UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Área de Tecnologia de Fermentações

**Cultivo contínuo de *Arthrospira (Spirulina) platensis* em
fotobiorreator tubular utilizando uréia como fonte de nitrogênio
e CO₂ puro ou proveniente de fermentação alcoólica**

MARCELO CHUEI MATSUDO

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

São Paulo

2010

Ficha Catalográfica

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

Matsudo, Marcelo Chuei

M434c Cultivo contínuo de *Arthrospira (Spirulina) platensis* em fotobiorreator tubular utilizando uréia como fonte de nitrogênio e CO₂ puro ou proveniente de fermentação alcoólica / Marcelo Chuei Matsudo. -- São Paulo, 2010.
145p.

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

Orientador: Carvalho, João Carlos Monteiro de

1. Biomassa microbiana : Bioquímica industrial 2. Biotecnologia 3. Microbiologia industrial I. T. II. Carvalho, João Carlos Monteiro de, orientador.

660.63 CDD

Marcelo Chuei Matsudo

**Cultivo contínuo de *Arthrospira (Spirulina) platensis* em
fotobiorreator tubular utilizando uréia como fonte de nitrogênio
e CO₂ puro ou proveniente de fermentação alcoólica**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

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

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo,de..... de 2010.

*Dedido à minha mãe Hatsuko e ao meu pai Chuken,
por sempre priorizarem a educação dos seus filhos.*

AGRADECIMENTOS

Pela dedicação irrestrita, pela confiança, por compartilhar seus conhecimentos, suas experiências e seus ditados e pela valiosa orientação, ao Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho, meus sinceros agradecimentos.

À Fapesp (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa de doutorado e do “Auxílio a Pesquisa”.

Ao Prof. Tit. Sunao Sato, pelo apoio, incentivo e pelas orientações quando da realização do estágio acadêmico no Japão.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia de Fermentações e do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica pela convivência, pela amizade e pelo apoio. À Raquel, pelas discussões, por compartilhar seus conhecimentos e suas experiências, pelos trabalhos em equipe. À Lívia, pela amizade, discussões e apoio. Ao estagiário Fábio, cuja ajuda foi importante na fase de construção dos fotobiorreatores.

À minha família: meu pai, meus irmãos, meus cunhados e meus sobrinhos, por sempre me apoiarem e pela família que somos. Agradeço em especial a minha mãe, por me ouvir, me apoiar e me encorajar na busca de “meu lugar ao Sol”.

Aos professores de algumas disciplinas que cursei durante o curso de doutorado, por compartilharem conhecimentos que foram importantes para minha formação.

Aos funcionários da biblioteca do Conjunto das Químicas, do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, da Secretaria de Pós-Graduação e da Vigilância da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Aos meus amigos da época da Unesp, de São Paulo e do Crusp pela amizade e pelo apoio, em especial ao Artemir e ao Jony por sempre me ouvirem, pelos conselhos e pelo incentivo.

À Coseas pela concessão da vaga no Crusp.

"A ciência serve para nos dar uma idéia de quão extensa é a nossa ignorância."

(Félicité Robert de Lamennais)

"A natureza jamais produz coisas de qualidade excelente para serem mal usadas ou não terem utilidade."

(John Locke)

RESUMO

MATSUDO, M. C. **Cultivo contínuo de *Arthrospira (Spirulina) platensis* em fotobiorreator tubular utilizando uréia como fonte de nitrogênio e CO₂ puro ou proveniente de fermentação alcoólica.** 2010. 145p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A aplicabilidade do processo de produção de microrganismos fotossintetizantes depende da obtenção de altas concentrações de biomassa e para isso seria interessante o emprego de fotobiorreatores tubulares. Eles permitem redução da área de cultivo e menor perda de CO₂ e nitrogênio amoniacal por volatilização. Em uma primeira etapa deste trabalho, *Arthrospira platensis* foi cultivada por processo contínuo, avaliando-se diferentes valores de vazão específica de alimentação ($D = 0,2$ a $1,0 \text{ dia}^{-1}$) e diferentes intensidades luminosas ($I = 60$ e $120 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Verificou-se que $120 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ associada a D igual a $0,2 \text{ dia}^{-1}$ resultou em maior valor de concentração celular em regime permanente ($X_P = 2446 \pm 74 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), mas o mesmo I associado a maior valor de D ($0,6 \text{ dia}^{-1}$) levou ao melhor valor de produtividade em células ($P_X = 938,73 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$). Foi possível a obtenção do regime permanente em quase todos os ensaios, o que indica que o cultivo contínuo de *A. platensis* em fotobiorreator tubular, usando uréia como fonte de nitrogênio, pode levar a resultados satisfatórios. Considerando a preocupação em relação à substituição de combustíveis fósseis por biocombustíveis, é iminente o crescente aumento da produção de etanol ainda nos próximos anos, e esse trabalho propõe o uso do CO₂ liberado pela fermentação alcoólica na produção de microrganismos fotossintetizantes como *A. platensis*. Para isso, em uma segunda etapa, *A. platensis* foi cultivada por processo contínuo, com I igual a $120 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, empregando uréia e CO₂ proveniente de fermentação alcoólica para manutenção de pH e reposição da fonte de carbono. O uso desse CO₂, sem tratamento prévio, associado a D igual a $0,6 \text{ dia}^{-1}$ e concentração de uréia de $3,2 \text{ mM}$ no meio de alimentação, permitiu a obtenção de P_X igual a $839 \pm 25 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, o que está próximo de $938 \pm 30 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, obtido com CO₂ puro de cilindro. Estes resultados mostram que o uso de CO₂ de fermentação alcoólica, associado a uréia, é adequado para cultivo contínuo de biomassa fotossintetizante de potencial interesse na área farmacêutica, alimentícia e de cosméticos, promovendo não só a redução no custo de produção mas também outros benefícios relacionados a questões ambientais e sociais.

Palavras-chave: *Arthrospira (Spirulina) platensis*. Processo contínuo. Fermentação alcoólica. CO₂. Uréia.

ABSTRACT

MATSUDO, M. C. **Continuous cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in tubular photobioreactor using urea as nitrogen source and CO₂ from cylinder or produced by alcoholic fermentation.** 2010. 145p. PhD Thesis – Faculty of Pharmaceutical Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Appropriately designed tubular photobioreactors seem to be suitable for photosynthetic biomass production. It can reduce the cultivation area and provide lower loss of CO₂ and ammoniacal nitrogen by volatilization. In a first step of this study, *Arthrospira platensis* was cultivated by continuous process, testing different values of dilution rate ($D = 0.2$ to 1.0 d^{-1}) and light intensities ($I = 60$ and $120 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). The results of these runs showed that the maximum steady-state cell concentration ($X_S = 2446 \pm 74 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) was achieved at $120 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ and D of 0.2 d^{-1} , but the same light intensity associated to higher dilution rate (0.6 d^{-1}) provided the highest cell productivity ($P_X = 938 \pm 30 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), a value appreciably higher than that reported in other studies. Besides, steady-state conditions were achieved in most of the runs indicating that *A. platensis* continuous cultivation in the tubular photobioreactor, using urea as nitrogen source, can be performed effectively, thus appearing an interesting alternative for the large scale fixation of carbon dioxide to mitigate the green house effect. Taking into account the concern about the substitution of fossil fuel with biofuels, it's evident that the ethanol production is going to increase even more in the next years, and this study propose the use of the CO₂ released by the alcoholic fermentation for the production of photosynthetic microorganism such as *A. platensis*. For this purpose, in a second step, cultivations of *A. platensis* were carried out with $120 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ by continuous process, using urea and CO₂ from Alcoholic fermentation for pH maintenance and carbon source replacement. The use of this CO₂, without any treatment, associated with a D of 0.6 d^{-1} and feed urea concentration of 3.2 mM provide us a P_X of $839 \pm 25 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, which is slightly lower than $938 \pm 30 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, obtained with pure CO₂ from cylinder. Our results showed that the use of CO₂ from alcoholic fermentation, associated with urea, is suitable for the continuous cultivation cyanobacterial biomass, providing not only the production cost reduction but also other benefits related to environmental and social issues.

Key words: *Arthrospira (Spirulina) platensis*. Continuous process. Alcoholic Fermentation. CO₂. Urea.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Arthrospira platensis (UTEX 1926).....	22
Figura 2 Produção de etanol no Brasil.	45
Figura 3 Fotobiorreator tubular.....	51
Figura 4 Curva de calibração para determinação da concentração celular de Spirulina platensis.....	53
Figura 5 Curva de calibração para determinação da concentração de amônia total em meio de cultivo.....	54
Figura 6 Concentração celular (X) ao longo do tempo.....	63
Figura 7 Logaritmo neperiano da concentração celular (Ln X) em função do tempo.....	64
Figura 8 Concentração celular (X) em função do tempo do ensaio padrão, utilizando Nitrato de Sódio como fonte de nitrogênio.....	66
Figura 9 Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 1.....	70
Figura 10 Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 2	72
Figura 11 Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 3	74
Figura 12 Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 4.....	76
Figura 13 Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 5	78
Figura 14 Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 6	80
Figura 15 Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 7	82
Figura 16 Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 8	84
Figura 17 Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 9	86
Figura 18 Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 10	88
Figura 19 Esquema da assimilação da amônia proveniente de uréia e nitrato de sódio.....	92
Figura 20 Porcentagem de Amônia e Amônio em Função do pH.	94
Figura 21 Concentração celular obtida no regime permanente (X_P) em função da vazão específica de alimentação de meio contendo uréia em duas diferentes intensidades luminosas.....	95
Figura 22 Produtividade em células no regime permanente (P_X) em função da vazão específica de alimentação de meio contendo uréia em duas diferentes intensidades luminosas.....	97

Figura 23	Fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função da vazão específica de alimentação de meio contendo uréia em duas diferentes intensidades luminosas:	99
Figura 24	Teor de proteínas em função da vazão específica de alimentação (D) em duas diferentes intensidades luminosas.....	102
Figura 25	Teor de lipídios em função da vazão específica de alimentação (D) em duas diferentes intensidades luminosas.....	103
Figura 26	$\ln X$ em função do tempo.....	105
Figura 27	Concentração celular no regime permanente (X_P), Etanol e ART (açúcar redutor total) para $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$	107
Figura 28	Concentração celular no regime permanente (X_P), Etanol e ART (açúcar redutor total) para $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$	107
Figura 29	Concentração celular no regime permanente (X_P), Etanol e ART (açúcar redutor total) para $D = 0,025 \text{ h}^{-1}$	108
Figura 30	Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 11	113
Figura 31	Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 12	115
Figura 32	Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 13	117
Figura 33	Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 14	119
Figura 34	Médias de concentração celular em regime permanente (X_P) em função da vazão específica de alimentação (D), empregando diferentes fontes de CO_2	121
Figura 35	Fator de Conversão de nitrogênio em células no regime permanente ($Y_{X/N}$) em função da vazão específica de alimentação (D), empregando diferentes fontes de CO_2	122
Figura 36	Produtividade em células no regime permanente (P_X) em função da vazão específica de alimentação (D), empregando diferentes fontes de CO_2	123
Figura 37	Teor de proteínas em função da vazão específica de alimentação (D) empregando diferentes fontes de CO_2	126
Figura 38	Teor de lipídios em função da vazão específica de alimentação (D) empregando diferentes fontes de CO_2	127

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Produtos de Microalgas e Cianobactérias.....	21
Tabela 2 Composição de aminoácidos de proteínas de <i>S. platensis</i> e <i>S. maxima</i> (mg.g ⁻¹ proteína bruta Nx6,25) em comparação com o recomendado pela FAO (Food and Agriculture Organization) para crianças pré-escolares.....	26
Tabela 3 Matriz de ensaio.....	60
Tabela 4 Resultados obtidos no teste para verificação da homogeneidade do fotobiorreator tubular.....	63
Tabela 5 Ensaio padrão: Cultivo de <i>Arthrospira platensis</i> utilizando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio.....	65
Tabela 6 Concentração celular (X), Carbonato Total, Amonia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 1	69
Tabela 7 Concentração celular (X), Carbonato Total, Amonia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 2	71
Tabela 8 Concentração celular (X), Carbonato Total, Amonia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 3	73
Tabela 9: Concentração celular (X), Carbonato Total, Amonia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 4	75
Tabela 10 Concentração celular (X), Carbonato Total, Amonia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 5	77
Tabela 11 Concentração celular (X), Carbonato Total, Amonia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 6	79
Tabela 12 Concentração celular (X), Carbonato Total, Amonia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 7	81
Tabela 13 Concentração celular (X), Carbonato Total, Amonia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 8	83
Tabela 14 Concentração celular (X), Carbonato Total, Amonia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 9	85
Tabela 15 Concentração celular (X), Carbonato Total, Amonia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 10	87
Tabela 16 Concentração celular média em regime permanente (X _P); parâmetros cinéticos: produtividade em células (P _X) e Fator de Conversão de Nitrogênio em Células (Y _{X/N}) dos ensaios realizados.....	89

Tabela 17	Taxa de remoção de nitrogênio amoniacal do meio de cultivo nos diferentes ensaios.....	91
Tabela 18	Análise estatística de variância (ANOVA) aplicada aos dados experimentais de concentração celular média no regime permanente (XP).	96
Tabela 19	Análise estatística de variância (ANOVA) aplicada aos dados experimentais de produtividade em células (Px).....	97
Tabela 20	Análise estatística de variância (ANOVA) aplicada aos dados experimentais de fator de conversão de nitrogênio em células (YX/N).	99
Tabela 21	Teor de proteínas e lipídios na biomassa seca de <i>Arthrospira platensis</i> obtida nos ensaios.....	101
Tabela 22	Análise estatística de variância (ANOVA) aplicada aos teores de proteínas.....	103
Tabela 23	Análise estatística de variância (ANOVA) aplicada aos teores de lipídios.....	104
Tabela 24	Variação da concentração de leveduras em função do tempo..	105
Tabela 25	Valores de XP, ART, Etanol e Rendimento do processo, no regime permanente, para os diferentes valores de D, com ART inicial igual a 170 g.L-1.....	106
Tabela 26	Concentração celular (X), Carbonato Total, Amonia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 11	112
Tabela 27	Concentração celular (X), Carbonato Total, Amonia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 12	114
Tabela 28	Concentração celular (X), Carbonato Total, Amonia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 13	116
Tabela 29	Concentração celular (X), Carbonato Total, Amonia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 14	118
Tabela 30	Concentração celular média em regime permanente (XP) e parâmetros cinéticos: produtividade em células (PX) e Fator de Conversão de Nitrogênio em Células (YX/N) dos ensaios realizados com CO2 proveniente de Fermentação Alcoólica.....	120
Tabela 31	Análise estatística de variância (ANOVA) aplicada aos dados experimentais de concentração celular média no regime permanente (XP)	121
Tabela 32	Análise estatística de variância (ANOVA) aplicada aos dados experimentais de fator de conversão de nitrogênio em células (YX/N).....	122

Tabela 33	Análise estatística de variância (ANOVA) aplicada aos dados experimentais de produtividade em células (Px).....	123
Tabela 34	Teor de proteínas e lipídios na biomassa seca de <i>Arthrospira platensis</i> obtida nos ensaios.....	126
Tabela 35	Análise estatística de variância (ANOVA) aplicada aos teores de proteínas.....	127
Tabela 36	Análise estatística de variância (ANOVA) aplicada aos teores de lipídios.....	128

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	20
3. REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1. <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i>	22
3.2. Distribuição geográfica e histórico.....	23
3.3. Aspectos nutricionais e composição da biomassa.....	24
3.4. Produção de <i>Arthrospira platensis</i>	27
3.4.1. Luz.....	27
3.4.2. Temperatura.....	29
3.4.3. Fonte de nitrogênio.....	30
3.4.4. Fonte de carbono.....	32
3.5. Fotobiorreator tubular.....	34
3.5.1. Configuração do Fotobiorreator tubular.....	36
3.5.2. Circulação e agitação do meio de cultura.....	37
3.6. Processo contínuo	38
3.7. Fermentação alcoólica.....	40
3.7.1. Indústria Sucro-Alcooleira no Brasil.....	43
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.1. Cultivo de <i>Arthrospira platensis</i>	48
4.1.1. Microrganismo.....	48
4.1.2 - Manutenção da <i>A. platensis</i>	48
4.1.3 - Meio de cultivo.....	48
4.1.3.1. Meio padrão para cultivo de <i>A. platensis</i>	48
4.1.3.2. Meio modificado.....	50
4.1.4. Preparo do inóculo.....	50
4.1.5. Dispositivo para cultura.....	50
4.1.6. Descrição de um experimento típico de cultivo da <i>Arthrospira platensis</i>	52

4.1.7. Técnicas Analíticas.....	52
4.1.7.1. Acompanhamento do cultivo.....	52
4.1.7.1.1. Determinação da concentração celular.....	52
4.1.7.1.2. Determinação da concentração de carbonato total.....	53
4.1.7.1.3. Determinação da concentração de amônia livre.....	54
4.1.7.1.4. Determinação da concentração de uréia.....	55
4.1.7.1.5. Determinação do pH	55
4.1.7.1.6. Determinação dos compostos orgânicos voláteis totais no meio efluente de <i>A. platensis</i>	55
4.1.8. Avaliação da biomassa de <i>A. platensis</i> obtida no final do cultivo..	55
4.1.8.1. Proteínas totais.....	56
4.1.8.2. Lipídios totais.....	56
4.2. Fermentação alcoólica contínua.....	56
4.2.1. Preparo do mosto.....	56
4.2.2. Microrganismo e condições de manutenção.....	57
4.2.3. Preparo do inóculo	57
4.2.4. Dispositivo para a cultura	57
4.2.5. Descrição das condições de fermentação contínua.....	58
4.2.6. Técnicas Analíticas na Fermentação Alcoólica.....	58
4.2.6.1. Determinação da concentração celular.....	58
4.2.6.2. Determinação do pH.....	58
4.2.6.3. Determinação de ART.....	58
4.2.6.4. Determinação da concentração de etanol meio efluente.....	59
4.2.6.5. Avaliação qualitativa dos compostos voláteis orgânicos majoritários no gás efluente da fermentação alcoólica.....	59
4.3. Experimentos realizados.....	60
4.4. Análise dos resultados.....	61
4.4.1. Fórmulas utilizadas nos cálculos dos parâmetros cinéticos.....	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
5.1. Verificação da homogeneidade do fotobiorreator tubular.....	62
5.2. Cultivo padrão de <i>Arthrospira platensis</i> no fotobiorreator tubular utilizando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio.....	65
5.3. Cultivos contínuos de <i>Arthrospira platensis</i> em fotobiorreator tubular utilizando uréia como fonte de nitrogênio e CO₂ de cilindro.....	68

5.3.1. Avaliação da concentração celular em regime permanente (X_P).....	94
5.3.2. Avaliação da produtividade em células (P_X).....	96
5.3.3. Avaliação do fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$).....	98
5.3.4. Avaliação do teor de proteínas e lipídios.....	100
5.4. Testes preliminares para os ensaios envolvendo acoplamento do cultivo de <i>Arthrospira platensis</i> à fermentação alcoólica.....	104
5.4.1 Avaliação da homogeneidade do biorreator.....	104
5.4.2. Avaliação de diferentes vazões específicas de alimentação.....	106
5.4.3. Análise dos voláteis orgânicos no gás efluente da fermentação alcoólica.....	110
5.5. Cultivos contínuos de <i>Arthrospira platensis</i> em fotobiorreator tubular utilizando uréia como fonte de nitrogênio e CO_2 proveniente de fermentação alcoólica.....	111
5.5.1. Avaliação de X_P , $Y_{X/N}$ e P_X	120
5.5.2. Avaliação do teor de proteínas e lipídios.....	126
6. CONCLUSÕES.....	129
7. REFERÊNCIAS.....	130

1. INTRODUÇÃO

Já há muito tempo os microrganismos são utilizados pelo homem. Aparentemente, a descoberta da utilidade dos microrganismos foi acidental, mas a partir de então, após muitas tentativas e erros, os microrganismos passaram a ser empiricamente empregados na produção de bebidas, alimentos e, posteriormente, insumos farmacêuticos e metabólitos.

Ao final da segunda guerra mundial, alguns microrganismos passaram a ser considerados interessantes devido ao seu valor nutricional. Surge o termo “Single Cell Protein (SCP)” e a partir de então muitas pesquisas enfocaram a produção de biomassa microbiana. Nesse contexto, destacam-se os microrganismos fotossintetizantes (microalgas e cianobactérias) devido à capacidade de crescimento utilizando CO₂ como única fonte de carbono (BOZE *et al.*, 1995).

A produção de microrganismos fotossintetizantes, como microalgas e cianobactérias, tem sido amplamente estudada na biotecnologia, pois esses microrganismos apresentam um sistema biológico muito eficiente para a utilização da energia solar para a produção de compostos orgânicos (VONSHAK, 1997). Segundo JANSSEN *et al.* (2002) eles são mais eficientes do que as plantas na utilização da energia luminosa. Dentre eles, destacam-se as *Arthrospira* spp., cianobactérias filamentosas, capazes de formar naturalmente grandes colônias em águas superficiais tropicais e subtropicais contendo altos níveis de carbonato e bicarbonato (TOMASELLI, 1997).

Arthrospira é um dos gêneros mais conhecidos, dentro do grupo de microrganismos fotoautotróficos, e foi produto de consumo dos Astecas, no Vale do México, e da população do Lago Chaad, na África (PARADA *et al.*, 1998). Atualmente, esta cianobactéria é usada como suplemento alimentar por humanos. O seu consumo traz benefícios à saúde humana devido a sua composição química, incluindo compostos como aminoácidos essenciais, vitaminas (especialmente B12), pigmentos naturais (como carotenóides, xantofilas, ficobilinas e clorofila) e ácidos graxos essenciais (particularmente ácido γ -linolênico, um precursor das prostaglandinas do corpo). Esse microrganismo apresenta um satisfatório conteúdo balanceado de aminoácidos, contendo inclusive metionina, um aminoácido ausente

na maioria das outras cianobactérias e microalgas (RICHMOND, 1988; HENRIKSON, 1994; PARADA *et al.*, 1998; McKASKLE, 2003).

Também são relatados estudos sobre o uso de microrganismos fotossintéticos como alimento e trocadores gasosos fotossintéticos para emprego em viagens espaciais (MORIST *et al.*, 2001). Outros trabalhos destacam a possibilidade de empregar *Arthrospira platensis* como pré-biótico (PARADA *et al.*, 1998; VARGA *et al.*, 2002).

Desde a década de 1970, *Arthrospira platensis* é comercializada como um alimento seguro para o consumo humano, sendo aprovada, para a nutrição humana, por vários órgãos governamentais, agências de saúde e outras associações em mais de 80 países (BELAY, 1997). Atualmente, mais de 70 % de *Arthrospira* spp. comercializadas se destinam ao consumo humano, principalmente para fins nutracêuticos (VONSHAK, 1997). Estima-se que a produção total anual dessa biomassa seja de 3000 toneladas (SHIMAMATSU, 2004).

O cultivo de microrganismos fotossintetizantes apresenta alguns problemas de implementação devido ao alto custo de extração e secagem do produto, bem como à presença de membrana celulósica, de baixa digestibilidade. Esse tipo de problema, entretanto, não ocorre quando se empregam *Arthrospira* spp. (DILLON *et al.*, 1995; RICHMOND, 1988). A cianobactéria *Arthrospira platensis* apresenta tamanho relativamente grande dos agregados de células e parede celular mucopolissacarídica, facilmente digerível (HENRIKSON, 1989).

Enquanto grandes empresas de alguns países se dedicaram à produção de *Arthrospira* sp. visando atender ao mercado consumidor, centros de pesquisa em todo o mundo começam a estudá-la sob diversos aspectos como perfil bromatológico em células cultivadas sob diferentes condições físico químicas; diversificação das fontes de nutrientes para o cultivo e utilização da biomassa na biopurificação de efluentes (NUNES *et al.*, 2003).

Atualmente, a produção comercial desse microrganismo é feita principalmente em tanques abertos devido ao menor custo de implementação e maior facilidade no aumento de escala (BOROWITZKA, 1999), entretanto esse sistema dificulta a obtenção de altas concentrações de biomassa dada a facilidade de contaminação e dificuldade no controle de temperatura e na exploração da

energia luminosa devido à baixa relação volume/superfície (GUTERMAN *et al.*, 1990). Essas dificuldades, porém, poderiam ser contornadas através do emprego de um fotobiorreator tubular, um dos objetos de estudo deste trabalho.

O sucesso da produção de um microrganismo fotossintetizante em biorreatores tubulares depende de diversas variáveis como luz, nutrientes, agitação, pH e construção do biorreator. Neste trabalho, além da intensidade luminosa e do tipo de processo, dois nutrientes foram destacados: nitrogênio e carbono. O uso de uréia como fonte alternativa de nitrogênio já foi estudado em outros trabalhos do Laboratório de Tecnologia de Fermentações, em processo descontínuo alimentado, mostrando ser eficiente na produção de concentração satisfatória de biomassa de *Arthrospira platensis* (DANESI, 2001; RANGEL, 1999; MATSUDO, 2006). Além da combinação carbonato/bicarbonato, o uso de CO₂ como fonte de carbono e para correção do pH no cultivo de *A. platensis* em fotobiorreatores tubulares também já foi iniciado neste mesmo laboratório (FERREIRA, 2008), mas o presente trabalho avalia o aproveitamento de CO₂ proveniente de fermentação alcoólica sem tratamento prévio.

Levando-se em conta que na estequiometria da fermentação alcoólica as formações de etanol e CO₂ em termos de massa são praticamente iguais (0,96 g CO₂/ g etanol), com o aumento da produção de etanol, há como consequência, o aumento da produção de CO₂, que poderá ser empregado diretamente no cultivo de *Arthrospira platensis*. O acoplamento da produção industrial de *Arthrospira platensis* à indústria sucro-alcooleira, aproveitando o CO₂ da fermentação alcoólica, pode ser promissor. Isso porque a produção da cianobactéria poderá ser executada durante todo o ano, inclusive no período de entressafra da cana-de-açúcar, período de maior irradiação solar, utilizando CO₂ armazenado, o que também permitirá a fixação do homem na indústria. Deve-se destacar também que, apesar de se utilizar um resíduo da fermentação alcoólica, o processo de produção da *Arthrospira platensis* ainda poderá ser realizado pelo “clean method”, não prejudicando a qualidade da biomassa para o consumo humano.

2. OBJETIVOS

Verificar o efeito da intensidade luminosa, da vazão específica de alimentação de uréia e da fonte de gás carbônico para manutenção do pH e reposição da fonte de carbono no cultivo de *Arthrospira platensis* por processo contínuo em fotobiorreator tubular, avaliando parâmetros cinéticos e fator de conversão de nitrogênio em células, bem como teores lipídico e protéico da biomassa.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Há tempos, o meio aquático serve como fonte de nutrientes, minerais e produtos naturais. Entretanto, com o aumento da população humana e suas necessidades, foi necessária a descoberta do desenvolvimento sustentável de novos recursos (BARBOSA, 2003). Organismos aquáticos representam um vasto leque de recursos com potencial a ser explorado por diversas áreas, como se vê na tabela 1 (BENEMANN *et al.*, 1987; COHEN, 1999; SKULBERG, 2000; PULZ *et al.*, 2001):

Tabela 1: Produtos de Microalgas e Cianobactérias

	Produto	Aplicação
<u>Biomasssa</u>	Biomassa	Nutracêuticos, alimentos funcionais, suplementos para ração animal e aquacultura
<u>Corantes e Antioxidantes</u>	Xantofila, luteína, β -caroteno, vitaminas C e E	Alimentação humana e animal; cosméticos
<u>Ácidos Graxos</u>	Ácidos araquidônico, γ -linolênico e linoléico	Aditivos de alimentos
<u>Enzimas</u>	Fosfoglicerato quinase, luciferase, enzimas de restrição.	Pesquisa, Medicina
<u>Polímeros</u>	Polissacarídeos, Amido, Poli- β -hidroxibutirato (PHB)	Aditivos de alimentos, cosméticos, Medicina
<u>Outros</u>	Peptídios, toxinas, aminoácidos, esteróides	Pesquisa, Medicina

Dentre os microrganismos aquáticos, microalgas e cianobactérias representam importantes fontes de vários produtos. Eles não apenas têm a capacidade de produzir compostos de grande interesse, como também têm a

habilidade de produzi-los utilizando apenas a luz solar, CO₂ e água do mar ou meio mineral, sendo por isso denominados fotoautotróficos (BARBOSA, 2003).

3.1. *Arthrospira (Spirulina) platensis*

Classe: Cyanophyceae

Ordem: Oscillatoriales

Família: Oscillatoriaceae

Genero: *Arthrospira*

Especie: *platensis*

(CASTENHOLZ *et al*, 2001)

O gênero *Arthrospira* pertence à família Oscillatoriaceae e compreende o grupo das cianobactérias filamentosas. É caracterizado por cadeias de células, constituindo um filamento na forma de espiral, denominado tricoma (Figura 1). Os tricomas são constituídos por células cilíndricas, curtas e largas, revestidas por uma fina membrana. Seu diâmetro pode variar de 6 a 12 µm, e as estruturas helicoidais formadas por este filamento podem apresentar diâmetros que variam de 30 a 70 µm. As dimensões celulares, o grau de ondulação e o comprimento dos filamentos variam de espécie para espécie. Esta última característica também pode variar conforme as condições ambientais de crescimento (HENRIKSON, 1989; CIFERRI e TIBONI, 1985; TOMASELLI, 1997; PELOSI *et al.*, 1982).

Figura 1. *Arthrospira platensis* (UTEX 1926).
Fonte: UTEX, 2006.

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

Segundo TOMASELLI (1997), essa espécie foi desconsiderada como membro do gênero *Spirulina* e incluída no gênero *Arthrospira* (da mesma ordem Oscillatoriales) por CASTENHOLZ (1989), oficialmente aceito em *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Mesmo assim, a designação “*Spirulina*” tem se mantido.

3.2. Distribuição geográfica e histórico

Arthrospira spp. vivem em meios líquidos específicos ricos em sais minerais compostos principalmente por bicarbonato e carbonato de sódio, com pH de 8 a 11. As regiões propícias são as tropicais e subtropicais quentes e ensolaradas, como México, Chade, Etiópia, Quênia, Zaire e Zâmbia (ABDIN EL SHERIF e CLÉMENT, 1982).

A biomassa de *Arthrospira* sp. seca era consumida pela população asteca residente nas proximidades do Lago Texcoco na época da colonização espanhola. Tenochtitlán (atual cidade do México), densamente povoada na época da colonização espanhola, possuía praças e mercados onde a biomassa desse microrganismo era vendida com o nome de *tecuitlatl*. (LACAZ-RUIZ, 2003).

Em estado natural, *Arthrospira* sp. crescia nas águas alcalinas do Lago Texcoco, ricas em carbonato e bicarbonato, formando aglomerados de biomassa na superfície da água. A biomassa era recolhida com ajuda de uma malha de tecido e seca ao sol na superfície das pedras antes de ser consumida. Daí o seu nome “*tecuitlatl*”, que significa “excreta de pedras” no dialeto local (CLÉMENT, 1975).

Sabe-se, atualmente, que a espécie *Arthrospira maxima* existe em estado semi-natural no lago Texcoco, sendo industrialmente explorada pela

companhia Texcoco Sosa S.A., desde 1972 (DURAND-CHASTEL, 1980). Trabalho recente indica a presença de *Arthrospira platensis* em lagoa salina, que apresenta altas concentrações de sais, principalmente sódio e potássio, e valores de pH variando de 8,0 a 10,1 no Pantanal da Nhecolândia, sub-região do Pantanal brasileiro (MALONE *et al.*, 2008).

Outro lago onde a *Arthrospira* sp. foi muito estudada é o Chade. Neste lago, a *Arthrospira platensis* pode se tornar a espécie dominante, e foi usada como alimento há muito tempo. Em 1940, DANGEARD relatou a presença de *Arthrospira platensis* neste lago, na então África Equatorial Francesa, hoje, República do Chade. A biomassa dessa cianobactéria era vendida seca em um mercado de Massacory, a 50 km do Lago Chade, para ser então utilizada como molho acompanhante da dieta-padrão de milhete. *Arthrospira platensis* está presente também nos lagos do vale Rift, no leste da África, onde representa a principal fonte alimentar de pequenos flamingos (*Phoenicoptera* sp.), habitantes dessa região. Neste lago, as cianobactérias são ingeridas pelos copépodos ou pelos cladóceros que, posteriormente, servem de alimento aos peixes e, finalmente, às aves (LACAZ-RUIZ, 2003).

Em 1963, o Institut Français du Pétrole (IFP) iniciou estudos com *Arthrospira* sp. em meio sintético, a partir das observações feitas nas colônias na África, e constatou que esse microrganismo possui um crescimento mais rápido, se comparado ao das plantas superiores; é rico em proteína; vem sendo consumido desde tempos imemoráveis pelos astecas e tribos do Chade, e é, portanto, atóxico (LACAZ-RUIZ, 2003).

3.3. Aspectos nutricionais e composição da biomassa

O consumo de *Arthrospira* spp. traz benefícios à saúde humana devido a sua composição química, incluindo compostos como aminoácidos essenciais, vitaminas (especialmente B12), pigmentos naturais (como carotenóides, xantofilas, ficobilinas e clorofila) e ácidos graxos essenciais, particularmente ácido γ -linolênico, um precursor das prostaglandinas no organismo humano.

Além do ácido γ -linolênico, podem ser encontrados também ácido palmítico, ácido palmitoléico, ácido esteárico, ácido oléico e ácido linoléico (SASSANO, 2004). Este autor, cultivando *Arthrospira platensis* em processo contínuo, utilizando cloreto de amônio como fonte de nitrogênio, verificou que a biomassa obtida em todos os experimentos realizados apresentou uma grande quantidade de ácidos graxos polinsaturados, o que indica a importância desses compostos na constituição do microrganismo. Além disso, este mesmo trabalho mostra que as diferentes condições de cultivo empregadas, em processo contínuo, não influenciaram o teor do ácido γ -linolênico na biomassa final. Por outro lado, COHEN (1997) mostra que diferentes espécies de *Arthrospira* apresentam diferentes teores de ácido γ -linolênico.

Esse microrganismo apresenta um satisfatório conteúdo balanceado de aminoácidos, contendo inclusive metionina, um aminoácido ausente na maioria das outras cianobactérias e microalgas (PARADA *et al.*, 1998; McKASKLE, 2003).

Arthrospira spp. são uma das mais ricas fontes protéicas de origem microbiana (55 a 70 %), colocando-se bem acima das carnes (15 a 25 %) (DILLON *et al.*, 1995) e da soja (cerca de 40 %) (MAEHLER *et al.*, 2003). Além disso, no corpo humano, a assimilação das proteínas de *Arthrospira* spp. é melhor do que a assimilação daquelas provenientes da carne de boi (MAIER *et al.*, 2000). No seu espectro de aminoácidos, todos os aminoácidos estão próximos dos padrões estabelecidos pela FAO (Food and Agriculture Organization), como pode ser observado na Tabela 2 (DILLON *et al.*, 1995).

Tabela 2 – Composição de aminoácidos de proteínas de *S. platensis* e *S. maxima* (mg.g⁻¹ proteína bruta Nx6,25) em comparação com o recomendado pela FAO (Food and Agriculture Organization) para crianças pré-escolares.

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

Fonte: DILLON *et al.* (1995)

Recentemente, maior atenção vem sendo dada à *Arthrospira* spp. pelo potencial de coloração de seus pigmentos de interesse às indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de alimentos. Segundo DANESI *et al.* (2002), há uma tendência na substituição de corantes artificiais por produtos naturais, o que sugere a possibilidade de maior exploração de *Arthrospira* spp., pois essa cianobactéria é uma das principais fontes de clorofila na natureza. No Brasil, a clorofila usada em corantes verdes naturais, é obtida a partir do espinafre, que contém

aproximadamente 0,6 mg/g (GROSS, 1991) , ao passo que a biomassa de *Arthrospira* sp. pode conter até 11,5 mg/g (HENRIKSON, 1989)

Atualmente, a maior parte da clorofila produzida e comercializada é obtida por fontes vegetais. Há, no entanto, um crescimento no interesse na área biotecnológica para obtenção de corantes de outras fontes. Nesse contexto, o emprego de processos de cultivo microbiano apresenta algumas vantagens em relação às fontes vegetais, como por exemplo, a possibilidade de um cultivo contínuo e com rápida multiplicação dos microrganismos (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004).

A possibilidade de incorporar toda a biomassa de *Arthrospira* sp. em alimentos é particularmente interessante, pois além de promover a coloração esverdeada, colabora com o enriquecimento do valor nutricional do alimento (DANESI *et al.*, 2002).

3.4. Produção de *Arthrospira platensis*

Arthrospira platensis apresenta vantagens por se desenvolver em meio altamente salino, com pH alcalino, características que ajudam na prevenção de contaminantes no reator (BOROWITZKA, 1999). Além disso, a sua separação do meio de cultivo é facilitada devido à formação dos tricomas, aumentando sua dimensão, e à forma espiralada (RICHMOND, 1988; PIORRECK *et al.*, 1984). Fatores ambientais e nutricionais podem exercer influência tanto na multiplicação quanto na composição do microrganismo e, dessa forma, condições de cultivo podem ser alteradas buscando o aumento da produção de biomassa, formação de metabólitos específicos ou mesmo diminuição do custo de produção.

3.4.1. Luz

Tal como em cultivos heterotróficos, também no cultivo de microrganismos fotossintéticos, altas produtividades são necessárias para se reduzir

o tamanho do sistema de cultivo e consequentemente reduzir custos de produção e recuperação do produto de interesse. Isso leva a uma necessidade de alta concentração de biomassa e alta eficiência no aproveitamento de luz, já que nesses casos a luz é um dos principais fatores limitantes (BARBOSA, 2003). VONSHAK (1997b) considera a luz como o principal fator que afeta organismos fotossintetizantes.

O crescimento de *Arthrospira platensis* pode ser limitado por baixa intensidade luminosa (fotolimitação) ou inibido por alta intensidade luminosa (fotoinibição) (BEZERRA *et al.*, 2008). A fotoinibição ocorre quando os fotossistemas absorvem fluxo de fótons em excesso e os elétrons, que não podem ser consumidos pelo ciclo de Calvin, levam à formação de peróxido de hidrogênio que pode causar prejuízos às estruturas da célula (VONSHAK, 1997b).

Alta intensidade luminosa é necessária para se obter altas concentrações celulares, mas para evitar problemas de fotoinibição, a única forma do microrganismo utilizar essa luz de forma eficiente é expondo-a a pequenos períodos cíclicos de claro e escuro (RICHMOND, 2000). FOX (1983) afirma que altas intensidades luminosas sem agitação do meio de cultivo causam fotólise ou fotodestruição das células devido ao que ele chama de efeito fotoelétrico, o que justifica a importância da agitação, que será abordado no item 3.5.2. Além disso, afirma também que altas intensidades luminosas com alta agitação propicia um crescimento ótimo, em uma condição em que todos os filamentos recebem cargas frequentes de luz, mas ao mesmo tempo são constantemente sombreadas por outros filamentos, promovendo proteção contra exposição excessiva à luz. Por outro lado, baixa intensidade luminosa com baixa agitação propicia baixo crescimento, mas a pigmentação é favorecida, ou seja, a coloração se torna verde escura e o azul da ficocianina se torna aparente.

Observa-se a dependência do crescimento celular em relação à intensidade luminosa. Existe, entretanto, um limite denominado ponto de saturação luminosa, sendo da ordem de 150 a 200 $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para *Arthrospira platensis* (VONSHAK, 1997b). Segundo SAMUELSSON *et al.* (1985), a fotoinibição também pode ocorrer sob intensidades luminosas moderadas se a taxa fotossintética estiver limitada por fatores estressantes, como baixas temperaturas.

A intensidade luminosa também pode afetar a composição da biomassa. DANESI *et al.* (2004) verificaram que a redução da intensidade luminosa de 60 para 24 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a partir do 9º ou 13º dia de cultivo, empregando tanto KNO_3 quanto uréia como fonte de nitrogênio, é eficiente para aumentar a produção total de clorofila em até 29 % por *Arthrospira platensis*. BEZERRA *et al.* (2008) estudaram a influência da intensidade luminosa em cultura de *Arthrospira platensis* e verificaram que o seu aumento resultava em diminuição dos teores tanto de proteínas quanto de lipídeos.

3.4.2. Temperatura

Este é um fator importante para todos os organismos vivos, exercendo influência sobre as atividades metabólicas. E no meio aquático, afeta também a disponibilidade e assimilação de nutrientes, além de outras propriedades físicas das células (VONSHAK, 1997).

A temperatura interfere no desenvolvimento do cultivo de cianobactérias e está intimamente associada à luz, principalmente em cultivos ao ar livre (*outdoor*). A produtividade de biomassa é diretamente relacionada à taxa de fixação de CO_2 ou produção de O_2 (fotossíntese). Fotossíntese e respiração de *Arthrospira platensis* são duas atividades metabólicas altamente dependentes da temperatura (TORZILLO e VONSHAK, 1994). Estudando a interação entre luz e temperatura, TORZILLO e VONSHAK (1994) verificaram que uma temperatura de 35 °C permitia à *Arthrospira platensis* uma melhor resistência a altas intensidades luminosas ao passo que uma maior (40 °C) e principalmente uma menor temperatura (25 °C) acelerava o fenômeno da fotoinibição.

Para uma dada intensidade luminosa, o aumento da temperatura, até um valor considerado ótimo, induz o aumento da produção de oxigênio (TORZILLO *et al.*, 1986). TORZILLO *et al.* (1991) investigaram a influência da variação diária de temperatura sobre a produtividade de *Arthrospira platensis* em reatores abertos e fechados, constatando que maiores produtividades eram obtidas quando se exercia um melhor controle da temperatura.

A temperatura também apresenta efeito sobre a estrutura de componentes celulares (FAINTUCHI, 1989). TOMASELLI *et al.* (1993) verificaram que o aumento da temperatura levou a um aumento do conteúdo de lipídeos e carboidratos, e ao mesmo tempo uma diminuição no teor de proteínas.

Arthrospira platensis é uma cianobactéria mesofílica. SANCHEZ-LUNA *et al.* (2007) cultivando este microrganismo em tanques abertos, por processo descontínuo alimentado com uréia, com intensidade luminosa de $72 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, verificaram que 29°C é a temperatura ideal para seu crescimento.

3.4.3. Fonte de nitrogênio

Em *Arthrospira platensis* a deficiência de nitrogênio durante o período de crescimento leva a um decréscimo na produção de ficocianina e clorofila, podendo afetar também a composição dos ácidos graxos (FUNTEU *et al.*, 1997)

MACEDO e ALEGRE (2001) investigaram a influência do teor de nitrogênio e da temperatura na produção de lipídeos em cultivo de *Arthrospira maxima*. Observaram que houve um aumento de aproximadamente 3 vezes do conteúdo de lipídeos, quando diminuiu-se o teor de nitrogênio e a temperatura, sugerindo que é viável o cultivo de *Arthrospira maxima* em condições limitantes visando a produção de lipídeos ricos em ácidos graxos poliinsaturados essenciais.

De acordo com PIORRECK *et al.* (1984), a concentração de clorofila na biomassa de *Arthrospira platensis* aumenta com o acréscimo da concentração de nitrogênio no meio de cultivo. Sabe-se ainda que a quantidade e qualidade do nitrogênio disponível influenciam também o conteúdo de proteínas, bem como outros compostos do microrganismo.

Trabalhos na literatura têm mostrado que o uso de nitrato como fonte de nitrogênio garante altas concentrações de biomassa de *Arthrospira platensis*, o que justifica a ampla utilização dos meios de cultivo de PAOLETTI *et al.* (1975) e SCHLÖSSER (1982), que empregam KNO_3 ou NaNO_3 . Contudo, sob o ponto de vista econômico, a busca de fontes de nitrogênio mais baratas como uréia e sais de amônio é particularmente atrativa. O nitrogênio proveniente da uréia pode ser até 5

vezes mais barato que o nitrogênio proveniente do nitrato de sódio (MATSUDO, 2006).

A utilização de uréia como fonte de nitrogênio promove um ganho energético devido a sua hidrólise espontânea em meio alcalino (DANESI *et al.*, 2002) ou pela presença da enzima urease (CARVAJAL *et al.*, 1980), formando amônia, que é facilmente assimilada por *Arthrospira*. No caso do nitrato, o microrganismo precisa reduzi-lo a nitrito (em uma reação catalisada pela enzima nitrato redutase) que, por conseguinte é reduzido a amônia (em uma reação catalisada pela enzima nitrito redutase). Esse processo de redução de nitrito em amônia requer gasto de energia (HATORI e MYERS, 1996).

Outra vantagem da uréia em relação aos nitratos é que cada molécula de uréia fornece 2 átomos de nitrogênio, ao passo que cada molécula de NaNO_3 , por exemplo, fornece apenas 1 átomo (DANESI *et al.*, 2002).

Em particular, o uso de uréia sob condições alcalinas pode ser desvantajoso em processo descontínuo. Em altos níveis de concentração inicial, devido a sua hidrólise (DANESI *et al.*, 2002), pode liberar grandes quantidades de amônia no meio de cultivo levando a inibição do crescimento pela toxicidade desta substância em altas concentrações (SASSANO *et al.*, 2004). Por outro lado, o uso de baixa concentração de uréia nos cultivos por processo de batelada levam a limitação do crescimento. Por isso, há a necessidade do controle do suprimento de uréia durante o cultivo.

A adição de uréia no processo descontínuo alimentado mostrou-se um excelente protocolo, garantindo níveis satisfatórios desse composto no meio de cultivo, propiciando o sucesso no cultivo de *Arthrospira platensis* (SASSANO *et al.*, 2004).

RANGEL-YAGUI *et al.* (2004) observaram que a melhor produção de biomassa em cultivo de *A. platensis*, foi alcançada em cultivo com uso de uréia como fonte de nitrogênio, por processo descontínuo alimentado, em comparação ao emprego de KNO_3 .

COSTA *et al.* (2004) estudaram o desenvolvimento de *Arthrospira platensis* em água coletada no Lago Mangureira (RS) suplementado com uréia e bicarbonato de sódio em processo descontínuo alimentado, buscando redução do

custo de produção. Na verdade, a água deste lago apresenta os nutrientes fundamentais para *Arthrospira platensis*, mas suporta o crescimento do microrganismo somente por um período de até 300 horas de cultivo, quando se deve iniciar a adição de nutrientes para prevenir o decréscimo da concentração celular. Observaram que na condição em que se adicionou $1,125 \text{ mg.L}^{-1}$ de uréia, sem adição de bicarbonato de sódio, a biomassa produzida foi 2,67 vezes maior em comparação ao ensaio sem suplementação de nutrientes, mostrando ser viável o cultivo de *Arthrospira platensis* em processo descontínuo alimentado, usando água do Lago Mangueira suplementado com uréia.

O processo contínuo também tem se mostrado apropriado para o cultivo de *A. platensis* utilizando fonte de nitrogênio que leve à presença de amônia no meio de cultivo (SASSANO *et al.*, 2007). De fato, este processo garantiu a manutenção de níveis satisfatórios de amônia no meio de cultivo, propiciando a obtenção de regime permanente no cultivo de *A. platensis*. Sendo a uréia uma substância que também leva à presença de amônia no meio de cultivo, espera-se, igualmente, que os cultivos contínuos com uréia como fonte de nitrogênio levem a bons resultados, com possível diminuição de custos de produção.

3.4.4. Fonte de carbono

Além do nitrogênio, a fonte de carbono também é importante objeto de estudo. Dentre todos os custos associados ao cultivo de *Arthrospira* (capital, mão-de-obra, água, nutrientes e energia) calcula-se que o carbono representa um dos principais componentes dos custos de operação (BOROWITZKA, 1992).

Os meios de cultivo tradicionais empregam carbonato de sódio e bicarbonato de sódio como fontes de carbono para *Arthrospira platensis* (SCHLÖSSER, 1982; PAOLETTI *et al.*, 1975), mas o CO_2 tem se apresentado como uma excelente fonte alternativa.

Em baixa concentração extracelular de bicarbonato, as cianobactérias têm a capacidade de acumular o bicarbonato no meio intracelular e utilizar o CO_2 como fonte de carbono para o seu crescimento (MORONEY e SOMANCHI, 1999).

BINAGHI *et al.*, (2003) verificaram que não houve crescimento de *Arthrospira platensis* em meio contendo apenas carbonato, o que enfatiza a importância do bicarbonato.

O aquecimento global induzido pelo aumento da concentração de gases causadores do efeito estufa na atmosfera é um assunto de grande preocupação ambiental, sendo o CO₂ o principal desses gases. O CO₂ atmosférico aumentou de 280 para 368 ppmv nos últimos 200 anos e é responsável por aproximadamente 50 % no aumento do efeito estufa (KARUBE *et al.*, 1992). Esse aumento do nível de CO₂ se deve principalmente à queima de combustíveis fósseis, associada ao aumento populacional e à industrialização (CHANG e YANG, 2003). A fixação de CO₂ por cianobactérias tem sido proposta como método de remover CO₂ liberado para a atmosfera, e então pode ser usada para reduzir a emissão dos gases causadores do efeito estufa (MAEDA *et al.*, 1995).

Recentemente, muitos esforços são empregados na redução do CO₂ atmosférico. Tratamentos químicos e físicos podem ser usados para separar e recuperar o CO₂, mas a fotossíntese de microalgas e cianobactérias tem recebido cada vez maior atenção buscando a redução da emissão de CO₂ para a atmosfera e ainda produzindo compostos de valor industrial e comercial. (BINAGHI *et al.*, 2003)

Em 1963, o Institut Français du Pétrole (IFP) iniciou estudos com *Arthrospira* sp. em meio sintético, a partir das observações feitas nas colônias na África. Este instituto tem grande interesse em aproveitar os gases provenientes da combustão dos derivados do petróleo como fonte de carbono para microrganismos fotossintetizantes, visando desta maneira reduzir a poluição atmosférica por estes compostos e obter uma biomassa que gere oxigênio e represente uma excelente fonte de proteína alimentar (LACAZ-RUIZ, 2003).

Segundo BINAGHI *et al.* (2003), o uso de métodos biológicos para reduzir a emissão de CO₂ é particularmente atrativo porque neste caso, as técnicas utilizadas são inofensivas ao meio ambiente. De fato, imensa quantidade de CO₂ pode ser empregada para o crescimento de organismos fotossintéticos. Dentre eles, cianobactérias fotoautotróficas como *A. platensis* propiciariam fixação de CO₂ muito mais rapidamente que organismos eucarióticos.

BINAGHI *et al.* (2003) empregaram o processo descontínuo e o processo descontínuo alimentado para avaliar a habilidade de *A. platensis* em utilizar o CO₂ como única fonte de carbono para o seu desenvolvimento. Cultivos a 25 °C em tanques abertos afirmam a idéia de que o carbono inorgânico é assimilado preferencialmente na forma de bicarbonato e que a eficiência dessa utilização depende tanto do pH quanto da concentração de biomassa. Produtividade e crescimento específico foram maiores quando se aplicou CO₂ como fonte de carbono em comparação à fonte carbonato/bicarbonato do meio Schlösser.

FERRAZ *et al.* (1985) fizeram uma avaliação do uso de CO₂ proveniente de fermentação alcoólica no cultivo de *A. maxima*, utilizando KNO₃ como fonte de nitrogênio. Nesse estudo, utilizaram reatores abertos para o cultivo da cianobactéria, borbulhando CO₂ proveniente de fermentações alcoólicas descontínuas. Concluíram que a utilização de CO₂ proveniente de fermentação alcoólica, como assinala RICHMOND (1983), pode ser uma fonte de carbono adequada para o cultivo de *Arthrospira*.

Os cultivos em grande escala, em sua maioria, utilizam reatores abertos, mas buscando uma maior eficiência na biofixação de CO₂ e amônia para produção de biomassa, vários trabalhos têm estudado o emprego de reatores tubulares.

3.5. Fotobiorreator tubular

Após identificação de uma cepa e de um produto de interesse, deve-se desenvolver o bioprocesso para conectar a descoberta à comercialização. Nesse contexto se fazem importantes o *design* e a otimização do reator. Sistemas abertos podem ser utilizados para microrganismos que apresentam crescimento rápido ou que crescem em condições extremas, como alto pH ou alta salinidade. Em alguns casos, porém, como na indústria farmacêutica, monocultura ou até culturas axênicas são necessárias (BARBOSA, 2003).

Além disso, a obtenção de alta concentração celular é importante para que um microrganismo efetivamente possa ser considerado uma potencial fonte de

compostos de alto valor, o que requer um biorreator projetado de forma apropriada. Um fotobiorreator tubular, com um processo otimizado, poderia ser uma boa opção para isso.

Os estudos com fotobiorreator tubular se iniciaram na década de 1950, nos Estados Unidos e Japão, quando os pesquisadores se atraíram pela possibilidade de se obter um sistema fechado que fosse mais fácil de limpar e que prevenisse contaminação. Entretanto, principalmente devido ao aumento da temperatura e, conseqüentemente, aumento no custo de produção, pela necessidade de resfriamento do sistema, esse tipo de sistema ficou abandonado por 3 décadas. Na década de 80, pesquisas com fotobiorreatores tubulares se reiniciaram para produção de *Chlorella*. Nessa mesma década se iniciaram estudos da aplicação desses fotobiorreatores para a produção de cianobactéria, particularmente *Arthrospira*, na Itália (TORZILLO, 1997).

Segundo TORZILLO (1997), biorreatores tubulares apresentam-se promissores para uso como nova geração de sistema fechado de cultivo de microrganismos fotossintéticos, pois permitem:

- a) iluminação efetiva devido a uma melhor relação superfície-volume;
- b) obtenção de altas concentrações de biomassa;
- c) possibilidade de esterilização efetiva do reator;
- d) alta eficiência de conversão de CO₂ devido à baixa taxa de perda desse gás (*outgassing*);
- e) baixo nível de contaminação; e
- f) fácil monitoramento e controle de parâmetros operacionais permitindo melhor utilização de energia solar, a todo momento.

Ainda considerando como uma vantagem dos reatores tubulares, poderia ser incluída, no caso de fontes de nitrogênio amoniacais, a baixa perda de amônia por volatilização, reduzindo a necessidade de adição de fonte de nitrogênio, como conseqüente redução do custo de produção. Assim, pode-se concluir que os esforços em melhoria de condições de cultivo de *A. platensis* não seja apenas utilizando reatores abertos, mas também reatores fechados, dentre os quais os tubulares.

Na literatura, encontram-se estudos com reatores tubulares para produção de *Phaeodactylum tricornutum* (FERNÁNDEZ *et al.*, 1998; MOLINA *et al.*, 2001; HALL *et al.*, 2003), *Chlorella pyrenoidosa* (LEE e LOW, 1992), *Arthrospira platensis* (WATANABE *et al.*, 1995; WATANABE e HALL, 1995; WATANABE e HALL, 1996) entre outros.

Os fotobiorreatores tubulares fechados são importantes para o cultivo dos microrganismos fotossintetizantes porque eles permitem melhores controles das condições de cultivo quando comparados aos fotobiorreatores abertos (CHEN, 1996). Maiores produtividades, menores níveis de contaminações, menores possibilidades de perda de CO₂, voláteis orgânicos, fontes de nitrogênio na forma de amônia e menor evaporação de água são obtidos nesses reatores. Monoculturas de *Chlorella*, *Arthrospira* e outros microrganismos fotossintetizantes têm sido mantidas com sucesso em fotobiorreatores tubulares fechados (LEE, 2001).

CONVERTI *et al.* (2006) mostraram que o desempenho de um fotobiorreator tubular é muito maior em relação a tanque aberto para cultivo de *A. platensis*. A eficiência do fotobiorreator tubular foi testada variando-se a intensidade luminosa e fluxo de circulação do meio. Empregando um sistema de *air-lift* para circulação do meio e intensidade luminosa de 120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, após 15 dias, obtiveram uma concentração celular máxima igual a 10,6 g.L⁻¹.

Ainda que a instalação, principalmente em larga escala, de fotobiorreatores tubulares apresentem um custo maior em relação a tanques abertos, a maior eficiência no aproveitamento da energia solar que ocorre no sistema fechado torna muito atrativo esse tipo de biorreator para produção de biomassa fotossintetizante (TORZILLO, *et al.*, 1986).

3.5.1. Configuração do Fotobiorreator tubular

Segundo TORZILLO (1997), a escolha do diâmetro do tubo é um importante aspecto para otimização da configuração do fotobiorreator, pois afeta: aproveitamento da luz; concentração celular em que se pode operar e, conseqüentemente, o custo de recuperação do produto; produtividade; concentração

de O₂ dissolvido na cultura; capacidade de armazenamento de CO₂ no biorreator; temperatura; e fluxo da cultura. Para que o microrganismo possa aproveitar com eficiência a radiação solar, é importante que o biorreator apresente uma alta relação superfície/volume, que pode ser obtida com o emprego de tubos de pequeno diâmetro. TORZILLO *et al.* (1993) indicam que quanto menor o diâmetro do tubo empregado no fotobiorreator, maior é a produtividade de biomassa.

O comprimento do tubo também é um fator importante, principalmente devido ao acúmulo de O₂ resultante da etapa de fotofosforilação acíclica da fotossíntese (TORZILLO *et al.*, 1986). Há evidências de que concentração de oxigênio acima de 30 mg.L⁻¹ no meio pode apresentar influência negativa tanto no crescimento de *Arthrospira platensis*, quanto na sua síntese de proteínas. Assim, o tempo de circulação do líquido em combinação com o comprimento do tubo deve ser de tal forma que evite o acúmulo de O₂ em níveis inibitórios (TORZILLO, 1997).

3.5.2. Circulação e agitação do meio de cultura

Uma agitação adequada é necessária para a homogeneidade do meio. Isso garante a manutenção das células em suspensão e distribuição de nutrientes e calor gerado dentro do reator; melhora a transferência de CO₂ e remoção de O₂ produzido; melhora a transferência de massa entre as células e o meio de cultivo e facilita o movimento das células entre as regiões iluminadas e não iluminadas do reator (TORZILLO, 1997). A relação da agitação com a iluminação se torna mais evidente quando o cultivo apresenta alta concentração celular, pois nessas condições, a luz é absorvida rapidamente pelas células da região superficial, e a intensidade luminosa diminui acentuadamente à medida em que se aproxima do centro do reator (OGBONNA e TANAKA, 1997). Disso resulta-se um gradiente de luz dentro do reator e dependendo do grau de agitação, o microrganismo é exposto a um determinado ciclo de claro/escuro. Então, as células recebem luz de forma intermitente, o que é a forma mais prática de diluir altas intensidades luminosas, resultando em um uso efetivo da luz pela cultura (RICHMOND, 2000).

A taxa de crescimento de alguns microrganismos fotossintetizantes pode aumentar com o aumento de turbulência, provavelmente devido a um melhor fornecimento de luz e CO₂, mas acima de um nível ótimo de turbulência, esse crescimento decresce acentuadamente, o que deve ser consequência do dano causado à célula (BARBOSA, 2003)

Muitos microrganismos fotossintetizantes apresentam uma parede celular frágil, e alguns ainda são móveis ou filamentosos, promovendo fragilidade e sensibilidade ao stress físico. Por isso, é desejável que se possa promover a agitação correta com um mínimo de stress hidrodinâmico possível (OGBONNA e TANAKA, 1997).

Nesse sentido, TORZILLO (1997) indica o sistema *air-lift* como o mais apropriado para a circulação de *Arthrospira*, principalmente devido ao baixo stress mecânico e também à construção relativamente simples. Além disso, esse sistema pode ser eficiente na transferência de CO₂ para o meio de cultivo e na remoção de O₂ liberado pelas células.

É importante citar também que o aumento da concentração celular propicia o aumento da viscosidade, o que pode ter grande importância na dinâmica do fluido em cultivo de cianobactérias (DE PHILIPPIS *et al.*, 2001). O aumento da viscosidade do líquido leva à redução da turbulência e do fluxo de líquido (SCHAFFER *et al.*, 2002).

3.6. Processo contínuo

Em biorreatores tubulares, podem ser realizados cultivos descontínuos (WATANABE e HALL, 1995; WATANABE *et al.*, 1995; WATANABE e HALL, 1996; HALL *et al.*, 2003) ou contínuos (FERNÁNDEZ *et al.*, 1998; MOLINA *et al.*, 2001; HALL *et al.*, 2003)

Em cultivos com elevadas concentrações celulares de microrganismos fotossintetizantes, o efeito de sombreamento pode reduzir o nível de luz que cada célula recebe, e conseqüentemente afetar negativamente a fixação de carbono (MORAIS e COSTA, 2007). Esse problema, porém, pode ser contornado retirando-

se, periodicamente, frações do meio de cultivo pelo processo descontínuo alimentado repetitivo (MATSUDO *et al.*, 2009) ou mantendo-se concentrações celulares constantes numa faixa ótima para crescimento, aplicando-se processo contínuo.

De acordo com PAMBOUKIAN (2003), o processo contínuo é realizado por meio de alimentação contínua de meio de cultura ao reator a uma determinada vazão constante e por uma retirada contínua de caldo fermentado, de forma a se ter o volume de reação constante, a fim de que o sistema atinja a condição de estado estacionário (*steady-state*). Na condição de *steady-state*, as variáveis de estado (concentrações de células, de substrato limitante e de produto) permanecem constantes ao longo do tempo de operação do sistema (FACCIOTTI, 2001).

O processo contínuo pode ser utilizado para as mais diversas aplicações, incluindo industriais e laboratoriais. No segundo caso, a possibilidade de trabalhar em regime estacionário é um bom meio para se obter correlações entre condição experimental e metabolismo microbiano. Este processo já é empregado no tratamento de efluentes (SAYED *et al.* 1984; HAAG *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2005) e na produção de etanol (ZARPELON e ANDRIETTA, 1992; OLIVEIRA *et al.* 2000; BORZANI, 2001). Seu uso já foi testado para diversas finalidades, levando a resultados satisfatórios, seja em processos visando produção industrial ou mesmo em processos para estudos de comportamento microbiano frente a distintas condições experimentais.

Dentre as possíveis aplicações do processo contínuo, podem ser citadas as produções de: biomassa (ZIINO *et al.*, 1999, SASSANO *et al.*, 2007) ácidos orgânicos (MIN-TIAN *et al.*, 2005), antibióticos (ADINARAYANA *et al.*, 2004), vitaminas (YANG *et al.*, 2004), antitumorais (PAMBOUKIAN e FACCIOTTI, 2004), enzimas (DOMINGUES *et al.*, 2005), aminoácidos (ENSARI e LIM, 2003), xilitol (MARTINEZ *et al.*, 2003), glicerol (LIU *et al.*, 2003), polissacarídeos (SAUDE *et al.*, 2002), bacteriocinas (BHUGALOO-VIAL *et al.*, 1997), solventes (BADR *et al.*, 2001), bebidas (KOURKOUTAS *et al.*, 2002) e hidrogênio (COLLET *et al.*, 2004). Também há aplicações do processo contínuo no estudo de metabolismo microbiano (PITKÄNEN *et al.*, 2003) bem como estudo de sua utilização para remoção de metais pesados em águas residuárias (CAMPBELL e MARTIN, 1990).

SASSANO (2004) verificou que o processo contínuo pode ser adequado para o cultivo de *Arthrospira platensis*, obtendo regime permanente em várias condições experimentais avaliadas, sendo que o maior valor de produtividade em células ($63,9 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) foi obtido com $D=0,083 \text{ dia}^{-1}$ e $N_0= 10\text{mmolar}$ (NH_4Cl).

MORIST *et al.* (2001), em cultivo de *A. platensis* por processo contínuo com dorna única, conseguiram obter regime permanente trabalhando com uma vazão de $0,0072 \text{ L.h}^{-1}$. Foi verificado pelos autores que a concentração celular no interior do reator está intimamente relacionada com a taxa de alimentação do mesmo.

Segundo MAXON (1954), uma possível desvantagem do processo contínuo seria a possibilidade de contaminação por outros microrganismos devido a grandes períodos de fermentação. Entretanto, SASSANO (2004) constatou que *Arthrospira platensis* é um excelente microrganismo para se trabalhar com este tipo de processo, visto que nas observações microscópicas dos cultivos não se verificou contaminação com outros microrganismos fotossintetizantes, nem perda de cultivos por contaminação bacteriana. Isto pode ser explicado pelo fato de se trabalhar com elevados valores de pH (ILTS, 1980), meio inorgânico (CIFERRI e TIBONI, 1985) e presença de amônia no meio de cultivo (BELKIN e BOUSSIBA, 1991). Além disso o reator tubular também pode ajudar a prevenir contaminação (WATANABE *et al.*, 1995; TORZILLO, 1997).

3.7. Fermentação alcoólica

A via fermentativa é a maneira mais importante para a obtenção do álcool etílico em nosso país. Mesmo que haja disponibilidade de derivados de petróleo que permitam a produção de álcool por via sintética, a via fermentativa ainda será de grande importância, principalmente por questão econômica, já que há um grande número de matérias-primas naturais existentes em todo o país (LIMA *et al.*, 2001).

O bioetanol pode ser produzido a partir de materiais contendo açúcares fermentescíveis como cana-de-açúcar e beterraba, que são ricos em sacarose. Além

disso, outras fontes devem ser consideradas, principalmente aquelas contendo polissacarídeos que podem ser hidrolisados para obtenção de açúcares que podem também ser convertidos a etanol (CARDONA e SANCHEZ, 2007).

No Brasil, o etanol é obtido por meio da fermentação do caldo de cana-de-açúcar ou da mistura de melaço e caldo de cana. Neste processo bioquímico, a sacarose ou a glicose é transformada em álcool, de acordo com a reação simplificada de Gay Lussac:

Durante a reação, ocorre uma intensa liberação de CO_2 e de calor e são formados alguns produtos secundários, como álcoois superiores, ésteres, glicerol e aldeídos (MACEDO e CORTEZ, 2005).

Comumente se aplica o método de Melle-Boinot nas destilarias brasileiras, cuja principal característica é a recuperação da levedura por meio da centrifugação do “vinho” (MACEDO e CORTEZ, 2005).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente empregada na produção de etanol a partir de biomassa renovável como cana de açúcar, beterraba, bem como melaços como principal fonte de carbono (LALUCE, 1991). Neste processo, vários fatores podem influenciar o rendimento do processo, ou seja, a conversão de açúcar em etanol, tais como pH, temperatura, concentração de açúcar, concentração de etanol (KOSARIC, 1996), tipo de processo (MONTE ALEGRE *et al.*, 2003) e presença de bactérias contaminantes (VASCONCELOS *et al.*, 2004).

Aumentando-se a concentração de açúcares até um determinado limite, aumenta-se a velocidade de fermentação e a produtividade de etanol. Entretanto, elevados teores de açúcar levam a um estresse osmótico da levedura (LIMA *et al.*, 2001).

O processo fermentativo pode ser inibido pelo seu principal produto, o etanol, mas também por outras substâncias que podem estar presentes no mosto, por exemplo, potássio e cálcio quando se emprega elevada proporção de melaço. A sulfitação do caldo de cana para sua clarificação pode resultar em melaços com elevados teores de sulfito, que pode acarretar efeitos tóxicos à levedura, comprometendo a fermentação, bem como aumentar a acidez do álcool obtido. Por

outro lado, pode exercer controle sobre bactérias, quando há elevada contaminação (LIMA *et al.*, 2001). PEREGO-JUNIOR (1979) verificou que a redução no teor alcoólico de cerca de 50 g.L⁻¹ para 5 g.L⁻¹ levou a uma maior multiplicação da levedura, como consequência da redução da inibição do metabolismo pelo seu produto.

As leveduras são mesófilas. As temperaturas ótimas para a produção industrial de etanol situam-se na faixa de 26 a 35 °C, mas nas destilarias esse valor pode chegar a 38 °C. O aumento da temperatura favorece a velocidade da fermentação, mas também pode favorecer a contaminação bacteriana, ao mesmo tempo em que a levedura fica mais sensível à toxicidade do etanol. Ademais, temperaturas elevadas permitem maior perda de etanol por evaporação em dornas abertas. Por isso, é importante o controle da temperatura na fermentação alcoólica (LIMA *et al.*, 2001). LALUCE *et al* (2002) construíram um sistema de fermentação contínua de 5 estágios com reciclo de células e diferentes temperaturas em cada estágio e verificaram o efeito das flutuações de temperatura no processo fermentativo. Verificaram que essas flutuações levaram a variações tanto na concentração celular quanto na viabilidade das leveduras.

Os valores de pH dos mostos industriais geralmente se encontram na faixa de 4,5 a 5,5, valores adequados para o processo fermentativo, com boa capacidade tamponante, especialmente os preparados com melaço (LIMA *et al.*, 2001).

70 % das usinas brasileiras empregam o processo descontínuo para produção de etanol, e o restante 30 %, o que equivale a aproximadamente 350 destilarias, empregam o processo contínuo (WHEALS *et al.*, 1999). Pela maior facilidade de operação e pela geração de menor quantidade de resíduo, neste trabalho adotou-se o processo contínuo de fermentação alcoólica. O processo contínuo apresenta vantagens, em relação ao processo descontínuo, devido à ausência do tempo improdutivo destinado ao enchimento, esvaziamento, limpeza do reator, que pode durar um tempo aproximadamente 50 % maior que o tempo necessário para fermentação alcoólica por processo descontínuo (VASCONCELOS *et al.*, 2004).

Dois problemas podem ser freqüentes numa fermentação contínua, a oscilação da vazão de alimentação de mosto e variação na composição (concentração de ART). Muitas fermentações contínuas apresentam estes dois problemas e, quando contornados ou minimizados, apresentam desempenho semelhante ao da batelada bem conduzida, porém com produtividade em etanol maior (VASCONCELOS, 2006).

Uma fermentação contínua bem conduzida deve obedecer às seguintes condições: em cada dorna, o meio em fermentação deverá ser homogêneo, ou seja, as concentrações de células, substrato e produto, entre outros parâmetros, são uniformes e iguais em qualquer ponto da dorna; o fluxo de alimentação de mosto deverá ser constante e igual ao de retirada do meio fermentado; as concentrações de substrato, nutrientes etc. deverão ser constantes no mosto; volume de meio em fermentação constante; devem ter agitação mecânica, considerando-se que esta é perfeita e completa, garantindo-se amostragens representativas, retiradas em qualquer ponto do fermentador (VASCONCELOS, 2006).

Nas destilarias brasileiras, não é comum a esterilização do mosto, embora ocorra redução de microrganismos com o aquecimento do caldo. Por isso, a importância de se adicionar um anti-séptico para se criar um ambiente sem contaminação, porém, favorável ao agente de fermentação (LIMA *et al.*, 2001). VASCONCELOS *et al.* (2004) utilizaram kamoran HJ (10 ppm) alternando a cada dois dias com penicilina (10 ppm) em associação com tetracilina (10 ppm). Neste trabalho, porém, o uso somente de penicilina, aparentemente, permitiu a condução do regime permanente por vários dias. De fato, a penicilina e o ácido sulfúrico são os anti-sépticos mais utilizados, propiciando fermentações mais rigorosas, regulares e puras, contendo as contaminações naturais do melaço (BATISTA, 2003).

3.7.1. Indústria Sucro-Alcooleira no Brasil

A biomassa tem sido a principal fonte de energia para a humanidade desde a antiguidade. Foi somente com o advento do carvão mineral e do petróleo,

no século XX, que a biomassa começou a ser gradualmente substituída. Porém, ela não somente ainda é a principal fonte de energia em muitos países em desenvolvimento, como também vem se tornando cada vez mais importante nos países industrializados. Coexistem, portanto, duas formas de uso da biomassa: o uso primitivo, tradicional e as aplicações industriais modernas avançadas. De qualquer forma, há necessidade de se modernizar o uso da biomassa para aumentar sua eficiência energética e sua sustentabilidade ambiental (HALL *et al.*, 2005)

Hoje em dia, com a iminente escassez do petróleo, pesquisas relacionadas a biocombustíveis renováveis tornam-se cada vez mais importantes. Um bom exemplo disso é a grande atenção dada à indústria alcooleira. Sinônimo de combustível renovável, que polui menos em comparação com os derivados de petróleo, o etanol voltou a ocupar um lugar de destaque no cenário energético do país e também começou a ser desejado por vários países. Com a demanda crescente, governo, usineiros e empresários do setor emprenham-se em aumentar a produção de álcool (OLIVEIRA e VASCONCELOS, 2006).

Em 1975, o estabelecimento do Proálcool (Programa Nacional do Álcool) teve como objetivo principal a redução das importações de petróleo, através da substituição da maior parte possível dos combustíveis veiculares derivados do petróleo por etanol. Paralelamente, foi introduzido no mercado o álcool carburante, sob a forma hidratada, e para isso, foi necessário o desenvolvimento de motores adaptados à queima de etanol puro (UNICA, 2007).

A produção e o uso do etanol combustível no Brasil, desde 1975, constituem o mais importante programa de combustível comercial renovável implementado no mundo até hoje. Esse sucesso hoje reconhecido, aliado ao interesse crescente na substituição de derivados de petróleo, na redução de emissões de gases poluentes e na mitigação do efeito estufa, tem provocado uma intensa demanda de informações sobre o programa (UNICA, 2007).

Figura 2. Produção de etanol no Brasil. (*: Posição em 16/05/2009). Fonte: União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA, 2009)

Como se observa na Figura 2, a safra 2007-2008 atingiu em torno de 22,5 bilhões de litros de álcool, e em maio de 2009 estimava-se que a safra 2008-2009 aumentaria para 27,5 bilhões de litros, sendo que a maior parte está concentrada na Região Centro-Sul (25,1 bilhões) e 16,7 bilhões no estado de São Paulo (UNICA, 2009). Em estimativa realizada em 2006, dos 15 bilhões de litros de álcool produzidos, o Brasil exportou apenas 3 bilhões, mas a demanda do mercado externo tende a aumentar principalmente pelo alto preço do barril de petróleo e para atender às prerrogativas do protocolo de Kyoto, em que as nações desenvolvidas terão que reduzir em 5 % as emissões de dióxido de carbono (CO₂), gás resultante, principalmente, da queima de derivados de petróleo. Um dos atuais desafios do Brasil é aumentar a produção de etanol para uso como combustível, por ser renovável, ser menos poluente em comparação aos derivados de petróleo e pelo aumento no interesse internacional em adquirir o etanol (OLIVEIRA e VASCONCELOS, 2006).

No Brasil, a principal fonte de etanol é a cana-de-açúcar, cuja colheita se dá durante boa parte do ano, iniciando-se em maio e terminando em novembro

ou dezembro (LALUCE, 1991). Atualmente cerca de 50 % da cana cultivada no Brasil é usada na produção de etanol. Cerca de 80 % da produção brasileira de etanol tem como destino o uso carburante, 5 % é destinado ao uso alimentar, perfumaria e álcoolquímica e 15 % para exportação (UNICA, 2007).

Em 2008, estimava-se que o agronegócio da cana-de-açúcar movimentava em torno de 40 bilhões de reais por ano no país. A safra 2007/2008 foi estimada em 547 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, 15,2 % a mais do que na anterior. Como metade dela é destinada à fabricação de etanol, o Brasil é o segundo maior produtor do combustível no mundo, estando atrás apenas dos Estados Unidos, que extraem etanol de milho. Avalia-se que o Brasil precisará dobrar sua produção num horizonte de 5 a 7 anos se quiser suprir as demandas locais e internacionais do combustível. Isso exigirá a construção de novas usinas, o crescimento das áreas plantadas, melhorias no manejo e, principalmente, ganhos de produtividade (MARQUES, 2008).

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) foi introduzida no Brasil pelos portugueses no início do século XVI em duas regiões diferentes: no Nordeste, no estado de Pernambuco, e no Sudeste, no estado de São Paulo, o que representou o segundo ciclo econômico durante a colonização, após o declínio do ciclo do pau-brasil. Ao longo da história, o cultivo desta planta se fortaleceu na região Sudeste, principalmente no estado de São Paulo, aonde imigrantes que chegaram da Europa passaram a desempenhar um importante papel no desenvolvimento industrial da região. No governo Vargas (1930) foi criado o Instituto do Açúcar e do Alcool (IAA), que teria uma importante participação nas atividades econômicas relacionadas ao açúcar no Brasil, e iniciaram-se experimentos com o uso de álcool combustível nos veículos oficiais (BRAUNBECK e CORTEZ, 2005).

Outro importante aspecto está relacionado à eficiência energética. O Brasil conta com 434 usinas sucroalcooleiras, todas elas auto-suficientes em energia graças à produção de vapor por meio da queima de bagaço de cana em caldeiras. Porém, somente 20 % das usinas (88 unidades) comercializam os seus excedentes de energia elétrica no mercado, sendo 54 centrais de co-geração exportando energia elétrica para a rede dentro do estado de São Paulo (61 % do total) e 34 centrais em outros 11 estados brasileiros. A reserva potencial de bioeletricidade

adormecida nos canaviais brasileiros é imensa. Estima-se que, se conseguíssemos aproveitar plenamente toda a biomassa de cana disponível no país, seria possível exportar para a rede elétrica um volume de energia que equivale a uma usina do porte de Itaipu (JANK, 2009). Essa eficiência energética da indústria deve melhorar por meio da implementação da colheita de cana crua, permitindo a recuperação da palha (MACEDO e CORTEZ, 2005).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cultivo de *Arthrospira platensis*

4.1.1. Microrganismo

Arthrospira (Spirulina) platensis UTEX 1926.

4.1.2 - Manutenção da *A. platensis*

A cianobactéria foi mantida em ágar inclinado, com adição de 2 % de ágar em meio líquido de cultivo padrão para *Arthrospira* (item 4.1.3.1).

4.1.3 - Meio de cultivo

Foram utilizados dois tipos de meio. Um meio padrão para o cultivo de *Arthrospira* (SCHLÖSSER, 1982) - item 4.1.3.1, com NaNO_3 como fonte de nitrogênio, que foi utilizado para duas finalidades: manutenção do microrganismo e preparo do inóculo; um meio modificado (item 4.1.3.2), onde se utilizou uréia como fonte de nitrogênio.

4.1.3.1. Meio padrão para cultivo de *A. platensis*

Meio mineral padrão (SCHLÖSSER, 1982), cuja composição, por litro (de água destilada), é a seguinte:

•	NaHCO ₃	13,61g
•	Na ₂ CO ₃	4,03g
•	K ₂ HPO ₄	0,50g
•	NaNO ₃	2,50g
•	K ₂ SO ₄	1,00g
•	NaCl.....	1,00g
•	MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,20g
•	CaCl ₂ .2H ₂ O.....	0,04g
•	**"PIV" solução de metais.....	6mL
•	**"Chu" solução de micronutrientes..	1mL
•	vitamina B ₁₂ (15µg/100mL H ₂ O).....	1mL

**"PIV" solução de metais (em 1 litro de água destilada):

•	Na ₂ EDTA	750 mg
•	FeCl ₃ .6H ₂ O	97 mg
•	MnCl ₂ .4H ₂ O	41 mg
•	ZnCl ₂	5 mg
•	CoCl ₂ .6H ₂ O	2 mg
•	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	4 mg

**"Chu" solução de micronutrientes (em 1 litro de água destilada):

•	Na ₂ EDTA	50,0 mg
•	H ₃ BO ₃	618,0 mg
•	CuSO ₄ .5H ₂ O	19,6 mg
•	ZnSO ₄ .7H ₂ O	44,0 mg
•	CoCl ₂ .6H ₂ O	20,0 mg
•	MnCl ₂ .4H ₂ O	12,6 mg
•	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	12,6 mg

4.1.3.2. Meio modificado

Trata-se do meio de SCHLÖSSER (1982) com substituição do nitrato de sódio por uréia. A vazão específica de alimentação, de meio contendo uréia, é uma variável deste trabalho.

4.1.4. Preparo do inóculo

A. platensis, mantida em ágar, foi colhida com auxílio de alça de platina, em condições assépticas, em fluxo laminar, e inoculada em 10 mL de meio líquido (em tubo de ensaio). Depois de aproximadamente 7 dias, esse material foi utilizado para inocular frascos de Erlenmeyer de 500 mL, com 200 mL de meio de cultivo padrão (item 4.1.3.1), previamente esterilizado por autoclavação.

Os frascos de Erlenmeyer após o repique foram imediatamente levados a agitador rotativo, a 100 RPM (FERRAZ, 1986), temperatura de 30 °C e iluminância de 72 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ (CARVALHO *et al.*, 2004).

O crescimento celular foi acompanhado, sendo utilizada para inóculo uma suspensão de *A. platensis* após de 6 a 8 dias de cultivo (PELIZER *et al.*, 2003), em crescimento exponencial, isenta de contaminação. O material foi filtrado e as células foram lavadas com solução fisiológica, para retirada do NaNO_3 , e ressuspensas em meio de cultivo padrão isento de NaNO_3 . Esta suspensão serviu de inóculo para o cultivo no reator tubular, onde se realizaram os estudos com diferentes vazões específicas de alimentação, de meio contendo uréia como fonte de nitrogênio, com o pH do cultivo controlado pela adição de CO_2 puro de cilindro ou proveniente de fermentação alcoólica.

4.1.5. Dispositivo para cultura

O fotobiorreator tubular utilizado é apresentado na Figura 3. Este é constituído por 20 tubos de vidro transparente (diâmetro interno de 1,0 cm) (CARLOZZI e PINZANI, 2005), com inclinação de 2 % ($1,15^\circ$) para facilitar o escoamento do líquido, interligados com mangueiras de silicone de mesmo diâmetro

interno, de forma que o volume iluminado corresponde a 2,12 L. O volume total do sistema foi de 3,5 litros. Na parte mais baixa dos tubos do reator tubular há um tubo na forma de Y que recebe ar proveniente de uma bomba, deslocando a suspensão celular para um frasco na parte superior, provido de agitação. Também na parte inferior do reator há um outro tubo em Y, no qual ocorre entrada de CO₂ para manutenção de pH quando da abertura da válvula solenóide, controlada por um controlador de pH. Uma válvula de retenção, próximo ao tubo de vidro em forma de Y, impede a entrada do líquido no tubo que conduz o gás. Lâmpadas fluorescentes de 20 watts foram utilizadas para fornecer luz nas intensidades de 60 e 120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ (WATANABE *et al.*, 1995).

Uma bomba peristáltica foi utilizada para alimentação de meio e retirada de meio em processo de cultivo. O volume foi mantido constante através da garantia de uma capacidade maior de vazão de saída em relação à entrada, sendo a vazão de saída limitada por meio de um tubo pescador localizado a uma determinada altura do frasco na parte superior do reator, de tal forma que este não ficasse com um volume menor que o correspondente a altura da coluna de líquido nele contida.

Figura 3: Fotobiorreator tubular

4.1.6. Descrição de um experimento típico de cultivo da *Arthrospira platensis*

A suspensão de *Arthrospira platensis* (inóculo - item 4.1.4) foi adicionada ao biorreator tubular, na concentração inicial de 400 mg.L⁻¹ (SOLETTO *et al.*, 2008) e o volume de trabalho foi de 3,5 L. Após uma fase inicial de processo descontínuo alimentado, com adição diária de 1,2 mM de uréia, iniciou-se o processo contínuo com adição de meio de alimentação contendo 3,2 mM de uréia com diferentes valores de velocidade específica de alimentação (D, d^{-1}): 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0.

O valor de pH nos cultivos foi mantido em $9,5 \pm 0,2$ (SANCHEZ-LUNA *et al.*, 2007), com auxílio da válvula solenóide ligada a um cilindro de CO₂ ou a uma tubulação que conduzia gás proveniente de fermentação alcoólica contínua. Quando o pH atingia valor igual a 9,6 ou acima, o controlador de pH enviava corrente elétrica para a válvula solenóide que, se abrindo, permitia a entrada de CO₂ no meio de cultivo, abaixando o pH até 9,4 ~ 9,5, quando a válvula solenóide se fechava.

A temperatura de 29 °C (SANCHEZ-LUNA *et al.*, 2007) foi obtida mantendo-se a temperatura da sala controlada em torno de 26 °C com auxílio de um condicionador de ar.

O experimento foi finalizado quando se conseguiu a estabilização da concentração celular por um tempo equivalente a pelo menos dois tempos de residência.

4.1.7. Técnicas Analíticas

Os experimentos foram acompanhados por técnicas analíticas descritas a seguir.

4.1.7.1. Acompanhamento do cultivo

4.1.7.1. 1. Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada por turbidimetria, a 560 nm (LEDUY e THERIEN, 1977). Para isso, foi construída uma curva de calibração,

correlacionando o logaritmo da transmitância de uma suspensão com a correspondente concentração celular, em massa seca (Figura 4). Obtida a equação da reta (Eq. 1), o valor da concentração de uma determinada amostra é calculada substituindo-se o Log do valor de transmitância, obtido espectrofotometricamente com comprimento de onda de 560 nm.

$$X = -583,14 \cdot \text{Log.Transmitância} + 1162,4 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde X= concentração celular (mg.L^{-1})

Figura 4: Curva de calibração para determinação da concentração celular de *Arthrospira platensis*.

4.1.7.1.2. Determinação da concentração de carbonato total

Embora a concentração de carbonato total deva se manter constante em decorrência do fornecimento de CO_2 para a manutenção do pH, foi acompanhado na fase líquida do meio em cultivo. Foi determinado por titulometria, de acordo com a metodologia preconizada por PIERCE e HAENISCH (1948).

4.1.7.1.3. Determinação da concentração de amônia livre

Em dias alternados, a amônia livre no meio de cultivo foi quantificada em potenciômetro marca ORION, modelo 710-A, por meio de um eletrodo seletivo para amônia, modelo 95-12 ORION. Determinou-se no meio isento de células, com o valor do pH corrigido para 13 pela adição de NaOH 1,5 M antes da leitura no eletrodo (CARVALHO *et al.*, 2004). Em cada dia de análise foi necessária a construção de uma curva de calibração com solução de NH_4Cl . A figura 5 apresenta um exemplo de curva obtida.

Figura 5: Curva de calibração para determinação da concentração de amônia livre no meio de cultivo.

A concentração de amônia livre de uma determinada amostra foi calculada substituindo-se o valor de milivoltagem, indicado pelo eletrodo seletivo de amônia, na equação da reta obtida no mesmo dia. Esta metodologia também serviu de auxiliar na determinação da concentração de uréia residual, conforme se observa no item a seguir.

4.1.7.1.4. Determinação da concentração de uréia

Para a determinação da concentração de uréia, inicialmente foi hidrolisada em meio ácido, como segue: 10 mL do meio de cultivo isento de células foi submetido a um tratamento com H_2SO_4 (1 mL de H_2SO_4 5 N), a 200 °C, por 6 horas, em bloco digestor Tecnal, modelo TE-106 (CEZARE, 1998). Após esse tempo, o tubo onde ocorreu a hidrólise ácida teve seu conteúdo quantitativamente transferido para um balão volumétrico de 50 mL, com neutralização do pH com NaOH 1,5 M, utilizando fenolftaleína como indicador, e finalmente o volume completado com água destilada. Desse balão foi retirado um volume de 10 mL para a determinação da concentração de amônia, conforme método descrito no item anterior. Considerando a diluição da amostra, podemos calcular a concentração de amônia total, que representa a amônia livre, que já estava presente no meio de cultivo, mais a amônia proveniente da hidrólise da uréia. Assim, por diferença, é possível calcular a concentração de uréia no meio de cultivo.

4.1.7.1.5. Determinação do pH

O pH foi acompanhado por potenciometria, com um aparelho METTLER TOLEDO.

4.1.7.1.6. Determinação dos compostos orgânicos voláteis totais no meio efluente

Foi realizada através de uma adaptação do método do microdicromato (JOSLYN, 1970).

4.1.8. Avaliação da biomassa de *A. platensis* obtida no final do cultivo

Ao final do cultivo, o meio contendo *A. platensis* foi centrifugado e a biomassa foi lavada com água destilada para retirada do sal adsorvido às células e

após secagem a 55 °C por 12 horas (PELIZER *et al.*, 1999), foram analisados os teores de proteínas totais e lipídios totais da biomassa seca.

4.1.8.1. Proteínas totais

Foi determinado pelo método de KJELDHAL, adotando-se o fator de 6,25 para a conversão a partir dos teores de nitrogênio total (OFFICIAL METHODS OF FOOD ANALYSIS, 1984).

4.1.8.2. Lipídios totais

O teor lipídico total das amostras foi determinado de acordo com FERRAZ (1986).

4.2. Fermentação alcoólica contínua

O CO₂ proveniente da fermentação alcoólica contínua serviu como fonte de carbono para o cultivo de *A. platensis*. Para tanto foi utilizado o mosto de melaço de cana-de-açúcar.

4.2.1. Preparo do mosto

A preparação do mosto foi realizada pela direta diluição do melaço de cana de açúcar com água destilada para o preparo do mosto, até concentração 170 g.L⁻¹ em açúcares redutores totais (ART) (GUERREIRO *et al.*, 1997). O mosto foi suplementado com sulfato de amônio na concentração de 1 g.L⁻¹ (MAGALHÃES, 1978) e o pH foi ajustado em 4,5 (JONES *et al.*, 1981) com H₂SO₄ ou NaOH. Por fim, adicionou-se penicilina V ácida (500 ui.L⁻¹) como antibiótico (AQUARONE, 1960; CARVALHO *et al.*, 2003).

4.2.2. Microrganismo e condições de manutenção

Saccharomyces cerevisiae CCT7150, uma cepa isolada de planta industrial de fermentação alcoólica nacional (Usina Nova América), adquirida da Fundação André Tosello, foi utilizada nos cultivos contínuos. Sua manutenção, em tubo de ensaio, foi realizada no meio Sabourand. A cultura foi armazenada sob refrigeração, à 4 °C.

4.2.3. Preparo do inóculo

A cultura de levedura estocada foi multiplicada em tubos contendo meio Sabourand (com agar a 2%) inclinado e incubados em estufa a 30 °C por 24 h. Posteriormente, as culturas foram inoculadas com alça de platina, sob condições assépticas, em tubos contendo 10 mL do meio líquido de Sabourand e incubadas em estufa a 30 °C por 24 h. Cada tubo, por sua vez, inoculou um frasco de Erlenmeyer de 500 mL contendo 90 mL de mosto de melaço de cana-de-açúcar contendo 5 % de ART, que foi então incubado a 30 °C por 12 h, em agitador rotativo, a 400 rpm. Decorrido este tempo, o conteúdo de 10 frascos de Erlenmeyer preparados com o pré-inóculo (1 L) foi adicionado à dorna juntamente com o mosto (9 L), resultando em um volume útil do fermentador de 10 litros, dando início a uma fermentação descontínua (PEREGO JÚNIOR, 1979).

4.2.4. Dispositivo para a cultura

Foi utilizado um fermentador INFORS HT com dorna de 10 litros de capacidade nominal, com controles de temperatura, pH, nível de espuma e frequência de agitação, com saídas que foram conectadas a uma bomba peristáltica para alimentação do mosto e retirada do material durante a fermentação contínua. Quando houve aproveitamento do gás para o cultivo de *Arthrospira platensis*, uma única saída de gás era conectada à válvula solenóide que controlava a entrada do gás no fotobiorreator tubular.

4.2.5. Descrição das condições de fermentação contínua

O cultivo contínuo teve como início o cultivo descontínuo como descrito acima (item 4.2.3). A alimentação contínua do mosto foi iniciada após um período de 6 a 8 h da inoculação de *S. cerevisiae* na dorna, para garantir que o microrganismo se encontrava na fase exponencial de crescimento. A concentração de açúcares no mosto de alimentação foi de 170 g.L^{-1} (GUERREIRO *et al.*, 1997), expressa em ART. A temperatura de fermentação foi de $30 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (KOCK *et al.*, 2000), com frequência do agitador de 500 rpm. A vazão específica de alimentação foi de $0,025 \text{ h}^{-1}$, determinada através de ensaios preliminares, descritos em “Resultados e Discussão”.

4.2.6. Técnicas Analíticas na Fermentação Alcoólica

A fermentação alcoólica foi acompanhada por técnicas analíticas descritas a seguir.

4.2.6.1. Determinação da concentração celular

A concentração celular expressa em massa seca foi determinada por filtração, de acordo com metodologia descrita por CARVALHO *et al.*, 2003.

4.2.6.2. Determinação do pH

O pH foi acompanhado por potenciometria.

4.2.6.3. Determinação de ART

A determinação da concentração de ART foi realizada por espectrofotometria, a 540 nm, pelo método de SOMOGY (1952), precedido da

hidrólise da sacarose contida na fase líquida do meio de fermentação, realizada pela técnica de FALCONE e MARQUES (1965).

4.2.6.4. Determinação da concentração de etanol no meio efluente

As determinações de etanol foram realizadas por uma adaptação do método do microdicromato (JOSLYN, 1970).

4.2.6.5. Avaliação qualitativa dos compostos voláteis orgânicos majoritários no gás efluente da fermentação alcoólica

Foi realizada análise qualitativa de compostos orgânicos em cromatógrafo a gás (Marca Shimadzu, modelo CG-2010) acoplado a espectrômetro de massas (Shimadzu, modelo GCMS – QP5050A). Essa metodologia foi realizada pelo Laboratório de Análises Químicas do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT).

4.3. Experimentos realizados

Os cultivos contínuos de *Arthrospira platensis*, no fotobiorreator tubular, foram conduzidos de acordo com o que é apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Matriz de ensaio

ENSAIO	I ($\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$)	D (dia^{-1})	Fonte de CO ₂
1	60	0,2 $\pm$ 0,01	Cilindro
2	60	0,4 $\pm$ 0,02	Cilindro
3	60	0,6 $\pm$ 0,02	Cilindro
4	60	0,8 $\pm$ 0,02	Cilindro
5	60	1,0 $\pm$ 0,02	Cilindro
6	120	0,2 $\pm$ 0,01	Cilindro
7	120	0,4 $\pm$ 0,02	Cilindro
8	120	0,6 $\pm$ 0,02	Cilindro
9	120	0,8 $\pm$ 0,02	Cilindro
10	120	1,0 $\pm$ 0,02	Cilindro
11	120	0,2 $\pm$ 0,01	Ferment. Alcoólica
12	120	0,4 $\pm$ 0,02	Ferment. Alcoólica
13	120	0,6 $\pm$ 0,02	Ferment. Alcoólica
14	120	0,8 $\pm$ 0,02	Ferment. Alcoólica

I: intensidade luminosa

D: vazão específica de alimentação

Após a conclusão dos 10 primeiros ensaios, os resultados foram analisados estatisticamente, mostrando que a intensidade luminosa de 120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ permite obtenção de melhores resultados. Por isso, essa intensidade foi fixada nos ensaios 11 a 14, com CO₂ proveniente de fermentação alcoólica, ao invés de CO₂ de cilindro para correção do pH.

4.4. Análise dos resultados

A partir dos cultivos, determinando-se o valor de X_P (média das concentrações celulares durante o regime permanente), foram calculados os fatores de conversão de nitrogênio em células e as produtividades em biomassa, de acordo com as fórmulas do item 4.4.1.

O cultivo foi considerado estar em regime permanente quando apresentasse concentração celular (X) com coeficiente de variação de até 10 %, sendo a média destes valores denominada de concentração celular em regime permanente (X_P)

4.4.1. Fórmulas utilizadas nos cálculos dos parâmetros cinéticos

Produtividade em células:

$$P_X = X_P \cdot D$$

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

X_P = concentração celular no regime permanente (mg.L^{-1})

D = vazão específica de alimentação (d^{-1})

Fator de conversão de nitrogênio em células:

$$Y_{X/N} = X_P / N_t$$

Onde: $Y_{X/N}$ = Fator de conversão de nitrogênio em celular (mg.mg^{-1})

X_P = concentração celular no regime permanente (mg.L^{-1})

N_t = quantidade total de nitrogênio adicionado ($87,5 \text{ mg.L}^{-1}$)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Verificação da homogeneidade do fotobiorreator tubular

Garantindo-se suprimento nutricional necessário para o crescimento e condições ambientais não limitantes, a agitação é a variável que deve receber maior atenção. Uma agitação eficiente é necessária para permitir uma dispersão uniforme do microrganismo dentro do meio de cultura, eliminando os efeitos dos gradientes de luz, concentração de nutrientes e temperatura (SASSANO, 2004).

Em um processo contínuo, para que possam ser aplicados os balanços materiais para reatores homogêneos, há necessidade de que as mesmas concentrações de células, substrato e produto, no meio líquido efluente, estejam presentes também no meio de reação (FACCIOTTI, 2001). Isso só é possível em reator com agitação adequada, considerado homogêneo.

Por isso, foi realizado um teste para verificar a homogeneidade do fotobiorreator tubular, de acordo com KOSHIMIZU *et al.* (1983). Para isso, após crescimento em Shaker, o microrganismo foi centrifugado e ressuspendido em água destilada, a fim de interromper o crescimento, obtendo-se uma suspensão celular com concentração igual a 1788 mg.L^{-1} . Essa suspensão foi colocada no fotobiorreator e iniciou-se contínua alimentação com água destilada e concomitante retirada, aplicando-se uma vazão específica de alimentação (D) igual a $0,8 \text{ d}^{-1}$. Se o biorreator estiver em condições que proporcionem a homogeneidade do sistema, a queda da concentração celular deve ser exponencial. Os resultados desse teste são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados obtidos no teste para verificação da homogeneidade do fotobiorreator tubular.

tempo (horas)	tempo (dias)	X (mg.L ⁻¹)	Ln (X)
0	0	1788,55	7,48916
12	0,5	1131,33	7,03114
24	1	830,95	6,72257
36	1,5	590,01	6,38015
48	2	407,50	6,01004
60	2,5	269,33	5,59595
72	3	182,00	5,20401
84	3,5	138,04	4,92751

De fato, como observado na figura 6, a queda da concentração celular foi exponencial, ao longo de 3,5 dias.

Figura 6. Concentração celular (X) ao longo do tempo.

Aplicando-se o logaritmo neperiano aos valores do gráfico da figura 6, tem-se que o coeficiente angular da reta obtida é igual à vazão específica de alimentação do sistema (D).

Figura 7: Logaritmo neperiano da concentração celular (Ln X) em função do tempo.

O valor de D obtido pela reta apresentada na Figura 7 é igual a 0,7337 d^{-1} , que é apenas 8,29 % menor que o adotado experimentalmente (0,8 d^{-1}), o que leva a concluir que o sistema pode ser considerado homogêneo (KOSHIMIZU *et al.* 1983).

5.2. Cultivo padrão de *Arthrospira platensis* no fotobiorreator tubular utilizando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio

Este cultivo foi realizado para possibilitar o cálculo da quantidade de nitrogênio requerida pelo microrganismo para seu crescimento, durante o processo descontínuo alimentado, utilizando uréia como fonte de nitrogênio. Para tanto, *Arthrospira platensis* foi cultivada no reator tubular, em processo descontínuo, com meio padrão de SCHÖSSER (1982), com nitrato como fonte de nitrogênio, intensidade luminosa de $120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e CO_2 para correção do pH.

Tabela 5: Ensaio padrão: Cultivo de *Arthrospira platensis* utilizando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio.

tempo (dias)	X (mg.L^{-1})	Carbonato total (g.L^{-1})	Nitrato (g.L^{-1})
0	$405,78 \pm 00,00$	$11,55 \pm 0,00$	$2,50 \pm 0,00$
1	$528,95 \pm 22,21$	-	-
2	$894,28 \pm 03,68$	$10,60 \pm 0,54$	$2,48 \pm 0,03$
3	$1400,96 \pm 75,88$	-	-
4	$2118,47 \pm 81,84$	$10,17 \pm 0,07$	$1,56 \pm 0,33^*$
5	$2584,25 \pm 50,45$	-	-
6	$3247,17 \pm 163,80$	$12,59 \pm 1,81$	$2,42 \pm 0,12$
7	$3155,93 \pm 34,78$	-	-

*: Houve correção da concentração de nitrato para 2,5 g/L, com adição de nitrato de sódio para prevenir carência de nitrogênio.

Figura 8: Concentração celular (X) em função do tempo do ensaio padrão, utilizando Nitrato de Sódio como fonte de nitrogênio.

Em seis dias, o ensaio padrão (Tabela 5 e Figura 8) apresentou uma concentração celular máxima, em média, igual a $3247,17 \pm 163,80$, o que resulta em uma produtividade em células igual a $473,57 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Tendo em vista que *Arthrospira platensis* apresenta teor de nitrogênio da ordem de 7 % (BEZERRA *et al.*, 2008), tem-se que a necessidade diária de nitrogênio desse microrganismo, nessas condições de cultivo, é de $33,15 \text{ mg.L}^{-1}$, o que equivale a 1,2 mM de uréia. Sendo assim, uma alimentação diária de 1,2 mM de uréia, em único pulso, foi adotada em todos os ensaios, durante a fase inicial de processo descontínuo alimentado.

Para o processo contínuo, levando-se em consideração: a) possibilidade de se obter produtividade em células próxima a $500 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$; b) teor de nitrogênio do microrganismo igual a 7 % (0,07) e c) valor intermediário de vazão específica de alimentação ($D = 0,4 \text{ d}^{-1}$), calcula-se:

$$N = (P_x \text{ esperada}) * (\text{teor de nitrogênio na biomassa})$$

Ou seja:

$$N = 500 * 0,07 = 35 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$$

Como:

$$N_0 \cdot D = N$$

$$N_0 = 35 / 0,4 = 87,5 \text{ mg N.L}^{-1}$$

Onde:

N: Velocidade de adição de nitrogênio no reator

N_0 : Concentração de nitrogênio no meio de alimentação

D: vazão específica de alimentação.

Assim, adotou-se uma concentração de nitrogênio, no meio de alimentação, igual a $87,5 \text{ mg.L}^{-1}$, o que equivale a 3,2 mM de uréia.

5.3. Cultivos contínuos de *Arthrospira platensis* em fotobiorreator tubular utilizando uréia como fonte de nitrogênio e CO₂ de cilindro

Foram realizados 10 ensaios, de acordo com o planejado para essa primeira etapa (Tabela 3, Material e Métodos):

As tabelas 6 a 15 e figuras 9 a 18 apresentam os resultados obtidos na realização dos ensaios 1 a 10. Foram acompanhadas, diariamente, a concentração celular, e em dias alternados, a concentração de carbonato total, amônia e uréia residual. O valor de pH foi controlado com auxílio de um controlador de pH e seu valor foi de $9,5 \pm 0,2$ (SANCHEZ-LUNA *et al.*, 2007).

A tabela 16 apresenta os valores de concentração celular no regime permanente (X_P), Produtividade em células (P_x) e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$).

Tabela 6: Concentração celular (X), Carbonato Total, Amônia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 1 ($60 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $D = 0,2$, CO_2 de cilindro para correção de pH).

Tempo (dias)	Processo	X (mg.L ⁻¹)	Carbonato (g.L ⁻¹)	Am\u00f4nia (Molar)	UR\u00c9IA (Molar)	Nitrog\u00eanio ^c (Molar)
0	P.D.A ^a	400,00	12,00	0,00	$1,20 \times 10^{-3}$	$2,40 \times 10^{-3}$
1	P.D.A ^a	481,12	-	-	-	-
2	P.D.A ^a	898,19	10,91	$2,66 \times 10^{-5}$	$2,6 \times 10^{-5}$	$7,96 \times 10^{-5}$
3	P.D.A ^a	1488,39	-	-	-	-
4	P.D.A ^a	2057,70	11,21	$1,51 \times 10^{-4}$	***	$1,51 \times 10^{-4}$
5	P.C. ^b	2492,92	-	-	-	-
6	P.C. ^b	2281,75 ^d	10,30	$1,53 \times 10^{-5}$	$1,33 \times 10^{-4}$	$2,82 \times 10^{-4}$
7	P.C. ^b	2355,63	-	-	-	-
8	P.C. ^b	2409,19	10,91	$2,16 \times 10^{-6}$	***	$2,68 \times 10^{-6}$
9	P.C. ^b	2373,32	-	-	-	-
10	P.C. ^b	2286,87	10,30	***	$1,48 \times 10^{-6}$	$3,42 \times 10^{-6}$
11	P.C. ^b	2366,23	-	-	-	-
12	P.C. ^b	2298,45	10,30	***	$2,15 \times 10^{-6}$	$4,31 \times 10^{-6}$
13	P.C. ^b	2368,94	-	-	-	-
14	P.C. ^b	2392,92	10,01	$6,12 \times 10^{-6}$	$3,53 \times 10^{-4}$	$7,13 \times 10^{-4}$
15	P.C. ^b	2395,19	-	-	-	-
16	P.C. ^b	2293,32	10,60	$3,08 \times 10^{-5}$	$3,85 \times 10^{-4}$	$8,01 \times 10^{-4}$
17	P.C. ^b	2349,00	-	-	-	-
18	P.C. ^b	2365,00	10,30	$5,21 \times 10^{-5}$	$3,95 \times 10^{-4}$	$8,42 \times 10^{-4}$

^a: Processo Descont\u00ednuo Alimentado

^b: Processo Cont\u00ednuo

^c: Nitrog\u00eanio residual no reator, resultante da am\u00f4nia livre e da ur\u00e9ia residual

^d: In\u00edcio do regime permanente

- : leitura n\u00e3o realizada

***: valor abaixo do detectado pela metodologia anal\u00edtica

Figura 9: Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 1 ($60 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; $D = 0,2 \text{ d}^{-1}$; CO_2 de cilindro para manutenção de pH). A linha vertical delimita o tempo correspondente à mudança do processo de cultivo, de descontínuo para contínuo.

Tabela 7: Concentração celular (X), Carbonato Total, Amônia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 2 ($60 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $D = 0,4$, CO_2 de cilindro para correção de pH).

Tempo (dias)	Processo	X (mg.L ⁻¹)	Carbonato (g.L ⁻¹)	Am\u00f4nia (Molar)	UR\u00c9IA (Molar)	Nitrog\u00eanio ^c (Molar)
0	P.D.A ^a	362,88	12,00	0,00	$1,20 \times 10^{-3}$	$2,40 \times 10^{-3}$
1	P.D.A ^a	394,82	-	-	-	-
2	P.D.A ^a	828,57	10,60	$1,44 \times 10^{-5}$	$2,75 \times 10^{-5}$	$6,95 \times 10^{-5}$
3	P.D.A ^a	1371,50	-	-	-	-
4	P.C. ^b	2026,02	11,21	$9,80 \times 10^{-6}$	$5,80 \times 10^{-5}$	$1,26 \times 10^{-4}$
5	P.C. ^b	1436,41 ^d	-	-	-	-
6	P.C. ^b	1407,10	10,30	$4,81 \times 10^{-5}$	$1,15 \times 10^{-4}$	$2,79 \times 10^{-4}$
7	P.C. ^b	1486,79	-	-	-	-
8	P.C. ^b	1475,25	10,91	$4,85 \times 10^{-5}$	$4,51 \times 10^{-5}$	$1,39 \times 10^{-4}$
9	P.C. ^b	1459,18	-	-	-	-
10	P.C. ^b	1486,79	10,30	$3,43 \times 10^{-5}$	$1,10 \times 10^{-5}$	$5,62 \times 10^{-5}$

^a: Processo Descont\u00ednuo Alimentado

^b: Processo Cont\u00ednuo

^c: Nitrog\u00eanio residual no reator, resultante da am\u00f4nia livre e da ur\u00e9ia residual

^d: In\u00edcio do regime permanente

- : leitura n\u00e3o realizada

Figura 10: Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 2 ($60 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; $D = 0,4 \text{ d}^{-1}$; CO_2 de cilindro para manutenção de pH). A linha vertical delimita o tempo correspondente à mudança do processo de cultivo, de descontínuo para contínuo.

Tabela 8: Concentração celular (X), Carbonato Total, Amônia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 3 ($60 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, $D = 0,6$, CO_2 de cilindro para correção de pH).

Tempo (dias)	Processo	X (mg.L^{-1})	Carbonato (g.L^{-1})	Amônia (Molar)	URÉIA (Molar)	Nitrogênio ^c (Molar)
0	P.D.A ^a	416,71	12,00	0,00	$1,20 \times 10^{-3}$	$2,40 \times 10^{-3}$
1	P.D.A ^a	647,65	-	-	-	-
2	P.D.A ^a	803,79	10,60	$6,02 \times 10^{-4}$	***	$6,02 \times 10^{-4}$
3	P.D.A ^a	1147,22	-	-	-	-
4	P.D.A ^a	1666,48	10,30	$7,10 \times 10^{-6}$	$7,68 \times 10^{-5}$	$1,61 \times 10^{-4}$
5	P.C. ^b	2125,24	-	-	-	-
6	P.C. ^b	1851,87	10,30	$8,05 \times 10^{-6}$	$1,00 \times 10^{-4}$	$2,08 \times 10^{-4}$
7	P.C. ^b	1475,25	-	-	-	-
8	P.C. ^b	1569,06	10,60	$1,88 \times 10^{-5}$	$1,13 \times 10^{-4}$	$2,45 \times 10^{-4}$
9	P.C. ^b	1297,45 ^d	-	-	-	-
10	P.C. ^b	1225,51	10,78	$1,16 \times 10^{-5}$	$2,24 \times 10^{-4}$	$4,61 \times 10^{-4}$
11	P.C. ^b	1276,08	-	-	-	-
12	P.C. ^b	1229,69	10,01	$9,10 \times 10^{-6}$	$1,97 \times 10^{-4}$	$4,02 \times 10^{-4}$
13	P.C. ^b	1175,94	-	-	-	-
14	P.C. ^b	1213,03	10,30	$3,09 \times 10^{-4}$	$1,75 \times 10^{-4}$	$6,58 \times 10^{-4}$

^a: Processo Descontínuo Alimentado

^b: Processo Contínuo

^c: Nitrogênio residual no reator, resultante da amônia livre e da uréia residual

^d: Início do regime permanente

- : leitura não realizada

***: valor abaixo do detectado pela metodologia analítica

Figura 11: Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 3 ($60 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $D = 0,6 \text{ d}^{-1}$; CO_2 de cilindro para manutenção de pH). A linha vertical delimita o tempo correspondente à mudança do processo de cultivo, de descontínuo para contínuo.

Tabela 9: Concentração celular (X), Carbonato Total, Amônia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 4 ($60 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $D = 0,8$, CO_2 de cilindro para corre\u00e7\u00e3o de pH).

Tempo (dias)	Processo	X (mg.L^{-1})	Carbonato (g.L^{-1})	Am\u00f4nia (Molar)	UR\u00c9IA (Molar)	Nitrog\u00eanio ^c (Molar)
0	P.D.A ^a	400,00	12,00	0,00	$1,20 \times 10^{-3}$	$2,40 \times 10^{-3}$
1	P.D.A ^a	422,34	-	-	-	-
2	P.D.A ^a	970,34	12,01	$6,75 \times 10^{-5}$	$1,20 \times 10^{-4}$	$3,08 \times 10^{-4}$
3	P.D.A ^a	1636,23	-	-	-	-
4	P.D.A ^a	2069,31	11,51	$3,52 \times 10^{-5}$	$2,86 \times 10^{-5}$	$9,24 \times 10^{-5}$
5	P.C. ^b	1770,38	-	-	-	-
6	P.C. ^b	1175,94	10,30	$2,28 \times 10^{-5}$	$3,56 \times 10^{-5}$	$9,41 \times 10^{-5}$
7	P.C. ^b	1113,30	-	-	-	-
8	P.C. ^b	900,94	11,51	$1,71 \times 10^{-4}$	***	$1,71 \times 10^{-4}$
9	P.C. ^b	751,46	-	-	-	-
10	P.C. ^b	559,65	11,51	$5,60 \times 10^{-4}$	***	$5,60 \times 10^{-4}$
11	P.C. ^b	247,43 ^d	-	-	-	-
12	P.C. ^b	250,12	12,12	$5,49 \times 10^{-4}$	***	$5,49 \times 10^{-4}$
13	P.C. ^b	233,29	-	-	-	-
14	P.C. ^b	232,43	10,30	$9,24 \times 10^{-4}$	$1,04 \times 10^{-3}$	$3,00 \times 10^{-3}$
15	P.C. ^b	284,69	-	-	-	-
16	P.C. ^b	276,89	12,72	$1,60 \times 10^{-3}$	***	$1,60 \times 10^{-3}$

^a: Processo Descont\u00ednuo Alimentado

^b: Processo Cont\u00ednuo

^c: Nitrog\u00eanio residual no reator, resultante da am\u00f4nia livre e da ur\u00e9ia residual

^d: In\u00edcio do regime permanente

- : leitura n\u00e3o realizada

***: valor abaixo do detectado pela metodologia anal\u00edtica

Figura 12: Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 4 ($60 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; $D = 0,8 \text{ d}^{-1}$; CO_2 de cilindro para manutenção de pH). A linha vertical delimita o tempo correspondente à mudança do processo de cultivo, de descontínuo para contínuo.

Tabela 10: Concentração celular (X), Carbonato Total, Amônia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 5 ($60 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $D = 1,0$, CO_2 de cilindro para correção de pH).

Tempo (dias)	Processo	X (mg.L^{-1})	Carbonato (g.L^{-1})	Amônia (Molar)	URÉIA (Molar)	Nitrogênio ^c (Molar)
0	P.D.A ^a	292,73	12,00	0,00	$1,20 \times 10^{-3}$	$2,40 \times 10^{-3}$
1	P.D.A ^a	416,07	-	-	-	-
2	P.D.A ^a	762,03	10,60	$5,45 \times 10^{-4}$	***	$5,45 \times 10^{-4}$
3	P.D.A ^a	1151,51	-	-	-	-
4	P.D.A ^a	1838,54	10,60	$3,55 \times 10^{-6}$	$1,64 \times 10^{-4}$	$3,31 \times 10^{-4}$
5	P.C. ^b	2425,01	-	-	-	-
6	P.C. ^b	1535,83	10,60	$5,57 \times 10^{-6}$	$2,44 \times 10^{-4}$	$4,94 \times 10^{-4}$
7	P.C. ^b	1023,12	-	-	-	-
8	P.C. ^b	679,66	10,91	$5,36 \times 10^{-4}$	$9,12 \times 10^{-4}$	$2,36 \times 10^{-3}$
9	P.C. ^b	480,18	-	-	-	-
10	P.C. ^b	301,03	10,60	$2,48 \times 10^{-3}$	$1,52 \times 10^{-3}$	$5,52 \times 10^{-3}$
11	P.C. ^b	276,13	-	-	-	-
12	P.C. ^b	250,33	12,02	$2,56 \times 10^{-3}$	$1,12 \times 10^{-3}$	$4,80 \times 10^{-3}$
13	P.C. ^b	159,31	-	-	-	-
14	P.C. ^b	155,48	12,01	$2,24 \times 10^{-3}$	$2,79 \times 10^{-4}$	$2,80 \times 10^{-3}$
15	P.C. ^b	117,18	-	-	-	-
16	P.C. ^b	93,23	11,81	$3,44 \times 10^{-3}$	$6,94 \times 10^{-4}$	$4,83 \times 10^{-3}$
17	P.C. ^b	*	*	*	*	*

^a: Processo Descontínuo Alimentado

^b: Processo Contínuo

^c: Nitrogênio residual no reator, resultante da amônia livre e da uréia residual

- : leitura não realizada

* : lavagem do sistema

***: valor abaixo do detectado pela metodologia analítica

Figura 13: Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 5 ($60 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$; $D = 1,0 \text{ d}^{-1}$; CO_2 de cilindro para manutenção de pH). A linha vertical delimita o tempo correspondente à mudança do processo de cultivo, de descontínuo para contínuo.

Tabela 11: Concentração celular (X), Carbonato Total, Amônia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 6 ($120 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $D = 0,2$, CO_2 de cilindro para correção de pH).

Tempo (dias)	Processo	X (mg.L^{-1})	Carbonato (g.L^{-1})	Amônia (Molar)	URÉIA (Molar)	Nitrogênio ^c (Molar)
0	P.D.A ^a	316,70	12,00	0,00	$1,20 \times 10^{-3}$	$2,40 \times 10^{-3}$
1	P.D.A ^a	359,66	-		-	-
2	P.D.A ^a	630,72	10,91	$2,38 \times 10^{-4}$	$2,07 \times 10^{-4}$	$6,52 \times 10^{-4}$
3	P.D.A ^a	1220,91	-			
4	P.D.A ^a	1608,45	11,51	$1,02 \times 10^{-5}$	$2,25 \times 10^{-4}$	$4,61 \times 10^{-4}$
5	P.D.A ^a	2146,15	-			
6	P.D.A ^a	2465,54	10,60	$1,45 \times 10^{-5}$	$2,04 \times 10^{-4}$	$4,23 \times 10^{-4}$
7	P.C. ^b	2915,05	-			
8	P.C. ^b	3041,46	11,24	$2,46 \times 10^{-3}$	1,42E-05	$2,49 \times 10^{-3}$
9	P.C. ^b	3126,92	-			
10	P.C. ^b	3010,32	11,53	$4,10 \times 10^{-3}$	$4,09 \times 10^{-4}$	$4,92 \times 10^{-3}$
11	P.C. ^b	3001,89	-			
12	P.C. ^b	2915,05	11,82	$3,31 \times 10^{-3}$	$2,32 \times 10^{-4}$	$3,77 \times 10^{-3}$
13	P.C. ^b	2858,77	-			
14	P.C. ^b	2854,80	11,24	$1,56 \times 10^{-3}$	$1,17 \times 10^{-3}$	$3,91 \times 10^{-3}$
15	P.C. ^b	3007,50	-			
16	P.C. ^b	2695,82	10,95	$1,15 \times 10^{-4}$	$1,14 \times 10^{-3}$	$2,39 \times 10^{-3}$
17	P.C. ^b	2663,71	-			
18	P.C. ^b	2652,69	10,95	$1,57 \times 10^{-5}$	$1,52 \times 10^{-3}$	$3,06 \times 10^{-3}$
19	P.C. ^b	2527,56 ^d	-			
20	P.C. ^b	2584,00	11,82	$9,71 \times 10^{-5}$	$1,44 \times 10^{-3}$	$2,97 \times 10^{-3}$
21	P.C. ^b	2573,32	-			
22	P.C. ^b	2465,54	11,24	$8,49 \times 10^{-6}$	$1,14 \times 10^{-3}$	$2,30 \times 10^{-3}$
23	P.C. ^b	2386,78	-			
24	P.C. ^b	2395,04	11,53	$1,44 \times 10^{-5}$	$1,04 \times 10^{-3}$	$2,10 \times 10^{-3}$
25	P.C. ^b	2371,97	-			
26	P.C. ^b	2374,16	10,09	$3,09 \times 10^{-6}$	$9,18 \times 10^{-4}$	$1,84 \times 10^{-3}$
27	P.C. ^b	2395,42	-			
28	P.C. ^b	2378,69	11,24	$3,30 \times 10^{-5}$	$8,99 \times 10^{-4}$	$1,83 \times 10^{-3}$
29	P.C. ^b	2395,71	-			
30	P.C. ^b	2434,19	11,82	$2,17 \times 10^{-6}$	$7,29 \times 10^{-4}$	$1,46 \times 10^{-3}$
31	P.C. ^b	2469,79	-			
32	P.C. ^b	2504,41	11,24	$4,84 \times 10^{-6}$	$5,43 \times 10^{-4}$	$1,09 \times 10^{-3}$

^a: Processo Descontínuo Alimentado

^b: Processo Contínuo

^c: Nitrogênio residual no reator, resultante da amônia livre e da uréia residual

^d: Início do regime permanente

- : leitura não realizada

Figura 14: Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 6 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; $D = 0,2 \text{ d}^{-1}$; CO_2 de cilindro para manutenção de pH). A linha vertical delimita o tempo correspondente à mudança do processo de cultivo, de descont\u00ednuo para cont\u00ednuo.

Tabela 12: Concentração celular (X), Carbonato Total, Amônia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 7 (120 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, D = 0,4, CO_2 de cilindro para correção de pH).

Tempo (dias)	Processo	X (mg.L ⁻¹)	Carbonato (g.L ⁻¹)	Amônia (Molar)	URÉIA (Molar)	Nitrogênio ^c (Molar)
0	P.D.A ^a	391,36	12,00	0,00	1,20x10 ⁻³	2,40x10 ⁻³
1	P.D.A ^a	746,87	-	-	-	-
2	P.D.A ^a	1052,18	11,36	1,66x10 ⁻⁵	2,68x10 ⁻⁶	2,20 x10 ⁻⁵
3	P.D.A ^a	1569,06	-	-	-	-
4	P.D.A ^a	2316,81	10,95	9,69x10 ⁻⁶	1,42x10 ⁻²	2,84 x10 ⁻²
5	P.D.A ^a	2919,12	-	-	-	-
6	P.C. ^b	3407,05	11,31	3,28x10 ⁻⁵	2,96x10 ⁻⁵	9,21 x10 ⁻⁵
7	P.C. ^b	3083,11	-	-	-	-
8	P.C. ^b	2527,56	10,60	1,06x10 ⁻⁵	4,89x10 ⁻⁵	1,08 x10 ⁻⁴
9	P.C. ^b	2475,77	-	-	-	-
10	P.C. ^b	2332,91	10,30	1,55x10 ⁻⁵	7,35x10 ⁻⁵	1,63 x10 ⁻⁴
11	P.C. ^b	2026,98	-	-	-	-
12	P.C. ^b	1843,86 ^d	10,91	2,19x10 ⁻⁵	7,12x10 ⁻⁵	1,64 x10 ⁻⁴
13	P.C. ^b	1798,99	-	-	-	-
14	P.C. ^b	1720,01	11,81	2,41x10 ⁻⁶	7,29x10 ⁻⁵	1,48 x10 ⁻⁴
15	P.C. ^b	1767,79	-	-	-	-
16	P.C. ^b	1778,15	10,30	1,62x10 ⁻⁵	2,83E-05	7,28 x10 ⁻⁵
17	P.C. ^b	1749,77	-	-	-	-

^a: Processo Descontínuo Alimentado

^b: Processo Contínuo

^c: Nitrogênio residual no reator, resultante da amônia livre e da uréia residual

^d: Início do regime permanente

- : leitura não realizada

***: valor abaixo do detectado pela metodologia analítica

Figura 15: Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 7 ($\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; $D = 0,4 \text{ d}^{-1}$; CO_2 de cilindro para manutenção de pH). A linha vertical delimita o tempo correspondente à mudança do processo de cultivo, de descontínuo para contínuo.

Tabela 13: Concentração celular (X), Carbonato Total, Amônia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 8 ($120 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $D = 0,6$, CO_2 de cilindro para correção de pH).

Tempo (dias)	Processo	X (mg.L ⁻¹)	Carbonato (g.L ⁻¹)	Amônia (Molar)	URÉIA (Molar)	Nitrogênio ^c (Molar)
0	P.D.A ^a	292,73	12,00	0,00	$1,20 \times 10^{-3}$	$2,40 \times 10^{-3}$
1	P.D.A ^a	400,98	-	-	-	-
2	P.D.A ^a	802,58	11,21	$1,80 \times 10^{-5}$	$1,14 \times 10^{-4}$	$2,47 \times 10^{-4}$
3	P.D.A ^a	1323,34				
4	P.D.A ^a	2098,59	10,30	$2,17 \times 10^{-6}$	$3,41 \times 10^{-4}$	$6,85 \times 10^{-4}$
5	P.C. ^b	2630,80				
6	P.C. ^b	2228,49	10,60	$3,52 \times 10^{-6}$	$2,82 \times 10^{-4}$	$5,67 \times 10^{-4}$
7	P.C. ^b	1930,55				
8	P.C. ^b	1744,64	10,91	$8,22 \times 10^{-6}$	$3,60 \times 10^{-4}$	$7,28 \times 10^{-4}$
9	P.C. ^b	1552,46 ^d				
10	P.C. ^b	1467,73	10,60	$4,64 \times 10^{-5}$	$4,14 \times 10^{-4}$	$8,74 \times 10^{-4}$
11	P.C. ^b	1583,51				
12	P.C. ^b	1603,88	12,03	$1,88 \times 10^{-5}$	$1,31 \times 10^{-4}$	$2,80 \times 10^{-4}$
13	P.C. ^b	1579,03				
14	P.C. ^b	1600,69	10,00	$1,01 \times 10^{-4}$	$3,09 \times 10^{-4}$	$7,20 \times 10^{-4}$

^a: Processo Descontínuo Alimentado

^b: Processo Contínuo

^c: Nitrogênio residual no reator, resultante da amônia livre e da uréia residual

^d: Início do regime permanente

- : leitura não realizada

***: valor abaixo do detectado pela metodologia analítica

Figura 16: Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 8 ($120 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; $D = 0,6 \text{ d}^{-1}$; CO_2 de cilindro para manutenção de pH). A linha vertical delimita o tempo correspondente à mudança do processo de cultivo, de descontínuo para contínuo.

Tabela 14: Concentração celular (X), Carbonato Total, Amônia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 9 ($120 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $D = 0,8$, CO_2 de cilindro para correção de pH).

Tempo (dias)	Processo	X (mg.L^{-1})	Carbonato (g.L^{-1})	Amônia (Molar)	URÉIA (Molar)	Nitrogênio ^c (Molar)
0	P.D.A ^a	416,71	12,00	0,00	$1,20 \times 10^{-3}$	$2,40 \times 10^{-3}$
1	P.D.A ^a	744,55	-	-	-	-
2	P.D.A ^a	990,32	12,02	$4,66 \times 10^{-4}$	***	$4,66 \times 10^{-4}$
3	P.D.A ^a	1572,33				
4	P.C. ^b	1911,33	10,30	$1,41 \times 10^{-5}$	$1,87 \times 10^{-4}$	$3,88 \times 10^{-4}$
5	P.C. ^b	1986,27				
6	P.C. ^b	1671,45	10,30	$9,25 \times 10^{-5}$	$1,56 \times 10^{-4}$	$4,04 \times 10^{-4}$
7	P.C. ^b	1127,31				
8	P.C. ^b	1286,75	12,01	$3,06 \times 10^{-4}$	$8,79 \times 10^{-5}$	$4,82 \times 10^{-4}$
9	P.C. ^b	1073,70				
10	P.C. ^b	723,89 ^d	12,80	$5,05 \times 10^{-4}$	$3,52 \times 10^{-4}$	$1,21 \times 10^{-3}$
11	P.C. ^b	821,45				
12	P.C. ^b	789,32	10,30	$2,18 \times 10^{-4}$	$1,98 \times 10^{-4}$	$6,15 \times 10^{-4}$
13	P.C. ^b	808,65				
14	P.C. ^b	758,52	12,01	$3,77 \times 10^{-4}$	$2,99 \times 10^{-4}$	$9,74 \times 10^{-4}$

^a: Processo Descontínuo Alimentado

^b: Processo Contínuo

^c: Nitrogênio residual no reator, resultante da amônia livre e da uréia residual

^d: Início do regime permanente

- : leitura não realizada

***: valor abaixo do detectado pela metodologia analítica

Figura 17: Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 9 ($120 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; $D = 0,8 \text{ d}^{-1}$; CO_2 de cilindro para manutenção de pH). A linha vertical delimita o tempo correspondente à mudança do processo de cultivo, de descontínuo para contínuo.

Tabela 15: Concentração celular (X), Carbonato Total, Amônia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 10 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $D = 1,0$, CO_2 de cilindro para correção de pH).

Tempo (dias)	Processo	X (mg.L ⁻¹)	Carbonato (g.L ⁻¹)	Am\u00f4nia (Molar)	UR\u00c9IA (Molar)	Nitrog\u00eanio ^c (Molar)
0	P.D.A ^a	316,70	12,00	0,00	$1,20 \times 10^{-3}$	$2,40 \times 10^{-3}$
1	P.D.A ^a	283,11	-	-	-	-
2	P.D.A ^a	513,95	10,91	$1,31 \times 10^{-4}$	$1,78 \times 10^{-4}$	$4,87 \times 10^{-4}$
3	P.D.A ^a	1131,41	-	-	-	-
4	P.D.A ^a	1390,24	11,51	$3,69 \times 10^{-6}$	$2,03 \times 10^{-4}$	$4,10 \times 10^{-4}$
5	P.D.A ^a	1947,14	-	-	-	-
6	P.C. ^b	2216,13	10,60	$1,39 \times 10^{-5}$	$1,62 \times 10^{-4}$	$3,37 \times 10^{-4}$
7	P.C. ^b	1701,48	-	-	-	-
8	P.C. ^b	1240,74	11,82	$3,67 \times 10^{-3}$	$5,35 \times 10^{-4}$	$4,74 \times 10^{-3}$
9	P.C. ^b	883,90	-	-	-	-
10	P.C. ^b	468,02	10,95	$4,30 \times 10^{-3}$	$1,01 \times 10^{-3}$	$6,31 \times 10^{-3}$
11	P.C. ^b	312,25	-	-	-	-
12	P.C. ^b	178,07	11,53	$4,67 \times 10^{-3}$	$7,78 \times 10^{-4}$	$6,23 \times 10^{-3}$
13	P.C. ^b	130,17	-	-	-	-
14	P.C. ^b	100,39	10,95	$3,04 \times 10^{-3}$	$1,68 \times 10^{-3}$	$6,40 \times 10^{-3}$
15	P.C. ^b	80,90	-	-	-	-
16	P.C. ^b	68,98	11,24	$1,96 \times 10^{-3}$	$2,15 \times 10^{-3}$	$6,25 \times 10^{-3}$
17	P.C. ^b	0,00	-	-	-	-

^a: Processo Descont\u00ednuo Alimentado

^b: Processo Cont\u00ednuo

^c: Nitrog\u00eanio residual no reator, resultante da am\u00f4nia livre e da ur\u00e9ia residual

- : leitura n\u00e3o realizada

***: valor abaixo do detectado pela metodologia anal\u00edtica

Figura 18: Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 10 ($120 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$; $D = 1,0 \text{ d}^{-1}$; CO_2 de cilindro para manutenção de pH). A linha vertical delimita o tempo correspondente à mudança do processo de cultivo, de descontínuo para contínuo

Tabela 16: Concentração celular média em regime permanente (X_P), produtividade em células (P_X) e Fator de Conversão de Nitrogênio em Células ($Y_{X/N}$) dos ensaios realizados.

Ensaio	I ^a	D ^b (dia ⁻¹)	X_P (mg.L ⁻¹)	P_X (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	$Y_{X/N}$ mg.mg ⁻¹
1	60	0,2	2348,92 ± 57,23	469,78	26,84
2	60	0,4	1458,59 ± 31,66	583,43	16,67
3	60	0,6	1236,28 ± 43,97	741,77	14,13
4	60	0,8	254,14 ± 21,99	203,31	2,90
5	60	1,0	***	***	***
6	120	0,2	2446,90 ± 74,81	489,38	27,96
7	120	0,4	1776,43 ± 42,49	710,57	20,30
8	120	0,6	1564,55 ± 50,88	938,73	17,88
9	120	0,8	780,36 ± 39,48	624,29	8,92
10	120	1,0	***	***	***

^a: Intensidade luminosa ($\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

^b: Vaz\u00e3o espec\u00edfica de alimenta\u00e7\u00e3o

***: lavagem do sistema ("wash out")

Todos os ensaios foram iniciados com processo descont\u00ednuo alimentado, com adi\u00e7\u00e3o di\u00e1ria de ur\u00e9ia igual a 1,2 mM, at\u00e9 que se atingisse uma concentra\u00e7\u00e3o celular pr\u00f3xima de 2000 mg.L⁻¹. Em ensaios em que se aplicaria baixos valores de D, esperou-se atingir uma concentra\u00e7\u00e3o celular superior a 2000 mg.L⁻¹. A partir de ent\u00e3o, iniciou-se o processo cont\u00ednuo com uma determinada vaz\u00e3o espec\u00edfica de alimenta\u00e7\u00e3o (D), de acordo com a Tabela 3, com meio contendo ur\u00e9ia na concentra\u00e7\u00e3o de 3,2 mM.

Durante o processo descont\u00ednuo alimentado, todos os ensaios apresentaram um crescimento satisfat\u00f3rio, possibilitando o in\u00edcio do processo cont\u00ednuo a partir do 4\u00b0 ou 5\u00b0 dia (Tabelas 6 a 15 e Figuras 9 a 18). Isso, aliado ao sucesso do processo cont\u00ednuo, indica a r\u00e1pida adapta\u00e7\u00e3o do microrganismo a nova fonte de nitrog\u00eanio, ur\u00e9ia, mesmo tendo recebido nitrato de s\u00f3dio na fase de preparo do in\u00f3culo. Esse fen\u00f4meno j\u00e1 foi observado por DANESI *et al.* (2002), que

empregaram uréia no lugar de KNO_3 , do meio de PAOLETTI (PAOLETTI *et al.*, 1975). Isso ocorre, provavelmente, devido à hidrólise espontânea da uréia em pH alcalino ou pela ação da enzima urease (CARVAJAL *et al.*, 1980; SHIMAMATSU, 2004), formando amônia, que é a forma preferencial de captação de nitrogênio pela célula, em que entra por difusão (BOUSSIBA, 1989). Por isso, como se pode ver nas figuras 9 a 18, é quase imperceptível uma fase lag na curva de crescimento do microrganismo nos diferentes ensaios. NERANTIZ *et al.* (2002), por sua vez, observaram uma fase lag de até 6 dias, em cultivos de *Arthrospira platensis* em fotobiorreator tubular helicoidal, empregando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio e um volume de trabalho e intensidade luminosa bem maiores, 170 L e $400 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente.

Mesmo durante o processo contínuo, o microrganismo apresentou-se eficiente no consumo da uréia como fonte de nitrogênio, sendo possível a obtenção do regime permanente em quase todos os ensaios realizados. Apenas nos ensaios 5 e 10 (Tabelas 10 e 15, e Figuras 13 e 18), que apresentam a maior vazão específica de alimentação, não foi possível obter o regime estacionário. Nestes ensaios, a queda da concentração celular foi lenta, indicando que mesmo nestes casos as maiores concentrações de amônia no meio não foram tóxicas para o crescimento do microrganismo, sendo que, provavelmente, a lavagem foi decorrente da vazão específica de alimentação excessivamente alta associada a valores de concentração de amônia que poderiam ser inibitórias (CARVALHO *et al.*, 2004). De fato, a concentração de uréia no meio de alimentação (3,2 mM) poderia resultar em uma concentração de amônia no meio de no máximo 6,4 mM, que, embora possa ser considerada inibitória (CARVALHO *et al.*, 2004), está abaixo da concentração considerada tóxica para o crescimento de *Arthrospira platensis* (10 mM) (BELKIN e BOUSSIBA (1991).

A lavagem do sistema, nos ensaios 5 e 10, aconteceu porque, claramente, a vazão específica de alimentação ($D = 1,0 \text{ dia}^{-1}$) foi maior que velocidade específica de crescimento máxima (μ_{max}). Mas, provavelmente, μ_{max} de *Arthrospira platensis* nas condições dos ensaios, realizados em fotobiorreator tubular com uréia como fonte de nitrogênio, é maior que $0,8 \text{ dia}^{-1}$, já que quando se aplicou um $D=0,8 \text{ dia}^{-1}$, foi possível a obtenção de regime permanente. MATSUDO

et al. (2009) cultivando *Arthrospira platensis* em minitanques, em processo descontínuo alimentado repetitivo, com uréia, obteve um $\mu_{\max}$ de $0,74 \text{ dia}^{-1}$. De fato, seria esperado que o processo contínuo levasse a valor de $\mu_{\max}$ maior que o obtido em processo descontínuo alimentado, uma vez que no processo contínuo não há qualquer tipo de limitação de nutriente ou de luz, em condições de lavagem, que é a condição em que se é obtido o valor desta velocidade.

Em todos os outros ensaios, foi possível a obtenção de regime permanente, com notável redução da concentração de nitrogênio amoniacal no meio de cultivo, chegando a uma remoção de até 97,53 % e 97,99 % nos ensaios 2 e 7, respectivamente, ambos com um D igual a $0,4 \text{ dia}^{-1}$ (Tabela 17).

Tabela 17: Taxa de remoção de nitrogênio amoniacal do meio de cultivo nos diferentes ensaios.

Ensaio	I ^a ($\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	D ^b (dia^{-1})	N ₀ ^c (mM)	N ^d (mM)	Remoção (%)
1	60	0,2	6,40	0,38	94,09
2	60	0,4	6,40	0,16	97,53
3	60	0,6	6,40	0,51	92,08
4	60	0,8	6,40	1,72	73,17
5	60	1,0	***	***	***
6	120	0,2	6,40	1,94	69,67
7	120	0,4	6,40	0,13	97,99
8	120	0,6	6,40	0,62	90,24
9	120	0,8	6,40	0,93	85,42
10	120	1,0	***	***	***

^a: Intensidade luminosa

^b: vazão específica de alimentação de meio contendo uréia

^c: Concentração de nitrogênio amoniacal (em forma de uréia) no meio de alimentação

^d: Concentração de nitrogênio amoniacal (em forma de amônia livre e uréia residual) no meio em cultivo.

***: lavagem do sistema.

FACCIOTTI (2001) destaca que para tratamento biológico de resíduos, o ideal é operar o reator com baixos valores de D, para que se possa obter um efluente com baixos valores da concentração do substrato. Os resultados obtidos nestes ensaios podem ser de grande interesse para uma possível aplicação ambiental do cultivo contínuo de *Arthrospira platensis* para remoção de nitrogênio amoniacal, como já assinalado por SASSANO *et al.* (2007).

Embora os meios de cultivo tradicionais para *Arthrospira platensis* sejam compostos de sais de nitrato como fonte de nitrogênio, a substituição por uréia acarreta em um ganho do ponto de vista energético. Em meio alcalino, a uréia sofre hidrólise gerando amônia, que é facilmente aproveitada pelas células. No caso do nitrato, o microrganismo precisa reduzi-lo a nitrito e posteriormente a amônia, processos que envolvem gastos energéticos (HATORI e MYERS, 1966), como é apresentado no esquema da Figura 19.

Figura 19. Esquema da assimilação da amônia proveniente de uréia e nitrato de sódio.

Segundo MAHAJAN e KAMAT (1995), a uréia tem se mostrado uma fonte de nitrogênio bastante efetiva para a produção de biomassa bem como para a produção do ácido graxo γ -linolênico. Os mesmos autores verificaram que dentre diversas fontes de nitrogênio estudadas, KNO₃, NaNO₃, uréia, NH₄NO₃, (NH₄)₃PO₄ e

(NH₄)₂SO₄ (nas concentrações de 0,01, 0,03 e 0,05M), a uréia levou à formação de uma maior quantidade de γ -linolênico.

DAVIS *et al.* (1953) indicam uréia como a melhor fonte de nitrogênio para produção de biomassa de *Chlorella*, pois não propicia contaminação bacteriana, induz a um crescimento mais rápido que com nitrato, mantém o pH constante e pode ser adicionado em altas concentrações sem prejudicar o crescimento.

Os cultivos deste trabalho tiveram seu pH controlado, fixando-se o valor a $9,5 \pm 0,2$. Um típico cultivo de *Arthrospira platensis* leva ao aumento do pH ao longo do crescimento (MATSUDO *et al.*, 2009). Esse fenômeno, de aumento do pH, pode ser explicado pelo consumo dos íons bicarbonato, como fonte de carbono, durante o crescimento, liberando íons carbonato.

SANCHEZ-LUNA *et al.* (2007) indicam pH 9,5 como sendo a melhor condição para crescimento de *Arthrospira platensis*, usando uréia como fonte de nitrogênio. Nesse mesmo trabalho, o controle de pH foi realizado com adição de HCl, mas com essa técnica, há perda da fonte de carbono na forma de CO₂. Nesse aspecto, a adição de CO₂ para o controle de pH pode ser muito mais interessante.

O CO₂ adicionado, para o controle do pH em torno de 9,5, deveria repor a quantidade de bicarbonato consumido pelo microrganismo. De fato, a concentração de carbonato total se manteve sempre entre 10 e 12 g.L⁻¹ (Tabelas 6 a 15).

O pH, além de determinar a forma ideal de aproveitamento da fonte de carbono pelo microrganismo, determina também o equilíbrio da fonte de nitrogênio amoniacal, que pode se apresentar na forma de amônia livre ou protonada (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, como mostra a Figura 20, elaborada a partir da aplicação da equação de Henderson-Hasselbach (RUSSEL, 1982), quanto mais alcalino se torna o meio de cultivo, maior é a proporção de amônia em relação ao amônio, e por conseguinte, maior seria a perda de amônia por volatilização. Por isso, mais um fator que indica a importância de se controlar o pH do meio de cultivo.

Figura 20: Porcentagem de Amônia e Amônio em Função do pH.

Enfim, todos os ensaios em que se obteve o regime permanente, poderiam ser estendidos por longos períodos, sem alterações significativas nas condições dentro do reator (principalmente concentração de amônia, concentração celular, pH, concentração de carbonato total), o que caracteriza um processo contínuo em estado estacionário.

5.3.1. Avaliação da concentração celular em regime permanente (X_P)

A tabela 16 mostra a média dos valores de concentração celular obtidos no regime permanente (X_P) dos ensaios realizados. Como se observa também na figura 21, X_P foi uma função decrescente da vazão específica de alimentação (D). Isso indica a importância da vazão específica de alimentação na retirada de células do reator, porque quanto maior esta vazão, maior será também a velocidade de retirada de meio do reator e, conseqüentemente, menor a concentração celular no reator (SASSANO, 2004) o que justifica menores valores de X_P quando se aplicaram maiores valores de D , e também o fenômeno de lavagem ("washout") nos ensaios 5 e 10. O efeito de D sobre X_P é confirmado pelo valor do nível descritivo ($p = 0,002$, Tabela 18) na Análise de Variância realizada.

Nessa mesma tabela, observa-se que a intensidade luminosa também exerce influência sobre essa variável dependente. De fato, considerando-se os ensaios 2 a 4 e 7 a 9, verifica-se que para um mesmo valor de D , a intensidade luminosa de $120 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ sempre proporcionou maiores valores de X_p em relação a $60 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Esses resultados indicam que os cultivos com $60 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foram limitados por luz. Em condições não limitadas por nutrientes, menores intensidades luminosas são insuficientes para fornecer energia necessária ao crescimento celular satisfatório. O mesmo fenômeno foi observado por DANESI *et al.* (2004), empregando uréia como fonte de nitrogênio em intensidades luminosas de 24 e $60 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Figura 21: Concentrao celular obtida no regime permanente (X_p) em funo da vazão especfica de alimentao (D) de meio contendo uréia em duas diferentes intensidades luminosas: $I = 60 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (♦) e $I = 120 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (▲).

Tabela 18 - Análise estatística de variância (ANOVA) aplicada aos dados experimentais de concentração celular média no regime permanente (X_P).

Fonte	GL	SQ	QM	F	p
I	1	201720	201710	13,17	0,036*
D	3	3589279	1196426	78,14	0,002*
Erro	3	45935	15312		
Total	7	7357073			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio;

I: Intensidade luminosa; D: Vazão específica de alimentação.

*: Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

5.3.2. Avaliação da Produtividade em células (P_X)

Obtendo-se o valor de X_P , a produtividade em células (P_X) de cada ensaio foi obtida a partir da multiplicação do primeiro valor pelo valor de D. Como se observa na tabela 16 e Figura 22, os valores de produtividade em células não apresentaram a mesma resposta aos diferentes valores de D. Considerando-se um nível de significância de 5 %, verifica-se que neste caso, a intensidade luminosa e a vazão específica de alimentação não apresentam uma influência tão evidente sobre P_X , como observado para X_P ($p = 0,110$ e $0,108$, respectivamente, Tabela 19). Mesmo assim, observando-se a tabela 16 e a figura 22, verifica-se que o aumento de D até $0,6 \text{ dia}^{-1}$, leva a um aumento da produtividade em células, mas a partir deste ponto a força de arraste de células promovida pelos altos valores de D foram maiores do que a capacidade de multiplicação do microrganismo. Embora ensaios com valores de D menores, por exemplo o ensaio 1 e 6, apresentem um valor de X_P alto, provavelmente não só a pequena vazão de saída de meio em cultivo leve a uma produtividade menor, mas também o efeito do sombreamento (VONSHAK *et al.*, 2000) pode ter diminuído a velocidade de multiplicação das células.

Figura 22: Produtividade em células no regime permanente (P_x) em função da vazão específica de alimentação (D) de meio contendo uréia em duas diferentes intensidades luminosas: $I = 60$ $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (◆) e $I = 120$ $\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (▲).

Tabela 19 - Análise estatística de variância (ANOVA) aplicada aos dados experimentais de produtividade em células (P_x).

Fonte	GL	SQ	QM	F	p
I	1	73090	73089,6	5,08	0,110
D	3	218011	72670,4	5,05	0,108
Erro	3	43191	14397,1		
Total	7	334292			

GL: grau de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; I: Intensidade luminosa; D: Vazão específica de alimentação.

A produtividade em células de $938,73 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, obtida no ensaio 8, com $120 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e $D = 0,6 \text{ dia}^{-1}$, é muito maior que aquela obtida em tanques abertos, empregando uréia em processo descontínuo alimentado repetitivo (MATSUDO *et al.*, 2009) ou cloreto de amônio em processo descontínuo alimentado (SANCHEZ-LUNA *et al.*, 2007), confirmando os resultados de CONVERTI *et al.* (2006). Comparando o crescimento de *A. platensis* em tanques abertos e reatores tubulares, com $55 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, em processo descontínuo, CONVERTI *et al.* (2006) observaram que a produtividade em células aumentou de $60 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, em tanque aberto para $290 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, em reator tubular. Além disso, aumentando a

intensidade luminosa para $120 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, obtiveram uma produtividade em células de $620 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Os valores de produtividade em células obtidos no presente trabalho também foram maiores do que os obtidos por RICHMOND (1990), que cultivou *Arthrospira platensis* em fotobiorreator tubular *outdoor* obtendo uma produtividade de $370 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$; e MORAIS e COSTA (2007) que obtiveram produtividade de $220 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ em fotobiorreator tubular em série.

SASSANO (2004) verificou que o processo contínuo pode ser adequado para o cultivo de *Arthrospira platensis* em tanque vertical de vidro, obtendo regime permanente em várias condições experimentais. Entretanto, a fundamental importância de uma distribuição adequada de luz é provada pelo fato que, ainda que tenham obtido regime permanente em várias condições experimentais, a maior produtividade em células foi de apenas $92,4 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, (com $D = 0,12 \text{ dia}^{-1}$) o que corresponde a apenas 1 décimo do obtido no presente trabalho.

5.3.3. Avaliação do Fator e Conversão de Nitrogênio em Células ($Y_{X/N}$)

$Y_{X/N}$ foi calculado dividindo-se X_P pela concentração de nitrogênio no meio de alimentação ($N_0 = 87,5 \text{ mg.L}^{-1}$). A partir da tabela 16 e figura 23, observa-se que o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) está intimamente associado à concentração celular obtida durante o regime permanente (X_P). Verifica-se, neste caso também, que tanto a intensidade luminosa quanto a vazão específica de alimentação exercem influência sobre $Y_{X/N}$ ($p = 0,036$ e $0,002$, respectivamente, Tabela 20). Para um determinado valor de D , a intensidade luminosa de $120 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ possibilita a obtenção de maiores valores de $Y_{X/N}$, em relação a $60 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Exceção é verificada em $D = 1,0$, pois neste caso houve lavagem do sistema nas duas intensidades luminosas. Isso indica que sob $60 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, o cultivo é limitado por luz e a energia é insuficiente para sustentar o crescimento celular e, conseqüentemente, uma porção maior da fonte de nitrogênio pode ser perdida na forma de NH_3 , como verificado por

BEZERRA *et al.* (2008) em cultivos descontínuos alimentados, limitados por luz, empregando cloreto de amônio como fonte de nitrogênio.

Para ambas as intensidades luminosas (60 e $120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) \u00e9 evidente a queda de $Y_{X/N}$ com o aumento do valor de D e, conseq\u00fcentemente, o aumento do fornecimento da fonte de nitrog\u00eanio ao sistema. Esse mesmo fen\u00f4meno foi verificado em processo descont\u00ednuo alimentado repetitivo com a mesma fonte de nitrog\u00eanio (MATSUDO *et al.*, 2009) , em processo cont\u00ednuo, em tanque vertical de vidro (SASSANO *et al.*, 2007), e descont\u00ednuo alimentado, em tanques abertos, utilizando cloreto de am\u00f4nio como fonte de nitrog\u00eanio (CARVALHO *et al.*, 2004).

Figura 23: Fator de convers\u00e3o de nitrog\u00eanio em c\u00e9lulas ($Y_{X/N}$) em fun\u00e7\u00e3o da vaz\u00e3o espec\u00edfica de alimenta\u00e7\u00e3o (D) de meio contendo ur\u00e9ia em duas diferentes intensidades luminosas: $I = 60 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($\blacklozenge$) e $I = 120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($\blacktriangle$).

Tabela 20 - An\u00e1lise estat\u00edstica de vari\u00e2ncia (ANOVA) aplicada aos dados experimentais de fator de convers\u00e3o de nitrog\u00eanio em c\u00e9lulas ($Y_{X/N}$).

Fonte	GL	SQ	QM	F	p
I	1	26,346	26,346	13,17	0,036*
D	3	468,804	156,268	78,14	0,002*
Erro	3	6,000	2,000		
Total	7	501,149			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado m\u00e9dio; I: Intensidade luminosa; D: Vaz\u00e3o espec\u00edfica de alimenta\u00e7\u00e3o.

*: Significativo ao n\u00edvel de 5% de probabilidade pelo teste F.

Verifica-se, portanto, que a intensidade luminosa (I) exerceu influência mais significativa em X_P e $Y_{X/N}$, e com menor evidência em P_X , de tal forma que $120 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ permitiu a obtenção de maiores valores desses 3 parâmetros, em relação a $60 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Isso indica que, mesmo a maior intensidade luminosa ainda não foi suficiente para provocar fotoinibição e/ou fotooxidação. De fato, BEZERRA *et al* (2008) verificaram um efeito de fotoinibição quando cultivaram *S. platensis* em uma intensidade luminosa equivalente a $168 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Mas, além disso, a temperatura próxima de 29°C provavelmente propiciou um melhor aproveitamento da luz, evitando qualquer efeito prejudicial, nessa intensidade, pois como observado por TORZILLO e VONSHAK (1994), em trabalho envolvendo a interação entre luz e temperatura, a temperatura de 35°C propiciou melhor resistência a células de *Arthrospira platensis* submetidas a altas intensidades luminosas, ao passo que em temperaturas tanto acima (40°C) quanto abaixo (25°C) o microrganismo foi muito mais sensível ao efeito de fotoinibição.

Por ser um microrganismo fotossintetizante, é clara a dependência do crescimento de *Arthrospira platensis* em relação à luz, como já descrito por diferentes autores (BARBOSA, 2003; RICHMOND, 2000; BEZERRA *et al.*, 2008). DANESI *et al.* (2004) também observaram o aumento da concentração celular máxima com o aumento da Intensidade luminosa (de 2 para 5 Klux, 24 e $60 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente). Este mesmo trabalho destaca também que embora resulte em menor concentração celular, a menor intensidade luminosa possibilita maior produção de clorofila.

5.3.4. Avaliação do teor de proteínas e lipídios da biomassa de *Arthrospira platensis*

Tendo em vista que os principais componentes da biomassa de *Arthrospira platensis* são proteínas e lipídios, e que seus teores na biomassa de vários microrganismos fotossintetizantes dependem de fatores nutricionais e ambientais (OLGUIN *et al.*, 2001) é importante essa avaliação nas diferentes

condições experimentais. Ao final de cada cultivo, a biomassa resultante foi levada à estufa para secagem, para posterior análise desses teores, que são apresentados na tabela 21.

Tabela 21: Teor de proteínas e lipídios na biomassa seca de *Arthrospira platensis* obtida nos ensaios.

Ensaio	I ^a	D ^b (dia ⁻¹)	Proteínas (%)	Lipídios (%)
1	60	0,2	25 ± 0,78	9 ± 0,89
2	60	0,4	38 ± 1,03	10 ± 0,12
3	60	0,6	54 ± 1,37	11 ± 0,37
4	60	0,8	57 ± 0,60	11 ± 0,58
5	60	1,0	***	***
6	120	0,2	23 ± 0,93	10 ± 0,62
7	120	0,4	28 ± 1,17	8 ± 0,14
8	120	0,6	51 ± 1,17	11 ± 0,29
9	120	0,8	56 ± 1,48	11 ± 0,87
10	120	1,0	***	***

^a: Intensidade luminosa ($\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

^b: Vazão específica de alimentação

***: lavagem do sistema ("wash out")

Como observado na tabela 21 e figura 24, o teor de proteínas sofreu influência dos diferentes valores de vazão específica de alimentação, mas não da intensidade luminosa, como confirmado pela Análise de Variância na tabela 22 ($p = 0,006$ e $0,172$, respectivamente). Verifica-se que houve um aumento do teor de proteínas com o aumento da vazão específica de alimentação. Mesmo efeito foi observado por SASSANO *et al.* (2007) em cultivo contínuo de *Arthrospira platensis* em tanque vertical de vidro. Esse fenômeno pode ser explicado pela associação da queda concentração celular no biorreator com o aumento do fornecimento de nitrogênio. Embora BEZERRA *et al.* (2008) tenham observado a redução do teor de

proteínas com o aumento da intensidade luminosa, esse efeito não foi observado no presente trabalho, provavelmente devido ao fornecimento adequado de nitrogênio.

Os ensaios com maior valor de D (4 e 9, $D = 0,8 \text{ dia}^{-1}$) propiciaram um teor de proteínas de 57 e 56 %, respectivamente, o que está dentro do valor esperado para biomassa de *Arthrospira* (VONSHAK, 1977), que varia de 50 a 60 %, e próximo do valor de 54 %, obtido por MAHAJAN e KAMAT (1995), cultivando esse microrganismo em condições não limitadas por nitrogênio. DANESI *et al.* (2002) obtiveram teor de proteínas de 60,5 %, utilizando nitrato como fonte de nitrogênio e DANESI *et al.* (2004) obtiveram 62,5 %, utilizando uréia como fonte de nitrogênio, cultivando o mesmo microrganismo em processo descontínuo e descontínuo alimentado, respectivamente, em minitanques. O alto teor de proteínas contido nesse microrganismo permite considerá-lo como importante fonte alternativa de proteínas, como já observado por BECKER (1994).

Figura 24: Teor de proteínas em função da vazão específica de alimentação (D) de meio contendo uréia em duas diferentes intensidades luminosas: $I = 60 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (□) e $I = 120 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (■).

Tabela 22 - Análise estatística de variância (ANOVA) aplicada aos teores de proteínas.

Fonte	GL	SQ	QM	F	p
I	1	37,64	37,642	3,19	0,172
D	3	1437,03	491,009	41,56	0,006
Erro	3	35,45	11,816		
Total	7	1546,12			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; I: Intensidade luminosa; D: Vazão específica de alimentação.

Trabalhos na literatura relatam a diminuição do teor de lipídios com o aumento da intensidade luminosa (BEZERRA *et al.*, 2008) ou aumento do teor de lipídios com a diminuição do fornecimento de nitrogênio (MACEDO e ALEGRE, 2001). Entretanto, no presente trabalho, como observado na tabela 21 e figura 25, nem os diferentes valores de vazão específica de alimentação nem a intensidade luminosa exerceram influência sobre o teor de lipídios, como confirmado pela Análise de Variância na tabela 23 ($p = 0,87$ e $0,282$, respectivamente). Os valores variam de 9 a 11 %, e estão dentro da faixa considerada típica para o gênero *Arthrospira*, que vai de 6 a 13 % (COHEN, 1997).

Figura 25: Teor de lipídios em função da vazão específica de alimentação (D) de meio contendo uréia em duas diferentes intensidades luminosas: $I = 60 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ (□) e $I = 120 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ (■).

Tabela 23 - Análise estatística de variância (ANOVA) aplicada aos teores de lipídios.

Fonte	GL	SQ	QM	F	p
I	1	0,9919	0,91186	1,71	0,282
D	3	9,6136	3,204545	6,01	0,087
Erro	3	1,5986	0,53287		
Total	7	12,1241			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; I:

Intensidade luminosa; D: Vazão específica de alimentação.

5.4. Testes preliminares para os ensaios envolvendo acoplamento do cultivo de *Arthrospira platensis* à fermentação alcoólica

Foi realizado teste para verificar a homogeneidade do biorreator bem como testes para verificar o melhor valor de vazão específica de alimentação, empregando uma concentração de ART igual a 170 g.L^{-1} .

5.4.1 Avaliação da homogeneidade do biorreator

O teste de homogeneidade foi realizado no reator, pois a teoria do quimiostato para reatores agitados somente é válida para reatores homogêneos. Para isso, o teste de homogeneidade foi realizado de acordo com KOSHIMIZU *et al.* (1983).

Foram preparados 10 litros de uma suspensão celular de 9 g.L^{-1} de levedura em água destilada e adicionada ao fermentador, que foi operado com rotação de 500 RPM, a 30°C . Após 30 minutos de homogeneização mecânica do material, iniciou-se uma contínua adição de água destilada e retirada da amostra a uma vazão específica de alimentação calculada (D) igual a 0,124. No intervalo de 30 minutos, em diferentes regiões do reator, as amostras foram recolhidas para determinar a concentração celular (Tabela 24). A homogeneidade do reator é verificada se a queda da concentração celular for uma função exponencial.

Tabela 24. Concentração de leveduras em função do tempo

Tempo (horas)	X (g. L ⁻¹)	Ln X
0,5	8,9	0,94939
1	7,2	0,857332
1,5	6,22	0,79379
2	5,7	0,755875
2,5	5,02	0,700704
3	4,64	0,666518
3,5	3,98	0,599883
4	3,3	0,518514
4,5	3,04	0,482874
5	2,48	0,394452

Aplicando-se o logaritmo neperiano aos valores do X (Tabela 24) e construindo um gráfico $\ln X$ em função do tempo (Figura 26), obtêm-se a equação da reta, onde o coeficiente angular da reta obtida é igual à vazão específica de alimentação do sistema teórico (D).

Figura 26: $\ln X$ em função do tempo

O valor de D obtido pela reta é igual a $0,115 \text{ h}^{-1}$, que se comparado ao valor calculado, $0,124 \text{ d}^{-1}$, apresenta uma diferença de apenas 7,8%, indicando que o sistema pode ser considerado homogêneo (Koshimizu *et al.*, 1983).

5.4.2. Avaliação de diferentes vazões específicas de alimentação (D)

Fixando-se concentração de ART igual a 170 g.L^{-1} , foram testados 3 valores de D : $0,1 \text{ h}^{-1}$, $0,05 \text{ h}^{-1}$ e $0,025 \text{ h}^{-1}$. Os resultados são mostrados na tabela 25 e figuras 27 a 29.

Tabela 25. Valores de X_p , ART, Etanol e Rendimento do processo, no regime permanente, para os diferentes valores de D , com ART inicial igual a 170 g.L^{-1} .

$D^a \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$X_p^b \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$	ART ^c (g.L ⁻¹)	Etanol (g.L ⁻¹)	Rendimento ^d (%)
0,100	5,47	94,21	41,69	47,99
0,050	6,18	47,80	45,42	52,29
0,025	6,09	53,21	55,28	63,64

^a: vazão específica de alimentação

^b: média dos valores de concentração celular ao longo do regime permanente

^c: açúcares redutores totais

^d: Rendimento do processo.

Figura 27. Concentração celular no regime permanente (X_p), Etanol e ART (açúcar redutor total) para $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$.

Figura 28. Concentração celular no regime permanente (X_p), Etanol e ART (açúcar redutor total) para $D = 0,05 \text{ h}^{-1}$.

Figura 29. Concentração celular no regime permanente (X_p), Etanol e ART (açúcar redutor total) para $D = 0,025 \text{ h}^{-1}$.

A produção de etanol por processo contínuo apresenta a vantagem de eliminar a maior parte do tempo improdutivo, presente nos processos descontínuos. Além disso, como o microrganismo pode ser mantido por longos períodos na fase de crescimento exponencial, pode-se prolongar também um processo com produtividade satisfatória de etanol. Duas principais desvantagens desse processo são contaminação e a dificuldade na manutenção da taxa de fermentação, sendo que a queda no desempenho da fermentação está relacionada à morte das células em decorrência, por exemplo da falta de oxigênio (KOSARIC, 1996). As figuras 27 a 29 mostram que nenhum dos 3 ensaios realizados apresentaram esses tipos de problema, pois os valores de concentração celular foram mantidos ao longo do ensaio. Além disso, o uso da penicilina como agente anti-séptico também pode ter sido importante para o sucesso do processo.

Como observado por FERNANDES (1998), a produção de etanol é uma função direta da concentração de açúcares redutores totais (ART) no mosto. Entretanto, conforme se eleva a concentração inicial de açúcar, as possibilidades de

inibição tanto pelo substrato quanto pelo produto também aumentam concomitantemente. No presente trabalho, como se pode observar nas figuras 27 a 29, foi possível a obtenção do regime permanente nos 3 valores de D empregados, indicando a adequação desses valores e da concentração de ART à velocidade de crescimento do microrganismo, mantendo os valores de concentração celular, etanol e açúcares redutores totais estáveis.

A estabilidade da cultura é de extrema importância em um processo contínuo. Se um sistema é operado em um regime permanente tendendo à instabilidade, a cultura não conseguirá compensar qualquer pequena perturbação em algum dos parâmetros do processo (como vazão específica de alimentação, temperatura ou concentração do substrato no meio de alimentação) e o sistema pode passar a apresentar condições de baixa produtividade ou grandes oscilações ao longo do tempo (SANCHEZ e CARDONA, 2008).

O processo contínuo permite a diminuição do efeito da inibição pelo produto. Em algumas indústrias, reatores seriados permitem o processo contínuo em cascata, e o etanol produzido no primeiro reator é facilmente transportado para o reator seguinte, reduzindo o efeito inibitório (SANCHEZ e CARDONA, 2008).

A Tabela 25 mostra que o emprego de D igual a $0,025 \text{ h}^{-1}$ levou a um melhor rendimento do processo (63,4 %). E aumentando-se a vazão específica de alimentação, o aumento do fluxo de entrada de açúcar, provavelmente superior ao aumento da velocidade de consumo, levou a uma diminuição da concentração de etanol, aumento da concentração de ART residual e conseqüentemente, diminuição da eficiência de transformação. Semelhante fenômeno foi constatado por VASCONCELOS *et al.* (2004), quando estudaram o efeito de diferentes valores de vazão específica de alimentação sobre a fermentação de melaço por leveduras imobilizadas.

PEREGO-JUNIOR (1979), avaliou a influência da concentração do mosto e da vazão específica de alimentação na estabilidade do sistema a 32°C , e também verificou que para uma dada concentração de ART, o aumento da vazão específica de alimentação levava a diminuição da concentração de etanol no mosto, embora em alguns casos, pudesse aumentar a produtividade de etanol. Neste mesmo trabalho, para uma concentração de ART igual a 180 g.L^{-1} , não foi possível a

obtenção do regime permanente com valores de D inferiores a $0,15 \text{ dia}^{-1}$, atribuindo esse fenômeno ao efeito da inibição pelo produto. O uso de um valor de D próximo a $0,05 \text{ dia}^{-1}$ resultou em um valor de concentração de etanol próximo de 70 g.L^{-1} , com conseqüente inibição da levedura e queda de concentração celular. A redução da concentração celular era acompanhada pela conseqüente diminuição do teor alcoólico para aproximadamente 40 g.L^{-1} , o que permitia a recuperação da levedura, iniciando-se novo ciclo de oscilação. No presente trabalho, aplicando-se D igual a $0,025 \text{ h}^{-1}$, a concentração de etanol chegou a 60 g.L^{-1} , mas verifica-se que não houve inibição no metabolismo do microrganismo, que conseguiu manter a velocidade específica de crescimento para compensar a taxa de diluição.

Nas condições adotadas nessa fermentação, com ART de 170 g.L^{-1} , optou-se por aplicar D igual a $0,025 \text{ h}^{-1}$, para gerar CO_2 que foi incorporado nos ensaios 11 a 14.

5.4.3. Análise dos voláteis orgânicos no gás efluente da fermentação alcoólica

De acordo com os resultados obtidos pelo Laboratório de Análises Químicas do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), foram encontrados, nos gás efluente da fermentação alcoólica contínua, predominância de dióxido de carbono (CO_2), pequenas proporções de Etanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$) e traços de acetaldeído ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$). LIMA *et al.* (2001) relatam que os produtos da fermentação alcoólica são principalmente etanol (43 ~ 47 %) e gás carbônico (41 ~ 45 %), havendo pequenas proporções de outros compostos orgânicos, tais como glicerol, ácido succínico e ácido acético. CAEHOT *et al.* (1991) também observaram a presença de acetaldeído, propanol, isobutanol, álcool isoamílico e acetato de etila no mosto de fermentação de cana-de-açúcar por *Saccharomyces cerevisiae*. Nas amostras obtidas na fermentação alcoólica do presente trabalho, os demais compostos orgânicos voláteis apresentados por LIMA *et al.* (2001) e CAEHOT *et al.* (1991), se presentes no gás efluente, estiveram em concentrações inferiores à sensibilidade da metodologia empregada.

5.5. Cultivos contínuos de *Arthrospira platensis* em fotobiorreator tubular utilizando uréia como fonte de nitrogênio e CO₂ proveniente de fermentação alcoólica

Tendo em vista os resultados obtidos no item 5.3, a avaliação do uso do CO₂ proveniente da fermentação alcoólica foi realizada em ensaios com 120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa e valores de D iguais a 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 (Tabelas 26 a 29; Figuras 30 a 33).

Tabela 26: Concentração celular (X), Carbonato Total, Amônia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 11 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $D = 0,2$, CO_2 de fermenta\u00e7\u00e3o alco\u00f3lica para corre\u00e7\u00e3o de pH).

Tempo (dias)	Processo	X (mg.L ⁻¹)	Carbonato (g.L ⁻¹)	Am\u00f4nia (Molar)	UR\u00c9IA (Molar)	Nitrog\u00eanio ^c (Molar)
0	P.D.A ^a	391,36	12,00	0,00	$1,20 \times 10^{-3}$	$2,40 \times 10^{-3}$
1	P.D.A ^a	561,52	-	-	-	-
2	P.D.A ^a	912,61	10,91	$1,30 \times 10^{-3}$	***	$1,30 \times 10^{-3}$
3	P.D.A ^a	1269,02	-	-	-	-
4	P.D.A ^a	1581,27	11,51	$5,10 \times 10^{-4}$	***	$5,10 \times 10^{-4}$
5	P.D.A ^a	1938,83	-	-	-	-
6	P.C. ^b	2307,20 ^d	10,60	$4,20 \times 10^{-5}$	$1,12 \times 10^{-4}$	$2,66 \times 10^{-4}$
7	P.C. ^b	2345,87	-	-	-	-
8	P.C. ^b	2326,46	11,24	$1,23 \times 10^{-4}$	$6,31 \times 10^{-5}$	$2,49 \times 10^{-4}$
9	P.C. ^b	2339,38	-	-	-	-
10	P.C. ^b	2250,29	11,53	-	-	-
11	P.C. ^b	2294,44	-	$4,07 \times 10^{-6}$	$1,91 \times 10^{-4}$	$3,87 \times 10^{-4}$
12	P.C. ^b	2206,89	11,82	-	-	-
13	P.C. ^b	2146,15	-	$2,14 \times 10^{-5}$	$2,22 \times 10^{-4}$	$4,66 \times 10^{-4}$
14	P.C. ^b	2213,04	11,24	-	-	-
15	P.C. ^b	2275,42	-	$4,64 \times 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-4}$	$4,30 \times 10^{-4}$
16	P.C. ^b	2158,18	-	-	-	-
17	P.C. ^b	2269,12	10,95	$2,72 \times 10^{-5}$	$1,56 \times 10^{-4}$	$3,40 \times 10^{-4}$

^a: Processo Descont\u00ednuo Alimentado

^b: Processo Cont\u00ednuo

^c: Nitrog\u00eanio residual no reator, resultante da am\u00f4nia livre e da ur\u00e9ia residual

^d: In\u00edcio do regime permanente

- : leitura n\u00e3o realizada

***: valor abaixo do detectado pela metodologia anal\u00edtica

Figura 30: Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 11 ($120 \mu\text{mol}$ fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; $D = 0,2 \text{ d}^{-1}$; CO_2 de fermentação alcoólica para manutenção de pH). A linha vertical delimita o tempo correspondente à mudança do processo de cultivo, de descontínuo para contínuo.

Tabela 27: Concentração celular (X), Carbonato Total, Amônia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 12 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $D = 0,4$, CO_2 de fermentação alcoólica para correção de pH).

Tempo (dias)	Processo	X (mg.L ⁻¹)	Carbonato (g.L ⁻¹)	Am\u00f4nia (Molar)	UR\u00c9IA (Molar)	Nitrog\u00eanio ^c (Molar)
0	P.D.A ^a	403,72	12,00	0,00	$1,20 \times 10^{-3}$	$2,40 \times 10^{-3}$
1	P.D.A ^a	602,37	-	-	-	-
2	P.D.A ^a	1083,62	-	$2,67 \times 10^{-6}$	$6,04 \times 10^{-5}$	$1,23 \times 10^{-4}$
3	P.D.A ^a	1578,63	10,91			
4	P.D.A ^a	1873,33	-	$6,01 \times 10^{-5}$	$9,35 \times 10^{-5}$	$2,47 \times 10^{-4}$
5	P.C. ^b	2051,91	11,51			
6	P.C. ^b	1798,99	-	$8,62 \times 10^{-4}$	***	$8,62 \times 10^{-4}$
7	P.C. ^b	1619,73 ^d	10,60			
8	P.C. ^b	1569,06	-	$6,82 \times 10^{-4}$	***	$6,82 \times 10^{-4}$
9	P.C. ^b	1521,72	11,82			
10	P.C. ^b	1505,36	-	$5,19 \times 10^{-4}$	***	$5,19 \times 10^{-4}$
11	P.C. ^b	1531,12	10,95			
12	P.C. ^b	1542,91	-	$5,39 \times 10^{-4}$	$2,25 \times 10^{-5}$	$5,84 \times 10^{-4}$

^a: Processo Descont\u00ednuo Alimentado

^b: Processo Cont\u00ednuo

^c: Nitrog\u00eanio residual no reator, resultante da am\u00f4nia livre e da ur\u00e9ia residual

^d: In\u00edcio do regime permanente

- : leitura n\u00e3o realizada

***: valor abaixo do detectado pela metodologia anal\u00edtica

Figura 31: Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 12 ($120 \mu\text{mol}$ fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; $D = 0,4 \text{ d}^{-1}$; CO_2 de fermentação alcoólica para manutenção de pH). A linha vertical delimita o tempo correspondente à mudança do processo de cultivo, de descontínuo para contínuo.

Tabela 28: Concentração celular (X), Carbonato Total, Amônia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 13 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $D = 0,6$, CO_2 de fermenta\u00e7\u00e3o alco\u00f3lica para corre\u00e7\u00e3o de pH).

Tempo (dias)	Processo	X (mg.L ⁻¹)	Carbonato (g.L ⁻¹)	Am\u00f4nia (Molar)	UR\u00c9IA (Molar)	Nitrog\u00eanio ^c (Molar)
0	P.D.A ^a	403,72	12,00	0,00	$1,20 \times 10^{-3}$	$2,40 \times 10^{-3}$
1	P.D.A ^a	701,61	-	-	-	-
2	P.D.A ^a	1141,40	10,91	$1,02 \times 10^{-5}$	$9,93 \times 10^{-5}$	$2,09 \times 10^{-4}$
3	P.D.A ^a	1678,92	-	-	-	-
4	P.C. ^b	2089,77	11,51	$1,22 \times 10^{-5}$	$1,07 \times 10^{-4}$	$2,26 \times 10^{-4}$
5	P.C. ^b	1812,11	-	-	-	-
6	P.C. ^b	1559,52	10,30	$3,24 \times 10^{-5}$	$1,63 \times 10^{-4}$	$3,58 \times 10^{-4}$
7	P.C. ^b	1535,83	-	-	-	-
8	P.C. ^b	1443,22 ^d	11,24	$7,18 \times 10^{-6}$	$9,76 \times 10^{-5}$	$2,02 \times 10^{-4}$
9	P.C. ^b	1431,88	-	-	-	-
10	P.C. ^b	1384,79	11,53	$1,47 \times 10^{-6}$	$8,49 \times 10^{-5}$	$1,71 \times 10^{-4}$
11	P.C. ^b	1398,16	-	-	-	-
12	P.C. ^b	1336,38	11,82	$6,01 \times 10^{-5}$	$9,35 \times 10^{-5}$	$2,47 \times 10^{-4}$

^a: Processo Descont\u00ednuo Alimentado

^b: Processo Cont\u00ednuo

^c: Nitrog\u00eanio residual no reator, resultante da am\u00f4nia livre e da ur\u00e9ia residual

^d: In\u00edcio do regime permanente

- : leitura n\u00e3o realizada

Figura 32: Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 13 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; $D = 0,6 \text{ d}^{-1}$; CO_2 de fermentação alco\u00f3lica para manuten\u00e7\u00e3o de pH). A linha vertical delimita o tempo correspondente \u00e0 mudan\u00e7a do processo de cultivo, de descont\u00ednuo para cont\u00ednuo.

Tabela 29: Concentração celular (X), Carbonato Total, Amônia Livre, Uréia Residual e Nitrogênio no Ensaio 14 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $D = 0,8$, CO_2 de fermentação alcoólica para correção de pH).

Tempo (dias)	Processo	X (mg.L ⁻¹)	Carbonato (g.L ⁻¹)	Am\u00f4nia (Molar)	UR\u00c9IA (Molar)	Nitrog\u00eanio ^c (Molar)
0	P.D.A ^a	402,4543	12,00	0,00	$1,20 \times 10^{-3}$	$2,40 \times 10^{-3}$
1	P.D.A ^a	585,57	-	-	-	-
2	P.D.A ^a	1017,35	10,91	$1,69 \times 10^{-4}$	$7,95 \times 10^{-5}$	$1,69 \times 10^{-4}$
3	P.D.A ^a	1310,36	-	-	-	-
4	P.D.A ^a	1716,63	11,51	$1,15 \times 10^{-4}$	$5,70 \times 10^{-5}$	$1,15 \times 10^{-4}$
5	P.C. ^b	2006,07	-	-	-	-
6	P.C. ^b	1846,53	10,60	$1,71 \times 10^{-4}$	$8,52 \times 10^{-5}$	$1,71 \times 10^{-4}$
7	P.C. ^b	1569,06	-	-	-	-
8	P.C. ^b	1301,75	11,92	$2,02 \times 10^{-4}$	$9,93 \times 10^{-5}$	$2,02 \times 10^{-4}$
9	P.C. ^b	1091,44	-	-	-	-
10	P.C. ^b	939,77	-	-	-	-
11	P.C. ^b	773,88 ^d	11,82	$3,11 \times 10^{-4}$	$1,54 \times 10^{-4}$	$3,11 \times 10^{-4}$
12	P.C. ^b	715,94	-	-	-	-
13	P.C. ^b	672,56	10,09	$2,71 \times 10^{-4}$	$1,35 \times 10^{-4}$	$2,71 \times 10^{-4}$
14	P.C. ^b	719,34	-	-	-	-
15	P.C. ^b	714,81	10,91	$1,91 \times 10^{-4}$	$9,27 \times 10^{-5}$	$1,91 \times 10^{-4}$

^a: Processo Descont\u00ednuo Alimentado

^b: Processo Cont\u00ednuo

^c: Nitrog\u00eanio residual no reator, resultante da am\u00f4nia livre e da ur\u00e9ia residual

^d: In\u00edcio do regime permanente

- : leitura n\u00e3o realizada

Figura 33: Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 14 ($120 \mu\text{mol}$ fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$; $D = 0,8 \text{ d}^{-1}$; CO_2 de fermentação alcoólica para manutenção de pH). A linha vertical delimita o tempo correspondente à mudança do processo de cultivo, de descontínuo para contínuo.

Tabela 30: Concentração celular média em regime permanente (X_P), produtividade em células (P_X) e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) dos ensaios realizados com CO_2 proveniente de fermentação alcoólica.

Ensaio	I ^a	D ^b (dia ⁻¹)	X_P (mg.L ⁻¹)	P_X (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	$Y_{X/N}$ mg.mg ⁻¹
11	120	0,2	2261,04 ± 70,84	452,21	25,84
12	120	0,4	1584,32 ± 41,01	619,33	17,70
13	120	0,6	1398,89 ± 42,31	839,33	15,99
14	120	0,8	719,30 ± 36,04	575,44	8,22

^a: Intensidade luminosa ($\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

^b: Vazão específica de alimentação

Os quatro ensaios realizados, utilizando CO_2 proveniente de fermentação alcoólica (Tabelas 26 a 29; Figuras 30 a 33) mostram que mesmo com essa fonte de CO_2 , foi possível obter o regime permanente no cultivo de *Arthrospira platensis* no fotobiorreator tubular empregado. Isso mostra que os possíveis compostos voláteis orgânicos que acompanham esse gás não prejudicaram o crescimento e/ou o metabolismo do microrganismo fotossintetizante.

Os níveis de carbonato total (tabelas 26 a 29) são semelhantes aos obtidos nos ensaios utilizando CO_2 de cilindro, o que mostra que houve reposição da fonte de carbono e correção do pH de forma eficiente, apesar da presença de outros componentes, além do gás carbônico, no gás efluente da fermentação alcoólica. Efeito semelhante já foi observado por FERRAZ *et al.* (1985) que empregou gás efluente de fermentação alcoólica em meio sintético (extrato de malte, extrato de levedura, peptona e sacarose).

5.5.1. Avaliação de X_P , $Y_{X/N}$ e P_X

Como se observa na tabela 30 e nas figuras 34 e 35 o emprego de CO_2 de fermentação alcoólica não possibilitou maiores valores de X_P e $Y_{X/N}$ em relação aos ensaios com CO_2 puro de cilindro.

De fato, a análise de variância (Tabelas 31 e 32) mostra que não só a vazão específica de alimentação (D) como também a fonte de CO_2 tiveram influência

sobre os valores de X_P ($p=0,020$ e $p=0,000$, respectivamente) e de $Y_{X/N}$ ($p=0,020$ e $p=0,000$, respectivamente). Mesmo assim, considerando os valores de D com maiores valores dos dois parâmetros ($D=0,02$) nas diferentes fontes de CO_2 (Figuras 34 e 35), temos que a diferença entre as médias obtidas com CO_2 de cilindro e CO_2 de fermentação alcoólica, é de apenas 5,58 %, nos dois casos, o que pode ser considerado baixo. Isso evidencia a viabilidade do uso de CO_2 proveniente de fermentação alcoólica, de custo zero, nesse tipo de cultivo. FERRAZ *et al.* (1985), por outro lado, verificaram que culturas de *S. maxima* que receberam gás de fermentação alcoólica apresentaram crescimento superior ao obtido com o emprego de CO_2 de cilindro.

Tabela 31 - Análise estatística de variância (ANOVA) aplicada aos dados experimentais de concentração celular média no regime permanente (X_P)

Fonte	GL	SQ	QM	F	p
CO_2	1	51311	51311	20,35	0,020*
D	3	2606694	868898	344,59	0,000*
Erro	3	7565	2522		
Total	7	2665569			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; CO_2 : Fonte de gás carbônico; D: Vazão específica de alimentação. *: significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Figura 34. Médias de concentração celular em regime permanente (X_P) em função da vazão específica de alimentação (D), empregando diferentes fontes de CO_2 .

Tabela 32 - Análise estatística de variância (ANOVA) aplicada aos dados experimentais de fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$).

Fonte	GL	SQ	QM	F	p
CO ₂	1	6,702	6,702	20,35	0,020*
D	3	340,466	113,489	344,59	0,000*
Erro	3	0,988	0,329		
Total	7	348,156			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; CO₂: Fonte de gás carbônico; D: Vazão específica de alimentação. *: significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Figura 35. Fator de Conversão de nitrogênio em células no regime permanente ($Y_{X/N}$) em função da vazão específica de alimentação (D), empregando diferentes fontes de CO₂.

A figura 36 mostra que, também com o uso do CO₂ proveniente de fermentação alcoólica, o aumento da vazão específica de alimentação até 0,6 dia⁻¹ leva a um aumento da produtividade em células, e a vazão específica de alimentação igual a 0,8 dia⁻¹, foi responsável pela retirada de células maior do que a capacidade de crescimento do microrganismo.

Também no caso de P_X , a análise estatística de variância mostra que a vazão específica de alimentação e a fonte de CO₂ exerceram influência sobre os valores dessa variável dependente ($p = 0,021$ e $p=0,001$, respectivamente, Tabela 33). Neste caso, como se observa na figura 36, o melhor valor de D foi de 0,6 para

ambas as fontes de CO_2 , e considerando as médias dos valores de P_x obtidos com CO_2 de cilindro e CO_2 proveniente de fermentação alcoólica, obteve-se um coeficiente de variação de apenas 7,90 %, o que também pode ser considerado baixo.

Além disso, deve-se levar em conta que o CO_2 proveniente de fermentação, além de auxiliar na redução de efeitos prejudiciais ao meio ambiente, é uma fonte de carbono de custo zero, pois, neste caso, não houve nenhum custo relacionado ao tratamento do gás efluente.

Tabela 33 - Análise estatística de variância (ANOVA) aplicada aos dados experimentais de produtividade em células (P_x).

Fonte	GL	SQ	QM	F	p
CO_2	1	9568	9567,7	20,23	0,021
D	3	183671	61223,6	129,44	0,001
Erro	3	1419	473,0		
Total	7	194657			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; CO_2 : Fonte de gás carbônico; D: Vazão específica de alimentação.

Figura 36. Produtividade em células no regime permanente (P_x) em função da vazão específica de alimentação (D), empregando diferentes fontes de CO_2 .

Diferentes autores já destacaram a possibilidade de crescimento mixotrófico de *Arthrospira platensis*, na presença de glicose (CHOJNACKA e NOWORYTA, 2004), acetato (Chen *et al.*, 2006) ou melaço de cana de açúcar (ANDRADE e COSTA, 2007).

A adição desses compostos orgânicos voláteis no cultivo de *Arthrospira platensis* poderia ter levado a um aumento do crescimento celular, como consequência do cultivo mixotrófico. MARQUEZ *et al.* (1993) verificaram que cultivo mixotrófico de *Arthrospira platensis*, com fornecimento de glicose e luz, levou a maiores valores de concentração celular em relação a cultivos autotróficos (sem glicose) ou heterotrófico (com glicose, em condições aeróbicas).

Embora a análise cromatográfica do gás efluente da fermentação alcoólica tenha detectado etanol como principal composto volátil orgânico presente, a análise de álcool no meio de cultivo de *Arthrospira platensis* pelo método de dicromato (como descrito no item "Material e Métodos") não detectou presença deste composto.

De qualquer forma, observa-se que o emprego de CO₂ de fermentação alcoólica em cultivo de *Arthrospira platensis* em fotobiorreator tubular pode levar a resultados satisfatórios no crescimento desse microrganismo em processo contínuo.

FERRAZ *et al.* (1985) já indicaram a possibilidade do uso de CO₂ proveniente de fermentação alcoólica no cultivo de *A. maxima*, utilizando KNO₃ como fonte de nitrogênio. Utilizaram reatores abertos para o cultivo da cianobactéria, borbulhando CO₂ proveniente de fermentações alcoólicas descontínuas. Concluíram que a utilização de CO₂ proveniente de fermentação alcoólica, como também assinala RICHMOND (1983), pode ser uma fonte de carbono adequada para o cultivo de *Arthrospira*. O presente trabalho, porém, difere do trabalho de FERRAZ *et al.* (1995) na fonte de nitrogênio, tipo de processo e fotobiorreator. Além disso, foi realizada análise de componentes orgânicos voláteis provenientes da fermentação alcoólica contínua no meio de cultivo da cianobactéria.

Outro importante aspecto estudado por FERRAZ *et al.* (1985) foi a correção do pH do meio de cultivo de *A. maxima* utilizando HCl, sem reposição da fonte de carbono. Verificou-se, neste caso, a importância do uso de CO₂, pois embora o HCl tenha corrigido o valor do pH, favorecendo o deslocamento no sentido

de bicarbonato, no tampão carbonato-bicarbonato, ao longo do cultivo houve uma redução da fonte de carbono, e conseqüentemente, deficiência deste nutriente, havendo efeito não somente sobre o crescimento mas também sobre a composição da biomassa, em que houve diminuição do teor de proteína e acúmulo de carboidratos. Além disso, deve-se levar em conta também que, como destacado por Sánchez-Luna *et al.* (2007) quando se adiciona o HCl, parte da fonte de carbono pode ser perdida na forma de CO₂.

O CO₂ oriundo da fermentação alcoólica é considerado “limpo”, ou seja, carrega somente níveis relativamente baixos de outras substâncias, que não são potencialmente tóxicas. Poderia, portanto, ser usado para a obtenção de uma biomassa que pudesse ser destinada a consumo humano ou animal, na sua forma íntegra (somente lavada para retirada de sais e devidamente seca) ou ser utilizada como fonte de substâncias de alto valor agregado, como clorofila *a*, por exemplo.

Considerando ainda que os principais componentes da *Arthrospira platensis* sejam carbono e nitrogênio, os quais representam cerca de 50 % e 10 % da biomassa seca, respectivamente (CORNET *et al.*, 1992), e que em muitos países a única fonte de CO₂ limpa para ser usada no cultivo desse microrganismo fotossintetizante seria o CO₂ puro, proveniente de cilindro, de custo relativamente elevado, fica claro o quanto nosso país teria de vantagem econômica pelo uso de um CO₂ que hoje é isento de custo, sendo liberado na atmosfera. Ademais, a grande maioria de nossas usinas, se não a totalidade, trabalha com dornas fechadas, canalizando a saída de CO₂.

5.5.2. Avaliação do teor de proteínas e lipídios

Tabela 34: Teor de proteínas e lipídios na biomassa seca de *Arthrospira platensis* obtida nos ensaios.

Ensaio	I ^a	D ^b (dia ⁻¹)	Proteínas (%)	Lipídios (%)
1	60	0,2	31 ± 0,63	9 ± 0,30
2	60	0,4	36 ± 1,35	8 ± 0,15
3	60	0,6	47 ± 0,49	10 ± 0,62
10	120	1,0	50 ± 1,23	10 ± 0,13

^a: Intensidade luminosa ($\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)

^b: Vazão específica de alimentação

A tabela 34 e a figura 37 mostram que o perfil dos teores de proteínas nas biomassas obtidas em cultivo empregando CO₂ proveniente de fermentação alcoólica, foi o mesmo apresentado quando se empregou CO₂ puro de cilindro, ou seja, houve aumento do teor de proteínas com o aumento de D ($p = 0,046$; Tabela 35), e não houve influência das diferentes fontes de CO₂ ($p = 0,7514$; Tabela 35).

Figura 37: Teor de proteínas em função da vazão específica de alimentação (D) de meio contendo , empregando diferentes fontes de CO₂: cilindro (□) e fermentação alcoólica (■).

Tabela 35 - Análise estatística de variância (ANOVA) aplicada aos teores de proteínas.

Fonte	GL	SQ	QM	F	p
CO ₂	1	3,97	3,967	0,12	0,751
D	3	978,90	326,301	9,91	0,046*
Erro	3	98,73	32,910		
Total	7	1081,60			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; CO₂: Fonte de gás carbônico; D: Vazão específica de alimentação. *: significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

A tabela 34 e a figura 38 mostram que também o perfil dos teores de lipídios nas biomassas obtidas em cultivo empregando CO₂ proveniente de fermentação alcoólica, foi o mesmo apresentado quando se empregou CO₂ puro de cilindro. Não houve influência nem da fonte de CO₂ nem da vazão específica de alimentação sobre este parâmetro ($p = 0,373$ e $0,185$, respectivamente, Tabela 36)

Figura 38: Teor de lipídios em função da vazão específica de alimentação (D) de meio contendo uréia, empregando diferentes fontes de CO₂: cilindro (□) e fermentação alcoólica (■).

Tabela 36 - Análise estatística de variância (ANOVA) aplicada aos teores de lipídios.

Fonte	GL	SQ	QM	F	p
CO ₂	1	0,59823	0,59823	1,09	0,373
D	3	5,20842	1,73614	3,16	0,185
Erro	3	1,64804	0,54935		
Total	7	7,45470			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; CO₂: Fonte de gás carbônico; D: Vazão específica de alimentação.

Os resultados apresentados indicam que o cultivo contínuo de *Arthrospira platensis* em fotobiorreator tubular, utilizando uréia como fonte de nitrogênio, pode levar a resultados satisfatórios de produtividade de células e teor de proteínas, independentemente da fonte de CO₂ empregada (proveniente de cilindro ou fermentação alcoólica). HIRATA *et al.* (1998) e NERANTZIZ *et al.* (2002) também destacaram resultados satisfatórios do cultivo contínuo desse microrganismo em fotobiorreator tubular, utilizando nitrato como fonte de nitrogênio.

6. CONCLUSÕES

Os resultados dos ensaios realizados sob diferentes intensidades luminosas e vazões específicas de alimentação indicam que o uso de CO₂, tanto para reposição da fonte de carbono como para controle do pH, é um método eficiente para obtenção de alta produtividade de biomassa de *Arthrospira platensis*. A fixação de CO₂ por esse microrganismo pode ser interessante na contribuição para a redução da emissão desse gás para a atmosfera.

Ensaio realizado com intensidade luminosa (I) de 120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ propiciaram melhores resultados em relação a 60 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, indicando que não houve saturação luminosa ou foto-oxidação mesmo na maior intensidade luminosa.

A concentração celular em regime permanente (X_P) e o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) foram funções decrescentes da vazão específica de alimentação (D), enquanto que o teor de proteínas na biomassa apresentou efeito contrário. Não houve variação do teor de lipídios nas diferentes condições experimentais.

Empregando CO₂ de cilindro, a maior produtividade em células (938,73 $\text{mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) foi obtida com $D = 0,6 \text{ dia}^{-1}$ e I de 120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Nessas condições, obteve-se X_P de $1564 \pm 51 \text{ mg.L}^{-1}$, $Y_{X/N}$ de $17,88 \text{ mg.mg}^{-1}$, teor de proteínas de $51 \pm 1,17 \%$ e teor de lipídios de $11 \pm 0,29 \%$.

Empregando-se CO₂ proveniente fermentação alcoólica, a maior produtividade em células (839,33 $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) foi obtida também com $D = 0,6 \text{ dia}^{-1}$. Nesse mesmo ensaio, obteve-se X_P de $1398 \pm 42 \text{ mg.L}^{-1}$, $Y_{X/N}$ de $15,99 \text{ mg.mg}^{-1}$, teor de proteínas de $47 \pm 0,49 \%$ e teor de lipídios de $10 \pm 0,62 \%$.

Os resultados obtidos indicam que o emprego de CO₂ de fermentação alcoólica pode levar a resultados satisfatórios no cultivo contínuo de *Arthrospira platensis* em fotobiorreator tubular, utilizando uréia como fonte de nitrogênio. Isso pode promover não só a redução no custo de produção mas também outros benefícios relacionados a questões ambientais e sociais.

O uso de fotobiorreatores tubulares empregando uréia como fonte de nitrogênio e CO₂ para controle do pH e reposição da fonte de carbono, em processo contínuo, levou a valores de produtividades em células maiores do que aqueles apresentados na literatura para minitânques abertos.

7. REFERÊNCIAS*

- ABDIN EL SHERIF, S.A.; CLEMENT, G. *Spirulina sp.* food algae: discovery of natural lakes at wadi el natrun in the Arab Republica of Egypt. **Revue d'Institut Français du Petrole et Annales des Combustibles Liquides**, v.37, p.123-130, 1982.
- ADINARAYANA, K. ; SRINIVASULU, B. ; BAPI-RAJU, K. V. V. S. N.; ELLAIAH, P. Continuous neomycin production by immobilized cells of *Streptomyces marinensis* NUV-5 in an airlift bioreactor. **Process Biochemistry**. V. 39, p. 1407-1414. 2004.
- ANDRADE, M.R.; COSTA, J.A.V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**. p. 264-130, 2007.
- AQUARONE, E. Penicillin and tetracycline as contamination control agents in alcoholic fermentation of sugbar cane molasses. **Applied Microbiology**. V. 8, p. 263-268, 1960.
- BADR, H. R. ; TOLEDO, R. ; HAMDY, M. K. Continuous acetone-ethanol-butanol fermentation by immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum*. **Biomass and Bioenergy**. V. 20, p. 119-132. 2001.
- BARBOSA, M. J. G. V. **Microalgal photobioreactors: Scale-up and optimisation**. Wageningen, 2003. 165p. Tese de Doutorado. Wageningen Universiteit.
- BATISTA, V. M. **Produção de Álcool (ETANOL)**. Trabalho de Conclusão de curso. Goiânia-GO. 2003. 61p.
- BECKER E W. **Microalgae - Biotechnology and Microbiology**. New York: Cambridge University Press, 1994, 293p.
- BELAY, A. Mass culture of *Spirulina* outdoors-the earthrise farms experience. In: VONSHAK, A., ed. ***Spirulina platensis (Arthrospira)*: physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997. p.131-158.
- BELKIN, S. ; BOUSSIBA, S. High internal ph conveys ammonia resistance in *S. platensis*. **Bioresource Technology**. V. 32, p. 167-169. 1991.
- BENEMANN, J. R.; TILLET, D. M.; WEISSMAN, J. C. Microalgae biotechnology. **Trends in Biotechnology**. V. 5, p. 47-53, 1987.

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

- BEZERRA, R.P.; MATSUDO, M.C.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J.C.M. Influence of the Ammonium Chloride Feeding Time and the Light Intensity on the Cultivation of *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Biotechnology and Bioengineering**. V. 100, p. 297-305. 2008.
- BHUGALOO-VIAL, P. ; GRAJEK, W.; DOUSSET, X.; BOYAVAL, P. Continuous bacteriocin production with high cell density bioreactors. **Enzyme and Microbial Technology**. V. 21, p. 450-457. 1997.
- 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, P. 1341-1346, 2003.
- BOROWITZKA, M. A. Algal biotechnology products and processes - matching science and economics. **Journal of Applied Phycology**. V. 4 , p. 267-279, 1992.
- BOROWITZKA, M.A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**. V.70, p. 313-321. 1999
- BORZANI, W. Variation of the ethanol yield during oscillatory concentrations changes in undisturbed continuous ethanol fermentation of sugar-cane blackstrap molasses. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. V. 17, p. 253-258. 2001.
- BOUSSIBA, S. Ammonia uptake in the alkalophilic cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Plant Cell Physiology**. v.30, p.303-308, 1989.
- BOZE, H.; MOULIN, G.; GALZY, P. Production of Microbial Biomass. In: REHM, H. J.; REED, G. **Biotechnology**. 2a ed. Weinheim: VCH. Vol. 9, p. 167-237. 1995.
- BRAUNBECK, O. A.; CORTEZ, L.A.B. O cultivo da cana-de-açúcar e o uso dos resíduos. In: ROSILLO-CALLE, F.; BAJAY, S.V.; ROTHMAN, H. (Orgs.) **Uso da Biomassa para produção de energia na indústria brasileira**. Campinas: Editora Unicamp. 2005. P. 215-246.
- CAEHOT, T.; MÜLLER, M.; PONS, M. Kinetics of volatile metabolites during alcoholic fermentation of cane molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.35, p.345-454, 1991.
- CAMPBELL, R.; MARTIN, M. H. Continuous-Flow fermentation to purify waste-water by removal of cadmium. **Water air and Soil Pollution**. V. 50, p. 397-408, 1990.
- CARDONA, C.A.; SANCHEZ, O.J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**. V. 98, p. 2415–2457, 2007.

- CARLOZZI, P.; PINZANIE. Growth Characteristics of *Arthrospira platensis* Cultured Inside a New Close-Coil Photobioreactor Incorporating a Mandrel to Control Culture Temperature. **Biotchnology and Bioengineering**, v.90, n.6, 2005.
- CARVAJAL, N., FERNÁNDEZ, M., RODRÍGUEZ, J.P., DONOSO, M. Urease of *Spirulina maxima*, **Phytochemistry**, v. 21, p. 2821-2823, 1980.
- CARVALHO, J.C.M.; FRANCISCO, F.R.; ALMEIDA, K.A.; SATO, S.; CONVERTI, A. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially-increasing feeding rate. **Journal of Phycology**, v.40, p.589-597, 2004.
- CARVALHO, J.C.M.; VITOLO, M.; SATO, S.; AQUARONE, E. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* grown in sugarcane blackstrap molasses through a fed-batch process: optimization by response surface methodology. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.110, p.151-164, 2003.
- CASTENHOLZ, R.W. Subsection III, Order Oscillatoriales. In: STANLEY, J.T.; BRYANT, M.P.; FENNING, N.; HOLT, J.G. (Eds.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: William and Wilkins. 1989. V.3, p. 1771.
- CASTENHOLZ, R.W.; RIPPKA, R.; HERDMAN, M.; WILMOTTE, A. Form-genus I. *Arthrospira* Stizenberger 1852. In: BOONE, D.; CASTENHOLZ, R.W. (Eds.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2ª edição. Springer. 2001. V.1, p. 542-543.
- CEZARE, E.A. **Contribuição ao estudo da produção de biomassa de *S. platensis* empregando uréia como fonte de nitrogênio por meio de processo descontínuo alimentado**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. 1998.
- Chang, E.H; Yang, S.S. Microalgae for biofixation of carbon dioxide. **Botanical Bulletin Academy Sinica**, v.44, p.43-52, 2003.
- CHEN, F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. **Titech**, v.14, p.421-426, 1996.
- CHEN, T.; ZHENG, W.; YANG, F.; BAI, Y.; WONG, Y.S. Mixotrophic culture of high selenium-enriched *Spirulina platensis* on acetate and the enhanced production of photosynthetic pigments. **Enzyme and Microbial Technology**. V. 39, p. 103-107, 2006.

- CHOJNACKA, K.; NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina* sp. Growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **Enzyme and Microbial Technology**. V. 34, p. 461-465, 2004.
- CIFERRI, O., TIBONI, O. The Biochemistry and Industrial Potential of *Spirulina*. **Microbiology**. V. 39, p. 503-526. 1985.
- CLÉMENT, G. Production et constituants caractéristiques des algues *Spirulina platensis* et *maxima*. **Annales de la Nutrition et de L'alimentation**. v.29, p.477-488, 1975.
- COHEN, Z. Products from Microalgae. In: **Hanbook of Microalgal mass culture**. P. 421-454. 1999
- COHEN, Z. The Chemicals of *Spirulina*. In : VONSHAK, A. (ed) ***Spirulina platensis* (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology**. London : Taylor & Francis Ltd. 1997, p. 175-204.
- COLLET, C. ; ADLER, N. ; SCHWITZGUÉBEL, J. P.; PÉRINGER, P. Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. **International Journal of Hydrogen Energy**. V. 29, p. 1479-1485. 2004.
- CONVERTI, A.; LODI, A.; DEL BORGHI, A.; SOLISIO, C. Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift-tubular reactor system. **Biochemical Engineering Journal**, v.32, p.13–18, 2006.
- CORNET, J. F., DUSSAP, C. G., 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, p. 826-834, 1992.
- COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE-FILHO, P. F. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. **Bioresource Technology**. v.92, p.237-241, 2004.
- DANESI, E.D.G. **Cultivo de *Spirulina platensis* por processo descontínuo alimentado para obtenção de clorofila**. São Paulo, 2001. 214p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- DANESI, E.D.G.; RANGEL-YAGUI, C.O.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass Bioenergy**, Amsterdam, v.23, p.261-269, 2002.

- DANESI, E.D.G.; RANGEL-YAGUI, C.O.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Effect of reducing the light intensity in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass Bioenergy**, Amsterdam, v.26, p.329-335, 2004.
- DAVIS, E.A.; DEDRICK, J.; FRENCH, C.S.; MILNER, H.W.; MYERS, J.; SMITH, J.H.C.; SPOEHR, H.A. Laboratory experiments on *Chlorella* culture at the Canegie Institution o Washington department of plant biology. In: BURLEW, J.S., ed. **Algal culture**: from laboratory to pilot plant. Washington: Carnegie Institution of Washington, 1953. p.105-153.
- DE PHILIPPIS, R.; SILI, C.; PAPERI, R.; VINCENZINI, M. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: A review. **Journal of Applied Phycology**. V. 13, p. 293-299, 2001.
- DILLON, J. C.; PHUC, A. P.; DUBACQ, J. P. Nutritional value of the alga *Spirulina*. **Plants in Human Nutritions**, v.77, p.32-46, 1995.
- DOMINGUES, L. ; LIMA, N. ; TEIXEIRA, J. A. *Aspergillus niger* – galactosidase production by yeast in a continuous high cell density reactor. **Process Biochemistry**. V.40, p.1151-1154, 2005.
- DURAND-CHASTEL, H. Production and use of *Spirulina* in Mexico. In: SHELEF, G.; SOEDER, C. J., eds. **Algae biomass**: production and use. Amsterdam: Elsevier; New York: Norht Holland Biochemical Press, 1980. p.51-64. (International Symposium on the Production and Use of Micro-algae Biomass, 1978, Acre – israel).
- ENSARI, S. ; LIM, H. C. Kinetics of L-lysine fermentation: a continuous culture model incorporating oxygen uptake rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**. V. 62, p. 35-40. 2003.
- FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação contínua. In: SCHMIDELL NETTO, W.; ALMEIDA-LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., coord. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v.2, p.223-246.
- FAINTUCH, B.L. **Análise comparativa da produção de biomassa a partir de três cianobactérias empregando distintas fontes nitrogenadas**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. São Paulo, 1989.
- FALCONE, M.; MARQUE, A. B. Estudo sobre as condições de hidrólise do HCl na dosagem de açúcares redutores totais (A.R.T.). **Tecnologia de Alimentos e Bebidas**, v. 4, p.24-30, 1965.

- FERNANDES, A.N.R. **Contribuição ao estudo do processo descontínuo alimentado de fermentação alcoólica**. São Paulo. 1998. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.
- FERNANDÉZ, F. G.; CAMACHO, F. G.; PÉRES, J. A. S.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; GRIMA, E. M. Modeling of biomass productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures: effects of dilution rate, tube diameter, and solar irradiance. **Biotechnology and Bioengineering**. V. 58, p. 605-616. 1998.
- FERRAZ, C.A.M. Produção de *Spirulina* máxima: Influência de ecofatores e uso de um sub produto da indústria alcooeira. **Revista de Microbiologia**, v.17, n.1, p.70-4, 1986.
- FERRAZ, C.A.M.; AQUARONE, E.; FLORENZANO, G.; BALLONI, W.; TREDICI, M. Utilização de sub-produtos da industria alcooleira na obtenção de biomassa se *Spirulina* máxima. Parte I – Emprego do anidro carbônico. **Revista de Microbiologia**, v.16, n.3, p.179-187, 1985.
- FERREIRA, L.S. **Estudo da intensidade luminosa no cultivo de *Arthrospira (Spirulina) platensis* em reator tubular utilizando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio por processo descontínuo alimentado**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. São Paulo, 2008. 113pp.
- FOX, R. D. The microalgae *Spirulina* (Cyanophyceae). **A study of the conditions necessary for their growth. Development of original production systems, particularly with reference to a village ecosystem**. Tese de Doutorado. Universidade Louis Pasteur – Strasbourg. 1983.
- FUNTEU, F.; GUET, C.; WU, B.; TRÉMOLIÈRES, A. Effects of environmental factors on the lipid metabolism in *Spirulina platensis*. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.35, p.63-71, 1997.
- GROSS, J. Chlorophylls. In: REINHOLD, V.N. **Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. P.3-74.
- GUERREIRO, M. A. ; ANDRIETTA, S. R. ; MAUGERI, F. . Expert for design of an industrial fermentation plant for the production alcohol. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 68, p. 163-170, 1997
- GUTERMAN, H.; VONSHAK, A.; BEM-YAAKOW, S. A macromodel for outdoor palgal mass production.. **Biotechnology and Bioengineering**. V. 35, p. 809-819. 1990.

- HAAG, J. E. ; VANDE-WOUWER, A.; QUEINNEC, I. Macroscopic modelling and identification of an anaerobic waste treatment process. **Chemical Engineering Science**. V. 58, p. 4307-4316. 2003.
- HALL, D. O.; FERNÁNDEZ, F. G.; GUERRERO, E. C.; RAO, K. K.; GRIMA, E. M. Outdoor helical tubular photobioreactors for microalgal production: Modeling of Fluid-Dynamics and Mass Transfer and Assessment of Biomass Productivity. **Biotechnology and Bioengineering**. V. 82, p. 62-73. 2003.
- Hall, D. O.; HOUSE, J. I.; SCRASE, I. Visão Geral de Energia e Biomassa. In: Rosillo-Calle, F.; Bajay, S. V.; Rothman, H. (Org.) **Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira**. Campinas: Editora da Unicamp. 2005. P. 25-67.
- HATORI, A.; MYERS, J. Reduction of nitrate and nitrite by subcellular preparations of *Anabaena cylindrica*. I. Reduction of nitrite to amonia. **Journal of Plant Physiology**. V.41, p.1031, 1996.
- HENRICKSON, R. **Microalga Spirulina**. Urano, Barcelona, 220p. 1994.
- HENRIKSON, R. **Earth food Spirulina**. Kenwood: Ronore Enterprises Inc., 1989, 180p.
- HIRATA S.; TAYA, M.; TONES, S. Continuous cultures of *Spirulina platensis* under photoautotrophic conditions with change in light intensity. **Journal of chemical engineering of Japan**, v.31, n.4, p.636-639, 1998.
- ILTS, A. Ecologie de *Spirulina platensis* dans le milieux natronés de Afrique Sahélienne. In : **Atti del Convergnio Prospective della coltura di Spirulina in Italia**. Firenze, 1980 .
- JANK, M.S. **A energia da cana pode fortalecer o sistema elétrico**. 2009. Disponível em WWW.unica.com.br. Acesso em jan.10.2010.
- JANSSEN, M.; TRAMPER, J.; MUR, L.R.; WIJFFELS, R. H. Enclosed Outdoor Photobioreactors: Light Regime, Photosynthetic Efficiency, Scale-Up, and Future Prospects. **Biotechnology and Bioengineering**, v.81, n.2, 2002.
- JONES, R.P.; PAMMENT, N. GREENFIELD, P.F. Alcohol fermentation by yeast. The effect of environmental and other variable. **Process. Biochemistry**. v.16, n.3., p. 42-49, 1981.
- JOSLYN, M. A. Alcoholometry. In: JOSLYN, M. A. (Ed.) **Methods in food analysis: physical, chemical and instrumental methods of analysis**. New York: Academic Press, 1970. P. 447-474.

- KARUBE, I.; TAKEUCHI, T.; BARNES, D. J. Biotechnological reduction of CO₂ emissions. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. v. 46, p. 63-79. 1992
- KOCK, J.L.F.; VENTER, P.; SMITH, D.P.; VANWYK, P.W.J.; BOTES, P.J.; COETZEE, D.J.; POHL, C.H.; A novel oxylipin-associated 'ghosting' phenomenon in yeast flocculation. **Antonie van Leeuwenhoek** v.77, p.401–406, 2000.
- KOSARIC, N. Ethanol- Potencial Source of Energy and Chemical Products. In: REHM, H.J.; REED, G.; PÜHLER, A.; STADLER, P. (eds). **Biotechnology**, 2nd ed. 1996, Vol. 6, p.121-203.
- KOSHIMIZU, L.H.; MELO-CRUZ, M.R.; VALDEOLIVAS, E.I.; BUENO-NETO, C.L.; RAMOS-GONÇALVES, A.C.; ROMERO DE LA IGLESIA, M.; BORZANI, W. Fermentação alcoólica em uma única dorna em escala piloto. **Revista Brasil Açucareiro**. V. 102, p. 14-21, 1983.
- KOURKOUTAS, Y.; KOUTINAS, A. A.; KANELAKI, M.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R. Continuous wine fermentation using a psychrophilic yeast immobilized on apple cuts at different temperatures. **Food Microbiology**. V. 19, p. 127-134. 2002.
- LACAZ-RUIZ, R. Espirulina e Zootecnia. In: LACAZ-RUIZ, R., ed. **Espirulina – Estudos & Trabalhos**. São Paulo: Ed. Roca. 2003, p.1-34.
- LALUCE, C. Current aspects of fuel ethanol production in Brazil. **Critical Reviews in Biotechnology**. V. 11, p. 49-161. 1991.
- LALUCE, C.; SOUZA, C.S.; ABUD, C.L.; GATTAS, E.A.L.; WALKER, G.M. Continuous ethanol production in a nonconventional five-stage system operating with yeast cell recycling at elevated temperatures. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**.v.29, p. 140–144, 2002.
- LEDUY, A.; THERIEN, N. An improved method for optical density measurement of the semicroscopic blue algae *Spirulina maxima*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.19, p.1219-1224, 1977.
- LEE, Y. K.; LOW, C. S. Productivity of outdoor algal cultures in enclosed tubular photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**. V. 40, p. 1119-1122. 1992.
- LEE, Y.K. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. **Journal of Applied Phycology**, v.13, p.307-315, 2001.

- LI, O. ; KANG, C. ; ZHANG, C. Waste water produced from an oilfield and continuous treatment with an oil-degrading bacterium. **Process Biochemistry**. V. 40, p. 873-877, 2005.
- LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Produção de Etanol. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, N. (Coords.) **Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. Vol. 3. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. P. 1-43.
- LIU, Y. ; LIU, D. ; SU, O. ; LIU, J. ; XIE, D. Effects of phosphorus and nitrogen limitations on continuous production of glycerol in a multistage cascade bioreactor by *Candida krusei*. **Biochemical Engineering Journal**. V. 15, p. 101-106. 2003.
- MACEDO, I.C.M; CORTEZ, L.A.B. O processamento industrial da cana-de-açúcar no Brasil. In: ROSILLO-CALLE, F.; BAJAY, S.V.; ROTHMAN, H. (Orgs.) **Uso da Biomassa para produção de energia na indústria brasileira**. Campinas: Editora Unicamp. 2005. P. 247-268.
- MACEDO, R.V.T.; ALEGRE, R.M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina máxima* em dois níveis de temperatura. Parte II: Produção de lipídeos. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.21, n.2, p.183-186, 2001.
- MAEDA, K.; OWADA, M.; KIMURA, N.; OMATA, K.; KARUBE, J. CO₂ fixation from the flue gas on coal-fired thermal power plant by micorlagae. **Energy Conversion and Management**, v. 36, p. 717-720, 1995.
- MAEHLER, A.R.; COSTA, J.A.; PIRES, J.L.F.; RAMBO, L. Grain quality in two soybean cultivars in relation to the water availability and plant arrangement. **Ciência Rural**. V. 33, p. 213-218. 2003.
- MAGALHAES, M.M.A. **Fermentação alcoólica do mosto de melaço: influência da adição de fonte de nitrogênio ao mesmo no teor de proteína e levedura residual**. Dissertação de Mestrado, Escola politécnica USP. São Paulo 1978.
- MAHAJAN, G.; KAMAT, M. γ -Linolenic acid production from *Spirulina platensis*. **Applied Microbiology And Biotechnology**. v.43, p.466-469. 1995.
- MAIER, R.M.; PEPPER, I.L.; GERBA, C.P. **Environmental Microbiology**. San Diego: Academic Press. 2000. P. 143-145.
- MALONE, C.F.S.; SANT'ANNA, C.L.; SAKAMOTO, A.Y. Cianobactérias de duas lagoas Salinas no pantanal da Nhecolândia, MS.Brasil. In: **XII Congresso Brasileiro de Ficologia**. Brasília: Sociedade Brasileira de Ficologia, 2008. P.43-44.

- MARQUES, F. Vias para avançar como líder do etanol: Fapesp lança programa para impulsionar pesquisa em bioenergia. **Revista Pesquisa Fapesp**. No 149. p. 20-25. 2008.
- MARQUEZ, F.J.; SASAKI, K.; KAKIZONO, T.; NISHIO N.; NAGAI, S. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. V.76, pp. 408–410. 1993.
- MARTINEZ, E. A. ; SILAV, S. S. ; ALMEIDA, J. B.; SILVA, S. S.; ANA, S.; SOLENZAL, I. N.; FELIPE, M. G. A. The influence of ph and dilution rate on continuous production of xylitol from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *C. guilliermondii*. **Process Biochemistry**. V. 38, p. 1677-1683. 2003.
- MATSUDO, M. C. **Cultivo de *Spirulina platensis* por processo descontínuo alimentado repetitivo utilizando uréia como fonte de nitrogênio**. São Paulo, 2006, 103p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.
- MATSUDO, M. C. ; BEZERRA, R. P. ; SATO, S. ; PEREGO, P. ; CONVERTI, A. ; CARVALHO, J. C. M. Repeated fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* using urea as nitrogen source. **Biochemical Engineering Journal**, V. 43, P. 52-57, 2009.
- MAXON, W. D. Continuous Fermentation. A Discussion of its principles and application. **Applied Microbiology**. Washington. V. 3, p. 110-122. 1954.
- McKASKLE, A. **Human utilization of algal biomass from *Spirulina***. Disponível em: <http://www.ag.arizona.edu/azqua/algaeclass/spiro2.htm>. Acesso em: 26 out. 2003.
- MIN-TIAN, G. ; KOIDE, M. ; GOTOU, R. ; TAKANASHI, H. ; HIRATA, M. ; HANO, T. Development of a continuous electrodialysis fermentation system for production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus*. **Process biochemistry**. V. 40, p. 1033-1036. 2005.
- MOLINA, E.; FERNÁNDEZ, J.; ACIÉN, F. G.; CHISTI, Y. Tubular photobioreactor design of algal cultures. **Journal of biotechnology**. V. 92, p. 113-131. 2001.
- MONTE ALEGRE, C.R.; RIGO, M.; JOEKES, I. Ethanol fermentation of a diluted molasses médium by *Saccharomyces cerevisiae* imobilized on chrysotile. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 46, p. 751-757, 2003.

- MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, v.129, p. 439–445, 2007
- 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**, Amsterdam, v.37, p.535-547, 2001.
- MORONEY, J. V.; SOMANCHI, A. How do algae concentrate CO₂ to increase the efficiency of photosynthetic carbon fixation?. **Plant physiology**. V. 119, p. 9-16, 1999.
- NERANTZIS ET, TZOVENIS IP, STAMATIADIS S, GIANNAKOPOULOU E, MANIATIS L: **Continuous Production of Arthrospira (=Spirulina) Platensis In A Helical Photobioreactor**. 2002. Disponível em: www.ath.aegean.gr/srcosmos/showpub.aspx?aa=8290. Acesso em: 20/nov/2006.
- NUNES, V. A.; GOMES, G. A; SILVA, R. C. S.; LACAZ-RUIZ, R. Tópicos de biologia molecular para o estudo de cianobactérias. In: LACAZ-RUIZ, R., ed. **Espirulina – Estudos & Trabalhos**. São Paulo: Editora Roca. 2003, p.235-237.
- OFFICIAL METHODS OF FOOD ANALYSIS**. Williams, S. (editor). Association of official analytical chemistry Inc., 14 th edition, Arlington, p.1141, 1984.
- OGBONNA, J.C.; TANAKA, H. Industrial-size photobioreactors **Chemtech**, v.27, n.7, p.43-49, 1997.
- OLGUIN, E. J.; GALICIA, S.; HERNANDEZ, E. ; ANGULO, O. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. Growth on pig waste. **Bioresource Technology**. v. 77, p. 19-24. 2001.
- OLIVEIRA, M.; VASCONCELOS, Y. *Revolução no canavial*, **Revista Pesquisa FAPESP**, nº. 122, abril de 2006.
- OLIVEIRA, S. C.; CASTRO, H. F.; VISTCONTI, A. E. S. Scale-up effects on kinetic parameters and on predictions of a yeast recycle continuous ethanol fermentation model incorporating loss of cell viability. **Bioprocess Engineering**, v. 23, p. 51-55. 2000.
- PAMBOUKIAN, C. R. D.; FACCIOTTI, M. C. R. Production of the antitumoral retamycin during continuous fermentation of *Streptomyces olindensis*. **Process Biochemistry**. V. 39, p. 2249-2255. 2004.

- PAMBOUKIAN, C.R.D. Utilização de processos contínuos para a produção do antitumoral retamicina por *Streptomyces olindensis*. In: **XIV SINA Ferm: Anais Florianópolis**, 2003
- PAOLETTI, C.; PUSHPARAJ, B.; TOMASELLI, L. Ricerche sulla nutrizione minerale di *Spirulina platensis*. In: **CONGRESSO NAZIONALE DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI MICROBIOLOGIA**, 17, Padua, 1975. Atti. Padua: Italian Society of Microbiology, 1975. p.833-839.
- 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, p.225-228, 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, p.371-375, 2003.
- PELIZER, L.H.; SASSANO, C.E.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S.; GIOIELLI, L.A.; MORAES, I.O. Padronização do método de secagem da biomassa de *Spirulina platensis*. **Farmácia e Química**, v.32, n.1, p.37-40, 1999.
- PELOSI, E.; MARGHERI, M. C.; TOMASELLI, L. Characteristics and significance of *Spirulina* morphology. **Caryologia**. V. 35, p. 157, 1982
- PEREGO JUNIOR, L. **Fermentação alcoólica continua de mosto de melaço: influência da concentração do mosto e da vazão específica de alimentação na estabilidade do sistema a 32 °C**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 162p. 1979.
- PIERCE, W. C., HAENISCH, E. L. **Quantitative Analysis**, 3ed., John Willey & Sons Inc., New York, 1948.
- PIORRECK, M.; HINNERK, K.; POHL, B.; POHL, P. Biomass production, total protein chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue green algae under different nitrogen regimes. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.23, n.2, p.207-216, 1984.
- PITKÄNEN, J. P. ; ARISTIDOU, A. ; SALUSJÄRVI, L.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M. Metabolic flux analysis of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using continuous culture. **Metabolic Engineering**. V. 5, p. 16-31. 2003.
- PULZ, O.; SCHEIBENBOGEN, K.; GROB, W. Biotechnology with cyanobacteria and microalgae. In: Rehm, H. J.; Reed, G.; Puhler, A.; Stadler, P. (Eds.) **Biotechnology**. Weinheim: Wiley – VCH. Vol. 10, p. 107-136, 2001.

- RANGEL, C.O. **Influência da luz e uréia no crescimento e conteúdo de clorofila da biomassa de *Spirulina platensis***. São Paulo, 1999, 129p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de 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**. Amsterdam, v.92, p.133-141, 2004.
- Richmond A. Large scale microalgal culture and applications. **Progress in Phycology Research** 1990;7:1–62.
- RICHMOND, A. Microalgal biotechnology at the turn of the turn of the millennium: A personal view. **Journal Applied Phycology**. V. 12, p. 441-41, 2000.
- RICHMOND, A. Phototropic microalgae. In: RAHM, H. J. & REED, G., eds. **Biotechnology**, Verlag Chemie. V. 3, 1983.
- RICHMOND, A. *Spirulina*. In: BOROWITZKA, M. A., BOROWITZKA, L. J. **Microalgal Biotechnology**. P. 85-121.1988.
- RUSSEL, J. B. **Química Geral**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1982. 897p.
- SAMUELSSON, G.; LÖNNEBORG, A.; ROSENQVIST, E.; GUSTAFSSON, P.; ÖQUIST, G. Photoinhibition and reactivation of photosynthesis in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. **Plant Physiology**. V. 79, p. 992-995, 1985.
- SANCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 5270-5295, 2008.
- 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. 9, p. 702-711, 2007.
- SASSANO, C. E. N. **Cultivo de *Spirulina platensis* por processo contínuo utilizando cloreto de amônio como fonte de nitrogênio**. São Paulo, 2004, 116p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- SASSANO, C.E.N.; CARVALHO, J.C.M.; GIOIELLI, L.A.; SATO, S. ; TORRE, P. Kinetics and bioenergetics of *Spirulina platensis* cultivation by fed-batch addition of urea as nitrogen source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 112, p. 143-150, 2004.

- 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, p.593-598, 2007.
- SAUDE, N. ; CHÉZE-LANGE, H. ; BEUNARD, D. ; DHULSTER, P. ; GUILLOCHON, D. ; CAZÉ, A. M. ; MORCELLET, M. ; JENTER, A. Alginate production by *Azotobacter vinelandii* in a membrane bioreactor. **Process Biochemistry**. V. 38, p. 273-278. 2002.
- SAYED, S. ; ZEEUW, W. ; LETTING, G. Anaerobic treatment of slaughterhouse waste using a flocculant sludge UASB reactor, **Agricultural Wastes**, v. 11, p. 197-226. 1984.
- SCHAFER, R.; MERTEN, C.; EIGENBERGER, G. Bubble size distributions in a bubble column reactor under industrial conditions. **Experimental Thermal and Fluid Science**. v. 26, p. 595-604, 2002.
- SCHLÖSSER, U. G. Sammlung von Algenkulturen. **Berlin Deutsche Botanische Gesellschaft**. Berlin, v.95, p.181-276, 1982.
- SHIMAMATSU, H. Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. **Hydrobiologia**, v.512, p.39-44, 2004.
- SKULBERG, O. M. Microalgae as a source of bioactive molecules – experience from cyanophyte research. **Journal of Applied Phycology**. V. 12, p. 341-348, 2000.
- SOLETO, D.; BINAGHI, L.; FERRARI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J.C.M.; ZILLI, M.; CONVERTI, A. Effects of Carbon Dioxide Feeding Rate and Light Intensity on the Fed-Batch Pulse-Feeding Cultivation of *Spirulina platensis* in Helical Photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**. V. 39, P. 369-375, 2008.
- SOMOGY, M. Notes on sugar determination. **Journal Biological Chemistry**, v.195, p.19-23, 1952
- 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 & Francis Ltd. 1997, p.1-14.
- TOMASELLI, L.; GIOVANNETTI, L.; TORZILLO, G. Physiology of stress response in *Spirulina* spp. In: DOUMENOE, F.; DURAND-CHASTEL, H.; TOULEMONT, A. (Eds.) ***Spirulina Age de Vie Salletin de Institut Occeanographique***. Monaco, n.2, p. 65-75, 1993.

- TORZILLO, G. Tubular Bioreactors. In: VONSHAK, A. ***Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology***. London: Taylor & Francis Ltd. 1997. p. 101-115.
- TORZILLO, G.; CARLOZZI, P.; PUSHPARAJ, B.; MONTAINI, E.; MATERASSI, R. A two-plane tubular photobioreactor for outdoor culture of *Spirulina*. **Biotechnology and Bioengineering**. V. 42, p.891-898, 1993.
- TORZILLO, G.; PUSHPARAJ, B.; BOCCI, F.; BALLONI, W.; MATERASSI, R.; FLORENZANO, G. Production of *Spirulina* biomass in closed photobioreactors. **Biomass**. V. 11, p. 61-74, 1986.
- TORZILLO, G.; SACCHI, A.; MATERASSI, R.; RICHMOND, A. Effect of temperature on yield and night biomass in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactor. **Journal of Applied Phycology**. P. 3, 103-109, 1991.
- TORZILLO, G.; VONSHAK, A. Effect of light and temperature on the photosynthetic activity of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Biomass & Bioenergy**. V. 6, p. 399-403, 1994.
- ÚNICA. **Produção de Etanol**. 2009. Disponível em: WWW.unica.com.br Acesso em 01.dez.2009.
- ÚNICA. **Produção e uso do Etanol combustível no Brasil**. 2007. Disponível em WWW.unica.com.br. Acesso em 08.jan.2010.
- UTEX. **UTEX The culture collection of algae**. Disponível em: <http://www.sbs.utexas.edu>. Acesso em 25.jul.2006.
- VARGA, L.; SZIGETI, J.; KOVÁCS, R.; FÖLDES, T.; BUTI, S. Influence of a *Spirulina platensis* biomass on the microflora of fermented ABT milks during storage (R1). **Journal of Dairy Science** Lancaster, v. 85, p. 1031-1038, 2002.
- VASCONCELOS, J.N. Generalidades sobre a condução da fermentação alcoólica contínua industrial. **Stab**. V. 24, p. 17-18. 2006.
- VASCONCELOS, J.N.; LOPES, C.E.; FRANÇA, F.P. Continuous ethanol production using yeast immobilized on sugar-cane stalks. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. V. 21, p. 357-365, 2004.
- VONSHAK, A. Outdoor mass production of *Spirulina*: the basic concept. In: VONSHAK, A., ed. ***Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology***. London: Taylor and Francis, 1997. p.79-99.

- VONSHAK, A. *Spirulina*: Growth, Physiology and Biochemistry. In: VONSHAK, A., ed. ***Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology***. London: Taylor and Francis, 1997b. p.43-65.
- VONSHAK, A.; CHEUNG, S.M.; CHEN, F. Mixotrophic growth modifies the response of *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Cyanobacteria) cells to light. **Journal of Phycology**. V. 36, p. 675-679, 2000.
- WATANABE, Y. NOÛE, J; HALL, D. O. Photosynthetic performance of a helical tubular photobioreactor incorporating the cyanobacterium *Spirulina palatensis*. **Biotechnology and Bioengineering**. Vol. 47, p. 261-269. 1995.
- WATANABE, Y.; HALL, D. O. Photosynthetic CO₂ conversion technologies using a photobioreactor incorporating microalgae – energy and material balances. **Energy Conversion**. V. 37, p. 1321-1326. 1996.
- WATANABE, Y.; HALL, D. O. Photosynthetic CO₂ fixation technologies using a helical tubular bioreactor incorporating the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Energy Conversion**. V. 36. p. 721-724. 1995.
- WHEALS, A.E.; BASSO, L.C.; ALVESAND, D.M.G.; AMORIM, H.V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnol.**, V.17, 482-487. 1999.
- YANG, Y. ; ZHANG, Z. ; LU, J. ; MAEKAWA, T. Continuous methane fermentation and the production of vitamin B 12 in a fixed-bed reactor packed with loofah. **Bioresource Technology**. V. 92. p. 285-290. 2004.
- ZARPELON, F.; ANDRIETTA, S. R. Fermentação contínua para produção de álcool. **Stab**, v. 10 (4), p. 23-28. 1992.
- ZIINO, M. ; CURTO, M. R. B.; SALVO, D.; SIGNORINO, B.; GIUFFRIDA, D. Lipid composition of *Geotrichum candidum* single cell protein grown in continuous submerged culture. **Bioresource Technology**. V. 67, p. 7-11. 1999.