, vitaminas, hormônios
Combustível	Hidrocarbonetos de cadeia longa e lipídios esterificados como óleo combustível; hidrogênio como biogás

FONTE: Becker, 1994.

Podem ser citados os gêneros *Nostoc*, *Spirulina*, *Chlorella*, *Anabaena*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, e *Synechococcus* como exemplos de cianobactérias em foco atual de estudos. As pesquisas incluem principalmente a produção de biomassa, remoção de metais pesados, incorporação de dióxido de carbono, e extração de compostos de alto valor agregado, tais como aminoácidos, ácidos graxos, enzimas, vitaminas, pigmentos, e moléculas bioativas.

Segundo Becker (1994), não falta interesse na produção comercial de microrganismos fotossintetizantes, e o potencial econômico das cianobactérias está se tornando amplamente reconhecido; no entanto, o esforço industrial para produção massiva de cianobactérias é pequeno. Existe uma discrepância hoje entre qual microrganismo se produz, e como ele é produzido, em relação ao que se conhece, através de estudos, como melhor alternativa. As dificuldades de aceitação dos novos modelos de produção são provavelmente devido ao alto custo, relacionado por sua vez à pequena disponibilidade de locais de produção, e à popularização da biomassa, em qualquer forma que esta possa vir a ser apresentada.

2.2 *Spirulina* sp.

2.2.1 Morfologia, classificação, histórico e ocorrência

Spirulina (*Arthrospira*), pertencente à ordem *Oscillatoriales*, família *Cyanophyceae*, é uma cianobactéria filamentosa, de cor verde azulada, caracterizada por uma cadeia de células cilíndricas dispostas de forma helicoidal – são os denominados tricomas (GUGLIELMI; RIPPKA; TANDEAU DE MARSAC, 1993), que variam de tamanho e morfologia conforme as condições de crescimento, porém possuem geralmente cerca de 500 µm de comprimento e de 6 a 12 µm de diâmetro (TOMASELLI, 1997).

Existe discordância entre diversos autores em relação à denominação desta cianobactéria. As espécies pertencem ao gênero *Arthrospira*, que foi oficialmente incluído no *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (CASTENHOLZ, 1989) no ano de 1989, e que foi diferenciado do gênero *Spirulina* com base em diversas características morfológicas e genéticas (TOMASELLI, 1997). No entanto, a denominação *Spirulina* permanece comercialmente e inclusive em publicações científicas.

Dentre as cianobactérias utilizadas na alimentação humana e animal, *Spirulina* é a mais popular (ANUPAMA, 2000). Pode ser encontrada naturalmente na região equatorial e leste da África, e no México; neste último, foi produto de consumo da civilização Asteca, e difundida no Oriente pelos espanhóis (PARADA *et al.*, 1998). Registros datados a partir de 1940 informam que em diversas regiões africanas, principalmente naquelas próximas aos lagos nos quais *Spirulina* se desenvolve, esta cianobactéria tem sido recolhida diretamente de tais lagos, após secagem ao sol, e consumida como alimento (CIFERRI, 1983; PANIAGUA-MICHEL; DUJARDIN; SIRONVAL, 1993).

Spirulina desenvolve-se naturalmente numa série de meios ambientais, porém seu crescimento é maior em meios aquáticos, de característica salina ou não. *S. platensis*, foco de estudo deste trabalho, é caracteristicamente alcalofílica – apresenta crescimento considerado adequado e máximo sob valores de pH entre 8 e 11, e prevalece perante outros microrganismos e cianobactérias em meios aquáticos com concentrações salinas superiores a $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, podendo suportar concentrações de até $270 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (CIFERRI, 1983).

A resistência de espécies de *Spirulina* a meios altamente salinos possibilita seu desenvolvimento em cultivos, tanto laboratoriais quanto comerciais, com diversas concentrações de sais. Zeng e Vonshak (1998) estudaram a variação da velocidade específica de crescimento e da atividade fotossintética, entre outros, de *S. platensis*, e determinaram que estes parâmetros decaem conforme o aumento da intensidade luminosa e da concentração de cloreto de sódio do meio. Concluíram, no entanto, que a cianobactéria recupera satisfatoriamente sua velocidade de crescimento e sua capacidade fotossintética após um período de adaptação, quando do aumento da concentração salina em até $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Concentrações superiores a esta, mesmo com intensidades luminosas baixas ($100 \mu\text{mol} \text{ fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), intensificam o efeito de fotoinibição, com conseqüente degradação das proteínas e redução da concentração de clorofila, inviabilizando o crescimento satisfatório de *Spirulina* e a recuperação de uma biomassa de boa qualidade (alto conteúdo protéico e de pigmentos).

Materassi, Tredici e Balloni (1984) mostraram que é possível o cultivo de *S. maxima* em água marinha com suplementos de nitrato, fosfato, bicarbonato e ferro, com obtenção de biomassa de mesma composição química que aquelas produzidas em meios de cultura laboratoriais inorgânicos. Estudos como estes demonstram a grande capacidade de adaptação de *Spirulina* a condições diversas de crescimento em meios aquáticos, e ilustram a grandeza da diversificação de meios naturais nos quais estas cianobactérias podem ser encontradas.

2.2.2 Composição química, propriedades e aplicações

As proteínas representam até 74 % da massa seca de *Spirulina*, valor este que varia conforme a espécie e as condições de crescimento (COHEN, 1997). Entre as proteínas estão presentes as ficocianinas, biliproteínas envolvidas nas reações bioquímicas de fotossíntese e que funcionam como reservatórios de nitrogênio (CIFERRI, 1983). Segundo Dillon, Phuc e Dubacq (1995), esta cianobactéria representa uma das mais ricas fontes de proteínas, e seu conteúdo é superior ao de carnes e peixes (15 a 25 %) e também ao da soja (35 %). Os autores afirmam que até 47 % da proteína presente equivalem a aminoácidos essenciais (TAB. 02), com a presença inclusive de metionina, aminoácido ausente na maioria das cianobactérias e algas.

Tabela 02 – Composição de aminoácidos estritamente essenciais de *S. platensis* e *S. maxima*

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

FONTE: Dillon; Phuc; Dubacq, 1995.

Os ácidos graxos poliinsaturados presentes nesta cianobactéria são, principalmente, os ácidos palmítico, linoléico, oléico e, especialmente, os ácidos essenciais alfa-linolênico e gama-linolênico (TAB. 03), correspondendo estes últimos a até 30 % de todos os ácidos graxos presentes (HIRANO *et al.*, 1990). *Spirulina* é única por conter a maior concentração de ácido gama-linolênico encontrada em organismos vegetais: 1 % da massa seca (DILLON; PHUC; DUBACQ, 1995). O teor de ácidos presentes varia conforme a espécie ou subespécie

de cianobactéria (HONGSTHONG *et al.*, 2007) e as condições de crescimento, principalmente ao que se diz respeito à fonte de nitrogênio (PIORRECK; BAASCH; POHL, 1984).

Tabela 03 – Teor de alguns dos ácidos graxos poliinsaturados encontrados em *S. platensis*

Ácidos graxos	Teor
	(%, em relação ao conteúdo lipídico)
Palmítico	34 – 42
Palmitoléico	9 – 11,5
Oléico	3 – 8
Linoléico	19 – 26
Gama-linolênico	16 – 25

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

Spirulina apresenta também quantidades apreciáveis de fibras e minerais como ferro, cálcio, potássio, fósforo, manganês, cobre, magnésio (BRANGER *et al.*, 2003), boro, molibdênio, selênio e zinco (SEDYKH *et al.*, 2005). As vitaminas encontradas em abundância são cianocobalamina (B₁₂), pirodoxina (B₆), riboflavina (B₂), tiamina (B₁), tocoferol (E) e fitonadiona (K) (BRANGER *et al.*, 2003).

As espécies de *Spirulina* são caracterizadas por parede celular constituída de peptideoglicanos, e conseqüentemente são mais digeríveis que aquelas formadas por celulose; do ponto de vista nutricional, essa característica é uma grande vantagem, pois o microrganismo pode ser consumido por inteiro, sem necessidade de cocção nem de qualquer outro tipo de tratamento, e os constituintes mais frágeis (vitaminas e ácidos graxos essenciais) podem ser disponibilizados no organismo humano sem degradação alguma (TOMASELLI, 1997).

Dentre os pigmentos presentes em *Spirulina*, destacam-se os carotenóides (ANNAPURNA; DEOSTHALE; BAMJI, 1991), especialmente beta-caroteno (CARERI *et al.*, 2001); e a clorofila (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004), encontrados, respectivamente, em teores de até 0,4 e 1,5 % na biomassa seca (CIFERRI, 1983). Recentemente, maior atenção vem sendo dada à *Spirulina* pelo potencial de coloração de seus pigmentos de interesse às indústrias de alimentos, farmacêuticas e de cosméticos (DANESI *et al.*, 2004). Existe atualmente uma tendência na substituição de corantes artificiais por produtos naturais

(DANESI *et al.*, 2002), o que sugere a possibilidade de maior exploração das espécies de *Spirulina*, pois essas cianobactérias são uma das principais fontes de clorofila na natureza. Deve ser ressaltado que esta constituição é de clorofila “a”, exclusivamente (PAOLETTI *et al.*, 1980).

Em decorrência de tal composição química – presença de proteínas em grande quantidade, aminoácidos essenciais, ácidos graxos poliinsaturados e outros compostos fitoquímicos de ação antioxidante (HERRERO *et al.*, 2005), as cianobactérias do gênero *Spirulina* são atrativas para produção de alimentos ou suplementos alimentícios, seja para alimentação humana ou animal.

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

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

Spolaore *et al.* (2006) relatam a comercialização de produtos cosméticos baseados em cianobactérias, especialmente *Spirulina* e *Chlorella*; estas podem ser encontradas no mercado mundial especialmente em produtos para rosto e pele, incluindo cremes anti-rugas, loções refrescantes e regenerantes, cremes emolientes e protetores solares. Samson e Leduy (1982) mostraram que a biomassa de *Spirulina* ainda pode ser utilizada industrialmente para produção de biogás por digestão anaeróbica, e Peng *et al.* (2001) sugeriram sua utilização para a alimentação de processos de pirólise.

O tratamento de efluentes industriais com cianobactérias, em particular as espécies de *Spirulina*, é uma área bem explorada no meio científico, podendo ser encontrada uma série de

estudos sobre a assimilação de nutrientes pela cianobactéria, e os mecanismos de absorção e adsorção de metais pesados.

Kim *et al.* (2000) estimaram a eficiência de remoção, em escala industrial, de alguns nutrientes por *S. platensis*: 70 a 93 % para fosfato, 67 a 93 % para nitrogênio inorgânico, 37 a 56 % para nitrogênio orgânico, e 80 a 90 % para carbono orgânico. Lodi *et al.* (2003) desenvolveram um sistema de remoção de íons nitrato e fosfato em duas fases, enquanto que Converti *et al.* (2006a) trabalharam com a remoção de amônia e uréia mediante processo alimentado; ambos utilizaram meios de cultura sintéticos, enriquecidos com tais nutrientes, com o objetivo de avaliar a possibilidade da utilização de *S. platensis* na remoção de nutrientes em sistemas de tratamento de efluentes industriais.

Olguín *et al.* (2003) avaliaram a capacidade de remoção de nutrientes de *Spirulina* em tanques externos de tratamento de efluente anaeróbio de resíduos de suinoculturas. Realizaram experimentos em escala piloto, no México, durante quatro anos, e determinaram que até 96 % do nitrogênio proveniente da amônia e até 87 % dos íons fosfato podem ser removidos mediante processo semi-contínuo. Sugeriram ainda que a biomassa recuperada, com conteúdo protéico de 48,9 %, tem potencial para comercialização no mercado de aquicultura. Bertolin *et al.* (2005) mostraram que é possível a cultura de *S. platensis* em efluente sintético de suínos, e o crescimento da cianobactéria é favorecido pela diluição do meio.

A maioria dos estudos referentes à remoção de nutrientes é realizada sobre apenas um microrganismo, em relação a um ou dois nutrientes. No entanto, essa idéia não é prática, uma vez que os efluentes a serem tratados contêm, na maioria das vezes, uma gama de nutrientes diferentes. Ogbonna, Yoshizawa e Tanaka (2000) realizaram um estudo envolvendo *S. platensis*, *Chlorella sorokiniana* e *Rhodobacter sphaeroides*, no qual todos os contaminantes de determinados efluentes industriais foram removidos efetivamente em um processo de apenas uma fase. Os dois segundos microrganismos removeram ácidos orgânicos sob valores de pH da ordem de 8,0, e com a elevação deste para 10,0 e intensificação da iluminância, *S. platensis* removeu quase que completamente todo o nitrogênio e fosfato inorgânico. Para otimização do processo, os autores sugerem que a razão dos três microrganismos envolvidos deve variar conforme a proporção dos nutrientes do efluente a ser tratado.

Chojnacka, Chojnacki e Górecka (2004) removeram elementos traços de efluente industrial de refinarias de cobre, contendo particularmente mercúrio e cádmio, com 0,25 g de células imobilizadas de *Spirulina* por litro de efluente, sem a adição de nutrientes ou luminosidade. O estudo obteve sucesso em escala industrial e provou ser uma alternativa

bastante econômica e aplicável. Chen e Pan (2005) mostraram que biomassa viva de *Spirulina* é capaz de remover até 95 % do chumbo presente em efluentes; estimaram que a EC₅₀ a 72 horas é de 11,46 mg · L de chumbo, resultado este maior quando comparado com outros microrganismos previamente estudados, e que comprova a alta resistência desta cianobactéria a este metal.

Converti *et al.* (2006b) otimizaram a remoção de íons cobre por biomassa pré-hidratada de *Spirulina*, introduzindo conceitos para criação de um processo em larga escala para remoção de metais de efluentes industriais. Li, Guo e Lin (2006) estudaram a biossorção de cromo por *S. platensis*. Determinaram que, inicialmente, o cromo é fisicamente adsorvido à membrana celular por atração eletrostática, para somente depois ser absorvido através de troca iônica e ligado a proteínas, lipídios e polissacarídeos. Essa incorporação do metal às células, diferentemente dos outros casos, acaba melhorando a qualidade do microrganismo, tornando ainda mais interessante a recuperação da biomassa ao final do processo.

Em relação à utilização de *Spirulina* para recuperação do meio ambiente, entre os mais recentes estudos estão inseridos os conceitos de assimilação de dióxido de carbono pela biomassa da cianobactéria, o que possibilita o tratamento também de emissões industriais (BINAGHI *et al.*, 2003).

2.2.3 Produção, comercialização e condições de cultivo

Na década de 50, o aumento da população mundial e as predições de suplemento protéico insuficiente levaram à busca de fontes alternativas de proteínas, e o cultivo de cianobactérias serve aos propósitos atuais (SPOLAORE *et al.*, 2006). O interesse na biotecnologia e na produção comercial da *Spirulina* em particular aumenta devido a algumas propriedades particulares, como o baixo custo de extração de componentes e secagem da biomassa deste microrganismo, sua alta digestibilidade protéica, baixa concentração de ácidos nucléicos, alto teor de proteínas, presença de vitaminas e pigmentos, e uma importância quantitativa de aminoácidos essenciais (MORIST *et al.*, 2001). A tolerância a pH alcalino e o tamanho relativamente grande dos agregados de células também são fatores positivos (HENRIKSON, 1989).

De acordo com o mencionado anteriormente, e segundo Shimamatsu (2004) e Spolaore *et al.* (2006), a produção em larga escala de cianobactérias teve início em 1960 com

Chlorella, e amplificou-se em 1970 com a instalação de cultivos de *Spirulina* no México, pela produtora *Spirulina Mexicana S.A.* (antiga *Sosa Texcoco*); atualmente, esta cianobactéria é produzida na Tailândia (*Siam Algae*), no Japão (*Nippon Spirulina*), na Índia (*Parry Agro Industries*), em Israel (*Koor Foods Co.*), e principalmente nos Estados Unidos, na China e na ilha de Taiwan. A maior planta de produção pertence à empresa americana *Earthrise Farms*, localizada na Califórnia, que fornece para mais de vinte países produtos baseados em *Spirulina* na forma de pó e tabletes, produtos estes que constituem, em sua maioria, suplementos alimentares e vitamínicos. Na cidade de Hainan, na China, se encontra a importante indústria *Hainan Simai Enterprising*, que colabora com 25 % da produção chinesa, o que corresponde a quase 10 % da produção mundial de *Spirulina*, esta última estimada em aproximadamente 3000 toneladas.

Na produção comercial da *Spirulina*, fatores como a composição do meio de cultura, pH, temperatura e intensidade luminosa devem ser levados em consideração (RICHMOND, 1989). Sabe-se que 15 a 25% do gasto total com a produção de cianobactérias é devido ao meio de cultura exigido para seu desenvolvimento (BELAY, 1997), e por isso se faz importante o estudo dos nutrientes presentes no meio, principalmente as fontes de carbono e nitrogênio.

As condições de crescimento de *Spirulina* são variadas. Cultivos laboratoriais são geralmente desenvolvidos com complementação de fonte nítrica, temperaturas de 32 a 35 °C, intensidade luminosa de 20 a 30 klux, e valores de pH entre 8 e 11 (CIFERRI, 1983). Na ausência de luz, a cianobactéria exige condições autotróficas para o crescimento; na presença de luz, o crescimento mixotrófico resulta em produtividades até três vezes maiores que aquelas obtidas em condições autotróficas (CIFERRI, 1983). A disponibilidade de luz para cada célula em culturas autotróficas é função da intensidade e duração da irradiação, assim como da concentração de células que afeta a extensão de sombra (BECKER, 1981; RICHMOND, 1989). Convencionalmente, *Spirulina* é cultivada em tanques abertos. As desvantagens dessa forma de cultivo incluem a baixa densidade de células, a facilidade de contaminação por outros microrganismos, e a dificuldade de controle de fatores ambientais como a temperatura e a intensidade luminosa (RANGEL, 2000). A utilização de tanques abertos é, no entanto, a forma preferencial de produção comercial, principalmente devido aos baixos custos de instalação. Recentemente, o estudo de fotobiorreatores e processos heterotróficos de cultivo foram introduzidos como alternativas aos cultivos tradicionais (CHEN; ZHANG, 1997).

2.3 Fontes de nitrogênio

Dentre os componentes do meio de cultivo da *Spirulina*, um que merece destaque é a fonte de nitrogênio, pois é o segundo elemento mais abundante da biomassa, representando de 7 a 10 % no total (CORNET *et al.*, 1992). A fonte convencional de nitrogênio para o cultivo de *Spirulina* são os nitratos, de sódio (NaNO_3) e potássio (KNO_3), principalmente. Estudos recentes, porém, indicam que o emprego de fontes amoniacais (cloreto de amônio e sulfato de amônio) ou uréia como fontes de nitrogênio em cultivos de *Spirulina* pode proporcionar um aumento na produção da biomassa e também nos teores de clorofila, lipídios e proteínas.

Considerando a substituição dos nitratos por uréia ou sais de amônio, verifica-se que esta é altamente vantajosa. O custo destas fontes alternativas é muito menor que o do nitrato, e sua assimilação pela cianobactéria é de maior facilidade. A utilização de sais de amônio possibilita a disponibilização direta de amônia à cianobactéria, e a assimilação da fonte ocorre sem gastos de energia. A uréia, por sua vez, sofre hidrólise no meio de cultivo e leva à formação de amônia, em decorrência da ação da enzima urease (CARVAJAL *et al.*, 1982), ou da alcalinidade do meio de cultivo (DANESI *et al.*, 2002; RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004).

Segundo Boussiba (1989), quando amônia e nitrato estão presentes juntos no meio de cultivo, a amônia é preferencialmente assimilada. Contudo, amônia pode ser tóxica à *Spirulina*, quando presente em altas concentrações (ABELIOVICH; AZOV, 1976), e, por isso, faz-se necessário o emprego de um processo de adição contínua de fontes de nitrogênio amoniacais ou de fontes que possam levar à formação de amônia no meio, como a uréia.

Vários tipos de trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de aumentar a produção de metabólitos específicos ou de biomassa final, bem como o de diminuir o custo de produção, e empregam tais fontes de nitrogênio alternativas. De acordo com Piorreck, Baasch e Pohl (1984), a concentração de clorofila na biomassa de *S. platensis* aumenta com o acréscimo da concentração de nitrogênio no meio de cultivo. Sabe-se ainda que a quantidade e a qualidade do nitrogênio disponível influenciam também o conteúdo de proteínas e lipídios, bem como de outros compostos da cianobactéria (STANCA; POPOVICI, 1996).

Macedo e Alegre (2001) investigaram a influência da concentração de nitrogênio e da temperatura no teor de lipídios em cultivos de *S. maxima*. Cultivaram a cianobactéria em meios com $0,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e $2,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de nitrato de potássio, e em ausência de nitrogênio, nas temperaturas de 25 e 35 °C. Observaram que houve um aumento de aproximadamente três

vezes do conteúdo de lipídios quando diminuiu-se o teor de nitrogênio e a temperatura, sugerindo que é viável o cultivo de *Spirulina* em condições limitantes visando a produção de lipídios ricos em ácidos graxos poliinsaturados essenciais.

Colla *et al.* (2007) avaliaram a influência da concentração de nitrogênio e da temperatura no teor de proteínas e lipídios e no crescimento celular de *S. platensis*. Cultivaram a cianobactéria em meios com quatro diferentes concentrações de nitrato de sódio (0,6 a 2,5 g · L⁻¹), nas temperaturas de 30 e 35 °C. Relataram que o aumento da concentração da fonte de nitrogênio e da temperatura levou a um aumento do teor lipídico e protéico, enquanto que a menor temperatura estudada favoreceu o crescimento celular. Sugeriram que nos cultivos realizados a 35 °C, a baixa concentração celular possibilitou uma maior disponibilidade de luz para as células, permitindo uma melhor utilização do nitrogênio por estas, e, conseqüentemente, uma maior produção de lipídios e proteínas nos cultivos realizados com as maiores concentrações de nitrato de sódio.

Costa *et al.* (2001) estudaram a aplicação de diversas fontes alternativas de nitrogênio, tais como nitrato de amônio, sulfato de amônio, cloreto de amônio, fosfato de amônio e uréia. Analisaram diferentes concentrações das fontes em até 0,05 M, em fotobioreator aerado a 30 °C e com 22,8 μmol fótons · m⁻² · s⁻¹ de iluminância por períodos intercalados de 12 horas. Apesar dos melhores resultados de concentração celular terem sido obtidos com a fonte tradicional de nitrogênio (nitrato de sódio), bons resultados foram possíveis com a aplicação das fontes uréia e nitrato de amônio, ambas consideradas já uma melhora econômica para produção em larga escala de *S. platensis*.

Danesi *et al.* (2002) estudaram os efeitos da adição contínua de uréia e de diferentes temperaturas sobre o crescimento de *S. platensis*, cultivada em processo descontínuo alimentado. Observaram que a adição contínua de uréia em uma taxa exponencialmente crescente, a 30 °C, possibilitou um ganho de biomassa equivalente a 37 % e, conseqüentemente, uma maior quantidade de clorofila. Em trabalho com vazão constante de adição de uréia, Sánchez-Luna *et al.* (2004) verificaram que a melhor temperatura para produção desta cianobactéria estaria um pouco abaixo de 30 °C (28 °C), indicando que o sucesso do emprego de fontes de nitrogênio que levam à presença de amônia no meio de cultivo depende de inúmeros fatores. De fato, quando do uso de vazão constante, ao contrário da vazão exponencialmente crescente, a mesma quantidade da fonte de nitrogênio é adicionada ao longo do tempo. Considerando a fase final do cultivo, onde a demanda por nitrogênio é mais alta devido à grande quantidade de células no sistema, temperaturas menores levariam a uma menor perda de amônia. Assim, no caso de vazão mássica de adição

de uréia constante, temperaturas menores que as normalmente consideradas ótimas para o crescimento celular são mais vantajosas no processo de produção, especialmente quando comparadas com as temperaturas ótimas para crescimento com nitratos (35 a 38 °C; VONSHAK, 1997a; JIMÉNEZ *et al.*, 2003).

Rangel-Yagui *et al.* (2004) investigaram a influência da intensidade de luz e do emprego de uréia como fonte de nitrogênio sobre o crescimento de *S. platensis* e conteúdo de clorofila. Para isso, realizaram processos descontínuos alimentados de cultivo empregando uréia, com aumento exponencial de alimentação, e em diferentes intensidades luminosas, comparando os resultados com aqueles obtidos em cultivo padrão, que emprega nitrato de potássio como fonte de nitrogênio. Concluíram que a melhor produção de biomassa foi observada em cultivo com uso de uréia. Considerando a produtividade de clorofila, que reflete o balanço entre crescimento celular e concentração de clorofila na biomassa, verificaram que seu valor máximo ocorreu quando do uso de 500 mg · L⁻¹ de uréia com intensidade luminosa de 42,0 μmol fótons · m⁻² · s⁻¹ (3,5 klux).

Matsudo (2006) estudou o emprego do processo descontínuo alimentado repetitivo no cultivo de *S. platensis* utilizando uréia como fonte de nitrogênio, com o objetivo de redução de custos de produção e aumento de produtividade. Concluiu que uma fração de corte de cerca de 80 %, associada a um tempo de alimentação de seis dias, leva a melhores condições de cultivo com bons resultados em todos os parâmetros analisados (concentração celular máxima, produtividade e fator de conversão de nitrogênio em células), resultados estes reprodutíveis ao longo de três ciclos. Avaliou, por último, os teores de proteínas e lipídios da biomassa recuperada, e observou que nenhuma das condições de processo estudadas alterou o conteúdo da biomassa da cianobactéria.

Carvalho *et al.* (2004), através do emprego do processo descontínuo alimentado, conseguiram bons resultados utilizando cloreto de amônio como fonte de nitrogênio no cultivo de *S. platensis*, com fatores de conversão de nitrogênio em células até três vezes superiores em relação a aqueles aonde foi utilizado nitrato de potássio como fonte de nitrogênio, com produtividades em células e concentrações celulares máximas equivalentes. No entanto, inicialmente, assim como Danesi *et al.* (2002), que trabalharam com uréia como fonte de nitrogênio, verificaram que os cultivos com nitrato de potássio apresentaram maiores velocidades de crescimento. Isso ocorreu provavelmente devido às menores taxas iniciais de adição de cloreto de amônio no cultivo, e à menor demanda associada às mais baixas concentrações celulares. A adição de maiores quantidades de fontes como cloreto de amônio e uréia no início dos cultivos somente levou a um aumento da perda de amônia por volatilização

(DANESI *et al.*, 2002), devido ao pH alcalino do meio de cultura, ou levou até mesmo à inibição do crescimento celular decorrente das altas concentrações de amônia (CARVALHO *et al.*, 2004; SOLETTTO *et al.*, 2005).

Bezerra (2006) estudou a influência do tempo de alimentação e da intensidade luminosa no crescimento de *S. platensis* e no teor de proteínas e lipídios da biomassa final, utilizando cloreto de amônio como fonte de nitrogênio. Observou que baixas intensidades luminosas promoveram o crescimento de biomassa rica em lipídios e proteínas, enquanto altas intensidades luminosas e longos períodos de alimentação favoreceram a concentração celular. A concentração celular máxima pode ser obtida com tempo de alimentação de 17,2 dias e intensidade luminosa de $156 \mu\text{mol f\acute{o}tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (13 klux).

Sassano *et al.* (2007) estudaram a influência da taxa de diluição do processo contínuo no crescimento de *S. platensis*, cultivada em duas condições de concentração de cloreto de amônio (1,0 e 10,0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$). Determinaram que o processo contínuo é uma alternativa viável para produção da cianobactéria quando do uso de cloreto de amônio como fonte de nitrogênio, devido aos altos valores de produtividade celular obtidos, superiores estes àqueles obtidos em tanques abertos com processo descontínuo alimentado e com a utilização de amônia ou uréia.

3 OBJETIVO

Este trabalho teve como principal objetivo verificar o efeito da adição de nitrato de potássio em cultivos de *Spirulina (Arthrospira) platensis* realizados com cloreto de amônio. Foram verificadas várias proporções entre as concentrações iniciais de nitrato de potássio e concentrações totais de cloreto de amônio, utilizando planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta. As variáveis dependentes foram: concentração celular máxima, produtividade em células e fator de conversão de nitrogênio em células, bem como os teores de clorofila, lipídios e proteínas na biomassa obtida.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado para a realização dos cultivos foi *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* UTEX1926 (FIG. 01), proveniente da UTEX (*The Culture Collection of Algae of the University of Texas at Austin* – US).

Esta cianobactéria foi mantida em meio de cultura líquido padrão (PAOLETTI; PUSHPARAJ; TOMASELLI FEROCI, 1975), de maneira asséptica, em temperatura ambiente e sem agitação.

Figura 01. *Spirulina platensis* UTEX1926 (FONTE: UTEX, 2006)

4.2 Meios de cultura

Foram utilizados dois tipos de meio de cultura líquido: um meio padrão (TAB. 04), contendo nitrato de potássio como fonte de nitrogênio (PAOLETTI; PUSHPARAJ; TOMASELLI FEROCI, 1975), e este mesmo meio, porém preparado sem a adição de tal fonte, denominado meio modificado.

Tabela 04 – Composição do meio de cultura mineral Paoletti

Reagente Químico	Concentração
A. Meio de cultura mineral	(g · L ⁻¹)
KNO ₃	2,57
K ₂ HPO ₄	0,500
NaCl	0,920
NaHCO ₃	15,2
Na ₂ CO ₃	8,89
Na ₂ SO ₄	1,88
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,0500
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,250
B. Solução de Fe-EDTA ¹	(g · L ⁻¹)
EDTA-Na ₂	29,8
FeSO ₄ · 7H ₂ O	24,9
C. Solução de microelementos ¹	(mg · L ⁻¹)
BaCl ₂ · 2H ₂ O	2846
CoCl ₂ · 6H ₂ O	194,0
MnCl ₂ · 4H ₂ O	173,0
SeCl ₂ · 2H ₂ O	146,0
SnCl ₂ · 2H ₂ O	304,0
LiCl	293,0
CuSO ₄ · 5H ₂ O	186,0
NiSO ₄ · 5H ₂ O	717,0
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	121,0

Fonte: Paoletti; Pushparaj; Tomaselli Feroci, 1975.

¹ São adicionados 1 mL da solução de microelementos e 1 mL da solução de Fe-EDTA para cada litro de meio de cultura mineral preparado.

O meio de cultura padrão foi utilizado para a manutenção do microrganismo, enquanto que o meio de cultura modificado foi utilizado para o preparo do inóculo e conseqüente

realização de todos os cultivos deste trabalho. As fontes de nitrogênio foram adicionadas posteriormente, em suas respectivas concentrações (ITEM 4.5) – todo o nitrato de potássio no instante inicial de cultivo, e o cloreto de amônio conforme o plano de alimentação, quando do uso de tais fontes.

O valor de pH inicial de ambos os meios de cultura foi de $9,5 \pm 0,2$, e após o preparo, estes foram armazenados em temperatura ambiente, por não mais que sete dias.

4.3 Inóculo

Uma parte da cultura de *S. platensis* mantida no laboratório foi transferida, sob condições assépticas, para um tubo de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura líquido padrão (PAOLETTI; PUSHPARAJ; TOMASELLI FEROCI, 1975). Após quinze dias, a suspensão foi transferida para frascos *Erlenmeyer* de 500 mL, contendo 200 mL do mesmo meio de cultura previamente utilizado. Estes frascos foram mantidos em frequência de agitação de 100 rpm, temperatura de 30 ± 1 °C (VONSHAK, 1997b) e intensidade luminosa de $72,0 \mu\text{mol fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (CARVALHO *et al.*, 2004) por cerca de seis a oito dias, durante os quais o crescimento, caracteristicamente exponencial (PELIZER *et al.*, 2003), foi acompanhado.

A suspensão resultante de *S. platensis* foi filtrada, lavada com solução fisiológica para retirada do nitrato de potássio, e ressuspensa em meio de cultura modificado. Esta suspensão, contendo células em crescimento em fase exponencial, serviu de inóculo para todos os cultivos deste trabalho, de tal forma que a concentração celular inicial de cada cultivo foi de $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (PELIZER *et al.*, 2003).

4.4 Dispositivo de cultura

Dentre os inúmeros sistemas de algacultura descritos na literatura, foi adotado o mini-tanque aberto de forma alongada (BELAY, 1997), devido a sua semelhança com os dispositivos industriais já existentes utilizados na produção de *S. platensis*.

O mini-tanque, com capacidade para cinco litros de cultura, foi construído com lâminas de cloreto de polivinila (PVC) de cor branca; a movimentação da cultura, necessária para a homogeneização, foi executada por pás rotativas com frequência de 18 rpm (FIG. 02).

Figura 02. Cultivo de *S. platensis* em mini-tanque

Acima do dispositivo foi instalado um sistema de iluminação, constituído de uma série de lâmpadas fluorescentes fixas em um suporte móvel. Esse sistema possibilitou o acerto da intensidade luminosa através do controle do número de lâmpadas em funcionamento e da distância entre estas e o dispositivo de cultura.

4.5 Experimentos realizados

Foram realizados os seguintes experimentos: cultivos experimentais E_1 a E_8 , obtidos por planejamento experimental, nos quais diversas quantidades de cloreto de amônio e nitrato de potássio por unidade de volume de reator foram utilizadas simultaneamente, bem como os cultivos experimentais E_9 a E_{14} , correspondentes ao ponto central; cultivos de ótimo O_1 a O_5 , correspondentes ao ponto de ótimo referente à concentração celular máxima (X_m); e cultivos de referência para cloreto de amônio (R_{A1} e R_{A2}) e para nitrato de potássio (R_{N1} e R_{N2}), nos

quais foram utilizadas, respectivamente, quantidades consideradas padrão de cloreto de amônio (CARVALHO *et al.*, 2004) e nitrato de potássio (PAOLETTI; PUSHPARAJ; TOMASELLI FEROCI, 1975) por unidade de volume de reator (TAB. 05).

Tabela 05 – Valores codificados e reais para as fontes de nitrogênio KNO_3 e NH_4Cl (variáveis do planejamento experimental), referentes aos experimentos realizados

Experimentos	Valores codificados		Valores reais ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	
	X_1	X_2	m_{T1}	m_{T2}
A. Cultivos do planejamento experimental				
E_1	-1,000	-1,000	8,00	8,00
E_2	+1,000	+1,000	22,0	8,00
E_3	-1,000	+1,000	8,00	22,0
E_4	+1,000	-1,000	22,0	22,0
E_5	0	-1,414	15,0	5,10
E_6	-1,414	0	5,10	15,0
E_7	0	+1,414	15,0	24,9
E_8	+1,414	0	24,9	15,0
E_9 a E_{14}	0	0	15,0	15,0
C. Cultivos do ponto ótimo referente à concentração celular				
O_1 a O_5	+0,05966	-0,1323	15,4	14,1
D. Cultivos de referência ¹				
R_{A1} e R_{A2}	-	-	-	21,5
R_{N1} e R_{N2}	-	-	25,4	-

X_1 , valores codificados conforme o planejamento experimental referentes ao nitrato de potássio; X_2 , valores codificados conforme o planejamento experimental referentes ao cloreto de amônio; m_{T1} , quantidade total adicionada de nitrato de potássio por unidade de volume de reator; m_{T2} , quantidade total adicionada de cloreto de amônio por unidade de volume de reator.

¹ Os cultivos de referência não apresentam valores codificados devido ao fato de não terem tido suas quantidades de matéria (fonte de nitrogênio) determinadas por planejamento experimental.

O planejamento experimental utilizado foi de modelo fatorial 2^2 , acrescido dos pontos centrais, mais configuração estrela (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). Tal planejamento, de composição central, é baseado na realização de quatro experimentos nos níveis clássicos do planejamento fatorial 2^n (valores codificados $\pm 1,000$), e mais quatro experimentos com rotação de 45° (valores codificados $\pm \sqrt{2}$) – experimentos estes que, quando dispostos sobre os anteriores, apresentam configuração de uma estrela (GRÁF. 01).

Gráfico 01. Valores codificados do planejamento experimental (X_1 , KNO_3 ; X_2 , NH_4Cl) referentes aos cultivos experimentais (E_1 a E_{14})

O expoente “n” é determinado pelo número de fatores considerados no planejamento, e foi representado neste trabalho pela quantidade inicial de nitrato de potássio e pela quantidade total de cloreto de amônio, ambas por unidade de volume de reator. Seis repetições do ponto central foram realizadas, a fim de determinar a variabilidade

experimental. O ponto ótimo foi obtido a partir da diferenciação do modelo matemático de X_m em função das variáveis independentes codificadas avaliadas (ITEM 6.3.1).

Os valores codificados do planejamento experimental fatorial apresentam relação proporcional aos valores reais de ambos os fatores considerados (quantidades das fontes de nitrogênio). Cada unidade de valor codificado corresponde ao valor real de $7,00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de fonte de nitrogênio; o ponto central é representado por $15,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de tal fonte, e a faixa estudada foi baseada em trabalhos anteriores (PAOLETTI; PUSHPARAJ; TOMASELLI FEROCI, 1975; CARVALHO *et al.*, 2004).

O processo descontínuo alimentado foi escolhido para o desenvolvimento de todos os cultivos realizados com a presença de cloreto de amônio (cultivos experimentais, cultivos de ótimo e cultivos de referência para cloreto de amônio), uma vez que tal fonte é potencialmente tóxica ao microrganismo quando em altas concentrações. A vazão de alimentação desta foi de característica exponencial crescente (EQ. 01; CARVALHO *et al.*, 2004).

$$m_{T2} = m_0 \cdot e^{k \cdot t} \quad (\text{equação 01}),$$

onde “ m_{T2} ” é a quantidade de cloreto de amônio adicionada por unidade de volume do reator até o instante “ t ” ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), “ m_0 ” é a quantidade inicial desta fonte de nitrogênio adicionada por unidade de volume do reator ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), “ k ” é a constante que determina o perfil de alimentação do sistema, e “ t ” é o instante de adição da fonte de nitrogênio (d).

Os valores de “ m_0 ” foram fixados em $1,70 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (CARVALHO *et al.*, 2004), e o tempo total de alimentação de cloreto de amônio (T) foi de 17 dias (BEZERRA, 2006). A adição de nitrato de potássio, fonte esta presente em todos os cultivos realizados, foi única, no instante inicial, e dessa forma os cultivos de referência para nitrato de potássio foram caracterizados pelo processo descontínuo.

Na Tabela 06 estão expressas as quantidades acumuladas de cloreto de amônio conforme a adição desta fonte ao longo do tempo de cultivo, junto aos valores da constante “ k ” do perfil de alimentação do sistema, para cada valor real de quantidade de cloreto de amônio utilizado nos cultivos.

Tabela 06 – Somatória das adições de cloreto de amônio e valor de k para cada valor real desta fonte de nitrogênio utilizado nos cultivos

Tempo	Quantidade total de NH_4Cl adicionado ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)						
(d) / k	5,10	8,00	14,1	15,0	21,5	22,0	24,9
0	1,70	1,70	1,70	1,70	1,70	1,70	1,70
1	1,81	1,86	1,92	1,93	1,97	1,98	1,99
2	1,94	2,04	2,18	2,20	2,29	2,30	2,33
3	2,06	2,23	2,47	2,50	2,66	2,67	2,73
4	2,20	2,45	2,80	2,84	3,09	3,10	3,20
5	2,35	2,68	3,17	3,22	3,59	3,61	3,74
6	2,50	2,94	3,59	3,67	4,16	4,20	4,38
7	2,67	3,22	4,06	4,17	4,83	4,88	5,13
8	2,85	3,52	4,60	4,74	5,61	5,67	6,01
9	3,04	3,86	5,21	5,38	6,51	6,59	7,04
10	3,24	4,29	5,90	6,12	7,56	7,67	8,24
11	3,46	4,63	6,68	6,96	8,78	8,91	9,66
12	3,69	5,08	7,57	7,91	10,2	10,4	11,3
13	3,94	5,56	8,57	8,99	11,8	12,0	13,2
14	4,20	6,09	9,71	10,2	13,7	14,0	15,5
15	4,48	6,67	11,0	11,6	16,0	16,3	18,2
16	4,78	7,30	12,4	13,2	18,5	18,9	21,3
17	5,10	8,00	14,1	15,0	21,5	22,0	24,9
k	0,064624	0,091106	0,12444	0,12808	0,14926	0,15061	0,15789

5,10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (cultivo E_5); 8,00 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (cultivos E_1 e E_2); 14,1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (cultivos O_1 a O_5); 15,0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (cultivos E_6 e E_8 , e cultivos E_9 a E_{14}); 21,5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (cultivos R_{A1} e R_{A2}); 22,0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (cultivos E_3 e E_4); 24,9 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (cultivo E_7).

4.6 Técnicas analíticas

4.6.1 Acompanhamento do cultivo

4.6.1.1 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada por turbidimetria, conforme descrito por Leduy e Therien (1977). Foram utilizadas amostras de 5 mL de meio contendo células, retiradas após a homogeneização dos tanques. Essas amostras, diluídas quando necessário, foram analisadas em espectrofotômetro (FEMTO 700 PL_μS), em comprimento de onda de 560 nm.

Para obtenção dos resultados foi construída uma curva de calibração (ITEM 4.7.1) que correlaciona o logaritmo da transmitância com um determinado valor de concentração celular, em miligramas por litro.

4.6.1.2 Determinação da concentração de amônia total

A concentração de amônia total foi determinada por potenciometria, conforme descrito por Carvalho *et al.* (2004), através de potenciômetro (ORION 710A) e de eletrodo seletivo para amônia (95-12 ORION). O volume de amostra utilizado foi de 15 mL de meio isento de células.

Foi necessária a alcalinização prévia das amostras, e para tal foi utilizada solução de NaOH 1,5 N, em quantidade suficiente para o aumento do valor do pH das amostras para cerca de 13,0. Em tal valor de potencial hidrogeniônico, a forma amoniacal se apresenta totalmente como amônia, conforme o equilíbrio químico: $\text{NH}_4^+ + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$. A conversão de íons amônio em amônia é essencial, uma vez que a membrana do eletrodo é permeável apenas a esta última.

Para obtenção dos resultados foram construídas curvas de calibração (ITEM 4.7.2) que correlacionam o logaritmo da concentração de amônia com um determinado valor de tensão de corrente elétrica, em milivolts.

4.6.1.3 Determinação da concentração de nitrato

A concentração de nitrato foi determinada conforme a metodologia descrita por trabalho anterior (RODRIGUES *et al.*, 2006), que por sua vez foi baseado em Vogel (2002), metodologia esta que inclui passagens de redução, destilação e titulação. Foram utilizados 10 mL de meio isento de células para a análise.

Os íons nitrato presentes na amostra foram reduzidos à amônia em consequência da presença dos metais da liga de Devarda (50 % cobre, 45 % alumínio e 5 % zinco) em meio alcalino forte, provido este último por solução de NaOH 0,50 N. A seguinte equação química ilustra essa redução: $3 \text{NO}_3^- + 8 \text{Al} + 5 \text{OH}^- + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 8 \text{AlO}_2^- + 3 \text{NH}_3$.

A destilação permite a captura da amônia formada em solução padronizada de HCl 0,20 N, e a quantificação da amônia é feita através da titulação do excesso de ácido com solução padronizada de NaOH 0,20 N, na presença de indicador vermelho de metila. A conversão de volume de ácido titulado (mililitros) em massa de íons nitrato (gramas) foi baseada na informação de que 1 mL de ácido clorídrico 1,00 N corresponde a 0,06201 g de íons nitrato (VOGEL, 2002). Do resultado final é exclusiva a quantidade de amônia detectada no dia pela metodologia anterior (ITEM 4.6.1.2).

4.6.1.4 Determinação da concentração de carbonato total

A concentração de carbonato foi determinada por titulometria, conforme descrito por Pierce e Haenisch (1948). Foram utilizados 10 mL de meio isento de células para a análise.

Às amostras foi adicionado NaOH 1,5 N, pois na presença de base ocorre a conversão dos íons hidrogenocarbonato em íons carbonato (EQ. 02). A solução foi titulada com HCl 0,50 N na presença de indicador fenolftaleína; em meio ácido, a conversão é inversa – os íons carbonato são convertidos em íons hidrogenocarbonato (EQ. 03). Uma segunda titulação foi

realizada então, utilizando a mesma solução ácida, porém na presença de indicador alaranjado de metila; em meio ácido em excesso, os íons hidrogenocarbonato formados acabam por ser convertidos em ácido carbônico, por reação de deslocamento de equilíbrio (EQ. 04).

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

4.6.1.5 Determinação do pH

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

4.6.2 *Avaliação da biomassa obtida*

4.6.2.1 Determinação da concentração de clorofila

A análise de clorofila foi realizada por espectrofotometria, conforme a metodologia descrita por Vonshak (1997a), na amostra correspondente à máxima concentração celular obtida. O volume de amostra utilizado para análise foi de 5 mL de meio contendo células.

As células foram extraídas das amostras líquidas retiradas dos tanques através de filtração a vácuo, e submetidas a processo de extração do pigmento com metanol, a 70 °C, e

filtração com membranas de politetrafluoretileno com porosidade de 1,0 μm (MILLIPORE). Diluições alcoólicas das soluções resultantes foram preparadas e submetidas à leitura de absorbância em espectrofotômetro (FEMTO 700 PL μ S), em comprimento de onda de 665 nm.

Para obtenção dos resultados foi construída uma curva de calibração (ITEM 4.7.3) que correlaciona os valores de absorbância com um determinado valor de concentração de clorofila, em miligramas por litro.

4.6.2.2 Determinação do teor de lipídios

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

4.6.2.3 Determinação do teor de proteínas

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

4.7 Curvas de calibração

4.7.1 Para determinação da concentração celular

A determinação da concentração celular ao longo dos cultivos foi realizada através de uma curva de calibração que correlaciona o logaritmo da transmitância com um valor de concentração celular, em miligramas por litro. A curva de calibração obtida pode ser observada no Gráfico 02, junto à equação utilizada para os cálculos de concentração celular.

Gráfico 02. Curva de calibração para determinação da concentração celular de suspensões de *S. platensis*

Para construção da curva de calibração, foram realizadas diversas diluições de uma suspensão de *S. platensis*, proveniente de um cultivo em mini-tanque com meio de cultura padrão Paoletti (ITEM 4.2). Alíquotas dessas diluições foram retiradas para leitura de transmitância em comprimento de onda de 560 nm, utilizando cubeta de caminho óptico de 1 cm. O valor da concentração celular da suspensão mãe utilizada no procedimento foi determinado por biomassa seca, a fim de validar os resultados obtidos em espectrofotômetro (FEMTO 700 PL_μS). Nesta primeira metodologia, são filtrados e lavados com água destilada 25 mL da suspensão mãe de células em fase de crescimento exponencial, com a utilização de

uma membrana de acetato de celulose de porosidade de 1,2 μm . Esta membrana foi previamente seca a 70 °C por 12 horas, e a 100 °C por cinco horas posteriormente à filtração da referida suspensão, tempo suficiente para obtenção de massa constante. A massa de células foi determinada com base na diferença de massa das membranas, antes e depois da filtração.

4.7.2 Para determinação da concentração de amônia total

A determinação da concentração de amônia total ao longo dos cultivos foi realizada através de uma série de curvas de calibração que correlacionam o logaritmo da concentração de amônia com um determinado valor de tensão de corrente elétrica, em milivolts. Segue-se um exemplo de curva de calibração obtida, no Gráfico 03, com a equação correspondente a mostra. Neste caso específico, a maior diluição, 1,00E-06 M (cujo valor de log é igual a -6,0) apresentou uma leitura de 197,4 mV no eletrodo seletivo de amônia.

Gráfico 03. Curva de calibração para determinação da concentração de amônia total em amostras isentas de células de *S. platensis*

Foram desenvolvidas curvas de calibração a cada dia de análise, como recomendado pelo fabricante do potenciômetro (ORION 710A). Estas foram construídas através de leituras da tensão de corrente elétrica de soluções de cloreto de amônio de diversas concentrações,

após alcalinização, procedimento este semelhante a aquele de determinação experimental descrito anteriormente (ITEM 4.6.1.2).

4.7.3 Para determinação da concentração de clorofila

A determinação da concentração de clorofila no dia de cultivo correspondente ao maior valor de concentração celular foi realizada através de uma curva de calibração que correlaciona a transmitância com um determinado valor de concentração de clorofila, em miligramas por litro. A curva de calibração obtida, bem como a equação de reta utilizada para os cálculos da concentração de clorofila, podem ser observadas no Gráfico 04.

Gráfico 04. Curva de calibração para determinação da concentração de clorofila em amostras de células de *S. platensis*

Para construção da curva de calibração, foi utilizada uma solução mãe de clorofila padrão (SIGMA) em metanol, de concentração conhecida, e a partir desta foram realizadas diversas diluições que resultaram em leituras em espectrofotômetro (FEMTO 700 PLμS), em comprimento de onda de 665 nm, de valores de absorbância entre 0,200 e 0,800.

4.8 Análise dos resultados

Com os valores de concentração celular máxima obtidos nos cultivos foram calculados alguns parâmetros, como produtividade em células e fator de conversão de nitrogênio em células, e realizadas análises estatísticas. Verificou-se a influência dos fatores estudados (quantidade das fontes de nitrogênio por unidade de volume de reator, em seus níveis codificados) através de regressão multivariável, obtendo-se equações polinomiais que permitiram a avaliação simultânea das variáveis, com detecção de possíveis interações entre estas. Os cultivos de referência, tanto para nitrato de potássio quanto para cloreto de amônio, foram excluídos desta análise estatística, pois apresentam apenas o intuito comparativo.

Realizou-se também uma avaliação das curvas de crescimento celular e consumo de nutrientes de todos os cultivos. Outros dados coletados, tais como teores de proteínas, lipídios e clorofila, foram analisados e comparados com as informações disponíveis na literatura, a fim de avaliar também o conteúdo da biomassa formada, e possíveis influências exercidas nesta pelas fontes de nitrogênio.

4.8.1 Cálculo de parâmetros

Os valores de X_m , em miligramas por litro, correspondem aos valores de concentração celular máxima dos cultivos.

Os valores de P_X , em miligramas por litro por dia, representam a média de crescimento celular diária, e foram determinados com base na concentração total de células formadas e no tempo total de cultivo (EQ. 05).

Os valores de $Y_{X/N}$, em miligramas de células por miligrama de nitrogênio, representam quanto do nitrogênio provido aos cultivos (independente da fonte – nitrato de potássio ou cloreto de amônio) foi convertido em células, e foram determinados com base na massa total de células formadas e massa total de nitrogênio adicionada (EQ. 06).

$$P_X = (X_m - X_i) / T_C \quad (\text{equação 05}),$$

$$Y_{X/N} = [(X_m - X_i) \cdot V] / N_T \quad (\text{equação 06}),$$

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

4.8.2 Análise estatística

Os parâmetros X_m , P_X e $Y_{X/N}$ dos cultivos realizados com o uso simultâneo de cloreto de amônio e nitrato de potássio, correspondentes ao planejamento experimental aplicado (cultivos E_1 a E_{14}), foram avaliados por regressão multivariável, com o objetivo de facilitar a compreensão da influência das variáveis independentes em estudo (quantidade inicial de nitrato de potássio e quantidade total de cloreto de amônio adicionada, em seus níveis codificados) nas respostas de interesse (variáveis dependentes).

Para a análise estatística, foram testados modelos quadráticos e lineares. Junto às análises que foram realizadas, encontram-se os chamados níveis descritivos (p), que indicam os erros. Na análise de regressão, os valores de p indicam o menor erro em que se incorre ao afirmar que um determinado coeficiente tem influência na determinação do parâmetro estimado. Em outras palavras, testando o coeficiente correspondente a uma variável independente é possível verificar se esta tem importância na determinação do parâmetro estimado. Na análise de variância da regressão, por sua vez, o valor de p indica se houve um bom ajuste da equação obtida através da regressão, ou seja, se a regressão realizada foi satisfatória (FERNANDES, 1998). Para os testes dos coeficientes associados aos fatores, foi considerado $p < 0,15$ (ECHEGARAY *et al.*, 2000; RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004) desde que a inclusão do respectivo coeficiente melhorasse o modelo matemático obtido, enquanto que as regressões foram aceitas somente se a análise de variância da regressão apresentou um valor de p inferior a 0,050.

4.9 Descrição de um experimento

Foram fixadas as seguintes condições experimentais: frequência de rotação das pás rotativas, 18 rpm; volume de líquido nos mini-tanques, 5 L; temperatura, 30 ± 1 °C – mantida

por meio de termostatos eletrônicos de 50 W (ARISTOS); intensidade luminosa, $156 \mu\text{mol f\acute{o}tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (BEZERRA, 2006) – mensurada por luxímetro (LI-COR 250A).

O inóculo (ITEM 4.3) de *S. platensis* (ITEM 4.1) foi adicionado ao mini-tanque (ITEM 4.4), junto a cerca de dois a três litros de meio de cultura modificado (ITEM 4.2), considerando como exemplo a execução de um dos diversos cultivos experimentais realizados. Foram adicionadas então uma solução concentrada de nitrato de potássio de molaridade total pré-determinada (ITEM 4.5) e uma solução de cloreto de amônio de $1,70 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. O volume do mini-tanque foi, por fim, acertado para cinco litros com adição de meio de cultura modificado, de tal forma que a concentração celular inicial atingisse a concentração de $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (ITEM 4.3).

Durante cerca de dezenove dias foram acompanhados os diversos parâmetros avaliados neste trabalho, conforme as técnicas analíticas já descritas (ITENS 4.6.1 e 4.6.2.1). Todos os dias, por dezessete dias, adicionaram-se soluções de cloreto de amônio em concentrações pré-determinadas (ITEM 4.5), e o volume dos mini-tanques, variável em decorrência de evaporação, foi acertado para cinco litros através da adição de água destilada – sempre antes da retirada de amostras.

Ao final do cultivo, caracterizado este pela estabilização do crescimento celular, a suspensão de *S. platensis* foi retirada em quase toda sua totalidade e centrifugada, com três lavagens sucessivas com água destilada, necessárias para a retirada do sal adsorvido às células. Após a secagem com ventilação a $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 horas (PELIZER *et al.*, 1999), a massa de cianobactérias foi triturada, e seguiu para as análises finais (ITENS 4.6.2.2 e 4.6.2.3).

5 RESULTADOS

A seguir, são dispostos em tabelas os resultados de concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia coletados para cada experimento realizado, na ordem: cultivos experimentais E_1 a E_8 (TAB. 07-14), cultivos de ponto central E_9 a E_{14} (TAB. 15-20), cultivos de ótimo O_1 a O_5 (TAB. 21-25), cultivos de referência para cloreto de amônio R_{A1} e R_{A2} (TAB. 26-27), e cultivos de referência para nitrato de potássio R_{N1} e R_{N2} (TAB. 28-29). No Apêndice podem ser encontrados gráficos individuais para cada cultivo realizado, referentes às mesmas análises.

São dispostos também os resultados referentes às análises de teores de clorofila, lipídios e proteínas (TAB. 30), além dos valores dos parâmetros concentração celular máxima, produtividade em células, e fator de conversão de nitrogênio em células (TAB. 31).

As determinações de concentração celular e pH foram feitas diariamente, enquanto que as medidas de concentração das fontes de nitrogênio e de carbonato total, em função dos relativos grandes volumes necessários para a execução das técnicas, foram realizadas a cada dois dias. As análises de clorofila foram realizadas nos últimos dias de cultivo, e os valores considerados foram aqueles correspondentes à máxima concentração celular obtida. Os teores de proteínas e lipídios foram determinados nas amostras de biomassa seca.

Tabela 07 – Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E₁ (KNO₃, 8,00 mmol · L⁻¹; NH₄Cl, 8,00 mmol · L⁻¹)

Tempo (d)	Células (mg · L ⁻¹)	pH	Carbonato (g · L ⁻¹)	Nitrato (g · L ⁻¹)	Amônia (mol · L ⁻¹)
0	49,96	9,54	15,85	0,50	-
1	182,5	9,65	-	-	-
2	381,9	9,80	13,11	0,37	1,46E-04
3	727,6	10,0	-	-	-
4	1013	10,1	11,24	0,34	6,06E-05
5	1326	10,3	-	-	-
6	1610	10,4	10,30	0,28	*
7	1965	10,5	-	-	-
8	2278	10,7	9,992	0,21	4,61E-04
9	2489	10,8	-	-	-
10	2678	10,9	9,679	0,21	1,44E-05
11	2778	10,9	-	-	-
12	2899	11,0	9,367	0,19	3,54E-04
13	3003	10,9	-	-	-
14	3104	11,0	8,118	0,16	2,86E-03
15	3175	10,8	-	-	-
16	3246	10,8	7,806	0,13	4,57E-04
17	3298	10,7	-	-	-
18	3363	10,7	6,869	0,10	6,73E-05
19	3038	10,7	-	-	-

“-”, amostras não analisadas; “*”, resultados abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada.

Tabela 08 – Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E₂ (KNO₃, 22,0 mmol · L⁻¹; NH₄Cl, 8,00 mmol · L⁻¹)

Tempo (d)	Células (mg · L ⁻¹)	pH	Carbonato (g · L ⁻¹)	Nitrato (g · L ⁻¹)	Amônia (mol · L ⁻¹)
0	50,26	9,63	15,85	1,4	-
1	166,5	9,84	-	-	-
2	390,8	9,94	15,50	1,3	8,09E-05
3	683,2	10,1	-	-	-
4	983,4	10,2	14,44	1,1	*
5	1253	10,4	-	-	-
6	1630	10,5	13,37	1,0	*
7	2009	10,5	-	-	-
8	2396	10,6	11,83	0,69	*
9	2665	10,7	-	-	-
10	2850	10,6	10,61	0,44	3,77E-06
11	3247	10,7	-	-	-
12	3524	10,7	9,925	0,41	4,25E-04
13	3778	10,6	-	-	-
14	3882	10,6	8,778	0,38	3,96E-03
15	4030	10,6	-	-	-
16	4004	10,6	8,012	0,34	6,34E-06
17	4146	10,6	-	-	-
18	4106	10,6	7,631	0,28	1,07E-05
19	3526	10,7	-	-	-

“-”, amostras não analisadas; “*”, resultados abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada.

Tabela 09 – Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E₃ (KNO₃, 8,00 mmol · L⁻¹; NH₄Cl, 22,0 mmol · L⁻¹)

Tempo (d)	Células (mg · L ⁻¹)	pH	Carbonato (g · L ⁻¹)	Nitrato (g · L ⁻¹)	Amônia (mol · L ⁻¹)
0	50,26	9,63	15,85	0,50	-
1	198,3	9,88	-	-	-
2	341,3	9,91	13,59	0,49	6,03E-05
3	681,9	10,1	-	-	-
4	1078	10,2	13,16	0,37	*
5	1309	10,4	-	-	-
6	1512	10,5	11,04	0,28	*
7	1827	10,5	-	-	-
8	1915	10,6	11,06	0,19	*
9	2159	10,7	-	-	-
10	2368	10,7	10,40	0,16	4,14E-06
11	2702	10,6	-	-	-
12	3232	10,5	10,30	0,13	*
13	3522	10,5	-	-	-
14	3677	10,4	9,929	0,12	2,38E-03
15	3727	10,5	-	-	-
16	3964	10,4	9,167	0,091	5,69E-06
17	4004	10,5	-	-	-
18	3744	10,5	8,771	0,036	3,32E-06

“-”, amostras não analisadas; “*”, resultados abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada.

Tabela 10 – Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E₄ (KNO₃, 22,0 mmol · L⁻¹; NH₄Cl, 22,0 mmol · L⁻¹)

Tempo (d)	Células (mg · L ⁻¹)	pH	Carbonato (g · L ⁻¹)	Nitrato (g · L ⁻¹)	Amônia (mol · L ⁻¹)
0	50,26	9,63	15,85	1,4	-
1	195,4	9,85	-	-	-
2	359,8	9,94	12,74	1,3	7,97E-05
3	629,4	10,1	-	-	-
4	959,1	10,2	12,52	1,1	*
5	1215	10,4	-	-	-
6	1640	10,4	12,10	1,0	*
7	1798	10,5	-	-	-
8	2000	10,5	11,44	0,82	*
9	2285	10,6	-	-	-
10	2567	10,6	10,40	0,63	4,24E-06
11	2765	10,6	-	-	-
12	2833	10,6	10,30	0,60	4,64E-03
13	2760	10,5	-	-	-
14	3042	10,5	9,928	0,56	3,69E-03
15	3007	10,4	-	-	-
16	3084	10,4	9,543	0,53	4,55E-04
17	3096	10,4	-	-	-
18	2718	10,4	9,545	0,50	3,44E-06

“-”, amostras não analisadas; “*”, resultados abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada.

Tabela 11 – Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E₅ (KNO₃, 15,0 mmol · L⁻¹; NH₄Cl, 5,10 mmol · L⁻¹)

Tempo (d)	Células (mg · L ⁻¹)	pH	Carbonato (g · L ⁻¹)	Nitrato (g · L ⁻¹)	Amônia (mol · L ⁻¹)
0	49,96	9,54	15,85	0,93	-
1	183,2	9,74	-	-	-
2	382,2	9,82	13,43	0,82	2,72E-04
3	728,6	10,0	-	-	-
4	1013	10,1	12,49	0,79	6,34E-05
5	1326	10,3	-	-	-
6	1610	10,4	10,30	0,75	*
7	1965	10,5	-	-	-
8	2278	10,6	9,991	0,72	9,43E-04
9	2489	10,7	-	-	-
10	2678	10,7	9,685	0,43	2,27E-05
11	2778	10,8	-	-	-
12	2899	10,8	9,376	0,31	1,95E-03
13	3003	10,8	-	-	-
14	3104	10,9	9,058	0,28	4,69E-03
15	3175	10,8	-	-	-
16	3246	10,9	8,747	0,25	2,84E-04
17	3298	10,9	-	-	-
18	3363	10,8	6,563	0,22	3,12E-05
19	3038	10,9	-	-	-

“-”, amostras não analisadas; “*”, resultados abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada.

Tabela 12 – Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E₆ (KNO₃, 5,10 mmol · L⁻¹; NH₄Cl, 15,0 mmol · L⁻¹)

Tempo (d)	Células (mg · L ⁻¹)	pH	Carbonato (g · L ⁻¹)	Nitrato (g · L ⁻¹)	Amônia (mol · L ⁻¹)
0	49,96	9,54	15,85	0,32	-
1	220,1	9,72	-	-	-
2	441,1	9,88	13,74	0,31	1,12E-04
3	489,6	10,0	-	-	-
4	1125	10,1	12,49	0,28	6,72E-05
5	1478	10,3	-	-	-
6	1628	10,4	11,24	0,24	*
7	1803	10,5	-	-	-
8	2240	10,6	10,93	0,21	5,73E-04
9	2647	10,7	-	-	-
10	2722	10,7	9,991	0,19	1,50E-05
11	2884	10,8	-	-	-
12	2953	10,8	9,374	0,16	1,05E-03
13	3120	10,7	-	-	-
14	3206	10,8	9,056	0,13	3,61E-03
15	3254	10,6	-	-	-
16	3387	10,6	8,123	0,10	1,31E-03
17	3481	10,6	-	-	-
18	3506	10,5	8,123	0,075	5,82E-05
19	3179	10,6	-	-	-

“-”, amostras não analisadas; “*”, resultados abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada.

Tabela 13 – Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E₇ (KNO₃, 15,0 mmol · L⁻¹; NH₄Cl, 24,9 mmol · L⁻¹)

Tempo (d)	Células (mg · L ⁻¹)	pH	Carbonato (g · L ⁻¹)	Nitrato (g · L ⁻¹)	Amônia (mol · L ⁻¹)
0	50,26	9,63	15,85	0,93	-
1	158,3	9,81	-	-	-
2	398,6	9,91	13,59	0,88	6,50E-05
3	669,8	10,1	-	-	-
4	1057	10,2	11,46	0,55	*
5	1237	10,4	-	-	-
6	1653	10,5	10,61	0,38	*
7	2081	10,5	-	-	-
8	2258	10,5	10,30	0,35	*
9	2304	10,6	-	-	-
10	2469	10,6	9,554	0,32	3,61E-06
11	2603	10,5	-	-	-
12	2652	10,4	8,393	0,31	*
13	2685	10,4	-	-	-
14	2692	10,4	8,018	0,28	5,64E-03
15	2793	10,4	-	-	-
16	3003	10,4	7,637	0,22	1,69E-05
17	3088	10,4	-	-	-
18	3395	10,4	6,491	0,16	3,02E-06
19	3088	10,5	-	-	-

“-”, amostras não analisadas; “*”, resultados abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada.

Tabela 14 – Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E₈ (KNO₃, 24,9 mmol · L⁻¹; NH₄Cl, 15,0 mmol · L⁻¹)

Tempo (d)	Células (mg · L ⁻¹)	pH	Carbonato (g · L ⁻¹)	Nitrato (g · L ⁻¹)	Amônia (mol · L ⁻¹)
0	49,96	9,54	15,85	1,5	-
1	191,2	9,65	-	-	-
2	463,3	9,80	13,11	1,4	1,12E-04
3	750,0	10,0	-	-	-
4	859,2	10,1	12,80	1,2	3,48E-05
5	1181	10,3	-	-	-
6	1213	10,4	11,24	1,0	*
7	1566	10,5	-	-	-
8	1759	10,6	10,93	0,91	6,93E-04
9	2006	10,6	-	-	-
10	2231	10,7	9,991	0,72	2,94E-05
11	2575	10,8	-	-	-
12	2626	10,8	9,682	0,66	2,14E-03
13	2797	10,7	-	-	-
14	3018	10,8	9,377	0,61	3,27E-03
15	3155	10,7	-	-	-
16	3234	10,8	9,050	0,58	5,06E-04
17	3286	10,7	-	-	-
18	3306	10,7	8,746	0,55	2,90E-05
19	2957	10,8	-	-	-

“-”, amostras não analisadas; “*”, resultados abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada.

Tabela 15 – Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E₉ (KNO₃, 15,0 mmol · L⁻¹; NH₄Cl, 15,0 mmol · L⁻¹)

Tempo (d)	Células (mg · L ⁻¹)	pH	Carbonato (g · L ⁻¹)	Nitrato (g · L ⁻¹)	Amônia (mol · L ⁻¹)
0	50,35	9,51	15,85	0,93	-
1	88,49	9,81	-	-	-
2	147,3	9,89	15,02	0,86	*
3	469,5	10,1	-	-	-
4	675,5	10,2	14,25	0,74	*
5	1045	10,4	-	-	-
6	1186	10,5	13,47	0,62	*
7	1332	10,6	-	-	-
8	1656	10,7	12,43	0,47	*
9	1994	10,8	-	-	-
10	2412	10,8	11,66	0,32	1,41E-04
11	2913	10,9	-	-	-
12	3125	10,9	11,14	0,26	1,65E-06
13	3374	10,9	-	-	-
14	3614	10,9	10,10	0,20	6,05E-05
15	3812	10,8	-	-	-
16	4030	10,8	9,323	0,17	*
17	4128	10,9	-	-	-
18	4313	10,9	9,077	0,14	1,47E-06
19	4008	10,8	-	-	-

“-”, amostras não analisadas; “*”, resultados abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada.

Tabela 16 – Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E₁₀ (KNO₃, 15,0 mmol · L⁻¹; NH₄Cl, 15,0 mmol · L⁻¹)

Tempo (d)	Células (mg · L ⁻¹)	pH	Carbonato (g · L ⁻¹)	Nitrato (g · L ⁻¹)	Amônia (mol · L ⁻¹)
0	50,35	9,51	15,85	0,93	-
1	125,5	9,81	-	-	-
2	214,3	9,89	15,02	0,83	*
3	506,6	10,1	-	-	-
4	728,7	10,3	14,76	0,71	*
5	1011	10,4	-	-	-
6	1357	10,5	14,25	0,59	*
7	1540	10,7	-	-	-
8	1961	10,8	13,21	0,44	*
9	2145	10,9	-	-	-
10	2268	10,9	12,17	0,32	1,40E-05
11	2464	11,0	-	-	-
12	2839	10,9	11,91	0,23	1,22E-06
13	3175	11,0	-	-	-
14	3437	10,9	11,66	0,17	6,16E-05
15	3640	10,9	-	-	-
16	3886	10,9	10,36	0,14	*
17	4030	11,0	-	-	-
18	4369	10,9	9,583	0,082	1,22E-06
19	4119	10,9	-	-	-

“-”, amostras não analisadas; “*”, resultados abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada.

Tabela 17 – Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E₁₁ (KNO₃, 15,0 mmol · L⁻¹; NH₄Cl, 15,0 mmol · L⁻¹)

Tempo (d)	Células (mg · L ⁻¹)	pH	Carbonato (g · L ⁻¹)	Nitrato (g · L ⁻¹)	Amônia (mol · L ⁻¹)
0	50,35	9,51	15,85	0,93	-
1	114,2	9,85	-	-	-
2	223,6	9,95	15,02	0,89	*
3	501,3	10,1	-	-	-
4	638,1	10,3	14,51	0,71	*
5	953,8	10,4	-	-	-
6	1159	10,5	13,73	0,56	*
7	1494	10,6	-	-	-
8	1728	10,7	12,17	0,41	*
9	1926	10,8	-	-	-
10	2289	10,9	11,40	0,26	1,68E-04
11	2442	10,9	-	-	-
12	2969	11,0	10,88	0,20	1,01E-06
13	3456	11,0	-	-	-
14	3770	10,9	10,62	0,14	6,28E-05
15	4018	10,9	-	-	-
16	4254	10,8	9,843	0,11	*
17	4419	10,9	-	-	-
18	4461	10,8	9,584	0,082	1,05E-06
19	4378	10,8	-	-	-

“-”, amostras não analisadas; “*”, resultados abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada.

Tabela 18 – Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E₁₂ (KNO₃, 15,0 mmol · L⁻¹; NH₄Cl, 15,0 mmol · L⁻¹)

Tempo (d)	Células (mg · L ⁻¹)	pH	Carbonato (g · L ⁻¹)	Nitrato (g · L ⁻¹)	Amônia (mol · L ⁻¹)
0	50,35	9,51	15,85	0,93	-
1	119,6	9,86	-	-	-
2	188,1	9,97	14,76	0,86	*
3	497,6	10,1	-	-	-
4	780,8	10,3	14,51	0,80	*
5	986,4	10,4	-	-	-
6	1225	10,5	13,73	0,68	*
7	1586	10,7	-	-	-
8	1822	10,8	13,21	0,47	*
9	2028	10,9	-	-	-
10	2164	11,0	12,43	0,32	7,51E-05
11	2342	11,0	-	-	-
12	2715	11,0	11,14	0,20	1,65E-06
13	3187	10,9	-	-	-
14	3515	10,9	10,88	0,17	6,40E-05
15	3941	10,9	-	-	-
16	4177	10,9	10,36	0,14	*
17	4355	11,0	-	-	-
18	4447	10,9	9,846	0,11	1,27E-06
19	4017	10,9	-	-	-

“-”, amostras não analisadas; “*”, resultados abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada.

Tabela 19 – Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E₁₃ (KNO₃, 15,0 mmol · L⁻¹; NH₄Cl, 15,0 mmol · L⁻¹)

Tempo (d)	Células (mg · L ⁻¹)	pH	Carbonato (g · L ⁻¹)	Nitrato (g · L ⁻¹)	Amônia (mol · L ⁻¹)
0	50,35	9,51	15,85	0,93	-
1	101,2	9,84	-	-	-
2	186,6	9,98	15,02	0,86	*
3	496,7	10,1	-	-	-
4	818,6	10,3	14,76	0,65	*
5	1040	10,4	-	-	-
6	1207	10,5	13,21	0,47	*
7	1436	10,7	-	-	-
8	1674	10,8	12,95	0,35	*
9	1825	10,9	-	-	-
10	1971	10,9	12,69	0,26	1,04E-04
11	2287	10,9	-	-	-
12	2618	10,9	11,66	0,23	*
13	2963	10,9	-	-	-
14	3390	10,8	10,62	0,20	6,52E-05
15	3695	10,8	-	-	-
16	3977	10,8	9,842	0,19	*
17	4213	10,9	-	-	-
18	4522	10,8	9,322	0,082	1,47E-06
19	3969	10,8	-	-	-

“-”, amostras não analisadas; “*”, resultados abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada.

Tabela 20 – Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo experimental E₁₄ (KNO₃, 15,0 mmol · L⁻¹; NH₄Cl, 15,0 mmol · L⁻¹)

Tempo (d)	Células (mg · L ⁻¹)	pH	Carbonato (g · L ⁻¹)	Nitrato (g · L ⁻¹)	Amônia (mol · L ⁻¹)
0	50,35	9,51	15,85	0,93	-
1	110,2	9,82	-	-	-
2	256,8	9,94	15,28	0,89	*
3	543,6	10,1	-	-	-
4	816,4	10,3	14,76	0,77	*
5	1024	10,4	-	-	-
6	1347	10,5	13,73	0,59	*
7	1579	10,7	-	-	-
8	1825	10,8	12,17	0,41	*
9	2243	10,9	-	-	-
10	2501	10,9	11,66	0,29	3,13E-04
11	2803	11,0	-	-	-
12	3131	11,0	10,62	0,23	*
13	3415	11,0	-	-	-
14	3781	10,9	10,10	0,17	6,46E-05
15	4029	10,9	-	-	-
16	4259	10,9	9,843	0,14	*
17	4410	11,0	-	-	-
18	4551	10,9	9,320	0,11	1,67E-06
19	4268	10,9	-	-	-

“-”, amostras não analisadas; “*”, resultados abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada.

Tabela 21 – Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo de ótimo O₁ (KNO₃, 15,4 mmol · L⁻¹; NH₄Cl, 14,1 mmol · L⁻¹)

Tempo (d)	Células (mg · L ⁻¹)	pH	Carbonato (g · L ⁻¹)	Nitrato (g · L ⁻¹)	Amônia (mol · L ⁻¹)
0	50,16	9,66	15,85	0,96	-
1	81,23	9,86	-	-	-
2	234,6	10,0	15,02	0,70	1,21E-06
3	452,0	10,2	-	-	-
4	750,5	10,3	14,51	0,67	1,41E-06
5	976,1	10,5	-	-	-
6	1179	10,6	13,21	0,52	2,07E-06
7	1443	10,7	-	-	-
8	1664	10,8	12,17	0,49	2,34E-06
9	1873	10,9	-	-	-
10	2120	11,0	10,88	0,40	2,61E-06
11	2376	11,0	-	-	-
12	2683	11,0	9,84	0,38	2,36E-06
13	2947	11,1	-	-	-
14	3333	11,1	8,81	0,37	3,69E-06
15	3511	11,1	-	-	-
16	3960	11,0	7,773	0,34	2,71E-06
17	4186	11,0	-	-	-
18	4327	11,0	7,512	0,31	2,30E-05
19	3856	10,9	-	-	-

“-”, amostras não analisadas.

Tabela 22 – Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo de ótimo O₂ (KNO₃, 15,4 mmol · L⁻¹; NH₄Cl, 14,1 mmol · L⁻¹)

Tempo (d)	Células (mg · L ⁻¹)	pH	Carbonato (g · L ⁻¹)	Nitrato (g · L ⁻¹)	Amônia (mol · L ⁻¹)
0	50,16	9,66	15,85	0,96	-
1	112,3	9,86	-	-	-
2	258,5	10,0	14,76	0,73	1,31E-06
3	481,7	10,2	-	-	-
4	735,6	10,3	14,25	0,70	1,19E-06
5	1019	10,4	-	-	-
6	1313	10,6	12,95	0,65	1,63E-06
7	1502	10,7	-	-	-
8	1890	10,8	11,91	0,50	2,28E-06
9	2067	10,9	-	-	-
10	2212	11,0	10,62	0,49	*
11	2415	11,0	-	-	-
12	2639	11,0	9,587	0,46	2,50E-06
13	2828	11,1	-	-	-
14	3399	11,1	8,555	0,45	2,53E-06
15	3691	11,1	-	-	-
16	3916	11,0	7,512	0,40	2,07E-06
17	4052	11,0	-	-	-
18	4281	11,0	6,991	0,38	2,42E-05
19	3899	10,9	-	-	-

“-”, amostras não analisadas; “*”, resultados abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada.

Tabela 23 – Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo de ótimo O₃ (KNO₃, 15,4 mmol · L⁻¹; NH₄Cl, 14,1 mmol · L⁻¹)

Tempo (d)	Células (mg · L ⁻¹)	pH	Carbonato (g · L ⁻¹)	Nitrato (g · L ⁻¹)	Amônia (mol · L ⁻¹)
0	50,16	9,66	15,85	0,96	-
1	77,45	9,86	-	-	-
2	218,9	10,0	13,99	0,80	1,20E-06
3	423,4	10,2	-	-	-
4	770,3	10,3	12,43	0,64	1,24E-06
5	1073	10,5	-	-	-
6	1223	10,6	11,14	0,55	2,51E-06
7	1485	10,7	-	-	-
8	1911	10,8	10,10	0,46	2,38E-06
9	2108	10,9	-	-	-
10	2235	11,0	8,811	0,45	3,40E-06
11	2542	11,0	-	-	-
12	2836	11,1	7,773	0,43	2,31E-06
13	3184	11,1	-	-	-
14	3431	11,1	7,512	0,41	2,22E-06
15	3661	11,1	-	-	-
16	3882	11,0	7,254	0,40	1,88E-06
17	4070	11,0	-	-	-
18	4250	10,9	6,481	0,38	1,22E-05
19	3834	10,9	-	-	-

“-”, amostras não analisadas.

Tabela 24 – Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo de ótimo O₄ (KNO₃, 15,4 mmol · L⁻¹; NH₄Cl, 14,1 mmol · L⁻¹)

Tempo (d)	Células (mg · L ⁻¹)	pH	Carbonato (g · L ⁻¹)	Nitrato (g · L ⁻¹)	Amônia (mol · L ⁻¹)
0	50,16	9,66	15,85	0,96	-
1	90,23	9,86	-	-	-
2	274,4	10,0	14,76	0,79	1,17E-06
3	454,3	10,2	-	-	-
4	775,1	10,3	13,73	0,71	*
5	866,8	10,5	-	-	-
6	1259	10,6	12,17	0,68	2,32E-06
7	1603	10,7	-	-	-
8	1904	10,8	11,14	0,56	2,11E-06
9	2254	10,9	-	-	-
10	2567	11,0	10,88	0,52	3,01E-06
11	2798	11,0	-	-	-
12	3023	11,1	10,36	0,46	2,22E-06
13	3202	11,1	-	-	-
14	3447	11,1	9,842	0,44	2,72E-06
15	3674	11,1	-	-	-
16	3886	11,0	9,071	0,41	1,20E-06
17	3956	11,0	-	-	-
18	4281	10,9	8,299	0,40	7,97E-06
19	3973	10,9	-	-	-

“-”, amostras não analisadas; “*”, resultados abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada.

Tabela 25 – Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total, concentração de nitrato e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo de ótimo O₅ (KNO₃, 15,4 mmol · L⁻¹; NH₄Cl, 14,1 mmol · L⁻¹)

Tempo (d)	Células (mg · L ⁻¹)	pH	Carbonato (g · L ⁻¹)	Nitrato (g · L ⁻¹)	Amônia (mol · L ⁻¹)
0	50,16	9,66	15,85	0,96	-
1	112,6	9,86	-	-	-
2	258,3	10,0	15,54	0,65	1,17E-06
3	481,1	10,2	-	-	-
4	735,4	10,3	13,47	0,58	1,30E-06
5	1019	10,5	-	-	-
6	1313	10,6	11,66	0,44	2,06E-06
7	1502	10,8	-	-	-
8	1890	10,9	11,14	0,37	2,20E-06
9	2067	11,0	-	-	-
10	2212	11,1	9,842	0,35	3,81E-06
11	2415	11,1	-	-	-
12	2639	11,1	9,071	0,34	2,38E-06
13	2828	11,2	-	-	-
14	3399	11,2	8,555	0,32	2,93E-06
15	3691	11,2	-	-	-
16	3916	11,1	8,031	0,31	1,45E-06
17	4052	11,1	-	-	-
18	4281	11,0	7,773	0,28	6,88E-06
19	3899	11,0	-	-	-

“-”, amostras não analisadas.

Tabela 26 – Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo de referência para cloreto de amônio R_{Al} (NH₄Cl, 21,5 mmol · L⁻¹)

Tempo (d)	Células (mg · L ⁻¹)	pH	Carbonato (g · L ⁻¹)	Amônia (mol · L ⁻¹)
0	50,35	9,51	15,85	-
1	79,36	9,83	-	-
2	164,2	9,93	15,02	*
3	255,1	10,0	-	-
4	303,6	10,2	14,76	*
5	360,2	10,2	-	-
6	435,8	10,3	13,99	*
7	570,6	10,4	-	-
8	859,7	10,5	13,73	*
9	969,0	10,6	-	-
10	1081	10,7	12,95	2,18E-04
11	1280	10,8	-	-
12	1403	10,8	11,66	8,98E-05
13	1554	10,8	-	-
14	1671	10,9	10,88	4,23E-04
15	1702	10,8	-	-
16	1817	10,8	10,62	1,89E-06
17	1908	10,8	-	-
18	2013	10,8	10,10	3,56E-06
19	1747	10,8	-	-

“-”, amostras não analisadas; “*”, resultados abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada.

Tabela 27 – Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia, em função do tempo, para o cultivo de referência para cloreto de amônio R_{A2} (NH₄Cl, 21,5 mmol · L⁻¹)

Tempo (d)	Células (mg · L ⁻¹)	pH	Carbonato (g · L ⁻¹)	Amônia (mol · L ⁻¹)
0	50,16	9,66	15,85	-
1	88,03	9,85	-	-
2	118,5	9,94	15,54	*
3	235,8	10,0	-	-
4	315,4	10,2	15,02	*
5	363,6	10,2	-	-
6	435,1	10,3	14,76	*
7	579,1	10,4	-	-
8	847,1	10,5	14,51	*
9	973,3	10,6	-	-
10	1021	10,7	13,73	2,01E-04
11	1232	10,8	-	-
12	1377	10,8	12,17	8,33E-05
13	1451	10,8	-	-
14	1576	10,8	11,66	4,07E-04
15	1694	10,8	-	-
16	1813	10,8	11,40	2,00E-06
17	1976	10,8	-	-
18	2125	10,8	10,62	3,27E-06
19	1945	10,8	-	-

“-”, amostras não analisadas; “*”, resultados abaixo da sensibilidade da metodologia aplicada.

Tabela 28 – Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de nitrato, em função do tempo, para o cultivo de referência para nitrato de potássio R_{N1} (KNO₃, 25,4 mmol · L⁻¹)

Tempo (d)	Células (mg · L ⁻¹)	pH	Carbonato (g · L ⁻¹)	Nitrato (g · L ⁻¹)
0	50,16	9,66	15,85	1,6
1	77,56	9,81	-	-
2	218,1	10,0	14,51	1,5
3	423,8	10,1	-	-
4	770,6	10,3	13,47	1,3
5	1073	10,4	-	-
6	1223	10,6	12,69	1,2
7	1485	10,7	-	-
8	1911	10,8	11,91	1,1
9	2108	10,9	-	-
10	2235	11,0	10,36	0,86
11	2542	11,0	-	-
12	2836	11,1	9,071	0,82
13	3184	11,1	-	-
14	3431	11,1	8,296	0,73
15	3661	11,1	-	-
16	3882	11,1	7,773	0,61
17	4070	11,1	-	-
18	4250	11,0	6,481	0,58
19	3834	11,0	-	-

“-”, amostras não analisadas.

Tabela 29 – Concentração celular, valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de nitrato, em função do tempo, para o cultivo de referência para nitrato de potássio R_{N2} (KNO_3 , $25,4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Tempo (d)	Células ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	pH	Carbonato ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Nitrato ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
0	50,35	9,51	15,85	1,6
1	149,0	9,73	-	-
2	288,2	9,83	14,98	0,94
3	570,4	9,94	-	-
4	864,6	10,1	10,28	0,86
5	1093	10,2	-	-
6	1368	10,4	7,341	0,77
7	1645	10,6	-	-
8	1847	10,7	6,465	0,59
9	2002	10,8	-	-
10	2247	10,9	6,172	0,44
11	2570	11,0	-	-
12	2850	10,8	5,871	0,38
13	3309	10,8	-	-
14	3436	10,8	5,585	0,26
15	3559	10,7	-	-
16	3991	10,7	5,298	0,20
17	1039	10,7	-	-
18	4150	10,7	3,523	0,17
19	3710	10,7	-	-

“-”, amostras não analisadas.

Tabela 30 – Teor de clorofila, lipídios e proteínas nas biomassas obtidas nos cultivos realizados, com suas respectivas concentrações de nitrogênio

Cultivos	KNO ₃ (mmol · L ⁻¹)	NH ₄ Cl (mmol · L ⁻¹)	Clorofila (mg cl · g células ⁻¹)	Lipídios (%)	Proteínas (%)
E ₁	8,00	8,00	9,150	9,28	39,5
E ₂	22,0	8,00	14,06	16,3	51,2
E ₃	8,00	22,0	9,350	16,0	50,8
E ₄	22,0	22,0	13,37	16,2	51,9
E ₅	15,0	5,10	10,23	15,2	49,3
E ₆	5,10	15,0	8,810	14,1	51,7
E ₇	15,0	24,9	10,84	17,2	48,3
E ₈	24,9	15,0	15,88	17,6	49,6
E ₉	15,0	15,0	22,55	19,6	51,5
E ₁₀	15,0	15,0	22,52	21,0	48,2
E ₁₁	15,0	15,0	22,42	19,8	52,0
E ₁₂	15,0	15,0	22,82	19,8	52,0
E ₁₃	15,0	15,0	22,69	21,6	51,2
E ₁₄	15,0	15,0	22,26	22,0	48,3
O ₁	15,4	14,1	21,85	20,5	49,8
O ₂	15,4	14,1	22,76	19,8	50,6
O ₃	15,4	14,1	21,29	20,9	49,3
O ₄	15,4	14,1	21,03	19,2	51,5
O ₅	15,4	14,1	22,43	19,2	49,6
R _{A1}	-	21,5	6,340	14,3	32,9
R _{A2}	-	21,5	6,460	14,9	33,1
R _{N1}	25,4	-	19,76	20,4	48,8
R _{N2}	25,4	-	19,51	20,1	41,8

Tabela 31 – Concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_X) e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) – parâmetros referentes aos cultivos, com as respectivas concentrações de nitrogênio

Cultivos	KNO_3 (mmol · L ⁻¹)	NH_4Cl (mmol · L ⁻¹)	X_m (mg · L ⁻¹)	P_X (mg · L ⁻¹ · d ⁻¹)	$Y_{X/N}$ (mg células · mg N ⁻¹)
E ₁	8,00	8,00	3363	184,0	14,8
E ₂	22,0	8,00	4146	240,9	9,75
E ₃	8,00	22,0	4004	232,6	9,41
E ₄	22,0	22,0	3096	179,2	4,94
E ₅	15,0	5,10	3597	197,1	12,6
E ₆	5,10	15,0	3506	192,0	12,3
E ₇	15,0	24,9	3395	185,8	5,99
E ₈	24,9	15,0	3306	180,9	5,83
E ₉	15,0	15,0	4313	236,8	10,1
E ₁₀	15,0	15,0	4369	239,9	10,3
E ₁₁	15,0	15,0	4461	245,0	10,5
E ₁₂	15,0	15,0	4447	244,3	10,5
E ₁₃	15,0	15,0	4522	248,4	10,6
E ₁₄	15,0	15,0	4551	250,0	10,7
O ₁	15,4	14,1	4327	237,6	10,7
O ₂	15,4	14,1	4281	235,1	10,3
O ₃	15,4	14,1	4250	233,3	10,2
O ₄	15,4	14,1	4281	235,1	10,3
O ₅	15,4	14,1	4286	235,3	10,2
R _{A1}	-	21,5	2013	109,0	9,34
R _{A2}	-	21,5	2125	115,2	9,88
R _{N1}	25,4	-	4318	237,1	12,0
R _{N2}	25,4	-	4150	227,8	11,5

6 DISCUSSÃO

6.1 Avaliação do crescimento celular e do consumo de nutrientes

Em todos os cultivos contendo tanto cloreto de amônio quanto nitrato de potássio como fontes de nitrogênio (E_1 a E_{14} , e O_1 a O_5), partiu-se de uma concentração inicial de células de cerca de $50 \pm 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, e entre 17 e 18 dias de cultivo, atingiram-se concentrações celulares que variaram de 3096 a $4551 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (TAB. 07-25).

A maior concentração celular obtida foi a de $4551 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ do cultivo E_{14} , correspondente ao ponto central do planejamento experimental e contendo $15,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de NH_4Cl e $15,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de KNO_3 (TAB. 20). É importante citar que, teoricamente, os cultivos correspondentes ao ponto ótimo (O_1 a O_5), calculado este com base na análise estatística da concentração celular, deveriam apresentar as maiores concentrações celulares máximas. No entanto, a diferença média dos valores médios obtidos entre os cultivos de ponto central ($4444 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; GRÁF. 05) e os cultivos de ponto de ótimo ($4284 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; GRÁF. 06) é de apenas 3,6 %, considerado satisfatório para processos envolvendo cultivo microbiano (DANESI *et al.*, 2002; FRATELLI *et al.*, 2005).

Gráfico 05. Curva de crescimento média dos cultivos de *S. platensis* referentes ao ponto central do planejamento experimental (■); barras de erro correspondentes ao desvio padrão

Gráfico 06. Curva de crescimento média dos cultivos de *S. platensis* referentes ao ponto de ótimo em relação à concentração celular máxima (●); barras de erro correspondentes ao desvio padrão

De fato, em ambas as condições as quantidades das fontes de nitrogênio utilizadas são quase que equivalentes (entre 14,0 e 15,0 mmol · L⁻¹), justificando assim a semelhança entre os valores de concentração celular máxima obtidos nos cultivos de ponto central e de ótimo.

Nos cultivos de referência para cloreto de amônio (R_{A1} e R_{A2}; TAB. 26-27), atingiram-se concentrações celulares que variaram de 35 a 53 % a menos que nos cultivos onde foram empregadas ambas as fontes de nitrogênio. Nos cultivos de referência para nitrato de potássio (R_{N1} e R_{N2}; TAB. 28-29), atingiram-se concentrações celulares até 28 % maiores que os cultivos do planejamento experimental (E₁ a E₈), até 6 % menores que os cultivos do ponto central do planejamento experimental (E₉ a E₁₄), e quase que equivalentes aos cultivos de ótimo (O₁ a O₅).

Esses resultados mostram que a associação de fontes diferentes de nitrogênio é benéfica ao crescimento da cianobactéria. Além disso, o nitrogênio proveniente do cloreto de amônio é até 40 % mais barato que aquele do nitrato de potássio, tradicionalmente utilizado no meio de cultura de *Spirulina* (PAOLETTI; PUSHPARAJ; TOMASELLI FEROCI, 1975); também é mais econômico que outros nitratos, utilizados em outros meios de cultura geralmente aplicados no cultivo deste microrganismo (ZARROUK, 1966; SCHLÖSSER, 1982). Segundo Piorreck, Baasch e Pohl (1984), o meio de cultura é o fator que mais encarece o cultivo de microalgas, justificando assim a utilização do cloreto de amônio como forma de redução de custos. Embora neste trabalho seja empregado também o nitrato de potássio, sua

quantidade pôde ser reduzida em cerca de $10,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, em relação à quantidade utilizada no meio de cultura Paoletti.

O modelo de crescimento de *S. platensis*, expresso como o aumento da concentração de células durante o cultivo, foi similar em todas as condições experimentais utilizando duas fontes de nitrogênio simultaneamente (GRÁF. 07): ausência da fase lag, ou fase de adaptação, seguindo com intenso crescimento. Isso se deve a semelhança das condições de crescimento, tais como composição química do meio de cultura e temperatura de cultivo, entre a preparação do inóculo e os cultivos em si. As células utilizadas no inóculo estavam em fase exponencial de crescimento, isto é, o inóculo era um cultivo jovem constituído de células ativas; isso também impediu a presença de fase lag, característica de cultivos de microrganismos com inóculo composto de células em fase estacionária. Outro fator de influência é a presença de nitrato de potássio nos cultivos, além do cloreto de amônio, que contribuiu para a presença de todos os nutrientes na fase de produção, assim como no inóculo.

Gráfico 07. Curvas modelo de crescimento dos cultivos de *S. platensis* contendo duas fontes de nitrogênio – cultivos E₈ (■), E₁₄ (●) e O₂ (▲)

Os cultivos de referência também não apresentaram fase lag (GRÁF. 08). Autores como Danesi *et al.* (2002) e Carvalho *et al.* (2004), trabalhando com uréia e cloreto de amônio como fontes de nitrogênio, respectivamente, também não observaram a presença de fase lag no cultivo de *S. platensis*, uma vez que, como assinala Boussiba (1989), a amônia é a forma preferencial de consumo de nitrogênio pelo microrganismo, e sua inserção no cultivo não provocou alterações no perfil de desenvolvimento deste.

Gráfico 08. Curvas modelo de crescimento dos cultivos de *S. platensis* contendo uma fonte de nitrogênio – cultivos de referência R_{N2} (●) e R_{A2} (■)

Os cultivos de referência para cloreto de amônio (R_{A1} e R_{A2}) apresentaram o perfil das curvas de crescimento similar ao de muitos cultivos em que se associaram as duas fontes de nitrogênio, ou nos cultivos de referência para nitrato de potássio, porém com uma inclinação menor. Isso se deve, provavelmente, à ocorrência de deficiência de nitrogênio, observada esta pela coloração amarelada dos cultivos por um período, muitas vezes que se deu do instante inicial até aproximadamente dez dias. Após esse período, devido provavelmente ao uso de vazão exponencialmente crescente (CARVALHO *et al.*, 2004), a coloração da cultura ficou esverdeada, indicando que houve aumento na formação de pigmentos pela biomassa em decorrência da maior quantidade de nitrogênio fornecida ao sistema.

Houve aumento de pH em todos os cultivos, com tendência da estabilização dos valores no final destes. Os valores máximos de pH foram alcançados a partir do nono dia de cultivo, chegando, em muitos casos, a valores da ordem de 11,0.

O aumento do pH com o crescimento celular pode ser explicado pelo consumo da fonte de carbono durante os cultivos. Os íons bicarbonato do meio de cultura são transportados ativamente para o interior celular, convertidos a íons carbonato e gás carbônico, e este último é utilizado na fotossíntese. Para cada molécula de dióxido de carbono utilizada pela célula, há a formação de um íon carbonato (MILLER; COLMAN, 1980), que é liberado para o meio de cultura (RANGEL, 2000), com conseqüente aumento do pH. Deste modo, além do pH, a quantidade de íons bicarbonato consumida também tende a aumentar ao longo

do crescimento, havendo conseqüentemente uma redução da concentração de carbonato total. Segundo Goldman, Dennett e Riley (1982), outro nutriente que pode levar a um aumento do pH quando do seu consumo é o nitrato, com liberação de hidroxila no meio de cultivo.

O cultivo de referência para nitrato de potássio R_{N1} , por exemplo, atingiu o pico máximo de pH de 11,1, e foi o que apresentou uma das maiores taxas de consumo da fonte de carbono: cerca de 59 % (GRÁF. 09).

Gráfico 09. Valores de pH (□) e da concentração de carbonato total (Δ) em função do tempo para o cultivo de referência para nitrato de potássio R_{N1}

O pH determina também o equilíbrio da fonte de nitrogênio amoniacal, que pode se apresentar na forma livre de amônia ou protonada de amônio (DANESI, 2001). Em 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 (BOUSSIBA, 1989). Outro fator a ser considerado é que, quanto mais alcalino se torna o meio de cultivo, maior é a concentração de amônia em relação ao amônio, e, por conseguinte, maior é a perda de amônia por volatilização. A utilização de cloreto de amônio como fonte de nitrogênio pode de certa forma atenuar o aumento do pH, uma vez que com a utilização da amônia ou até mesmo em decorrência de sua perda por volatilização, há uma liberação de íons hidrogênio no meio de cultivo (CARVALHO *et al.*, 2004).

Os cultivos de referência para cloreto de amônio (R_{A1} e R_{A2}), que utilizaram exclusivamente esta fonte de nitrogênio, ilustram tal situação, pois atingiram o valor de pH

máximo nos dias 14 e 11, respectivamente, e se mantiveram em tais valores até o final do cultivo (TAB. 26-27; GRÁF. 10).

Gráfico 10. Valores de pH em função do tempo para o cultivo de referência para cloreto de amônio R_{AI} (□)

O nitrato de potássio adicionado em batelada no início dos cultivos permitiu uma reserva na forma de nitrato, que reduzido, através da ação das enzimas nitrato e nitrito redutases, quando necessário, impediu qualquer tipo de carência dessa fonte para as células. Observou-se desde o início de todos os cultivos contendo simultaneamente as duas fontes de nitrogênio referidas uma queda da concentração de nitrato, geralmente mais acentuada até o décimo dia, o que demonstra que esta fonte foi muito importante para suprir o cultivo com nitrogênio, principalmente nos períodos em que havia um menor suprimento de cloreto de amônio, devido ao perfil de adição exponencialmente crescente. Após aproximadamente a metade do cultivo, quando as concentrações celulares se tornaram mais elevadas, aparentemente houve uma redução da taxa de consumo de nitrato, o que pode ter sido consequência de duas situações que ocorreram ao mesmo tempo. Primeiro podemos citar, como já mencionado, que com o decorrer do tempo houve aumento da taxa de adição de cloreto de amônio ao sistema, e como esta é a fonte preferencial de nitrogênio (BOUSSIBA, 1989), havendo maior suprimento desta, a *S. platensis* há de utilizá-la mais que o nitrato de potássio. Adicionalmente, com o decorrer do cultivo e consequente aumento da concentração celular, o efeito do sombreamento começa a se tornar mais pronunciado (RICHMOND; QIANG, 1997), e, portanto, a quantidade absorvida de energia pela célula se torna menor

também. Como o nitrato requer energia para ser reduzido a amônia (HATTORI; MYERS, 1966), tem-se um fator a mais para que a célula utilize preferencialmente a amônia como fonte de nitrogênio, uma vez que esta já está na forma em que é incorporada ao alfa-cetoácido para formação do correspondente aminoácido.

Os cultivos referentes ao ponto central (E_9 a E_{14}) apresentaram as maiores taxas de consumo de nitrato, com valores da ordem de até 92 %, e a curva do cultivo E_{11} (GRÁF. 11) é um exemplo típico do fenômeno aqui descrito.

Gráfico 11. Concentração de nitrato em função do tempo para o cultivo experimental referente ao ponto central do planejamento E_{11} (x)

De fato, diferentemente do observado por Carvalho *et al.* (2004) e, como já mencionado, nos cultivos de referência para cloreto de amônio (R_{A1} e R_{A2}), nem no início dos cultivos onde foram utilizadas as duas fontes de nitrogênio as células apresentaram coloração amarelada, o que demonstra que não faltou nitrogênio para a formação de pigmentos. Como desde o início dos cultivos as células não sofreram nenhum tipo de limitação de nutrientes, seu crescimento pôde ser mais eficiente durante todo o período de cultivo, levando conseqüentemente a elevados valores de concentração celular.

Rangel-Yagui *et al.* (2004), trabalhando com intensidades luminosas da ordem de até 5,60 klux ($67,2 \mu\text{mol fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), verificaram que não havia limitação de nitrogênio em cultivos realizados com nitrato de potássio como fonte de nitrogênio. Considerando os cultivos realizados neste trabalho, onde foram empregadas intensidades luminosas bem maiores ($156 \mu\text{mol fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), o consumo de nitrato foi maior provavelmente devido à

maior energia fornecida aos cultivos. Embora se tenha observado nos cultivos de referência para nitrato de potássio uma queda contínua da concentração de nitrato (GRÁF. 12), aparentemente não houve deficiência deste nutriente, uma vez que o íon não foi exaurido do meio em cultivo.

Gráfico 12. Concentração de nitrato em função do tempo para o cultivo de referência para nitrato de potássio R_{N1} (×)

Na associação de fontes de nitrogênio, os valores de leitura da concentração de amônia se apresentam geralmente abaixo dos níveis considerados inibitórios (10,0 mmol · L⁻¹, BELKIN; BOUSSIBA, 1991; 6,0 mmol · L⁻¹, CARVALHO *et al.*, 2004), e a maioria das concentrações, especialmente para os cultivos do ponto central do planejamento experimental (E₉ a E₁₄), ficou abaixo do limite de detecção da metodologia analítica (TAB. 15-20), o que pode ocorrer em cultivos com intensidades luminosas não limitantes (BEZERRA, 2006).

Dessa forma, esses cultivos levaram a resultados de concentração celular, produtividade em células e fatores de conversão de nitrogênio em células significativamente maiores que aqueles realizados utilizando somente cloreto de amônio como fonte de nitrogênio, e, utilizando uma menor quantidade de nitrato de potássio no meio de cultivo (15,0 mmol · L⁻¹), foi possível a obtenção de concentrações celulares máximas ligeiramente superiores que nos cultivos onde se utilizou apenas nitrato de potássio (25,4 mmol · L⁻¹) como fonte de nitrogênio.

Tais resultados também são melhores que os relatados na literatura, referentes a cultivos com *S. platensis*. Com a utilização de processo descontínuo alimentado, Sánchez-

Luna *et al.* (2006) obtiveram $749,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ mediante o uso exclusivo de uréia, enquanto que Carvalho *et al.* (2004) e Bezerra (2006), trabalhando somente com cloreto de amônio, chegaram a $1239 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e $1771 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente. Rangel-Yagui *et al.* (2004), com a utilização de nitrato de potássio e através do emprego do processo descontínuo de cultivo, chegaram a resultados de $1878 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Matsudo (2006) obteve $2101 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ utilizando uréia e processo descontínuo alimentado repetitivo, e Costa *et al.* (2001), trabalhando com sistema fechado de cultivo, chegou a valores de concentração celular máxima de $1992 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $56,00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $81,00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ e $993,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ em cultivos com nitrato de sódio, cloreto de amônio, sulfato de amônio e nitrato de amônio, respectivamente. No entanto, deve ser ressaltado que houve variações nas condições de cultivo entre os trabalhos citados, e que nestes a intensidade luminosa foi menor que a empregada aqui, o que pode ter levado a um efeito de sombreamento, com limitação do crescimento celular.

A utilização do processo descontínuo alimentado para o cultivo de *S. platensis* permitiu a obtenção de resultados satisfatórios com o uso simultâneo de cloreto de amônio e nitrato de potássio como fontes de nitrogênio, mantendo a concentração de amônia no decorrer do cultivo em níveis adequados – não inibitórios (GRÁF. 13), suficientes para o crescimento celular (BOUSSIBA, 1989).

Gráfico 13. Concentração de amônia adicionada (◇) e residual (◆) em função do tempo para o cultivo experimental referente ao ponto central do planejamento E₁₀

O consumo quase que total do nitrato e da amônia na maioria dos cultivos indica que a adição das fontes de nitrogênio, além de adequada para suportar o crescimento da *S. platensis*, foi vantajosa em relação a meios de cultura onde se utiliza somente nitrato de potássio como fonte de nitrogênio. Neste último caso, para que o cultivo se desenvolva adequadamente, há a necessidade da adição de grandes concentrações de nitrogênio (FAINTUCH, 1989), com conseqüente sobra de grandes quantidades de nitrato ao final do cultivo (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004).

6.2 Análise dos teores da biomassa obtida

O conteúdo de clorofila nos cultivos experimentais E₁ a E₈ (TAB. 30) aumentou conforme a quantidade de nitrato de potássio presente. De fato, comparando-se os cultivos E₁ e E₂, bem como E₃ e E₄, em que as quantidades iniciais de nitrato de potássio foram de 8,00 mmol · L⁻¹ e 22,0 mmol · L⁻¹, respectivamente, nota-se um aumento significativo no teor de clorofila na biomassa. Esse aumento se deve ao fato de que tal conteúdo é dependente da composição do meio de cultivo, em especial a quantidade e tipo da fonte de nitrogênio (PIORRECK; BAASCH; POHL, 1984), uma vez que o nitrogênio faz parte da composição da molécula de clorofila (BOGORAD, 1962). Os cultivos de referência para cloreto de amônio (R_{A1} e R_{A2}) apresentaram os menores valores de conteúdo de clorofila – cerca de apenas 28 % dos maiores valores obtidos (GRÁF. 14). Isso se deve provavelmente à deficiência de nitrogênio, percebida visualmente pela coloração amarelada durante grande parte dos cultivos, como mencionado neste trabalho.

Além da fonte de nitrogênio, outros fatores influenciam o teor de clorofila, como a concentração celular e intensidade luminosa (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004). Os cultivos do ponto central (E₉ a E₁₄) e os cultivos de ótimo (O₁ a O₅) apresentaram os maiores valores de conteúdo de clorofila (TAB. 30), provavelmente devido à melhor combinação do suprimento de nitrogênio e às maiores concentrações celulares. Os cultivos de referência para nitrato de potássio (R_{N1} e R_{N2}) apresentaram valores bem próximos destes (GRÁF. 14), também provavelmente pelo mesmo motivo. A presença deste sal se mostra de grande importância e influência na produção de clorofila “a”, uma vez que serve de reserva de nitrogênio.

Gráfico 14. Conteúdo de clorofila dos cultivos experimentais (E₁ a E₈), e média dos teores dos cultivos do ponto central (E₉-E₁₄), do ponto ótimo (O₁-O₅) e de referência para cloreto de amônio (R_A) e nitrato de potássio (R_N)

Todos os cultivos deste trabalho foram realizados a $156 \mu\text{mol f\u00f3tons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (13,0 klux), e, provavelmente, o crescimento nos instantes finais foi limitado por efeito de sombreamento (RICHMOND; QIANG, 1997). Considerando que a produ\u00e7\u00e3o de clorofila \u00e9 inversamente proporcional \u00e0 intensidade luminosa, em condi\u00e7\u00f5es n\u00e3o limitantes de nitrog\u00eanio (LEE; ERICKSON; YANG, 1987; OLAIZOLA; DUERR, 1990), o efeito de sombreamento nesses cultivos deve ter colaborado para a produ\u00e7\u00e3o deste pigmento. \u00c9 conhecido que a cianobact\u00e9ria aumenta a produ\u00e7\u00e3o de clorofila na tentativa de aumentar a efici\u00eancia de captura de f\u00f3tons para compensar a falta de luz das c\u00e9lulas que n\u00e3o ficam na superf\u00edcie do tanque (HENDRY, 1996).

Os valores em porcentagem de lip\u00eddios e prote\u00ednas da biomassa final, referentes aos cultivos experimentais, cultivos de \u00f3timo e dos cultivos de refer\u00eancia deste trabalho podem ser observados no Gr\u00e1fico 15.

Gráfico 15. Porcentagens de proteínas e lipídios da biomassa recuperada dos cultivos experimentais (E₁ a E₈), e médias dos teores dos cultivos do ponto central (E₉-E₁₄), do ponto ótimo (O₁-O₅) e de referência para cloreto de amônio (R_A) e nitrato de potássio (R_N)

Considerando como referência a quantidade da ordem de 20 % de lipídios (TAB. 30), obtida nos cultivos de referência para nitrato de potássio (R_{N1} e R_{N2}), pode-se afirmar que os cultivos do ponto central (E₉ a E₁₄) e os cultivos de ótimo (O₁ a O₅) apresentaram valores da mesma grandeza (19 a 22 %) devido à presença abundante de nitrato. Os cultivos de referência para cloreto de amônio (R_{A1} e R_{A2}) apresentaram 14 % de massa lipídica; resultados estes de acordo com os encontrados na literatura (BEZERRA, 2006). Os cultivos experimentais E₂ a E₈ apresentaram valores de 14 a 17 % de massa lipídica, e, portanto, se mostraram intermediários entre os valores padrão. O teor lipídico parece ser influenciado tanto pela quantidade (SASSANO, 2004) quanto pelo tipo da fonte de nitrogênio.

Syrett (1962) descreve que o nitrogênio assimilado pelo microrganismo é utilizado primeiro para o crescimento celular e, posteriormente, para formação de nitrogênio orgânico como material de reserva. De fato, Sassano (2004) observou que os teores de proteínas nas biomassas decaíram significativamente, a valores que chegaram a 16,5 %, em cultivos realizados sob limitação de nitrogênio. Em todos os cultivos com a utilização de ambas as fontes de nitrogênio, com exceção do cultivo experimental E₁, os teores de proteínas compreenderam a faixa relatada para os teores de proteínas para biomassas de *S. platensis* (50-60 %; VONSHAK, 1997a). Isso indica que nesses ensaios houve disponibilidade de nitrogênio suficiente tanto para o crescimento celular quanto para a produção de nitrogênio

orgânico, na forma de proteínas, como material de reserva da célula. Os cultivos de referência para cloreto de amônio (R_{A1} e R_{A2}), nos quais a limitação de nitrogênio foi evidente, apresentaram 33 % de proteínas, consistente com resultados prévios (BEZERRA, 2006).

Os menores teores de lipídios e proteínas, de cultivos com associação de fontes de nitrogênio, foram obtidos no cultivo E_1 : cerca de 9 e 40 %, respectivamente. Este cultivo foi o que teve menor fornecimento de nitrogênio do sistema ($16,0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$). O efeito da limitação de nitrogênio na composição da biomassa já vem sendo relatado na literatura, com diminuição do teor de proteína e lipídios, e conseqüente aumento do teor de carboidratos (SASSANO, 2004). Essa diminuição do teor de lipídios e proteínas em cultivos limitados por nitrogênio se deve, provavelmente, ao fato de componentes destas frações serem dependentes de nitrogênio para sua formação. De fato, uma vez que a energia captada na fotossíntese é transformada em energia química, no caso de carência de nitrogênio, não haveria como acumulá-la na forma de proteína ou parte da fração lipídica que necessitasse de nitrogênio para sua formação, mas sim na forma de carboidratos.

Conclusivamente, os valores de teor de proteínas na biomassa dos cultivos utilizando ambas as fontes de nitrogênio são superiores aos valores obtidos nos cultivos com a mesma intensidade luminosa e emprego de somente cloreto de amônio (35,9 %; BEZERRA, 2006). São inferiores aos valores obtidos nos cultivos de *S. platensis* com uréia ou nitrato de potássio (63,7 e 60,5 %, respectivamente; DANESI *et al.*, 2002); no entanto, deve ser levado em conta que os estes autores, citados por último, desenvolveram cultivos com menores valores de intensidade luminosa, e obtiveram menores concentrações celulares finais, caracterizando cultivos com menor demanda por nitrogênio que o apresentado aqui.

6.3 Avaliação estatística

Os parâmetros X_m (concentração celular máxima), P_X (produtividade em células) e $Y_{X/N}$ (fator de conversão de nitrogênio em células) dos cultivos realizados com uso simultâneo de cloreto de amônio e nitrato de potássio (E_1 a E_{14}), correspondentes ao planejamento experimental aplicado (TAB. 31), foram avaliados por regressão multivariável, com o objetivo de facilitar a compreensão da influência das variáveis independentes em estudo (quantidade das fontes de nitrogênio) nas respostas de interesse.

6.3.1 Concentração celular máxima (X_m)

Nas Tabelas 32 e 33 estão apresentados os resultados de análise de regressão multivariável para concentração celular máxima (X_m) em função das variáveis independentes codificadas: quantidade inicial de KNO_3 por unidade de volume de reator (X_1) e quantidade total de NH_4Cl adicionado por unidade de volume de reator (X_2), bem como os resultados da análise de variância da regressão, respectivamente.

Tabela 32 – Análise da regressão multivariável para X_m

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	Valor t	p
Constante	4444	52,29	84,98	0,0000
X_2	-86,84	45,29	-1,917	0,0874
X_1^2	-468,7	47,14	-9,941	0,0000
X_2^2	-423,6	47,14	-8,986	0,0000
$X_1 \cdot X_2$	-422,8	64,04	-6,601	0,0001

X_1 : valor codificado da quantidade inicial de KNO_3 por unidade de volume de reator; X_2 : valor codificado da quantidade total de NH_4Cl por unidade de volume de reator.

Tabela 33 – Análise de variância do modelo de regressão para X_m

Fator de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	p
Modelo	3512341	4	878085	53,5262	0,0000
Erro	147643	9	16404		
Total	3659984	13			

$$R^2 \text{ ajustado} = 0,9417$$

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

$$X_m = 4444 - 86,84.X_2 - 468,7.X_1^2 - 423,6.X_2^2 - 422,8.X_1.X_2 \quad (\text{equação 07})$$

A partir da análise de regressão múltipla, observou-se o nível de significância dos coeficientes e o coeficiente de determinação do modelo. Para um ajuste do modelo, foi eliminado o fator X_1 , pois este se mostrou estatisticamente não significativo ($p > 0,20$). Esses dados indicam, como esperado pela observação dos resultados da Tabela 31, que a tendência de maiores concentrações celulares finais ocorre com quantidades médias das fontes de nitrogênio.

Com esses resultados, há evidências que o ponto de ótimo do modelo possa estar próximo aos pontos médios, no centro do planejamento. A partir da derivação da Equação 07 chegou-se aos valores codificados $X_1 = 0,05966$ e $X_2 = -0,1323$ como os correspondentes pontos de ótimo. Esses valores representam, respectivamente, $15,4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de KNO_3 e $14,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de NH_4Cl , com uma concentração celular máxima esperada de $4450 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Assim, os cultivos adicionais, referidos neste por cultivos de ótimo (O_1 a O_5), foram realizados para confirmação do modelo, com estas quantidades de nitrogênio pré-determinadas.

Como pode ser observado por estes cultivos, o valor médio da concentração celular máxima ($X_m = 4284 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) é apenas 3,7 % menor que o valor estimado a partir da Equação 07 ($4450 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), confirmando a utilidade da regressão multivariável na otimização das condições experimentais para maximização de X_m .

O valor de p da análise de variância do modelo foi inferior a 0,050 (TAB. 33), comprovando ser o ajuste do modelo adequado aos dados experimentais. No Gráfico 16 pode ser visualizada a superfície de resposta correspondente ao modelo ajustado.

Gráfico 16. Superfície de resposta para a concentração celular máxima (X_m) em função de X_1 (valor codificado da quantidade inicial de KNO_3 por unidade de volume) e X_2 (valor codificado da quantidade total de NH_4Cl adicionado por unidade de volume de reator)

6.3.2 Produtividade em células (P_X)

Nas Tabelas 34 e 35 estão apresentados os resultados de análise de regressão multivariável para produtividade em células (P_X) em função das variáveis independentes codificadas: quantidade inicial de KNO_3 por unidade de volume de reator (X_1) e quantidade total de NH_4Cl adicionado por unidade de volume de reator (X_2), bem como os resultados da análise de variância da regressão, respectivamente.

Tabela 34 – Análise da regressão multivariável para P_X

Fator	Coeficiente de regressão	Erro padrão	Valor t	p
Constante	244,0	4,31	56,60	0,0000
X_1^2	-23,75	3,89	-6,110	0,0001
X_2^2	-21,25	3,89	-5,467	0,0003
$X_1 \cdot X_2$	-27,57	5,28	-5,221	0,0004

X_1 : valor codificado da quantidade inicial de KNO_3 por unidade de volume de reator; X_2 : valor codificado da quantidade total de NH_4Cl por unidade de volume de reator.

Tabela 35 – Análise de variância do modelo de regressão para P_X

Fator de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	p
Modelo	10009	3	3336,5	29,9055	0,0000
Erro	1115,7	10	111,57		
Total	11125	13			

R^2 ajustado = 0,8696

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

$$P_X = 244,0 - 23,75.X_1^2 - 21,25.X_2^2 - 27,57.X_1.X_2 \quad (\text{equação 08})$$

A partir da análise de regressão múltipla, observou-se o nível de significância dos coeficientes e o coeficiente de determinação do modelo. Para um ajuste do modelo, foram eliminados os fatores X_1 e X_2 , pois estes se mostraram estatisticamente não significativos: $p > 0,70$ e $p > 0,30$, respectivamente. Esses dados indicam, como esperado pela observação dos resultados da Tabela 31, que a tendência de maiores produtividades em células ocorre com quantidades médias das fontes de nitrogênio, assim como a concentração celular máxima (X_m). Considerando que a produtividade em células é a relação entre a concentração de

células formadas e o correspondente tempo para que a concentração celular máxima seja formada, tal resultado já era esperado, uma vez que os tempos de cultivo sofreram muito pouca variação, estando na faixa de 18 a 19 dias.

O valor de p da análise de variância do modelo foi inferior a 0,050 (TAB. 35), comprovando ser o ajuste do modelo adequado aos dados experimentais. No Gráfico 17 pode ser visualizada a superfície de resposta correspondente ao modelo ajustado.

Gráfico 17. Superfície de resposta para a produtividade em células (P_x) em função de X_1 (valor codificado da quantidade inicial de KNO_3 por unidade de volume) e X_2 (valor codificado da quantidade total de NH_4Cl adicionado por unidade de volume de reator)

6.3.3 Fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$)

Nas Tabelas 36 e 37 estão apresentados os resultados de análise de regressão multivariável para fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função das variáveis independentes codificadas: quantidade inicial de KNO_3 por unidade de volume de reator (X_1)

e quantidade total de NH_4Cl adicionado por unidade de volume de reator (X_2), bem como os resultados da análise de variância dessa regressão, respectivamente.

Tabela 36 – Análise da regressão multivariável para $Y_{X/N}$

Fator	Coefficiente de regressão	Erro padrão	Valor t	p
Constante	10,46	0,137	76,03	0,0000
X_1	-2,329	0,119	-19,54	0,0000
X_2	-2,442	0,119	-20,50	0,0000
X_1^2	-0,566	0,124	-4,567	0,0014
X_2^2	-0,446	0,124	-3,599	0,0058

X_1 : valor codificado da quantidade inicial de KNO_3 por unidade de volume de reator; X_2 : valor codificado da quantidade total de NH_4Cl por unidade de volume de reator.

Tabela 37 – Análise de variância do modelo de regressão para $Y_{X/N}$

Fator de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	p
Modelo	94,68	4	23,7	208,387	0,0000
Erro	1,022	9	0,113		
Total	95,71	13			

R^2 ajustado = 0,9846

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

$$Y_{X/N} = 10,46 - 2,329 \cdot X_1 - 2,442 \cdot X_2 - 0,566 \cdot X_1^2 - 0,446 \cdot X_2^2 \quad (\text{equação 09})$$

A partir da análise de regressão múltipla, observou-se o nível de significância dos coeficientes e o coeficiente de determinação do modelo. Para um ajuste do modelo, foi

eliminada a interação de fatores $X_1 \cdot X_2$, pois esta se mostrou estatisticamente não significativa ($p > 0,40$). Esses dados indicam, como esperado pela observação dos resultados da Tabela 31, que a tendência de maiores fatores de conversão de nitrogênio em células ocorre com diminuição da quantidade de nitrogênio total. Essa relação de $Y_{X/N}$ com a quantidade adicionada de cloreto de amônio foi observada por Carvalho *et al.* (2004). Adicionalmente, neste trabalho, verificou-se a mesma relação para o nitrato de potássio, o que pode indicar que essa função decrescente de $Y_{X/N}$ e nitrogênio total poderia ser estendida para outras fontes de nitrogênio.

O valor de p da análise de variância do modelo foi inferior a 0,050 (TAB. 37), comprovando ser o ajuste do modelo adequado aos dados experimentais. No Gráfico 18 pode ser visualizada a superfície de resposta correspondente ao modelo ajustado.

Gráfico 18. Superfície de resposta para o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função de X_1 (valor codificado da quantidade inicial de KNO_3 por unidade de volume) e X_2 (valor codificado da quantidade total de NH_4Cl adicionado por unidade de volume de reator)

6.4 Substituição do cloreto de amônio ou nitrato de potássio pela associação dos sais e suas ramificações no processo de produção de *Spirulina platensis*

Na produção comercial de *Spirulina*, fatores como a composição do meio de cultura devem ser levados em consideração (RICHMOND, 1989). O sucesso para a produção comercial em larga escala desta cianobactéria depende do desenvolvimento de um cultivo econômico e eficaz – 15 a 25 % do custo total com a produção de cianobactérias é referente ao meio de cultivo (BELAY, 1997). A fonte de nitrogênio merece destaque, pois é o segundo elemento mais abundante da biomassa de *Spirulina*, representando até cerca de 10 % do total (CORNET *et al.*, 1992).

A aplicação de cloreto de amônio como fonte de nitrogênio apresenta diversas vantagens. Além de ser uma fonte mais barata, em comparação com as fontes tradicionais (nitratos), é prontamente assimilada pelo microrganismo (BOUSSIBA, 1989), dispensando gastos de energia por parte deste. É tóxica, quando em altas concentrações (ABELIOVICH; AZOV, 1976), porém *Spirulina* é um dos poucos microrganismos que suporta meios com amônia, e a utilização desta fonte previne e/ou reduz a contaminação dos cultivos (BELKIN; BOUSSIBA, 1991), que são, a nível comercial, desenvolvidos em tanques abertos, e, portanto, susceptíveis à contaminação. Tal toxicidade da amônia à cianobactéria em questão pode ser contornada pela aplicação do processo descontínuo alimentado e vazões de alimentação exponencialmente crescentes, como proposto neste trabalho e em outros já publicados (DANESI *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2004).

Porém, o uso exclusivo de cloreto de amônio como fonte de nitrogênio em cultivos de *Spirulina* leva a baixos valores de concentração celular e biomassa final com conteúdos de clorofila, lipídios e proteínas reduzidos, como pode ser observado nos cultivos de referência deste trabalho para cloreto de amônio (R_{A1} e R_{A2}). Isso se deve ao fato de que a amônia é volátil, e parte da fonte adicionada evapora (CARVALHO *et al.*, 2004), levando à deficiência de nitrogênio; tais fenômenos foram observados no decorrer dos cultivos pela coloração amarelada das culturas de referência até aproximadamente o décimo dia de cultivo.

A associação de nitrato de potássio e cloreto de amônio propicia contornar as dificuldades encontradas quando da utilização exclusiva e isolada de tais fontes em tanques abertos. A presença de nitrato impede a deficiência de nitrogênio em cultivos com amônia, e a presença de amônia permite a redução da quantidade de nitrato usada, colaborando para a redução de custos. Como foi mostrado neste trabalho, é possível a utilização de menores

quantidades de nitrato de potássio, devido à complementação dos cultivos com cloreto de amônio. As quantidades residuais de nitrato dos cultivos com associação de fontes de nitrogênio foram muito menores que aquelas dos cultivos de referência para esta fonte, diminuindo a salinidade final do meio de cultivo, colaborando quando do tratamento e dispensação do efluente.

Para a seguinte avaliação do custo das fontes de nitrogênio, foram consideradas as médias dos cultivos do ponto ótimo referentes à concentração celular (O_1-O_5), e dos cultivos de referência para cloreto de amônio (R_A) e nitrato de potássio (R_N).

Após uma pesquisa com cinco fornecedores brasileiros de reagentes químicos, foram obtidos os valores médios de R\$ 969,53 cada 2,5 kg de KNO_3 e R\$ 439,72 cada 2,5 kg de NH_4Cl (moeda atual – Real). A Tabela 38 mostra os custos com as fontes de nitrogênio em relação aos cultivos considerados nesta avaliação.

Tabela 38 – Quantidade de fonte de nitrogênio, concentração celular máxima média, e custos com as fontes de nitrogênio e por massa de células

Cultivos	KNO_3 (mmol · L ⁻¹)	NH_4Cl (mmol · L ⁻¹)	X_m (média) (mg · L ⁻¹)	Custo com nitrogênio	Custo por quilograma de células
O_1-O_5	15,4	14,1	4285	R\$ 3,68	R\$ 182,53
R_A	-	21,5	2069	R\$ 1,01	R\$ 111,33
R_N	25,4	-	4200	R\$ 4,98	R\$ 250,08

R\$ 1,00 (Real) = £\$ 0,39 (Euro) / U\$ 0,61 (Dólar Americano)

(valores comerciais em 16 de maio de 2008 segundo Banco Central do Brasil).

As condições da associação do cloreto de amônio e nitrato de potássio para otimização da concentração celular máxima promovem a obtenção de 107 % a mais de células quando comparada com o uso isolado de cloreto de amônio, com um aumento de custo de cerca de 64 % por célula, em relação à fonte de nitrogênio. Apesar deste aumento, devem ser levados em consideração: o aumento de produtividade, com conseqüente utilização de menor área útil de produção; o menor volume de efluentes gerados por processo; a diminuição de custos com separação da biomassa; o melhor aproveitamento dos demais sais que constituem o meio de cultura; e, de maneira geral, um melhor aproveitamento de custos fixos, entre outros. Deve ser

considerado também que os cultivos foram desenvolvidos todos em escala laboratorial, e que uma otimização rigorosa em escala piloto deveria ser realizada para que as informações de custos providas aqui possam gerar dados aplicáveis à indústria.

Embora a condição de otimização da concentração celular máxima tenha gerado cultivos com maiores custos, pôde ser verificado dentre os outros cultivos com associação de fontes de nitrogênio (cultivos experimentais) que uma pequena complementação de nitrato de potássio é o suficiente para que haja um favorecimento do crescimento celular. No cultivo experimental E₆ (KNO₃, 5,10 mmol · L⁻¹; NH₄Cl, 15,0 mmol · L⁻¹), por exemplo, foram obtidas 3506 mg · L⁻¹ de células, ao valor de R\$ 104,76 cada quilograma destas (R\$ 0,10 o grama de célula), em relação ao nitrogênio; o custo com a fonte de nitrogênio é menor que aquele do cultivo de referência para cloreto de amônio, e puderam ser obtidas 1437 mg · L⁻¹ de células a mais. Para a avaliação das vantagens e desvantagens dessa informação de custo e produtividade, em âmbito laboratorial ou comercial, são válidas as mesmas considerações feitas no parágrafo anterior.

Em relação ao uso isolado de nitrato de potássio, a associação de fontes de nitrogênio levou a um aumento de X_m de somente 2 %, porém o custo com fonte de nitrogênio foi reduzido em cerca de 28 %. A vantagem econômica da associação é clara quando da comparação com cultivos de referência que utilizam nitrato.

7 CONCLUSÕES

Este trabalho teve como principal objetivo verificar o efeito da adição de nitrato de potássio em cultivos de *Spirulina (Arthrospira) platensis* realizados com cloreto de amônio. Foi possível observar que a associação destas fontes de nitrogênio proporcionou o desenvolvimento de cultivos com altos valores de concentração celular máxima – da grandeza de até $4,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; valores estes bastante superiores aos alcançados nos cultivos onde se utilizou apenas cloreto de amônio como fonte de nitrogênio ($2,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Propõe-se que a associação de fontes é importante pois impede que haja carência de nitrogênio durante o decorrer do cultivo, carência esta comum em cultivos com sais de amônio, evidente pela coloração inicial amarelada da cultura. Além disso, tal associação permite a obtenção de biomassa com maior conteúdo de clorofila, lipídios e proteínas.

A partir da análise de regressão múltipla, foi possível ajustar modelos para correlacionar concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_X), e fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), com os níveis codificados das quantidades de KNO_3 (X_1) e NH_4Cl (X_2). Para os cultivos com a associação das fontes de nitrogênio, o modelo ajustado para relacionar X_m com X_1 e X_2 permitiu a otimização das condições de cultivo para tal parâmetro, com quantidades de $15,4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de KNO_3 e $14,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de NH_4Cl , e com uma concentração celular máxima esperada de $4450 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Em testes de confirmação do modelo (cultivos de ponto ótimo), chegou-se a um valor médio de X_m de $4284 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Por fim, destaca-se que a utilização de cloreto de amônio em associação com o nitrato de potássio em cultivos de *S. platensis* permite a redução dos custos com o meio de cultura, uma vez que a fonte amoniacal é cerca de 40 % mais barata que a fonte padrão (nitratos). Isso, associado à redução dos riscos de contaminação dos cultivos, devido ao uso de NH_4Cl , e à redução da salinidade dos resíduos gerados, devido à diminuição da quantidade de KNO_3 utilizada, torna cultivos com associação de tais fontes de nitrogênio uma alternativa vantajosa para a produção desta cianobactéria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

AARONSON, S.; DUBINSKY, Z. Mass production of microalgae. **Birkhäuser Basel**, v. 38, n. 1, p. 36-40, Jan. 1982.

ABELIOVICH, A.; AZOV, Y. Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 31, n. 6, p. 801-806, June 1976.

ANNAPURNA, V.V.; DEOSTHALE, Y.G.; BAMJI, M.S. *Spirulina* as a source of vitamin A. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 41, n. 2, p. 125-134, Apr. 1991.

ANUPAMA, R.P. Value-added food: single cell protein. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 6, p. 459-479, Oct. 2000.

AOAC Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 14th ed. Arlington: AOAC, 1984. 1141 p.

ASHBY, M.K.; HOUMARD, J. Cyanobacterial two-component proteins: structure, diversity, distribution, and evolution. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, n. 2, p. 472-509, June 2006.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 3a ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2001. 300 p.

BECKER, E.W. Algae mass cultivation – production and utilization. **Processes in Biochemistry**, v. 16, n. 5, p. 10-14, 1981.

BECKER, E.W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. London: Cambridge University Press, 1994. 301 p.

BELAY, A. Mass culture of *Spirulina* outdoors: the earthrise farms experience. In: VONSHAK, A. (Ed.). ***Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology***. London: Taylor and Francis, 1997. Cap. 8, p. 131-158.

BELKIN, S.; BOUSSIBA, S. High internal pH conveys ammonia resistance in *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 38, n. 2-3, p. 167-169, - 1991.

BENEMAN, J.R. Microalgae products and production: an overview. In: PIERCE, G.E. (Ed.). **Developments in Industrial Biotechnology**. New York: Elsevier, 1990. Vol. 31, p. 247-256.

BERTOLIN, T.B.P.; COSTA, J.A.V.; BERTOLIN, T.E.; COLLA, L.M.; HEMKEMEIER, M. Cultivo da cianobactéria *Spirulina platensis* a partir do efluente sintético de suíno. **Ciências e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 118-125, jan-fev. 2005.

BEZERRA, R.P. **Influência do tempo de alimentação e da intensidade luminosa no cultivo de *Spirulina platensis* sob alimentação com cloreto de amônio**. 2006. 153 p. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.

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

BINAGHI, L.; DEL BORGHI, A.; LODI, A.; CONVERTI, A.; DEL BORGHI, M. Batch and fed-batch uptake of carbon dioxide by *Spirulina platensis*. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 9, p. 1341-1346, Apr. 2003.

BOGORAD, L. Chlorophylls. In: LEWIN, R. A. (Ed.). **Physiology and biochemistry of algae**. New York: Academic Press, 1962. Cap. 23, p. 385-407.

BOROWITZKA, M.A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, n. 1, p. 313-321, Apr. 1999.

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

BRANGER, B.; CADUDAL, J.L.; DELOBEL, M.; OUOBA, H.; YAMEOGO, P.; QUEDRAOGO, D.; GUERIN, D.; VALEA, A.; ZOMBRE, C.; ANCEL, P. *Spirulina* as a food supplement in case of infant malnutrition in Burkina Faso. **Archives de Pédiatrie**, v. 10, n. 5, p. 424-431, May 2003.

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

CARVAJAL, N.; FERNANDES, M.; RODRIGUES, J.P.; DONOSO, M. Urease of *Spirulina maxima*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2821-2823, - 1982.

CARVALHO, J.C.M.; FRANCISCO, F.R.; ALMEIDA, K.A.; SATO, S. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Cyanophyceae) by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially increasing feeding rates. **Journal of Phycology**, v. 40, n. 3, p. 589-597, June 2004.

CASTENHOLZ, R.W. Subsection III, order *Oscillatoriales*. In: STANLEY, J.T. *et al.* (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Vol. 3. Baltimore: William and Wilkins, 1989. -, p. 1771.

CHEN, F.; ZHANG, Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, n. 3, p. 221-224, Feb. 1997.

CHEN, H.; PAN, S. Bioremediation potential of *Spirulina*: toxicity and biosorption studies of lead. **Journal of Zhejiang University SCIENCE**, v. 6B, n. 3, p. 171-174, Mar. 2005.

CHOJNACKA, K.; CHOJNACKI, A.; GÓRECKA, H. Trace element removal by *Spirulina* sp. from copper smelter and refinery effluents. **Hydrometallurgy**, v. 73, n. 1-2, p. 147-153, Apr. 2004.

CHRONAKIS, I.S.; GALATANU, A.N.; NYLANDER, T.; LINDMAN, B. The behavior of protein preparations from blue-green algae (*Spirulina platensis* strain Pacifica) at the air/water interface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 173, n. 1, p. 181-192, Nov. 2000.

CIFERRI, O. *Spirulina*, the edible microorganism. **Microbiological Reviews**, v. 47, n. 4, p. 551-578, - 1983.

COHEN, Z. The chemicals of *Spirulina*. In: VONSHAK, A. (Ed.). *Spirulina platensis (Arthrospira)*: physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor and Francis, 1997. Cap. 10, p. 175-204.

COLLA, L.M.; REINEHR, C.O.; REICHERT, C.; COSTA, J.A.V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, V. 98, n. 7, p. 1489-1493, May 2007.

CONVERTI, A.; SCAPAZZONI, S.; LODI, A.; CARVALHO, J.C.M. Ammonium and urea removal by *Spirulina platensis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 8-16, Jan. 2006a.

CONVERTI, A.; LODI, A.; SOLISIO, C.; SOLETTI, D.; DEL BORGHI, M.; CARVALHO, J.C.M. *Spirulina platensis* biomass as adsorbent for copper removal. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v. 5, n. 2, p. 85-88, Jul. 2006b.

CORNET, J.F.; DUSSAP, C.G.; CLUZEL, P.; DUBERTRET, G. A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photobioreactors: II. Identification of kinetic parameters under light and mineral limitations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, n. 7, p. 826-834, Oct. 1992.

COSTA, J.A.V.; COZZA, K.L.; OLIVEIRA, L.; MAGAGNIN, G. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 439-442, July 2001.

DANESI, E.D.G. **Cultivo de *Spirulina platensis* por processo descontínuo alimentado para obtenção de clorofila**. 2001. 214 p. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.

DANESI, E.D.G.; RANGEL-YAGUI, C.O.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, n. 4, p. 261-269, Oct. 2002.

DANESI, E.D.G.; RANGEL-YAGUI, C.O.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Effect of reducing the light intensity in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 26, n. 4, p. 329-335, Apr. 2004.

DERNER, R.B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S.M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, nov-dez. 2006.

DILLON, J.C.; PHUC, A.P.; DUBACQ, J.P. Nutritional value of the alga *Spirulina*. In: SIMOPOULOS, A. P. (Ed.). **World review of nutrition and dietetics**: plants in human nutrition. v. 77. Basel: Karger, 1995. Cap. 5, p. 32-46.

DURAND-CHASTEL, H. Production and use of *Spirulina* in Mexico. In: SHELEF, G.; SOEDER, C.J. (Eds.). **Algae biomass**: production and use. Amsterdam: Elsevier / North Holland Biochemical Press, 1980. p. 51-64.

ECHEGARAY, O.F.; CARVALHO, J.C.M.; FERNANDES, A.N.R.; SATO, S.; AQUARONE, E.; VITOLO, M. Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugar-cane blackstrap molasses: invertase activity of intact cells in ethanol fermentation. **Biomass and Bioenergy**, v. 19, n. 1, p. 39-50, July 2000.

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

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

FRATELLI, F.; SIQUINI, T.J.; PRADO, S.M.A.P.; HIGASHI, H.G.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J.C.M. Effect of medium composition on the production of tetanus toxin by *Clostridium tetani*. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 3, p. 756-761, June 2005.

GOLDMAN, J.C.; DENNETT, M.R.; RILEY, C.B. Effect of nitrogen-mediated changes in alkalinity on pH control and CO₂ supply in intensive microalgal cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, n. 3, p. 619-631, Mar. 1982.

GUGLIELMI, G.; RIPPKA, R.; TANDEAU DE MARSAC, N. Main properties that justify the different taxonomic position of *Spirulina* spp. and *Arthrospira* spp. among cianobactéria. **Bulletin de l'Institut Océanographique Monaco**, v. 12, numéro special, p. 13-23, - 1993.

HATTORI, A.; MYERS, J. Reduction of nitrate and nitrite by subcellular preparations of *Anabaena cylindrica*: I. Reduction of nitrite to ammonia. **Plant Physiology**, v. 41, n. 6, p. 1031-1036, June 1966.

HENDRY, G.A.F. Chlorophylls and chlorophyll derivatives. In: HENDRY, G.A.F.; HOUGHTON, J.D. (Eds.). **Natural food colorants**. London: Blackie Academic Professional, 1996. Cap. 5, p. 131-155.

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

HERRERO, M.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J.; SEÑORÁNS, F.J.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. **Food Chemistry**, v. 93, n. 3, p. 417-423, Dec. 2005.

HIRANO, M. Gamma-linolenic acid production by microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 24/25, p. 183-191, 1990.

HONGSTHONG, A.; SIRIJUNTARUT, M.; PROMMEENATE, P.; THAMMATHORN, S.; BUNNAG, B.; CHEEVADHANARAK, S.; TANTICHAROEN, M. Revealing differentially expressed proteins in two morphological forms of *Spirulina platensis* by proteomic analysis. **Molecular Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 123-130, June 2007.

JIMÉNEZ, C.; COSSÍO, B.R.; LABELLA, D.; NIELL, F.X. The feasibility of industrial production of *Spirulina* (*Arthrospira*) in Southern Spain. **Aquaculture**, v. 217, n. 1-4, p. 179-190, Mar. 2003.

KIM, M.; CHUNG, W.; LEE, M.; LEE, J.-Y.; OHH, S.; LEE, J.-H.; PARK, D.; LEE, H. Kinetics of removing nitrogenous and phosphorus compounds from swine waste by growth of microalga, *Spirulina platensis*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 455-461, - 2000.

LEDUY, A.; THERIEN, N. An improved method for optical density measurement of the semimicroscopic blue green alga *Spirulina maxima*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 19, n. 8, p. 1219-1224, Aug. 1977.

LEE, H.Y.; ERICKSON, L.E.; YANG, S.S. Kinetics and bioenergetics of light-limited photoautotrophic growth of *Spirulina platensis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 29, n. 7, p. 832-843, May 1977.

LI, Z.; GUO, S.; LIN, L. Study on the process, thermodynamical isotherm and mechanism of Cr(III) uptake by *Spirulina platensis*. **Journal of Food Engineering**, v. 75, n. 1, p. 129-136, July 2006.

LODI, A.; BINAGHI, L.; SOLISIO, C.; CONVERTI, A.; DEL BORGHI, M. Nitrate and phosphate removal by *Spirulina platensis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 656-660, Nov. 2003.

MACEDO, R.V.T.; ALEGRE, R.M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina máxima* em dois níveis de temperatura: parte II - produção de lipídios. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 183-186, maio-ago. 2001.

MATERASSI, R.; TREDICI, M.; BALLONI, W. *Spirulina* culture in sea-water. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 384-386, June 1984.

MATSUDO, M.C. **Cultivo de *Spirulina platensis* por processo descontínuo alimentado repetitivo utilizando uréia como fonte de nitrogênio**. 2006. 103 f. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.

MILLER, A.G.; COLMAN, G. Evidence for HCO_3^- transport by the blue green alga (cyanobacterium) *Coccochloris penicystis*. **Plant Physiology**, v. 65, n. 2, p. 397-402, Feb. 1980.

MORIST, A.; MONTESINOS, J.L.; CUSIDÓ, J.A.; GÒDIA, F. Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 535-547, Dec. 2001.

MOSULISHVILI, L.M.; KIRKESALI, E.I.; BELOKOBYLSKY, A.I.; KHIZANISHVILI, A.I.; FRONTASYEVA, M.V.; PAVLOV, S.S.; GUNDORINA, S.F. Experimental substantiation of the possibility of developing selenium- and iodine-containing pharmaceuticals based on blue-green algae *Spirulina platensis*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, n. 1, p. 87-97, Aug. 2002.

OGBONNA, J.C.; YOSHIZAWA, H.; TANAKA, H. Treatment of high strength organic wastewater by a mixed culture of photosynthetic microorganisms. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3-5, p. 177-284, Oct. 2000.

OLAIZOLA, M.; DUERR, E.O. Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 2, n. 2, p. 97-104, June 1990.

OLGUÍN, E.J.; GALICIA, S.; ANGULO-GUERRERO, O.; HERNÁNDEZ, E. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 1, p. 19-24, Mar. 2001.

OLGUIN, E.J.; GALICIA, S.; MERCADO, G.; PEREZ, T. Annual productivity of *Spirulina* (*Arthrospira*) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, n. 2-3, p. 249-257, Mar. 2003.

PANIAGUA-MICHEL, J.; DUJARDIN, E.; SIRONVAL, C. El *tecuitlatl*, concentrado de algas espirulinas fuente de proteínas comestibles del pueblo de los aztecas. **Cahiers Agricultures**, v.2, [s.n.], p. 283-287, - 1993.

PAOLETTI, C.; PUSHPARAJ, B.; TOMASELLI FEROCI, L. Ricerche sulla nutrizione minerale di *Spirulina platensis*. In: Atti del Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, 17, 26-28 ott. 1975, Padova, Italia. **Società Italiana di Microbiologia**, [s.n.], v. 2, 1975. p. 845-853.

PAOLETTI, C.; VINCENZINI, M.; BOCCI, F.; MATERASSI, R. Composizione biochimica generale delle biomassa di *S. platensis* e *S. maxima*. In: MATERASSI, R. **Prospettive della coltura di *Spirulina* in Italia**. Rome: Consiglio Nazionale delle Ricerche, 1980. p. 111-125.

PARADA, J.L.; CAIRE, G.Z.; MULÉ, M.C.Z.; CANO, M.M.S. Lactic acid bacteria growth promoters from *Spirulina platensis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 225-228, Dec. 1998.

PELIZER, L.H.; DANESI, E.D.G.; RANGEL, C.O.; SASSANO, C.E.N.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S.; MORAES, I.O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **Journal of Food Engineering**, v. 56, n. 4, p. 371-375, Mar. 2003.

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

PENG, W.; WU, Q.; TU, P.; ZHAO, N. Pyrolytic characteristics of microalgae as renewable energy source determined by thermogravimetric analysis. **Bioresource Technology**, v. 80, n. 1, p. 1-7, Oct. 2001.

PIERCE, W.C.; HAENISCH, E.L. **Quantitative analysis**. 3rd ed. New York: John Wiley and Sons, 1948. 519 p.

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

RANGEL, C.O. **Influência da luz e uréia no crescimento e conteúdo de clorofila da biomassa de *Spirulina platensis***. 2000. 132 f. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.

RANGEL-YAGUI, C.O.; DANESI, E.D.G.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 2, p. 133-141, Apr. 2004.

REED, G.; NAGODAWITHANA, T.W. (Ed.). **Enzymes, biomass, food and feed**. 2nd ed. (Biotechnology, Vol. 9). Weinheim: VHC, 1995. 804 p.

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

RICHMOND, A.; QIANG, H. Principles for efficient utilization of light for mass production of photoautotrophic microorganisms. In: Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 18, 1996, Gatlinburg, Tennessee. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Human Press, v. 63-65, 1997. p. 649-658.

RODRIGUES, M.S.; FERREIRA, L.S.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Determinação de nitrato em meio de cultivo de *Spirulina platensis*. In: Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 21, 16-20 out. 2006, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, v. 42, supl. 1, 2006. p. 86.

SAMSON, R.; LEDUY, A. Biogas production from anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algal biomass. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, n. 8, p. 1919-1924, Aug. 1982.

SÁNCHEZ-LUNA, L.D.; CONVERTI, A.; TONINI, G.C.; SATO, S.; CARVALHO, J.C.M. Continuous and pulse feedings of urea as a nitrogen source in fed-batch cultivation of *Spirulina platensis*. **Aquacultural Engineering**, v. 31, n. 3-4, p. 237-245, 2004.

SÁNCHEZ-LUNA, L.D.; BEZERRA, R.P.; MATSUDO, M.C.; SATO, S.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J.C.M. Influence of pH, temperature, and urea molar flowrate on *Arthrospira platensis* fed-batch cultivation: a kinetic and thermodynamic approach. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 4, p. 702-711, Sep. 2006.

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

SASSANO, C.E.N.; GIOIELLI, L.A.; ALMEIDA, K.A.; SATO, S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J.C.M. Cultivation of *Spirulina platensis* by continuous process using ammonium chloride as nitrogen source. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, n. 8, p. 593-598, Aug. 2007.

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

SEDYKH, E.M.; LYABUSHEVA, O.; TAMBIEV, A.; BANNYKH, L. Determination of the elemental composition of cyanobacteria cells and cell fractions by atomic emission and atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 29-33, Jan. 2005.

SHIMAMATSU, H. Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. **Hydrobiologia**, v. 512, n. 1, p. 39-44, Jan. 2004.

SOLETTO, D.; BINAGHI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J.C.M.; CONVERTI, A. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. **Aquaculture**, v. 243, n. 1-4, p. 217-224, Jan. 2005.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, Mar. 2006.

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

SUKAN, F. V. Cyanobacterial biotechnology (book review). **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 25, n. 4, p. 377-380, Apr. 2000.

SYRETT, P.J. Nitrogen assimilation. In: LEWIN, R. A. (Ed.). **Physiology and biochemistry of algae**. New York: Academic Press, 1962. Cap. 10, p. 171-187.

TOMASELLI, L. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira (Spirulina) maxima* and *Arthrospira (Spirulina) platensis*. In: VONSHAK, A. (Ed.). ***Spirulina platensis (Arthrospira)*: physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor and Francis, 1997b. Cap. 1, p. 1-15.

TROTTA, P. A simple and inexpensive system for continuous monoxenic mass culture of marine microalgae. **Aquaculture**, v. 22, n. 4, p. 383-387, 1978.

TSUKADA, O.; KAWAHARA, T.; MIYACHI, S. Mass culture *Chlorella* in Asian countries. In: MITSUI, A. *et al.* (Eds.). **Biological solar energy conversion**. New York: Academic Press, 1977. p. 363-365.

UTEX The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin. Algae Detail. <<http://www.utex.org/>>. Acessado em 15 de abril de 2008.

VOGEL, A.I. **Análise química quantitativa**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2002. 462 p.

VONSHAK, A. (Ed.). ***Spirulina platensis (Arthrospira)*: physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor and Francis, 1997a. 233 p.

VONSHAK, A. *Spirulina*: growth, physiology and biochemistry. In: VONSHAK, A. (Ed.). ***Spirulina platensis (Arthrospira)*: physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor and Francis, 1997b. Cap. 3, p. 43-65.

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

ZENG, M.; VONSHAK, A. Adaptation of *Spirulina platensis* to salinity-stress. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular and Integrative Physiology**, v. 120, n. 1, p. 113-118, May 1998.

APÊNDICE

Gráfico 19. Cultivo E_1 – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo

Gráfico 20. Cultivo E_1 – concentração de carbonato total (♦) e nitrato (■) em função do tempo

Gráfico 21. Cultivo E₁ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo

Gráfico 22. Cultivo E₂ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo

Gráfico 23. Cultivo E₂ – concentração de carbonato total (♦) e nitrato (■) em função do tempo

Gráfico 24. Cultivo E₂ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo

Gráfico 25. Cultivo E₃ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo

Gráfico 26. Cultivo E₃ – concentração de carbonato total (♦) e nitrato (■) em função do tempo

Gráfico 27. Cultivo E₃ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo

Gráfico 28. Cultivo E₄ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo

Gráfico 29. Cultivo E₄ – concentração de carbonato total (♦) e nitrato (■) em função do tempo

Gráfico 30. Cultivo E₄ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo

Gráfico 31. Cultivo E_5 – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo

Gráfico 32. Cultivo E_5 – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo

Gráfico 33. Cultivo E₅ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo

Gráfico 34. Cultivo E₆ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo

Gráfico 35. Cultivo E₆ – concentração de carbonato total (♦) e nitrato (■) em função do tempo

Gráfico 36. Cultivo E₆ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo

Gráfico 37. Cultivo E_7 – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo

Gráfico 38. Cultivo E_7 – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo

Gráfico 39. Cultivo E₇ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo

Gráfico 40. Cultivo E₈ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo

Gráfico 41. Cultivo E₈ – concentração de carbonato total (♦) e nitrato (■) em função do tempo

Gráfico 42. Cultivo E₈ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo

Gráfico 43. Cultivo E_9 – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo

Gráfico 44. Cultivo E_9 – concentração de carbonato total (♦) e nitrato (■) em função do tempo

Gráfico 45. Cultivo E₉ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo

Gráfico 46. Cultivo E₁₀ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo

Gráfico 47. Cultivo E₁₀ – concentração de carbonato total (♦) e nitrato (■) em função do tempo

Gráfico 48. Cultivo E₁₀ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo

Gráfico 49. Cultivo E_{11} – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo

Gráfico 50. Cultivo E_{11} – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo

Gráfico 51. Cultivo E₁₁ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo

Gráfico 52. Cultivo E₁₂ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo

Gráfico 53. Cultivo E₁₂ – concentração de carbonato total (♦) e nitrato (■) em função do tempo

Gráfico 54. Cultivo E₁₂ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo

Gráfico 55. Cultivo E₁₃ – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo

Gráfico 56. Cultivo E₁₃ – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo

Gráfico 57. Cultivo E_{13} – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo

Gráfico 58. Cultivo E_{14} – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo

Gráfico 59. Cultivo E₁₄ – concentração de carbonato total (♦) e nitrato (■) em função do tempo

Gráfico 60. Cultivo E₁₄ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo

Gráfico 61. Cultivo O_1 – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo

Gráfico 62. Cultivo O_1 – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo

Gráfico 63. Cultivo O_1 – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo

Gráfico 64. Cultivo O_2 – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo

Gráfico 65. Cultivo O₂ – concentração de carbonato total (♦) e nitrato (■) em função do tempo

Gráfico 66. Cultivo O₂ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo

Gráfico 67. Cultivo O_3 – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo

Gráfico 68. Cultivo O_3 – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo

Gráfico 69. Cultivo O_3 – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo

Gráfico 70. Cultivo O_4 – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo

Gráfico 71. Cultivo O₄ – concentração de carbonato total (♦) e nitrato (■) em função do tempo

Gráfico 72. Cultivo O₄ – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo

Gráfico 73. Cultivo O_5 – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo

Gráfico 74. Cultivo O_5 – concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo

Gráfico 75. Cultivo O_5 – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo

Gráfico 76. Cultivo R_{A1} – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo

Gráfico 77. Cultivo R_{A1} – concentração de carbonato total (♦) em função do tempo

Gráfico 78. Cultivo R_{A1} – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo

Gráfico 79. Cultivo R_{A2} – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo

Gráfico 80. Cultivo R_{A2} – concentração de carbonato total (◆) em função do tempo

Gráfico 81. Cultivo R_{A2} – logaritmo da concentração de amônia (+) em função do tempo

Gráfico 82. Cultivo R_{N1} – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo

Gráfico 83. Cultivo R_{N1} – concentração de carbonato total (♦) e nitrato (■) em função do tempo

Gráfico 84. Cultivo R_{N2} – concentração celular (●) e valor de pH (▲) em função do tempo

Gráfico 85. Cultivo R_{N_2} – concentração de carbonato total (♦) e nitrato (■) em função do tempo