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

**Estudo do cultivo de *Spirulina platensis* por processo
contínuo com uréia como fonte de nitrogênio**

Iván Alejandro Ávila León

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

São Paulo
2010

Iván Alejandro Ávila León

Estudo do cultivo de *Spirulina platensis* por processo contínuo com
uréia como fonte de nitrogênio

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

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

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, 5 de Abril de 2010.

Para Ana y Samuel
Por ellos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai e minha mãe, por serem os motores físicos e emocionais da minha vida pessoal e acadêmica.

Ao Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho, pela ajuda, compreensão, apoio, paciência, pelas noites de trabalho no laboratório, pela disposição para sempre ajudar e por me transmitir seu conhecimento.

Aos professores do departamento pelos conselhos, as aulas ministradas e os ensinamentos transmitidos.

Aos meus companheiros do laboratório pela ajuda pronta, a resolução de dúvidas, o apoio logístico, os conhecimentos compartilhados, as risadas, as festas de aniversário, o sorriso apesar da angústia, as conversações furadas e especialmente pela amizade sincera.

Às meninas de iniciação científica e aos técnicos do laboratório pelo apoio nos experimentos e nas análises, pelos ensinamentos, a paciência com minha bagunça, pelo café com cigarro e pela amizade.

Ao departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacéutica e seus funcionários, pelos serviços prestados, a celeridade do seu trabalho e sua disposição.

Aos meus amigos e irmãos, na distância ou na proximidade, por sempre estarem prontos a me apoiar.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos que me permitiu realizar o mestrado.

*El secreto de la genialidad es el de conservar el espíritu del niño hasta la vejez,
lo cual quiere decir nunca perder el entusiasmo.*

Aldous Huxley

RESUMO

Arthrospira (Spirulina) platensis vem sendo cultivada para a produção de biomassa pelos altos conteúdos de proteína, ácidos graxos poliinsaturados e vitaminas. O nitrogênio é um nutriente que exerce influência em seu metabolismo, e o uso de fontes nitrogenadas de baixo custo pode contribuir para a viabilização da produção de *A. platensis*. Foi verificado o crescimento do microrganismo empregando uréia como fonte de nitrogênio por meio de processo contínuo, visando evitar níveis inibitórios de amônia no meio. Verificou-se a influência da vazão específica de alimentação (D , 0,04 a 0,44 dia^{-1}) utilizando duas concentrações de uréia (N_0) de 0,5 e 5 mM no meio de alimentação. Para $N_0=0,5\text{mM}$, a maior produtividade em células (P_x) obtida foi 201,5 $\text{mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ com $D=0,44\text{d}^{-1}$; nessas condições a concentração celular em regime permanente (X_p) foi 458 mg.L^{-1} , obtendo-se uma biomassa com um teor de proteínas de 27,2%. Para $N_0=5\text{mM}$, o máximo valor de P_x encontrado foi 148,2 $\text{mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, com $D=0,12\text{d}^{-1}$; nessa vazão de alimentação, o X_p foi 1235 mg.L^{-1} e o teor protéico na biomassa (71,9%) o mais alto encontrado.

Palavras chave: *Spirulina (Arthrospira) platensis*. Processo contínuo. Uréia. Fonte de nitrogênio. Vazão específica de alimentação.

ABSTRACT

Arthrospira platensis is being cultivated for biomass production because of its high content of proteins, polyunsaturated fatty acids and vitamins. Nitrogen is a nutrient which has a big influence in its metabolism, and the use of low cost sources of this element could contribute for the feasibility of *A. platensis* production. It was verified the growth of the microorganism using urea as a nitrogen source by a continuous process, to avoid ammonia inhibitory levels into the culture. It was evaluated the influence of the specific dilution rate (D , 0.04 to 0.44 day⁻¹) in the culture applying two urea concentrations (N_0) 0.5 and 5mM in the feeding medium. For $N_0=0.5$ mM, the highest cell productivity (P_x) obtained was 201.5 mg.L⁻¹.day⁻¹ using $D=0.44$ d⁻¹; under these conditions the cell concentration in steady state (X_p) was 458 mg.L⁻¹, obtaining a biomass with a protein content of 27.2%. For $N_0=5$ mM, the highest P_x value was 148.2 mg.L⁻¹.day⁻¹, with $D=0.12$ day⁻¹; under this dilution rate, the X_p was 1235 mg.L⁻¹ and its protein content (71.9%) was the highest achieved.

Key words: *Arthrospira (Spirulina) platensis*. Continuous culture. Urea. Nitrogen source. Dilution rate.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> (UTEX 1926)	26
Figura 2 Concentrações relativas de gás carbônico, bicarbonato e carbonato (%) em função do pH	28
Figura 3 Porcentagem de Amônia e Amônio em Função do pH	30
Figura 4 Esquema de um processo contínuo típico	31
Figura 5 Biorreator empregado no cultivo de <i>A. platensis</i>	37
Figura 6 Concentração celular (X) em função do tempo segundo o método de “wash-out”	42
Figura 7 Relação do logaritmo neperiano da concentração celular (ln X) em função do tempo	44
Figura 8 Curva de calibração para deeterminação cda concentração celular (X) de suspensões de <i>A. platensis</i>	45
Figura 9 Curva de crescimento de <i>A. platensis</i> em meio com nitrato de sódio como Fonte de nitrogênio (A)	46
Figura 10 Curva de crescimento de <i>A. platensis</i> em meio com nitrato de sódio como fonte de nitrogênio (B)	49
Figura 11 Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio 1 ($N_0=5\text{mmol.L}^{-1}$; $D=0.04\text{ dia}^{-1}$)	49
Figura 12 Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio 2 ($N_0=5\text{mmol.L}^{-1}$; $D=0.08\text{ dia}^{-1}$)	51
Figura 13 Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio 3 ($N_0=5\text{mmol.L}^{-1}$; $D=0.12\text{ dia}^{-1}$)	53
Figura 14 Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio 4 ($N_0=5\text{mmol.L}^{-1}$; $D=0.16\text{ dia}^{-1}$)	55
Figura 15 Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio 5 ($N_0=5\text{mmol.L}^{-1}$; $D=0.32\text{ dia}^{-1}$)	57

Figura 16	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio 6 ($N_0=0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$; $D=0.08 \text{ dia}^{-1}$)	59
Figura 17	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio 7 ($N_0=0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$; $D=0.12 \text{ dia}^{-1}$)	61
Figura 18	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio 8 ($N_0=0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$; $D=0.16 \text{ dia}^{-1}$)	63
Figura 19	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio 9 ($N_0=0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$; $D=0.24 \text{ dia}^{-1}$)	65
Figura 20	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio 10 ($N_0=0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$; $D=0.32 \text{ dia}^{-1}$)	67
Figura 21	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio 11 ($N_0=0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$; $D=0.4 \text{ dia}^{-1}$)	69
Figura 22	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio 12 ($N_0=0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$; $D=0.44 \text{ dia}^{-1}$)	71
Figura 23	Esquema da assimilação da amônia proveniente de uréia e nitrato de sódio.	72
Figura 24	Representação esquemática da assimilação de bicarbonato por <i>Spirulina platensis</i> .	74
Figura 25	Logaritmo da concentração de amônia livre no reator durante o regime permanente (A_L), em função da velocidade específica de alimentação (D)	75
Figura 26	Porcentagem de proteína na biomassa seca (PTN) e lipídeos (LIP) em função da velocidade de fornecimento de uréia para $N_0=5 \text{ mM}$	80
Figura 27	Porcentagem de proteína na biomassa seca (PTN) e lipídeos (LIP) em função da velocidade de fornecimento de uréia para $N_0=0,5 \text{ mM}$	81
Figura 28	Concentração celular obtida em regime permanente (X_P) em função da vazão específica de alimentação (D), para concentrações de uréia (N_0) de 5 mM e $0,5 \text{ mM}$	84

Figura 29	Concentração celular obtida em regime permanente (X_p) em função da velocidade de fornecimento de nitrogênio ($D.N_0$), para concentrações de uréia (N_0) 0,5mM e 5mM	85
Figura 30	Produtividade em células (P_x) em função da vazão específica de alimentação (D), para concentrações de uréia (N_0) de 5mM e 0,5mM	86
Figura 31	Produtividade em células no regime permanente (P_x) em função da velocidade de fornecimento de nitrogênio ($D.N_0$), para concentrações de uréia (N_0) 0,5mM e 5mM	87
Figura 32	Fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{x/N}$) em função da velocidade específica de alimentação (D), para concentrações de uréia (N_0) 0,5mM e 5mM	88

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Matriz de ensaio	41
Tabela 2 Concentração celular, logaritmo neperiano da concentração celular e valores da vazão de diluição em função do tempo.	43
Tabela 3 Resultados referentes ao experimento 1: Cultivo contínuo de <i>S. platensis</i> com meio de alimentação contendo 5mmol.L ⁻¹ (N ₀) de uréia, sob uma vazão específica de alimentação (D) de 0,04 dia ⁻¹	48
Tabela 4 Resultados referentes ao experimento 2: Cultivo contínuo de <i>S. platensis</i> com meio de alimentação contendo 5mmol.L ⁻¹ (N ₀) de uréia, sob uma vazão específica de alimentação (D) de 0,08 dia ⁻¹	50
Tabela 5 Resultados referentes ao experimento 3: Cultivo contínuo de <i>S. platensis</i> com meio de alimentação contendo 5mmol.L ⁻¹ (N ₀) de uréia, sob uma vazão específica de alimentação (D) de 0,12 dia ⁻¹	52
Tabela 6 Resultados referentes ao experimento 4: Cultivo contínuo de <i>S. platensis</i> com meio de alimentação contendo 5mmol.L ⁻¹ (N ₀) de uréia, sob uma vazão específica de alimentação (D) de 0,16 dia ⁻¹	54
Tabela 7 Resultados referentes ao experimento 5: Cultivo contínuo de <i>S. platensis</i> com meio de alimentação contendo 5 mmol.L ⁻¹ (N ₀) de uréia, sob uma vazão específica de alimentação (D) de 0,32 dia ⁻¹	56
Tabela 8 Resultados referentes ao experimento 6: Cultivo contínuo de <i>S. platensis</i> com meio de alimentação contendo 0,5mmol.L ⁻¹ (N ₀) de uréia, sob uma vazão específica de alimentação (D) de 0,08 dia ⁻¹	58
Tabela 9 Resultados referentes ao experimento 7: Cultivo contínuo de <i>S. platensis</i> com meio de alimentação contendo 0,5mmol.L ⁻¹ (N ₀) de uréia, sob uma vazão específica de alimentação (D) de 0,12 dia ⁻¹	60
Tabela 10 Resultados referentes ao experimento 8: Cultivo contínuo de <i>S. platensis</i> com meio de alimentação contendo 0,5mmol.L ⁻¹ (N ₀) de uréia, sob uma vazão específica de alimentação (D) de 0,16 dia ⁻¹	62

Tabela 11	Resultados referentes ao experimento 9: Cultivo contínuo de <i>S. platensis</i> com meio de alimentação contendo 0,5mmol.L ⁻¹ (N ₀) de uréia, sob uma vazão específica de alimentação (D) de 0,24 dia ⁻¹	64
Tabela 12	Resultados referentes ao experimento 10: Cultivo contínuo de <i>S. platensis</i> com meio de alimentação contendo 0,5mmol.L ⁻¹ (N ₀) de uréia, sob uma vazão específica de alimentação (D) de 0,32 dia ⁻¹	66
Tabela 13	Resultados referentes ao experimento 11: Cultivo contínuo de <i>A. platensis</i> com meio de alimentação contendo 0,5mmol.L ⁻¹ (N ₀) de uréia, sob uma vazão específica de alimentação (D) de 0,4 dia ⁻¹	68
Tabela 14	Resultados referentes ao experimento 12: Cultivo contínuo de <i>A. platensis</i> com meio de alimentação contendo 0,5mmol.L ⁻¹ (N ₀) de uréia, sob uma vazão específica de alimentação (D) de 0,4 dia ⁻¹	70
Tabela 15	Porcentagens de remoção de amônia no cultivo contínuo de <i>A. platensis</i>	77
Tabela 16	Composição da biomassa obtida nos ensaios realizados.	79
Tabela 17	Concentração celular (X _P) e parâmetros cinéticos calculados para os experimentos realizados	83

LISTA DE ABREVIATÖES E SIGLAS

X	concentraçãõ celular (mg.L ⁻¹)
X _p	concentraçãõ celular no regime permanente (mg.L ⁻¹)
P _x	produtividade em células (mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹)
X _i	concentraçãõ celular inicial (mg.L ⁻¹)
X _f	concentraçãõ celular final (mg.L ⁻¹)
t	tempo de cultivo (dias)
N ₀	concentraçãõ de uréia adicionada (mmol L ⁻¹)
A _L	amônia livre no meio de cultivo (mmol L ⁻¹)
AR	amônia residual durante o regime permanente (mmol L ⁻¹)
U	Concentraçãõ de uréia residual (mmol;L ⁻¹)
D	Vazãõ específica de alimentaçãõ (dia ⁻¹)
F	vazãõ de alimentaçãõ (mL.min ⁻¹)

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	14
1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 <i>Histórico</i>	22
3.2 <i>Propriedade e Aplicações</i>	23
3.3 <i>Generalidades da Arthrospira</i>	25
3.4 <i>Composição química da biomassa</i>	26
3.5 <i>Produção e Condições de Cultivo</i>	27
3.5.1 Fonte de Carbono	27
3.5.2 Fonte de Nitrogênio	28
3.5.3 pH	29
3.6 Processo contínuo de cultivo	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Microrganismo	34
4.2 Manutenção de <i>A. platensis</i>	34
4.3 Meio de cultivo	34

4.3.1 Meio padrão de cultivo de <i>A. platensis</i>	34
4.3.2 Meio modificado	35
4.4 Preparo de inóculo e obtenção da concentração de biomassa inicial	35
4.5 Dispositivo para cultura e condições de cultivo	36
4.6 Técnicas Analíticas	37
4.6.1 Acompanhamento do cultivo	37
4.6.1.1 Determinação da concentração celular	37
4.6.1.1.1 Construção da curva de calibração para determinação da concentração celular.	37
4.6.1.2 Determinação da concentração de amônia total.	38
4.6.1.3 Determinação da concentração de uréia	38
4.6.1.4 Determinação da concentração de carbonato total	39
4.6.1.5 Determinação do pH.	39
4.6.2 Avaliação da biomassa obtida	39
4.6.2.1 Lipídios totais	40
4.6.2.2 Proteínas totais	40
4.7 Planejamento experimental	40
5. RESULTADOS	42
5.1 Verificação da homogeneidade	42
5.2 Curva de calibração para determinação da concentração celular	44
5.3 Curvas de crescimento e determinação das condições de alimentação	45
5.4 Resultados dos cultivos 1 a 12	48

6. DISCUSSÃO	72
6.1 Avaliação do crescimento celular e do consumo de nutrientes	72
6.2 Análise da composição da biomassa	79
6.3 Análise dos parâmetros cinéticos e do fator de conversão de nitrogênio em células	82
7. CONCLUSÕES	90
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

1. INTRODUÇÃO

As inquietantes tendências da produção agropecuária, junto com as atuais políticas do comércio internacional, questionam a possibilidade de que a produção e distribuição de alimentos possam ou não melhorar com a rapidez necessária para se equilibrar com o crescimento da população e atingir o alvo da segurança alimentar. Graças a este fato, tem se gerado grande interesse na produção de fontes alternativas de alimentos, considerando que a necessidade protéica é uma constante na alimentação humana e animal. Ao produzir-se maior quantidade de proteínas por área em função do tempo e satisfazendo as necessidades protéicas mínimas de animais, e em última análise do homem, é razoável que não se descarte este fato como possível solução para o problema da fome em algumas regiões (CIFERRI & TIBONI, 1985). Uma via alternativa de disponibilidade de fonte protéica para alimentação é a produção de proteínas a partir de microorganismos, entre os quais as cianobactérias se destacam por possuírem muitas vantagens de acordo com Tacon & Jackson (1985): a) são capazes de utilizar fontes de carbono inorgânico e orgânico; b) possuem em torno de 40-70% de proteína bruta em função da espécie; c) apresentam tempos de geração curtos sob condições ótimas de crescimento; d) são facilmente cultivadas em pequenas áreas.

Assim, a cianobactéria *Arthrospira (Spirulina) platensis* vem sendo cultivada fotoautotróficamente para a produção de biomassa com alto conteúdo protéico, da ordem de 70% em massa seca (PELIZER *et al.*, 2003), colocando-se acima das carnes (15 – 25%) e da soja (DILLON *et al.*, 1995; STANCA & POPOVIC, 1996). Apresenta a vantagem de não conter o colesterol das carnes, ser pouco calórica, além de conter todos os aminoácidos essenciais recomendados pela FAO. (WHO, 1985). Sua biomassa é caracterizada pela boa digestibilidade e por possuir baixo teor de ácidos nucléicos, não ultrapassando 5% da massa seca (CIFERRI & TIBONI, 1985; BALLONI *et al.*, 1981; DURAND-CHASTEL, 1980). Adicionalmente, tem em sua constituição vitaminas A, E, K, B e C (BECKER, 1981), ácidos graxos polinsaturados (MAHAJAN & KAMAT, 1995), bem como polissacarídeos com propriedade imunomodulatória, pigmentos e antioxidantes (PULZ & SCHEIBENBOGEN, 1998).

Quanto aos aspectos tecnológicos de cultivo da *Arthrospira*, esta apresenta vantagens em relação aos demais fotoautotróficos. Dentre estas, podem ser citadas

o crescimento em pH alcalino e altamente salino, fatores importantes na prevenção de contaminação no reator por microrganismos contaminantes (WALACH *et al.*; 1987, BOROWITZKA, 1999) e a separação fácil do meio de cultivo, devido a sua morfologia espiralada e sua maior dimensão celular (RICHMOND, 1983; PIORRECK *et al.*, 1984).

Por meio de estudos com processos descontínuos de cultivo, verificou-se que a forma de adição do substrato nas dornas pode interferir na qualidade da biomassa produzida (MAXON, 1954). No entanto, esses tipos de processos de cultivo, mesmo sendo viáveis em grande escala, não apresentam as mesmas vantagens dos processos contínuos para estudos de variáveis no crescimento e composição de microrganismos, tendo em conta as variações a que os microrganismos são submetidos ao longo de todo o processo de cultivo, especificamente de nutrientes (SASSANO, 2004).

A fermentação contínua visa justamente aproveitar a manutenção do microrganismo em condições ótimas e constantes ao longo de todo o processo. Neste ponto, vê-se a importância da escolha correta da vazão específica de alimentação, da qual depende o tempo de residência do material no tanque de cultivo, que deve favorecer a produção de metabólitos em função das condições ambientais no biorreator. Além disso, quando o regime permanente é atingido, pode-se garantir que o microrganismo trabalhe sempre em condições de elevada atividade metabólica com parâmetros de crescimento inalterados ao longo do tempo, o que facilita o estudo da influência de parâmetros nutricionais no crescimento microbiano (PEREGO Jr, 1979; REHM & REED, 1995).

A aplicação do processo contínuo foi adequada para a redução de alguns componentes com nitrogênio de um meio contendo detritos de suínos e simultaneamente produção de biomassa de *A. platensis* (KIM *et al.*, 2000). Ressaltando que o processo contínuo é o processo de escolha no tratamento de efluentes, o presente projeto poderia ser importante no sentido de gerar informações úteis para o tratamento de águas residuárias empregando *A. platensis* em meio contendo uréia.

A utilização do processo contínuo para o cultivo de *Arthrospira platensis* permitiu a obtenção de resultados bastante satisfatórios com o uso de cloreto de amônio como fonte de nitrogênio (SASSANO *et al.*, 2007), acarretando uma

diminuição do custo de produção e uma maior produtividade quando comparada com o processo descontínuo. Adicionalmente, sendo a uréia um nutriente amplamente utilizado na agricultura por apresentar custo bastante baixo, poderia ser usada como fonte de nitrogênio para o cultivo contínuo de *A. platensis*.

2. OBJETIVOS

Verificar a influência de parâmetros próprios do processo contínuo de cultivo, como a concentração de uréia no meio de alimentação (N_0) e vazão específica de alimentação (D) no cultivo *Arthrospira (Spirulina) platensis*, tendo como variáveis dependentes os parâmetros cinéticos do crescimento microbiano, bem como seu conteúdo de lipídio e proteína.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Histórico

Arthrospira spp. cresce 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. Isoladas no México, Tchad, Etiopia, Quênia, Zaire, Zâmbia, etc., as espécies do gênero *Arthrospira* constituem um dos raros exemplos de cianobactérias continentais utilizadas naturalmente como alimento humano e animal (ABDIN EL SHERIF & CLEMENT, 1982).

A biomassa de *Arthrospira* sp. seca era consumida pela população asteca residente nas proximidades do Lago Texcoco na época da colonização espanhola. Tenochtitlán possuía praças e mercados onde a biomassa desse microrganismo era vendida com o nome de “*tecuitlatl*”. (LACAZ-RUIZ, 2003). A biomassa era recolhida com ajuda de uma malha de tecido e seca ao sol na superfície das pedras antes de ser consumida.

Na África, os povos de Kanembu, que vivem ao longo das costas do lago da República do Chade, alimentam-se dessas algas até hoje; a biomassa é recolhida dos lagos, estendidas sobre pedras e secas ao sol, resultando no alimento conhecido como “*Dihé*”. (PANIAGUA-MICHEL *et al.*, 1993).

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 concluiu que esse microrganismo possui um crescimento mais rápido, se comparado ao das plantas superiores; é rico em proteína e atóxico, razão pela qual vem sendo consumido desde tempos imemoráveis (LACAZ-RUIZ, 2003).

O cultivo comercial em larga escala de microalgas iniciou por volta de 1960 no Japão com o cultivo de *Chlorella* (TSUKADA *et al.*, 1977). Posteriormente, em 1970, a *Arthrospira* sp. começou a ser comercializada devido a sua facilidade de cultivo e recolhimento no Lago Texcoco, México, por Sosa Texcoco S.A (DURAND-CHASTEL, 1980). Segundo Borowitzka (1999), de menos de 30 toneladas em 1975, a produção global de *Arthrospira* sp. aumentou para mais de 2.500 toneladas em 1998. Shimamatsu (2004) estima que a produção total anual dessa biomassa seja de 3000 toneladas. Sabe-se que a maior planta de

produção deste microrganismo é a Fazenda *Earthrise* (Califórnia – EUA) que distribui seus produtos para até 20 países no mundo (SPOLAORE *et al.*, 2006).

3.2 Propriedades e aplicações

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

Sassano (2004) determinou que além do ácido γ -linolênico, podem ser encontrados também ácido palmítico, ácido palmitoléico, ácido esteárico, ácido oléico e ácido linoléico, cultivando *Arthrospira platensis* em processo contínuo e utilizando cloreto de amônio como fonte de nitrogênio; nos experimentos realizados por este autor, a biomassa apresentou uma grande quantidade de ácidos graxos polinsaturados, o que indica a importância desses compostos na constituição do microrganismo.

Em geral, biomassas microbianas possuem elevados teores de ácidos nucléicos. Devido à inabilidade do organismo humano para metabolizar o ácido úrico proveniente do metabolismo das purinas, o aumento no consumo de ácidos nucléicos pode acarretar altos níveis de ácido úrico no soro, desenvolvendo doenças como a gota. Neste contexto, as microalgas e cianobactérias são os microrganismos que apresentam os menores teores de ácidos nucléicos em suas biomassas (cerca de 4 – 6 %), contra 8 – 12 % para leveduras e 20 % para bactérias (ARAÚJO *et al.*, 2003), fazendo das microalgas e cianobactérias, em relação a ácidos nucléicos, os microrganismos com maior tolerância de consumo diário. A proteína produzida por *Arthrospira* spp. apresenta um conteúdo balanceado de aminoácidos, contendo inclusive metionina, ausente na maioria das outras microalgas (PARADA *et al.*, 1998). No seu espectro de aminoácidos, todos estes estão próximos dos padrões estabelecidos pela

FAO (Food and Agriculture Organization) (DILLON *et al.*, 1995; WHO, 1985). Além disso, o corpo humano assimila por volta de 95% das proteínas de *Arthrospira* spp., ao passo que apenas cerca de 20% das proteínas provenientes da carne de boi são assimiladas (MAIER *et al.*, 2000).

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. Atualmente, a maior parte da clorofila produzida e comercializada é obtida por fontes vegetais. No entanto, há 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).

Por outra parte, pesquisas relacionadas ao cultivo de *Arthrospira* têm demonstrado diversos usos do microrganismo, como sua possível aplicação como prebiótico: Parada *et al.* (1998) observaram o desenvolvimento da bactéria probiótica *Lactococcus lactis* por *A. platensis* em testes *in vitro*. Em 2002, Varga *et al.* constataram que esta cianobactéria pode ser utilizada para a fabricação de produtos lácteos funcionais devido ao efeito benéfico na sobrevivência de bactérias probióticas (*L. acidophilus* - *L. bifidus* - *S. thermophilus*) independente da temperatura de estocagem.

Morist *et al.* (2001) cultivaram *A. platensis* em fotobiorreator contínuo com o objetivo de utilizar a biomassa como suporte para a sobrevivência dos humanos em viagens espaciais. As biomassas recuperadas e tratadas para obtenção de um produto a base de *A. platensis* com segurança microbiológica e manutenção da composição química e nutricional, foi considerada com potencial para ser utilizada como alimento.

3.3 Generalidades de *Arthrospira* sp.

O gênero *Arthrospira* (ordem *Oscillatoriales*, família *Cyanophyceae*) contém o grupo de cianobactérias fotossintetizantes filamentosas cilíndricas, caracterizadas por uma cadeia de células na forma de espiral e envolvida por uma bainha fina, cujas paredes transversas podem ser vistas sob microscopia ótica (GUGLIELMI *et al.*, 1993); os espirais aparecem como filamentos verde-azulados devido à presença de dois pigmentos, a clorofila, verde e a ficocianina, azul (TOMASELLI, 1997).

O conjunto de células filamentosas cilíndricas é denominado tricoma (Figura 1). Estes possuem comprimentos de aproximadamente 500 µm e diâmetro variando de 6-12 µm (TOMASELLI, 1997), mas dependendo das condições de cultivo podem adquirir morfologias diferentes. As dimensões celulares, o grau de ondulação e o comprimento dos filamentos variam de espécie para espécie e podem ser afetados por fatores ambientais como temperatura ou condições físicas e químicas (CIFERRI e TIBONI, 1985; TOMASELLI, 1997). A temperatura influencia o tamanho das células e a ocorrência de diferentes organelas; o aumento da intensidade luminosa causa um aumento na concentração de vesículas de gás, no tamanho do tricoma e nos ficobilissomos (SASSANO, 2004). Os filamentos não possuem ramificações nem heterocistos. Sua reprodução é por fissão binária, produzindo vários descendentes semelhantes geneticamente. Também pode ocorrer a fragmentação dos tricomas, com a correspondente formação dos necrídeos. Esses fragmentos, também denominados de hormogônias, dão origem a um novo tricoma, o qual difere dos tricomas maduros pela falta de mobilidade, tamanho celular reduzido e morfologia diferenciada (CIFERRI e TIBONI, 1985).

Segundo Tomaselli (1997), esta espécie foi classificada novamente, agora com o nome de *Arthrospira* sp., e aceita oficialmente em *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. No entanto, a denominação *Spirulina* permanece tanto comercialmente como em publicações científicas.

Figura 1. *Arthrospira platensis* (UTEX 1926)

Fonte: O autor

3.4 Composição química da biomassa

As proteínas representam até 74% da massa seca de *Arthrospira*, valor que varia conforme a espécie e as condições de crescimento (COHEN, 1997). Entre as proteínas estão presentes as ficocianinas, biliproteínas envolvidas nas reações químicas de fotossíntese e que funcionam como reservatórios de nitrogênio (CIFERRI, 1983). Segundo Dillon *et al.* (1995), até 47% da proteína presente equivale a aminoácidos essenciais, com a presença inclusive de metionina, aminoácido ausente na maioria das cianobactérias e microalgas.

Os ácidos graxos poliinsaturados presentes nesta cianobactéria são, principalmente, os ácidos palmítico, linoléico, oléico e especialmente, os ácidos essenciais α -linolênico e γ -linolênico, correspondendo estes últimos a até 30% de todos os ácidos graxos presentes (HIRANO *et al.*, 1990); o teor de ácidos presentes varia conforme a espécie ou subespécie (HONGSTHONG *et al.*, 2007) e as condições de crescimento, principalmente a respeito à fonte de carbono (PIORRECK *et al.*, 1984)

Arthrospira spp. é rica em vitaminas como Cianocobalamina (B12), Pirodoxina (B6), Riboflavina (B2), Tiamina (B1), Tocoferol (E) e Filoquinona ou Fitonadiona (K) (BRANGER *et al.*, 2003). Também contém altos níveis de carotenóides (ANNAPURNA *et al.*, 1991), especialmente β -caroteno (CARERI *et al.*, 2001), clorofila (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004) e ficobilinas, que constituem 20% de proteína celular e são quantitativamente os pigmentos dominantes em *Arthrospira* sp. (RICHMOND, 1986). Dentre as ficobilinas encontra-se um dos mais importantes pigmentos, a ficocianina, um complexo protéico solúvel em água que auxilia na

atividade fotossintética de microalgas e pode ser encontrada em até 20% da massa seca de *Arthrospira* (VONSHAK, 1997). É utilizada como corante alimentar (SILVEIRA *et al.*, 2007) e também em técnicas fluorescentes de imunoenensaio (SUN *et al.*, 2006).

3.5 Produção e condições de cultivo

Arthrospira spp. desenvolve-se em meios em que os constituintes principais são as fontes minerais de carbono (carbonatos, bicarbonatos), fósforo e nitrogênio (normalmente, nitratos). Cresce bem em temperaturas da ordem de 30° C e utiliza a energia luminosa para seu desenvolvimento, entre 20 e 30 klx de intensidade luminosa (CIFERRI, 1983); é um microrganismo alcalofílico, apresentando crescimento considerado adequado sob valores de pH entre 8 e 11, e prevalece perante outros microrganismos e cianobactérias em meios aquáticos com concentrações salinas superiores a 30 g/L, podendo suportar concentrações de até 270 g/L (CIFERRI, 1983); todas essas condições ambientais evitam o crescimento de microrganismos contaminantes e outras cianobactérias que possam competir por nutrientes.

3.5.1 Fonte de Carbono

A forma de carbono preferencialmente assimilada por cianobactérias é o bicarbonato, sendo o pH ideal aquele que assegure o maior deslocamento do equilíbrio químico no sentido de sua formação, como pode se observar na Figura 2; o ânion entra na célula por transporte ativo e posteriormente a enzima anidrase carbônica age sobre o bicarbonato liberando o dióxido de carbono. Este é incorporado no ciclo de Calvin produzindo moléculas orgânicas, tais como carboidratos, proteínas e lipídeos (KAPLAN e REINHOLD, 1999).

Em baixa concentração extracelular de bicarbonato, as cianobactérias têm a capacidade de acumular o bicarbonato no meio intracelular (CORNET *et al.*, 1998) e utilizar o dióxido de carbono como fonte de carbono para seu metabolismo. Em cultivos realizados por Binaghi *et al.*, (2003) em meio contendo apenas carbonato não ocorreu um aumento da biomassa e, portanto o pH manteve-se praticamente invariável, ressaltando a importância do bicarbonato no metabolismo das cianobactérias.

Figura 2. Concentrações relativas de gás carbônico, bicarbonato e carbonato (%) em função do pH
Modificado de: Richmond (1986).

3.5.2. Fonte de nitrogênio

Dentre os fatores limitantes para a produção de *Arthrospira*, quando se trata de cultivo sintético, o custo dos nutrientes representa um fator importante na sua viabilização (TROTТА, 1978).

A fonte convencional de nitrogênio utilizada para a produção de *Arthrospira* é o nitrato de potássio. No entanto, em trabalho desenvolvido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF/USP), a utilização do processo descontínuo alimentado para o cultivo de *Arthrospira platensis* permitiu a obtenção de resultados bastante satisfatórios com o uso de uréia como fonte de nitrogênio (DANESI *et al.*, 2002), acarretando numa diminuição do custo de produção.

Sabe-se que a quantidade e qualidade da fonte de nitrogênio usada no meio de cultura podem influenciar no conteúdo de proteína, bem como em outros constituintes da *Arthrospira sp* (BOUSSIBA & RICHMOND, 1980; NAES & POST, 1988; STANCA & POPOVIC, 1996). Neste sentido, muitos trabalhos foram realizados visando a utilização de diversas fontes de nitrogênio para o cultivo de *Arthrospira*, sendo os melhores resultados atribuídos aos nitratos em termos de biomassa produzida (FAINTUCH, 1989; CORNET *et al.* 1998), o que confirma a ampla utilização dos meios de Paoletti (PAOLETTI *et al.*, 1975) e Zarouk (STANCA

& POPOVIC, 1996), que utilizam KNO_3 e NaNO_3 como fonte de nitrogênio, respectivamente.

Faintuch (1989), estudando diferentes fontes de nitrogênio para cultivo de *Arthrospira maxima* por processo descontínuo de cultivo, verificou que a utilização de fontes alternativas de nitrogênio em vez de nitrato, como cloreto de amônio e uréia, foi limitada a baixos níveis de concentração do nutriente, com conseqüente pequena quantidade de biomassa produzida.

Saxena *et al.* (1983), trabalhando com produção de *A. platensis* a partir de águas residuárias domésticas adicionadas de sais, conseguiram bons resultados com uréia a 0,01% como complementação, embora os teores protéicos maiores tenham sido obtidos para a fonte nitrato de sódio 0,1%. Isso poderia ser esperado em função do planejamento executado, que levou ao fornecimento de 3,53 vezes mais nitrogênio (considerando em número de átomos) na complementação realizada com nitrato.

Dao-Lun & Zu-Cheng (2006) observaram o crescimento de *A. platensis* em urina e obtiveram uma biomassa com alto conteúdo de lipídeos (20,43%), com um baixo teor de proteína, o que pôde ser causado pela perda de nitrogênio por evaporação, diminuindo a síntese de aminoácidos e proteínas.

3.5.3 pH

Em cultivos de *Arthrospira*, o pH é uma variável que exerce muita influência no crescimento celular há uma importância maior, pois a forma como a fonte de carbono se apresenta é determinada por esta variável, como se observa na Figura 2: em valores de pH abaixo de 6,0, predomina a forma CO_2 ; em valores de pH entre aproximadamente 6 e 10, predomina a forma HCO_3^- e a forma CO_3^{2-} é predominante em pH acima de 10 e exclusiva em pH acima de 13. Portanto, para obtenção de um determinado pH basta equilibrar as concentrações destes íons; além disso, Miller e Colman (1980) relataram que as cianobactérias assimilam preferencialmente a forma bicarbonato, portanto, o pH ideal de cultivo é aquele em que haja deslocamento do equilíbrio químico no sentido de sua formação.

O pH influencia também na disponibilidade de nitrogênio para a célula, pois em pH abaixo de 8,0 há uma predominância do íon amônio. Em pH acima de 11, o nitrogênio encontra-se na forma não protonada de amônia que é a forma facilmente assimilada pelas células (BOUSSIBA, 1989). Quanto mais alcalino se torna o meio

de cultivo, maior é a quantidade de amônia em relação ao amônio, e, portanto, maior é a perda de amônia por volatilização (Figura 3, baseada na equação de Henderson-Hasselbach).

Figura 3. Porcentagem de Amônia e Amônio em Função do pH.
Fonte: FERREIRA, 2008

3.6 Processo contínuo de cultivo

Como visto no item 3.5.2, a utilização do processo descontínuo se aplica melhor aos cultivos que tem como fonte de nitrogênio os nitratos, principalmente devido ao pH alcalino dos meios de crescimento de *Arthrospira*. Isto porque em pH básico as fontes amoniacais apresentam-se deslocadas para a forma de amônia e, no caso da uréia, esta é hidrolisada liberando amônia no meio de cultivo. Dessa forma, se toda a uréia necessária para atingir maiores concentrações celulares no sistema for colocada no início do processo, poderá ocorrer morte celular devido à liberação excessiva de amônia no meio de cultivo (DANESI *et al.*, 2002).

A utilização do processo contínuo pode contornar esses problemas. É uma técnica muito útil quando se trata de evitar fenômenos de inibição por substrato e de adequar condições operacionais em processos fermentativos.

O processo fermentativo contínuo (Figura 4) é definido como aquele em que a matéria-prima é adicionada ao fermentador com uma vazão constante e o meio fermentado é retirado com a mesma vazão de alimentação. Anteriormente ao desenvolvimento do processo contínuo, o reator pode ser operado por processo

descontínuo ou descontínuo alimentado. Imediatamente após o processo começar a ser alimentado com mosto com a correspondente retirada de meio fermentado, há uma fase de adaptação do microrganismo às condições impostas ao sistema, de forma que nesse período ocorre uma oscilação das concentrações de células, nutrientes e produtos. Esse período é conhecido como regime transiente. No entanto, após esse período de adaptação, há uma tendência da manutenção de concentrações constantes ao longo do tempo, sendo esse período corresponde ao regime estacionário (permanente) (DOIN, 1975).

Figura 4: Esquema de um processo contínuo típico

Modificado de: BADINO JR. *et al.*, 1999

Duas variáveis extremamente importantes no processo fermentativo contínuo são a vazão específica de alimentação (D) e a concentração do nutriente limitante no meio de alimentação, sendo determinantes, por exemplo, para a obtenção de regime permanente no processo, além de afetarem a produtividade e o rendimento do mesmo.

Shi & Weimer (1992) avaliaram o efeito de D na degradação de celulose por *Ruminococcus flavefaciens*, e verificaram que o aumento do valor de D levava a um aumento do consumo de substrato.

Liu & Zajic (1973) estudaram a produção da enzima L-Asparaginase, que possui atividade antitumoral, por *Erwinia aroideae* em fermentação descontínua e contínua. Observaram que a fermentação contínua produz maiores valores de biomassa e enzima com um valor de D de $0,1h^{-1}$, quando comparada com o

processo descontínuo sob as mesmas condições ambientais e mesmo substrato. No entanto, em valores de D maiores observaram-se produtividades menores.

A produção de exopolissacarídeos por *Lactobacillus pentosus* foi avaliada por Sanchez *et. al.*, (2006), mostrando que a produção do polissacarídeo com alto peso molecular em fermentação contínua aumenta se aumenta a velocidade de crescimento, a qual é totalmente dependente de um valor de D baixo. Nessas condições, não havia a produção de polissacarídeo com baixo peso molecular. Por outro lado, em valores de D maiores, havia a produção dos dois tipos de polissacarídeos, com diminuição da produção do polissacarídeo de alto peso molecular.

Como se pode concluir a partir dos trabalhos comentados, o valor da vazão específica de alimentação é um dos fatores de cultivo mais importantes tanto na produção de biomassa como de metabólitos.

No caso da produção de proteína unicelular cultivando a levedura *H. polymorpha* usando metanol como substrato num cultivo contínuo, observou-se a importância de manter a concentração de substrato adequada, pois neste trabalho houve inibição ao atingir a concentração de 6,5g metanol/L no meio de cultivo. Porém, em concentração de 1g/L a taxa de crescimento mostrou ser dependente da concentração de metanol, seguindo a equação do modelo de Monod. Foi demonstrada a inibição de 30% no crescimento deste microorganismo usando formaldeído em concentrações maiores de 0,1g/L, e a inibição total usando 1,7g/L. Quando crescida em ácido fórmico, a levedura apresentou inibição de 20% com 0,11g/L e inibição total com 0,19g/L, embora tenha ocorrido a assimilação do ácido fórmico em ausência de crescimento, quando foi atingida concentração de 0,21g/L (SWARTZ e COONEY, 1981). Assim, pode-se concluir que a concentração de nutriente no meio de cultivo também é um importante fator a ser considerado em cultivos microbianos, especialmente se nesse processo se estiver trabalhando com um nutriente potencialmente tóxico.

A utilização do processo contínuo para o cultivo de *Arthrospira platensis* permitiu a obtenção de resultados bastante satisfatórios com o uso de cloreto de amônio como fonte de nitrogênio (SASSANO *et al.*, 2007), acarretando uma diminuição do custo de produção e uma produtividade da mesma ordem de grandeza que o processo descontínuo. A aplicação do processo contínuo também foi adequada para a redução de alguns componentes com nitrogênio num meio

complexo (detritos de suínos) e simultaneamente produção de biomassa de *A. platensis* (KIM *et al.*, 2000).

Neste trabalho, em particular, é importante a avaliação da vazão específica de alimentação, pois se está trabalhando com um nutriente que leva a um metabólito tóxico (amônia), devendo ser ajustada a melhor combinação do valor de D e da concentração de uréia no meio de alimentação para maximizar a produtividade em células.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismo:

A cepa *Arthrospira platensis* UTEX 1926, classificada como *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* (Nordstedt) por Gomont (SILVA *et al.*, 1996), foi obtida a partir da coleção de culturas da Universidade do Texas.

4.2. Manutenção da *Arthrospira platensis*:

A microalga foi mantida placas de Petri, em meio de cultivo líquido padrão para *Arthrospira* (item 4.3.1) com adição de 2% de ágar.

4.3. Meio de cultivo:

Foi empregado um meio padrão para o cultivo de *Arthrospira* (SCHLÖSSER *et al.*, 1982) - item 4.3.1, com NaNO₃ como fonte de nitrogênio, utilizado para a manutenção do microrganismo e preparo do inóculo; do mesmo modo, modificou-se este meio padrão, onde se utilizou uréia como fonte de nitrogênio e quantidades de bicarbonato e carbonato de sódio, para manter o pH adequado do meio durante o processo contínuo (item 4.3.2).

4.3.1. Meio padrão para cultivo de *A. platensis*:

O meio mineral padrão foi o de Schlösser (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

Onde

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

- Na₂EDTA 750 mg
- FeCl₃.6H₂O 97 mg
- MnCl₂.4H₂O 41 mg
- ZnCl₂ 5 mg
- CoCl₂.6H₂O 2 mg
- Na₂MoO₄.2H₂O 4 mg

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

- Na₂EDTA 50,0 mg
- H₃BO₃ 618,0 mg
- CuSO₄.5H₂O 19,6 mg
- ZnSO₄.7H₂O 44,0 mg
- CoCl₂.6H₂O 20,0 mg
- MnCl₂.4H₂O 12,6 mg
- Na₂MoO₄.2H₂O 12,6 mg

4.3.2. Meio modificado

Modificou-se o meio de Schlösser (SCHLÖSSER, 1982), com substituição do nitrato de sódio por uréia em concentração fixada de acordo com a Tabela 1 (item 4.7). O valor de bicarbonato adicionado foi 14,28g/L e o de carbonato foi 3,18 g/L, não alterando a quantidade de carbono presente no meio de Schlösser, mantendo um pH no meio de entrada entre 9,2 e 9,3.

4.4. Preparo do inóculo e obtenção da concentração de biomassa inicial

Arthrospira platensis, mantida em ágar, foi colhida com auxílio de alça de platina, em condições assépticas, em fluxo laminar, e inoculada em 10mL de meio líquido. Depois de 15 dias, esse material foi utilizado para inocular frascos erlenmeyers de 500 mL, com 200 mL de meio de cultivo padrão (item 4.3.1), previamente autoclavado a 121° C por 20 minutos.

Os frascos erlenmeyers após o repique foram levados a agitador rotativo, a 100min^{-1} (FERRAZ, 1986), temperatura de 30°C e iluminância de 6000 lux (CARVALHO *et al.*, 2004), fornecida por 6 lâmpadas fluorescentes de 40Watts, dispostas a uma distância de 30cm dos frascos.

O crescimento celular foi acompanhado, sendo utilizada para inóculo uma suspensão de *A. platensis* após 8 a 10 dias de cultivo (PELIZER *et al.*, 2003), em crescimento exponencial, isenta de contaminação. Essa suspensão foi filtrada, lavada com solução fisiológica para retirada do NaNO_3 e ressuspensa em meio de cultivo padrão isento de NaNO_3 . Esta suspensão foi o inóculo para o cultivo em reator cilíndrico, onde foram realizados os estudos da influência dos parâmetros concentração de uréia no meio de alimentação e vazão específica de alimentação no cultivo *Arthrospira platensis*.

A concentração celular inicial (em massa seca) foi fixada em 400 mg/L (SOLETTO *et al.*, 2005) e o cultivo foi alimentado diariamente com uma solução de uréia 0,145 mM até que a concentração celular atingisse o valor desejado para início do processo contínuo.

4.5. Dispositivo para cultura e condições de cultivo

Adotou-se um tanque vertical, construído de vidro, que possibilite a obtenção de homogeneidade (Figura 5). A movimentação da cultura foi executada por 3 agitadores tipo turbina, numa frequência de 140 rotações por minuto, sendo a iluminação de 9 klux (SASSANO *et al.*, 2007). Uma bomba peristáltica foi utilizada para a alimentação de meio de cultivo, bem como para retirada de meio em processo de cultivo. O volume do tanque foi de 9 L e foi mantido constante através 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 reator, garantindo a altura da coluna de líquido nele contida.

Figura 5: Biorreator empregado no cultivo contínuo de *A. Platensis*

4.6. Técnicas Analíticas

Os experimentos foram acompanhados por técnicas analíticas descritas a seguir:

4.6.1. Acompanhamento do cultivo

4.6.1.1. Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada diariamente por turbidimetria, a 560nm (LEDUY & THERIEN, 1977). Os valores de transmitância obtidos no espectrofotômetro foram convertidas em concentração celular através de uma curva de calibração.

4.6.1.1.1. Construção da curva de calibração para determinação da concentração celular

A curva de calibração foi obtida tomando-se um volume de 25 mL de uma suspensão concentrada, de células em fase de crescimento exponencial, que foi filtrado e lavado, com água destilada, em uma membrana de acetato de celulose de 1,2 μm , previamente seca a 70° C por 12 h, e previamente

pesada. A amostra foi levada à estufa à 100 - 105° C por um período de 5 h, suficiente para que mantivesse uma massa constante. A massa das células foi calculada por diferença dos valores das massas das membranas antes e depois da filtração, e dividido pelo volume filtrado para obter-se a concentração celular na suspensão. A partir desta mesma suspensão, foram preparadas diferentes diluições, e alíquotas dessas diluições foram levadas ao espectrofotômetro para leitura da transmitância a 560nm de comprimento de onda e caminho óptico de 1cm, com água destilada como branco. Obteve-se, dessa forma, uma curva que relaciona concentração celular com o logaritmo da transmitância.

4.6.1.2. Determinação da concentração de amônia total

Para acompanhar os níveis de amônia no processo, foram realizadas medidas em dias alternados, na fase líquida do meio em cultivo, adotando-se um eletrodo seletivo para amônia conectado a um potenciômetro ORION, modelo 710A. Tendo em vista que o eletrodo só é sensível ao íon amônia, e que no pH de cultivo existe equilíbrio entre os íons amônia e amônio, para se fazer a leitura, foi necessário elevar o pH da amostra, adicionando-se solução de NaOH, para deslocamento do equilíbrio, de forma que todo íon amônio fosse convertido em amônia (LEDUY & SAMSON, 1982).

Neste procedimento foi necessária a calibração do aparelho em todos os dias em que foram realizadas as determinações. Isso era feito através da construção de uma curva que correlaciona a milivoltagem lida no potenciômetro com soluções de NH_4Cl , em diferentes diluições, com concentrações conhecidas. A partir da equação dessa curva, com a milivoltagem lida na amostra do cultivo, era calculada a concentração de amônia total.

4.6.1.3 – Determinação da concentração de uréia

Para a determinação da concentração de uréia, inicialmente a amostra 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 obteve 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 (item 4.6.1.2). Considerando ainda a diluição da amostra, podemos calcular a concentração de amônia global, que representa a amônia 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.

4.6.1.4 – Determinação da concentração de carbonato total

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

4.6.1 5. Determinação do pH

O pH foi acompanhado, diariamente, por potenciometria, com um aparelho da marca Metler Toledo.

4.6.2. Avaliação da biomassa obtida

Ao final do cultivo, o volume retirado contendo a *Arthrospira platensis* foi centrifugado, lavado com água destilada para remoção do sal adsorvido às células e seco com ventilação a 55 °C por 12 horas (PELIZER *et al.*,

1999); após a separação foi avaliado o teor de proteína e de lipídio da biomassa.

4.6.2.1. Lipídeos totais

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

4.6.2.2. Proteínas totais

O teor protéico total na biomassa seca foi determinado pelo clássico método de KJELDAHL, adotando-se o fator de 6,25 para a conversão a partir dos teores de nitrogênio total (OFFICIAL METHODS OF FOOD ANALYSIS, 1984). Para isso, empregou-se a amostra desengordurada, resultante da análise de lipídeos totais, seca e pulverizada. A amostra foi digerida em meio ácido, com adição de catalisador, em bloco digestor a 350 °C até que o material se apresentasse límpido. Em seguida, a amostra foi levada a um destilador de nitrogênio, adicionando hidróxido de sódio 60%, e recuperando o nitrogênio, na forma amoniacal, em solução saturada de ácido bórico. Esse material foi titulado com HCl 0,02 N, possibilitando o cálculo da porcentagem de proteína na biomassa seca.

4.7. Planejamento experimental

Os valores da concentração de uréia no meio de alimentação e a velocidade específica de alimentação foram selecionados de acordo com Sassano *et al.* (2007). A matriz de ensaio dos experimentos é apresentada na Tabela 1.

Foi considerado regime permanente quando a concentração celular teve seu valor inalterado por pelo menos 7 dias (SASSANO *et al.*, 2007).

Tabela 1: Matriz de ensaio

Número do experimento	N ₀ ^a (mM)	D ^b (d ⁻¹)
1	5	0,04
2	5	0,08
3	5	0,12
4	5	0,16
5	5	0,32
6	0,5	0,08
7	0,5	0,12
8	0,5	0,16
9	0,5	0,24
10	0,5	0,32
11	0,5	0,4
12	0,5	0,44

^a Concentração de uréia no meio de alimentação

^b Vazão específica de alimentação

5. RESULTADOS

5.1 Verificação da homogeneidade

Tendo em vista que os balanços materiais do quimiostato são válidos apenas para reatores homogêneos (SASSANO, 2004), realizaram-se testes para determinar se as condições do cultivo são adequadas para obter homogeneidade no biorreator. Estes testes foram feitos de acordo com o método descrito por Koshimizu *et al.* (1983), onde se emprega a técnica do arraste do biorreator (wash-out) de uma suspensão microbiana em água destilada, por meio da entrada de água destilada e correspondente saída da suspensão celular. Quando o biorreator trabalha sob condições homogêneas, a queda da concentração da suspensão celular é exponencial, confirmando a homogeneidade do sistema; esta queda da concentração pode ser observada na Figura 6.

Figura 6 Concentração celular (X) em função do tempo segundo o método de “wash-out”

Aplicando logaritmo neperiano aos valores das concentrações celulares ao longo do processo, pode obter-se a taxa de diluição deste sistema, denominada D em processos contínuos de cultivos celulares, a qual é igual ao valor da inclinação da reta obtida nesta função. Os resultados obtidos no teste de homogeneidade são

apresentados na Tabela 2, enquanto que a relação entre o logaritmo neperiano da concentração celular e o tempo de diluição do sistema é apresentada na Figura 7.

Tabela 2. Concentração celular, logaritmo neperiano da concentração celular e valores da vazão de diluição em função do tempo.

t (h)	X (mg/L)	lnX	D= F/V (h ⁻¹)
0	862,59	6,760	0,0096
22	697,48	6,547	0,0084
45	575,36	6,355	0,0081
67	445,94	6,100	0,0087
74	404,47	6,003	0,0089
91	392,19	5,972	0,0087
98	384,77	5,953	0,0100
115	308,82	5,733	0,0083
122	292,92	5,680	0,0083
140	273,55	5,611	0,0081

Figura 7. Relação do logaritmo neperiano da concentração celular ($\ln X$) em função do tempo.

Na Figura 7 se obteve um valor de $r^2=0.9822$, indicando a linearidade dos dados e, por conseguinte a homogeneidade do sistema, pois a perda da biomassa no reator foi exponencial em relação ao tempo. Para confirmar se o processo é homogêneo ou não, comparou-se a média dos valores medidos da taxa de diluição apresentados na Tabela 2 (0,0087) com o valor obtido no gráfico (0,0084), sendo calculada a diferença percentual em 3,6%. Dessa forma o reator foi considerado homogêneo.

5.2 Curva de calibração para determinação de concentração celular

A determinação da concentração celular ao longo das diferentes fases do cultivo foi realizada por meio de uma curva de calibração espectrofotométrica, que correlaciona o logaritmo da transmitância com um valor de concentração celular, em miligramas por litro (RODRIGUES, 2008). Esta curva pode ser observada na Figura 8.

Figura 8. Curva de calibração para determinação da concentração celular (X) de suspensões de *S. platensis*.

5.3 Curvas de crescimento e determinação das condições de alimentação

Foram realizados dois cultivos com meio Schlösser padrão (Figuras 9 e 10), para calcular a produtividade em células, determinar a demanda diária de nitrogênio e definir os valores de uréia necessários durante o processo descontínuo alimentado, para atingir a concentração celular que permita o início do processo contínuo. Para isso, foi dividido o valor da biomassa total produzida (X_T) pelo correspondente tempo de cultivo. O valor de X_T corresponde à subtração do valor final de concentração de biomassa (X_f) pelo valor da concentração inicial (X_i). Em 16 dias, o cultivo A (Figura 9) apresentou um valor médio de formação de biomassa ($X_f - X_i$) de 818 mg/L; para o cultivo B (Figura 10) se obteve após 14 dias de cultivo uma biomassa final de 874 mg/L.

Considera-se que o conteúdo de nitrogênio para esta cianobactéria atinge entre 7-10% da biomassa seca total (GOLDMAN et al., 1982; CORNET et al., 1992). Ferreira (2008) determinou que para a alimentação do cultivo de *Arthrospira*, a adição de nitrogênio correspondente a 7% do valor total da biomassa é adequada, enquanto que a adição correspondente a 10% do valor total da biomassa leva a

níveis de amônia inibitórios. De tal modo, para determinar a concentração de nitrogênio necessária tomaram-se as produtividades dos cultivos A e B, $51 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e $62,4 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ respectivamente, obtendo uma produtividade média de $56,7 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. A partir deste resultado se obteve um valor de adição de nitrogênio de $3,97 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$; se é tido em conta que por cada mol de uréia adicionada são fornecidos dois mols de nitrogênio, então o valor de adição de uréia diário é de $8,51 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, ou $0,142 \text{ mM}.\text{dia}^{-1}$, levando potencialmente a valores de concentração de amônia diários inferiores àquele considerado inibitório por Carvalho *et al* (2004), sendo este cerca de 6 mM. Nota-se também nas curvas padrão que a velocidade de crescimento foi praticamente constante durante todo o processo de cultivo celular, o que indica que a demanda por nitrogênio praticamente não foi afetada ao longo do tempo, independentemente da concentração celular no reator, como uma consequência da permanente queda da velocidade específica de crescimento celular desde o início do cultivo (DANESI *et al.*, 2002)

Figura 9: Curva de crescimento de *A. platensis* em meio com nitrato de sódio como fonte de nitrogênio (A)

Figura 10: Curva de crescimento de *A. platensis* em meio com nitrato de sódio como fonte de nitrogênio (B)

Nos ensaios realizados se obteve um aumento gradual no valor de pH ao longo do processo, atingindo um valor final de 10,2 e 10,3, desacelerando o crescimento a partir do dia 14 e 15. Resultados similares também foram observados por Bezerra (2006), o que se faz supor algo comum no cultivo de *Arthrospira*, pois o consumo de bicarbonato causa um aumento gradual do pH, deslocando o equilíbrio para a formação de compostos mais alcalinos, como carbonato (PELIZER *et al.*, 2003). No entanto, este aumento nos valores de pH atua como um auto-inibidor do crescimento celular (JIMENEZ *et al.*, 2003), já que, segundo Russel (1982), acima de pH 10,2 a principal fonte presente no meio é carbonato, derivado da quebra no equilíbrio químico da formação do bicarbonato no meio de cultura (MILLER & COLMAN, 1980). Também no processo contínuo o consumo da fonte de carbono para o crescimento celular levaria a um aumento do pH, de forma que o valor de pH inicial do meio de Schlosser (aproximadamente 9,6) poderia levar a valores de pH excessivamente alcalinos, considerados inibitórios para o crescimento celular

5.4 Resultados dos cultivos 1 a 12

Os resultados relativos aos acompanhamentos dos ensaios são apresentados nas Tabelas 3 a 12. Após as respectivas tabelas para cada ensaio, apresentam-se as correspondentes figuras de concentração celular e pH em função do tempo (Figuras 11 a 22).

Tabela 3: Resultados referentes ao experimento 1: Cultivo contínuo de *A. platensis* com meio de alimentação contendo 5mmol.L^{-1} (N_0) de uréia, sob uma vazão específica de alimentação (D) de $0,04\text{ dia}^{-1}$

Tempo (dias)	Processo de cultivo	F ^a (mL.min ⁻¹)	X ^b (mg.L ⁻¹)	pH	N ^c (mmol.L ⁻¹)	Coloração do cultivo
0	D.A	-	484	9,9	-	verde típico
1	D.A	-	535	9,9	-	verde típico
2	D.A	-	656	10,0	-	verde típico
3	D.A	-	719	9,8	-	verde típico
4	D.A	-	867	9,6	-	verde típico
5	D.A	-	931	9,7	-	verde típico
6	P.C	0,25	745	9,8	0,103	verde típico
7	P.C	0,25	830	9,8	-	verde claro
8	P.C	0,25	808	9,9	0,085	verde claro
9	P.C	0,25	868	9,9	-	verde claro
10	P.C	0,24	868	10,0	0,076	verde claro
11	P.C	0,24	1091	10,1	-	verde claro
12	P.C	0,24	1090	10,1	0,084	verde claro
13	P.C	0,24	1141	10,1	-	verde típico
14	P.C	0,23	1326	10,2	0,086	verde típico
15	P.C	0,25	1386	10,2	0,197	verde típico
16	P.C	0,25	1424	10,3	-	verde típico
17	P.C	0,25	1422	10,3	0,870	verde típico
18	P.C	0,25	1412	10,3	-	verde típico
19	P.C	0,25	1392	10,3	0,131	verde típico
20	P.C	0,25	1422	10,4	-	verde típico
21	P.C	0,25	1396	10,3	0,183	verde típico
22	P.C	0,24	1437	10,3	-	verde típico

^a Vazão de alimentação

^b Concentração celular expressa em massa seca

^c Concentração de uréia na fase líquida do biorreator

D.A: Processo descontínuo alimentado com uréia, como fase de obtenção de biomassa

P.C: Processo contínuo

- : Leitura não realizada

Figura 11. Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio 1 ($N_0=5\text{mmol.L}^{-1}$; $D=0.04\text{ dia}^{-1}$). O processo contínuo iniciou em $t=6$ dias

Tabela 4: Resultados referentes ao experimento 2: Cultivo contínuo de *A. platensis* com meio de alimentação contendo 5mmol.L^{-1} (N_0) de uréia, sob uma vazão específica de alimentação (D) de $0,08\text{ dia}^{-1}$

Tempo (dias)	Processo de cultivo	F^a (mL.min^{-1})	X^b (mg.L^{-1})	pH	N^c (mmol.L^{-1})	Coloração do cultivo
0	D.A	-	434	9,6	-	verde típico
1	D.A	-	569	9,6	-	verde típico
2	D.A	-	690	9,6	-	verde típico
3	D.A	-	798	9,7	-	verde típico
4	D.A	-	884	9,8	-	verde típico
5	P.C	0,5	945	9,7	-	verde típico
6	P.C	0,5	881	9,7	0,301	verde típico
7	P.C	0,5	949	9,8	-	verde típico
8	P.C	0,52	1062	9,7	0,117	verde típico
9	P.C	0,52	1061	9,8	-	verde típico
10	P.C	0,5	1130	9,9	0,119	verde típico
11	P.C	0,5	1062	9,8	-	verde típico
12	P.C	0,48	1209	9,8	0,077	verde típico
13	P.C	0,5	1229	9,8	-	verde típico
14	P.C	0,5	1222	9,9	0,060	verde típico
15	P.C	0,5	1214	9,9	-	verde típico
16	P.C	0,49	1248	9,9	0,064	verde típico
17	P.C	0,49	1262	9,9	-	verde típico
18	P.C	0,5	1261	9,9	0,058	verde típico

^a Vazão de alimentação

^b Concentração celular expressa em massa seca

^c Concentração de uréia na fase líquida do biorreator

D.A: Processo descontínuo alimentado com uréia, como fase de obtenção de biomassa

P.C: Processo contínuo

- : Leitura não realizada

Figura 12. Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio 2 ($N_0=5\text{mmol.L}^{-1}$; $D=0.08\text{ dia}^{-1}$). O processo contínuo iniciou em $t=5$ dias

Tabela 5: Resultados referentes ao experimento 3: Cultivo contínuo de *A. platensis* com meio de alimentação contendo 5mmol.L^{-1} (N_0) de uréia, sob uma vazão específica de alimentação (D) de $0,12\text{ dia}^{-1}$

Tempo (dias)	Processo de cultivo	F^a (mL.min^{-1})	X^b (mg.L^{-1})	pH	N^c (mmol.L^{-1})	Coloração do cultivo
0	D.A	-	412	9,7	-	verde típico
1	D.A	-	540	9,8	-	verde típico
2	D.A	-	662	9,9	-	verde típico
3	D.A	-	673	9,9	-	verde típico
4	D.A	-	718	9,8	-	verde típico
5	D.A	0,75	762	9,7	-	verde típico
6	P.C	0,75	885	9,8	0,364	verde típico
7	P.C	0,74	965	10,0	-	verde típico
8	P.C	0,74	1059	10,0	0,317	verde típico
9	P.C	0,75	1133	10,1	-	verde típico
10	P.C	0,75	983	10,1	0,297	verde típico
11	P.C	0,75	1076	10,0	-	verde típico
12	P.C	0,72	1205	10,0	0,242	verde típico
13	P.C	0,69	1208	10,0	-	verde típico
14	P.C	0,72	1243	10,0	0,212	verde típico
15	P.C	0,73	1227	10,0	-	verde típico
16	P.C	0,73	1259	10,0	0,224	verde típico
17	P.C	0,74	1243	10,0	-	verde típico
18	P.C	0,74	1259	10,0	0,229	verde típico

^a Vazão de alimentação

^b Concentração celular expressa em massa seca

^c Concentração de uréia na fase líquida do biorreator

D.A: Processo descontínuo alimentado com uréia, como fase de obtenção de biomassa

P.C: Processo contínuo

- : Leitura não realizada

Figura 13. Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio 3 ($N_0=5\text{mmol.L}^{-1}$; $D=0.12\text{ dia}^{-1}$). O processo contínuo iniciou em $t=6$ dias

Tabela 6: Resultados referentes ao experimento 4: Cultivo contínuo de *A. platensis* com meio de alimentação contendo 5mmol.L^{-1} (N_0) de uréia, sob uma vazão específica de alimentação (D) de $0,16\text{ dia}^{-1}$

Tempo (dias)	Processo de cultivo	F ^a (mL.min^{-1})	X ^b (mg.L^{-1})	pH	N ^c (mmol.L^{-1})	Coloração do cultivo
0	D.A	-	344	9,8	-	verde típico
1	D.A	-	509	9,9	-	verde típico
2	D.A	-	548	10,0	-	verde típico
3	D.A	-	688	9,8	-	verde típico
4	D.A	-	788	9,8	-	verde típico
5	D.A	-	907	9,6	-	verde típico
6	P.C	1	898	9,5	-	verde típico
7	P.C	1	827	9,6	0,062	verde típico
8	P.C	1	1117	9,5	-	verde típico
9	P.C	0,98	1076	9,6	0,059	verde típico
10	P.C	0,98	1064	9,5	-	verde típico
11	P.C	0,95	1058	9,6	*	verde típico
12	P.C	0,95	1070	9,7	-	verde típico
13	P.C	0,95	1022	9,7	*	verde típico
14	P.C	0,95	953	9,7	-	verde típico
15	P.C	1	960	9,7	*	verde claro
16	P.C	1	865	9,7	-	verde claro
17	P.C	1	866	9,7	*	verde claro
18	P.C	1	907	9,8	-	verde claro
20	P.C	1	795	9,8	*	verde claro
22	P.C	0,94	599	9,7	-	verde amarelado
25	P.C	0,94	462	9,7	*	verde amarelado
27	P.C	0,94	300	9,7	-	verde amarelado
29	P.C	0,94	156	9,7	*	verde amarelado

a Vazão de alimentação

b Concentração celular expressa em massa seca

c Concentração de uréia na fase líquida do biorreator

D.A: Processo descontínuo alimentado com uréia, como fase de obtenção de biomassa

P.C: Processo contínuo

- : Leitura não realizada

* Valor não detectável pela metodologia

Figura 14. Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio 4 ($N_0=5\text{mmol.L}^{-1}$; $D=0.16\text{ dia}^{-1}$). O processo contínuo iniciou em $t=6$ dias

Tabela 7: Resultados referentes ao experimento 5: Cultivo contínuo de *A. platensis* com meio de alimentação contendo 5 mmol.L⁻¹ (N₀) de uréia, sob uma vazão específica de alimentação (D) de 0,32 dia⁻¹

Tempo (dias)	Processo de cultivo	F ^a (mL.min ⁻¹)	X ^b (mg.L ⁻¹)	pH	N ^c (mmol.L ⁻¹)	Coloração do cultivo
0	D.A	0	418	9,4	-	verde típico
1	D.A	0	434	9,5	-	verde típico
2	D.A	0	550	9,6	-	verde típico
3	D.A	0	648	9,7	-	verde típico
4	D.A	0	742	9,9	-	verde típico
5	D.A	0	911	10,0	-	verde típico
6	P.C	1,9	974	10,0	0,151	verde típico
7	P.C	1,9	1035	10,0	-	verde típico
8	P.C	1,8	1058	9,8	0,209	verde típico
9	P.C	1,8	1096	9,7	-	verde típico
10	P.C	1,8	913	9,7	0,089	verde típico
11	P.C	1,9	829	9,7	-	verde típico
12	P.C	1,8	761	9,7	*	verde típico
13	P.C	1,8	691	9,7	-	verde típico
14	P.C	2	615	9,7	*	verde claro
15	P.C	2	607	9,6	-	verde claro
16	P.C	1,8	568	9,6	*	verde claro
17	P.C	1,8	531	9,7	-	verde claro
18	P.C	1,8	478	9,6	*	verde claro
19	P.C	2	409	9,7	-	verde claro
20	P.C	2	339	9,7	*	verde claro
21	P.C	2,1	261	9,7	-	verde claro
22	P.C	2	188	9,7	*	verde amarelado
23	P.C	2	153	9,7	-	verde amarelado
24	P.C	1,8	120	9,7	*	verde amarelado
25	P.C	1,8	75	9,7	-	verde amarelado
26	P.C	1,8	70	9,7	*	verde amarelado

a Vazão de alimentação

b Concentração celular expressa em massa seca

c Concentração de uréia na fase líquida do biorreator

D.A: Processo descontínuo alimentado com uréia, como fase de obtenção de biomassa

P.C: Processo contínuo

- : Leitura não realizada

* Valor não detectável pela metodologia

Figura 15. Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio 5 ($N_0=5\text{mmol.L}^{-1}$; $D=0.32\text{ dia}^{-1}$). O processo contínuo iniciou em $t=6$ dias

Tabela 8: Resultados referentes ao experimento 6: Cultivo contínuo de *A. platensis* com meio de alimentação contendo 0,5 mmol.L⁻¹ (N₀) de uréia, sob uma vazão específica de alimentação (D) de 0,08 dia⁻¹

Tempo (dias)	Processo de cultivo	F ^a (mL.min ⁻¹)	X ^b (mg.L ⁻¹)	pH	N ^c (mmol.L ⁻¹)	Coloração do cultivo
0	D.A	-	407	10,1		verde típico
1	D.A	-	473	10,1		verde típico
2	D.A	-	582	10,1		verde típico
3	D.A	-	608	10,3		verde típico
4	D.A	-	778	10,4		verde típico
5	D.A	-	892	10,5		verde típico
6	D.A	-	993	10,6		verde típico
7	P.C	0.5	996	10,6	0,00953	verde típico
8	P.C	0.5	879	10,5		verde típico
9	P.C	0.5	1015	10,4	0,00759	verde típico
10	P.C	0.5	766	10,6		verde típico
11	P.C	0.5	818	10,3	0,01034	verde típico
12	P.C	0.5	995	10,4		verde típico
13	P.C	0.45	736	10,4	0,00685	verde claro
14	P.C	0.45	751	10,4		verde claro
15	P.C	0,5	574	10,3	0,00215	verde claro
16	P.C	0,4	576	10,5		verde claro
17	P.C	0,4	485	10,4	0,00103	verde claro
18	P.C	0,4	479	10,3		verde claro
19	P.C	0.5	658	10,3	0,00156	verde claro
20	P.C	0,5	757	10,3		verde claro
21	P.C	0,4	773	10,3	0,00116	verde claro
22	P.C	0,4	807	10,2		verde claro
23	P.C	0,4	724	10,2	0,00036	verde claro
24	P.C	0.5	683	10,2		verde amarelado
25	P.C	0.5	678	10,1	0,00006	verde amarelado
26	P.C	0.5	640	10,1		verde amarelado
27	P.C	0.5	658	10,1	0,00005	verde amarelado
28	P.C	0.5	698	10,1		verde amarelado
29	P.C	0,5	710	10,1	0,00004	verde amarelado

a Vazão de alimentação

b Concentração celular expressa em massa seca

c Concentração de uréia na fase líquida do biorreator

D.A: Processo descontínuo alimentado com uréia, como fase de obtenção de biomassa

P.C: Processo contínuo

- : Leitura não realizada

Figura 16. Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio 6 ($N_0=0,5$ mmol.L⁻¹; $D=0.08$ dia⁻¹). O processo contínuo iniciou em $t=6$ dias

Tabela 9: Resultados referentes ao experimento 7: Cultivo contínuo de *A. platensis* com meio de alimentação contendo 0,5mmol.L⁻¹ (N₀) de uréia, sob uma vazão específica de alimentação (D) de 0,12 dia⁻¹

Tempo (dias)	Tipo de Processo	F ^a (mL.min ⁻¹)	X ^b (mg.L ⁻¹)	pH	N ^d (mmol.L ⁻¹)	Coloração do cultivo
0	D.A	0.75	421	10.0		verde típico
1	D.A	0.75	587	10.0		verde típico
2	D.A	0.75	685	10.1		verde típico
3	D.A	0.75	779	10.3		verde típico
4	D.A	0.75	914	10.1		verde típico
5	P.C	0.75	740	9.9	0.0292	verde típico
6	P.C	0.70	840	9.9		verde típico
7	P.C	0.73	796	9.9	0.0410	verde claro
8	P.C	0.75	653	9.9		verde claro
9	P.C	0.70	769	9.9	0.0263	verde claro
10	P.C	0.70	754	9.8		verde claro
11	P.C	0.75	679	10.1	0.0443	verde claro
12	P.C	0.70	654	10.1		verde claro
13	P.C	0.76	673	10.1	0.0591	verde claro
14	P.C	0.68	685	10.0		verde claro
15	P.C	0.70	655	10.0	0.0664	verde claro
16	P.C	0.70	642	10.0		verde claro
17	P.C	0.70	668	10.0	0.0848	verde claro
18	P.C	0.70	602	9.9		verde claro
19	P.C	0.70	616	9.9	0.0219	verde claro
20	P.C	0.70	648	9.9		verde claro

^a Vazão de alimentação

^b Concentração celular expressa em massa seca

^c Concentração de uréia na fase líquida do biorreator

D.A: Processo descontínuo alimentado com uréia, como fase de obtenção de biomassa

P.C: Processo contínuo

- : Leitura não realizada

Figura 17. Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio 7 ($N_0=0,5\text{mmol.L}^{-1}$; $D=0.12\text{ dia}^{-1}$). O processo contínuo iniciou em $t=5$ dias

Tabela 10: Resultados referentes ao experimento 8: Cultivo contínuo de *A. platensis* com meio de alimentação contendo $0,5\text{mmol.L}^{-1}$ (N_0) de uréia, sob uma vazão específica de alimentação (D) de $0,16\text{ dia}^{-1}$

Tempo (dias)	Tipo de Processo	F ^a (mL.min^{-1})	X ^b (mg.L^{-1})	pH	N ^c (mmol.L^{-1})	Coloração do cultivo
0	D.A	-	410	10.0		verde típico
1	D.A	-	581	10.0		verde típico
2	D.A	-	679	10.1		verde típico
3	D.A	-	795	10.2		verde típico
4	D.A	-	906	10.0		verde típico
5	P.C	-	686	9.9	0.0705	verde típico
6	P.C	1.00	746	9.9		verde típico
7	P.C	1.00	960	9.8	0.0364	verde claro
8	P.C	1.00	700	9.8		verde claro
9	P.C	1.00	691	9.8	0.0268	verde claro
10	P.C	0.87	715	9.8		verde claro
11	P.C	1.00	734	10.1	0.0410	verde claro
12	P.C	0.90	731	10.0		verde claro
13	P.C	0.71	708	10.0	0.0589	verde claro
14	P.C	1.04	631	10.0		verde claro
15	P.C	1.00	616	10.0	0.0580	verde claro
16	P.C	1.10	619	9.9		verde claro
17	P.C	0.88	639	9.9	0.0593	verde claro
18	P.C	1.00	646	9.9		verde claro
19	P.C	1.00	613	9.9	0.0593	verde claro
20	P.C	1.00	605	9.9		verde claro
21	P.C	1.00	629	9.9	0.0590	verde claro

^a Vazão de alimentação

^b Concentração celular expressa em massa seca

^c Concentração de uréia na fase líquida do biorreator

D.A: Processo descontínuo alimentado com uréia, como fase de obtenção de biomassa

P.C: Processo contínuo

- : Leitura não realizada

Figura 18. Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio 8 ($N_0=0,5\text{mmol.L}^{-1}$; $D=0.16\text{ dia}^{-1}$) O processo contínuo iniciou em $t=5$ dias

Tabela 11: Resultados referentes ao experimento 9: Cultivo contínuo de *A. platensis* com meio de alimentação contendo $0,5\text{mmol.L}^{-1}$ (N_0) de uréia, sob uma vazão específica de alimentação (D) de $0,24\text{ dia}^{-1}$

Tempo (dias)	Tipo de Processo	F^a (mL.min^{-1})	X^b (mg.L^{-1})	pH	N^c (mmol.L^{-1})	Coloração do cultivo
0	D.A	-	393	9.4	-	verde típico
1	D.A	-	450	9.4	-	verde típico
2	D.A	-	587	9.6	-	verde típico
3	D.A	-	726	9.8	-	verde típico
4	D.A	1.44	895	9.9	-	verde típico
5	P.C	1.44	693	9.7	0.0493	verde típico
6	P.C	1.50	615	9.8	-	verde típico
7	P.C	1.47	602	9.7	0.0586	verde típico
8	P.C	1.52	571	9.8	-	verde típico
9	P.C	1.50	562	9.7	0.0639	verde típico
10	P.C	1.53	560	9.8	-	verde típico
11	P.C	1.50	584	9.8	0.0692	verde típico
12	P.C	1.51	521	9.8	-	verde típico
13	P.C	1.42	481	9.8	0.0647	verde típico
14	P.C	0.00	484	9.8	-	verde claro
15	P.C	0.00	502	9.8	0.0746	verde claro
16	P.C	1.48	473	9.8	-	verde claro
17	P.C	1.48	465	9.8	0.0720	verde claro
18	P.C	1.48	467	9.8	-	verde claro
19	P.C	1.50	455	9.7	-	verde claro

^a Vazão de alimentação

^b Concentração celular expressa em massa seca

^c Concentração de uréia na fase líquida do biorreator

D.A: Processo descontínuo alimentado com uréia, como fase de obtenção de biomassa

P.C: Processo contínuo

- : Leitura não realizada

Figura 19. Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio 9 ($N_0=0,5$ mmol.L⁻¹; $D=0.24$ dia⁻¹). O processo contínuo iniciou em $t=5$ dias

Tabela 12: Resultados referentes ao experimento 10: Cultivo contínuo de *A. platensis* com meio de alimentação contendo $0,5\text{mmol.L}^{-1}$ (N_0) de uréia, sob uma vazão específica de alimentação (D) de $0,32\text{ dia}^{-1}$

Tempo (dias)	Tipo de Processo	F ^a (mL.min^{-1})	X ^b (mg.L^{-1})	pH	N ^c (mmol.L^{-1})	Coloração do cultivo
0	D.A	-	418	9.6	-	verde típico
1	D.A	-	547	9.6	-	verde típico
2	D.A	-	572	9.7	-	verde típico
3	D.A	-	650	9.8	-	verde típico
4	D.A	-	771	9.8	-	verde típico
5	D.A	-	858	9.9	-	verde típico
6	D.A	2.00	903	10.0	-	verde típico
7	P.C	2.00	961	10.1	-	verde típico
8	P.C	2.00	826	9.8	-	verde típico
9	P.C	1.90	684	9.9	0.0567	verde típico
10	P.C	1.90	592	9.8	-	verde típico
11	P.C	1.90	503	9.8	0.0559	verde típico
12	P.C	1.95	447	9.9	-	verde típico
13	P.C	1.92	548	9.8	0.0315	verde típico
14	P.C	2.00	521	9.8	-	verde típico
15	P.C	2.00	561	9.5	0.0461	verde típico
16	P.C	2.00	413	9.6	-	verde típico
17	P.C	2.00	400	9.6	0.0543	verde típico
18	P.C	1.90	423	9.5	-	verde claro
19	P.C	1.83	394	9.5	0.0246	verde claro
20	P.C	1.90	442	9.5	-	verde claro
21	P.C	1.95	422	9.5	0.0209	verde claro
22	P.C	2.10	422	9.5	-	verde claro
23	P.C	2.00	400	9.5	0.0636	verde claro

a Vazão de alimentação

b Concentração celular expressa em massa seca

c Concentração de uréia na fase líquida do biorreator

D.A: Processo descontínuo alimentado com uréia, como fase de obtenção de biomassa

P.C: Processo contínuo

- : Leitura não realizada

Figura 20. Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio 10 ($N_0=0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$; $D=0.32 \text{ dia}^{-1}$). O processo contínuo iniciou em $t=7$ dias.

Tabela 13: Resultados referentes ao experimento 11: Cultivo contínuo de *A. platensis* com meio de alimentação contendo 0,5mmol.L⁻¹ (N₀) de uréia, sob uma vazão específica de alimentação (D) de 0,4 dia⁻¹

Tempo (dias)	Tipo de Processo	F ^a (mL.min ⁻¹)	X ^b (mg.L ⁻¹)	pH	N ^c (mmol.L ⁻¹)	Coloração do cultivo
0	D.A	-	356	9,4	-	verde típico
1	D.A	-	578	9,6	-	verde típico
2	D.A	-	653	9,7	-	verde típico
3	D.A	-	685	9,8	-	verde típico
4	D.A	-	771	9,8	-	verde típico
5	D.A	-	966	10,0	-	verde típico
6	D.A	2,50	1049	10,0	-	verde típico
7	P.C	2,36	767	10,0	-	verde típico
8	P.C	2,40	626	9,9	0,0656	verde típico
9	P.C	2,40	577	9,9	-	verde típico
10	P.C	2,30	548	9,9	0,0653	verde típico
11	P.C	2,30	527	9,8	-	verde típico
12	P.C	2,33	414	9,8	0,0390	verde típico
13	P.C	2,30	420	9,7	-	verde típico
14	P.C	2,30	431	9,7	0,0550	verde típico
15	P.C	2,40	391	9,7	-	verde típico
16	P.C	2,40	392	9,8	0,0557	verde típico
17	P.C	2,40	448	9,8	-	verde típico
18	P.C	2,40	432	9,8	0,0518	verde típico
19	P.C	2,40	443	9,8	-	verde típico

a Vazão de alimentação

b Concentração celular expressa em massa seca

c Concentração de uréia na fase líquida do biorreator

D.A: Processo descontínuo alimentado com uréia, como fase de obtenção de biomassa

P.C: Processo contínuo

- : Leitura não realizada

Figura 21. Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio 11 ($N_0=0,5$ mmol.L⁻¹; $D=0.4$ dia⁻¹). O processo contínuo iniciou em $t=6$ dias.

Tabela 14: Resultados referentes ao experimento 12: Cultivo contínuo de *A. platensis* com meio de alimentação contendo $0,5\text{mmol.L}^{-1}$ (N_0) de uréia, sob uma vazão específica de alimentação (D) de $0,4\text{ dia}^{-1}$

Tempo (dias)	Tipo de Processo	F^a (mL.min^{-1})	X^b (mg.L^{-1})	pH	N^c (mmol.L^{-1})	Coloração do cultivo
0	D.A		361	9,4		verde típico
1	D.A		512	9,6		verde típico
2	D.A		605	9,6		verde típico
3	D.A		668	9,8		verde típico
4	D.A		762	9,8		verde típico
5	D.A		859	9,9		verde típico
6	D.A	2,70	1061	10,1	0,0715	verde típico
7	P.C	2,63	827	10,0		verde típico
8	P.C	2,60	585	9,9	0,0693	verde típico
9	P.C	2,60	570	9,9		verde típico
10	P.C	2,50	776	9,8	0,0678	verde típico
11	P.C	2,70	688	9,8		verde típico
12	P.C	2,60	469	9,8	0,0557	verde típico
13	P.C	2,80	438	9,7		verde típico
14	P.C	2,90	417	9,8	0,0550	verde típico
15	P.C	2,80	425	9,7		verde típico
16	P.C	2,80	454	9,7	0,0596	verde típico
17	P.C	2,80	493	9,8		verde típico
18	P.C	2,70	483	9,8	0,0616	verde típico
19	P.C	2,70	487	9,8		verde típico
20	P.C		361	9,4		verde típico

a Vazão de alimentação

b Concentração celular expressa em massa seca

c Concentração de uréia na fase líquida do biorreator

D.A: Processo descontínuo alimentado com uréia, como fase de obtenção de biomassa

P.C: Processo contínuo

- : Leitura não realizada

Figura 22. Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio 12 ($N_0=0,5$ mmol.L⁻¹; $D=0.44$ dia⁻¹). O processo contínuo iniciou em $t=6$ dias.

6. DISCUSSÃO

6.1 Avaliação do crescimento celular e do consumo de nutrientes

Embora os meios de cultivo tradicionais para *Arthrospira platensis* utilizem sais de nitrato como fonte de nitrogênio, a utilização de uréia apresenta melhoras no aspecto energético (SASSANO *et al.*, 2004; MATSUDO, 2006). Em meio alcalino, a uréia sofre hidrólise gerando amônia, que é facilmente aproveitada pelas células (DANESSI *et al.*, 2002). No caso do nitrato, o microrganismo precisa reduzi-lo a nitrito e posteriormente a amônia, processos que envolvem gastos energéticos (HATORI & MYERS, 1966), como é apresentado no esquema da Figura 23.

Figura 23. Esquema da assimilação da amônia proveniente de uréia e nitrato de sódio.

Fonte: MATSUDO (2006).

Neste contexto, o crescimento do microrganismo nos experimentos realizados (Figuras 11 a 22) não apresentou uma fase de adaptação, mesmo usando a uréia como fonte de nitrogênio e não o nitrato de sódio empregado no meio de cultivo para a preparação do inóculo; além da hidrólise da uréia em meio alcalino citada acima, a ausência da fase lag ocorreu graças à semelhança nas condições de cultivo, como a composição química do meio de cultura e a temperatura de crescimento no preparo do inóculo e do cultivo; outro fator que permitiu a rápida adaptação da cianobactéria no biorreator foi que as

células para a preparação do inóculo estavam na fase exponencial de crescimento, permitindo a obtenção de células metabolicamente ativas. Experimentos realizados com uréia como fonte de nitrogênio (DANESI *et al.*, 2002; SASSANO *et al.*, 2004) também não observaram a presença de fase lag no cultivo de *A. platensis*, confirmando assim que o uso de fontes de nitrogênio que levem à presença de amônia no meio de cultivo são tão eficientes quanto o uso de nitrato e não interferem no crescimento da célula, pois a amônia é a fonte de nitrogênio preferencialmente utilizada pela *A. platensis* (BOUSSIBA, 1989; BELKIN & BOUSSIBA, 1991).

O aumento do pH em todos os cultivos foi proporcional ao crescimento da cianobactéria até o começo do processo contínuo, isto é, ao atingir uma concentração celular de aproximadamente 900 mg.L⁻¹; este aumento do pH com o crescimento celular pode ser explicado pelo consumo da fonte de carbono durante os cultivos. De fato, o aumento do valor do pH com o aumento da concentração celular já havia sido constatado para os cultivos padrão, em que se utilizou nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. A relação entre o pH e o bicarbonato disponível para a célula é representado na Figura 24, onde os íons bicarbonato do meio de cultura são transportados ativamente para o interior celular, convertidos em íons carbonato e gás carbônico, este último utilizado na fotossíntese (FERRAZ, 1986). Para cada molécula de dióxido de carbono utilizada pela célula, ocorre a formação de um íon carbonato, que é liberado para o meio de cultura, com conseqüente aumento de pH. Deste modo, além do aumento do pH, a quantidade de íons bicarbonato consumida também tende a aumentar ao longo do crescimento, havendo conseqüentemente uma redução da concentração de carbonato total (MILLER & COLMAN, 1980).

Figura 24. Representação esquemática da assimilação de bicarbonato por *Arthrospira platensis*.

Fonte: RANGEL-YAGUI, *et al.* (2004)

A partir do momento em que se iniciou a alimentação contínua no biorreator, durante o regime transiente o valor de pH não apresentou um perfil definido, o que se deve provavelmente a uma complexa interação entre vários fatores que interferem nessa variável, como o pH do meio de alimentação, o consumo de bicarbonato pelas células e a saída de meio, bem como a presença de amônia no meio de cultivo. No entanto, os valores de pH obtidos em regime permanente tiveram um comportamento que indicaram que os menores valores foram obtidos com as maiores vazões específicas de alimentação, o que se deve à retirada do meio que evita a acumulação dos íons carbonato, os quais são responsáveis pelo aumento do pH. De fato, nos ensaios 10 a 12 ($D \geq 0,32 \text{ dia}^{-1}$; $N_0 = 0,5 \text{ mM}$) o valor de pH do meio presente no reator esteve abaixo de 10, aproximando-se ao pH do meio de alimentação, enquanto que nos cultivos 1 a 3 ($D \leq 0,12 \text{ dia}^{-1}$; $N_0 = 5 \text{ mM}$), onde se obtiveram maiores valores de concentração celular em regime permanente (X_P), atingiram-se valores de pH acima de 10.

Na Figura 25 se observa a relação da amônia livre presente no reator frente à vazão específica de alimentação.

Figura 25: Logaritmo da concentração de amônia livre no reator durante o regime permanente (A_L), em função da velocidade específica de alimentação (D).

Belkin & Boussiba (1991) determinam que a amônia torna-se tóxica numa concentração acima de 10 mM, valor não atingido durante nenhum dos ensaios. O maior valor de A_L obtido ocorreu nos ensaios 3 e 5 ($N_0=5$ mM; $D=0,16d^{-1}$ e $D=0,32d^{-1}$ respectivamente), chegando até 4,34 mM, próximo do valor determinado como inibitório segundo Carvalho *et al.* (2004) (6 mM). A relação da concentração de amônia livre ao longo do regime permanente é inversamente proporcional à concentração celular, o qual é uma evidência da assimilação desta molécula por parte da cianobactéria. A utilização de NH_4^+ no cultivo de *Arthrospira* spp. é preferencial por levar à presença de NH_3 no meio de cultivo alcalino, que entra por difusão na célula (BOUSSIBA, 1989), não necessitando sofrer nenhuma alteração posterior para que possa ser usada para a formação do correspondente aminoácido. Com respeito à vazão de alimentação, observa-se na Figura 25 que a amônia livre no meio aumenta conforme aumenta o valor de D , indicando que velocidades altas não permitem uma total assimilação deste nutriente por parte da célula, permitindo o acúmulo de amônia no meio de cultivo. Isto pode ter resultado

em uma inibição do crescimento da cianobactéria e em uma lavagem do sistema, como foi confirmado nos ensaios 3 e 5, com $N_0=5$ mM; também é importante destacar que o arraste impede um aumento da quantidade de células que possam assimilar este composto.

Resultados similares foram observados por Sassano *et al* (2007), onde se obteve a lavagem do sistema ao alimentar com as mesmas vazões e empregando cloreto de amônio como fonte de nitrogênio, atingindo níveis de até 6 mM de amônia livre e confirmando a influência da velocidade específica de alimentação no acúmulo deste composto. Nos resultados apresentados no presente trabalho, a concentração de A_L não atingiu o valor inibitório (6mM) considerado por Carvalho *et al.* (2004) em processo descontínuo. Este valor se aplica quando o reator é alimentado uma única vez; no presente trabalho em processo contínuo, uma concentração de 4mM tornou-se inibitória ao ser mantida por um longo período no sistema, permitindo um contato prolongado do microorganismo com uma concentração alta de amônia. Isto evidencia a importância da vazão de alimentação, pois afetou tanto na concentração celular como no metabolismo do nitrogênio da cianobactéria, já que o fornecimento deste elemento com $D \geq 0,16$ d⁻¹ e $N_0 = 5$ mM possibilitou que a concentração de amônia atingisse um valor inibitório com concentração da ordem de 4 mM, impedindo que a velocidade específica de crescimento fosse igualada à vazão específica de alimentação, com conseqüente impedimento da obtenção de regime permanente nos ensaios 3 e 5.

A coloração da biomassa também é um fator a ter em conta. Nos ensaios realizados, observou-se que sob valores baixos de D quando $N_0=0,5$ mM a coloração da biomassa tornou-se clara e inclusive tornou-se amarelada no cultivo com o valor mais baixo ($D=0,08$ d⁻¹). Isto indica que uma deficiência na assimilação de nitrogênio conduz a uma redução na clorofila produzida, uma vez que esta molécula apresenta nitrogênio na sua composição (BOGORAD, 1962); a baixa quantidade de clorofila é uma evidência da baixa concentração de nitrogênio fornecida ao sistema devido à concentração de uréia e à vazão de alimentação, que tornam insuficiente a quantidade de nitrogênio para a formação deste composto. Ao haver uma carência de nitrogênio, *A. platensis* pode utilizar a ficocianina como composto de reserva de nitrogênio (CIFERRI, 1983; RICHMOND, 1986), o que contribui também na perda da cor característica.

Para ter um melhor conhecimento do comportamento do nitrogênio no processo de cultivo, foram calculadas as porcentagens de remoção deste composto, baseados na somatória dos valores de amônia livre e da amônia proveniente da uréia não hidrolisada durante o regime permanente (A_R); os dados podem ser observadas na Tabela 8.

Tabela 15. Porcentagens de remoção de amônia no cultivo contínuo de *A. platensis*

ENSAIO	D (dia ⁻¹)	N ₀ (mM)	A _R (mM)	Remoção (%)
1	0,04	5	0,131	98,7
2	0,08	5	0,478	95,2
3	0,12	5	0,793	92,1
4*	0,16	5	-	-
5*	0,32	5	-	-
6	0,08	0,5	0,246	75,4
7	0,12	0,5	0,111	88,9
8	0,16	0,5	0,119	88,1
9	0,24	0,5	0,144	85,6
10	0,32	0,5	0,101	89,9
11	0,4	0,5	0,105	89,5
12	0,44	0,5	0,110	89,0

D. Vazão de alimentação

N₀. Concentração de uréia no meio de alimentação

A_R. Concentração amônia residual no meio efluente

- Condições em que não se obteve regime permanente

Nos ensaios com N₀= 5mM observou-se uma função decrescente entre a velocidade de alimentação e a remoção de nitrogênio, devido principalmente à acumulação de amônia no sistema derivada de uma maior vazão aplicada, aumentando desta maneira a incapacidade do microorganismo de assimilar este composto. De fato, como observado nos ensaios 4 e 5, não se obtiveram regimes permanentes. O melhor valor de

remoção, próximo a 99%, se obteve no ensaio 1 ($N_0=5\text{mM}$; $D=0,04\text{d}^{-1}$), ensaio com os maiores valores de biomassa, enquanto que o menor valor de remoção de nitrogênio (75%) se obteve no ensaio 6 ($N_0=0,5\text{mM}$; $D=0,08\text{d}^{-1}$), com o menor teor de proteínas obtido (Tabela 9). A porcentagem de remoção de nitrogênio nos ensaios 6 a 12 ($N_0=0,5\text{mM}$) teve um aumento pouco significativo à medida que aumentava a vazão de alimentação, derivado provavelmente aos baixos valores de biomassa obtidos nesse N_0 , como concluído por Lee & Lee (2002), pois uma alta densidade no cultivo de microalgas é efetivo no tratamento de águas residuárias com alto conteúdo de nitrogênio.

Os valores de remoção de nitrogênio no presente trabalho são concordantes com trabalhos realizados anteriormente, como o visto por Sassano *et al* (2007) cultivando *A. platensis* em processo contínuo (cerca de 99%). Lee & Lee (2002), cultivando a microalga *Chlorella kesleri* em processo descontínuo, obtiveram valores de 98% de remoção de nitratos e 81% de remoção de nitrogênio amoniacal proveniente de águas residuárias. Kim *et al* (2000), empregando detritos suínos no cultivo contínuo de *A. Platensis*, atingiram uma remoção de até 90% do nitrogênio amoniacal. Os resultados obtidos no presente trabalho, comparado com os trabalhos mencionados previamente, demonstram a aplicação e eficiência do processo contínuo de cultivo na remoção de nitrogênio para o tratamento de águas residuárias.

O uso de microalgas pode oferecer uma alternativa aos tratamentos convencionais de purificação com algumas vantagens, entre as que estão: (a) não é ambientalmente perigoso, pois o tratamento está baseado nos princípios dos ecossistemas naturais; (b) a biomassa pode ser reciclada reduzindo possíveis problemas posteriores de poluição e (c) o crescimento dos microorganismos nos efluentes remove metais pesados e substâncias xenobióticas, e sob condições fotossintéticas, oxigênio pode ser liberado, aumentando desta maneira o potencial de auto-depuração de corpos de água (Converti *et al.*, 2006).

6.2. Análise da composição da biomassa

Na Tabela 9 são apresentados os conteúdos de proteínas e lipídeos dos ensaios realizados.

Tabela 16: Composição da biomassa obtida nos ensaios realizados

Ensaio	D (dia ⁻¹)	PTN (%)	LIP (%)
1	0,04	28,3	13,0
2	0,08	56,8	17,2
3	0,12	71,9	16,8
4	0,16	-	-
5	0,32	-	-
6	0,08	18,6	8,4
7	0,12	19,2	7,2
8	0,16	22,5	5,6
9	0,24	22,5	5,3
10	0,32	26,7	5,2
11	0,4	26,8	7,8
12	0,44	27,2	7,1

D velocidade específica de alimentação

PTN porcentagem de proteínas na biomassa seca

LIP porcentagem de lipídeos na biomassa seca

Verificou-se que o teor de proteína na biomassa foi uma função da vazão de alimentação do reator e da concentração de uréia no meio de alimentação, observando um aumento do teor de proteína à medida que era aumentada a velocidade específica de alimentação (Figuras 26 e 27). Obteve-se uma porcentagem máxima de 72% com o ensaio 3 ($N_0=5$ mM; $D=0.12$ d⁻¹), enquanto que o menor valor obtido (18,6%) foi no ensaio 6 ($N_0=0,5$ mM; $D=0.32$ d⁻¹).

Figura 26. Porcentagem de proteína na biomassa seca (PTN) e lipídeos (LIP) em função da velocidade de fornecimento de uréia para $N_0=5\text{mM}$

Nos ensaios com $N_0=5\text{ mM}$ (Figura 26), observou-se que o teor de proteínas teve valores maiores quando comparados com os ensaios onde $N_0=0,5\text{ mM}$ (Figura 27). Isto era esperado, pois o fornecimento de nitrogênio foi 10 vezes maior, permitindo uma maior assimilação da amônia proveniente da hidrólise da uréia. Piorreck *et al.* (1984), afirma que um incremento nos valores de nitrogênio, em processos descontínuos, favorece o aumento da biomassa assim como a síntese de proteínas, o qual pôde ser observado nos ensaios realizados, pois maiores valores de amônia no meio de cultivo permitiram sua assimilação para o crescimento celular, bem como para sua acumulação na forma orgânica como material de reserva (SYRETT, 1962). As porcentagens de proteínas obtidas nesta faixa de concentração de uréia concordam com o visto por Sassano (2004), que obteve um teor máximo de 72,5% alimentando com 10 mM de cloreto de amônio e com $D=0,08\text{ d}^{-1}$; no presente trabalho se obteve um teor protéico da mesma ordem de grandeza com uma vazão maior ($D=0,12\text{ d}^{-1}$), devido provavelmente à necessidade da hidrólise da uréia para sua assimilação por parte de *A. platensis*, uma vez que o cloreto de amônio entra diretamente por difusão na célula, o que resultaria em uma velocidade de fornecimento menor de nitrogênio quando comparada com a uréia.

Figura 27. Porcentagem de proteína na biomassa seca (PTN) e lipídeos (LIP) em função da velocidade de fornecimento de uréia para $N_0=0,5\text{mM}$

A baixa porcentagem obtida nos ensaios com $N_0=0,5\text{mM}$ é concordante com trabalhos anteriores em processos descontínuos com baixo fornecimento de nitrogênio (SASSANO, 1999; MAHAJAM & KAMAT, 1995), assim como em processos contínuos (SASSANO, 2004). Os baixos teores de proteína obtidos podem ser explicados pelo metabolismo da célula ser deslocado para a produção de moléculas de maior teor de energia quando houvesse carência de fonte de nitrogênio, aproveitando desta maneira a energia transformada na fotossíntese em energia química, produzindo moléculas de reserva como lipídeos ou carboidratos (SASSANO, 2004; RODRIGUES, 2008).

Os teores de lipídeos obtidos nos ensaios encontram-se na faixa proposta por Cohen (1997) para *Arthrospira* sp, os quais variam entre 6 e 13%. Analisando estes teores (Figuras 26 e 27) pode-se inferir que nos

ensaios em que se empregou $N_0=5\text{mM}$ a porcentagem lipídica média na biomassa foi $15,7 \pm 2,3\%$, enquanto que quando do uso de $N_0=0,5\text{mM}$ houve uma queda no valor médio desta variável dependente ($6,7 \pm 1,3\%$). Comportamento similar foi obtido por Sassano (2004), em que o emprego de menor concentração de nitrogênio no meio de alimentação levou a uma diminuição no teor de lipídeo da biomassa. Em concordância aos resultados obtidos neste trabalho, Piorreck *et al.* (1984), estudando diferentes níveis iniciais de fontes de nitrogênio, encontraram que em cultivos de *A. platensis* realizados sob limitação de nitrogênio ocorria uma diminuição do teor lipídico da biomassa. A queda nos teores lipídicos e protéicos nas biomassas obtidas a partir dos ensaios com $N_0=0,5\text{mM}$ podem decorrer do aumento da formação de carboidratos em condições de limitação de nitrogênio, como o observado por Van Rijn & Shilo (1986), bem como por Sassano (2004). Por outro lado, Hsieh & Wu (2009) estudando o crescimento de *Chlorella* por processo semi-contínuo usando uréia, determinou que a concentração intracelular de lipídeos aumentava com a queda do valor de concentração de uréia adicionada. Concluiu que a atividade de Acetil-CoA carboxilase, enzima que atua na fixação de HCO_3 para a biossíntese de lipídeos, é aumentada em condições de deficiência de nitrogênio.

Adicionalmente, segundo Mahajan & 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, a uréia em concentração $0,01\text{M}$ suportou uma maior quantidade de γ -linolênico, que foi de $20,8 \mu\text{g/mL}$, demonstrando que dentro da fração lipídica da biomassa da *A. platensis* há uma substância de interesse em quantidades apreciáveis.

6.3 Análise dos parâmetros cinéticos e do fator de conversão de nitrogênio em células

O regime permanente foi obtido em todos os experimentos com $N_0=0,5\text{mM}$ (6 a 12) e nos ensaios 1 a 3 com $N_0=5\text{mM}$, onde as variáveis

medidas (concentração celular, pH, concentração de amônia livre, concentração de uréia residual e carbonato total) mantiveram-se praticamente inalteradas ao longo do processo, como esperado para este tipo de regime (PAMBOUKIAN, 2003; FACCIOTTI, 2001). Neste sentido, haveria a possibilidade de estender os cultivos por longos períodos de tempo sem ter mudanças nas condições ambientais no reator, o que oferece vantagens na reprodutibilidade, controle e manipulação de variáveis (HOSKISSON & HOBBS, 2005). Os parâmetros cinéticos obtidos nos experimentos, como a concentração celular obtida no regime permanente (X_P) e a produtividade em células (P_X) podem ser observados na Tabela 10.

Tabela 17: Concentração celular (X_P) e parâmetros cinéticos calculados para os experimentos realizados.

Ensaio	D (dia ⁻¹)	N ₀ (mM)	X _P (mg.L ⁻¹)	P _X (mg.L ⁻¹ .dia ⁻¹)	Y _{X/N} (mg.mg ⁻¹)
1	0,04	5	1415	56,6	10,11
2	0,08	5	1235	98,8	8,82
3	0,12	5	1235	148,2	8,82
4	0,16	5	-	-	-
5	0,32	5	-	-	-
6	0,08	0,5	683	54,6	48,79
7	0,12	0,5	649	77,9	46,36
8	0,16	0,5	625	100,0	44,64
9	0,24	0,5	475	114,0	33,93
10	0,32	0,5	414	132,5	29,57
11	0,4	0,5	421	168,4	30,07
12	0,44	0,5	458	201,5	32,71

D: Velocidade específica de alimentação

N₀: Concentração de uréia no meio efluente

X_P: Média da concentração celular no regime permanente

P_X: Produtividade em células

Y_{X/N}: Fator de conversão de nitrogênio em células

Com respeito à concentração celular no regime permanente (X_P), observou-se que esta é uma função decrescente da vazão específica de alimentação (D) (Figura 28), demonstrando a importância do valor de D na retirada de células do reator, pois quanto maior a vazão específica de alimentação maior é a vazão de retirada de meio do sistema (taxa de diluição) e conseqüentemente menor concentração de células. Esta taxa de diluição foi a responsável por atingir menores valores de concentração celular em vazões altas, assim como maiores concentrações residuais de nutrientes, como observado no item 6.1.

Figura 28. Concentração celular obtida em regime permanente (X_P) em função da vazão específica de alimentação (D), para concentrações de uréia (N_0) de 5mM (■) e 0,5mM (◆).

Do mesmo modo, ao analisar o comportamento da concentração celular em relação à velocidade de fornecimento de nitrogênio ($D.N_0$) (Figura 29), observou-se como é afetada a concentração de células no sistema. As altas velocidades de fornecimento dos ensaios 1 a 5, derivadas de uma maior concentração de uréia no meio efluente ($N_0=5\text{mM}$), influenciaram a concentração celular durante o processo, levando a atingir valores muito maiores de X_P quando comparados com os ensaios em que $N_0=0,5\text{mM}$. No entanto, nos ensaios 4 e 5 ($D=0,16\text{ d}^{-1}$ e $D=0,32\text{ d}^{-1}$, respectivamente) esta velocidade de fornecimento foi a causa de se obterem valores de amônia

muito altos, os quais provocaram a inibição do crescimento do microorganismo, ao serem fornecidas concentrações de nitrogênio maiores às requeridas para o crescimento e multiplicação da cianobactéria, evidenciado pela lavagem do sistema nestes ensaios (Figuras 14 e 15).

Figura 29: Concentração celular obtida em regime permanente (X_P) em função da velocidade de fornecimento de nitrogênio ($D.N_0$), para concentrações de uréia (N_0) 0,5mM (■) e 5mM (◆)

Ao avaliar a produtividade em células (P_X) em função do valor de D (Figura 29), obteve-se uma função crescente na faixa de D estudada. Isto pode ter ocorrido pelo microorganismo ter a possibilidade de assimilar mais facilmente os nutrientes fornecidos em vazões maiores de alimentação, permitindo maior crescimento celular. Os valores de produtividade obtidos foram maiores que em ensaios anteriores, empregando cloreto de amônio como fonte de nitrogênio sob as mesmas condições de alimentação (SASSANO, 2004), onde a maior produtividade em células obtida foi na ordem de $92 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ quando $D=0,12 \text{ dia}^{-1}$ e $N_0=10 \text{ mmol.L}^{-1}$. No presente trabalho, a maior produtividade em células obtida foi de $201,5 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ no ensaio 12 ($D=0,44 \text{ dia}^{-1}$ e $N_0=0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$), demonstrando a eficiência do

emprego da uréia como fonte de nitrogênio e seu ganho energético, assim como uma redução nos valores de custo de produção, pois comercialmente a uréia apresenta um preço 10 vezes menor que o cloreto de amônio, inclusive se é de grau analítico (MATSUDO, 2006; BEZERRA, 2006).

Figura 30: Produtividade em células (P_x) em função da vazão específica de alimentação (D), para concentrações de uréia (N_0) de 5mM (■) e 0,5mM (◆).

A relação da produtividade em células em função da velocidade de fornecimento de nitrogênio é evidenciada na Figura 31. Para cada concentração de uréia no meio de alimentação, observa-se uma linearidade na função entre P_x e $D.N_0$ nos experimentos em que se obteve regime permanente.

Figura 31: Produtividade em células no regime permanente (P_X) em função da velocidade de fornecimento de nitrogênio ($D.N_0$), para concentrações de uréia (N_0) 0,5mM (■) e 5mM (◆).

Quando N_0 foi 0,5 mM, apesar de uma maior vazão de alimentação acarretar uma maior taxa de diluição, permitindo uma maior retirada de células do sistema, os maiores valores de produtividade foram nas maiores velocidades de fornecimento de nitrogênio (ensaios 11 e 12), indicando que crescimento foi limitado pelo nitrogênio adicionado no sistema, pois a taxa de crescimento aumentou conforme aumentou a velocidade de fornecimento de nitrogênio, mesmo o sistema tendo perda celular por maiores vazões de retirada. Também é importante destacar que nestes ensaios não se atingiram valores tóxicos ou inibitórios de amônia no sistema. Por outro lado, nos ensaios 4 e 5 ($N_0 = 5 \text{ mM}$), onde a concentração de amônia fornecida era 10 vezes maior que nos ensaios 11 e 12, se atingiram valores inibitórios e uma lavagem do sistema (item 6.1), decorrente das altas velocidades de fornecimento de nitrogênio.

Na figura 32 podem ser observados os fatores de conversão de nitrogênio em células

Figura 32: Fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função da velocidade específica de alimentação (D), para concentrações de uréia (N_0) 0,5mM (◆) e 5mM (■)

Nos ensaios com menores concentrações celulares (ensaios 9 a 12; $D \geq 0,24 \text{ d}^{-1}$), o valor de $Y_{X/N}$ foi menor com respeito aos ensaios onde se empregou o mesmo valor de N_0 (0,5mM) e menores valores de D . Comparando os fatores de conversão obtidos com as duas concentrações de uréia no meio de alimentação, fica evidente o menor valor de $Y_{X/N}$ quando se emprega um maior valor de N_0 , o que para um mesmo valor de D corresponde a uma maior alimentação do sistema. Do mesmo modo, Rodrigues (2008), empregando cloreto de amônio e nitrato de potássio como fontes de nitrogênio, determinou que há uma tendência a menores fatores de conversão de nitrogênio em células decorrentes de um aumento da quantidade de nitrogênio total fornecida. SYRETT (1962) descreve que o nitrogênio assimilado pelo microrganismo é utilizado primeiro para o crescimento celular e, posteriormente, para formação de nitrogênio orgânico como material de reserva. Se comparados os valores de $Y_{X/N}$ com as porcentagens de proteína acumulada na biomassa, pode se inferir que nos ensaios com vazões baixas de alimentação e

$N_0=0,5\text{mM}$, a maioria do nitrogênio incorporado foi assimilado para crescimento celular e a sobrevivência do microorganismo nas condições do sistema, mas a formação de nitrogênio orgânico em forma de proteínas se viu afetada pela limitação de substrato, conseqüente de uma baixa velocidade de fornecimento de uréia.

Segundo Maxon (1954), algumas das desvantagens do processo contínuo são a dependência de equipamentos para a transferência de fluídos e a possibilidade de contaminação por outros microrganismos devido a grandes períodos de fermentação. No entanto, sendo a *Arthrospira platensis* resistente a altas salinidades, altos valores de pH, e níveis relativamente mais altos de amônia no meio de cultivo (BELKIN & BOUSSIBA, 1991), seria possível estabelecer o processo contínuo por períodos prolongados sem a interferência de microrganismos contaminantes.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- *Arthrospira (Spirulina) platensis* suportou as características do processo contínuo, mostrando este tipo de cultivo ser adequado para o crescimento do microrganismo, uma vez que foi atingido regime permanente em quase todas as vazões de alimentação avaliadas.
- Quando as vazões específicas de alimentação foram menores, a concentração celular no reator foi maior, demonstrando a relação existente entre o valor de D e o valor da concentração de células no regime permanente.
- A produtividade em células foi função crescente de D , sendo os maiores valores obtidos com $N_0=0,5\text{mM}$ ($201,5 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) e $N_0 = 5 \text{ mM}$ ($148,2 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) com $D = 0,44\text{dia}^{-1}$ e $D = 0,12 \text{ dia}^{-1}$, respectivamente.
- O emprego de maiores valores de N_0 levou a menores valores de $Y_{X/N}$.
- Os valores de concentração de amônia livre no meio aumentaram conforme aumentou o valor de D , indicando que velocidades altas permitem o acúmulo de amônia no meio de cultivo, levando a níveis inibitórios deste composto e uma conseqüente lavagem do sistema, o que foi observado nos experimentos em que se empregou $N_0=5\text{mM}$ e $D\geq 0,16 \text{ dia}^{-1}$.
- Os maiores teores de lipídios da biomassa foram encontrados para experimentos com N_0 de 5 mM , chegando a valores médios de $15,7 \pm 2,3 \%$. Em experimentos conduzidos com $N_0 = 0,5 \text{ mM}$, o valor médio do teor de lipídios foi de $6,7 \pm 1,3\%$.
- A concentração de uréia de $0,5\text{mM}$ no meio de alimentação (N_0) e vazão específica de alimentação (D) $\leq 0,12 \text{ dia}^{-1}$ levou a uma biomassa com baixo teor de proteínas ($\leq 20\%$). Por outro lado, o emprego de $N_0 = 5 \text{ mM}$ e $D = 0,12 \text{ dia}^{-1}$ levaram a uma biomassa com teor de proteínas da ordem de 72% . Nestas condições também foram obtidas concentração celular no reator de 1235 mg L^{-1} e produtividade em células de $148,2 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$.
- As porcentagens de remoção de nitrogênio foram maiores com o maior valor de N_0 estudado (5 mM), no mais baixo valor de D empregado ($0,04 \text{ dia}^{-1}$), chegando a praticamente 99% de remoção deste nutriente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDIN EL SHERIF, S.A.; CLEMENT, G. *Spirulina* sp. Food Algae. Discovery of natural lakes at wadi el natrun in the Arab Republic of Egypt. **Revue de L'Institut Français du Pétrole et Annales des Combustibles Liquides**, v.37, p.123-130, 1982.

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

BADINO JR A.C.; FACCIOTTI M.C.R. E SCHMIDELL W. Estimation of the rheology of glucoamylase fermentation broth from the biomass concentration and shear conditions. **Biotechnology Techniques**, v.13, n.10, p.723-726. 1999.

BALLONI, W.; MATERASSI, R.; PELOSI, E.; PUSHPARAJ, B.; FLORENZANO, G.; STENGEL, E.; SOEDER, C.J. Comparison of two different culture devices for mass production of microalgae. I – Yields of *Scenedesmus obliquus* and *Coelastrum sphaericum* **Arch. Hydrobiol. Suppl.**, v.60, n.3, p.324 – 331, 1981.

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

BELKIN, S. & BOUSSIBA, S. High internal pH conveys ammonia resistance in *S. platensis*. **Bioresource Technology**. 38:167–9. 1991.

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

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

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

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

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

BOUSSIBA, S.; RICHMOND, A.C. Phycocyanin as a storage protein in blue-green algae. **Archives in Microbiology**, v.125, p.143-147, 1980.

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

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

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.**

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

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

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

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., 1992. 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, 826–834.

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

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

DAO-IUN, F. ZU-CHENG, W. Culture of *Spirulina platensis* in human urine for biomass production and O₂ evolution. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 7, n. 1. p. 34-37. 2006.

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

DOIN, P. Fermentação Contínua. Em: BORZANI, W.; ALMEIDA-LIMA, U.; AQUARONE, E.; **Engenharia Bioquímica, Volume 3**. Ed. da Universidade de São Paulo. 1975.

DURAND-CHASTEL, H. Production and use of *Spirulina* in Mexico. In: SHELEF, G. & SOEDER, C.J., (Eds). **Algae biomass**. Elsevier-North Holland, Biomedical Press, Amsterdam, Holand, p.851, 1980.

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.

FAO/OMS/ONU. Necesidades de energía y de proteínas. **Serie de Informes Técnicos No. 724**. Ginebra, 1985

FERRAZ, C.A.M.; AQUARONE, E.; KRAUTER, M. Utilização de sub-produtos da indústria alcooleira na obtenção de biomassa de *Spirulina máxima*. Parte II- Emprego do resíduo da destilação do mosto fermentado (vinhaça). **Reviews in Microbiology**, v.17, n.1. p.15-21, 1986.

FERREIRA, L. S. **Estudo da intensidade luminosa no cultivo de *Arthrospira (Spirulina) platensis* em reator tubular utilizando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio por processo descontínuo alimentado**. 2008. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo. 113 p.

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

GOLDMAN, J.C., DENNET, M.R., RILEY, C.B. Effect of nitrogen-mediated changes in alkalinity on pH control and CO₂ supply in intensive microalgae cultures. **Biotechnology and Bioengineering** 24, p. 619–631, 1982.

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

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

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

HONGSTHONG, A. SIRIJUNTARUT, M. PROMMEENATE, P. THAMMATHORN, S. BUNNAG, B. CHEEVADHANARAK, S. TANTICHAROEN, M. Revealing differentially expressed proteins in two morphological forms of *Spirulina platensis* by proteomic analysis. **Molecular Biotechnology**, v. 36. n. 3, p. 123-130, 2007.

HSIEH, C-H. WU, W-T. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3921-3926, 2009.

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

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

KIM MH, CHUNG WT, LEE MK, LEE JY, OHH SJ, LEE JH. Kinetics of removing nitrogenous and phosphorus compounds from swine waste by growth of microalga *Spirulina platensis*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.10, p.455–461, 2000.

KIM, C-J., JUNG, Y-H., Oh, Hee-Mock. Factors Indicating Culture Status During Cultivation of *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **The Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, 2007.

KOSHIMIZU, L.H.; MELO CRUZ, M.R.; VALDEOLIVAS, E.I.; BUENO NETO, C.L.; RAMOS GONÇALVES, A.C.; ROMERO DE LA IGRESIA, M.; BORZANI, W. Fermentação alcoólica em uma única dorna em escala piloto. **Brasil Açucareiro**, v.102, p.14-21, 1983.

LACAZ – RUIZ, R. Espirulina e Zootecnia. In: LACAZ – RUIZ, R. coord. **Espirulina - Estudos e Trabalhos**. São Paulo: Roca. 2003, p. 1 – 34.

LEDUY, A., SAMSON, R. Testing of an ammonia ion selective electrode for ammonia nitrogen measurement in the methanogenic sludge. **Biotechnology Letters**, v. 4, p. 303-306, 1982.

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, K. LEE, C. Nitrogen removal by microalgae without consuming organic carbon sources. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 979-985, 2002.

LIU F. S.; ZAJIC J. E. Fermentation Kinetics and Continuous Process of L-Asparaginase Production. **Applied Microbiology**, v. 25. n. 1, p. 92-96, 1973.

MAHAJAN, G.; KAMAT, M. γ -Linolenic acid production from *S. platensis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.43, n.3, p.466-469, 1995.

MAIER, R. M.; PEPPER, I. L. ; GERBA, C. P. **Environmental Microbiology**. San Diego: Academic Press. 2000. p.143-145.

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

MAXON, W.D. Continuous Fermentation. A Discussion of its principles and application. **Applied Microbiology**, Washington, v. 3, p.110-122, Michigan, 1954.

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

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

NAES, H.; POST, A.F. Transient states of geosmin, pigments, carbohydrates and proteins in continuous cultures of *Oscillatoria brevis* induced by changes in nitrogen supply. **Archives of Microbiology**, v.150, p.333-337, 1988.

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

OGBONDA, K. AMINIGO, R. ABU, G. Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. **Bioresource Technology**, 98, p. 2207–2211, 2007.

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

PAMBOUKIAN, C. R. D. Utilização de processos contínuos para a produção do antitumoral retamicina por *Streptomyces olindensis*. In: **XIV SINA Ferm: Anais**. Florianópolis, 2003.

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

PAOLETTI, C., PUSHPARAJ, B., TOMASELLI FEROCI, L. Ricerche sulla nutrizione minerale di *Spirulina platensis*. In **Atti del XVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia**. Padua, Italy: Italian Society of Microbiology, p. 833-9, 1975.

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

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

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.

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**, v.23, n.2, p.207-216, 1984.

PULZ, O.; SCHEIBENBOGEN, K. Photobioreactors: Design and performance with respect to light energy input. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.41, p.124-48, 1998.

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

REHM, H.-J.; REED, G. **Production of Microbial Biomass**. Biotechnology., v. 9, p. 202-205, 1995.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal mass culture**. Boca-Ratón, Fla. CRC Press. Pp 212-230. 1986.

RICHMOND, A. **Phototrophic microalgae**. In: Biotechnology. REHM, H.J.; REED, G.(eds.), v.3, Verlag Ch., weinhein, 1983.

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

RUSSEL, J. B. **Química Geral**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1982. 897p.

SÁNCHEZ, J-I; MARTÍNEZ, B; GUILLÉN, R; JIMÉNEZ-DÍAZ, R; RODRÍGUEZ, A. Culture Conditions Determine the Balance between Two Different Exopolysaccharides Produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n 12, p.7495-7502, 2006

SASSANO, C.E N. **Influência da uréia no crescimento e no teor do ácido graxo 'gama'-linolênico da biomassa de *Spirulina platensis*** Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo, 1999.

SASSANO, C.E.N. **Cultivo de *Spirulina platensis* por processo contínuo utilizando cloreto de amônio como fonte de nitrogênio**. 2004. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. São Paulo.

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

SASSANO, C.E.N; CARVALHO, J.C.M.; GIOIELLI, L.A.; SATO, S.; TORRE. P.; CONVERTI, A. Kinetics and bioenergetics of *Spirulina platensis* cultivation by fed-batch addition of urea as nitrogen source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.12, p.143-150, 2004.

SAXENA, P. N.; AHMAD, M. R.; SHYAM, R. Cultivation of *Spirulina* in sewage for poultry feed. **Amnia. Experientia**, v.39, p.1077-1083, 1983.

SCHLÖSSER, U. G. Sammlung von Algenkulturen. **Ber. Deutsch. Bot. Ges.**, v.95, p.181–276, 1982.

SHI, Y; WEIMER, P.J.; Response surface analysis of the effects of pH and dilution rate on *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 in cellulose-fed continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.8, p.2583-2591, 1992.

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

SILVA, P.C., BASSON, P.W., MOE, R.L. **Catalogue of the Benthic Marine Algae of the Indian Ocean**, vol. 79. University of California Publications in Botany, Berkeley, CA, 1996.

SILVEIRA, S. T.; BURKERT, J. F. M.; COSTA, J. A. V.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bioresource Technology**, v.98, n.8, p.1629-1634, 2007.

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

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

STANCA, D.; POPOVIC, E. Urea as nitrogen source in modified zarrouk medium. **Biol. Veget.**, v.41, n.1, p.25-31, 1996.

SUN, L.; WANG, S.; QIAO, Z. Chemical stabilization of the Phycocyanin from cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Biotechnology**, v. 121, p. 563-569, 2006.

SWARTZ, J. COONEY, C. Methanol Inhibition in Continuous Culture of *Hansenula Polymorpha*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 5, p.1206-1213, 1981.

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

TACON, A ; JACKSON, A. **Utilization of conventional and unconventional source in practical fish feeds**. In: Nutrition and feeding in fish. London, Academic Press, p.119-45, 1985.

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

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

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

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

VAN RIJN, J. SHILO, M. Nitrogen Limitation in Natural Populations of Cyanobacteria (*Spirulina* and *Oscillatoria* spp.) and Its Effect on Macromolecular Synthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 32. p. 340-344, 1986.

VARGA, L.; SZIGETI, J.; KOVA, 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**, v.85, p.1031–1038, 2002.

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

WALACH, M.R.; BAZIN, M.J.; PIRT, S.J.; BALYUZI, H.H.M. Computer control of carbon-nitrogen ratio in *Spirulina platensis*. **Biotechnology Bioengineering**, v.29, p.520-528, 1987.