UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA BIOQUÍMICO-
FARMACÊUTICA**
ÁREA DE TECNOLOGIA DE FERMENTAÇÕES

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Ankistrodesmus braunii* EM REATOR
TUBULAR EMPREGANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITRATO
EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO**

MARCELLO DAPIEVI BRESAOLA

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

São Paulo

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA BIOQUÍMICO-
FARMACÊUTICA**
ÁREA DE TECNOLOGIA DE FERMENTAÇÕES

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Ankistrodesmus braunii* EM REATOR
TUBULAR EMPREGANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITRATO
EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO**

MARCELLO DAPIEVI BRESAOLA

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica

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

Bresaola, Marcello Dapievi

B842a   Avaliação do crescimento de *Ankistrodesmus braunii* em reator tubular empregando diferentes concentrações de nitrato em diferentes condições de cultivo / Marcello Dapievi Bresaola. -- São Paulo, 2016.
71p.

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

Orientador: Carvalho, João Carlos Monteiro de

1. Microbiologia aplicada 2. Processos descontínuos 3. Biomassa
I. T. II. Carvalho, João Carlos Monteiro de, orientador.

660.6   CDD

MARCELLO DAPIEVI BRESAOLA

**Avaliação do crescimento de *Ankistrodesmus braunii* em reator tubular
empregando diferentes concentrações de nitrato em diferentes condições de cultivo**

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

Orientador/Presidente

Dr. Fernando Fratelli

1º. examinador

Dr. Marcelo Sircili

2º. examinador

Profa. Dra. Marina Ishii

3º. examinador

São Paulo, 18 de abril de 2016

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho, por todos os ensinamentos, orientação, confiança e paciência ao longo de todo o processo.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão de bolsa de mestrado.

Aos meus pais (Franco e Gladys) e irmãos (Marco e Monica), sempre presentes em minha vida e dispostos a ajudar em qualquer situação.

Aos amigos que conheci no laboratório no início e ao decorrer da pós-graduação e que tanto me ensinaram, ajudaram e apoiaram durante todo o percurso (Ana Morocho, Camila Knysak, Ivan Alejandro, Guilherme Mascioli, João Vítor, Eleane, Marcelo Chuei).

A todos os funcionários e professores do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica e da Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

RESUMO

BRESAOLA, M. D. **Avaliação do crescimento de *Ankistrodesmus braunii* em reator tubular empregando diferentes concentrações de nitrato em diferentes condições de cultivo.** 2016. 71p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Microalgas são organismos unicelulares, eucariontes, fotossintetizantes e eficientes fixadores de gás carbônico que apresentam grande potencial para produção de ácidos graxos além de pigmentos, como os carotenóides e a clorofila, de interesse nas indústrias de alimentos, química, farmacêutica e de cosméticos. Dentre as microalgas, o microrganismo *Ankistrodesmus braunii* vem sendo citado como capaz de produzir grandes quantidades de lipídios, podendo corresponder a até 73% de sua massa seca, com produção de ácidos graxos insaturados, como o ácido linolênico. Esse microrganismo se destaca do ponto de vista industrial por poder ser conduzido em reatores e em meios de cultivo complexos. As fontes de nitrogênio, as concentrações empregadas destes nutrientes, bem como o tipo de processo de cultivo interferem na composição de biomassas fotossintetizantes. O uso de reatores tubulares tem sido estudado e tem se apresentado interessante por permitir a obtenção de altas concentrações celulares. Nesse sentido, este trabalho teve a finalidade de estudar o crescimento de *Ankistrodesmus braunii* em reator tubular com uso de diferentes quantidades de nitrato de sódio por processos descontínuo, descontínuo alimentado e semi-contínuo. Nos cultivos descontínuos, a máxima concentração celular (X_m) encontrada foi de $1588 \pm 11 \text{ mg.L}^{-1}$ com uso de 20 mM de NaNO_3 . O uso do processo descontínuo alimentado, o qual teve adição de 20 mM de NaNO_3 feito num intervalo a cada 48 horas sendo iniciada a adição no primeiro dia, permitiu a obtenção de $X_m = 2753 \pm 7 \text{ mg.L}^{-1}$; porém não foi possível eliminar a fase lag do cultivo, levando a uma produtividade em células (P_x) de $351 \pm 1 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. O processo semi-contínuo foi eficiente para eliminar a fase lag do cultivo, permitindo a obtenção de $X_m = 2399 \pm 5 \text{ mg.L}^{-1}$ e um aumento de até 50% em P_x , que chegou a valores de $525 \pm 1 \text{ mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ em cultivos com uso de 20 mM de NaNO_3 . Nesta condição os teores de proteínas e lipídios nas biomassas foram de

$34,8 \pm 0,2\%$ e $38,6 \pm 0,2\%$, respectivamente. Foi observado que, independentemente do tipo de processo empregado, há um decréscimo do valor do fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) com o aumento da adição de NaNO_3 . O maior valor de $Y_{X/N}$ foi obtido no experimento com processo semi-contínuo e uso de 2 mM de NaNO_3 no meio de cultivo, com valor médio de $29,1 \pm 0,1 \text{ mg mg}^{-1}$ ao final do segundo ciclo. Porém, nesta condição, o teor de proteínas da biomassa foi de $17,3 \pm 0,4\%$. Já os maiores valores de $Y_{X/N}$ encontrados nos processos descontínuo e descontínuo alimentado foram, respectivamente, de $22,5 \pm 1,6$ e $7,1 \pm 0,1 \text{ mg mg}^{-1}$. Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam o potencial de *Ankistrodesmus braunii* como fonte de proteínas e lipídios para uso industrial.

Palavras-chave: *Ankistrodesmus braunii*; processo semi-contínuo; processo descontínuo; processo descontínuo alimentado; nitrato.

ABSTRACT

BRESAOLA, M. D. **Evaluation of *Ankistrodesmus braunii* growth in tubular reactor using different concentrations of nitrate in different conditions.** 2016. 71p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Microalgae are unicellular organisms, photosynthetic eukaryotes and which have great potential for the production of fatty acids as well as pigments such as carotenoids and chlorophyll, of interest in the food industry, chemicals, pharmaceuticals and cosmetics. Among the microalgae, the microorganism *Ankistrodesmus braunii* has been cited as capable of producing large amounts of lipids, which may correspond to up to 73% of its dry mass, producing unsaturated fatty acids, such as linolenic acid. This microorganism stands out from the industrial point of view because it can be carried out in reactors and in complex culture media. Nitrogen sources and concentrations employed of these nutrients interfere the composition of photosynthetic biomass and type of process employed also clearly exerts its influence both the growth and the composition of the biomass obtained. The use of tubular reactors has been studied and shown to be interesting because it allows the achievement of high cell concentrations. In this sense, this work aims to study the growth of *Ankistrodesmus braunii* tubular reactor using different amounts of nitrogen and under different forms of cultivation. In batch cultures, the maximum cell concentration (X_m) was found to be $1588 \pm 11 \text{ mg.L}^{-1}$, using 20 mM NaNO_3 . The use of the fed batch process, which had the addition of 20 mM NaNO_3 in a range of 48 to 48 hours from the first to the sixth day, afforded $X_m = 2753 \pm 7 \text{ mg.L}^{-1}$; however it was not possible to eliminate the lag phase cultivation, leading to a productivity of cells (P_x) of $351 \pm 1 \text{ mg.L}^{-1}.\text{day}^{-1}$. The semi-continuous process was effective to eliminate the lag phase of the culture, allowing to obtain $X_m = 2399 \pm 5 \text{ mg.L}^{-1}$ and increased up to 50% the P_x value, which reached values of $525 \pm 1 \text{ mg.L}^{-1}.\text{day}^{-1}$ in cultures with the use of 20 mM of NaNO_3 . In this condition the protein levels and lipid in the biomass were $34,8 \pm 0,2\%$ and $38,6 \pm 0,2\%$, respectively. In all culture processes, it was observed that regardless of the type of process used, there is a

decrease in the amount of nitrogen conversion factor into cells ($Y_{X/N}$) with increasing addition of NaNO_3 . The highest value of $Y_{X/N}$ was obtained in the experiment with semi-continuous process with the use of 2 mM of NaNO_3 in the culture medium, with an average of $29.1 \pm 0.1 \text{ mg mg}^{-1}$ at the end of the second cycle. However, in this condition, the protein content of the biomass was $17.3 \pm 0.4\%$. The best values of $Y_{X/N}$ found in the batch and fed-batch processes were, respectively, 22.5 ± 1.6 and $7.1 \pm 0.1 \text{ mg mg}^{-1}$. The results of this study shows the potential of *Ankistrodesmus braunii* as a source of protein and lipids for industrial use.

Key words: *Ankistrodesmus braunii*; semi-continuous process; batch process; fed-batch process; nitrate.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1	Foto de <i>Ankistrodesmus braunii</i> 17
Figura 2	Curva de calibração para determinação da concentração de <i>Ankistrodesmus braunii</i> 32
Figura 3	Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 1 (processo descontínuo utilizando 2mM de nitrato de sódio)..... 33
Figura 4	Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 2 (processo descontínuo utilizando 5mM de nitrato de sódio)..... 34
Figura 5	Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 3 (processo descontínuo utilizando 10mM de nitrato de sódio)..... 35
Figura 6	Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 4 (processo descontínuo utilizando 20mM de nitrato de sódio)..... 36
Figura 7	Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 5 (processo descontínuo utilizando 30mM de nitrato de sódio)..... 37
Figura 8	Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 6 (processo descontínuo alimentado utilizando 2mM de nitrato de sódio)..... 38
Figura 9	Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 7 (processo descontínuo alimentado utilizando 5mM de nitrato de sódio)..... 39
Figura 10	Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 8 (processo descontínuo alimentado utilizando 10mM de nitrato de sódio)..... 40

Figura 11	Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 9 (processo descontínuo alimentado utilizando 20mM de nitrato de sódio).....	41
Figura 12	Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 10 (processo semi-contínuo utilizando 2mM de nitrato de sódio).....	43
Figura 13	Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 11 (processo semi-contínuo utilizando 5mM de nitrato de sódio).....	45
Figura 14	Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 12 (processo semi-contínuo utilizando 10mM de nitrato de sódio).....	47
Figura 15	Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 13 (processo semi-contínuo utilizando 20mM de nitrato de sódio).....	49
Figura 16	Variação da atividade da enzima nitrato redutase sob efeito da variação do pH em células congeladas e descongeladas de <i>Chlorella vulgaris</i> (a) e <i>Ankistrodesmus braunii</i> (b). Fonte: HIPKIN & SYRETT (1977).....	54

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Experimentos realizados utilizando diferentes processos de cultivo e diferentes concentrações de nitrato de sódio.....	30
Tabela 2 Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo descontínuo utilizando 2mM de nitrato de sódio (Experimento 1).....	33
Tabela 3 Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo descontínuo utilizando 5mM de nitrato de sódio (Experimento 2).....	34
Tabela 4 Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo descontínuo utilizando 10mM de nitrato de sódio (Experimento 3).....	35
Tabela 5 Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo descontínuo utilizando 20mM de nitrato de sódio (Experimento 4).....	36
Tabela 6 Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo descontínuo utilizando 30mM de nitrato de sódio (Experimento 5)	37
Tabela 7 Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo descontínuo alimentado utilizando 2mM de nitrato de sódio (Experimento 6)	38
Tabela 8 Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo descontínuo alimentado utilizando 5mM de nitrato de sódio (Experimento 7)	39
Tabela 9 Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo descontínuo alimentado utilizando 10mM de nitrato de sódio (Experimento 8)	40

Tabela 10	Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo descontínuo alimentado utilizando 20mM de nitrato de sódio (Experimento 9)	41
Tabela 11	Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo semi-contínuo utilizando 2mM de nitrato de sódio (Experimento 10)	42
Tabela 12	Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo semi-contínuo utilizando 5mM de nitrato de sódio (Experimento 11)	44
Tabela 13	Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo semi-contínuo utilizando 10mM de nitrato de sódio (Experimento 12)	46
Tabela 14	Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo semi-contínuo utilizando 20mM de nitrato de sódio (Experimento 13)	48
Tabela 15	Teores de lipídios e proteínas médios e correspondentes desvios-padrão das biomassas secas provenientes dos processos de cultivo semi-contínuos ao final do segundo ciclo.....	49
Tabela 16	Resultados médios de concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_x) e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$), e correspondentes valores de desvio padrão, de todos os ensaios realizados.....	50
Tabela 17	Valores médios de concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_x) e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função da molaridade do nitrato de sódio adicionado.....	61
Tabela 18	Valores médios de concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_x) e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função do tipo de processo empregado no cultivo de <i>A. braunii</i>	62

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
SUMMARY.....	3
LISTA DE FIGURAS.....	5
LISTA DE TABELAS.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1 Aspectos nutricionais e composição de biomassa.....	15
3.2 Distribuição geográfica, classificação e morfologia.....	16
3.3 Produção de <i>Ankistrodesmus braunii</i>	17
3.4 Fotobiorreatores e processos de cultivo.....	19
3.4.1. Processo descontínuo (batelada).....	21
3.4.2. Processo descontínuo alimentado (batelada alimentada).....	22
3.4.3 Processo semi-contínuo.....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 Microorganismo.....	25
4.2 Meio de cultivo.....	25
4.3 Preparo de inóculo.....	26
4.4 Dispositivo para cultura.....	26
4.5 Técnicas analíticas.....	27
4.5.1 Determinação da concentração celular.....	27
4.5.2 Determinação e acompanhamento do pH.....	27
4.5.3 Avaliação da biomassa.....	27
4.5.3.1 Determinação da concentração de lipídios totais.....	28
4.5.3.2 Determinação da concentração de proteínas totais.....	28
5. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	29
5.1 Análises dos resultados.....	31
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32

6.1	Curva de calibração para determinação de concentração celular.....	32
6.2	Resultados referentes aos acompanhamentos dos experimentos 1 a 13.....	32
6.2.1	Uso de NaNO ₃ e CO ₂ para cultivo de <i>Ankistrodesmus braunii</i>	52
6.2.2	Cultivos e crescimento de <i>Ankistrodesmus braunii</i> em reator.....	55
6.2.2.1	Cultivo em processo descontínuo.....	55
6.2.2.2	Cultivo em processo descontínuo alimentado.....	56
6.2.2.3	Cultivo em processo semi-contínuo.....	57
6.2.2.3.1	Análise do teor de proteínas e lipídios da biomassa.....	59
6.2.2.4	Análise estatística.....	60
7.	CONCLUSÕES.....	63
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

1. INTRODUÇÃO

Microalgas são encontradas no meio marinho e em água doce, sendo consideradas responsáveis por pelo menos 60% da produção primária da Terra (CHISTI, 2004). O número exato de espécies de microalgas ainda é desconhecido. Atualmente são encontradas citações relatando que podem existir entre 200.000 até alguns milhões de representantes deste grupo. Tal diversidade também se reflete na composição bioquímica e, desta forma, as microalgas são fonte de uma quantidade ilimitada de produtos (NORTON *et al.*, 1996; PULZ & GROSS, 2004). Apresentam elevadas velocidades de crescimento, o que favorece alta produção de biomassa em curtos intervalos de tempo. (CAMPOS *et al.*, 2005). Por isso, apresentam várias possibilidades de aplicações como produção de compostos de interesse na indústria de alimentos, farmacêutica, e cosméticos, tais como suplementos nutricionais para humanos e animais, biomassa microbiana para alimentação animal e uso em aquicultura, bem como formulações farmacêuticas e cosméticas, entre outros (PULZ & GROSS, 2004).

É importante lembrar que organismos fotossintetizantes unicelulares são capazes de utilizar energia luminosa muito mais eficientemente que as plantas (JANSSEN *et al.* 2002) e são eficientes fixadores de gás carbônico (BROWN & ZEILER, 1993). Ademais, por poderem ser cultivadas sob condições controladas, podem apresentar constituição estável (SASSANO *et al.*, 2010), o que facilita a operação industrial. A fixação de gás carbônico por microrganismos fotossintetizantes tem sido proposta como método para remoção do CO₂ liberado na atmosfera e, portanto, esses microrganismos podem ser utilizados na redução da emissão dos gases causadores do efeito estufa (MAEDA *et al.*, 1995). No nosso país, considerando a importância da obtenção de energia a partir de matérias-primas renováveis, a obtenção de biodiesel a partir de microalgas, acoplada ou não à obtenção de moléculas de interesse alimentício, farmacêutico ou cosmético, poderia ao mesmo tempo aproveitar o CO₂ proveniente de fermentação alcoólica, contribuindo para a diminuição de gases de efeito estufa (CARVALHO *et al.*, 2009).

O conteúdo de lipídios da biomassa de microalgas pode variar entre 1 a 40% da massa seca e, em certas condições de cultivo, pode alcançar até 85% (BECKER, 2004).

Os lipídios de microalgas são tipicamente compostos por glicerol, açúcares ou bases esterificadas e ácidos graxos contendo entre 12 e 22 carbonos, podendo ser tanto saturados quanto mono ou poliinsaturados. Os ácidos graxos correspondem à maior fração dos lipídios e, em algumas espécies, os PUFA (“polyunsaturated fatty acids”) representam entre 25 e 60% dos lipídios totais (BECKER, 1988; BROWN, 1991; BECKER, 2004).

A microalga *Ankistrodesmus braunii* tem sido relatada como alta produtora de lipídios, podendo o teor deste componente chegar a até 73% de sua biomassa seca. Produz ácidos graxos de interesse alimentar, sendo que os ácidos α -linolênico e oléico correspondem a 13% e 54% da fração de ácidos graxos, respectivamente. Apresenta composição de ácidos graxos semelhante a óleos vegetais, mas com uma predominância do ácido linolênico sobre o linoléico, o que não é usual em óleos vegetais. Ademais, apresenta em sua composição diferentes pigmentos que apresentam propriedades antioxidantes, como β -caroteno, astaxantina, luteína, bem como um possível derivado de neoxantina (WILLIAMS & MCMILLAN, 1961).

Levando-se em conta a escassez de resultados avaliando fontes de nitrogênio no crescimento de *A. braunii* e que este nutriente tem um papel fundamental na composição de biomassa de microrganismos fotossintetizantes, este trabalho visou fazer tal avaliação, empregando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio em diferentes concentrações e sob diferentes processos de cultivo para a avaliação e conhecimento do perfil do crescimento celular deste microrganismo. O conhecimento dos parâmetros relacionados ao crescimento e a composição da biomassa obtida é importante para a avaliação de possíveis aplicações industriais deste micro-organismo.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve por finalidade analisar o comportamento do crescimento da microalga *Ankistrodesmus braunii* em reator tubular com uso de diferentes concentrações de nitrato de sódio, em diferentes processos de cultivo (descontínuo, descontínuo alimentado e semi-contínuo), tendo como variáveis dependentes a concentração celular máxima, a produtividade em células e o fator de conversão de nitrogênio em células. Também teve por finalidade realizar a determinação dos teores de lipídios e proteínas no processo de cultivo que levou a maiores produtividades em células.

3. REVISÃO DE LITERATURA

A Food and Agriculture Organization (FAO) e a World Health Organization (WHO) recomendam desde 1994 que um organismo humano deve ingerir 3% de ácidos graxos essenciais, principalmente ômega 3 e ômega 6, com base na energia total consumida de 3.000 calorias/dia. Esses compostos devem estar presentes na alimentação diária já que elevados índices de colesterol no sangue podem levar ao surgimento de doenças coronarianas, e uma das formas de se evitar este quadro é aumentar o consumo de ácidos graxos poliinsaturados, os quais podem ser obtidos de microalgas, e diminuição da ingestão de ácidos graxos saturados. (COZZA & COSTA, 2000, apud MORAIS & COSTA, 2008). Diversos estudos indicam que os ácidos graxos poliinsaturados, como o ômega 3, diminuem os riscos de desenvolvimento de doenças coronarianas através de suas ações antiinflamatórias, redução do crescimento de placas de ateroma e diminuição da susceptibilidade de arritmia ventricular (WARD & SINGH, 2005).

Lipídios e ácidos graxos são constituintes de todas as células vegetais, onde atuam como componentes de membrana, produtos de reserva, metabólitos e fontes de energia. Microalgas, porém, apresentam algumas diferenças em relação a plantas superiores. Microalgas respondem a flutuações nas condições de crescimento ou a vários tipos de estresse no meio com variações na composição de ácidos graxos na fração lipídica. Diferentemente das plantas, células de microalgas que acumulam lipídios são as mesmas que executam a fotossíntese e, por isso, a completa via desde a fixação de CO₂ até a síntese de triacilglicerol pode ser ajustada pela mesma célula. Como, nessas condições de estresse, a síntese de lipídio ocorre com a redução da atividade fotossintética, a produção máxima de triacilglicerol seria obtida a partir de duas etapas: 1) rápido crescimento sob condições ótimas seguido por 2) depleção de nitrogênio ou outro fator de estresse que leve a um conteúdo máximo de lipídio nas células (BECKER, 1994).

Dentre os produtos lipídicos da biomassa de microalgas, grande importância tem sido dada à produção de ácidos graxos poli-insaturados, devido principalmente às mudanças na dieta humana nos últimos séculos e ao aparecimento de algumas doenças

relacionadas ao baixo consumo destes compostos, bem como à sua reconhecida importância terapêutica, entre outros benefícios, que trazem à saúde humana, especialmente aqueles da família ômega 3 (DERNER *et al.*, 2006, SIMOPOULOS, 2002, KIY *et al.*, 2005). Esse crescente interesse na relevância nutricional e farmacêutica de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa tem levado ao aumento da demanda por esses lipídios (KIY *et al.*, 2005).

3.1. Aspectos nutricionais e composição de biomassa

É bem conhecido o fato de que biomassa de microalgas constitui uma reserva de compostos naturais de alto valor. Algumas espécies apresentam vias metabólicas que permitem o acúmulo de grande quantidade de compostos como carotenóides, que agem como antioxidantes sob condições de estresse luminoso; sacarose ou prolina, para proteger as células contra alta salinidade; polissacarídeos extracelulares, que protegem a célula da dessecação; e ácidos graxos insaturados, que induzem mudanças na viscosidade da membrana, promovendo proteção contra variações térmicas e salinidade. Os principais produtos atualmente comercializados são carotenóides, ficobilinas, ácidos graxos, polissacarídeos, vitaminas, esteróides entre outros compostos biologicamente ativos (WISNIAK & KORIN, 2005).

No caso de *Ankistrodesmus braunii*, grande atenção deve ser dada a sua composição lipídica devido a seu grande potencial para a produção dos mesmos. Ainda que a maioria dos lipídios produzidos por microalgas apresentem constituição de ácidos graxos similar a óleos vegetais e de peixes, existem muitos ácidos graxos de alto valor agregado que são sintetizados exclusivamente por microalgas (BECKER, 1994). Sendo assim, podem ser consideradas como substitutas em potencial na nutrição humana e animal, assim como servir de matéria prima na produção de suplementos alimentares, nutracêuticos, medicamentos e cosméticos. Além disso, após um processo de extração dos ácidos graxos de interesse, o excedente poderia ser utilizado para produção de biocombustível. Algumas espécies são identificadas como produtoras primárias desses ácidos graxos, contendo um eficiente sistema enzimático para essa biossíntese e, além disso, os ácidos graxos poli-insaturados provenientes de microalgas possuem vantagens

em relação aos provenientes de outras fontes, como os óleos de peixes, já que microalgas produzem diversos tipos de ácidos graxos insaturados, os quais apresentam ausência de odor e possuem melhor potencial para o processo de purificação. (VAN BEELAN *et al.*, 2009). Outros aspectos também devem ser levados em consideração, como a alta estabilidade dos ácidos graxos poli-insaturados de microalgas, quando comparados aos provenientes de outras fontes, além de poderem ser produzidos através de matéria prima renovável. (SIJTSMA & SWAAF, 2004). Particularmente, a microalga *Ankistrodesmus braunii* tem sido relatada como grande produtora de lipídios, podendo o teor deste componente chegar a até 73% de sua biomassa seca, sendo o ácido palmítico, ácido oleico e ácido linolênico os mais abundantes, e o ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico e ácido palmitoleico os encontrados em menor quantidade. (WILLIAMS & McMILLAN, 1961).

3.2. Distribuição geográfica, classificação e morfologia

O gênero *Ankistrodesmus* pertence à família *Selenastraceae* e a espécie *Ankistrodesmus braunii* é um micro-organismo unicelular (Figura 1). Suas células apresentam-se normalmente isoladas ou temporariamente agrupadas, possuem tamanho que podem variar de 20 a 56µm de comprimento e de 5 a 8µm de largura e apresentam formato alongado e fusiforme, com ápices obtusos (JOHN *et al.*, 2002). São provenientes de água doce, sendo estas células encontradas neste tipo de habitat, ou seja, em ambiente aquático que possui baixas concentrações de sais e normalmente mais presentes em águas mais frias. Geograficamente, esta espécie pode ser localizada na região dos Grandes Lagos, na América do Norte, Argentina, Iraque, Taiwan, Austrália e Nova Zelândia. (GUIRY & GUIRY, 2015).

Figura 1. Foto de *Ankistrodesmus braunii*. (Fonte: Elaborado pelo autor.)

3.3. Produção de *Ankistrodesmus braunii*

O cultivo para a produção de células de microalgas e outros microorganismos fotossintetizantes, com o intuito de se obter bioprodutos de interesse para a indústria de alimentos ou farmacêutica, apresenta grandes vantagens quando comparado a outros processos de obtenção destes mesmos bioprodutos como os de origem agrícola, por exemplo, já que o cultivo de células não necessita de solo para tal, evitando-se também problemas como erosão e contaminação do ambiente. (MAIER, *et al.*, 2000).

Ankistrodesmus braunii cresce bem em meios ricos em compostos orgânicos (FIORESI & SIPAÚBA-TAVARES, 2008), o que pode favorecer seu cultivo em larga escala. Considerando que nutrientes podem alterar o crescimento de microrganismos e sua interação com outros organismos (MAY FIELD & INNESS, 1978), e que os nutrientes também alteram sua composição, torna-se importante investigar o efeito deles no crescimento da microalga. Esse tipo de estudo proporciona a aquisição de conhecimentos acerca das vias bioquímicas do microrganismo, o que gera ferramentas

para o desenvolvimento de novos sistemas de produção e bioprodutos de interesse (SIJTSMA & SWAAF, 2004).

A velocidade de crescimento e o rendimento da produção sofrem influência da intensidade luminosa e da duração da irradiação até um limite, que é denominado ponto de saturação luminosa. De acordo com Balloni *et al.* (1980), este ponto está por volta de 60 a 120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. O regime de claro/escurecimento é afetado pela intensidade de agitação do tanque, da turbulência e da densidade populacional (RICHMOND & QIANG, 1997).

Em cultivos de *Arthrospira platensis* submetidos à alta intensidade luminosa, 144 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, aumenta-se a quantidade de polissacarídeos reduzindo a quantidade de lipídios totais e proteínas na biomassa (OLGUÍN *et al.*, 2001). O processo térmico, bem como a exposição da luz, pode afetar o conteúdo de ácidos graxos insaturados e poli-insaturados por causa do processo de oxidação e há evidências que a irradiância possa regular o metabolismo de lipídios. Khotimchenko & Yakovleva (2005) relataram que altas intensidades luminosas estimulam o acúmulo de lipídios de reserva, como o triacilglicerol, enquanto que baixas intensidades luminosas induzem um aumento na quantidade de lipídios estruturais, como fosfatilglicerol, fosfatidilcolina e monogalactosildiacilglicerol. Solovchenko *et al.* (2008) cultivaram a microalga *Parietochloris incisa* sob diferentes intensidades luminosas, advertindo um aumento no conteúdo volumétrico de lipídeos totais e ácido araquidônico, bem como um aumento da biomassa em intensidade luminosa superior.

Na fase lipogênica, o excesso de carbono e um fator limitante de crescimento, geralmente depleção de nitrogênio, são responsáveis pelo acúmulo de lipídios. Com a imposição da limitação de nitrogênio, mantendo-se o fornecimento de luz em excesso, o crescimento é cessado, mas como a fixação de carbono continua, a relação C/N na célula aumenta e o carbono pode ser aproveitado para produção de reserva de materiais não nitrogenados, como triacilgliceróis (COHEN & KHOZIN-GOLDBERG, 2005).

O nitrogênio é o segundo mais abundante constituinte da célula e precisa ser adicionado no meio de cultivo, influenciando tanto no custo deste como no crescimento celular e na composição da biomassa obtida (STANCA & POPOVICI, 1996; GOLDMAN *et al.*, 1982). O tipo e a quantidade da fonte de nitrogênio usada no meio

de cultura têm influência na composição da biomassa, no que diz respeito, principalmente, a proteínas, lipídeos e suas frações, pigmentos, etc.

Assim, percebe-se que ao se modificar determinados fatores das condições de cultivo de organismos fotoautotróficos como concentração de nutrientes, salinidade, luz, temperatura e pH, pode-se obter diferentes resultados relacionados a composição bioquímica da célula cultivada, sendo este tipo de análise um dos focos do presente trabalho.

3.4. Fotobiorreatores e processos de cultivo

Para o cultivo de células com o intuito de se produzir compostos de interesse, são utilizados os biorreatores que são equipamentos nos quais ocorrem uma série de reações químicas catalisadas por biocatalizadores, sendo estes biocatalizadores as células vivas. Os reatores que fazem o uso de células vivas são os mais utilizados e conhecidos hoje em dia, e sua utilização industrial vem sendo realizada desde 1940 para a produção de diversas substâncias como antibióticos, enzimas, vitaminas, ácidos orgânicos e solventes. (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001).

Deve-se ressaltar que os biorreatores podem apresentar características de processos bem distintas, dependendo do micro-organismo utilizado, já que estes podem ser unicelulares ou filamentosos, aeróbios ou anaeróbios, fotoautotróficos ou heterotróficos, e daí vem a importância de se escolher um equipamento mais adequado ao determinado tipo de célula a ser estudada (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001).

Existe uma ampla variedade de biorreatores utilizados para o cultivo de microrganismos fotossintetizantes como cianobactérias e microalgas – alguns deles são utilizados atualmente para produção industrial destes (LEE, 2001). Os fotobiorreatores abertos são os mais comuns, porém, possuem certas desvantagens em relação aos fotobiorreatores fechados, dentre as quais a menor eficiência fotossintética e a menor qualidade dos produtos de interesse obtidos a partir dos microrganismos (VONSHAK & RICHMOND, 1988). A baixa eficiência fotossintética ocorre, principalmente, devido ao efeito de sombreamento quando se atinge alta concentração celular no meio de cultivo,

além de apresentar outro problema como a maior dificuldade de se controlar possíveis contaminações com outros micro-organismos que podem interferir no processo. Sendo assim, há um grande número de estudos na literatura que tem demonstrado que os reatores fechados são mais adequados para o cultivo de micro-organismos fotossintetizantes.

Os fotobiorreatores fechados do tipo “air-lift” são constituídos basicamente de tubos de vidro ou outro material transparente, como o PVC transparente e acrílico, conectados entre si, dentro dos quais passam o meio de cultura com as células a serem cultivadas. Estes tubos devem receber iluminação natural ou proveniente de lâmpadas, uma vez que a energia luminosa é necessária para o cultivo dos micro-organismos fotossintetizantes. O meio circula neste sistema de cima para baixo por gravidade e depois é direcionado para cima novamente, com o auxílio de uma bomba de ar, para iniciar um novo ciclo. Na parte superior do fotobiorreator há um frasco degaseificador, que tem por finalidade receber a suspensão celular e onde é removido o ar que foi inserido no sistema pela bomba de ar.

Por outro lado, os fotobiorreatores abertos são do tipo “tanques” e são feitos a partir de tanques abertos onde todo o volume de meio e células a serem cultivadas irão circular com o auxílio de pás ou bombas, permitindo o fluxo de todo o material em seu interior. Este tipo de fotobiorreator, pelas maiores facilidades de operação e menor custo, permite trabalhar com volumes maiores, havendo tanques cuja capacidade máxima pode atingir volumes da ordem de 1000 m³.

Existem diversos processos de cultivo de micro-organismos, os quais podem variar de acordo com o tipo de equipamento utilizado, finalidade do cultivo e o tipo de células a serem utilizadas no processo. Com relação a estes tipos de processos, há basicamente quatro tipos, como descontínuo, descontínuo alimentado, contínuo e semi-contínuo. Neste trabalho, foram avaliados três desses processos, comentados a seguir.

3.4.1. Processo descontínuo (batelada)

O processo descontínuo, também conhecido como processo em batelada, é um dos mais simples e mais antigos processos de fermentação, sendo utilizado pelo homem desde a Antiguidade e é caracterizado, basicamente, em se adicionar um meio de cultivo, que seja adequado para o desenvolvimento e multiplicação celular de um microorganismo, em um reator, seguida da inoculação dos micro-organismos em questão. Em seguida, o processo é deixado em andamento, não sendo adicionado mais nenhum nutriente até sua finalização, nem soluções ácidas ou alcalinas para correção de pH, e um gás para fornecimento de oxigênio ao sistema, no caso de cultivos aeróbios, mantendo sempre constante o volume. Terminada a fermentação, o meio fermentado segue para os tratamentos finais para que haja remoção dos produtos obtidos. (CARVALHO & SATO, 2001).

Uma das desvantagens deste processo é a obtenção de baixos rendimentos e/ou produtividade já que o substrato adicionado ao meio de uma única vez pode acarretar em inibição da multiplicação celular ou desvio de metabolismo da célula para a síntese de outros componentes que não são de interesse. Outro problema que pode ocorrer ao se fazer uso desta metodologia é a presença de “tempos mortos”, ou seja, períodos de tempo em que a fermentação não está ocorrendo como, por exemplo, carga e descarga da dorna e lavagem e esterilização do fermentador. Em contrapartida, em virtude de ser um processo mais “fechado” e “unificado”, apresenta menores riscos de contaminação externa quando comparados a outros processos, além de permitir maior controle de estabilidade genética dos microorganismos utilizados no processo, melhor identificação de lote de produto e flexibilidade para se fabricar com mais rapidez e agilidade outros produtos de interesse como iogurte, cerveja, vinho, entre outros (CARVALHO & SATO, 2001).

3.4.2. Processo descontínuo alimentado (batelada alimentada)

O processo descontínuo alimentado, também chamado de batelada alimentada, é utilizado desde cerca de 1900 para regular o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* e se baseia na adição de meio de cultivo e inóculo no reator no começo do processo, seguida da adição de um ou mais nutrientes durante o decorrer do processo até o seu fim, ou seja, os nutrientes são adicionados gradualmente à dorna. A vazão de alimentação destes nutrientes pode ser constante ou variar com o tempo fazendo, consequentemente, que o volume de todo o sistema possa variar também. Uma das grandes vantagens desta metodologia é poder se ter um controle maior do metabolismo microbiano já que, com a utilização de diferentes vazões de alimentação da dorna com o nutriente, se pode deslocar uma determinada via metabólica para a produção de um substrato ou outro que se tenha interesse. (CARVALHO & SATO, 2001).

O principal objetivo do uso deste processo é aumentar o rendimento e/ou produtividade do sistema e manter a produção continuamente, sem a presença de “tempos mortos”, quando do uso do processo descontínuo alimentado repetitivo. Também pode-se destacar a prevenção da inibição por substrato ou precursores, minimização da formação de produtos de metabolismo tóxicos, superação de problemas frequentes de estabilidade em processo contínuo, adequação do processo fermentativo a condições operacionais e estudo de cinética de processos fermentativos. A desvantagem é a maior susceptibilidade à contaminação e maior complexidade para se monitorar o sistema.

3.4.3. Processo semi-contínuo

Define-se por processo semi-contínuo, ou processo de batelada repetida, o processo em que, após o término de um cultivo inicial por processo de batelada, haja a remoção de uma fração do meio fermentado e, mantendo no reator o outro restante de meio fermentado, seja adicionado igual volume de meio de cultivo novo no reator, com restauração do volume inicial neste. Ou seja, no processo semi-contínuo, após o

primeiro instante da fermentação, uma parte constante de volume da cultura fermentada é removida em intervalos de tempo pré-estabelecidos, seguida de realimentação do reator com meio novo. (BORZANI, 2001).

As células presentes no meio fermentado que estão dentro do reator servem de inóculo para o início do novo ciclo e, apresentam como vantagem, estarem já devidamente adaptadas, o que evita a fase “lag” do ciclo seguinte, otimizando todo o processo já que se ganha tempo com isso. Outro ponto positivo deste método é ter a possibilidade de operar o fermentador por longos períodos de tempo sem que haja necessidade de se preparar novos inóculos. O fato de ser chamado de semi-contínuo é porque são intermitentes tanto o fluxo de entrada do meio no reator quanto o de saída de material fermentado. (BORZANI, 2001).

Este processo é empregado na indústria para a produção de diversas substâncias de interesse. KUMAR *et al.* (2000) mostraram o emprego deste método para a síntese e aumento da produtividade de lovastina, um metabólito secundário obtido da fermentação do fungo *Aspergillus terreus*, e aplicado no tratamento de hipercolesterolemia.

Já GIRIDHAR & SRIVASTAVA (2001) utilizaram *Gluconobacter oxydans* neste mesmo processo semi-contínuo para efetuarem a conversão de D-sorbitol em L-sorbose, cujo objetivo era eliminar o tempo morto do reator para otimização do processo através do processamento de altas concentrações de sorbitol em tempo mais curto.

O uso de *Sacharomyces cerevisiae* recombinante contendo gene para xilose redutase e adição de glicose sob o processo semi-contínuo para a produção de xilitol foi empregado por BAE *et al.* (2004) aumentando, assim, o rendimento da produção, sendo a concentração final e produtividade de xilitol neste processo maior do que o obtido no processo descontínuo.

A produção de antibióticos, como a penicilina G, por processo semi-contínuo feita por LI *et al.* (2005) possibilitou se manter constantemente no reator as células produtoras destes antibióticos, o que favoreceu a implementação deste método para este tipo de produção.

Levando-se em consideração que a produção de inóculo de *Ankistrodesmus braunii* é demorada em shaker, já que pode levar de 14 a 20 dias, em virtude da lenta

velocidade de multiplicação celular nesta condição, pode-se deduzir que a utilização do processo de cultivo semi-contínuo venha a ser vantajosa para o aumento da produtividade ao se utilizar estes microorganismos específicos já que haverá a redução de “tempos mortos” no reator. Sendo assim, este trabalho visa fazer esta avaliação comparativa para se saber qual é o processo mais efetivo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microorganismo

Ankistrodesmus braunii (UTEX 245), proveniente da Universidade do Texas, cultivado em meio Bold. (BISCHOFF & BOLD, 1963).

4.2. Meio de cultivo

O meio de cultivo utilizado no trabalho foi o BOLD, ou suas variações na concentração de nitrato de sódio (Tabela 1), o qual apresenta os seguintes elementos nas seguintes concentrações:

Sais: 10mL/L

- 1 $\text{NaNO}_3 - 3\text{g}/400\text{mL dH}_2\text{O}$
- 2 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 1\text{g}/400\text{mL dH}_2\text{O}$
- 3 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 3\text{g}/400\text{mL dH}_2\text{O}$
- 4 $\text{K}_2\text{HPO}_4 - 3\text{g}/400\text{mL dH}_2\text{O}$
- 5 $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 7\text{g}/400\text{mL dH}_2\text{O}$
- 6 $\text{NaCl} - 1\text{g}/400\text{mL dH}_2\text{O}$

PIV (Solução de Metais): $6\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$

- 1 $\text{Na}_2\text{EDTA} - 750\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
- 2 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 97\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
- 3 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 41\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
- 4 $\text{ZnCl}_2 - 5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
- 5 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 2\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
- 6 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 4\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

Vitamina B12: $1\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$

- 1 $0,027\text{g}/200\text{mL dH}_2\text{O}$

4.3. Preparo de inóculo

Ankistrodesmus braunii, inicialmente mantido em ágar, foi colhido com o auxílio de uma alça de platina em condições assépticas e inoculado num tubo de ensaio contendo 10mL de meio BOLD durante um período de 7 dias. Após este período, com a multiplicação celular obtida, os 10mL de inóculo foram divididos em 10 partes sendo cada uma delas adicionadas a 200mL de meio BOLD em Erlenmeyers de 500mL de capacidade, previamente esterilizados em autoclave a 1 atm. Todos os frascos foram mantidos em shaker a 110 rpm, numa temperatura de 25 ± 1 °C e expostos a $60 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As amostras resultantes destes processos serviram de inóculo para alimentar o reator tubular nos experimentos seguintes.

4.4. Dispositivo para cultura

O fotobiorreator tubular utilizado foi do tipo *air-lift*, desenvolvido no Laboratório de Tecnologia de Fermentações do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. É constituído de tubos transparentes de diâmetro interno de 1,0 cm que são interligados entre si, acoplados também a uma bomba para impulsionar o fluxo da cultura. O volume total do sistema foi de 3,5 L e o volume iluminado correspondeu a 2,0 L, com fluxo da cultura de $40 \pm 1 \text{ L.h}^{-1}$. A concentração celular inicial foi de 300 mg.L^{-1} . Os cultivos foram realizados em condições assépticas, em temperatura de 25 ± 1 °C (YOO *et al.*, 2010), e submetidos a $60 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Acoplados a cada dispositivo se encontravam ainda um eletrodo para acompanhamento dos valores de pH o qual ficou submerso no meio de cultura e uma sonda ligada a um cilindro de monóxido de carbono para injeção do gás que foi controlado por válvulas solenoides e consequente manutenção dos valores de pH ($7,25 \pm 0,25$).

4.5. Técnicas analíticas

Os experimentos foram acompanhados pelas técnicas analíticas descritas a seguir:

4.5.1. Determinação da concentração celular:

Foi medida por espectrofotometria, com amostras de meio contendo células, analisadas por absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nanômetros (FEMTO 700 PL_μS), e expressa em concentração (massa seca por litro), por meio de uma curva de calibração.

A curva de calibração foi obtida através do uso inicial de 25mL de uma suspensão concentrada de células em fase de crescimento exponencial, que posteriormente foi filtrada e lavada com água destilada em uma membrana de acetato de celulose previamente seca a 70°C por 12 horas e pesada. A amostra foi levada à estufa a 100°C até obtenção de massa constante. Pela diferença entre a massa da membrana com as células secas e a massa da membrana, foi possível obter a massa de células contida no volume filtrado de suspensão celular. A partir desta mesma suspensão, por meio da absorbância a 550 nm de suas diferentes diluições, foi possível obter uma curva que relaciona a concentração celular, expressa em massa seca por litro de suspensão, com absorbância da amostra.

4.5.2. Determinação e acompanhamentos do pH:

O pH foi medido com potenciômetro (METTLER TOLEDO M300), através da imersão do eletrodo nas culturas, e mantido constante nos valores de $7,25 \pm 0,25$ com uso de injeção de gás carbônico no meio com o auxílio de válvula solenoide.

4.5.3. Avaliação da biomassa:

Ao final do cultivo em reator, o volume total retirado do mesmo contendo células e meio de cultivo foi centrifugado, e as células concentradas foram colocadas em placas de cerâmica e secas em estufa com circulação de ar a 55°C por 12 horas. Após a

secagem, as biomassas secas foram trituradas em gral e armazenadas em frascos secos e limpos até serem utilizadas nas posteriores análises.

4.5.3.1. Determinação da concentração de lipídios totais:

O teor de lipídios foi determinado através da extração com solvente orgânico. A amostra de biomassa seca foi triturada em gral e então transferida para um extrator contínuo de Soxhlet com refluxo dos solventes utilizados, clorofórmio e metanol na proporção (2:1) respectivamente, até que a amostra não apresentasse coloração, sendo o extrato recolhido em balão de fundo redondo. Após este período, o solvente foi retirado do balão de fundo redondo com o auxílio de evaporador rotativo e posteriormente feita a pesagem do frasco contendo a amostra. A diferença entre o frasco contendo a amostra e o mesmo frasco sem a amostra permitiu se determinar o teor lipídico.

4.5.3.2. Determinação da concentração de proteínas totais:

A concentração de proteínas foi feita através do método de Micro-Kjeldahl, onde se fez primeiramente uma digestão da amostra desengordurada seca e pulverizada com ácido sulfúrico com adição de catalizador em bloco digestor a 350°C até que o material se apresentasse límpido. Após a digestão se fez a destilação da amostra digerida em destilador de nitrogênio, adicionando hidróxido de sódio a 60% para recuperação do nitrogênio na forma amoniacal em solução saturada de ácido bórico. A amostra resultante foi encaminhada para titulação com ácido clorídrico a 0,02M, para se determinar a concentração de nitrogênio livre da amostra. Para se encontrar o valor de proteína, multiplicou-se o valor de nitrogênio obtido pelo fator de conversão, sendo ele 6,25, e assim se determinou o teor de proteína total presente na amostra.

5. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos realizados (Tabela 1) buscaram avaliar o comportamento do crescimento celular da microalga *Ankistrodesmus braunii* sob influência da variação da concentração de nitrato de sódio no meio de cultivo da mesma, assim como avaliar seu crescimento sob influência do tipo de processo de cultivo empregado. Nos cultivos feitos em batelada, o nitrato foi adicionado uma única vez no início do cultivo. Já nos cultivos em processo descontínuo alimentado o nitrato foi adicionado de 48 em 48 horas, sendo iniciada a adição no primeiro dia do cultivo, e a última adição feita no sexto dia. No processo semi-contínuo, foi esperado ser atingido o primeiro pico de concentração celular máxima para, só então, ser feita a primeira retirada do primeiro volume de meio processado e reinserção de meio novo, seguido do aguardo do segundo pico de concentração celular máxima alcançado (1º ciclo). Neste ponto foi feita segunda retirada de meio processado e reinserção de mais meio novo para que pudesse ser alcançado o terceiro pico de concentração máxima (2º ciclo). Os volumes retirados foram os correspondentes àqueles que proporcionaram o restabelecimento da concentração celular de 300 mg.L⁻¹.

Tabela 1. Experimentos realizados utilizando diferentes processos de cultivo e diferentes concentrações de nitrato de sódio.*

Experimento	Processo	NaNO₃ (mM)
1	Descontínuo	2
2	Descontínuo	5
3	Descontínuo	10
4	Descontínuo	20
5	Descontínuo	30
6	Descontínuo alimentado	2
7	Descontínuo alimentado	5
8	Descontínuo alimentado	10
9	Descontínuo alimentado	20
10	Semi-Contínuo	2
11	Semi-Contínuo	5
12	Semi-Contínuo	10
13	Semi-Contínuo	20

* Cultivos realizados em duplicata

5.1 Análise dos resultados

Todos os cultivos foram avaliados segundo o parâmetro de concentração celular máxima obtida em cada experimento realizado. Adicionalmente, foram avaliados a produtividade em células, bem como o cálculo do fator de conversão de nitrogênio em células, como forma de se obter uma melhor visualização da eficácia dos métodos de cultivos executados. Também foram avaliados os teores de proteínas e lipídios das biomassas nos cultivos semi-contínuos, que levaram aos maiores valores de produtividades em células.

Fórmula empregada para calcular a produtividade em células:

$$P_x = (X_m - X_i) / T_c$$

Onde: P_x = produtividade em células ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)
 X_m = concentração celular máxima obtida (mg.L^{-1})
 X_i = concentração celular inicial (mg.L^{-1})
 T_c = tempo correspondente a X_m (dias)

Fórmula empregada para calcular o fator de conversão de nitrogênio em células:

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

Onde: $Y_{X/N}$ = fator de conversão de nitrogênio em células (mg.mg^{-1})
 X_m = concentração celular máxima obtida (mg.L^{-1})
 X_i = concentração celular inicial (mg.L^{-1})
 V = volume do meio (L)
 N_t = quantidade total de nitrogênio adicionado (mg)

Os resultados foram comparados por meio de análise de variância – ANOVA *two-way* com nível de significância de 0,05, realizada no programa MINITAB 17.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Curva de calibração para determinação de concentração celular

A determinação da concentração celular ao longo dos cultivos foi feita através da correlação entre a absorbância da amostra e a correspondente concentração celular, em massa seca (Figura 2).

Figura 2. Curva de calibração para determinação da concentração de *Ankistrodesmus braunii*.

6.2 Resultados referentes aos acompanhamentos dos experimentos 1 a 13

Nas Tabelas 2 a 14 e as Figuras 3 a 15 são apresentados os valores de concentração celular obtidos (experimentos realizados em duplicata), Na Tabela 15 são apresentados os teores de lipídios e proteínas das biomassas secas provenientes dos processos de cultivo semi-contínuos ao final do segundo ciclo para cada um dos experimentos realizados. Na Tabela 16 são apresentados os parâmetros relacionados ao crescimento celular (concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_x) e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$)) de todos os ensaios realizados.

Tabela 2 - Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo descontínuo utilizando 2mM de nitrato de sódio (Experimento 1)*.

Tempo (Dias)	X (mg.L ⁻¹)	
	1a	1b
0	300	300
1	344	330
2	252	280
3	330	336
4	621	643
5	802	763
6	898	962
7	912	942

*Cultivos em duplicata (Experimentos 1a e 1b)

Figura 3. Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 1 (processo descontínuo utilizando 2mM de nitrato de sódio).

Tabela 3 - Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo descontínuo utilizando 5mM de nitrato de sódio (Experimento 2)*.

Tempo (Dias)	X (mg.L ⁻¹)	
	2a	2b
0	300	300
1	258	292
2	421	428
3	549	555
4	720	736
5	931	935
6	1096	1108
7	1090	1106

*Cultivos em duplicata (Experimentos 2a e 2b)

Figura 4. Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 2 (processo descontínuo utilizando 5mM de nitrato de sódio).

Tabela 4 - Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo descontínuo utilizando 10mM de nitrato de sódio (Experimento 3)*.

Tempo (Dias)	X (mg.L ⁻¹)	
	3a	3b
0	300	300
1	278	294
2	495	504
3	686	698
4	837	847
5	1030	1012
6	1310	1298
7	1292	1278

*Cultivos em duplicata (Experimentos 3a e 3b)

Figura 5. Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 3 (processo descontínuo utilizando 10mM de nitrato de sódio).

Tabela 5 - Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo descontínuo utilizando 20mM de nitrato de sódio (Experimento 4)*.

Tempo (Dias)	X (mg.L ⁻¹)	
	4a	4b
0	300	300
1	310	322
2	435	439
3	701	715
4	1121	1113
5	1339	1351
6	1580	1596
7	1562	1566

*Cultivos em duplicata (Experimentos 4a e 4b)

Figura 6. Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 4 (processo descontínuo utilizando 20mM de nitrato de sódio).

Tabela 6 - Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo descontínuo utilizando 30mM de nitrato de sódio (Experimento 5)*.

Tempo (Dias)	X (mg.L ⁻¹)	
	5a	5b
0	300	300
1	286	300
2	198	180
3	408	391
4	500	514
5	577	589
6	779	788
7	687	697

*Cultivos em duplicata (Experimentos 5a e 5b)

Figura 7. Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 5 (processo descontínuo utilizando 30mM de nitrato de sódio).

Tabela 7 - Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo descontínuo alimentado utilizando 2mM de nitrato de sódio (Experimento 6)*.

Tempo (Dias)	X (mg.L ⁻¹)	
	6a	6b
0	300	300
1	265	270
2	383	391
3	484	457
4	738	746
5	871	863
6	1037	1047
7	1105	1096
8	1078	1073
9	997	1004

*Cultivos em duplicata (Experimentos 6a e 6b)

Figura 8. Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 6 (processo descontínuo alimentado utilizando 2mM de nitrato de sódio).

Tabela 8 - Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo descontínuo alimentado utilizando 5mM de nitrato de sódio (Experimento 7)*.

Tempo (Dias)	X (mg.L ⁻¹)	
	7a	7b
0	300	300
1	196	203
2	262	270
3	298	292
4	537	530
5	863	871
6	1162	1156
7	1196	1206
8	1124	1128
9	1114	1122

*Cultivos em duplicata (Experimentos 7a e 7b)

Figura 9. Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 7 (processo descontínuo alimentado utilizando 5mM de nitrato de sódio).

Tabela 9 - Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo descontínuo alimentado utilizando 10mM de nitrato de sódio (Experimento 8)*.

Tempo (Dias)	X (mg.L ⁻¹)	
	8a	8b
0	300	300
1	202	211
2	236	229
3	352	347
4	631	644
5	1038	1030
6	1375	1377
7	1557	1547
8	1670	1683
9	1580	1573

*Cultivos em duplicata (Experimentos 8a e 8b)

Figura 10. Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 8 (processo descontínuo alimentado utilizando 10mM de nitrato de sódio).

Tabela 10 - Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo descontínuo alimentado utilizando 20mM de nitrato de sódio (Experimento 9)*.

Tempo (Dias)	X (mg.L ⁻¹)	
	9a	9b
0	300	300
1	257	267
2	428	422
3	576	575
4	1149	1136
5	2093	2086
6	2391	2406
7	2748	2758
8	2724	2716
9	2697	2710

*Cultivos em duplicata (Experimentos 9a e 9b)

Figura 11. Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 9 (processo descontínuo alimentado utilizando 20mM de nitrato de sódio).

Tabela 11 - Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo semi-contínuo utilizando 2mM de nitrato de sódio (Experimento 10)*.

Tempo (Dias)	X (mg.L⁻¹)	
	10a	10b
0	300	300
1	268	273
2	369	363
3	432	447
4	776	791
5	855	846
6	1017	1010
7	1115	1120
8	1096	1104
8	300	300
9	363	355
10	800	809
11	1077	1075
12	1118	1126
13	1112	1118
13	300	300
14	475	466
15	813	821
16	1073	1070
17	1116	1111
18	1107	1113

*Cultivos em duplicata (Experimentos 10a e 10b)

Figura 12. Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 10 (processo semi-contínuo utilizando 2mM de nitrato de sódio). A primeira etapa do processo semi-contínuo foi um processo descontínuo, que seguiu com dois ciclos de processo semi-contínuo.

Tabela 12. - Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo semi-contínuo utilizando 5mM de nitrato de sódio (Experimento 11)*.

Tempo (Dias)	X (mg.L⁻¹)	
	11a	11b
0	300	300
1	207	213
2	257	252
3	291	295
4	580	587
5	920	914
6	1169	1166
7	1323	1330
8	1316	1320
8	300	300
9	538	528
10	748	753
11	1247	1255
12	1294	1292
13	1292	1288
13	300	300
14	596	604
15	731	736
16	1162	1156
17	1311	1325
18	1314	1306

*Cultivos em duplicata (Experimentos 11a e 11b)

Figura 13. Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 11 (processo semi-contínuo utilizando 5mM de nitrato de sódio). A primeira etapa do processo semi-contínuo foi um processo descontínuo, que seguiu com dois ciclos de processo semi-contínuo.

Tabela 13 - Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo semi-contínuo utilizando 10mM de nitrato de sódio (Experimento 12)*.

Tempo (Dias)	X (mg.L⁻¹)	
	12a	12b
0	300	300
1	202	197
2	228	227
3	341	346
4	605	595
5	1023	1020
6	1400	1394
7	1582	1579
8	1649	1654
9	1640	1646
9	300	300
10	552	548
11	864	870
12	1290	1287
13	1613	1607
14	1600	1596
14	300	300
15	582	576
16	881	878
17	1322	1331
18	1631	1639
19	1634	1626

*Cultivos em duplicata (Experimentos 12a e 12b)

Figura 14. Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 12 (processo semi-contínuo utilizando 10mM de nitrato de sódio). A primeira etapa do processo semi-contínuo foi um processo descontínuo, que seguiu com dois ciclos de processo semi-contínuo.

Tabela 14 - Concentração celular (X) em função do tempo do cultivo feito em processo semi-contínuo utilizando 20mM de nitrato de sódio (Experimento 13)*.

Tempo (Dias)	X (mg.L⁻¹)	
	13a	13b
0	300	300
1	270	266
2	418	426
3	568	572
4	1158	1152
5	2066	2072
6	2367	2372
7	2542	2547
8	2489	2511
8	300	300
9	611	606,5
10	1142	1151
11	1776	1786
12	2324	2323
13	2318	2324
13	300	300
14	642	650
15	989	979
16	1790	1780
17	2395	2402
18	2400	2392

*Cultivos em duplicata (Experimentos 13a e 13b)

Figura 15. Concentração celular (X) em função do tempo para o experimento 13 (processo semi-contínuo utilizando 20mM de nitrato de sódio). A primeira etapa do processo semi-contínuo foi um processo descontínuo, que seguiu com dois ciclos de processo semi-contínuo.

Tabela 15. Teores de lipídios e proteínas médios e correspondentes desvios-padrão das biomassas secas provenientes dos processos de cultivo semi-contínuos ao final do segundo ciclo.

Concentração de Nitrato de Sódio no meio de cultivo	Teor de Lipídios (%)	Teor de Proteínas (%)
2mM	39,4 ± 0,4	17,3 ± 0,4
5mM	39,2 ± 0,3	52,1 ± 0,1
10mM	38,2 ± 0,1	55,4 ± 0,1
20mM	38,6 ± 0,2	34,8 ± 0,2

Tabela 16. Resultados médios de concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_x) e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$), e correspondentes valores de desvio padrão, de todos os ensaios realizados.

Experimento	Processo	NaNO₃ (mM)	Ciclo	T_c* (Dias)	X_m (mg.L⁻¹)	P_x (mg.L⁻¹.d⁻¹)	Y_{X/N} (mg.mg⁻¹)
1	Descontínuo	2	-	6	930 ± 45	105 ± 7	22,5 ± 1,6
2	Descontínuo	5	-	6	1102 ± 8	134 ± 1	11,5 ± 0,1
3	Descontínuo	10	-	6	1304 ± 8	167 ± 1	7,2 ± 0,1
4	Descontínuo	20	-	6	1588 ± 11	215 ± 2	4,6 ± 0,0
5	Descontínuo	30	-	6	784 ± 6	81 ± 1	1,2 ± 0,0
6	Descontínuo Alimentado	2	-	7	1101 ± 6	115 ± 1	7,1 ± 0,1
7	Descontínuo Alimentado	5	-	7	1201 ± 7	129 ± 1	3,2 ± 0,0
8	Descontínuo Alimentado	10	-	8	1677 ± 9	172 ± 1	2,5 ± 0,0
9	Descontínuo Alimentado	20	-	7	2753 ± 7	351 ± 1	2,2 ± 0,0

Continuação da tabela 16

10	Semi- contínuo	2	D**	7	1118 ± 4	117 ± 1	$29,2 \pm 0,1$
			1º ciclo	4	1122 ± 6	206 ± 1	$29,4 \pm 0,2$
			2º ciclo	4	1114 ± 4	204 ± 1	$29,1 \pm 0,1$
11	Semi- contínuo	5	D	7	1327 ± 5	147 ± 1	$14,7 \pm 0,1$
			1º ciclo	4	1293 ± 1	249 ± 1	$14,2 \pm 0,0$
			2º ciclo	4	1318 ± 10	255 ± 2	$14,5 \pm 0,1$
12	Semi- contínuo	10	D	8	1652 ± 4	169 ± 0	$9,7 \pm 0,0$
			1º ciclo	4	1610 ± 4	328 ± 1	$9,4 \pm 0,0$
			2º ciclo	4	1635 ± 6	334 ± 1	$9,5 \pm 0,0$
13	Semi- contínuo	20	D	7	2545 ± 4	321 ± 1	$8,0 \pm 0,0$
			1º ciclo	4	2324 ± 1	506 ± 0	$7,2 \pm 0,0$
			2º ciclo	4	2399 ± 5	525 ± 1	$7,5 \pm 0,0$

* Tc = Tempo de cultivo (dias).

**D = Descontínuo (Fase anterior ao início do processo semi-contínuo propriamente dito).

6.2.1. Uso de NaNO_3 e CO_2 para cultivo de *Ankistrodesmus braunii*

Diversas substâncias podem ser utilizadas como fonte de nitrogênio para cultivo de micro-organismos fotossintetizantes e, dentre elas, pode-se destacar a uréia, os sais de amônio e os sais de nitrato. Contudo, em virtude das diferenças metabólicas que existem entre a imensidão de espécies de micro-organismos fotossintetizantes que existem, opta-se por uma ou outra fonte de nitrogênio tendo em vista maior eficiência da célula para metabolizar este nutriente.

De acordo com MATSUDO (2006), para o cultivo de *Arthrospira platensis*, o uso de uréia como fonte de nitrogênio pode ser muito vantajoso em comparação ao uso de outras substâncias. Isto ocorre pois em meios alcalinos, onde esse micro-organismo é cultivado, a uréia sofre hidrólise gerando amônia, que é rapidamente aproveitada por estas células, diferentemente do que ocorre com o nitrato de sódio onde a célula necessita reduzi-la a nitrito inicialmente para depois convertê-lo em amônia, o que ocasiona, assim, em maiores gastos energéticos (HATORI & MYERS, 1966).

No caso do cultivo de *Ankistrodesmus braunii*, por se tratar de uma espécie proveniente de água doce, onde há presença de nitratos, o uso de uréia já não se mostra tão vantajoso como no caso do cultivo de *Arthrospira platensis*, optando-se, então, pelo uso de nitrato de sódio para cultivo da microalga em estudo neste trabalho.

Sabe-se que a assimilação de nitrogênio por micro-organismos fotossintetizantes, como as microalgas, tem grande efeito no seu metabolismo quando se diz respeito à fotossíntese e a síntese de uma ampla variedade de substâncias. A adição de nitrogênio, sob a forma de nitrato de sódio, no meio de cultivo, causa rápido crescimento da síntese de aminoácidos pela célula (TURPIN *et al.*, 1988). A falta deste nutriente também implica em consequências para o micro-organismo. No caso de microalgas do gênero *Ankistrodesmus*, a carência de nitrogênio faz com que eles passem a acumular componentes intracelulares como os carotenoides (STEWART, 1974). Outras espécies como *Nannochloropsis oculata* e *Chlorella vulgaris* foram estudadas para se avaliar o efeito da redução de 75% da concentração de nitrogênio em seus respectivos cultivos e foi verificada a produção do dobro de lipídios por elas nestas condições (CONVERTI *et al.*, 2009).

Primeiramente, procurou-se avaliar em qual faixa de concentração de nitrato de sódio dissolvido no meio esta microalga iria apresentar melhores resultados de crescimento celular em vista da grande importância da presença de nitrogênio para o desenvolvimento e multiplicação deste micro-organismo e, sendo assim, foi estipulado inicialmente valores que variaram desde uma quantidade baixa até uma mais alta que foram, respectivamente, de 2mM, 5mM, 10mM, 20mM e 30mM de NaNO_3 , adicionados aos meios de cultura para cultivo nos reatores.

O controle dos valores de pH em todos os cultivos realizados nos reatores tubulares, mantendo as células dentro da faixa de 7,0 a 7,5, foi de suma importância para a preservação destas, já que foi relatada que a atividade da enzima nitrato redutase, presente nos organismos fotossintetizantes para a assimilação de nitrogênio por eles, sofre clara influência de valores de pH. Isto foi observado por HIPKIN & SYRETT (1977), cujo trabalho avaliou, entre outras questões, a influência que o pH exerce na atividade da enzima nitrato redutase em células congeladas e descongeladas dos micro-organismos *Ankistrodesmus braunii* e *Chlorella*. Essas células foram preparadas e incubadas em valores de pH que variaram de 5,0 a 9,0. A atividade da enzima variou de acordo com a variação dos valores de pH e isto ocorreu de maneira diferente para cada espécie avaliada. No caso de *Ankistrodesmus braunii*, a atividade ótima da enzima nitrato redutase ocorreu no valor de pH de 7,4 e a atividade se apresentou mais baixa em valores acima e abaixo deste, como mostra a Figura 16b. Adicionalmente, ao contrário de *Chlorella vulgaris*, a atividade da nitrato redutase de *Ankistrodesmus braunii* não sofreu influência da presença de malato, que leva a formação de NADH.

Figura 16. Variação da atividade da enzima nitrato redutase sob efeito da variação do pH em células congeladas e descongeladas de *Chlorella* (a) e *Ankistrodesmus braunii* (b). Os dados em forma triangular representam a atividade da enzima na ausência de malato e os dados em forma de círculo representam a atividade da mesma enzima na presença do malato. Fonte: HIPKIN & SYRETT (1977).

Com base nesta discussão anterior, em todos os ensaios foi feita a manutenção dos valores de pH fixando estes entre 7,0 e 7,5, como descrito no item 4.5.2 deste trabalho, o que possibilitou rápida velocidade de crescimento da microalga, assim como a preservação da mesma.

Além do uso de gás carbônico para manter o meio de cultivo dentro da faixa de pH desejada, deve-se destacar também a grande importância do aproveitamento desta substância como forma de reduzir sua emissão na atmosfera. É importante lembrar que organismos fotossintetizantes unicelulares são eficientes fixadores de gás carbônico (BROWN & ZEILER, 1993), e esta fixação tem sido proposta como método para remoção do CO₂ liberado na atmosfera e, portanto, esses microrganismos podem ser utilizados na redução da emissão dos gases causadores do efeito estufa (MAEDA *et al.* 1995). No nosso país, considerando a importância da obtenção de energia a partir de

matérias-primas renováveis, a obtenção de substâncias de interesse a partir de microalgas poderia ao mesmo tempo aproveitar o CO₂ proveniente de fermentação alcoólica, contribuindo para a diminuição de gases de efeito estufa (CARVALHO *et al.*, 2009).

6.2.2. Cultivos e crescimento de *Ankistrodesmus braunii* em reator

Todos os cultivos foram avaliados segundo o parâmetro de concentração celular máxima obtida (X_m) em função do tempo de cultivo (dias) em cada experimento feito. Os resultados de concentração celular foram obtidos em cada experimento, assim como a produtividade em células (P_x) e o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$), podendo-se, assim, elaborar de um modelo padrão que melhor se aproxima da melhor condição de cultivo desta microalga para que haja maior crescimento celular e consequente maior produção de bioprodutos de interesse.

6.2.2.1 Cultivo em processo descontínuo

O processo de cultivo que foi utilizado inicialmente foi o descontínuo (batelada), em virtude de ser um processo mais simples de ser conduzido, já que nele o meio de cultivo e o inóculo são adicionados uma única vez no reator e sem a necessidade de adição de nutrientes posteriormente. Dentro destas condições, a concentração celular máxima obtida (X_m) foi de $1588 \pm 11 \text{ mg.L}^{-1}$ de células, que corresponde ao cultivo em reator utilizando 20mM de NaNO₃. O cultivo de microalgas com 30mM adicionados inicialmente no processo não se mostrou eficaz já que a concentração celular máxima obtida foi de $784 \pm 6 \text{ mg.L}^{-1}$, fato que pode ser explicado por inibição de crescimento celular por excesso de nitrogênio no meio. Sendo assim, os testes seguintes foram conduzidos de modo a não se utilizar quantidades de NaNO₃ superiores a 20mM. Em todos os casos houveram fases lag, que chegaram até a 3 dias, sendo mais pronunciadas nos experimentos com uso de menor e maior concentração de nitrato de sódio adicionada. No caso do experimento com 2mM de NaNO₃, ao contrário do experimento

com 30mM de NaNO_3 , houve deficiência de fonte de nitrogênio, o que levou, inclusive a uma fase lag mais longa (3 dias) que no experimento com uso de 30mM de NaNO_3 (2 dias). Pode-se observar que no processo descontínuo a produtividade em células (P_x) alcança valor máximo de $215 \pm 2 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ no cultivo contendo 20 mM de nitrato de sódio e o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) decresce com o uso de maiores quantidades deste mesmo nutriente. O valor máximo obtido de conversão foi de $22,5 \pm 1,6 \text{ mg.mg}^{-1}$ no cultivo utilizando 2mM de NaNO_3 .

6.2.2.2 Cultivo em processo descontínuo alimentado

Sabendo-se que o processo de batelada, apesar de ser mais simples de ser conduzido, possui suas desvantagens e, dentre elas, se obter menores rendimentos quando comparados a outros processos, foram realizados os mesmos testes em processo descontínuo alimentado (batelada alimentada), cujo objetivo foi averiguar uma possível melhora dos índices de crescimento microbiano, devido ao fato de haver reposição do nutriente ao longo do cultivo microbiano. Com o intuito de se confirmar a tendência dos valores obtidos nos primeiros experimentos, as concentrações de NaNO_3 utilizadas nos cultivos em batelada alimentada foram de 2mM, 5mM, 10mM e 20mM pois em 30mM foi observada inibição de crescimento previamente, sendo esta quantidade descartada para nova análise.

Na batelada alimentada, o meio de cultura e inóculo são adicionados ao reator inicialmente, com posterior adição de nutrientes em intervalos de tempo pré-estabelecidos, fazendo com que o microrganismo tenha contato com este nutriente de forma mais contínua, o que poderia otimizar seu crescimento, fato que foi observado já que a concentração celular máxima obtida dentro deste processo foi de $2753 \pm 7 \text{ mg.L}^{-1}$ no reator onde foi adicionado 20mM de NaNO_3 .

A produtividade em células (P_x) foi crescente neste processo, proporcionalmente ao aumento da concentração de NaNO_3 presente no meio, podendo-se observar um valor máximo de $351 \pm 1 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ com o uso de 20mM de nitrato. Já com o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$), neste caso, foi observada uma diminuição de

seu valor nos cultivos com quantidades maiores de nitrato, sendo o maior valor obtido de $7,1 \pm 0,1 \text{ mg.mg}^{-1}$ com o uso de 2 mM de nitrato.

Com base nestes experimentos realizados, foram obtidas informações que puderam indicar qual a concentração ideal de NaNO_3 para ser adicionada ao cultivo assim como o tipo de processo mais adequado. Ambas as informações foram de suma importância pois através delas já pode-se ter um direcionamento para saber quais as melhores condições de cultivo do *Ankistrodesmus braunii*. Porém, em todos os cultivos realizados ainda foi observada a prevalência da fase “lag” no início de todos os processos, período onde há adaptação das células no reator. Esta fase se caracterizou predominantemente por queda do número de células nos dois primeiros dias de cultivo seguida de crescimento celular a partir do terceiro dia. No entanto, no caso do experimento com uso de 2mM de NaNO_3 , ficou evidenciada a diminuição da fase lag, que provavelmente foi favorecida pelo fornecimento da fonte de nitrogênio de forma parcelada, diminuindo, assim, o efeito da carência deste nutriente.

6.2.2.3 Cultivo em processo semi-contínuo

Com o objetivo de otimizar o processo ainda mais, tendo em vista a redução da fase lag, com consequente aumento da produtividade em células, optou-se por fazer testes de cultivo no processo semi-contínuo. Este processo tem como característica principal a retirada de uma quantidade de meio contendo células do reator após se atingir um valor de estabilização da concentração celular máxima (fase de processo descontínuo), seguida de reabastecimento do reator com meio de cultivo novo no mesmo volume que foi retirado anteriormente, retornando à concentração celular inicial do reator, que neste trabalho foi fixado em 300 mg.L^{-1} (início do primeiro ciclo). Ele é denominado semi-contínuo, pois os nutrientes não são adicionados continuamente pelo mosto, com concomitante retirada de meio, mas, de tempos em tempos, há uma retirada de grande volume meio contendo células, seguida de realimentação deste mesmo volume, porém agora de meio novo. Com este processo, pode-se aproveitar as células já adaptadas deixadas no reator, eliminando a fase “lag” nos cultivos subsequentes. Da mesma forma, por serem desprezíveis o tempo de descarga e carga frente ao tempo de

processo, evita-se o “tempo morto”, que é caracterizado pelo tempo em que o reator não está sendo usado para o cultivo microbiano propriamente dito.

Os testes que foram feitos no processo semi-contínuo seguiram a mesma ordem no sentido de concentração de NaNO_3 adicionadas inicialmente nos reatores para se verificar ainda se o crescimento celular da microalga iria seguir a mesma tendência dos demais. A concentração celular máxima obtida dentre os processos semi-contínuos realizados foi de $2399 \pm 5 \text{ mg.L}^{-1}$ ao final do segundo ciclo quando adicionado 20mM de NaNO_3 no meio.

Inicialmente, na fase de batelada, todos os experimentos do processo semi-contínuo apresentaram fase “lag”, já que a adaptação inicial da microalga é inevitável, durando uma média de dois a três dias. Contudo, após o primeiro corte, que é feito logo quando se obtém o primeiro valor de estabilização da concentração máxima de células, foi observada a ausência da fase lag com o reinício do cultivo em 300 mg.L^{-1} de células. As células já adaptadas ao meio de cultura e ao reator foram capazes de se multiplicarem numa velocidade muito maior, atingindo níveis máximos de concentração celular em menos dias do que quando inoculadas inicialmente do reator. Foi observada uma média de três a quatro dias a menos para as microalgas alcançarem máximo número de células nos reatores dentro deste processo de cultivo.

A produtividade em células foi uma função crescente da molaridade de nitrato de sódio (Tabela 16), sendo que os maiores valores encontrados ($P_x = 525 \pm 1 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) foram quando do uso de 20 mM deste nutriente. Isto ocorreu devido ao aumento da quantidade de células formadas no decorrer do cultivo sem que houvesse um tempo maior para esta ocorrência.

Em todos os processos de cultivo foi observado que, independentemente do tipo de processo empregado, há um decréscimo do valor de $Y_{X/N}$ conforme se adiciona NaNO_3 no meio, sendo que no processo de batelada alimentada há uma diminuição significativa do valor de $Y_{X/N}$ quando comparados aos valores do mesmo nos processos de cultivo em batelada e semi-contínuo. Desta forma, verifica-se que a quantidade de nitrogênio que se converte em células tende a diminuir com o aumento da concentração de nitrato adicionado ao meio. A tendência de diminuição de $Y_{X/N}$ com o aumento da quantidade de nitrogênio adicionada ao meio de cultivo já havia sido observada por

Carvalho *et al.* (2004), em trabalho com *Arthrospira platensis* com uso de cloreto de amônio como fonte de nitrogênio em fotobiorreator aberto.

6.2.2.3.1 Análise do teor de proteínas e lipídios da biomassa para o processo semi-contínuo

Devido a microalga *Ankistrodesmus braunii* ser promissora no que se diz respeito à produção de uma ampla variedade de substâncias de interesse industrial, buscou-se avaliar quais os teores de proteínas e lipídios encontrados nestas células. A biomassa proveniente do processo onde foi obtido maior crescimento celular, sendo ele o semi-contínuo, foi analisada para se determinar suas concentrações de lipídios e proteínas, elementos os quais podem ter alto valor agregado no mercado.

Ao final do segundo ciclo do processo semi-contínuo, que obteve a melhor produtividade em células quando comparados aos outros processos realizados, a biomassa resultante foi levada à estufa para obtenção da massa seca que continha as proteínas e lipídios a serem analisados.

Nas amostras onde o cultivo foi feito utilizando-se 2 e 5mM de nitrato de sódio foram obtidos valores da ordem de 39% de lipídios, enquanto nas amostras onde o cultivo foi feito utilizando-se 10 e 20mM de nitrato de sódio foram obtidos valores da ordem de 38% de lipídios. Assim, pode-se perceber que não houve uma diferença significativa da quantidade de lipídios produzidas em todos os cultivos, podendo-se confirmar que a quantidade de nitrogênio não exerceu influência na síntese deste composto.

Com relação aos teores de proteínas, cuja técnica foi feita pelo método de Micro-Kjeldhal, obteve-se diferença significativa de valores obtidos nos cultivos realizados. No cultivo utilizando 2mM de nitrato de sódio o teor de proteínas obtido foi de $17,3 \pm 0,4\%$, enquanto no cultivo usado 5mM de nitrato se conseguiu um valor de $52,1 \pm 0,1\%$ de proteínas. Já com 10mM de nitrato de sódio usado no cultivo foi obtido $55,4 \pm 0,1\%$ de proteínas e com 20mM de nitrato de sódio usado no último cultivo se obteve 34,6% de proteínas. Enquanto que no experimento correspondente ao uso de

2mM de NaNO_3 , a diminuição do teor proteico na biomassa foi decorrente da baixa quantidade de nitrogênio adicionado, a maior quantidade de nitrogênio pode ter levado a uma diminuição do conteúdo do teor de proteínas nas células quando do uso de 20mM da fonte de nitrogênio. Assim, pode-se observar que a quantidade de nitrato de sódio adicionado pode interferir diretamente no teor de proteínas produzidos pelas células no cultivo já que o mesmo fornece à célula o nitrogênio, elemento o qual é indispensável para a síntese de aminoácidos, que por sua vez, formam as proteínas.

Considerando-se um volume de produção de 1000 m^3 , e levando-se em conta que as produtividades em células obtidas sejam mantidas, com concentrações de nitrogênio de 10 mM e 20 mM, pode-se estimar que a produção anual de biomassa seria da ordem de 122 e 192 toneladas, respectivamente. Adicionalmente, considerando os teores proteicos dessas biomassas, poder-se-ia produzir quantidades proteicas da mesma ordem de grandeza para ambas as condições experimentais (de 67 a 68 toneladas de proteínas). Desse modo, o uso de 20 mM de nitrato de sódio, por permitir maior produção de lipídios (73 toneladas) que quando do uso de 10 mM deste nutriente (46 toneladas de lipídios), seria mais vantajoso no tocante à produção de moléculas de interesse industrial.

6.2.2.4 Análise estatística

Visando à comparação dos tipos de processos de cultivo empregados, foi realizada análise estatística onde foram considerados os resultados dos processos descontínuos referentes à primeira parte do trabalho experimental (experimentos 1 a 4) e da primeira etapa dos cultivos por processos semi-contínuos (experimentos 10 a 13), os resultados obtidos nos experimentos descontínuos alimentados (experimentos 6 a 9), bem como os resultados do segundo ciclo do processo semi-contínuo.

Houve influência da molaridade na concentração celular máxima (X_m) obtida, sendo que o maior valor médio obtido foi com 20 mM, correspondente a 2355 mg.L^{-1} (Tabela 17). Esta mesma tabela também mostra que essa tendência foi mantida para a produtividade em células, o que era esperado em função dos tempos de cultivo, para um mesmo processo, não diferenciarem muito. Com relação ao fator de conversão de

nitrogênio em células, os maiores valores encontrados foram com 2 mM de NaNO_3 (Tabela 16), sendo que houve uma tendência de decréscimo dos valores de $Y_{X/N}$ com o aumento da molaridade do nitrato de sódio (Tabela 17).

Tabela 17. Valores médios de concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_x) e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função da molaridade do nitrato de sódio adicionado.*

Concentração molar (mM)	X_m médio (mg.L ⁻¹)	P_x média (mg.L ⁻¹)	$Y_{X/N}$ médio (mg.mg ⁻¹)
2	1099 ^C	150 ^C	21,3 ^A
5	1271 ^{B, C}	181 ^{B, C}	10,3 ^B
10	1601 ^B	225 ^B	6,5 ^{B, C}
20	2355 ^A	367 ^A	4,9 ^C

*Valores médios numa mesma coluna seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando um intervalo de confiança de 95%.

Na avaliação do efeito do tipo de processo no cultivo, observou-se que a concentração celular máxima (X_m) obtida não variou entre eles (Tabela 18). Por outro lado, a produtividade em células (P_x), foi dependente do tipo de processo empregado, com clara vantagem do uso do processo semi-contínuo, decorrente do menor tempo de cultivo quando do uso deste. Com relação ao fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$), fica evidente que o processo descontínuo alimentado levou aos menores valores desta variável. Isto foi decorrente da adição de maiores quantidades de nitrogênio que foram adicionadas neste processo sem que houvesse um incremento da quantidade de células formadas.

Tabela 18. Valores médios de concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_x) e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função do tipo de processo empregado no cultivo de *A. braunii*.*

Processo de cultivo	X_m médio (mg.L⁻¹)	P_x médio (mg.L⁻¹)	$Y_{X/N}$ médio (mg.mg⁻¹)
Descontínuo	1446 ^A	150 ^C	13,4 ^A
Descontínuo alimentado	1683 ^A	181 ^{B, C}	3,8 ^B
Semi-contínuo	1616 ^A	367 ^A	15,2 ^A

*Valores médios numa mesma coluna seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando um intervalo de confiança de 95%.

7. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram avaliados a concentração de nitrato de sódio e o tipo de processo no cultivo da microalga *Ankistrodesmus braunii*. Os maiores resultados de concentração celular máxima (X_m) e produtividade em células (P_x) foram obtidos quando o cultivo foi submetido a uma concentração de 20mM de nitrato de sódio em todos os processos empregados. Nestas condições foram obtidos valores de X_m iguais a 1588 ± 11 , 2753 ± 7 e 2399 ± 5 mg.L⁻¹ nos processos descontínuo, descontínuo alimentado e semi-contínuo respectivamente. Os valores de P_x obtidos foram iguais a 215 ± 2 , 351 ± 1 e 525 ± 1 mg.L⁻¹.d⁻¹ nos processos descontínuo, descontínuo alimentado e semi-contínuo, respectivamente. Ensaios realizados com processo descontínuo com concentração de nitrato de sódio de 30mM levou a uma inibição do crescimento celular. Concentrações inferiores a 20mM não se mostraram tão eficientes para que altas concentrações celulares e produtividades pudessem ser alcançadas independentemente do processo de cultivo utilizado.

Os processos descontínuo e descontínuo alimentado levaram à fase lag, retardando o tempo total de processo. No entanto, o processo semi-contínuo permitiu a eliminação desta fase de crescimento, diminuindo o tempo de cultivo.

O tipo de processo de cultivo empregado não influenciou na concentração celular máxima obtida, mas levou a diferentes valores de produtividade em células e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$). As maiores produtividades em células ($P_x = 525 \pm 1$ mg.L⁻¹.d⁻¹) foram obtidas no processo semi-contínuo com 20mM de NaNO₃. Os maiores valores de $Y_{X/N}$ foram obtidos nos processos descontínuo e semi-contínuo com 2mM de NaNO₃, correspondentes a $22,5 \pm 1,6$ e $29,2 \pm 0,1$ mg.mg⁻¹. Foi observado que, independentemente do tipo de processo empregado, há um decréscimo do valor do fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) com o aumento da adição de NaNO₃.

No processo semi-contínuo, o teor de proteínas aumentou com o uso de maiores concentrações de nitrato de sódio até o limite de 10mM, condição na qual se obteve um teor proteico de $55,4 \pm 0,1\%$ de proteínas. Com o uso de 20mM de nitrato de sódio obteve-se um teor proteico da biomassa de 34,6%. Os teores lipídicos das biomassas

chegaram a valores da ordem de 38 a 39%, independentemente da quantidade de nitrato de sódio utilizado.

Com base em todos os resultados obtidos neste trabalho, pode-se então sugerir que para o cultivo da microalga *Ankistrodesmus braunii* seja utilizado o processo de cultivo semi-contínuo em reator tubular, em vista da otimização do tempo de cultivo, com o uso de nitrato de sódio na concentração de 20mM já que com o uso deste nutriente nesta concentração se obteve maiores concentrações celulares e produtividades em células.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 14th ed. Arlington: AOAC, 1984, p. 1141.
- BALLONI, W.; TOMASELLI, L.; GIOVANNETTI, L.; MARGHERI, M.C. **Biologia fondamentale del genere *Spirulina***. In: Atti del Convegno: Prospettive della coltura di *Spirulina* in Italia, 1980, p.49-82.
- BAE, S. M.; PARK, Y. C.; LEE, T. H.; KWEON, D.H.; CHOI, J. H.; KIM, S. K.; RYU, Y.; SEO, J. H. Production of xylitol by recombinant *Sacharomyces cerevisiae* containing xylose reductase gene in repeated fed-batch and cell-recycle fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**. 2004, v. 35, p. 545-549.
- BECKER E W. **Microalgae - Biotechnology and Microbiology**. New York: Cambridge University Press, 1994, p. 293.
- BECKER, E.W. Micro-algae for human and animal consumption. In: Borowitzka, M.A.; Borowitzka, L.J. (Eds). **Micro-algal biotechnology**. Cambridge: Cambridge University, 1988. p.222-256.
- BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: Richmond, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. London: Blackwell Science, 2004. p. 312-351.
- BISCHOFF H W, BOLD H C. **Phycological Studies. IV. Some Algae from Enchanted Rock and Related Algae Species**. Texas: University of Texas Publications, 1963, n. 6318, p. 1-95.
- BORZANI, W. Fermentação Semicontínua. In: SCHMIDELL NETTO, W.; ALMEIDA-LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., coord. **Biotecnologia Industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v.2, p. 219-222.
- BROWN L M, ZEILER K G. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. **Energy Conv Manag**, 1993, v. 34, p. 1005-1013.

- BROWN, M.R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 1991, v.145, p.79- 99.
- CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Fermentação descontínua. In: SCHMIDELL NETTO, W.; ALMEIDA-LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., coord. **Biotecnologia Industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v.2, p. 193-204.
- 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. **J. Phycol.**, v. 40, p. 589-597, 2004.
- CARVALHO, J. C. M.; SATO, S.; CONVERTI, A.; BEZERRA, R.P.; MATSUDO, M. C.; VIEIRA, D. C. M.; FERREIRA, L. S.; RODRIGUES, M. S. Método de aproveitamento de dióxido de carbono e seu uso no cultivo de microrganismos fotossintetizantes. PI 0805123-2. Protocolada em 19 de novembro de 2008. RPI No1988, p. 82, item 2.1, 22/4/2009.
- CAMPOS, V. B.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.2, p.339-347, fev, 2010.
- 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.
- CHISTI, Y. Microalgae: our marine forests. Book reviews. RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. p. 566.
- COHEN, Z.; KHOZIN-GOLDBERG, I. Searching for PUFA-Rich Microalgae. In: COHEN, Z.; RATLEDGE, C. (Eds.) **Single Cell Oils**. Champaign: AOCS Press. 2005. p. 53-72.
- CONVERTI, A.; CASAZZA, A.A; ORTIZ, E.Y.; PEREGO, P.; BORGHI, M.D. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**. Elsevier, 2009.

- DAY, S.A., Wickham, R.P., Entwisle, T.J. & Tyler, P.A. (1995). Bibliographic checklist of non-marine algae in Australia. *Flora of Australia Supplementary Series* 4: i-vii, p. 1-276.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S.M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**. v. 36, p. 1959-1967. 2006.
- FIORESI, T.B.; SIPAÚBA-TAVARES, L.H. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (Chlorophyta) em laboratório à base de esterco suíno. **Biotermas**, v. 21, p. 7-16, 2008.
- GIRIDHAR, R.; SRIVASTAVA, A.K. Repeated fed-batch sorbose fermentation by *Gluconobacter oxydans*. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**. v. 15, p. 127-129, 2001.
- GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M. 2015. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; acessado em 13 novembro de 2015.
- 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**, v. 24, p. 619 - 631, 1982.
- HARTMAN L, LAGO R C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab Prat**, 22, 475-476, 1973.
- HATORI, A; MYERS, J. Reduction of nitrate and nitrite by subcellular preparations of *Anabaena cylindrica*. I. Reduction of nitrite to ammonia. **Journal of Plant Physiology**. v. 41, p. 1031, 1966.
- HIPKIN, C.R.; SYRETT, P.J. Nitrate reduction by whole cells of *Ankistrodesmus braunii* and *Chlamydomonas reinhardtii*. **Department of Botany and Microbiology, University College of Swansea. New Phytol.** 79. p. 639 – 648, 1977.
- IAL Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. V. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 4 ed, 1 ed digital. São Paulo: IMESP, 1985. p. 105-106.

- JAMES, C. M.; AL-HINTY, S.; SALMAN, A.E. Growth and ω -3 fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. **Aquaculture**, v.77. p. 337-351, 1989.
- JANSSEN M, TRAMPER J, MUR L R, WIJFFELS, R H. Enclosed Outdoor Photobioreactors: Light Regime, Photosynthetic Efficiency, Scale-Up, and Future Prospects. **Biotech Bioeng**, 81, 2, 2002.
- JOHN, D.M., WHITTON, B.A. & BROOK, A.J. Eds. The Freshwater Alga Flora of The British Isles. An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae. **Cambridge: Cambridge University Press**, p. 338. 2002.
- KHOTIMCHENKO, S.V.; YAKOVLEVA, I.M. Lipid composition of the red alga *Tichocarpus crinitus* exposed to different levels of photon irradiance. **Phytochemistry**, v.66, p.73–79, 2005.
- KIY, T.; RUSING, M.; FABRITIUS, D. Production of Docosahexaenoic Acid by the Marine Microalga, *Ulkenia* sp. In: Cohen, Z.; Ratledge, C. (Eds.) Single Cell Oils. **Champaign: AOCS Press**. 2005. P. 99-106.
- KUMAR, M.S.; JANA, SK.; SENTHIL, V.; SHASHANKA, V.; KUMAR, S.V.; SADHUKHAN, A.K. Repeated fed-batch process for improving lovastatin production. **Process Biochemistry**. v.36, p. 363-368, 2000.
- 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.
- LEE, Y.K. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, p. 307 - 315, 2001.
- LI, X. B.; ZHAO, G. R.; YUAN, Y. J. A strategy of phosphorus feeding for repeated fed-batch fermentation of penicillin G. **Biochemical Engineering Journal**. v. 27, p. 53-58, 2005.
- LICHTENTHALER H K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic iomembranes. In: Packer L, Douce R. (Eds). **Methods in Enzymology**. Washington: Academic Press, 1987, vol. 148, p. 350-382.
- MAIER, R. M.; PEPPER, I. L.; GERBA, C.P. Environmental Microbiology. San Diego: Academic Press. 2000. p. 143-145.

- MATSUDO, M.C. Cultivo de *Spirulina platensis* por processo descontínuo alimentado repetitivo utilizando uréia como fonte de nitrogênio. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP São Paulo, 2006.
- MAYFIELD, C.I.; INNISS, W.E. Interactions Between Freshwater Bacteria and *Ankistrodesmus braunii* in Batch and Continuous Culture. **Microbial Ecology**, v. 4, p. 331-344, 1978.
- MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.32, n.4, p.1245-1251, jul./ago., 2008.
- NORTON, T.A et al. Algal biodiversity. **Phycologia**, n.35, p.308–326, 1996.
- 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.
- 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. **J Food Eng**, 56, 371-375, 2003.
- PELIZER LH, SASSANO CE, CARVALHO JCM, SATO S, GIOIELLI LA, MORAES IO. Padronização do método de secagem da biomassa de *Spirulina platensis*. **Rev Farm Quim**. v.32. p. 37-40. 1999.
- PULZ O, GROSS W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiol Biotechnol**, 65, 635-648, 2004.
- RICHMOND, A.; QIANG, H. Principles for efficient utilization of light for mass production of photoautotrophic microorganisms. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 63/65, p. 649–658, 1997.
- RODRIGUES-RACK, J.; GIOIELLI, L.A. Lipídios modificados obtidos a partir de gordura do leite, óleo de girassol e ésteres de fitosteróis para aplicação em spreads. **Química Nova**. v. 31, p. 1960-1965. 2008.

- SASSANO, C.E.N.; GIOIELLI, L.A.; FERREIRA, L.S.; RODRIGUES, M.S.; SATO, S.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J.C.M. Evaluation of the composition of continuously-cultivated *Arthrospira (Spirulina) platensis* biomass using ammonium chloride as nitrogen source. **Biomass and Bioenergy**. v. 34, p. 1732-1738, 2010.
- SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e processos fermentativos. In: SCHMIDELL NETTO, W.; ALMEIDA-LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., coord. Biotecnologia Industrial: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v.2, p179-192.
- SIJTSMA, L.; SWAAF, M. E. **Biotechnological production and applications of the ω -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid**. Appl. Microbiol. Biotechnol. p. 146-153, 2004.
- SIMOPOULOS, A.P. The importance of the ratio of omega-6/ omega-3 essential fatty acids. **Biomedecine & Pharmacotherapy**, v.56, n. 8, p.365-379, 2002.
- SOLOVCHENKO, A.E. KHOZIN-GOLDBERG, I. DIDI-COHEN S. COHEN, Z. MERZLYAK, M. N. Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. **Journal of Applied Phycology**, v 20:245–251. 2008.
- STANCA, D.; POPOVIC, E. Urea as nitrogen source in modified Zarrouk medium. **Review Roumain de Biologie Animals**, v. 41, n. 1, p. 25 - 31, 1996.
- STEWART, W.D.P. Algal physiology and biochemistry. **Botanical monographs**. v. 10, p. 727, 1974.
- TURPIN, D.H.; ELRIFI, I.R.; BIRCH, D.G.; WEGER, H.G.; HOLMES, J.J. Interactions between photosynthesis, respiration and nitrogen assimilation in microalgae. **Can. J. Bot.** v. 66: p. 2083 – 2097, 1988.
- VAN BEELAN, V.A.; SPENKELINK, B.; MOOIBROEK, H.; SIJTSMA, L.; BOSCH, D.; RIETJENS, I. M. C. M.; ALINK, G. M. **An n-3 PUFA-rich microalgal oil diet protects to a similar extent as a fish oil-rich diet against AOM-induced colonic aberrant crypt foci in F344 rats**. Food and Chemical Toxicology 47, p. 316-320, 2009.
- VONSHAK, A. e RICHMOND, A. Mass production of the blue – green algae *Spirulina*. An overview. **Biomass**, v. 15, p. 233-247, 1988.

- VONSHAK A. (Ed.). *Spirulina platensis (Arthrospira)*: physiology, cell-biology and biotechnology. **London: Taylor and Francis**, 1997, p.233.
- WARD, O.P.; SINGH, A. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. **Process Biochemistry** v.40, p.3627-3652, 2005.
- WILLIAMS, V.R.; MCMILLAN, R. Lipids of *Ankistrodesmus braunii*. **Science**, v. 133, p. 459-460, 1961.
- WISNIAK, J.; KORIN, E. Supercritical fluid extraction of lipids and other materials from algae. In: . In: Cohen, Z.; Ratledge, C. (Eds.) **Single Cell Oils**. Champaign: AOCS Press. 2005. P. 220-238.