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

# Avaliação do cultivo de *Spirulina platensis* utilizando simultaneamente nitrato de potássio e uréia como fontes de nitrogênio

Denise Cristina Moretti Vieira

Dissertação para a obtenção do grau de MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

São Paulo
2008

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

Vieira, Denise Cristina Moretti
V657a Avaliação do cultivo de *Spirulina platensis* utilizando simultaneamente nitrato de potássio e uréia como fontes de nitrogênio / Denise Cristina Moretti Vieira. -- São Paulo, 2007.
145p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Carvalho, João Carlos Monteiro de

1. Fermentação : Tecnologia de alimentos I. T. II. Carvalho, João Carlos Monteiro de, orientador.

664.02 CDD

**DENISE CRISTINA MORETTI VIEIRA**

**Avaliação do cultivo de S*pirulina platensis* utilizando simultaneamente nitrato de potássio e uréia como fontes de nitrogênio**

**Comissão Julgadora**

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho
Orientador /Presidente

_____
1ºExaminador

_____
2ºExaminador

Aos meus pais, Norberto e Manoela, pelo apoio e dedicação, e aos meus irmãos, Daniela e Norberto, pelo incentivo.

# Agradecimentos

Ao Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho pela orientação, dedicação incentivo, confiança e amizade.

Ao Prof. Dr Sunao Sato pelo apoio e incentivo.

A Profa. Dra. Tereza Cristina Vessoni Penna pelo incentivo e apoio.

A FAPESP (processos nº 2005/52269-7 e nº 2005/52255-6) pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

Aos meus pais, Norberto Vieira e Manoela R. Moretti Vieira, por sempre me apoiarem, pela dedicação a minha educação , pelos conselhos e confiança e aos meus irmãos Daniela R. Moretti Vieira e Norberto Vieira Jr. pela paciência, apoio, incentivo e por sempre estarem ao meu lado.

A Mayla Santos Rodrigues pela ajuda, amizade, discussões e apoio na execução dos experimentos.

A Lívia Seno Ferreira pela amizade, ajuda nos experimentos, companhia e por compartilhar seus conhecimentos.

Ao Bruno Brandão Folino e a Licia Raduan pela colaboração na execução da parte prática, aos técnicos do laboratório Kleber Albuquerque Almeida e Dante Augusto Moraes e todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório, Marcelo Chuei Matsudo e Raquel Pedrosa Bezerra pelo apoio e incentivo proporcionados durante a pós-graduação.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, em especial Elza Ferreira Silva e Mirian Bernardes Lopes Alves pelo apoio e dedicação e por sempre estarem disponíveis para ajudar.

Aos funcionários da biblioteca do conjunto das químicas pelo apoio e pronto atendimento.

Aos Secretários de pós-graduação – FCF, Elaine Midori Ychico e Jorge Alves de Lima pela amizade e eficiência no atendimento aos pós-graduandos.

**“O único meio de alcançar a vitória é expressar-se completamente a serviço da humanidade.”**

**Aristóteles**

## RESUMO

A microalga *Spirulina platensis*, que possui alto de teor de proteínas, vem sendo cultivada fotoautotroficamente para a produção de biomassa microbiana. Embora as fontes convencionais de nitrogênio utilizadas para a produção de *Spirulina* sejam os nitratos, há a possibilidade do emprego de fontes alternativas, como a uréia, utilizando o processo descontínuo alimentado, com diminuição do custo de produção. No entanto, o uso exclusivo de uréia, em função de sua hidrólise no meio de cultivo e conseqüente perda de amônia, pode levar as células a crescerem por determinados períodos sob carência da fonte de nitrogênio, uma vez que esta fonte não pode ser adicionada em grandes quantidades devido à toxicidade da amônia proveniente de sua hidrólise. Este trabalho teve como objetivo verificar se a adição de nitrato de potássio em cultivos realizados com uréia podem levar a processos com maior produtividade e/ou aumento na quantidade de biomassa produzida. Foram verificadas várias proporções entre as concentrações iniciais de nitrato de potássio e uréia, utilizando planejamento experimental e a metodologia de superfície de resposta. As variáveis dependentes foram concentração celular máxima ($X_m$), produtividade em células ($P_x$) e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$), bem como, os teores de clorofila, proteínas e lipídios na biomassa obtida. Os resultados obtidos permitiram concluir que a associação de nitrato de potássio e uréia aumentaram a concentração celular máxima. A condição ótima obtida pela análise de regressão multivariável para Xm foi 17,3 mM de $KNO_3$ e 8,90 mM de uréia, nessas condições foram obtidos 6077 ±199 mg/L.



**Palavras Chaves**: *Spirulina platensis*; uréia; nitrato de potássio; processo descontínuo alimentado.

## ABSTRACT

The cyanobacterium *Spirulina platensis*, that have high protein content, has been cultivated photoautrophically for microbial biomass production. However nitrates are the conventional nitrogen sources for *Spirulina*, there is the possibility of use alternative source, as urea by fed batch process, decreasing the costs of production. So, the exclusive use of urea, due to urea hydrolysis in culture medium and consequently loss of ammonia, can cause the cell to growing for specific moments without nitrogen source, because urea can not be added in huge quantity due to the ammonia toxicity provide by its hydrolysis. This work have as objectives verify if the potassium nitrate addition in the culture carried out with urea can lead a process with more productivity and/or increase in the biomass quantity. It was verified many proportion between initial concentration of potassium nitrate and urea, using experimental planning and surface response methodology. The dependent variables were maximum cell concentration ($X_m$), cell productivity ($P_x$) and nitrogen-cell conversion factor ($Y_{X/N}$), as well as biomass contents of chlorophyll, protein and lipids. The results allowed us concluded that the association of $KNO_3$ and urea was good and improved the maximum cell concentration. The optimal condition otained by statistic analysis for Xm was 17,3 mM of KNO3 and 8,90 mM of urea. In this condition the maximum cell concentration was 6077 ±199 mg $L^{-1}$.



**Key Words**: *Spirulina platensis*; urea; potassium nitrate; fed-batch process.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1 – Composição de aminoácidos de proteínas de *S. platensis* e *S. maxima* (mg.g$^{-1}$proteínas bruta Nx6,25) em comparação com o recomendado pela FAO (Food and Agriculture Organization) para crianças pré-escolares. ...24**

**Tabela 2 – Comparação entre produção de proteínas de *Spirulina spp*. e de outras fontes.....30**

**Tabela 3 - Experimentos realizados combinando-se $KNO_3$ e uréia .....51**

**Tabela 4 – Concentração celular (X) e valor de pH para o experimento 1P (Tempo de alimentação 14 dias). .....56**

**Tabela 5 – Concentração celular (X) e valor de pH para o experimento 2P. (Tempo de alimentação 17 dias) .....58**

**Tabela 6 – Concentração celular (X) e valor de pH para o experimento 3P (Tempo de alimentação 20 dias). .....60**

**Tabela 7 – Concentração celular (X) e valor de pH para o experimento 4P (Tempo de alimentação 23 dias) .....62**

**Tabela 8 - Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 1 ($KNO_3$, 8 mM; Uréia, 4 mM). .....65**

**Tabela 9 – Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 2 ($KNO_3$, 22 mM; Uréia, 4 mM). ...68**

**Tabela 10 – Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 3 ($KNO_3$, 8 mM; Uréia, 11 mM). ...71**

**Tabela 11 – Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 4 ($KNO_3$, 22 mM; Uréia, 11 mM). .....74**

**Tabela 12 – Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 5 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 2,55 mM). .....77**

**Tabela 13 – Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 6 ($KNO_3$, 5,1 mM; Uréia, 7,5 mM). .....80**

**Tabela 14 – Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 7 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 12,5 mM). .....83**

**Tabela 15 – Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 8 ($KNO_3$, 24,9 mM; Uréia, 7,50 mM). .....86**

**Tabela 16 – Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 9 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM). .....89**

**Tabela 17 - Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 10 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM). .....92**

**Tabela 18 - Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 11 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM). .....95**

**Tabela 19 - Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 12 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM). .....98**

**Tabela 20 - Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 13 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM). .....101**

**Tabela 21 - Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 14 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM). .....104**

**Tabela 22 - Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 15 ($KNO_3$, 17,3; Uréia, 8,90 mM). .....107**

**Tabela 23 - Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 16 ($KNO_3$, 17,3; Uréia, 8,90 mM). .....110**

**Tabela 24 - Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 17 ($KNO_3$, 17,3; Uréia, 8,90 mM). .....113**

**Tabela 25 – Teor proteínas, lipídios e clorofila nas biomassas secas de *Spirulina platensis* .....120**

**Tabela 26 – Concentração celular máxima ($X_m$), produtividade em células ($P_X$) e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) obtidos nos experimentos realizados.....122**

**Tabela 27 – Análise da regressão multivariável para a concentração celular máxima (Xm) .....124**

**Tabela 28 – Análise de variância do modelo de regressão para a concentração celular máxima ($X_m$).....124**

**Tabela 29 – Análise da regressão multivariável para produtividade em células ($P_x$) .....127**

**Tabela 30 – Análise de variância do modelo de regressão para a produtividade em células (Px). .....127**

**Tabela 31 – Análise da regressão multivariável para o fator de conversão de nitrogênio em célula ($Y_{X/N}$).....130**

**Tabela 32 – Análise de variância do modelo de regressão para o fator de conversão de nitrogênio em célula ($Y_{X/N}$).....130**

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1. *Spirulina platensis* UTEX 1926. .....21**

**Figura 2. Proporção de gás carbônico, bicarbonato e carbonato em função dos valores de pH. .....39**

**Figura 3. Concentração de amônia e amônio em relação ao pH.....40**

**Figura 4. Minitanques utilizados no cultivo de *S. platensis* .....46**

**Figura 5. Curva de calibração para determinação da concentração celular de *Spirulina platensis*. .....52**

**Figura 6. Curva de calibração para determinação da concentração de amônia total em meio de cultivo de *Spirulina platensis*.....53**

**Figura 7. Curva de calibração para determinação do teor de Clorofila em meio de cultivo de *Spirulina platensis*.....54**

**Figura 8. Concentração celular (X –◆–) e pH (–▲–) em função do tempo para o experimento 1P (Tempo de alimentação 14 dias).....57**

**Figura 9. Concentração celular (X –◆–) e pH (–▲–) em função do tempo para o experimento 2P (Tempo de alimentação 17 dias).....59**

**Figura 10. Concentração celular (X –◆–) e pH (–▲–) em função do tempo para o experimento 3P (Tempo de alimentação 20 dias).....61**

**Figura 11. Concentração celular (X –◆–) e pH (–▲–) em função do tempo para o experimento 4P (Tempo de alimentação 23 dias).....63**

**Figura 12. Concentração celular (X –◆–) e pH (–▲–) em função do tempo para experimento 1 ($KNO_3$, 8 mM; Uréia, 4 mM). .....66**

**Figura 13. Concentração de carbonato total (–◆–) e nitrato (–■–) em função do tempo para experimento 1 ($KNO_3$, 8 mM; Uréia, 4 mM). .....66**

**Figura 14. Log da Concentração de Amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para experimento 1 ($KNO_3$ , 8 mM; Uréia , 4 mM). .....67**

**Figura 15. Concentração celular (X –◆–) e pH (–▲–) em função do tempo para experimento 2 ($KNO_3$, 22 mM; Uréia, 4 mM). .....69**

**Figura 16. Concentração de carbonato total (–◆–) e nitrato (–■–) em função do tempo para experimento 2 ($KNO_3$, 22 mm; Uréia, 4 mm). .....69**

**Figura 17. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para experimento 2 ($KNO_3$, 22 mM; Uréia, 4 mM).....70**

**Figura 18. Concentração Celular (X –◆–) e pH (–▲–) em função do tempo para experimento 3 ($KNO_3$, 8 mM; Uréia, 11 mM). .....72**

**Figura 19. Concentração de carbonato total (–◆–) e nitrato (–■–) em função do tempo para experimento 3 ($KNO_3$, 8 mM; Uréia, 11 mM).....72**

**Figura 20. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para experimento 3 ($KNO_3$, 8 mM; Uréia, 11 mM).....73**

**Figura 21. Concentração Celular (X –◆–) e pH (–▲–) em função do tempo para experimento 4 ($KNO_3$, 22 mM; Uréia, 11 mM). .....75**

**Figura 22. Concentração de carbonato total (–◆–) e nitrato (–■–)em função do tempo para experimento 4**(KNO3, 22 mM; Uréia, 11 mM) **.....75**

**Figura 23. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para experimento 4 ($KNO_3$, 22 mM; Uréia, 11 mM).....76**

**Figura 24. Concentração celular (X –◆–) e pH (–▲–) em função do tempo para experimento 5 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 2,55 mM) .....78**

**Figura 25. Concentração de carbonato total (–◆–) e nitrato (–■–) em função do tempo para experimento 5 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 2,55 mM).....78**

**Figura 26. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para experimento 5 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 2,55 mM).....79**

**Figura 27. Concentração celular (X –◆–) e pH (–▲–) em função do tempo para experimento 6 ($KNO_3$, 5,1 mM; Uréia, 7,5 mM). .....81**

**Figura 28. Concentração de carbonato total (–◆–) e nitrato (–■–) em função do tempo para experimento 6 ($KNO_3$, 5,1 mM; Uréia, 7,5 mM).....81**

**Figura 29. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para experimento 6 ($KNO_3$, 5,1 mM; Uréia, 7,5 mM). .....82**

**Figura 30. Concentração de celular (X –●–) e pH (–▲–) em função do tempo para experimento 7 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 12,5 mM). .....84**

**Figura 31. Concentração de carbonato total (–♦–) e nitrato (–■–) em função do tempo para experimento 7 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 12,5 mM). .....84**

**Figura 32. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para experimento 7 ($KNO_3$ , 15 mM; Uréia, 12,5 mM). .....85**

**Figura 33. Concentração de celular (X –●–) e pH (–▲–) em função do tempo para experimento 8 ($KNO_3$ , 24,9 mM; Uréia, 7,50 mM). .....87**

**Figura 34. Concentração de carbonato total (–♦–) e nitrato (–■–) em função do tempo para experimento($KNO_3$, 24,9 mM; Uréia, 7,50 mM). .....87**

**Figura 35. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para experimento 8 ($KNO_3$ , 24,9 mM; Uréia, 7,50 mM). .....88**

**Figura 36. Concentração de celular (X –●–) e pH (–▲–) em função do tempo para experimento 9 ($KNO_3$ , 15 mM; Uréia, 7,50 mM). .....90**

**Figura 37. Concentração de carbonato total (–♦–) e nitrato (–■–) em função do tempo para experimento 9 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM). .....90**

**Figura 38. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para experimento 9 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM). .....91**

**Figura 39. Concentração de celular (X –●–) e pH (–▲–) em função do tempo para ensaio 10 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM). .....93**

**Figura 40. Concentração de carbonato total (–♦–) e nitrato (–■–) em função do tempo para experimento 10 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM). .....93**

**Figura 41. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para ensaio 10 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM). .....94**

**Figura 42. Concentração de celular (X –●–) e pH (–▲–) em função do tempo para ensaio 11 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM). .....96**

**Figura 43. Concentração de carbonato total (–♦–) e nitrato (–■–) em função do tempo para experimento 11 ($KNO_3$,15 mM; Uréia, 50 mM). .....96**

**Figura 44. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para ensaio 11 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).....97**

**Figura 45. Concentração de celular (X –●–) e pH (–▲–) em função do tempo para ensaio 12 ($KNO_3$ , 15 mM; Uréia, 7,50 mM). .....99**

**Figura 46. Concentração de carbonato total (–●–) e nitrato (–■–) em função do tempo para experimento 12 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).....99**

**Figura 47. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para ensaio 12 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).....100**

**Figura 48. Concentração de celular (X –●–) e pH (–▲–) em função do tempo para ensaio 13 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).....102**

**Figura 49. Concentração de carbonato total (–●–) e nitrato (–■–) em função do tempo para experimento 13($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).....102**

**Figura 50. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para ensaio 13 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).....103**

**Figura 51. Concentração de celular (X –●–) e pH (–▲–) em função do tempo para ensaio 14 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).....105**

**Figura 52. Concentração de carbonato total (–●–) e nitrato (–■–) em função do tempo para ensaio 14 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).....105**

**Figura 53. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–)em função do tempo para ensaio 14 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).....106**

**Figura 54. Concentração de celular (X –●–) e pH (–▲–) em função do tempo para ensaio 15 ($KNO_3$ , 17,3 mM; Uréia, 8,90 mM). .....108**

**Figura 55. Concentração de carbonato total (–●–) e nitrato (–■–) em função do tempo para experimento 15 ($KNO_3$, 5,1 mM; Uréia, 8,9 mM).....108**

**Figura 56. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para ensaio 15 ($KNO_3$, 17,3 mM; Uréia, 8,90 mM).....109**

**Figura 57. Concentração de celular (X –●–) e pH (–▲–) em função do tempo para ensaio 16 ($KNO_3$, 17,3 mM; Uréia, 8,90 mM). .....111**

**Figura 58. Concentração de carbonato total (–●–) e nitrato (–■–) em função do tempo para experimento 16 ($KNO_3$, 5,1 mM; Uréia,8,9 mM).....1114**

**Figura 59. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para ensaio 16 ($KNO_3$, 17,3 mM; Uréia, 8,90 mM).....112**

**Figura 60. Concentração de celular (X –●–) e pH (–▲–) em função do tempo para ensaio 17 ($KNO_3$, 17,3 mM; Uréia, 8,90 mM).....114**

**Figura 61. Concentração de carbonato total (–♦–) e nitrato (–■–) em função do tempo para experimento 17 ($KNO_3$, 5,1 mM; Uréia,8,9 mM).....114**

**Figura 62. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para ensaio 17 ($KNO_3$, 17,3 mM; Uréia, 8,90 mM).....115**

**Figura 63. Concentração celular máxima obtida nas diferentes condições experimentais avaliadas ($X_1$ = Valor codificado da quantidade inicial de $KNO_3$ por unidade de volume; $X_2$ = Valor codificado da quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume de reator).....123**

**Figura 64. Superfície de resposta para a concentração celular máxima ($X_m$; mg $L^{-1}$) em função de $X_1$ (Valor codificado da quantidade inicial de $KNO_3$ por unidade de volume) e $X_2$ (Valor codificado da quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume de reator).....126**

**Figura 65. Superfície de resposta para a produtividade em células ($P_x$; mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$) em função de $X_1$ (Valor codificado da quantidade inicial de $KNO_3$ por unidade de volume) e $X_2$ (Valor codificado da quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume de reator).....129**

**Figura 66. Superfície de resposta para o fator de conversão de nitrogênio em célula ($Y_{X/N}$; mg $mg^{-1}$) em função de $X_1$ (Valor codificado da quantidade inicial de $KNO_3$ por unidade de volume) e $X_2$ (Valor codificado da quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume de reator).....131**

## SUMÁRIO


1. INTRODUÇÃO ..... 17
2. OBJETIVOS ..... 20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ..... 21
3.1. CLASSIFICAÇÃO ..... 21
3.2. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E HISTÓRICO ..... 22
3.3. COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA ..... 23
3.4. PRODUÇÃO, COMERCIALIZAÇÃO E APLICAÇÃO. ..... 26
3.5. FONTE DE CARBONO ..... 32
3.6. FONTE DE NITROGÊNIO ..... 33
3.7. EFEITO DO pH ..... 38
3.8. EFEITO DA TEMPERATURA ..... 40
3.9. CULTIVOS EM TANQUES ABERTOS ..... 41
3.10. PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO DE CULTIVO ..... 42
4. MATERIAIS E MÉTODOS ..... 44
4.1. MICRORGANISMO ..... 45
4.2. MANUTENÇÃO DA *S PLATENSIS* ..... 45
4.3. MEIO DE CULTIVO ..... 45
4.4. PREPARO DO INÓCULO ..... 45
4.5. DISPOSITIVO PARA CULTURA ..... 45
4.6. DESCRIÇÃO DE UM EXPERIMENTO TÍPICO ..... 46
4.7. TÉCNICAS ANALÍTICAS ..... 46
4.8. PLANO DE TRABALHO ..... 50
4.9. FORMA E ANÁLISE DOS RESULTADOS ..... 51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 52
5.1. CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR ..... 52
5.2. CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AMÔNIA TOTAL ..... 53
5.3. CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CLOROFILA ..... 54
5.4. RESULTADOS REFERENTES AOS ACOMPANHAMENTOS DOS EXPERIMENTOS PRELIMINARES 1 A 4 (EXPERIMENTOS 1P A 4P) APENAS UTILIZANDO UREIA COMO FONTE DE NITROGÊNIO ..... 55
5.5. RESULTADOS ..... 64
5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA ..... 121
6. CONCLUSÕES ..... 132
7. REFERÊNCIAS BIBIOGRÁFICAS ..... 133

## 1. INTRODUÇÃO

O cultivo de microrganismos fotossintéticos é um processo vantajoso devido à produção de proteínas de alto valor biológico para nutrição humana e animal, pigmentos, lipídios e vitaminas (AARONSON et al., 1980).

Alguns problemas de implementação que os cultivos de microrganismos fotossintéticos podem apresentar são devido ao alto custo de extração e secagem do produto, a presença de membrana celulósica de baixa digestibilidade. Esses tipos de problemas não ocorrem no cultivo de *Spirulina sp*. A cianobactéria *Spirulina platensis*, por exemplo, apresenta tolerância a pH alcalino, tamanho relativamente grande dos agregados de células, taxa de crescimento celular relativamente alta e parede celular facilmente digerível, o que reduz o custo operacional para a recuperação de biomassa tornando-a economicamente viável para a produção industrial (PHAM QUOC & DUBACQ, 1997; HENRIKSON et al., 1989).

A *Spirulina* é um dos gêneros mais conhecidos dentre os microrganismos fotoautotróficos, sendo que foi produto de consumo dos Astecas, no Vale do México, e da população do Lago Chade, na África (PARADA et al., 1998).

O consumo de *Spirulina* traz benefícios à saúde humana, uma vez possui em sua composição química aminoácidos essenciais, vitaminas (especialmente B12), pigmentos naturais (como carotenóides, xantofilas, ficobilinas e clorofila) e ácidos graxos essenciais (particularmente ácido $\gamma$-linolênico, um precursor das prostaglandinas do corpo).

O meio de cultura convencional para a obtenção da biomassa utiliza sais de nitrato como fonte de nitrogênio, como, por exemplo, nitrato de potássio e nitrato de sódio. Fontes alternativas de nitrogênio, como uréia e sais de amônio, estão sendo pesquisadas com a finalidade de diminuir os custos na produção industrial.

Faintuch (1989) estudando diferentes fontes de nitrogênio para cultivo de *Spirulina maxima* por processo descontínuo verificou que a utilização de fontes alternativas de nitrogênio, como cloreto de amônio e uréia, só foi viável reduzindo os níveis de concentração do nutriente, conseqüentemente diminuindo a quantidade de biomassa produzida. Por outro lado, há estudos indicando que durante depleção de nitrato o crescimento pára e apoproteínas e ficocianinas são degradadas para suprir as necessidades de nitrogênio (CORNET et al., 1998), o que poderia ser estendido para outras fontes, uma vez que o nitrogênio incorporado nos aminoácidos é o

amoniacal. A diminuição da concentração de nitrogênio no meio de cultivo também diminui a concentração de clorofila na biomassa de *Spirulina platensis* (PIORRECK et al., 1984). A quantidade e a qualidade do nitrogênio disponível influenciam também o conteúdo de compostos da microalga, como os lipídios (SASSANO, 2004).

A substituição de $KNO_3$ por uréia é altamente vantajosa, porque o custo desta é muito menor que o do $KNO_3$, além da uréia ser facilmente assimilada pela *S. platensis*, provavelmente devido à sua hidrólise no meio de cultivo, com formação de amônia, seja esse processo devido à ação da urease (CARVAJAL et al., 1980), seja devido à alcalinidade do meio de cultivo (DANESI et al., 2002; RANGEL-YAGUI et al., 2004).

A utilização do processo descontínuo alimentado torna possível a adição de nutrientes sem prejudicar o crescimento microbiano, prevenindo o acúmulo de substrato e diminuindo sua perda por evaporação quando for utilizar nutrientes voláteis em cultivos em tanques abertos. Além disso, o custo operacional em relação a um cultivo descontínuo não seria alterado no caso de se alimentar o cultivo por meio de pulsos diários. Assim, para cultivos com fontes de nitrogênio amoniacais, o processo descontínuo alimentado pode ser usado para o crescimento da *Spirulina spp*. a fim de aumentar a densidade celular e o conteúdo de proteínas e lipídios, desde que a concentração de nitrogênio adicionada possa ser gradativamente aumentada sem resultar na inibição do crescimento.

A uréia, sendo uma fonte de nitrogênio prontamente utilizável pela *Spirulina*, leva a resultados de crescimento celular melhores que os nitratos quando do emprego de vazões exponencialmente crescentes (DANESI et al., 2002; RANGEL-YAGUI et al., 2004). No entanto, como se observa nos resultados de Danesi et al., (2002), assim como em cultivos com cloreto de amônio como fonte de nitrogênio (CARVALHO et al., 2004), nos instantes iniciais, os cultivos com $KNO_3$ apresentaram maior velocidade específica de crescimento. Isso ocorreu provavelmente devido a menores taxas iniciais de adição da fonte de nitrogênio no cultivo, devido à menor demanda associada às mais baixas concentrações celulares. De fato, a adição de maiores quantidades de uréia no início, devido a sua hidrólise, somente levaria a um aumento da perda de amônia por volatilização (DANESI et al., 2002), devido ao pH alcalino do meio de cultura, ou até mesmo à inibição por amônia (ABELIOVICH & AZOV, 1976; CARVALHO et al., 2004, SOLETTO et al., 2005). Assim, a associação

da uréia com o $KNO_3$ poderia levar a resultados ainda melhores, com o $KNO_3$ suprindo a deficiência de nitrogênio no início do cultivo, onde são empregadas menores velocidades de adição de uréia. Assim, ao mesmo tempo em que estaria sendo beneficiada pelo uso de uma fonte mais prontamente utilizável (uréia), teria uma reserva na forma de nitrato, que reduziria, através da ação das enzimas nitrato e nitrito redutases, quando necessário, impedindo qualquer tipo de carência dessa fonte para as células.

## 2. OBJETIVOS

Verificar se a adição de nitrato de potássio em cultivos realizados com uréia podem levar a cultivos com maior produtividade e/ou aumento na quantidade de biomassa produzida. Foram verificadas várias proporções entre as concentrações iniciais de nitrato de potássio e uréia, utilizando planejamento experimental e a metodologia de superfície de resposta. As variáveis dependentes foram: concentração celular máxima, produtividade em células e fator de conversão de nitrogênio em células, bem como, os teores de clorofila, proteínas e lipídios na biomassa obtida.

## 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3. 1. CLASSIFICAÇÃO

O gênero *Spirulina* pertence à família *Oscillatoriacea*, faz parte do grupo das cianobactérias filamentosas (microalgas verde-azuladas), caracterizadas por uma cadeia de células na forma de espiral e envolvida por uma bainha fina, cujas paredes transversas podem ser vistas sob microscopia ótica (GUGLIELMI et al., 1993). Tricoma é o conjunto de células filamentosas cilíndricas (Figura 1), possuem comprimento de aproximadamente 500 µm e diâmetro variando de 6-12 µm (TOMASELLI, 1997), mas dependendo das condições de cultivo podem adquirir morfologias diferentes. Os filamentos não possuem ramificações nem heterocistos.

As *Spirulina spp*. se reproduzem por divisão binária, produzindo vários descendentes semelhantes geneticamente, sendo que periodicamente tem-se a quebra do tricoma em uma célula intercalária que perde seu citoplasma e é convertida em um necrídio. Esta quebra origina cadeias curtas de células, denominadas hormogônios, que diferem dos tricomas maduros pela falta de motilidade, tamanho celular reduzido e morfologia diferenciada (CIFERRI & TIBONI, 1985).

Fonte: Universidade do Texas, 2007

**Figura 1.** *Spirulina platensis* UTEX 1926.

As espécies *Arthrospira maxima* e *Arthrospira* são freqüentemente referidas como *Spirulina maxima* e *Spirulina platensis*, embora o gênero *Arthrospira* tenha sido oficialmente incluído no Bergey's Manual of Systematic Bacteriology em 1989 (CASTENHOLZ, 1989). Essas cianobactérias são cultivadas industrialmente em diversas regiões do mundo, e suas biomassas são comercializadas com a denominação de "*spirulina".*

Geitler em 1932 propôs que todas as espécies da ordem *Oscillatoriale* que formam filamentos helicoidais fossem incluídas no gênero *Spirulina*. Entretanto, em 1892 os gêneros *Arthrospira e Spirulina* já haviam sido separados por Gomont (1893), que foi citado por Guglielmi et al. (1993).

Atualmente, diversos autores adotam *Arthrospira e Spirulina* como dois gêneros separados (GUGLIELMI et al., 1993; RIPPKA et al., 1981; SCHELDEMAN et al., 1999) e a separação entre os dois gêneros tem sido confirmada repetidamente com base em muitas características morfológicas e genéticas (TOMASELLI, 1997). Mesmo assim a denominação *Spirulina* tem sido usada para designar a biomassa das cianobactérias do gênero *Arthrospira*.

## 3. 2. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E HISTÓRICO

O gênero *Spirulina* diferencia-se do resto das cianobactérias particularmente devido ao seu nicho ecológico. Estes microrganismos proliferam em águas muito mineralizadas, cuja composição seja principalmente bicarbonato e carbonato de sódio, extremamente alcalinas (pH do meio em torno de 8 a 11) e quentes. Estas condições excluem a maioria dos seres.

As regiões tropicais, subtropicais quentes e ensolaradas, como México, Chade, Etiópia, Quênia, Zaire e Zâmbia são as mais próprias para o cultivo da *Spirulina spp.* (ABDIN EL SHERIF & CLÉMENT, 1982).

A primeira vez que tiveram notícias sobre estas cianobactérias, foi no México, em 1521, na região do lago Texcoco, região da atual cidade do México.

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

A biomassa seca de *Spirulina sp*. era consumida pela população asteca residente em Tenochtitlán (atual cidade do México), nas proximidades do Lago Texcoco, onde na época da colonização espanhola haviam praças e mercados que vendiam tecuitlatl (biomassa seca de *Spirulina sp.)* (LACAZ-RUIZ, 2003).

Os espanhóis consumiam o “chimalli”, que consiste em molho preparado com o Tecuitlatl, milho e outros cereais, além de tomate, pimenta e vários temperos. Os

espanhóis levaram esse alimento para a Índia, onde foi comercializado e consumido em grandes quantidades (CIFERRI & TIBONI, 1985; DURAND-CHASTEL, 1980; PANIAGUA-MICHEL et al., 1993).

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

Os Kanembu, que vivem ao longo das costas do lago Chade na África Central, alimentam-se dessas algas até hoje. Eles retiravam essas cianobactérias dos lagos, depois as estendiam sobre pedras e as secavam ao sol, resultando no alimento conhecido como “Dihé” (PANIAGUA-MICHEL et al., 1993).

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

## 3. 3. COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA

A *Spirulina spp*. possui compostos como aminoácidos essenciais, vitaminas (especialmente B12), pigmentos naturais (como carotenóides, xantofilas, ficobilinas e clorofila) e ácidos graxos essenciais (particularmente ácido $\gamma$-linolênico, um precursor das prostaglandinas do corpo). Além de apresentar um satisfatório conteúdo balanceado de aminoácidos, incluindo metionina, um aminoácido ausente na maioria das outras microalgas (PARADA et al., 1998; McKASKLE, 2003**).**

O conteúdo de proteínas da *Spirulina spp*. oscila entre 50 e 70 % de sua massa seca, devendo-se considerar uma variação de 10 a 15 %, dependendo do fotoperíodo no momento da coleta; As cianobactérias são uma das mais ricas fontes

protéicas de origem microbiana, colocando-se bem acima das carnes (15 a 25%) (DILLON et al., 1995) e da soja (cerca de 40%) (MAEHLER et al., 2003). No seu espectro de aminoácidos, todos os aminoácidos estão próximos dos padrões estabelecidos pela FAO (Food and Agriculture Organization), como pode ser observado na Tabela 1 (DILLON et al., 1995).

**Tabela 1** – Composição de aminoácidos de proteínas de *S. platensis* e *S. maxima* ($mg.g^{-1}$proteína bruta N x 6,25) em comparação com o recomendado pela FAO (Food and Agriculture Organization) para crianças pré-escolares.

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

Fonte: Dillon et al. (1995).

Qualitativamente as proteínas de *Spirulina* são completas e contém todos os aminoácidos essenciais, que representam 47 % do peso total das proteínas (DILLON et al., 1995). Entre esses aminoácidos encontram-se os oito aminoácidos essenciais

(Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Treonina, Triptófano e Valina) (COHEN, 1997).

Os aminoácidos sulfurados, como metionina e cisteína, encontram-se em concentrações menores, que estão presentes em 60% do valor ideal recomendado pela FAO/WHO/UNO (com base na albumina do ovo) (DILLON et al.,1995; SVS/MS, portaria nº 222).

*Spirulina spp*. são ricas em vitaminas como Cianocobalamina (B12), Pirodoxina (B6), Riboflavina (B2), Tiamina (B1), Tocoferol (E) e Filoquinona ou Fitonadiona (K) (BRANGER et al., 2003). A vitamina B12 que praticamente só existe em fontes de origem animal, apresenta no caso da *Spirulina spp*. um conteúdo de 0,11 mg/100g de biomassa (SHIMAMATSU, 2004).

A *Spirulina spp*. apresenta em sua composição os principais ácidos graxos polinsaturados, como ácido linolêico ω-3, além de quantidades substanciais do raro ácido linolênico ω-6 (γ-linolênico), que varia de 8 a 31% no total de ácidos graxos, dependendo de como ela é cultivada. O ácido linolênico ω-6 (γ-linolênico) somente é encontrado em quantidades significativas no leite materno, no óleo das sementes da Prímula-da-Noite (Evening Primrose), frutos de groselhas pretas e borragem, sendo possível encontrá-lo em fungos e cianofíceas (COHEN, 1993).

Estudos nutricionais de *Spirulina spp*. apontam evidências científicas mostrando que a cianobactéria é rica em compostos fitoquímicos típicos de vegetais verdes e amarelos, como carotenóides e outros antioxidantes (GOMES-CORONADO et al., 2004; HERRERO et al., 2004) e, que, sua ingestão tem efeito benéfico sobre a saúde. Este resultado faz possível a produção de compostos fitoquímicos típicos de plantas pelo método de cultivo industrial.

Atualmente há interesse em encontrar antioxidantes novos e seguros de fontes naturais, para impedir a deterioração oxidativa do alimento e para minimizar os danos oxidativos às células vivas (PRATT, 1992). Portanto, o consumo de antioxidantes traz benefício à saúde humana (KEHRER, 1994). O uso de antioxidantes sintéticos diminuiu, devido a uma rejeição geral do consumidor de aditivos de alimento sintéticos (NAMIKI, 1990). Poucas espécies de algas possuem componentes com atividades antioxidantes e compostos fenólicos, com atividade antioxidante em sistemas biológicos (SAKATA, 1992).

Enquanto a incidência de compostos antioxidantes em plantas é bem conhecida (HO, 1992), as características antioxidantes de algas são pobremente conhecidas. Miranda et al. (1998) encontraram atividade antioxidante em extratos de *Spirulina spp.* tanto *in vitro* como *in vivo*. Estrada et al. (2001) relataram a presença da ficocianina como responsável da atividade antioxidante do extrato protéico da *Spirulina platensis.*

*S. platensis* contém altos níveis de carotenóides (ANNAPURNA et al., 1991), especialmente β-caroteno (CARERI et al., 2001); clorofila a (RANGEL-YAGUI et al., 2004) e ficobilinas, que constituem 20% das proteínas celulares e são quantitativamente os pigmentos dominantes na *Spirulina sp* (RICHMOND, 1989 REDDY et al., 2000). Outros carotenóides como a β-criptoxantina e a zeaxantina encontram-se em menores quantidades (CARERI et al., 2001).

Quantidades apreciáveis de fibras e minerais como ferro, cálcio, potássio, fósforo, manganês, cobre, zinco, magnésio (BRANGER et al., 2003), boro, molibidênio, selênio e zinco (SEDYKH et al., 2005) também estão presentes nas *Spirulina ssp*.

## 3. 4. PRODUÇÃO, COMERCIALIZAÇÃO e APLICAÇÃO.

O cultivo comercial em larga escala de microalgas iniciou por volta de 1960 no Japão com o cultivo de *Chlorella* (TSUKADA et al., 1977). Desde então, num período de algumas décadas, a indústria de biotecnologia de microalgas tem se expandido e diversificado significativamente. Esse crescimento é bem exemplificado pela produção de *Spirulina* que, de algumas toneladas, em 1975, deu um salto para mais de 2.500 toneladas em 1998 (BOROWITZKA, 1999).

Uma das causas do grande aumento que a produção de microalgas fotossintetizantes obteve no mundo, foi a possibilidade de utilização de culturas de algas como renovadoras de oxigênio e fonte de proteína alimentar, em vôos espaciais (BOROWITZKA, 1999).

Algas aquáticas são um grupo de organismos geneticamente diversos com amplas características bioquímicas e fisiológicas. As microalgas requerem apenas água, luz, $CO_2$ e nutrientes inorgânicos para crescerem.

Essa característica juntamente com sua alta taxa de crescimento, tornam algumas algas uma fonte atrativa de biomassa, com significativa vantagem técnica e comercial (CHRONAKIS et al., 2000).

Esta explosão de atividades relacionadas com a produção de microalgas tem conduzido para o desenvolvimento de muitos aspectos de sua ecologia, fisiologia e bioquímica. Três principais espécies de microalgas têm atraído, até agora, a atenção de cientistas e indústrias. A *Dunaliella salina*, que produz β-caroteno, composto presente na pro-vitamina A e com propriedades antioxidantes (MENDES et al., 2003); o *Haematococcus pluvialis* que acumula grande quantidade de astaxantina, usada como fonte de pigmentação para peixes em aquacultura (especialmente em salmonídeos) e ovos da indústria de criação de aves, além ter uma alta atividade antioxidante (MIKI,1991; KOBAYASHI et al., 1997) e a *Chlorella vulgaris,* uma microalga alaranjada, produz astaxantina, cantaxantina e, em menor quantidade β-caroteno e luteína (PRATT, 1992), mas, muitas outras, estão sendo pesquisadas para a produção de componentes de alto valor (LI & QI, 1997).

As *Spirulina spp* são cianobactérias, e dentre os vários microrganismos classificados como cianobactérias, se destacam no âmbito industrial, pela simples tecnologia de cultivo e a alta qualidade e quantidade de proteínas, bem como, ausência de efeitos tóxicos (SALAZAR et al., 1998, LI et al., 2003).

Outra característica importante é a sua capacidade de crescer em grande escala, tendo uma produção anual no mundo de aproximadamente 3000 toneladas (SHIMAMATSU, 2004) e por ser recolhida mais facilmente devido a sua morfologia filamentosa (PIORRECK et al., 1984), o que diminui os custos de produção quando comparadas ao cultivo em larga escala das microalgas *Chlorella sp*. e *Oscillatoria sp*. Assim, além de suas propriedades nutricionais e terapêuticas (ESTRADA et al., 2001), a produção de *Spirulina sp* em larga escala é favorecida.

A Sosa Texcoco Co., localizada no México, foi a primeira indústria a produzir *Spirulina* em larga escala, em 1970, e passou a comercializá-la devido a sua facilidade de cultivo e recolhimento no Lago Texcoco (DURAND-CHASTEL, 1980). Posteriormente, diversos países como Taiwan, Índia, Estados Unidos, México e Japão, iniciaram a produção dessa microalga em biorreatores abertos (SHIMAMATSU et al., 2004). Essa microalga também cresce naturalmente em lagos salgados da América do Sul e Central e, na África devido a suas condições

climáticas. Ultimamente há várias companhias no mundo que produzem biomassa de *Spirulina spp*.

O Lago Chade, no continente Africano, é o ambiente natural mais propício para o desenvolvimento das microalgas. Em função das chuvas e evaporação, a salinidade varia de 8,5-200 g $L^{-1}$. A temperatura média é de 25,5 ºC, pH alcalino (9,5 - 11,0), índice pluviométrico baixo. O sódio, bicarbonato e carbonato são íons predominantes (ILTS, 1980). São extensos e rasos, proporcionando a geografia perfeita para a proliferação das microalgas, já que a baixa profundidade facilita a captação de luz necessária para a realização do processo fotossintético.

Na produção comercial em larga escala das *Spirulina spp*., devem ser levados em conta muitos fatores, entre eles a composição do meio de cultura. Sabe-se que 15-25% do gasto total com a produção de microalga, é devido ao meio de cultura (BELAY, 1997).

A contaminação nos cultivos de *Spirulina spp*. é baixa, porque ao consumir os íons carbonatos e bicarbonatos do meio de cultura as *Spirulina spp.* tendem a aumentar a alcalinidade do líquido, que pode atingir um valor de pH de 12,5. Outro motivo é que os filamentos de *Spirulina spp* que são altamente pigmentados, freqüentemente, formam uma camada muito eficaz que impede a luz solar de penetrar dificultando o desenvolvimento do outras algas como, por exemplo, a *Chlorella*, uma microalga comestível, que pode se proliferar, às vezes, nos cultivos de *Spirulina spp.*

O sucesso para a produção comercial em larga escala da microalga depende do desenvolvimento de um cultivo eficaz e econômico.

Possivelmente fatores como intensidade de luz, temperatura e composição do meio de cultivo, que variam de uma região produtora para outra, além de alterar a velocidade de crescimento celular, possam resultar no acúmulo de diferentes metabólitos, e proporcionar atividades biológicas distintas em função de tais condições.

As lojas de produtos naturais e farmácias são o principal destino dos produtos derivados da *Spirulina spp*, onde a biomassa seca é vendida como suplemento alimentar. Também são utilizadas na alimentação animal e extração de pigmentos para uso em alimentos no Japão (BELAY, 1997). Podem servir como complemento alimentar para camarões, mamíferos, aves e peixes, por aumentar a pigmentação dos peixes ornamentais (MCKASLE, 2003).

Algumas cianobactérias produzem substâncias que podem promover ou inibir o desenvolvimento microbiológico (PARADA et al., 1998; McKASKLE, 2003). Parada et al. (1998) determinaram que meio de cultivo isento de células contendo produtos extracelulares de *Spirulina platensis* promove o desenvolvimento de bactérias ácido-lácticas benéficas (LAB), como *Lactococcus lactis*, *in vitro*. No entanto, testes ainda devem ser realizados em ratos e humanos para determinar se esse complemento alimentar pode ser usado como um tipo de prebiótico, para beneficiar a colonização intestinal de LAB (bactérias ácido-lácticas) e a saúde humana.

A produção da biomassa pode ser utilizada também industrialmente para produção de biogás por digestão anaeróbica (SAMSON & LUDDY, 1982) e na produção de emulsificantes e agentes gelatinizantes (CHRONAKIS et al., 2000).

Recentemente, maior atenção vem sendo dada à *Spirulina spp*. pelo potencial de coloração de seus pigmentos de interesse às industrias farmacêuticas, de cosméticos e de alimentos. Segundo Danesi et al. (2002), há uma tendência na substituição de corantes artificiais por produtos naturais, o que sugere a possibilidade de maior exploração de *Spirulina spp*., pois essa microalga é uma das principais fontes de clorofila na natureza. No Brasil, a clorofila usada em corantes verdes naturais, é obtida a partir do espinafre, que contém aproximadamente 0,6 mg g-1 (GROSS, 1991), ao passo que a biomassa de *Spirulina sp*. contém 11,5 mg g -1 (HENRIKSON, 1989)

A clorofila além de ser usada como corante, também possui efeito anti-oxidante *in vitro*, o que sugere a redução dos danos causados por agentes químicos e pela radiação (KAMAT et al, 2001), sendo também avaliada em tratamentos voltados para a área médica (CHERNOMORSKY et al., 1988; YAMAZAKI et al., 2004)

Atualmente, a maior parte da clorofila produzida e comercializada é obtida por fontes vegetais, como o espinafre (0,6 mg $g^{-1}$) e salsa (1 mg $g^{-1}$) (BOHN et al., 2004).

Há, no entanto, um crescimento no interesse na área biotecnológica para obtenção de corantes de outras fontes. Nesse contexto, o emprego de processos de cultivo microbiano apresenta algumas vantagens em relação às fontes vegetais, como por exemplo, a possibilidade de um cultivo contínuo e com rápida multiplicação dos microrganismos (RANGEL-YAGUI et al., 2004) e pelo fato das microalgas apresentarem um teor de clorofila muito mais alto que as fontes vegetais (11,5 mg $g^{-1}$).

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

As *Spirulina spp*. apresentam muitas vantagens em relação a outros produtos agrícolas, por ser um microrganismo aquático, não requerer solo fértil e não causar erosão, nem contaminação de terras ou águas (MAIER et al., 2000). A Tabela 2 mostra a área de terra requerida para outras importantes fontes de alimentos para produção de 1 Kg de proteínas em comparação com a requerida para produzir a mesma quantidade de proteínas de *Spirulina spp*. Observa-se que o cultivo de *Spirulina spp*. produz 26,6 vezes mais por área que a soja e 316,7 vezes mais que a carne de boi, além disso, requer um volume muito menor de água.

**Tabela 2** – Comparação entre produção de proteínas de *Spirulina spp*. e de outras fontes.

| Fonte de proteínas [a] | Área necessária ($m^2$) | Água necessária (L) |
|---|---|---|
| *Spirulina spp.* | 0,6 | 2.100 |
| Soja | 16 | 9.000 |
| Milho | 22 | 12.500 |
| Grãos[b] | 190 | 105.000 |

a: Valores estão indicados para produção de 1 Kg de proteínas.

b: Produção de 60 Kg de grãos para alimentação de bovino que resultará em 1 Kg de proteínas animal.

- Fonte: MAIER et al. (2000).

As propriedades terapêuticas de substâncias presentes na biomassa de *Spirulina spp*. como ácido γ-linolénico (KATAOKA et al., 1983), polissacarídeos e compostos com potencial antioxidante (DILLON & PHAN, 1993), estão sendo estudadas. Em trabalho de revisão publicado por Belay et al., (1993) e Chamorro et al., (2002), são citados vários estudos cujos resultados indicam um grande potencial para o uso farmacológico desta cianobactéria. Numerosos estudos ressaltam o valor terapêutico da *Spirulina spp*., que é ressaltado pela ausência de efeitos secundários (SÀNCHEZ et al., 2005; MCKASLE, 2003).

Os resultados dos primeiros testes utilizando *Chlorella spp*. para consumo humano não foram satisfatórios (POWELL et al., 1961), devido aos problemas com a digestibilidade da biomassa algal. Diversas técnicas para a determinação do rompimento da parede celular mais eficiente têm sido aplicadas, como secagem ao sol (sun drying), liofilização (freeze drying), atomização (spray drying) e cocção.

A recuperação e o tratamento de cultivo de *S. platensis* para fins alimentares foi estudada por Morist et al. (2001). Eles concluíram que a técnica de “freeze-dryer” é a mais recomendada porque causa pequena degradação do produto e evita a deterioração dos constituintes mais frágeis, tais como, vitaminas e ácidos graxos essenciais. A biomassa pode ser consumida por inteira e, conseqüentemente, permanecendo a alta qualidade do produto. Por outro lado, a técnica “spray-drying” é utilizada comercialmente em outras áreas, tendo vantagem adicional por manter uniformidade na aparência do produto e ser relativamente fácil de embalar.

Segundo Becker & Venkataraman (1984) o “sun drying” (secagem ao sol) é a melhor técnica para romper a parede celular das cianobactérias, e no caso da *S. platensis*, essa técnica é suficiente para o seu aproveitamento no consumo humano, aumentando a digestibilidade de 74-76% para 91-95%.

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

As biomassas microbianas geralmente possuem elevados teores de ácidos nucléicos. Devido à inabilidade do organismo humano para metabolizar o ácido úrico proveniente do metabolismo das purinas, o aumento no consumo de ácidos nucléicos pode levar à altos níveis de ácido úrico no soro. Desta forma poderia culminar no desenvolvimento de moléstias como a gota. Neste contexto, as microalgas e cianobactérias são os microrganismos que apresentam os menores teores de ácidos nucléicos em suas biomassas (cerca de 4 – 6 %), contra 8 – 12 % para leveduras e 20 % para bactérias (ARAÚJO et al., 2003), fazendo das microalgas e cianobactérias, em relação a ácidos nucléicos, os microrganismos com maior tolerância de consumo diário.

A *Spirulina spp.* além de ser usada como alimento, pode ser usada em vôos espaciais, por ser um microrganismo com bom rendimento energético da fotossíntese, tempo de geração relativamente curto, baixo risco de contaminação

devido ao pH ótimo de crescimento ser bastante elevado (pH 8 a 11), sendo um alimento com alto valor nutricional, boa digestibilidade e atóxico (CREUS, 2003).

As proteínas da *Spirulina pacifica* podem ser usadas com estabilizantes de emulsões e espumas, por apresentarem pequena tensão interfacial entre ar/água (CHRONAKIS et al., 2000).

Tam & Wong (1990) sugerem a utilização da cianobactéria como um processo alternativo de tratamento secundário para remoção simultânea de nutrientes e compostos orgânicos de esgoto. Olguín (2000) relatam um sistema integrado na qual se usa água do mar não tratada com efluentes anaeróbicos da criação de porcos como um processo atrativo que tem 2 finalidades: produção da *Spirulina* a baixo custo e tratamento de resíduo animal

A produção de *Spirulina platensis* (processo semi-contínuo) integrada a produção de camarão demonstrou um controle satisfatório na qualidade da água e, ao mesmo tempo, uma alta quantidade de camarão (83 camarões/$m^2$) (CHUNTAPA et al., 2003).

Na Etiópia, fazendeiros e vaqueiros fazem seus gados beberem água dos lagos contendo *Spirulina spp*. uma vez por mês, por acreditarem que tem efeitos terapêuticos e compensa alguma falha na alimentação diária (KEBEDE, 1997).

## 3. 5. FONTE DE CARBONO

As *Spirulina spp* são tradicionalmente cultivadas autotroficamente utilizando altos níveis de carbonatos e bicarbonatos como fontes de carbono, por serem de baixo custo e proporcionarem pH elevado no meio, o que é ideal para o desenvolvimento desse microrganismo. A fonte de carbono principal é o íon bicarbonato que entra na célula por transporte ativo, posteriormente, a enzima anidrase carbônica presente no meio intracelular e/ou na membrana periplasmática age sobre o bicarbonato liberando o dióxido de carbono. Esse é incorporado no ciclo de Calvin produzindo moléculas orgânicas, tais como; carboidratos, proteínas e lipídios (KAPLAN & REINHOLD, 1999)

As cianobactérias têm a capacidade de acumular o bicarbonato no meio intracelular, quando há baixa concentração extracelular de bicarbonato (CORNET et al., 1998) e utilizar o dióxido de carbono, como fonte de carbono, para seu metabolismo. No meio contendo apenas carbonato, não ocorre um aumento da

biomassa e o pH mantém-se praticamente invariável, salientando a importância do bicarbonato, no metabolismo das cianobactérias (BINAGHI et al., 2003).

*Spirulina spp*. crescem tanto em condições mixotróficas quanto heterotróficas. Em condições heterotróficas, possuem uma longa fase lag de crescimento e uma pequena velocidade específica de crescimento. Já as culturas mixotróficas não apresentam fase lag. A baixa intensidade luminosa e baixa concentração de carbono orgânico podem limitar o crescimento celular (CHEN & ZHANG, 1997).

As *Spirulina spp*. possuem uma particularidade atrativa como fontes de biomoléculas naturais ativas por serem também autotróficas, pois necessitam apenas de água, luz, fonte de carbono e nutrientes inorgânicos, obtendo uma alta taxa de crescimento, tornando-se uma fonte atrativa para obtenção de biomassa com significativa vantagem técnica e comercial (CHRONAKIS et al., 2000).

## 3. 6. FONTE DE NITROGÊNIO

*Spirulina spp*. não fixam nitrogênio atmosférico, exceto a *Spirulina labyrinthyformis* (uma espécie termofílica), sendo com isto obrigatória a suplementação desse nutriente no meio de cultivo (CIFERRI & TIBONI, 1985).

O meio de cultura convencional para a obtenção da biomassa utiliza sais de nitrato como fonte de nitrogênio, como, por exemplo, nitrato de potássio (PAOLLETI et al., 1975) e nitrato de sódio (ZARROUK et al., 1966). Fontes alternativas de nitrogênio, como uréia e sais de amônio, estão sendo pesquisadas com a finalidade de diminuir os custos na produção industrial. O tipo e a quantidade da fonte de nitrogênio no meio de cultura influenciam o crescimento e composição da biomassa (STANCA & POPOVICI, 1996).

Trabalhos na literatura têm mostrado que o uso de nitrato como fonte de nitrogênio garante altas concentrações de biomassa de *Spirulina platensis*, o que justifica a ampla utilização dos meios de cultivo de Zarrouk (1966), Paoletti et al. (1975) e Schlösser (1982), que empregam $KNO_3$ ou $NaNO_3$. Contudo, sob o ponto de vista econômico, a busca de fontes de nitrogênio mais baratas como uréia e sais de amônio é particularmente atrativa.

O consumo de nitrato pelo fitoplâncton envolve vários passos mediados por enzimas para reduzir o nitrogênio em uma forma assimilável. Esses passos consecutivos são o transporte do nitrato para dentro da célula por uma proteína

transportadora de nitrato, redução do nitrato para nitrito pela nitrato redutase, e posteriormente, para amônia pela nitrito redutase. Essas reduções do nitrogênio envolvem gasto energético (HATORY & MYERS, 1966). A amônia, por sua vez, é incorporada ao metabolismo do nitrogênio, através da ação de transaminases, para a formação de aminoácidos (HUNG et al., 2000). A utilização de fontes de nitrogênio inorgânico na forma reduzida como sais de amônio é energeticamente favorável em comparação com nitratos e nitritos, disponibilizando energia para o crescimento celular.

A proteína transportadora de nitrato é associada à membrana citoplasmática, enquanto que a nitrato redutase e nitrito redutase são componentes da membrana tilacoidal (SINGH et al., 2002)

Fontes de nitrogênio a partir de moléculas orgânicas (aminoácidos), por já estarem na forma reduzida, deveriam proporcionar um crescimento mais rápido da biomassa por necessitarem de menos energia, especialmente quando a intensidade luminosa é limitante. No entanto, Pustizzi et al. (2004), estudando o crescimento da *Aureococus anophagefferens* em diferentes proporções de acido glutâmico e nitrato como fontes de nitrogênio observou que o crescimento mais rápido não foi em cultivos com apenas ácido glutâmico como fonte de nitrogênio quando comparados com cultivos contendo nitrato. Uma possível explicação para isso é um maior gasto energético para a metabolização de moléculas orgânicas. Explicam que uma vez transportados para dentro da célula, os aminoácidos são diretamente incorporados em proteínas, mas sua degradação até amônio provavelmente exige um metabolismo mais energético que outros compostos nitrogenados.

A utilização de uréia como fonte de nitrogênio promove um ganho energético devido a sua hidrólise espontânea em meio alcalino, formando amônia, que é facilmente assimilada pela *Spirulina*. No caso do nitrato, o microrganismo precisa reduzi-lo a nitrito (em uma reação catalisada pela enzima nitrato redutase) que, por conseguinte é reduzido em amônia (em uma reação catalisada pela enzima nitrito redutase). Esse processo de redução de nitrito em amônia requer gasto de energia. (HATORI & MYERS, 1966)

Outra vantagem da uréia em relação aos nitratos é que cada molécula de uréia fornece 2 átomos de nitrogênio, ao passo que cada molécula de $KNO_3$, fornece apenas 1 átomo de nitrogênio (DANESI et al., 2002).

Em particular, o uso de uréia sob condições alcalinas pode ser desvantajoso, em processo descontínuo, devido à hidrólise deste sal à amônia e conseqüente perda por volatilização ou devido à inibição do crescimento pela toxicidade de amônia a altos níveis (SASSANO et al., 2004). Por isso, há a necessidade do controle do suprimento de uréia durante o cultivo.

A adição de uréia no processo descontínuo alimentado mostrou-se um excelente protocolo, garantindo níveis satisfatórios desse composto no meio de cultivo, propiciando o sucesso no cultivo de *Spirulina platensis* (SASSANO et al., 2004). A adição de nutrientes durante o processo descontínuo alimentado pode ser realizada empregando uma taxa constante ou variável de vazão mássica e o regime de adição pode ser contínuo ou intermitente (CARVALHO & SATO, 2001).

Sanchez-Luna et al. (2004) mostraram que os cultivos de *Spirulina platensis* pelo processo descontínuo alimentado, com taxa de alimentação constante, com regime de adição intermitente e contínuo exibiram resultados estatisticamente coincidentes. Dessa forma, indicam que, quando a uréia é adicionada com taxa constante, ela pode ser adicionada de forma intermitente, sem que haja prejuízo no desenvolvimento microbiológico, o que além de ser menos trabalhoso, também é economicamente vantajoso, pois não necessita de equipamentos para bombeamento constante do nutriente. De fato, quando do uso de vazão constante, ao contrário da vazão exponencialmente crescente, a mesma quantidade da fonte de nitrogênio é adicionada ao longo do tempo. Considerando a fase final do cultivo, onde a demanda por nitrogênio é mais alta, devido à grande quantidade de células no sistema, temperaturas menores levariam a uma menor perda de amônia. Assim, no caso de vazão mássica de adição de uréia constante, temperaturas menores que as normalmente consideradas ótimas para o crescimento celular seriam mais vantajosas no processo de produção, especialmente quando comparadas com as temperaturas ótimas para crescimento com nitratos (35-38 °C) (VONSHAK, 1997a; JIMÉNEZ et al., 2003).

Danesi et al. (2002) estudaram os efeitos da adição contínua e intermitente de uréia e das diferentes temperaturas sobre o crescimento de *Spirulina platensis*, cultivado em processo descontínuo alimentado. Observaram que a adição contínua ou intermitente de uréia, em uma taxa exponencialmente crescente, a 30°C, possibilitou um ganho de biomassa em relação ao cultivo realizado com $KNO_3$ como fonte de nitrogênio.

Ranguel-Yagui et al. (2004) investigaram a influência da intensidade de luz e do emprego de uréia como fonte de nitrogênio sobre o conteúdo de clorofila na biomassa de *Spirulina platensis*. Para isso, realizaram processos descontínuos alimentados de cultivo empregando uréia, com aumento exponencial de alimentação, em diferentes intensidades de luz, comparando os resultados com aqueles obtidos em cultivo padrão, empregando $KNO_3$ como fonte de nitrogênio. Concluíram que a melhor produção de biomassa foi observada em cultivo com uso de uréia como fonte de nitrogênio, em comparação ao emprego de $KNO_3$. Observaram também que a melhor produtividade de clorofila a (o que reflete o balanço entre crescimento celular e concentração de clorofila na biomassa) ocorreu com uréia em uma concentração total adicionada de 500 mg $L^{-1}$, com intensidade luminosa de 3500 lux.

Costa et al. (2004) estudaram o desenvolvimento de *Spirulina platensis* em água coletada no Lago Mangueira (RS) suplementado com uréia e bicarbonato de sódio em processo descontínuo alimentado, buscando redução do custo de produção. Na verdade, a água deste lago apresenta os nutrientes fundamentais para *Spirulina platensis*, mas suporta o crescimento do microrganismo somente por um período de até 300 horas de cultivo, quando se deve iniciar a adição de nutrientes para prevenir o decréscimo da velocidade de crescimento. Observaram que na condição em que se adicionou 1,125 mg $L^{-1}$ de uréia, sem adição de bicarbonato de sódio, a biomassa produzida foi 2,67 vezes maior em comparação ao ensaio sem suplementação de nutrientes, mostrando ser viável o cultivo de *Spirulina platensis* em processo descontínuo alimentado, usando água do Lago Mangueira suplementado com uréia.

O cultivo de *Spirulina platensis* utilizando uréia obteve um aumento de 37% na produção de biomassa e menor custo, quando comparado com as culturas cultivadas com $KNO_3$ (DANESI et al., 2002). Uréia é hidrolisada formando amônia em condições alcalinas e é tóxica para as microalgas em altas concentrações. Em concentrações acima de 2 mM (120 mg $L^{-1}$) a amônia inibe a fotossíntese e o crescimento de algumas microalgas como, *Scenedesmus obliqus*, *Chorella pyrinoidosa*, *Anacystis nidulans*, *Plectonema borynum* (ABELIOVICH, A & AZOV, Y., 1976). Carvalho et al. (2004) detectaram 1.6 mM (85,6 mg $L^{-1}$) de cloreto de amônio como inibitório no cultivo de *Spirulina platensis* utilizando o processo descontínuo.

Estudos revelaram que o aumento do nível de nitrogênio nos cultivos de *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquous*, *Anacustis nidulans*, *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria rubescens* e *Spirulina platensis* levaram a uma maior quantidade de biomassa, proteínas e clorofila (PIORRECK et al., 1984). Em algas verdes (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquous*) levou a uma maior porcentagem de lipídios (45% da biomassa), mas nas algas verdes-azuladas (*Spirulina platensis*) a quantidade de lipídios não variou (PIORRECK et al., 1984).

Na *Spirulina platensis*, a deficiência de nitrogênio durante o período de crescimento leva a um decréscimo na produção de ficocianina e clorofila e a composição de ácidos graxos pode ser afetada pela falta desse nutriente (FUNTEU et al., 1997). Ficocianinas são cromoproteínas, que constituem o principal pigmento na captação de luz em cianobactérias e representa 1/2 das proteínas celulares. Na falta de nitrogênio e enxofre, essas cromoproteínas são consumidas reduzindo a eficiência fotossintética (CORNET et al., 1992).

Segundo Pirt et al. (1987), células de cianobactérias cultivadas com carência de nitrogênio perdem suas características de cor verde-azulada.

Com a adição da fonte de nitrogênio em cultivos deficientes em nitrogênio, ocorre um rápido aumento na quantidade de proteínas, tais como ficocianinas e, com menos intensidade, outras proteínas celulares são produzidas (CORNET et al., 1998).

A associação da uréia com o $KNO_3$ pode levar a bons resultados, com o $KNO_3$ suprindo a deficiência de nitrogênio no início do cultivo, onde são empregadas menores velocidades de adição de uréia. Assim, ao mesmo tempo em que estaria sendo beneficiada pelo uso de uma fonte mais prontamente utilizável (uréia), teria uma reserva na forma de nitrato, que reduziria, através da ação das enzimas nitrato e nitrito redutases, quando necessário, impedindo qualquer tipo de carência dessa fonte para as células.

O nitrogênio, juntamente com o fósforo, no meio de cultura tem também uma significante influência sobre a capacidade de flotação no gênero *Spirulina (*RAMÍREZ et al., 1999).

## 3. 7. EFEITO DO pH

As reações bioquímicas estão relacionadas com a concentração dos íons $H^+$ no meio de cultura. O pH interfere na estrutura e atividade das proteínas, em particular de proteínas enzimáticas.

O valor do pH no meio de cultivo de *S. platensis* situa-se na faixa de 9,5. No entanto, esse valor pode variar em decorrência de diferentes proporções de carbonato e bicarbonato no meio de cultivo. As formas em que a fonte de carbono é disponibilizada no meio de cultura podem ser observadas nas reações 1 e 2.

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+ \text{ (Reação 1)}$$

$$HCO_3^- + H^+ \rightleftharpoons CO_3^{-2} + 2H^+ \text{ (Reação 2)}$$

A partir da constante de equilíbrio das equações 1 e 2, pode-se correlacionar o pH com as proporções de $CO_2$, $HCO_3^-$ e $CO_3^{-2}$ (Figura 2), de acordo com a equação de Hendersen-Hasselbalch (SASSANO, 2004):

$$[HCO_3^-] / [CO_3^{-2}] = 10^{\,pH - 10,25} \quad \text{(Equação 1)}$$

$$[HCO_3^-] / [CO_2] = 10^{\,pH - 6,38} \quad \text{(Equação 2)}$$

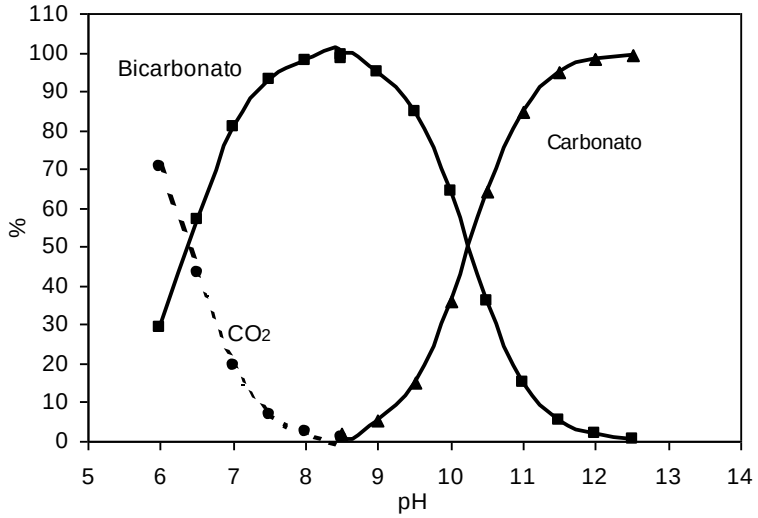


**Figura 2**. Proporção de gás carbônico, bicarbonato e carbonato em função dos valores de pH.

O crescimento da *S. platensis* depende mais do pH do meio do que da fonte de carbono inorgânico, uma vez que, em pH entre 6,5 - 10,0 há uma predominância de íons bicarbonato sendo esse a fonte de carbono assimilável pela *S. platensis* (BINAGHI et al., 2003). Acima do pH 10,3, a fonte de carbono se apresenta como carbonato e por isso seu crescimento é reduzido (SANCHEZ-LUNA, 2004).

O pH também influencia na disponibilidade de nitrogênio para a célula, visto que com pH abaixo de 8,0 há uma predominância de íon amônio. Em pH acima de 11,0, o nitrogênio encontra-se na forma não protonada de amônia que é a forma que tem passagem livre pela membrana celular (BOUSSIBA, 1989; BELKIN & BOUSSIBA, 1991).

Entre esses valores de pH, há as duas formas no meio de cultivo (Figura 3). O equilíbrio entre a amônia e os íons amônio é dependente do pH da solução (Reação 3).

$$NH_4^+ + OH^- \rightleftharpoons NH_3 + H_2O \quad \text{(Reação 3)}$$

A partir da constante de equilíbrio da reação 3 e da equação de Hendersen-Hasselbalch (SASSANO, 2004), pode-se obter a relação entre as concentrações dos compostos para um determinado pH, sendo que em valores de pH acima de 9,3 o equilíbrio é deslocado para a direita e a amônia é predominante.

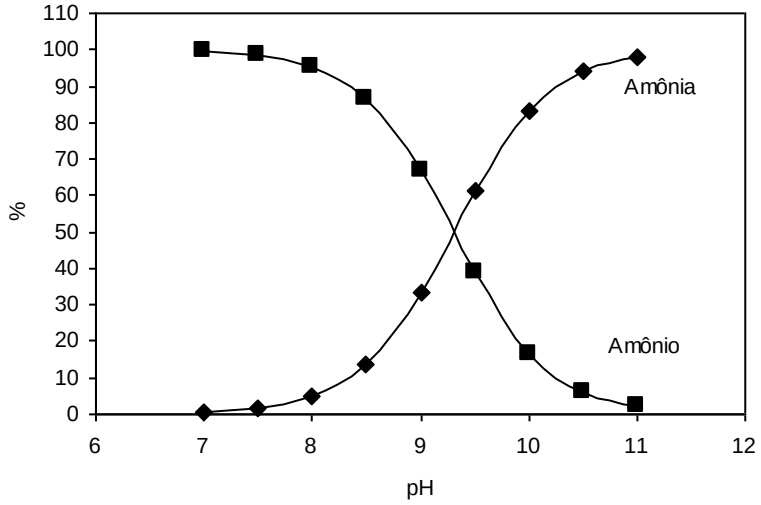


**Figura 3**. Concentração de amônia e amônio em relação ao pH

Tam & Wong (1996), relataram que, quando em pH baixo, há uma redução na formação do gás amônia e a maior parte no nitrogênio existirá na forma de íons amônio, na qual é menos tóxica para a alga. No entanto, pH abaixo de 8,7 ocorre uma diminuição na formação da biomassa produzida (SANCHEZ-LUNA, 2004).

## 3. 8. EFEITO DA TEMPERATURA

A temperatura afeta a concentração celular, a natureza do metabolismo, as necessidades nutricionais e a composição da biomassa. O efeito da temperatura no crescimento é explicado em termos de dois fatores: pela ação da temperatura na estrutura dos componentes celulares (principalmente proteínas e lipídios) e outro relacionando os coeficientes de temperatura com a taxa de reação os quais dependem das energias de ativação das reações (FAINTUCH, 1989).

As *Spirulina spp*. são algas mesofílicas tendo como temperatura ótima para o crescimento por volta de 30 °C (DANESI et al., 2002, SANCHEZ-LUNA, 2004). Em cultivos em tanques abertos, a temperatura pode chegar a 40 °C por poucas horas e, portanto, não tendo efeito prejudicial. A temperatura mínima permitida para o crescimento das *Spirulina spp*. é de 18 °C (JIMÉNEZ et al., 2003). Em geral, o conteúdo do perfil dos lipídios (KATES & HAGEN, 1964; WADA & WADA, 1990) e ácidos graxos varia com a mudança da temperatura, especialmente os

poliinsaturados (MORIST et al., 2001). A temperatura em culturas em tanques abertos, durante o dia iluminado, exerce efeito predominante sobre a produtividade (RICHMOND et al., 1990).

Em relação à temperatura de cultivo da *Spirulina maxima*, observou-se que a variação de 30 ºC para 42 ºC promoveu um aumento de 7,4% para 11,5% no conteúdo de lipídios, um decréscimo de 58,6% para 45% no conteúdo de proteína e um aumento de 29,9% para 38,7% no conteúdo de carboidratos (TOMASELLI et al., 1993).

Pham Quoc & Dubacq (1997) observaram que a composição de lipídios é afetada pela temperatura de crescimento do cultivo e a adição de linoleato de amônio, à temperatura de 24 ºC proporciona um aumento na quantidade de ácido linolênico na *Spirulina platensis*.

## 3.9. CULTIVOS EM TANQUES ABERTOS

Cultivos em tanques abertos de microalgas têm sido estudados por muitos anos e têm revelado resultados satisfatórios a respeito da produtividade e qualidade da biomassa (SANSAWA & ENDO, 2004). Apurados estudos foram efetuados sobre as *Spirulina spp*., revelando seu poder de produzir substâncias, que podem promover ou inibir o crescimento de outros microrganismos (DE CAIRE, 1987, DE CANO et al., 1990, KULIK, 1995). Em cultivos fotossintéticos em tanques abertos, por apresentarem luz como fatores limitantes para a produção algal, tanques com amplas áreas iluminadas têm sido construídos (SANSAWA & ENDO, 2004).

A produção comercial das *Spirulina spp.* é hoje baseada quase que exclusivamente em tanques abertos (PULZ, 2001), embora algumas indústrias usem biorreatores tubulares fechados (SPECKTOROVA et al., 1997). Duas principais vantagens de sistemas em tanques abertos são o menor custo de instalação e o uso da fonte de energia solar (CHAUMONT, 1993). Em cultivos em tanques abertos iluminados, a temperatura exerce um efeito predominante sobre a produtividade (RICHMOND et al., 1990).

## 3.10. PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO DE CULTIVO

Diversos processos de cultivo têm sido desenvolvidos com a finalidade de aumentar a produtividade do material desejado. Segundo Sassano (1999), a forma de adição do substrato nas dornas pode interferir na qualidade da biomassa produzida.

No processo descontínuo, todo o substrato é adicionado no início do cultivo, enquanto no processo descontínuo alimentado o substrato é adicionado, em determinados intervalos de tempo, durante todo o processo. É uma técnica em processos microbianos, onde um ou mais nutrientes são adicionados ao biorreator durante o cultivo e em que os produtos aí permanecem até o final do cultivo (CARVALHO & SATO, 2001). Em casos particulares, como por exemplo, a necessidade de utilização de nutriente viscoso no cultivo, este processo geralmente reduz a viscosidade do meio, e o efeito dos componentes tóxicos é também limitado pela diluição (WARD, 1989). Entre outras vantagens desse processo são: desvia o metabolismo celular para via de interesse de formação do produto, evita repressão catabólica, evita formação de produtos tóxicos no metabolismo microbiano e controla a velocidade de crescimento microbiano. O melhor procedimento operacional, para esse sistema é iniciar com pequena quantidade de biomassa e substrato, e adicionar mais substrato quando a maior parte do substrato inicial ter sido consumida pelo microrganismo (GREGERSEN & JORGENSEN, 1999).

No processo descontínuo alimentado, a alimentação pode ser de forma intermitente ou contínua. O modo de operação da alimentação em bioprocessos permite prevenir o acúmulo, ou a falta do substrato no cultivo. Em processo microbiano, uma apropriada taxa de alimentação exponencialmente crescente resulta na manutenção da concentração do substrato limitante residual, controlando a taxa de formação do produto. Estratégias de alimentações têm sido estudadas em bioprocessos recombinantes para aumentar a produtividade do sistema (D´ANJOU & DAUGULIS, 2000).

O cultivo descontínuo, usando uma concentração inicial de amônia de 1 mM, incubada a 32 ºC, ocorre uma grande perda desse íon para a atmosfera além de ser consumida pelo microrganismo, tornando-se deficiente depois de poucos dias, especificamente 12 dias (OLGUÍN et al. ,2001).

A baixa intensidade luminosa ou a baixa concentração de nitrogênio no cultivo limita o crescimento celular. Por outro lado, a alta intensidade luminosa ou a alta concentração de nitrogênio inibem o crescimento celular. Estas características implicam que o processo descontínuo alimentado deve ser usado para melhorar a densidade celular no crescimento da *S. platensis*, desde que a intensidade luminosa e a concentração de nitrogênio solúvel possam ser alternativamente aumentadas, até alcançar a produção máxima de biomassa sem resultar na inibição do crescimento. Um dos objetivos deste estudo foi explorar esta possibilidade.

# 4. MATERIAIS E MÉTODOS

## 4.1. MICRORGANISMO

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

## 4.2. MANUTENÇÃO DA *S. PLATENSIS*:

A cianobactéria foi mantida em meio de cultivo padrão para *Spirulina* (PAOLETTI et al., 1975) (item 4.3.1).

## 4.3. MEIO DE CULTIVO

Utilizaram-se dois tipos de meio. Um meio padrão para o cultivo de *Spirulina* (PAOLETTI et al., 1975) - item 4.3.1, com $KNO_3$ como fonte de nitrogênio - que foi utilizado para duas finalidades: manutenção do microrganismo e preparo do inóculo; um meio modificado (item 4.3.2), onde se utilizou uréia como fonte de nitrogênio.

### 4.3.1. Meio padrão para cultivo de *S. platensis*

O meio mineral padrão foi o de Paoletti (PAOLETTI et al., 1975), cuja composição, em gramas por litro, é a seguinte: $KNO_3$, 2,57; NaCl, 0,92; $Na_2SO_4$, 1,88; $K_2HPO_4$, 0,50; $Na_2CO_3$, 8,89; $NaHCO_3$, 15,15; $CaCl_2.2H_2O$, 0,05; $MgSO_4.7H_2O$, 0,25. Nesse meio incorporou-se 1,0 mL de solução de Fe-EDTA e 1,0 mL de solução de microelementos, discriminadas a seguir.

Solução de Fe-EDTA (g $L^{-1}$): EDTA-$Na_2$, 29,8; $FeSO_4.7H_2O$, 24,9.

Solução de microelementos (mg.$L^{-1}$): $SnCl_2.2H_2O$, 304; $MnCl_2.4H_2O$, 173; LiCl, 293; $CoCl_2.6H_2O$, 194; $SeCl_2.2H_2O$, 146; $BaCl_2.2H_2O$, 2846; $CuSO_4.5H_2O$, 186; $NiSO_4.5H_2O$, 717; $Na_2MoO_4.2H_2O$, 121.

4.3.2. Meio modificado

Foi o meio de Paoletti (PAOLETTI et al., 1975), com substituição do nitrato de potássio por uréia. A massa total adicionada será uma função do tempo total de alimentação (item 4.8).

4.4. PREPARO DO INÓCULO

A *S. platensis*, mantida em ágar, foi colhida com auxílio de alça de platina, em condições assépticas, em fluxo laminar, e inoculada em 10 mL de meio líquido (em tubo de ensaio). Depois de 7 dias, esse material foi utilizado para inocular frascos Erlenmeyer de 500 mL, com 200mL de meio de cultivo padrão (item 4.3.1), previamente esterilizados por filtração.

Os frascos Erlenmeyer após o repique foram imediatamente levados ao agitador rotativo, a 100 $min^{-1}$ (FERRAZ, 1986), temperatura de 30 $^{O}C$ e iluminância de 72 µmol fótons $m^{-2}$ $s^{-1}$ (CARVALHO et al., 2004), fornecida por 4 lâmpadas fluorescentes Sylvania de 20 Watts, cada uma a uma distância de 50 cm dos frascos.

O crescimento celular foi acompanhado, sendo utilizada para inóculo uma suspensão de *S. platensis*, após 6 a 8 dias de cultivo (PELIZER et al., 2003), em crescimento exponencial, isenta de contaminação. Essa suspensão foi filtrada, lavada com solução fisiológica para retirada do $KNO_3$ e ressuspensa em meio de cultivo padrão isento de $KNO_3$. Esta suspensão foi o inóculo para o cultivo em minitanques, onde foram realizados os estudos com diferentes concentrações iniciais de $KNO_3$ e da adição de uréia como fonte de nitrogênio (item 4.8). A concentração celular inicial foi fixada em 50 mg $L^{-1}$.

4.5. DISPOSITIVO PARA CULTURA

Dentre os inúmeros sistemas de algacultura descritos na literatura, adotaremos os minitanques de forma alongada (BELAY, 1997). Estes tanques são construídos de lâminas de PVC de cor branca. A movimentação da cultura foi executada por pás rotativas com freqüência de 18 rotações por minuto. Na Figura 4 pode-se observar os minitanques.

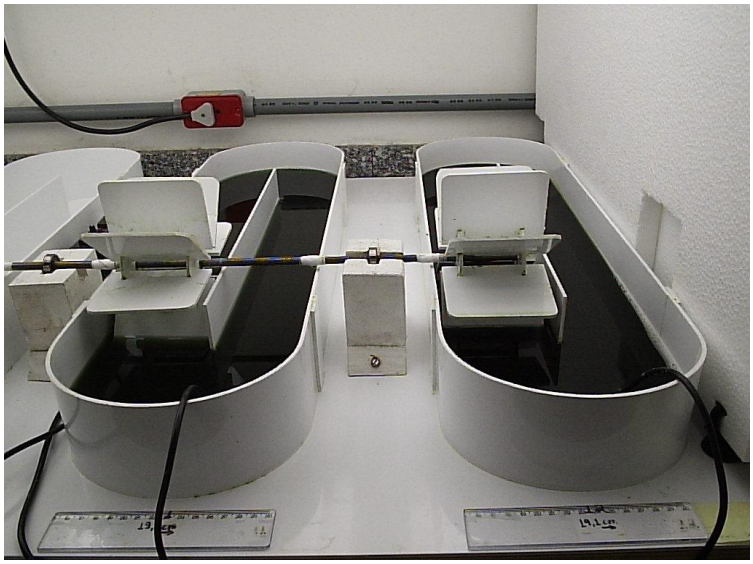

**Figura 4**. Minitanques utilizados no cultivo de *S.platensis*

## 4.6. DESCRIÇÃO DE UM EXPERIMENTO TÍPICO

Foram fixadas as seguintes condições experimentais: freqüência de rotação das pás rotativas: 18 rpm; geometria dos minitanques; volume de líquido nos minitanques: 5,0L.

A suspensão de *Spirulina* (inóculo - item 4.4) foi adicionada ao minitanque e o volume de meio completado até 5,0 L. Este é o meio de cultivo preparado com $KNO_3$ (item 4.3.1), ao qual se adicionou uréia de acordo com o plano de trabalho (item 4.8).

A concentração inicial de uréia foi de 1,33 mM (80,0 mg $L^{-1}$) (DANESI et. al., 2002), sendo adicionada diariamente de acordo com a equação 3 (item 4.8.1). A temperatura de 30 $^{o}$C foi mantida por meio de resistências elétricas controladas por termostatos. A intensidade luminosa foi fixada em 156 µmol fótons $m^{-2}$ $s^{-1}$ (PEDROSA, 2006).

## 4.7. TÉCNICAS ANALÍTICAS

Os experimentos foram acompanhados por técnicas analíticas descritas a seguir. As determinações de concentração celular e pH foram feitas diariamente, enquanto que as medidas de concentração das fontes de nitrogênio e de carbonato total, em função dos relativos grandes volumes necessários para a execução das técnicas, foram realizadas de dois em dois dias.

4.7.1. Acompanhamento do cultivo

4.7.1.1. Determinação da concentração celular

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

4.7.1.1.1 - Construção da curva de calibração para determinação da concentração celular

A curva de calibração foi obtida tomando-se um volume de 25 mL de uma suspensão concentrada, de células em fase de crescimento exponencial, que foi filtrado e lavado, com água destilada, em uma membrana de acetato de celulose de 1,2 µm, previamente seca a 70 ºC por 12 h, e previamente pesada. A amostra foi levada à estufa de 100 ºC a 105 $^{o}$C, por um período de 5 h, suficiente para que mantivesse uma massa constante. A massa das células foi calculada por diferença dos valores das massas das membranas antes e depois da filtração, e dividido pelo volume filtrado para obter-se a concentração celular na suspensão. A partir desta mesma suspensão, foram preparadas diferentes diluições, e alíquotas dessas diluições foram levadas ao espectrofotômetro para leitura da transmitância a 560nm de comprimento de onda e caminho óptico de 1cm, com água destilada como branco. Obteve-se, dessa forma, uma curva que relaciona concentração celular com o logaritmo da transmitância.

4.7.1.2. Determinação da concentração de amônia total.

A amônia total foi quantificada em potenciômetro marca ORION, modelo 710-A, por meio de um eletrodo seletivo para amônia (LEDUY & SAMSON, 1982), cujo modelo era 95-12 ORION. Determinou-se no meio isento de células, com o valor do pH corrigido para 13, pela adição de NaOH 1,5 M antes da leitura no eletrodo (CARVALHO et al., 2004). O volume utilizado foi de 15 mL.

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

4.7.1.3. Determinação da concentração de uréia

Para a determinação da concentração de uréia, inicialmente foi hidrolisada em meio ácido, como segue: 10 mL do meio de cultivo isento de células foi submetido a um tratamento com $H_2SO_4$ (1 mL de $H_2SO_4$ 5 N), a 200°C, por 6 horas, em bloco digestor Tecnal, modelo TE-106 (CEZARE, 1998). Após esse tempo, o tubo onde ocorreu a hidrólise ácida teve seu conteúdo quantitativamente transferido para um balão volumétrico de 50 mL, com neutralização do pH com NaOH 1,5 M, utilizando fenolftaleína como indicador, e finalmente o volume completado com água destilada. Desse balão foi retirado um volume de 15 mL para a determinação da concentração de amônia, conforme método descrito no item anterior. Considerando ainda a diluição da amostra, podemos calcular a concentração de amônia global, que representa a amônia que já estava presente no meio de cultivo, mais a amônia proveniente da hidrólise da uréia. Assim, por diferença, é possível calcular a concentração de uréia no meio de cultivo.

4.7.1.4. Determinação da concentração de $KNO_3$

A concentração de $KNO_3$ foi determinada conforme a metodologia descrita por Vogel (1992). Esta técnica, está baseada na redução do nitrato à amônia pela liga de Devarda em meio alcalino, com captura da amônia formada em meio contendo uma solução de HCl 0,2 M em excesso. Após o recebimento da amônia, o que sobrou de HCl foi titulado com uma solução de NaOH padrão 0,2 M. Por diferença entre a quantidade de nitrogênio recebida e aquela proveniente da amônia e uréia é possivel calcular a concentração de nitrato no meio de cultivo.

4.7.1.5. Determinação da concentração de carbonato total

A concentração de carbonato total foi determinada por titulometria, de acordo com a metodologia preconizada por Pierce & Haenisch (1948).

No meio isento de células adiciona-se de hidróxido de sódio na amostra e titula-se com ácido clorídrico na presença do indicador fenoftaleina até ponto de viragem para a conversão de carbonato em bicarbonato. Posteriormente a amostra foi titulada novamente com ácido clorídrico na presença do indicador alaranjado de metila, para que todo o bicarbonato transforme-se em ácido carbônico. A concentração de carbonato total foi quantificada pelos 2 intervalos de viragem.

4.7.1.6. Determinação do pH.

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

4.7.2. Avaliação da biomassa obtida.

A análise do teor de clorofila foi realizada conforme metodologia descrita por Vonshak (1997b), na amostra correspondente à máxima concentração celular obtida.

Ao final do cultivo, o volume de 5 L foi retirado, contendo, *Spirulina platensis* foi centrifugado, com 3 lavagens sucessivas com água destilada para retirada do sal adsorvido às células, e, após secagem com ventilação a 55 ºC por 12 horas (PELIZER et al., 1999), foi avaliado o teor de proteínas e de lipídios na biomassa.

4.7.2.1 Proteínas totais

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

4.7.2.2 Lipídios totais

A fração lipídica total foi obtida por extração com solvente orgânico (FERRAZ et al., 1986). A amostra foi triturada em gral e, então transferida para um extrator contínuo de Soxhlet com refluxo da mistura clorofórmio-metanol (2:1 v/v) e esse processo continuou, até que o solvente no copo de Soxhlet não apresentasse coloração (PIORRECK, 1984, OLGUÍN et al., 2001). A fração lipídica total juntamente com os solventes foram tratados em sistema evaporador rotativo a vácuo. O material obtido reúne ácidos graxos, triglicerídeos, fosfolipídeos, carotenóides, pigmentos fotossintetizantes, esteróides e hidrocarbonetos, sendo chamados de fração lipídica total (GIOIELLI, 1997).

## 4.8. PLANO DE TRABALHO

### 4.8.1. Processo de cultivo

Para alimentação dos cultivos com uréia, o processo utilizado foi o descontínuo alimentado com vazão de alimentação exponencialmente crescente (DANESI et al., 2002), de acordo com a seguinte equação:

$$m_t = m_0 e^{kt} \qquad (3).$$

Onde "$m_t$" representa a quantidade de uréia adicionada por unidade de volume do reator até instante t (mmol $L^{-1}$). "$m_0$" representa a quantidade inicial desta fonte de nitrogênio adicionada por unidade de volume (mmol $L^{-1}$).

Os valores de $m_o$ foram fixados em 1,33 mM (79,8 mg $L^{-1}$) (DANESI et al., 2002). O tempo de alimentação (T) desta fonte de nitrogênio foi de 17 dias (determinado em testes preliminares em cultivos somente com uréia como fonte de nitrogênio- item 5.4), enquanto que todo o $KNO_3$ foi adicionado inicialmente, de acordo com os valores fixados na Tabela 3.

As quantidades totais adicionadas ($m_T$) de uréia por unidade de volume de reator foram variáveis estudadas neste trabalho e tiveram seus níveis centrais baseados em trabalhos anteriores (DANESI et al., 2002; RANGEL-YAGUI et al., 2004), com seus valores discriminados na Tabela 3 (item 4.8.2), respectivamente.

Considerando a equação 3, quando t = T, mt = mT. Como se conhece o valor de $m_0$, é possível para cada condição da Tabela 3 calcular o valor de k, que determina perfil de alimentação do sistema.

### 4.8.2. Planejamento Experimental

O planejamento utilizado foi baseado na metodologia denominada planejamento em estrela (BARROS NETO et al., 1996), com duas variáveis (quantidade inicial de $KNO_3$ por unidade de volume e quantidade adicionada de uréia por unidade de volume). Os experimentos foram realizados de acordo com o apresentado na Tabela 3. Os níveis de $KNO_3$ foram escolhidos levando-se em conta o trabalho de Paoletti et al. (1975). Nessa Tabela constam os valores reais e os valores codificados das variáveis.

## 4.9. FORMA E ANÁLISE DOS RESULTADOS

**Tabela 3** - Experimentos realizados combinando-se $KNO_3$ e uréia[a]

| Experimento | Valores codificados | | Valores reais | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | $X_1$[b] | $X_2$[c] | Quantidade inicial de $KNO_3$[d] (mmol $L^{-1}$) | Quantidade inicial de $KNO_3$[d] (g $L^{-1}$)) | $m_T$[e] (mmol $L^{-1}$) | $m_T$[e] (g $L^{-1}$) |
| 1 | -1 | -1 | 8,00 | 0,81 | 4,00 | 0,24 |
| 2 | +1 | -1 | 22,00 | 2,22 | 4,00 | 0,24 |
| 3 | -1 | +1 | 8,00 | 0,81 | 11,00 | 0,66 |
| 4 | +1 | +1 | 22,00 | 2,22 | 11,00 | 0,66 |
| 5 | 0 | -1,414 | 15,00 | 1,52 | 2,55 | 0,15 |
| 6 | -1,414 | 0 | 5,10 | 0,52 | 7,50 | 0,45 |
| 7 | 0 | +1,414 | 15,00 | 1,52 | 12,45 | 0,75 |
| 8 | +1,414 | 0 | 24,90 | 2,51 | 7,50 | 0,45 |
| 9 | 0 | 0 | 15,00 | 1,52 | 7,50 | 0,45 |
| 10 | 0 | 0 | 15,00 | 1,52 | 7,50 | 0,45 |
| 11 | 0 | 0 | 15,00 | 1,52 | 7,50 | 0,45 |
| 12 | 0 | 0 | 15,00 | 1,52 | 7,50 | 0,45 |
| 13 | 0 | 0 | 15,00 | 1,52 | 7,50 | 0,45 |
| 14 | 0 | 0 | 15,00 | 1,52 | 7,50 | 0,45 |

[a] A adição de $KNO_3$ foi unicamente no início do cultivo, enquanto que a adição de uréia foi feita ao longo de 17 dias, de acordo com a Eq. 3.
[b] valor codificado da variável quantidade inicial de $KNO_3$.
[c] valor codificado da variável quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume de meio de cultivo ($m_T$).
[d] quantidade inicial de $KNO_3$ adicionado por unidade de volume de meio de cultivo.
[e] quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume de meio de cultivo ($m_T$)..

A partir dos cultivos, foram calculadas as produtividades em biomassa e os fatores de conversão da fonte de nitrogênio em células. Verificou-se a influência dos parâmetros estudados nos resultados através de regressão multivariável (BARROS NETO et al., 1996), obtendo-se equações polinomiais, que permitem a avaliação simultânea das variáveis estudadas, com detecção de possíveis interações entre as variáveis independentes.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse item serão apresentadas: a curva de calibração para a determinação da concentração celular (item 5.1), a curva de calibração para determinação da concentração de amônia total (item 5.2), a curva de calibração para determinação do teor de clorofila (item 5.3), os resultados preliminares realizados para avaliação do tempo de alimentação (item 5.4), resultados dos experimentos de 1 a 14 (item 5.5) , discussão dos resultados (item 5.6) e a análise estatística dos experimentos de 1 a 14 (item 5.7)

### 5.1. CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

A determinação da concentração celular ao longo dos cultivos foi realizada através de uma curva de calibração que correlaciona o logaritmo da transmitância com um valor de concentração celular, como apresentado na Figura 5.

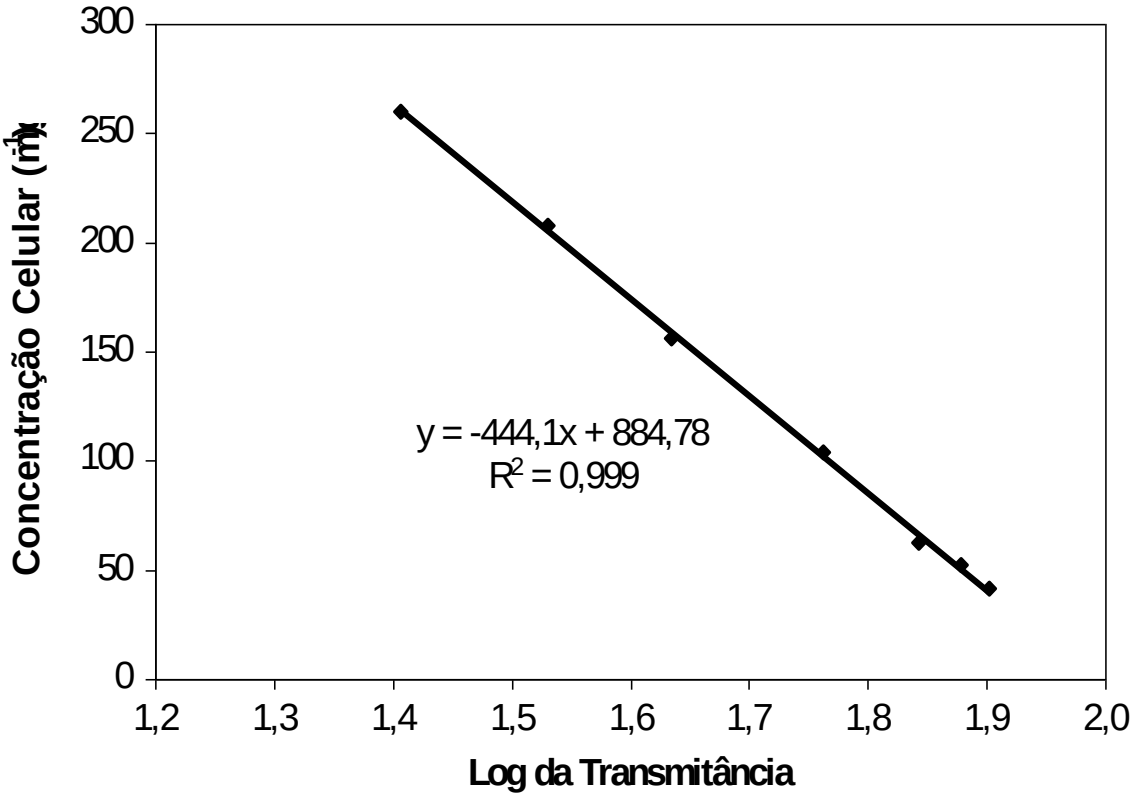


**Figura 5**. Curva de calibração para determinação da concentração celular de *Spirulina platensis*.

## 5.2. CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AMÔNIA TOTAL

Foi desenvolvida uma curva de calibração, cada dia de análise, como recomendado pelo fabricante do equipamento e do eletrodo. Segue-se um exemplo de curva de calibração obtida, na Figura 6. Neste caso específico, a maior diluição, 9,2589E$^{-07}$M (cujo valor de Log é igual a – 6,0334) apresentou uma leitura de 220,0 mV, no eletrodo seletivo de amônia.

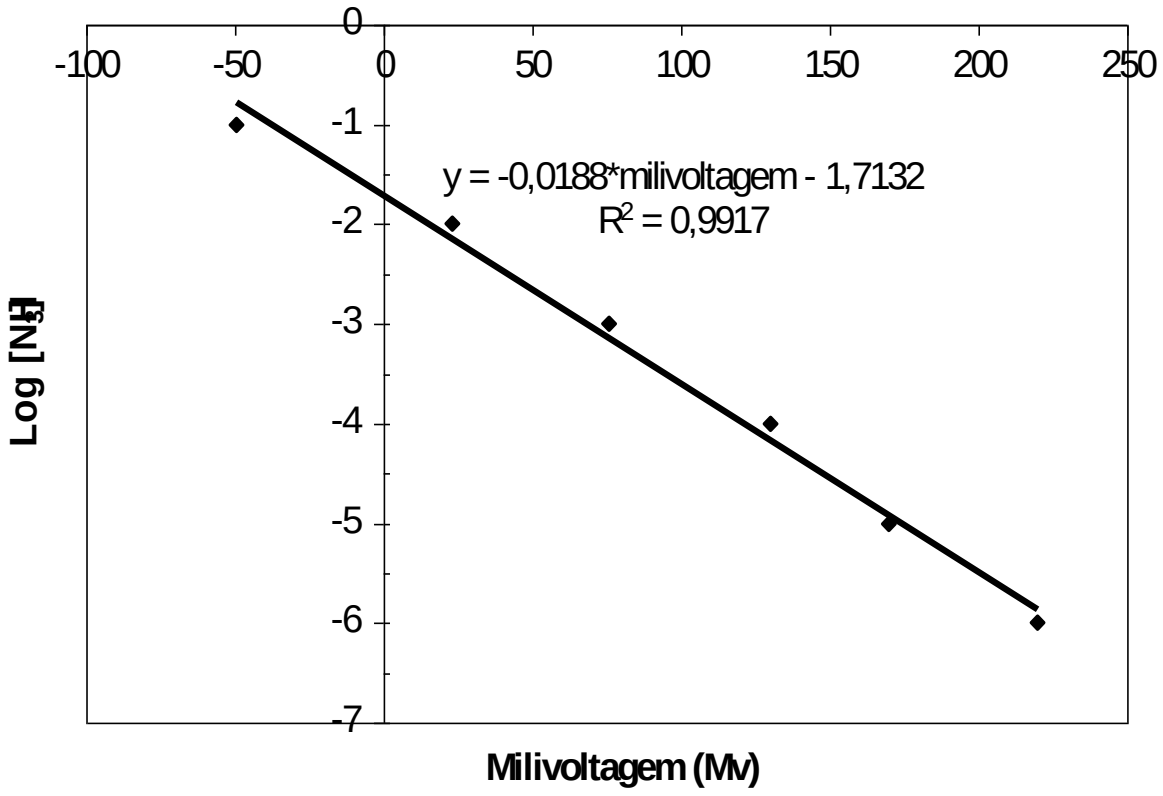


**Figura 6**. Curva de calibração para determinação da concentração de amônia total em meio de cultivo de *Spirulina platensis*.

## 5.3. CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CLOROFILA

A determinação teor de clorofila foi realizada através de uma curva de calibração, que correlaciona a concentração de clorofila com um valor de absorbância, como apresentado na Figura 7. Clorofila Sigma foi utilizada como padrão para a construção da curva de calibração.

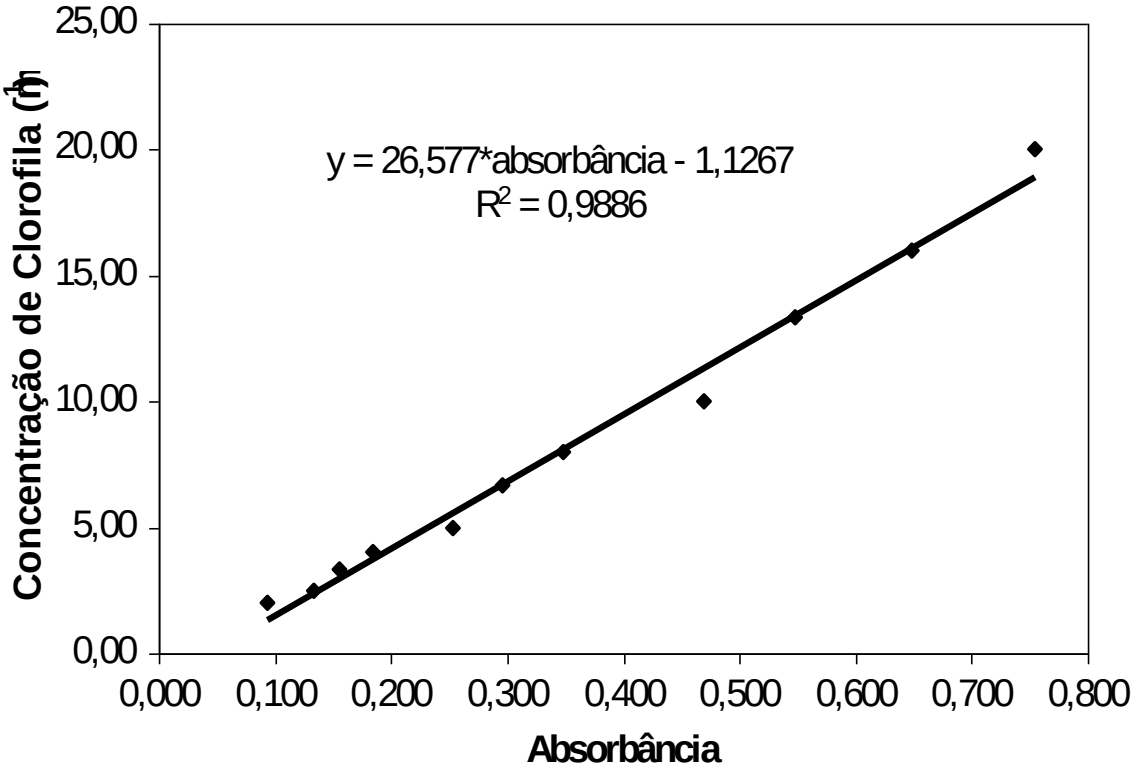


**Figura 7**. Curva de calibração para determinação do teor de Clorofila em meio de cultivo de *Spirulina platensis*.

## 5.4. RESULTADOS REFERENTES AOS ACOMPANHAMENTOS DOS EXPERIMENTOS PRELIMINARES 1 A 4 (EXPERIMENTOS 1P A 4P), APENAS UTILIZANDO URÉIA COMO FONTE DE NITROGÊNIO

Tendo em vista que em trabalho de otimização de condições de intensidade luminosa no laboratório de biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, a intensidade luminosa de 156 µmol fótons $m^{-2}$ $s^{-1}$ é a que leva á maiores valores de concentração celular final quando do uso de cloreto de amônio como fonte de nitrogênio, com tempo de alimentação da ordem de 17 dias (BEZERRA, 2006), foi necessário avaliar se essas condições seriam válidas para o uso de uréia como fonte de nitrogênio. Assim, antes de iniciar os experimentos propostos para este trabalho, foram realizados alguns testes preliminares para estudar o melhor tempo de alimentação de uréia, em cultivos com intensidade luminosa de 156 µmol fótons $m^{-2}$ $s^{-1}$ e 8,33 mM (0,5 g L-1 ) de uréia, com a mesma lei de adição adotada por Bezerra (2006). Os resultados referentes aos acompanhamentos dos experimentos são apresentados nas Tabelas 4 a 7. Os tempos escolhidos para avaliação variaram de 14 a 23 dias. Para cada experimento, após as respectivas tabelas, apresentam-se as correspondentes figuras (Figuras 8 a 11).

**EXPERIMENTO 1 P**

**Tabela 4** – Concentração celular (X) e valor de pH para o experimento 1P (Tempo de alimentação 14 dias).

| Tempo (Dias) | X (mg $L^{-1}$) | pH |
|---|---|---|
| 0 | 50 | 10,0 |
| 1 | 136 | 10,0 |
| 2 | 248 | 10,4 |
| 3 | 444 | 10,4 |
| 4 | 988 | 10,6 |
| 5 | 945 | 10,7 |
| 6 | 927 | 10,9 |
| 7 | 1380 | 11,0 |
| 8 | 1561 | 10,9 |
| 9 | 1941 | 11,0 |
| 10 | 2177 | 11,1 |
| 11 | 2200 | 10,9 |
| 12 | 2320 | 11,1 |
| 13 | 2409 | 10,9 |
| 14 | 2641 | 10,9 |
| 15 | 2767 | 10,7 |
| 16 | 2390 | 11,0 |
| 17 | 2291 | 11,0 |

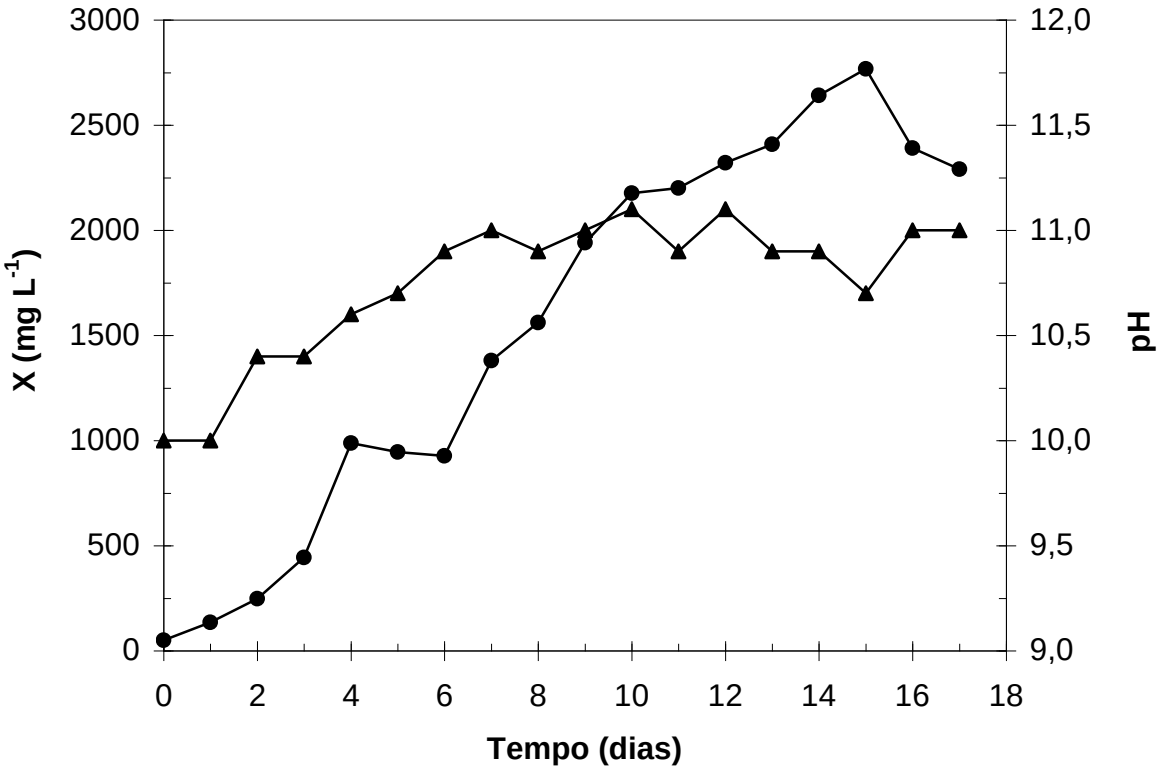


**Figura 8**. Concentração celular (X ◆) e pH (▲) em função do tempo para o experimento 1P (Tempo de alimentação 14 dias).

**EXPERIMENTO 2 P**

**Tabela 5** – Concentração celular (X) e valor de pH para o experimento 2P. (Tempo de alimentação 17 dias).

| Tempo (Dias) | X ($mg\ L^{-1}$) | pH |
|---|---|---|
| 0 | 50 | 10,0 |
| 1 | 149 | 10,0 |
| 2 | 266 | 10,2 |
| 3 | 451 | 10,5 |
| 4 | 796 | 10,7 |
| 5 | 892 | 10,7 |
| 6 | 903 | 11,0 |
| 7 | 1254 | 11,2 |
| 8 | 1306 | 11,1 |
| 9 | 1477 | 11,3 |
| 10 | 1586 | 11,1 |
| 11 | 1761 | 11,0 |
| 12 | 2189 | 11,2 |
| 13 | 2691 | 11,0 |
| 14 | 3211 | 11,0 |
| 15 | 3375 | 10,8 |
| 16 | 3591 | 11,0 |
| 17 | 3670 | 10,9 |
| 18 | 2897 | 10,9 |
| 19 | 2362 | 10,8 |

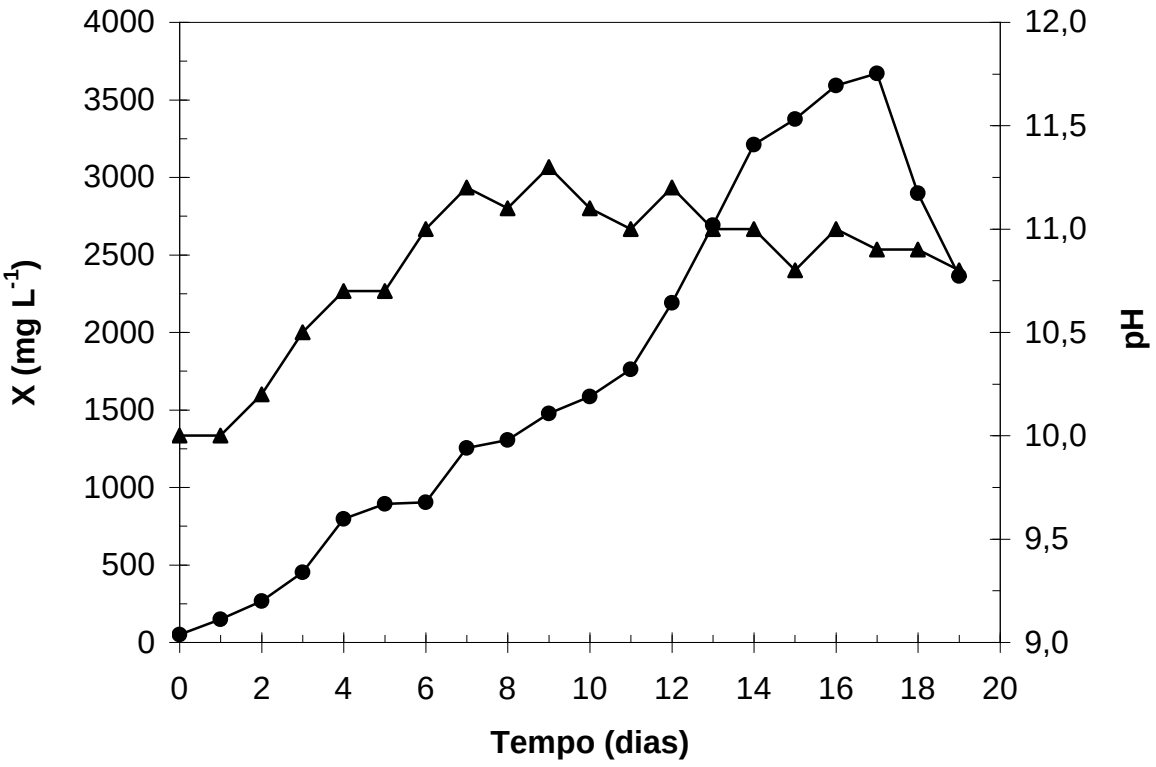


**Figura 9**. Concentração celular (X ◆) e pH (▲) em função do tempo para o experimento 2P (Tempo de alimentação 17 dias).

**EXPERIMENTO 3 P**

**Tabela 6** – Concentração celular (X) e valor de pH para o experimento 3P (Tempo de alimentação 20 dias).

| Tempo (Dias) | X (mg $L^{-1}$) | pH |
|---|---|---|
| 0 | 50 | 10,0 |
| 1 | 140 | 10,0 |
| 2 | 299 | 10,2 |
| 3 | 448 | 10,7 |
| 4 | 742 | 10,8 |
| 5 | 856 | 10,8 |
| 6 | 1034 | 11,1 |
| 7 | 1202 | 11,2 |
| 8 | 1393 | 11,1 |
| 9 | 1863 | 11,2 |
| 10 | 2129 | 11,1 |
| 11 | 1715 | 11,1 |
| 12 | 2443 | 11,2 |
| 13 | 2699 | 11,2 |
| 14 | 2673 | 11,1 |
| 15 | 2876 | 11,0 |
| 16 | 3226 | 11,0 |
| 17 | 3689 | 11,0 |
| 18 | 2991 | 10,9 |
| 19 | 3035 | 10,8 |
| 20 | 2895 | 10,8 |
| 21 | 2541 | 10,9 |

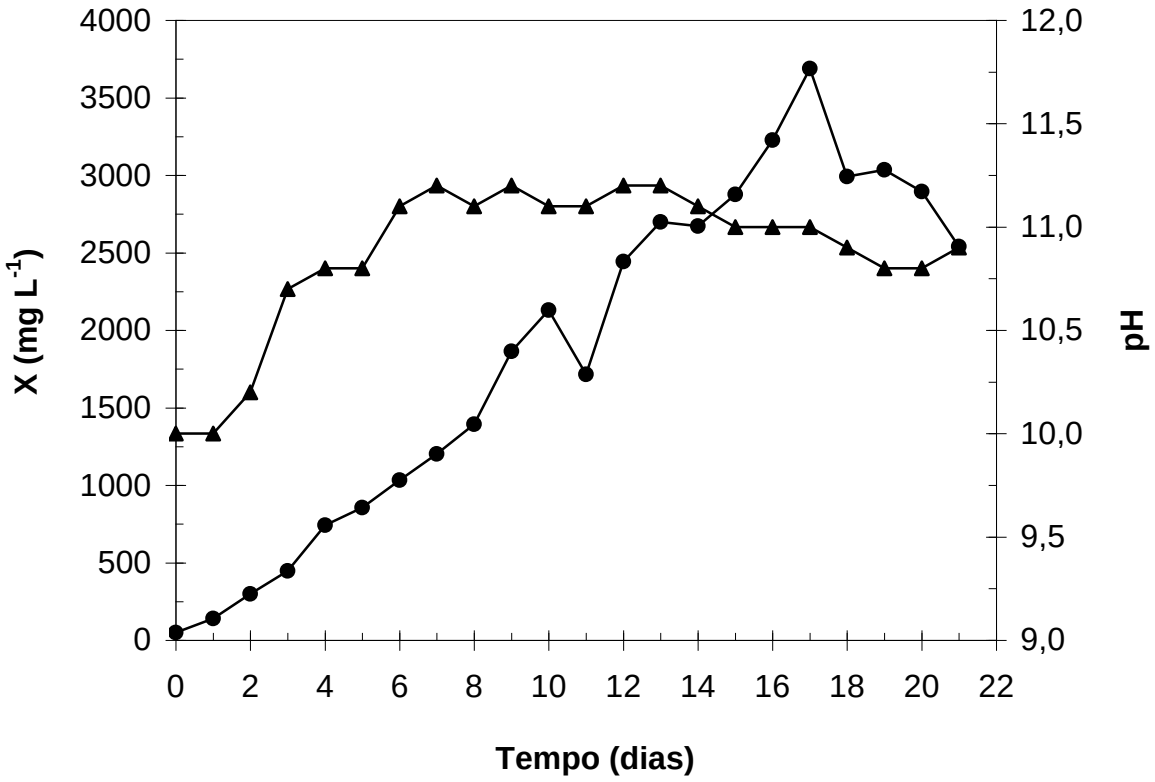


**Figura 10**. Concentração celular (X ◆) e pH (▲) em função do tempo para o experimento 3P (Tempo de alimentação 20 dias).

**EXPERIMENTO 4 P**

**Tabela 7** – Concentração celular (X) e valor de pH para o experimento 4P (Tempo de alimentação 23 dias).

| Tempo (Dias) | X (mg $L^{-1}$) | pH |
|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,8 |
| 1 | 154 | 9,8 |
| 2 | 258 | 10,0 |
| 3 | 413 | 10,2 |
| 4 | 636 | 10,8 |
| 5 | 705 | 10,5 |
| 6 | 866 | 10,8 |
| 7 | 1281 | 11,0 |
| 8 | 1417 | 10,9 |
| 9 | 1614 | 11,0 |
| 10 | 1792 | 11,0 |
| 11 | 1613 | 11,0 |
| 12 | 2143 | 11,2 |
| 13 | 2076 | 11,1 |
| 14 | 2731 | 11,2 |
| 15 | 3077 | 11,1 |
| 16 | 3466 | 11,1 |
| 17 | 3918 | 11,1 |
| 18 | 2554 | 11,0 |
| 19 | 2632 | 10,8 |
| 20 | 2872 | 10,8 |
| 21 | 2977 | 10,9 |
| 22 | 2848 | 10,9 |
| 23 | 2688 | 10,9 |

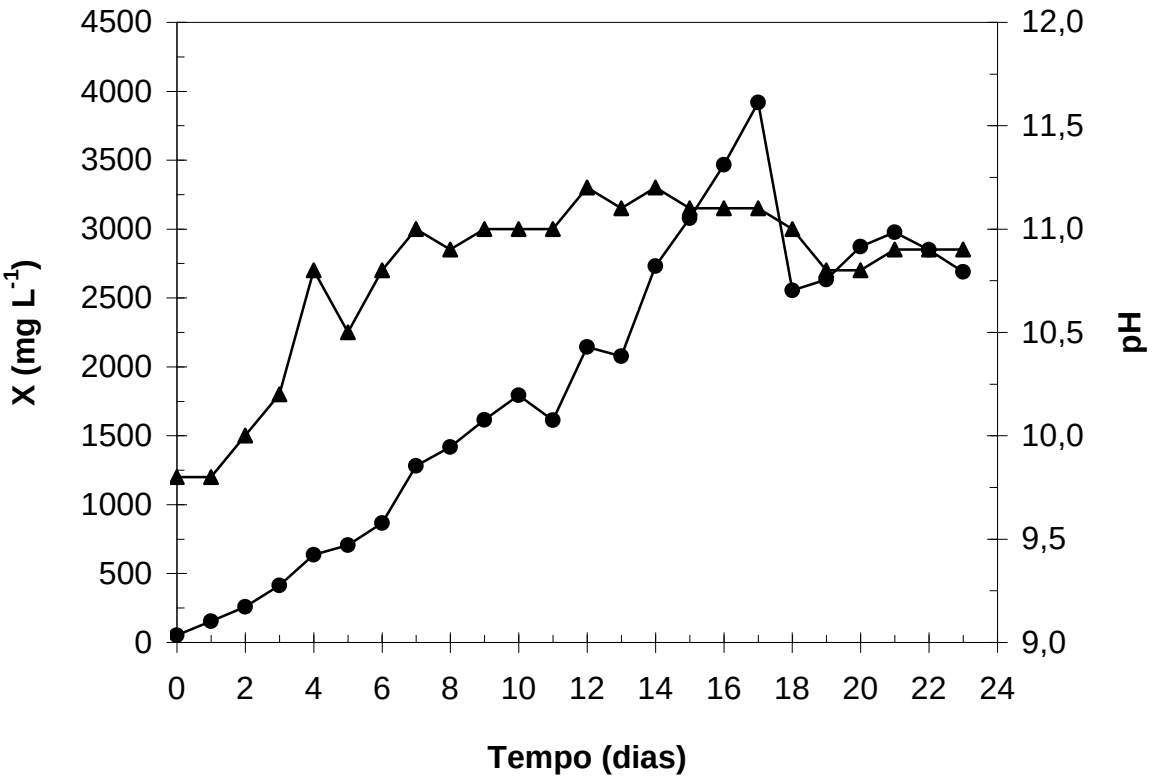


**Figura 11**. Concentração celular (X ◆) e pH (▲) em função do tempo para o experimento 4P (Tempo de alimentação 23 dias).

Pode-se observar por estes resultados preliminares que não há vantagem em trabalhar com tempo de alimentação superior a 17 dias, pois nesse dia foram obtidas as maiores concentrações celulares finais. Dessa forma, esse tempo foi o escolhido para dar continuidade ao trabalho, com uso simultâneo de uréia e nitrato de potássio como fontes de nitrogênio. Esse tempo é da mesma ordem de grandeza ao obtido para o cultivo de *S. platensis* com a mesma intensidade luminosa, porém com cloreto de amônio como fonte de nitrogênio (BEZERRA, 2006).

## 5.5. RESULTADOS REFERENTES AO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Foram realizados os seguintes experimentos: experimentos 1 a 8 do planejamento experimental, experimentos correspondentes aos pontos centrais 9 a 14 do planejamento experimental, e experimentos correspondentes aos pontos de ótimo (15 a 17), referentes às concentrações celulares obtidas, a partir da análise estatística. Os resultados referentes aos acompanhamentos dos experimentos são apresentados nas Tabelas 8 a 24. Para cada experimento, após as respectivas tabelas, apresentam-se as correspondentes curvas de crescimento, variação da concentração de carbonato e nitrato em função do tempo e a variação da concentração de amônia e uréia em função do tempo (Figuras 12 a 62).

**EXPERIMENTO 1**

**Tabela 8** – Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 1 ($KNO_3$, 8 mM (0,8 g $L^{-1}$); Uréia, 4 mM (0,24 g $L^{-1}$)).

| Tempo (Dias) | X (mg $L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $L^{-1}$) | Nitrato (g $L^{-1}$) | Amônia (mol $L^{-1}$) | Uréia (mol $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,3 | 15,85 | 0,50 | - | - |
| 1 | 125 | 9,7 | - | - | - | - |
| 2 | 234 | 9,8 | 14,52 | 0,47 | $2,1516 \times 10^{-5}$ | $2,7714 \times 10^{-5}$ |
| 3 | 356 | 10,0 | - | - | - | - |
| 4 | 561 | 10,1 | - | - | - | - |
| 5 | 948 | 10,3 | 12,60 | 0,47 | $4,1764 \times 10^{-6}$ | $2,0239 \times 10^{-5}$ |
| 6 | 1194 | 10,4 | - | - | - | - |
| 7 | 1392 | 10,5 | 12,38 | 0,44 | $1,3319 \times 10^{-6}$ | $1,8654 \times 10^{-5}$ |
| 8 | 1730 | 10,7 | - | - | - | - |
| 9 | 2825 | 10,8 | 11,44 | 0,38 | $2,8635 \times 10^{-6}$ | $5,8297 \times 10^{-6}$ |
| 10 | 3247 | 10,9 | - | - | - | - |
| 11 | 3647 | 11,0 | 10,68 | 0,38 | $7,6521 \times 10^{-5}$ | $1,3015 \times 10^{-4}$ |
| 12 | 3732 | 11,0 | - | - | - | - |
| 13 | 4044 | 11,0 | 8,77 | 0,35 | $6,5400 \times 10^{-6}$ | $1,2243 \times 10^{-6}$ |
| 14 | 4295 | 11,0 | - | - | - | - |
| 15 | 4350 | 11,0 | 5,34 | 0,31 | $1,6906 \times 10^{-5}$ | $2,2333 \times 10^{-5}$ |
| 16 | 4751 | 10,9 | - | - | - | - |
| 17 | 4978 | 10,9 | 4,96 | 0,28 | $2,6857 \times 10^{-5}$ | $8,4828 \times 10^{-5}$ |
| 18 | 5257 | 10,9 | - | - | - | - |
| 19 | 4195 | 10,7 | - | 0,25 | $4,9662 \times 10^{-6}$ | $7,9813 \times 10^{-6}$ |
| 20 | 3559 | 10,6 | - | - | - | - |

-: Amostras não analisada.

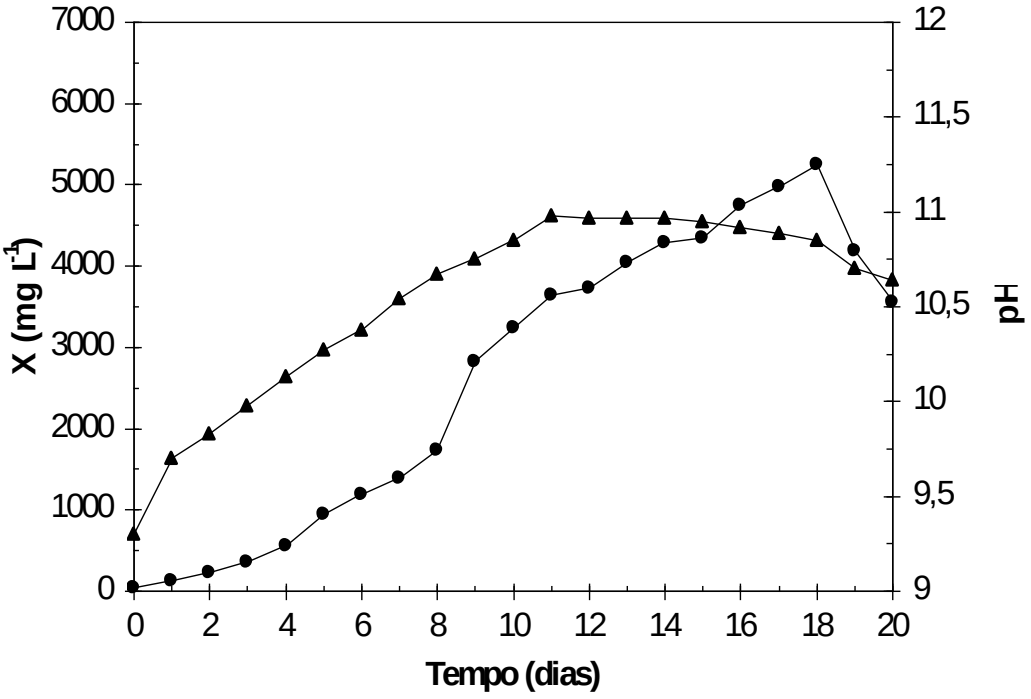


**Figura 12**. Concentração celular (X –◆–) e pH (–▲–) em função do tempo para experimento 1 ($KNO_3$, 8 mM; Uréia, 4 mM).

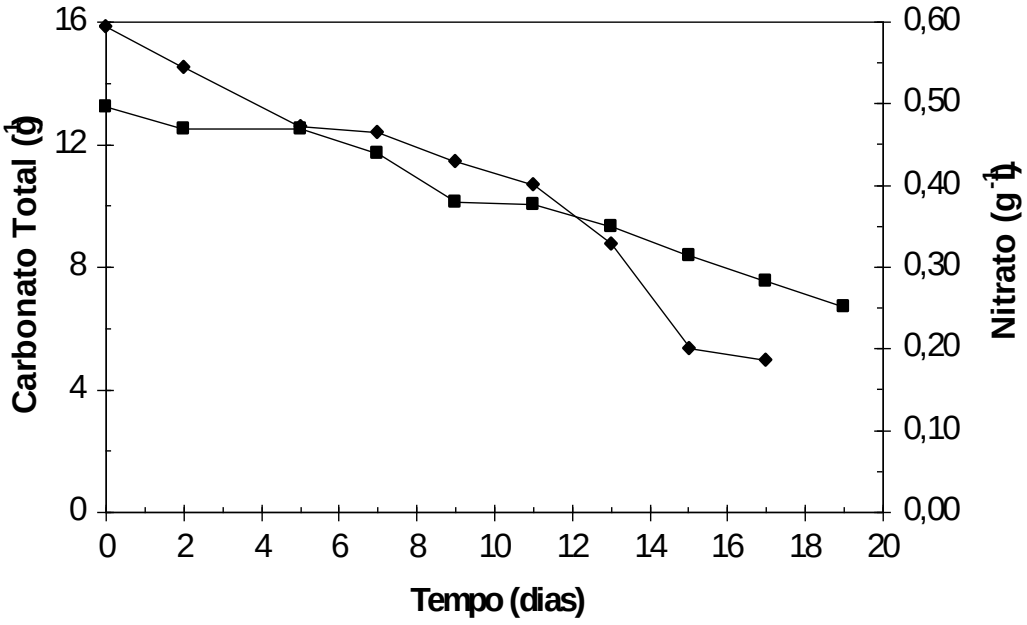


**Figura 13**. Concentração de carbonato total (–◆–) e nitrato (–■–) em função do tempo para experimento 1 ($KNO_3$, 8 mM; Uréia, 4 mM).

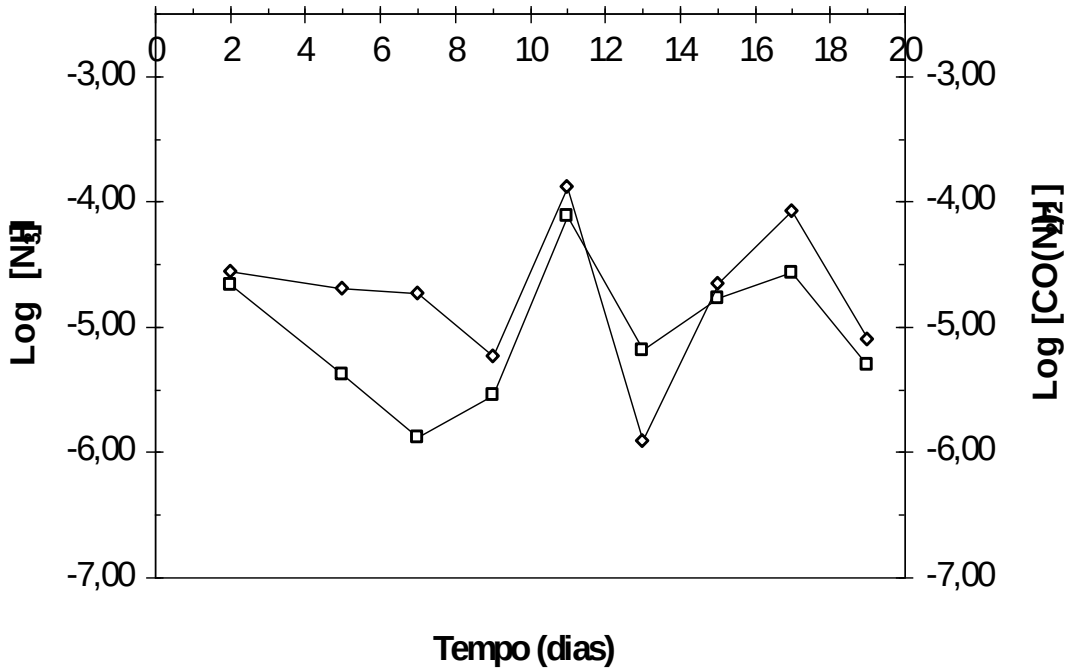


**Figura 14**. Log da Concentração de Amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para experimento 1 ($KNO_3$, 8 mM; Uréia, 4 mM).

**EXPERIMENTO 2**

**Tabela 9** – Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 2 ($KNO_3$, 22 mM (2,22 g $L^{-1}$); Uréia, 4 mM (0,24 g $L^{-1}$)).

| Tempo (Dias) | X (mg $L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $L^{-1}$) | Nitrato (g $L^{-1}$) | Amônia (mol $L^{-1}$) | Uréia (mol $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,3 | 15,85 | 1,36 | * | * |
| 1 | 115 | 9,8 | - | - | - | - |
| 2 | 240 | 9,8 | 15,16 | 1,34 | $4,3744 \times 10^{-6}$ | $5,1400 \times 10^{-6}$ |
| 3 | 448 | 10,0 | - | - | - | - |
| 4 | 760 | 10,1 | - | - | - | - |
| 5 | 1164 | 10,3 | 14,09 | 1,30 | $3,8969 \times 10^{-6}$ | $5,0836 \times 10^{-6}$ |
| 6 | 1335 | 10,4 | - | - | - | - |
| 7 | 1863 | 10,6 | 10,67 | 0,64 | $1,1850 \times 10^{-6}$ | $5,4101 \times 10^{-6}$ |
| 8 | 1908 | 10,7 | - | - | - | - |
| 9 | 2109 | 10,8 | 9,92 | 0,61 | $2,6046 \times 10^{-6}$ | $4,1860 \times 10^{-6}$ |
| 10 | 2342 | 10,9 | - | - | - | - |
| 11 | 2432 | 11,0 | 5,72 | 0,60 | $1,2028 \times 10^{-5}$ | $1,4060 \times 10^{-5}$ |
| 12 | 2549 | 11,0 | - | - | - | - |
| 13 | 2926 | 11,0 | 4,58 | 0,56 | $5,0795 \times 10^{-6}$ | $1,5810 \times 10^{-6}$ |
| 14 | 3179 | 11,0 | - | - | - | - |
| 15 | 3391 | 10,9 | 4,58 | 0,50 | $9,1428 \times 10^{-6}$ | $9,8816 \times 10^{-6}$ |
| 16 | 4291 | 10,9 | - | - | - | - |
| 17 | 4898 | 10,9 | 4,58 | 0,38 | $5,1025 \times 10^{-6}$ | $1,5472 \times 10^{-5}$ |
| 18 | 5226 | 10,9 | - | - | - | - |
| 19 | 5520 | 10,7 | 4,58 | 0,28 | $8,0854 \times 10^{-6}$ | $6,6474 \times 10^{-6}$ |
| 20 | 5206 | 10,6 | - | - | - | - |

-: Amostras não analisada.

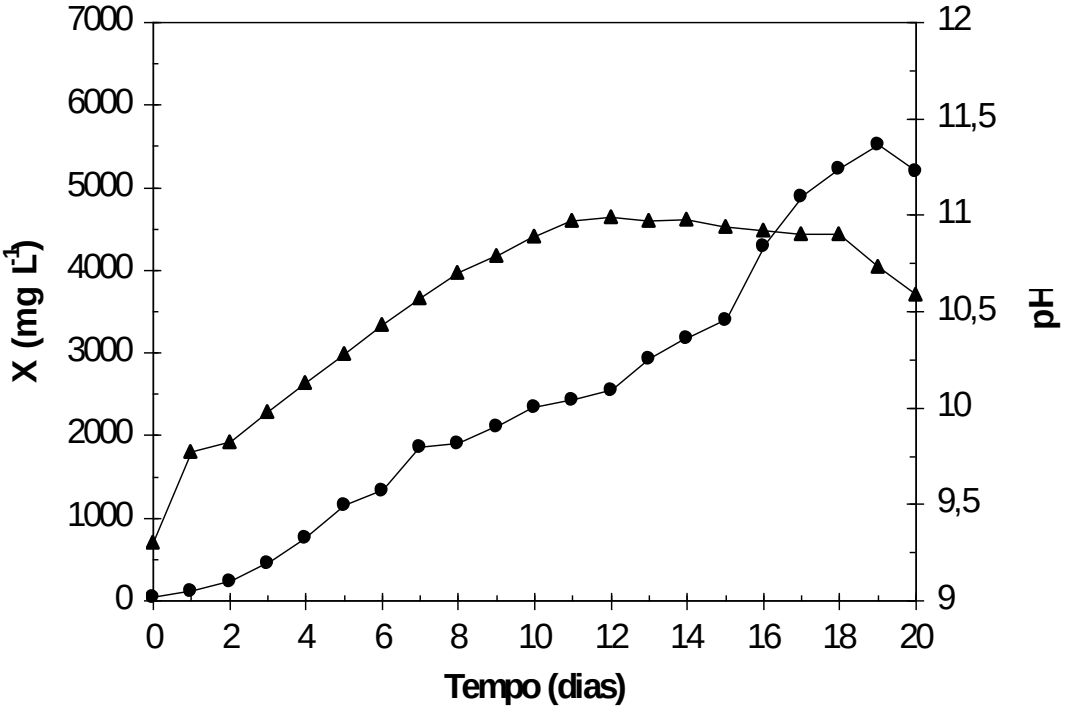


**Figura 15**. Concentração celular (X –◆–) e pH (–▲–) em função do tempo para experimento 2 ($KNO_3$, 22 mM; Uréia, 4 mM).

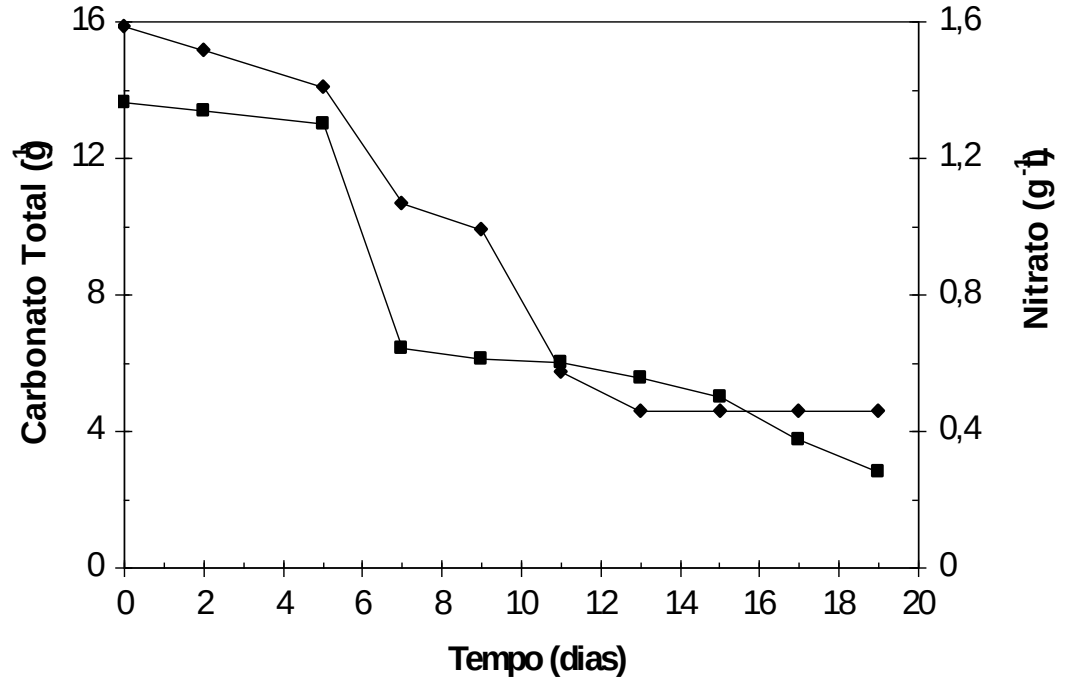


**Figura 16**. Concentração de carbonato total (–◆–) e nitrato (–■–) em função do tempo para experimento 2 ($KNO_3$, 22 mM; Uréia, 4 mM).

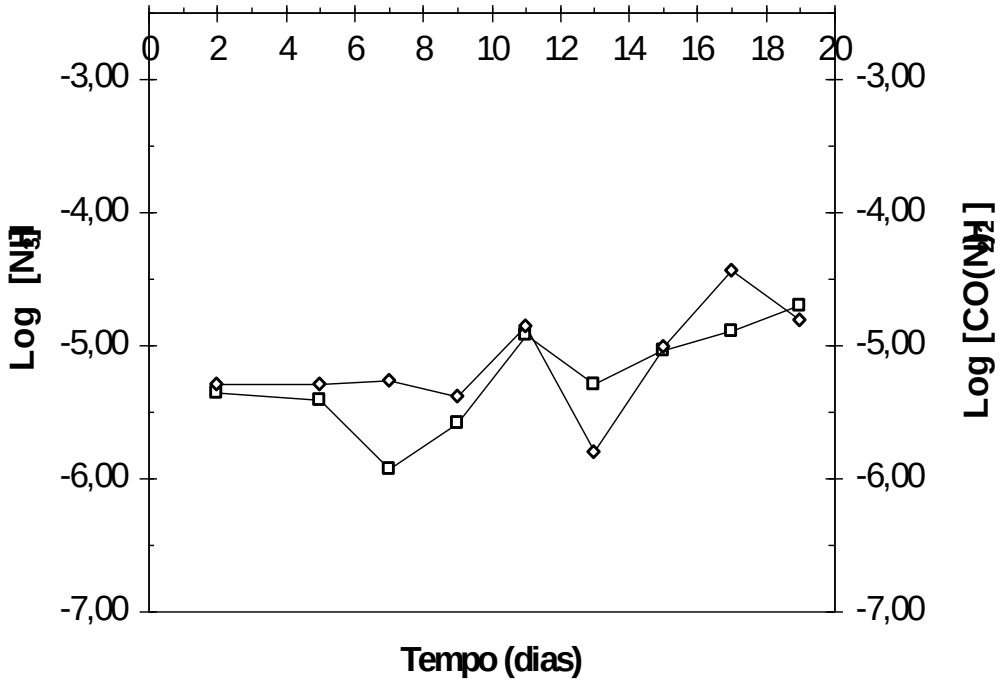


**Figura 17**. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para experimento 2 ($KNO_3$, 22 mM; Uréia, 4 mM).

**EXPERIMENTO 3**

**Tabela 10** – Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 3 ($KNO_3$, 8 mM (0,8 g $L^{-1}$); Uréia, 11 mM (0,66 g $L^{-1}$)).

| Tempo (Dias) | X (mg $L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $L^{-1}$) | Nitrato (g $L^{-1}$) | Amônia (mol $L^{-1}$) | Uréia (mol $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,3 | 15,85 | 0,49 | $4,6111 \times 10^{-6}$ | $1,5027 \times 10^{-5}$ |
| 1 | 189 | 9,6 | - | - | - | - |
| 2 | 353 | 9,9 | 15,59 | 0,48 | $8,7640 \times 10^{-7}$ | $4,4174 \times 10^{-6}$ |
| 3 | 647 | 10,0 | - | - | - | - |
| 4 | 843 | 10,1 | 12,87 | 0,48 | $8,4159 \times 10^{-7}$ | $1,7641 \times 10^{-5}$ |
| 5 | 1426 | 10,3 | - | - | - | - |
| 6 | 1815 | 10,4 | 10,40 | 0,45 | $5,4528 \times 10^{-7}$ | $7,9987 \times 10^{-7}$ |
| 7 | 2098 | 10,5 | - | - | - | - |
| 8 | 2242 | 10,8 | 9,48 | 0,39 | $7,1578 \times 10^{-6}$ | $3,0856 \times 10^{-7}$ |
| 9 | 2325 | 10,8 | - | - | - | - |
| 10 | 2347 | 11,0 | 7,03 | 0,27 | $1,5350 \times 10^{-5}$ | $2,9300 \times 10^{-5}$ |
| 11 | 2422 | 11,0 | - | - | - | - |
| 12 | 2877 | 11,1 | 6,73 | 0,24 | $1,4176 \times 10^{-5}$ | $9,7485 \times 10^{-5}$ |
| 13 | 3664 | 11,0 | - | - | - | - |
| 14 | 4419 | 11,0 | 6,12 | 0,24 | $7,0734 \times 10^{-5}$ | $1,5671 \times 10^{-4}$ |
| 15 | 4879 | 10,9 | - | - | - | - |
| 16 | 5526 | 10,7 | 5,81 | 0,24 | $3,9331 \times 10^{-5}$ | $1,4662 \times 10^{-6}$ |
| 17 | 5754 | 10,6 | - | - | - | - |
| 18 | 5921 | 10,6 | 4,89 | 0,15 | * | * |
| 19 | 5820 | 10,6 | - | - | - | - |

-: Amostras não analisada.

*: Valor abaixo da sensibilidade do método.

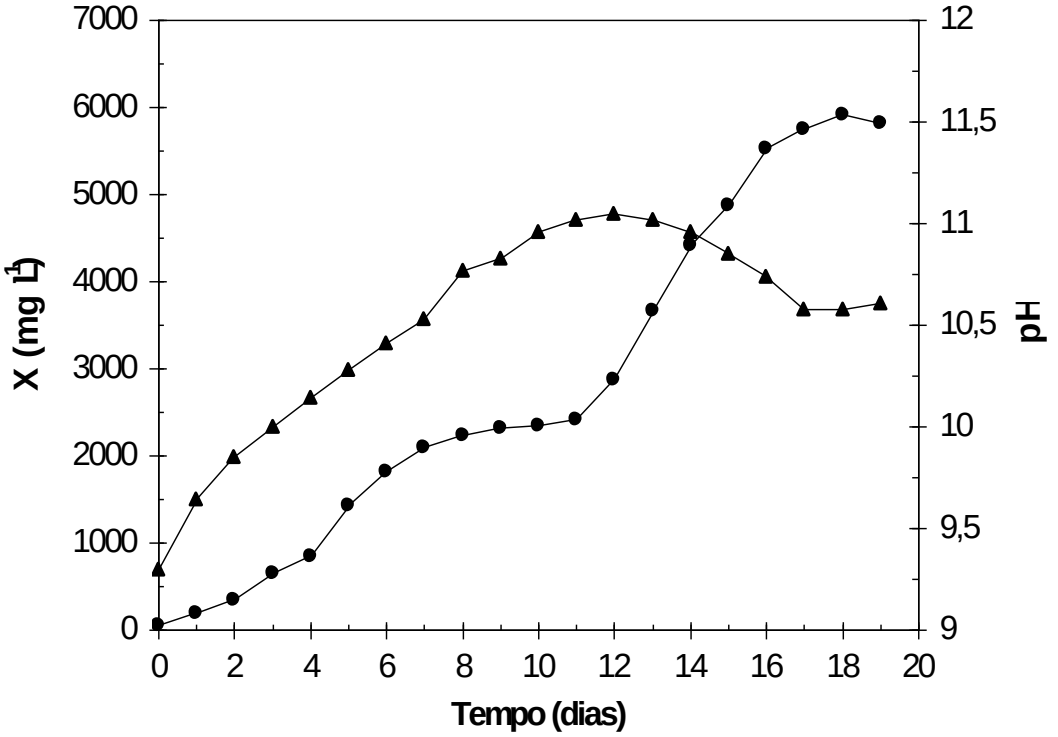


**Figura 18**. Concentração Celular (X –◆–) e pH (–▲–) em função do tempo para experimento 3 ($KNO_3$, 8 mM; Uréia, 11 mM).

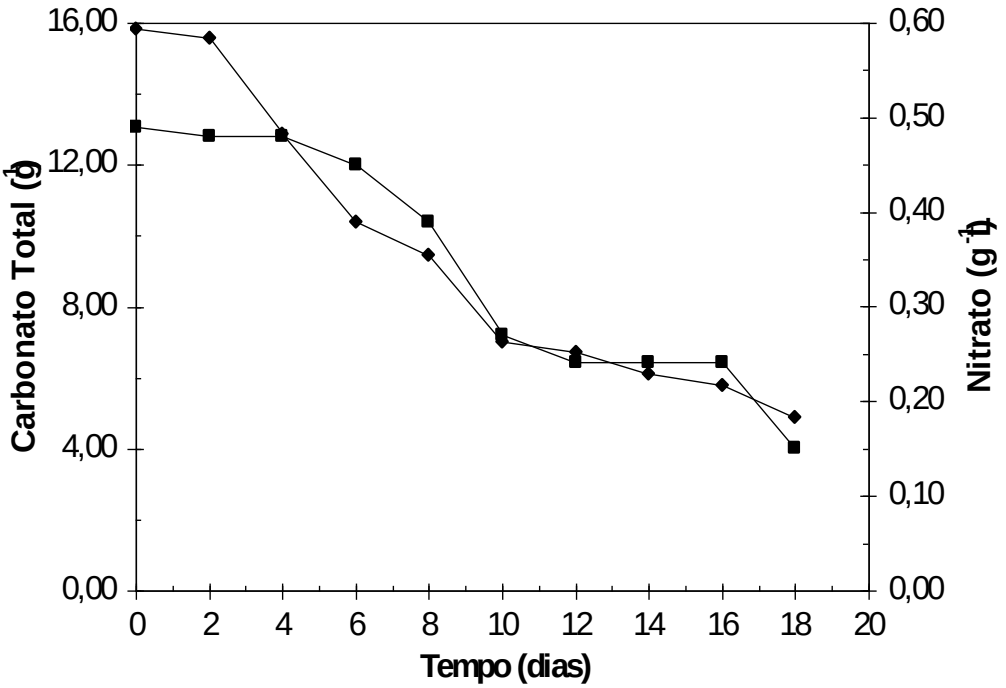


**Figura 19**. Concentração de carbonato total (–◆–) e nitrato (–■–) em função do tempo para experimento 3 ($KNO_3$, 8 mM; Uréia, 11 mM).

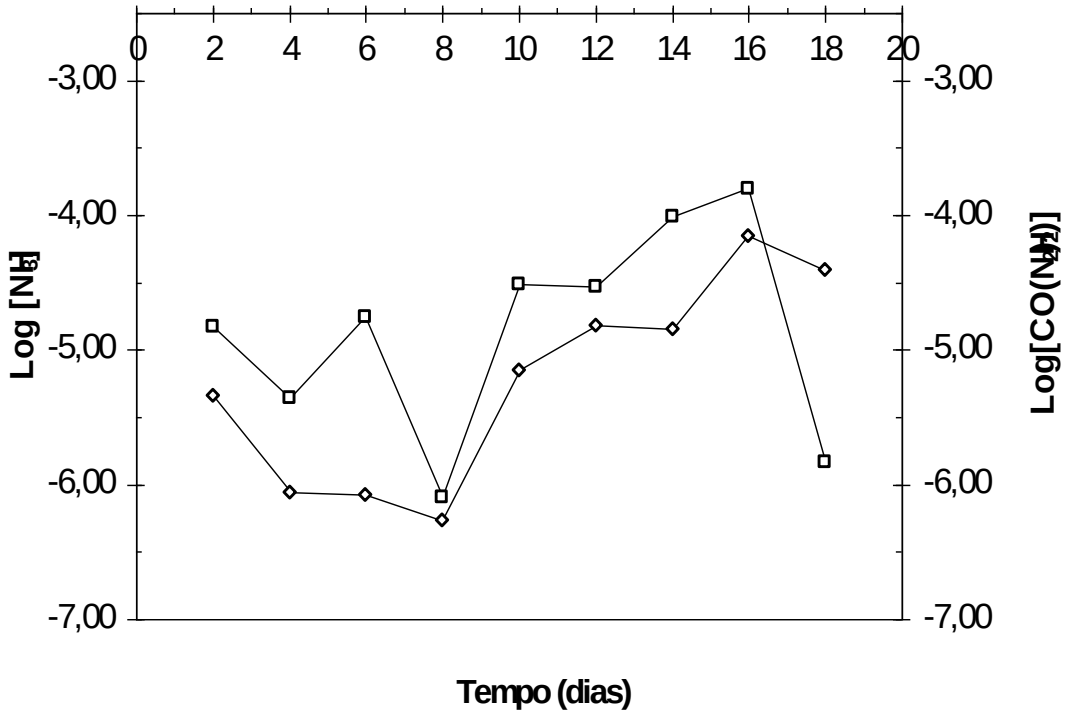


**Figura 20**. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para experimento 3 ($KNO_3$, 8 mM; Uréia, 11 mM).

**EXPERIMENTO 4**

**Tabela 11** – Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 4 ($KNO_3$, 22 mM (2,22 c); Uréia, 11 mM (0,66 g $L^{-1}$)).

| Tempo (Dias) | X (mg $L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $L^{-1}$) | Nitrato (g $L^{-1}$) | Amônia (mol $L^{-1}$) | Uréia (mol $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,3 | 15,85 | 1,36 | $2,1063 \times 10^{-6}$ | $1,8652 \times 10^{-6}$ |
| 1 | 272 | 9,7 | - | - | - | - |
| 2 | 385 | 9,9 | 14,98 | 1,14 | $6,1489 \times 10^{-7}$ | $2,7576 \times 10^{-6}$ |
| 3 | 704 | 10,0 | - | - | - | - |
| 4 | 1155 | 10,1 | 12,54 | 0,93 | $2,2665 \times 10^{-6}$ | $2,9782 \times 10^{-6}$ |
| 5 | 1589 | 10,3 | - | - | - | - |
| 6 | 1846 | 10,4 | 11,01 | 0,87 | $3,4487 \times 10^{-6}$ | $7,8706 \times 10^{-7}$ |
| 7 | 2071 | 10,6 | - | - | - | - |
| 8 | 2420 | 10,8 | 10,70 | 0,87 | $2,8972 \times 10^{-5}$ | $1,1142 \times 10^{-4}$ |
| 9 | 3104 | 10,9 | - | - | - | - |
| 10 | 3691 | 11,0 | 8,87 | 0,81 | $4,1353 \times 10^{-5}$ | $1,1594 \times 10^{-4}$ |
| 11 | 4127 | 10,9 | - | - | - | - |
| 12 | 4597 | 10,9 | 7,34 | 0,78 | $1,5026 \times 10^{-4}$ | $9,9063 \times 10^{-5}$ |
| 13 | 4607 | 10,8 | - | - | - | - |
| 14 | 4684 | 10,6 | 6,73 | 0,69 | $1,3149 \times 10^{-4}$ | $7,8475 \times 10^{-4}$ |
| 15 | 4737 | 10,9 | - | - | - | - |
| 16 | 5299 | 10,4 | 6,42 | 0,24 | $8,3451 \times 10^{-5}$ | $2,4627 \times 10^{-4}$ |
| 17 | 5748 | 10,3 | - | - | - | - |
| 18 | 5848 | 10,3 | 5,81 | 0,18 | * | * |
| 19 | 5671 | 10,3 | - | - | - | - |

-: Amostras não analisada.

*: Valor abaixo da sensibilidade do método.

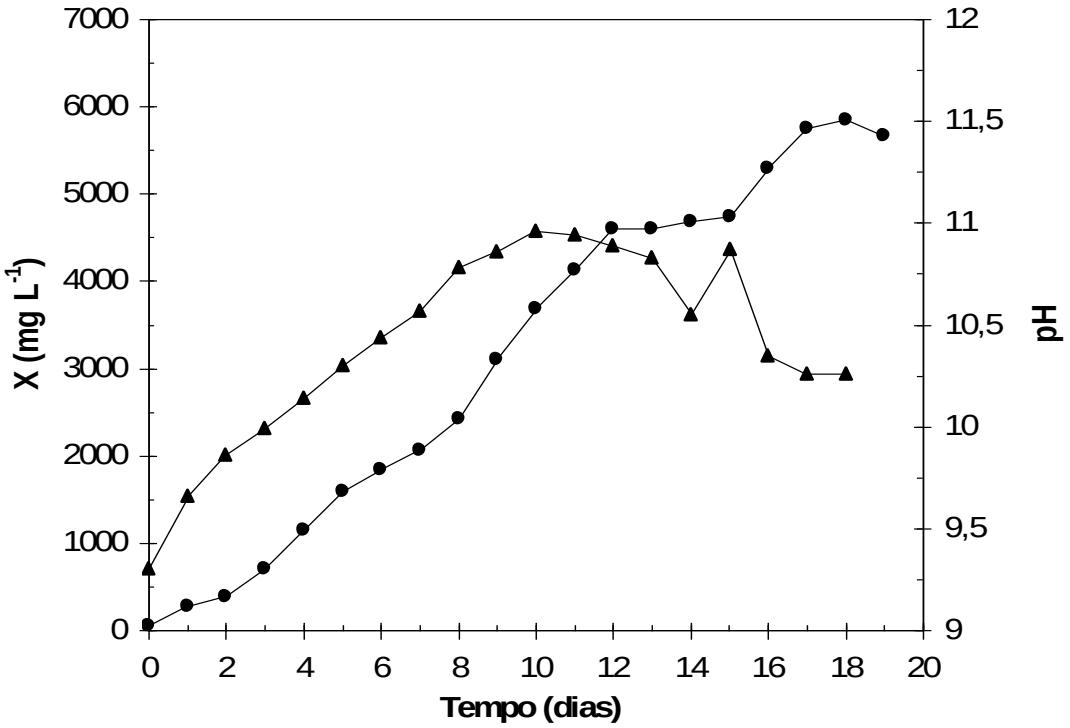


**Figura 21**. Concentração Celular (X ◆) e pH (▲) em função do tempo para experimento 4 ($KNO_3$, 22 mM; Uréia, 11 mM).

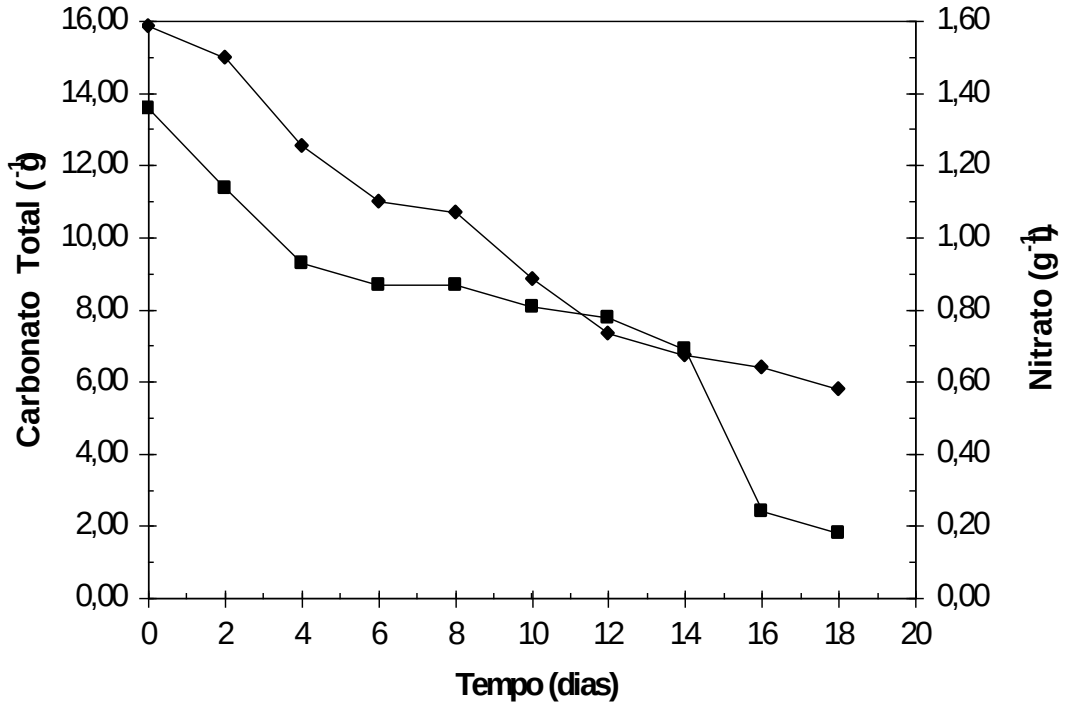


**Figura 22**. Concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo para experimento 4 ($KNO_3$, 22 mM; Uréia, 11 mM).

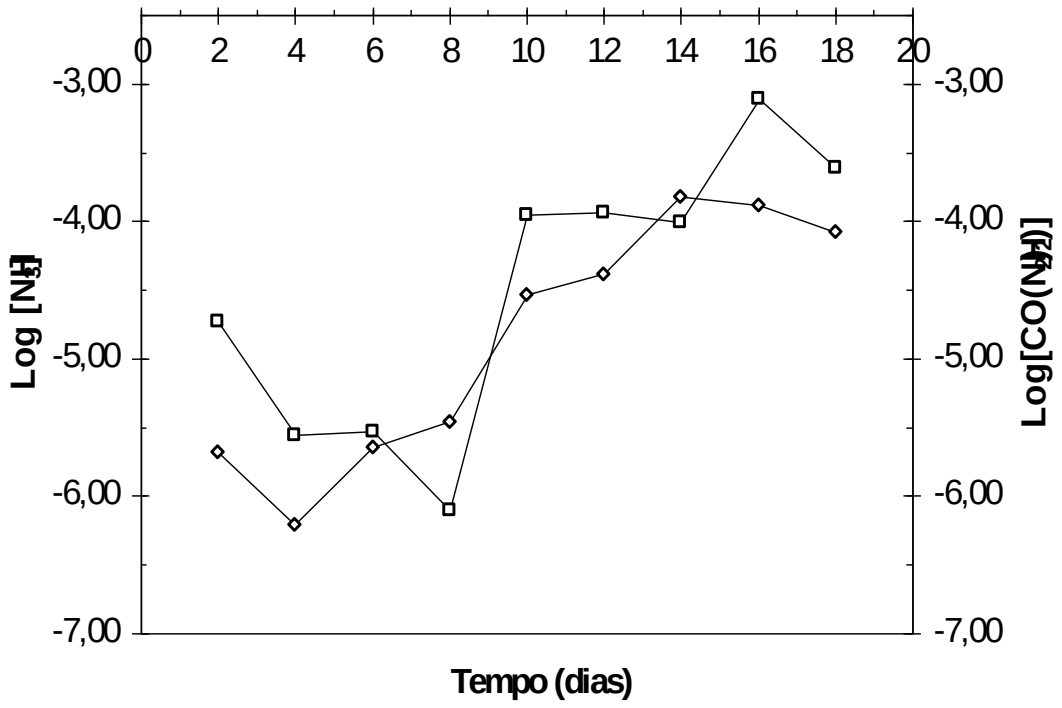


**Figura 23**. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para experimento 4 ($KNO_3$, 22 mM; Uréia, 11 mM).

**EXPERIMENTO 5**

**Tabela 12** – Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 5 ($KNO_3$, 15 mM (1,51 g $L^{-1}$); Uréia , 2,55 mM (0,15 g $L^{-1}$)).

| Tempo (Dias) | X (mg $L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $L^{-1}$) | Nitrato (g $L^{-1}$) | Amônia (mol $L^{-1}$) | Uréia (mol $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,3 | 15,85 | 0,93 | - | - |
| 1 | 141 | 9,7 | - | - | - | - |
| 2 | 278 | 9,8 | 14,52 | 0,86 | $3,3592 \times 10^{-6}$ | $4,3822 \times 10^{-6}$ |
| 3 | 417 | 10,0 | - | - | - | - |
| 4 | 601 | 10,1 | - | - | - | - |
| 5 | 1099 | 10,3 | 12,17 | 0,80 | $1,6184 \times 10^{-6}$ | $7,8945 \times 10^{-6}$ |
| 6 | 1331 | 10,3 | - | - | - | - |
| 7 | 1403 | 10,5 | 11,74 | 0,65 | $1,1901 \times 10^{-6}$ | $6,5583 \times 10^{-6}$ |
| 8 | 1635 | 10,6 | - | - | - | - |
| 9 | 1712 | 10,7 | 11,44 | 0,50 | * | $1,2496 \times 10^{-6}$ |
| 10 | 1919 | 10,8 | - | - | - | - |
| 11 | 2415 | 10,9 | 11,06 | 0,31 | $4,0534 \times 10^{-6}$ | $4,7980 \times 10^{-5}$ |
| 12 | 2670 | 10,9 | - | - | - | - |
| 13 | 2756 | 10,9 | 10,68 | 0,26 | $4,9215 \times 10^{-6}$ | $2,9073 \times 10^{-6}$ |
| 14 | 2922 | 11,0 | - | - | - | - |
| 15 | 3088 | 11,0 | 8,77 | 0,16 | $7,2370 \times 10^{-6}$ | $1,3395 \times 10^{-5}$ |
| 16 | 3800 | 11,0 | - | - | - | - |
| 17 | 4227 | 11,0 | 6,87 | 0,03 | $4,2790 \times 10^{-6}$ | $7,5230 \times 10^{-6}$ |
| 18 | 4431 | 11,0 | - | - | - | - |
| 19 | 4200 | 10,9 | 9,92 | 0,03 | $2,1549 \times 10^{-6}$ | * |
| 20 | 4173 | 10,8 | - | - | - | - |

-: Amostras não analisada.

*: Valor abaixo da sensibilidade do método.

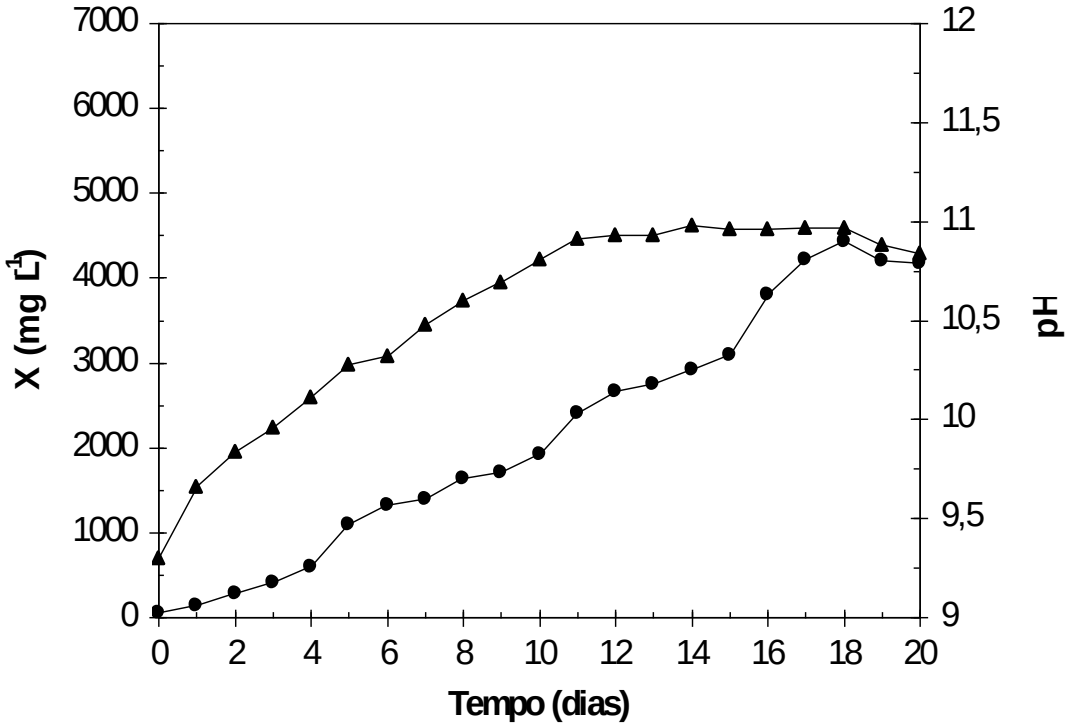


**Figura 24**. Concentração celular (X –◆–) e pH (–▲–) em função do tempo para experimento 5 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 2,55 mM)

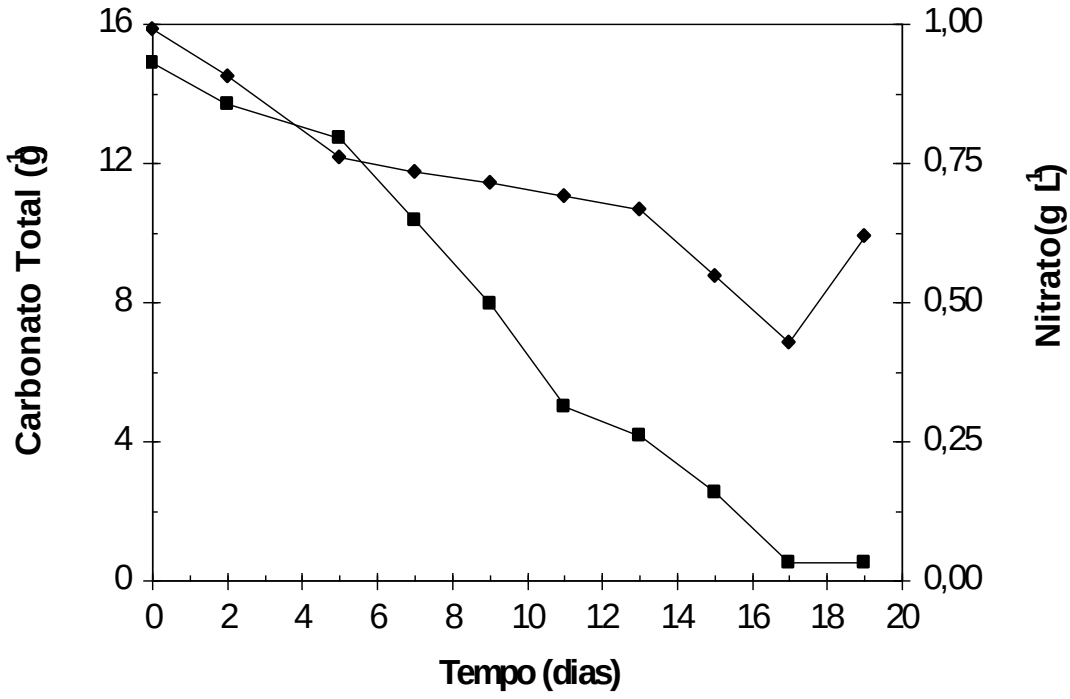


**Figura 25**. Concentração de carbonato total (–◆–) e nitrato (–■–) em função do tempo para experimento 5 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 2,55 mM).

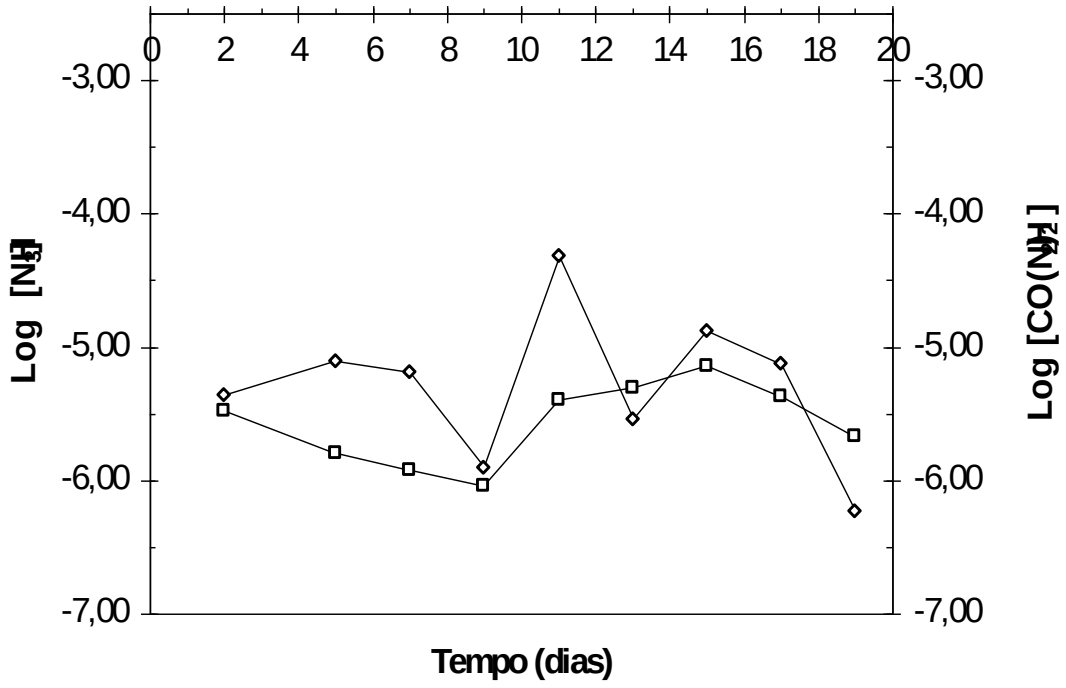


**Figura 26**. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para experimento 5 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 2,55 mM).

**EXPERIMENTO 6**

**Tabela 13** – Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 6 ($KNO_3$, 5,1 mM (0,51 g $L^{-1}$); Uréia, 7,5 mM (0,45 g $L^{-1}$)).

| Tempo (Dias) | X (mg $L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $L^{-1}$) | Nitrato (g $L^{-1}$) | Amônia (mol $L^{-1}$) | Uréia (mol $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,3 | 15,85 | 0,32 | - | - |
| 1 | 100 | 9,7 | - | - | - | - |
| 2 | 247 | 9,9 | 15,37 | 0,26 | $7,0120 \times 10^{-6}$ | $8,4633 \times 10^{-6}$ |
| 3 | 507 | 10,0 | - | - | - | - |
| 4 | 752 | 10,1 | - | - | - | - |
| 5 | 911 | 10,3 | 13,24 | 0,23 | $1,5565 \times 10^{-6}$ | $3,9549 \times 10^{-6}$ |
| 6 | 1179 | 10,4 | - | - | - | - |
| 7 | 1551 | 10,6 | 11,53 | 0,20 | * | $9,9767 \times 10^{-6}$ |
| 8 | 1958 | 10,7 | - | - | - | - |
| 9 | 2511 | 10,8 | 11,06 | 0,17 | * | $5,7252 \times 10^{-6}$ |
| 10 | 2787 | 10,9 | - | - | - | - |
| 11 | 2883 | 10,9 | 10,68 | 0,16 | $7,3212 \times 10^{-6}$ | $2,0763 \times 10^{-5}$ |
| 12 | 3181 | 10,9 | - | - | - | - |
| 13 | 3250 | 10,9 | 10,30 | 0,14 | $5,5093 \times 10^{-6}$ | $1,4377 \times 10^{-6}$ |
| 14 | 3834 | 10,9 | - | - | - | - |
| 15 | 4485 | 10,7 | 9,54 | 0,10 | $3,0724 \times 10^{-5}$ | $1,9391 \times 10^{-5}$ |
| 16 | 4551 | 10,6 | - | - | - | - |
| 17 | 4973 | 10,6 | 9,16 | 0,10 | $1,0041 \times 10^{-5}$ | $1,0406 \times 10^{-6}$ |
| 18 | 5569 | 10,6 | - | - | - | - |
| 19 | 5462 | 10,4 | - | 0,10 | $9,7288 \times 10^{-6}$ | $1,2379 \times 10^{-6}$ |
| 20 | 4918 | 10,4 | - | - | - | - |

-: Amostras não analisada.

*: Valor abaixo da sensibilidade do método**.**

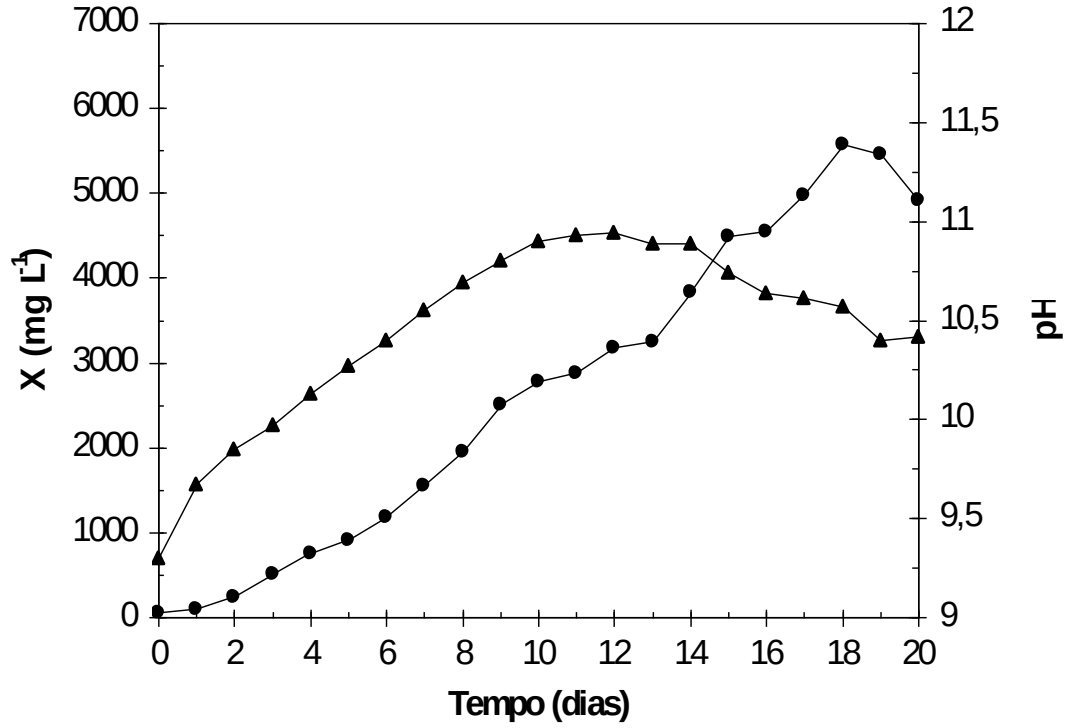


**Figura 27**. Concentração celular (X –◆–) e pH (–▲–) em função do tempo para experimento 6 ($KNO_3$, 5,1 mM; Uréia, 7,5 mM).

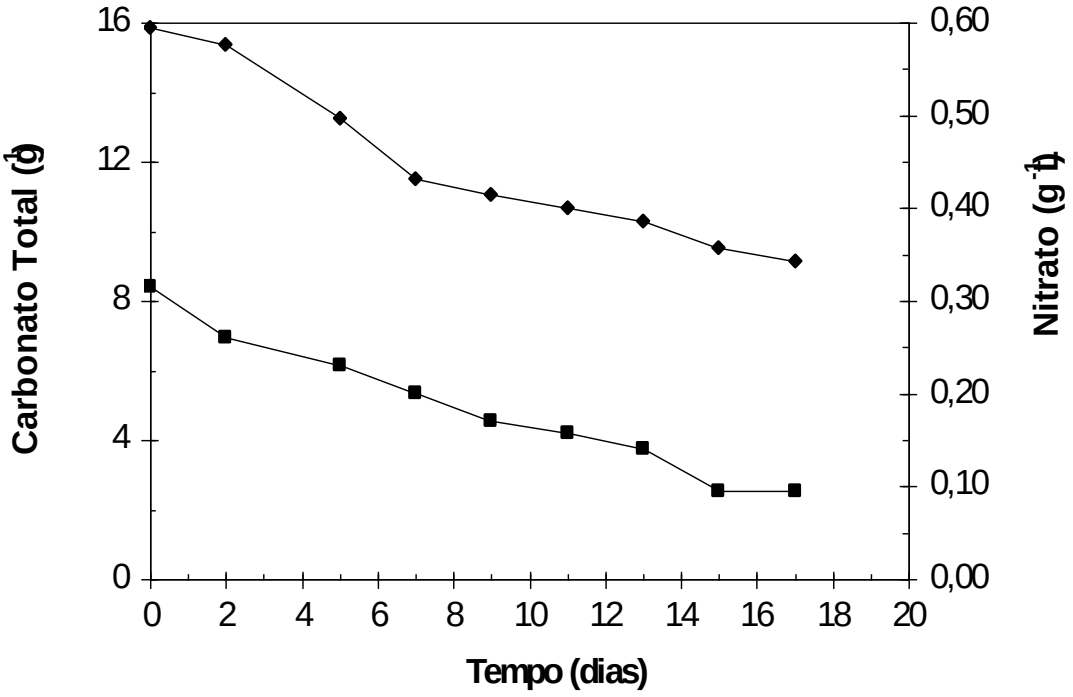


**Figura 28**. Concentração de carbonato total (–◆–) e nitrato (–■–) em função do tempo para experimento 6 ($KNO_3$, 5,1 mM; Uréia, 7,5 mM).

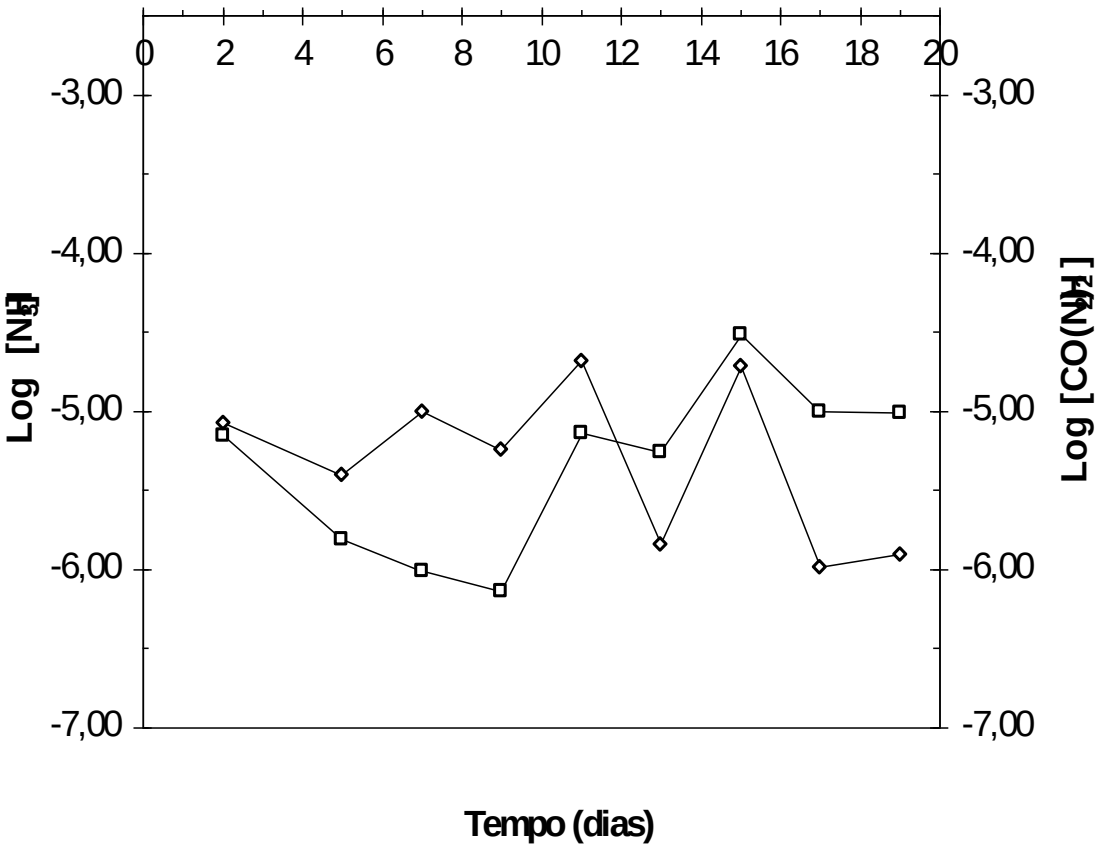


**Figura 29**. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para experimento 6 ($KNO_3$, 5,1 mM; Uréia, 7,5 mM).

**EXPERIMENTO 7**

**Tabela 14** – Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 7 ($KNO_3$, 15 mM (1,51 g $L^{-1}$); Uréia, 12,5 mM (0,75g $L^{-1}$)).

| Tempo (Dias) | X (mg $L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $L^{-1}$) | Nitrato (g $L^{-1}$) | Amônia (mol $L^{-1}$) | Uréia (mol $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,3 | 15,85 | 0,93 | - | - |
| 1 | 108 | 9,7 | - | - | - | - |
| 2 | 240 | 9,9 | 13,88 | 0,83 | $9,0523 \times 10^{-6}$ | $8,6804 \times 10^{-6}$ |
| 3 | 506 | 10,0 | - | - | - | - |
| 4 | 831 | 10,2 | - | - | - | - |
| 5 | 1132 | 10,3 | 12,81 | 0,80 | $1,4336 \times 10^{-6}$ | $8,6176 \times 10^{-6}$ |
| 6 | 1254 | 10,5 | - | - | - | - |
| 7 | 1915 | 10,6 | 10,46 | 0,77 | $1,2321 \times 10^{-6}$ | $7,1815 \times 10^{-6}$ |
| 8 | 2011 | 10,7 | - | - | - | - |
| 9 | 2278 | 10,8 | 9,54 | 0,74 | $1,7990 \times 10^{-6}$ | $4,5959 \times 10^{-6}$ |
| 10 | 3166 | 10,9 | - | - | - | - |
| 11 | 3460 | 10,9 | 9,16 | 0,63 | $5,9756 \times 10^{-6}$ | $5,7358 \times 10^{-6}$ |
| 12 | 3898 | 10,9 | - | - | - | - |
| 13 | 4291 | 10,9 | 8,39 | 0,62 | $2,8506 \times 10^{-6}$ | $5,0118 \times 10^{-6}$ |
| 14 | 4641 | 10,9 | - | - | - | - |
| 15 | 4785 | 10,9 | 8,01 | 0,31 | $1,0232 \times 10^{-5}$ | $2,3175 \times 10^{-5}$ |
| 16 | 4968 | 10,9 | - | - | - | - |
| 17 | 5677 | 10,8 | 7,63 | 0,28 | $5,0112 \times 10^{-6}$ | $3,3853 \times 10^{-6}$ |
| 18 | 5754 | 10,8 | - | - | - | - |
| 19 | 5612 | 10,6 | 7,63 | 0,25 | $3,3384 \times 10^{-6}$ | $1,8794 \times 10^{-6}$ |
| 20 | 4805 | 10,6 | - | - | - | - |

-: Amostras não analisada.

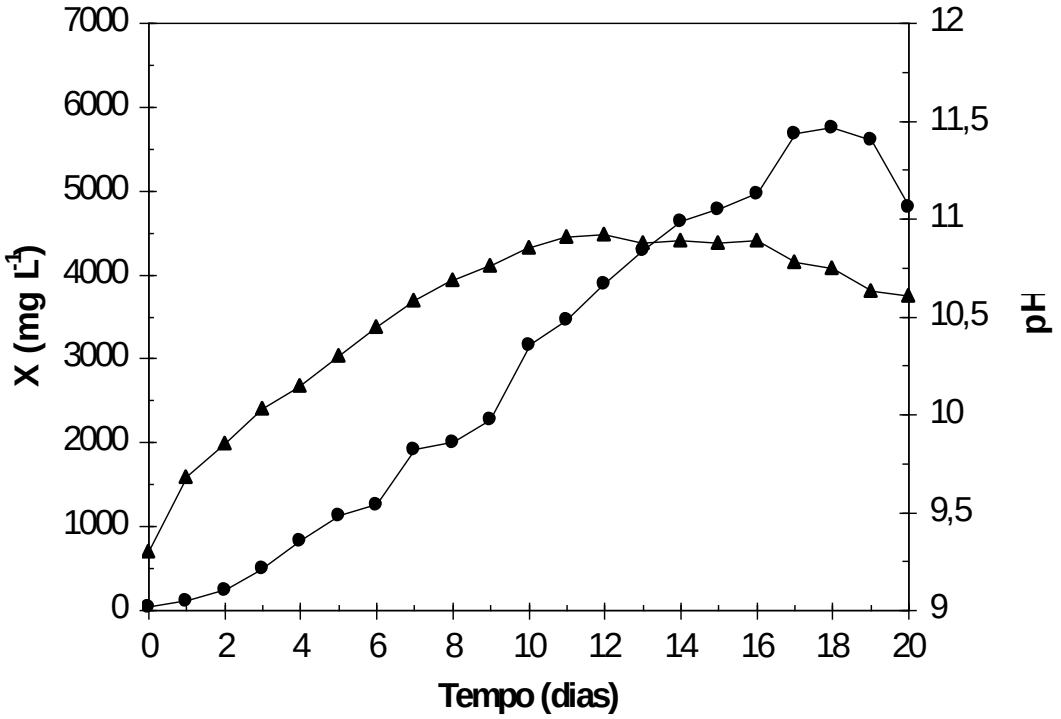


**Figura 30**. Concentração de celular (X –◆–) e pH (–▲–) em função do tempo para experimento 7 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 12,5 mM).

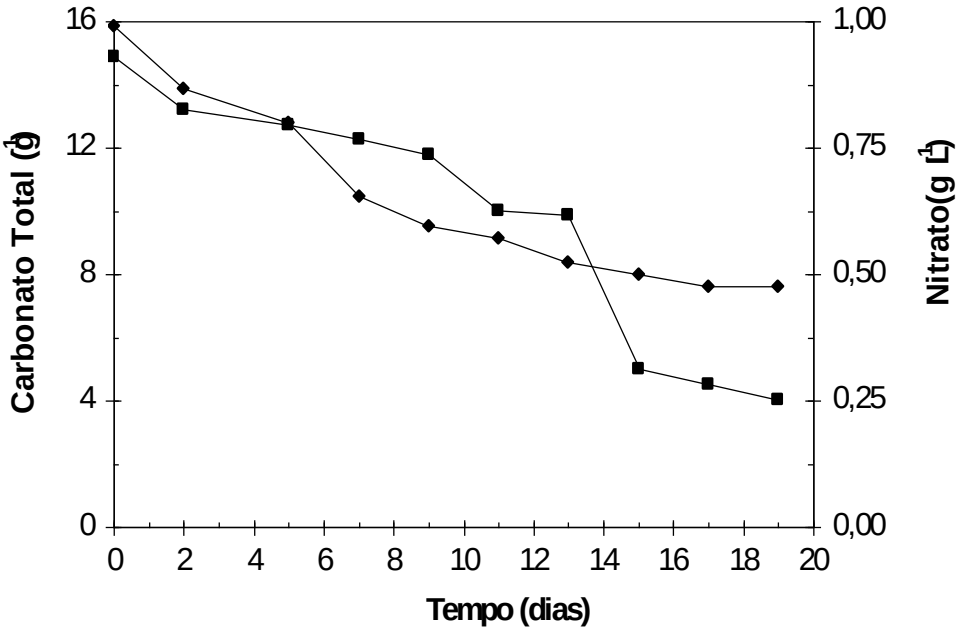


**Figura 31**. Concentração de carbonato total (–◆–) e nitrato (–■–) em função do tempo para experimento 7 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 12,5 mM).

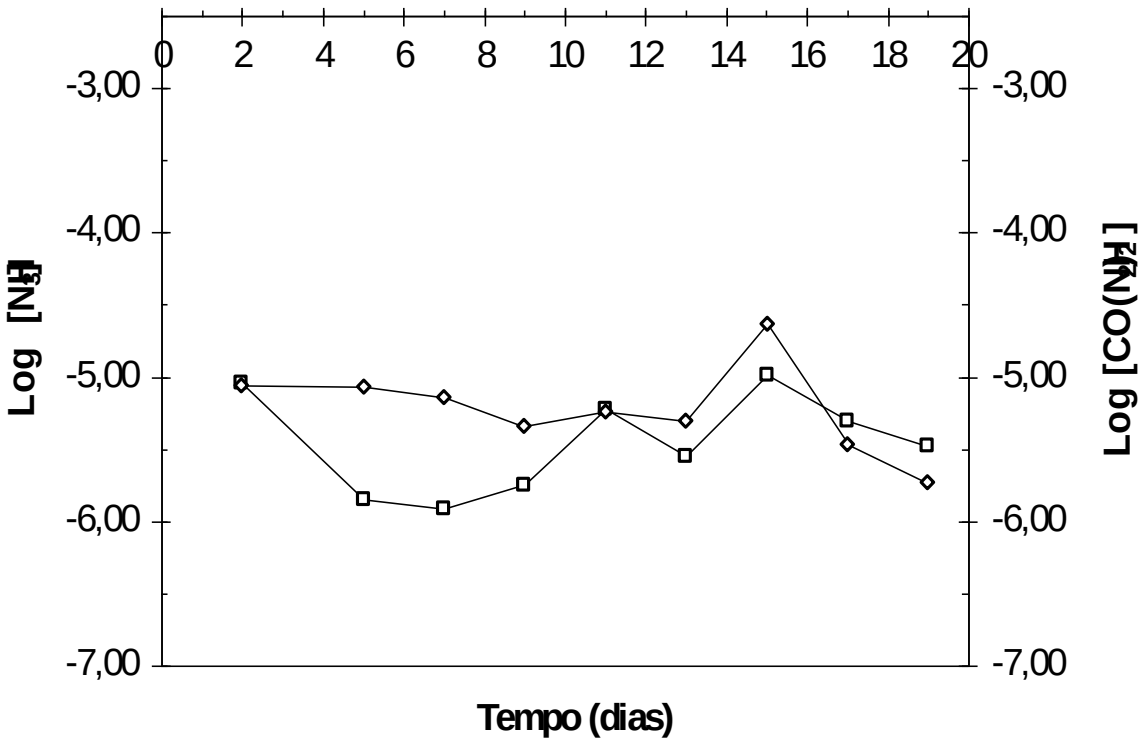


**Figura 32**. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para experimento 7 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 12,5 mM).

**EXPERIMENTO 8**

**Tabela 15** – Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 8 ($KNO_3$, 24,9 mM (2,51 g $L^{-1}$); Uréia, 7,50 mM (0,45 g $L^{-1}$)).

| Tempo (Dias) | X (mg $L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $L^{-1}$) | Nitrato (g $L^{-1}$) | Amônia (mol $L^{-1}$) | Uréia (mol $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,3 | 15,85 | 1,54 | - | - |
| 1 | 56 | 9,6 | - | - | - | - |
| 2 | 184 | 9,8 | 15,16 | 1,54 | $2,1789 \times 10^{-6}$ | $5,4473 \times 10^{-6}$ |
| 3 | 426 | 10,0 | - | - | - | - |
| 4 | 631 | 10,1 | - | - | - | - |
| 5 | 843 | 10,3 | 12,60 | 1,12 | $1,1348 \times 10^{-6}$ | $2,8370 \times 10^{-6}$ |
| 6 | 1241 | 10,4 | - | - | - | - |
| 7 | 1483 | 10,6 | 12,38 | 1,09 | $1,0317 \times 10^{-6}$ | $2,5793 \times 10^{-6}$ |
| 8 | 1921 | 10,7 | - | - | - | - |
| 9 | 2275 | 10,7 | 11,44 | 1,03 | $2,1646 \times 10^{-6}$ | $5,4115 \times 10^{-6}$ |
| 10 | 2412 | 10,9 | - | - | - | - |
| 11 | 2621 | 11,0 | 11,44 | 0,91 | $4,4968 \times 10^{-6}$ | $1,1242 \times 10^{-5}$ |
| 12 | 3826 | 11,0 | - | - | - | - |
| 13 | 4195 | 10,9 | 11,06 | 0,86 | $5,0566 \times 10^{-6}$ | $1,2642 \times 10^{-5}$ |
| 14 | 4475 | 10,9 | - | - | - | - |
| 15 | 4670 | 10,9 | 10,68 | 0,63 | $1,0144 \times 10^{-5}$ | $2,5359 \times 10^{-5}$ |
| 16 | 5488 | 10,9 | - | - | - | - |
| 17 | 5699 | 10,8 | 9,92 | 0,53 | $2,5122 \times 10^{-6}$ | $6,2806 \times 10^{-6}$ |
| 18 | 5904 | 10,8 | - | - | - | - |
| 19 | 5732 | 10,6 | - | 0,47 | $7,9407 \times 10^{-6}$ | $1,9852 \times 10^{-5}$ |
| 20 | 5403 | 10,6 | - | - | - | - |

-: Amostras não analisada.

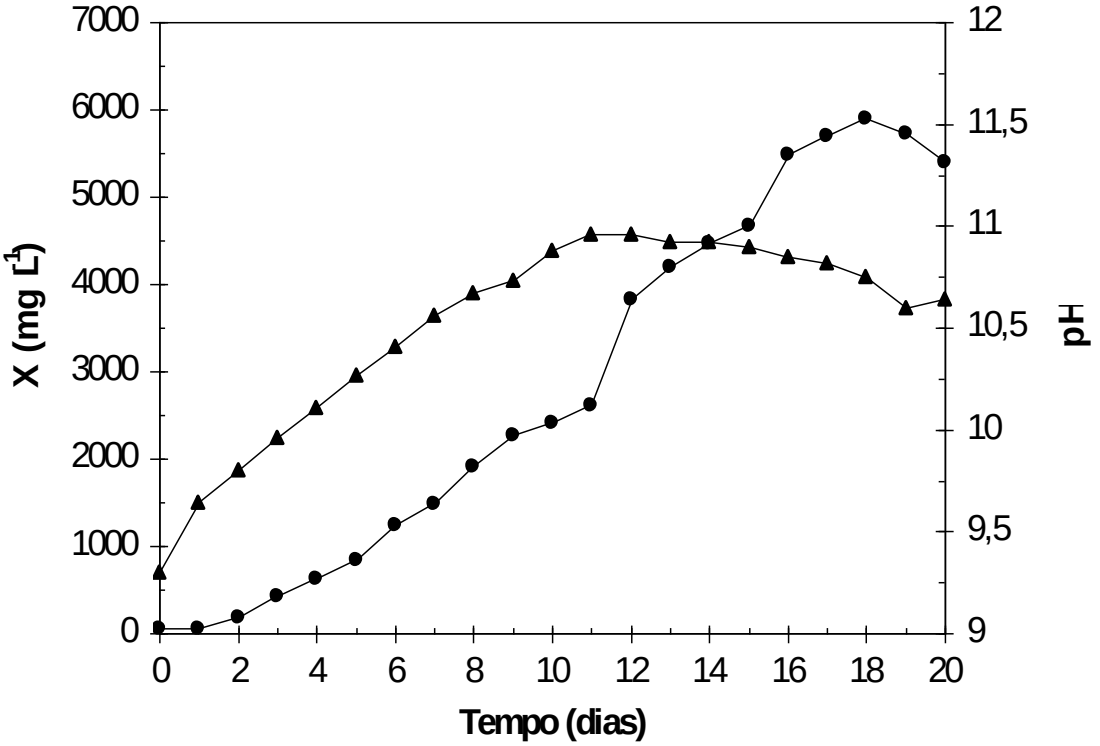


**Figura 33**. Concentração de celular (X ◆) e pH (▲) em função do tempo para experimento 8 ($KNO_3$, 24,9 mM; Uréia, 7,50 mM).

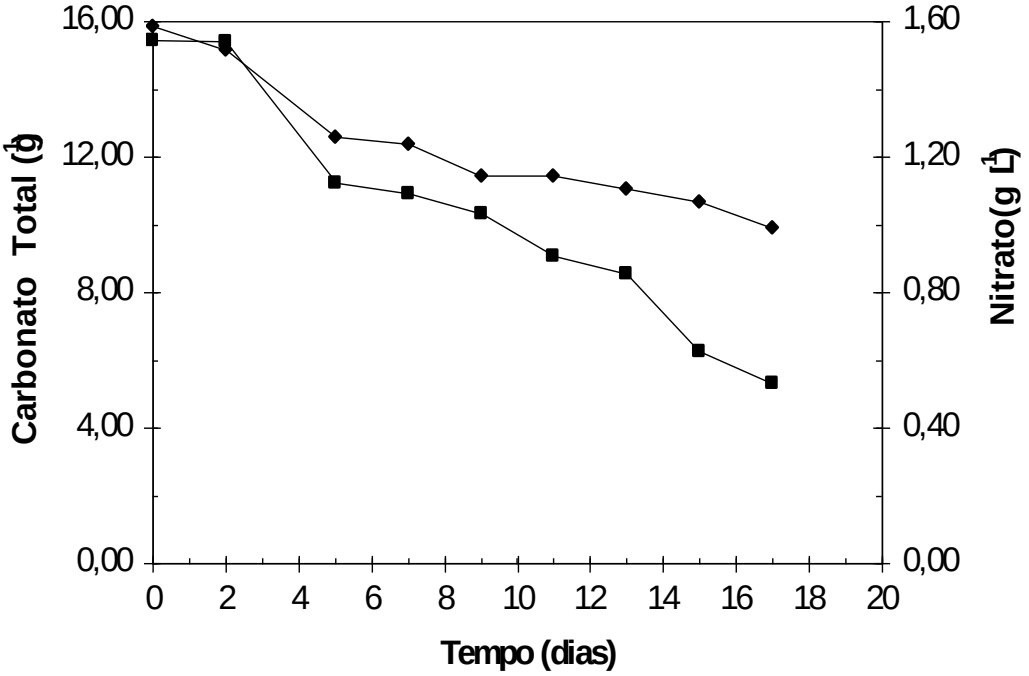


**Figura 34.** Concentração de carbonato total (◆) e nitrato (■) em função do tempo para experimento 8 (KNO3, 24,9 mM; Uréia, 7,50mM).

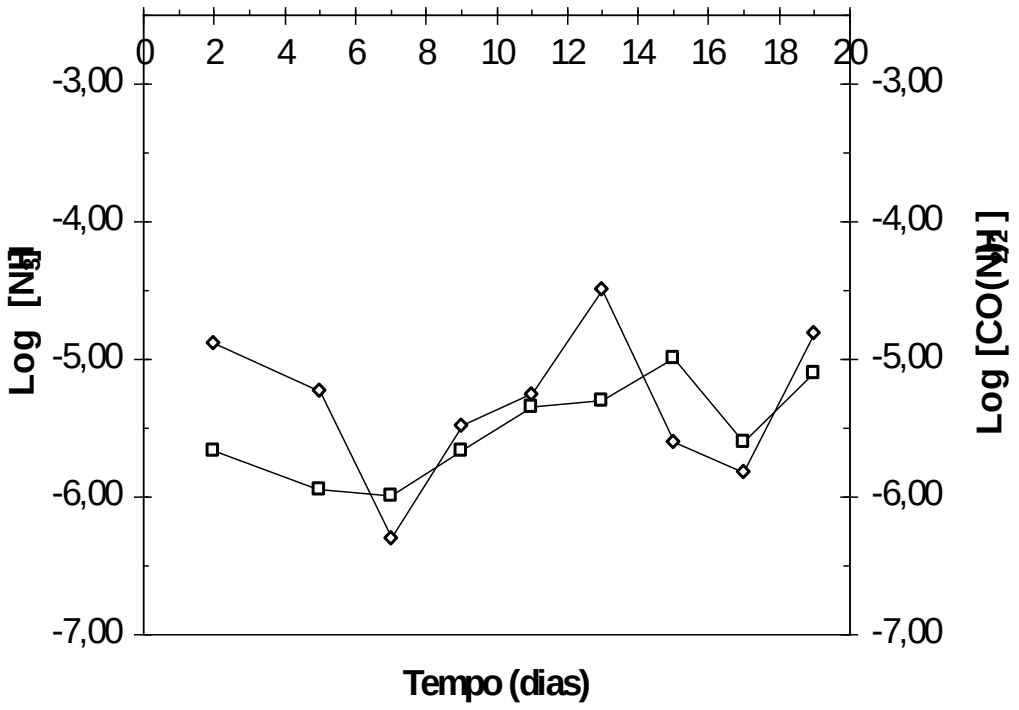


**Figura 35**. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para experimento 8 ($KNO_3$, 24,9 mM; Uréia, 7,50 mM).

**EXPERIMENTO 9**

**Tabela 16** – Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 9 ($KNO_3$, 15 mM (1,51 g $L^{-1}$); Uréia, 7,50 mM (0,45 g $L^{-1}$)).

| Tempo (Dias) | X (mg $L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $L^{-1}$) | Nitrato (g $L^{-1}$) | Amônia (mol $L^{-1}$) | Uréia (mol $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,3 | 15,85 | 0,93 | - | - |
| 1 | 120 | 9,7 | - | - | - | - |
| 2 | 245 | 9,8 | 14,09 | 0,92 | $2,5574 \times 10^{-6}$ | $7,8710 \times 10^{-6}$ |
| 3 | 487 | 10,0 | - | - | - | - |
| 4 | 804 | 10,1 | - | - | - | - |
| 5 | 1153 | 10,3 | 12,38 | 0,86 | $1,0407 \times 10^{-6}$ | $7,9300 \times 10^{-6}$ |
| 6 | 1398 | 10,4 | - | - | - | - |
| 7 | 1615 | 10,5 | 11,74 | 0,83 | $9,2589 \times 10^{-7}$ | $6,5043 \times 10^{-6}$ |
| 8 | 2020 | 10,6 | - | - | - | - |
| 9 | 2499 | 10,7 | 11,44 | 0,80 | $3,0229 \times 10^{-6}$ | $9,7932 \times 10^{-7}$ |
| 10 | 3466 | 10,8 | - | - | - | - |
| 11 | 3880 | 10,8 | 10,30 | 0,77 | $4,5787 \times 10^{-6}$ | $9,8916 \times 10^{-6}$ |
| 12 | 4400 | 10,8 | - | - | - | - |
| 13 | 4612 | 10,8 | 9,92 | 0,74 | $5,6351 \times 10^{-6}$ | $5,4090 \times 10^{-6}$ |
| 14 | 5058 | 10,8 | - | - | - | - |
| 15 | 5574 | 10,8 | 9,54 | 0,74 | $1,0276 \times 10^{-5}$ | $1,7312 \times 10^{-5}$ |
| 16 | 5933 | 10,8 | - | - | - | - |
| 17 | 6127 | 10,8 | 9,54 | 0,71 | $4,7470 \times 10^{-6}$ | $1,7206 \times 10^{-6}$ |
| 18 | 6052 | 10,8 | - | - | - | - |
| 19 | 4584 | 10,6 | 9,54 | 0,68 | $3,1482 \times 10^{-6}$ | $1,4303 \times 10^{-6}$ |
| 20 | 4536 | 10,6 | - | - | - | - |

-: Amostras não analisada.

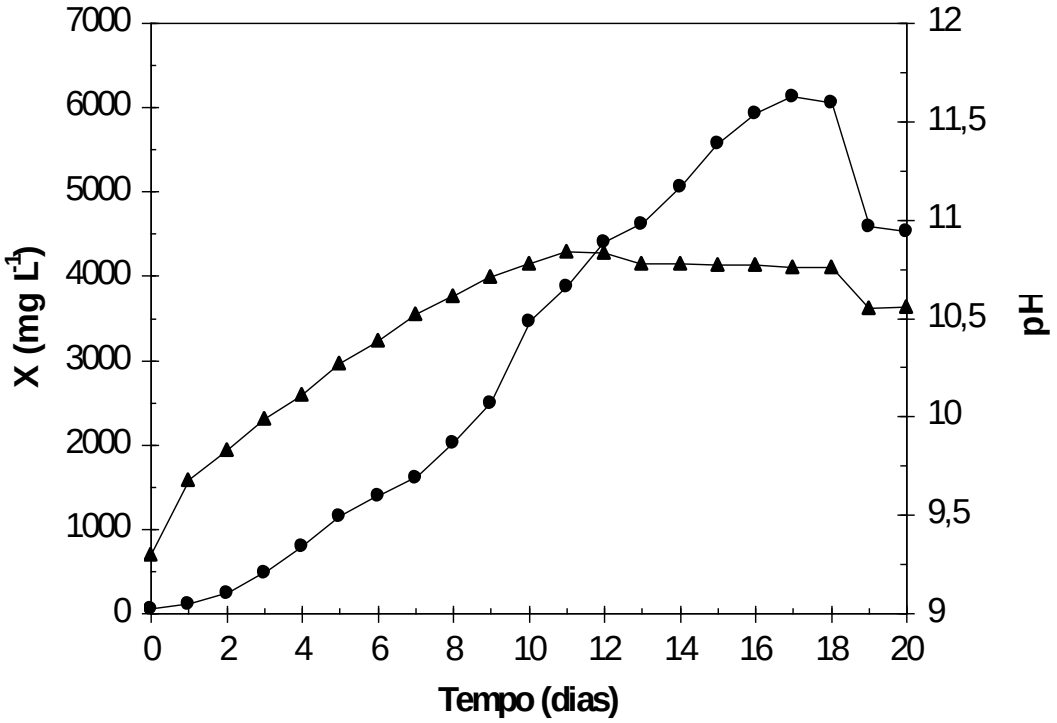


**Figura 36**. Concentração de celular (X –◆–) e pH (–▲–) em função do tempo para experimento 9 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).

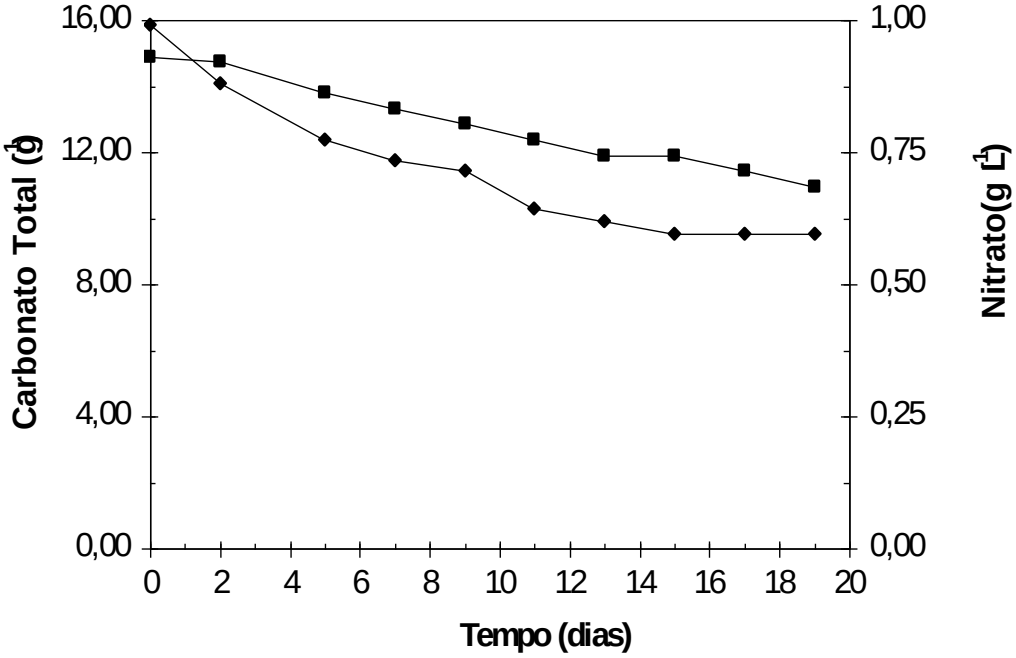


**Figura 37**. Concentração de carbonato total (–◆–) e nitrato (–■–) em função do tempo para experimento 9 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).

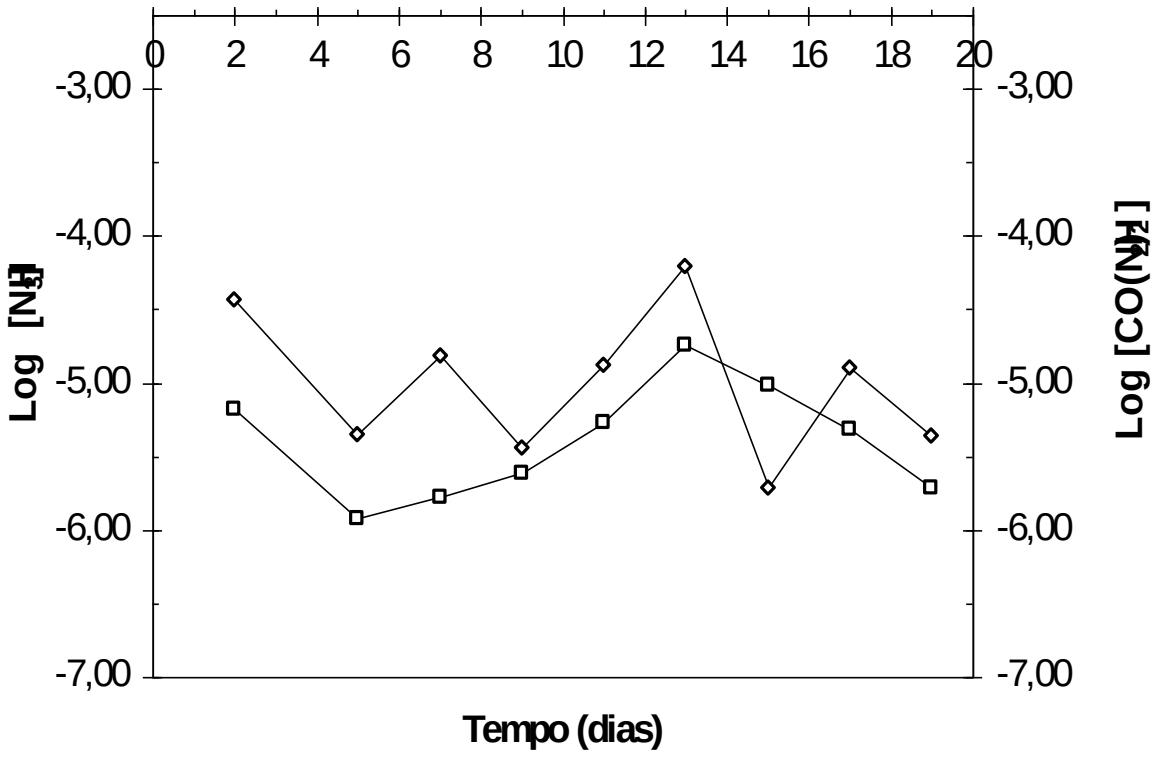


**Figura 38**. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para experimento 9 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).

**EXPERIMENTO 10**

**Tabela 17** - Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 10 ($KNO_3$, 15 mM (1,51 g $L^{-1}$); Uréia, 7,50 mM (0,45 g $L^{-1}$)).

| Tempo (Dias) | X (mg $L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $L^{-1}$) | Nitrato (g $L^{-1}$) | Amônia (mol $L^{-1}$) | Uréia (mol $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,3 | 15,85 | 0,93 | - | - |
| 1 | 108 | 9,7 | - | - | - | - |
| 2 | 236 | 9,8 | 13,66 | 0,92 | $2,1789 \times 10^{-6}$ | $1,3239 \times 10^{-5}$ |
| 3 | 484 | 10,0 | - | - | - | - |
| 4 | 804 | 10,1 | - | - | - | - |
| 5 | 1051 | 10,3 | 12,60 | 0,86 | $1,1348 \times 10^{-6}$ | $5,9820 \times 10^{-6}$ |
| 6 | 1395 | 10,4 | - | - | - | - |
| 7 | 1594 | 10,5 | 10,89 | 0,83 | $1,0317 \times 10^{-6}$ | $5,0092 \times 10^{-7}$ |
| 8 | 1761 | 10,6 | - | - | - | - |
| 9 | 2068 | 10,7 | 9,54 | 0,80 | $2,1646 \times 10^{-6}$ | $3,3198 \times 10^{-6}$ |
| 10 | 3052 | 10,8 | - | - | - | - |
| 11 | 3327 | 10,9 | 8,39 | 0,77 | $4,4968 \times 10^{-6}$ | $5,5570 \times 10^{-6}$ |
| 12 | 3858 | 10,9 | - | - | - | - |
| 13 | 4622 | 10,9 | 7,25 | 0,74 | $5,0566 \times 10^{-6}$ | $3,2494 \times 10^{-6}$ |
| 14 | 5488 | 10,9 | - | - | - | - |
| 15 | 5927 | 10,8 | 6,87 | 0,71 | $1,0144 \times 10^{-5}$ | $2,5338 \times 10^{-6}$ |
| 16 | 5972 | 10,8 | - | - | - | - |
| 17 | 6024 | 10,8 | 6,87 | 0,68 | $2,5122 \times 10^{-5}$ | $1,5192 \times 10^{-6}$ |
| 18 | 5832 | 10,7 | - | - | - | - |
| 19 | 5606 | 10,5 | 6,87 | 0,68 | $7,9407 \times 10^{-6}$ | $1,5522 \times 10^{-5}$ |
| 20 | 5043 | 10,5 | - | - | - | - |

-: Amostras não analisada.

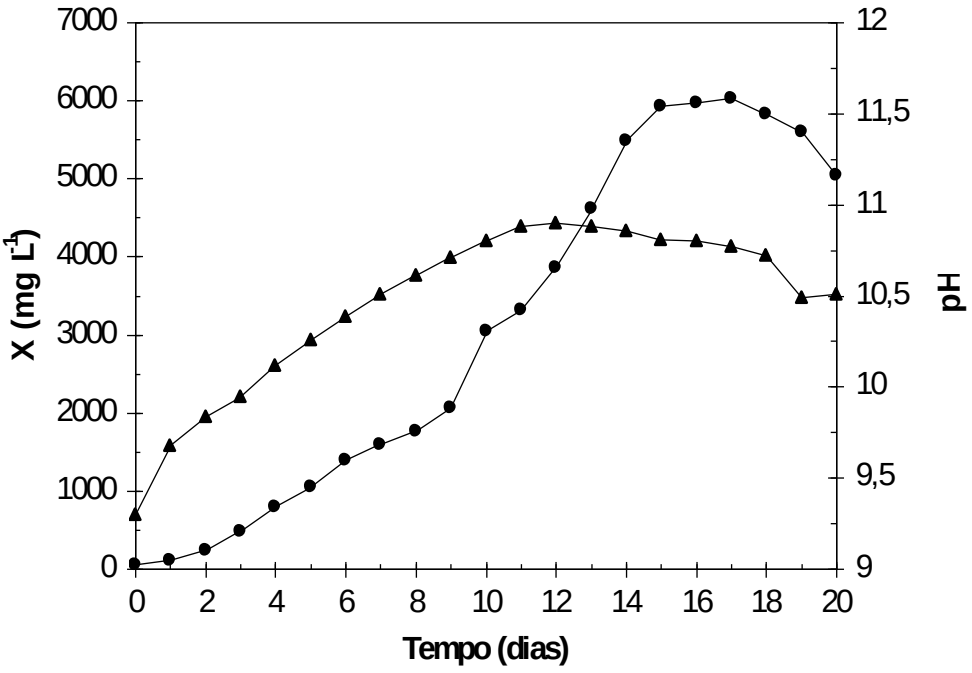


**Figura 39**. Concentração de celular (X -◆-) e pH (-▲-) em função do tempo para ensaio 10 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).

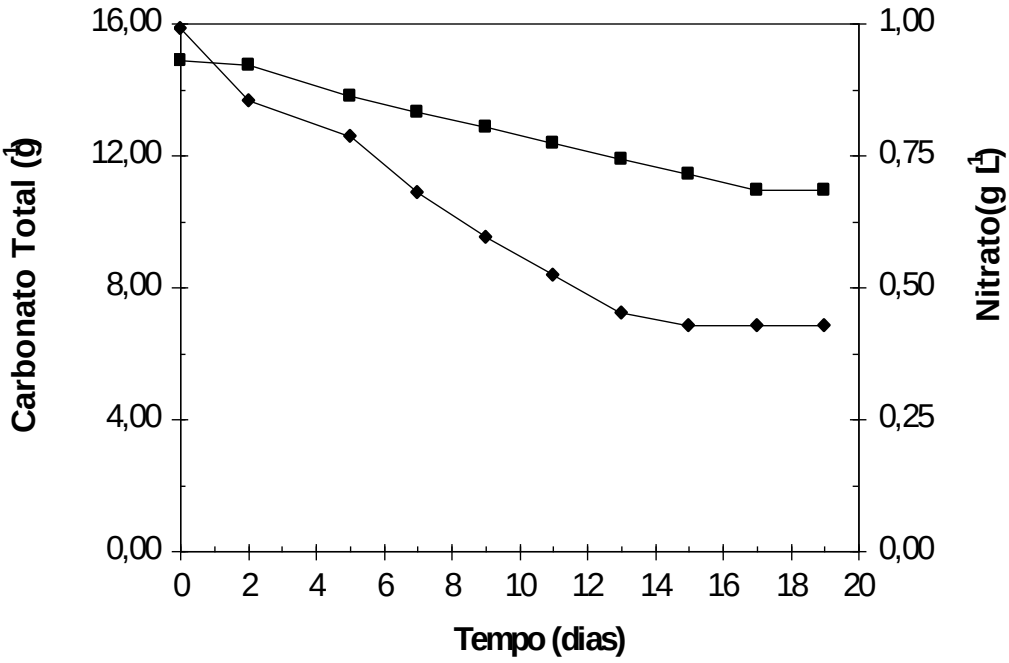


**Figura 40**. Concentração de carbonato total (-◆-) e nitrato (-■-) em função do tempo para experimento 10 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).

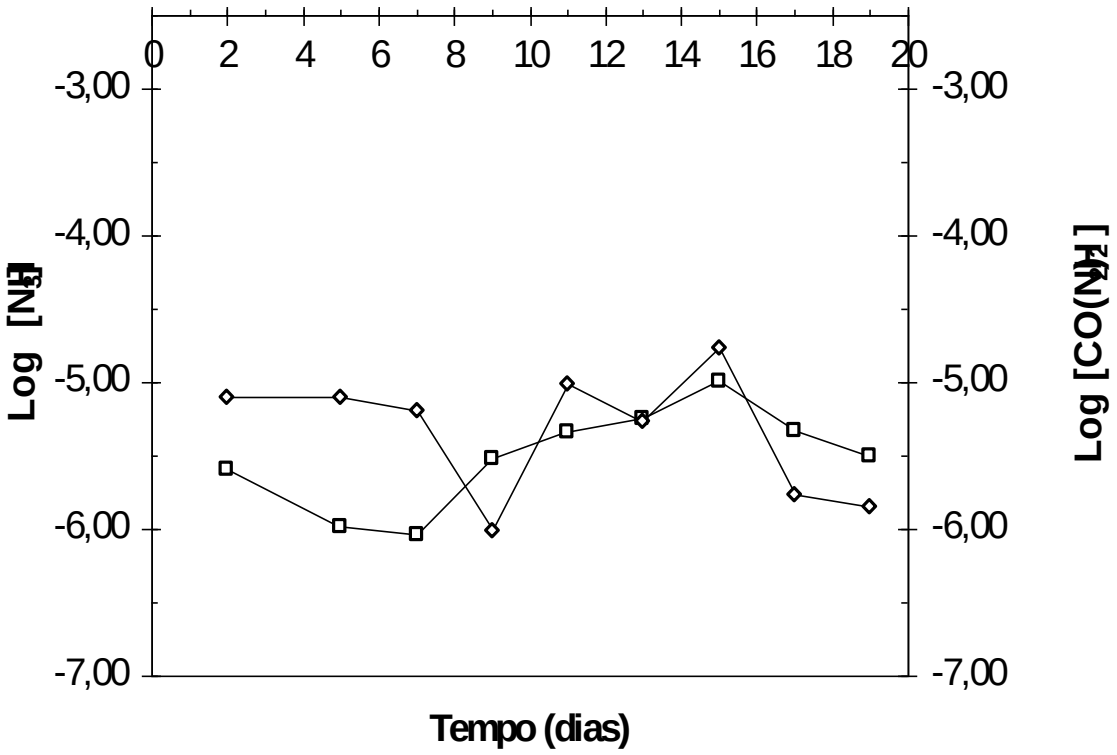


**Figura 41**. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para ensaio 10 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).

**EXPERIMENTO 11**

**Tabela 18 -** Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 11 ($KNO_3$, 15 mM (1,51 g $L^{-1}$); Uréia, 7,50 mM (0,45 g $L^{-1}$)).

| Tempo (Dias) | X (mg $L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $L^{-1}$) | Nitrato (g $L^{-1}$) | Amônia (mol $L^{-1}$) | Uréia (mol $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,3 | 15,85 | 0,93 | - | - |
| 1 | 206 | 9,7 | - | - | - | - |
| 2 | 368 | 9,9 | 13,45 | 0,87 | $2,7224 \times 10^{-6}$ | $3,5216 \times 10^{-5}$ |
| 3 | 662 | 10,0 | - | - | - | - |
| 4 | 903 | 10,1 | 12,84 | 0,75 | $1,0237 \times 10^{-6}$ | $2,3152 \times 10^{-6}$ |
| 5 | 1176 | 10,3 | - | - | - | - |
| 6 | 1609 | 10,4 | 11,01 | 0,69 | $3,0388 \times 10^{-6}$ | $2,2257 \times 10^{-5}$ |
| 7 | 1854 | 10,5 | - | - | - | - |
| 8 | 2173 | 10,7 | 11,01 | 0,66 | $4,6470 \times 10^{-7}$ | $2,5193 \times 10^{-6}$ |
| 9 | 2699 | 10,8 | - | - | - | - |
| 10 | 2989 | 10,9 | 9,17 | 0,57 | $6,3034 \times 10^{-6}$ | $2,7366 \times 10^{-5}$ |
| 11 | 3312 | 11,0 | - | - | - | - |
| 12 | 3974 | 11,0 | 8,26 | 0,48 | $3,8154 \times 10^{-5}$ | $5,6303 \times 10^{-5}$ |
| 13 | 4457 | 11,0 | - | - | - | - |
| 14 | 5149 | 10,7 | 7,64 | 0,48 | $4,6153 \times 10^{-5}$ | $1,1065 \times 10^{-4}$ |
| 15 | 5531 | 10,5 | - | - | - | - |
| 16 | 5961 | 10,5 | 6,12 | 0,39 | $4,9801 \times 10^{-6}$ | $5,2185 \times 10^{-5}$ |
| 17 | 6012 | 10,4 | - | - | - | - |
| 18 | 6144 | 10,4 | 5,81 | 0,15 | $1,5915 \times 10^{-6}$ | $1,0689 \times 10^{-4}$ |
| 19 | 5843 | 10,5 | - | - | - | - |

-: Amostras não analisada.

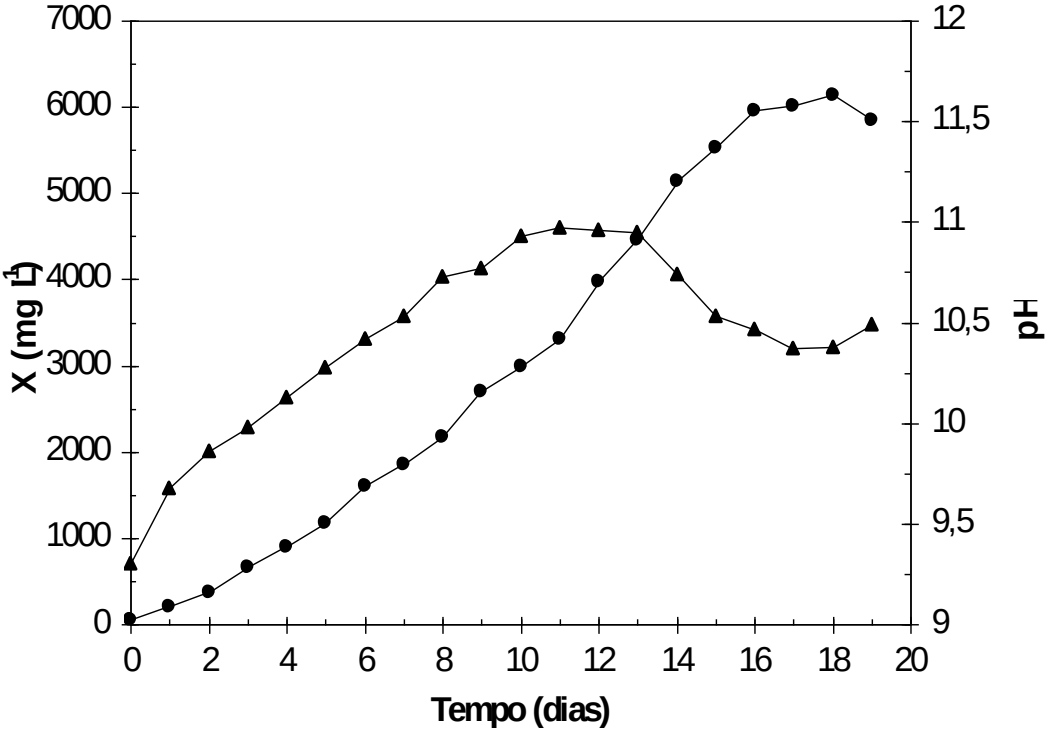


**Figura 42**. Concentração de celular (X -♦-) e pH (-▲-) em função do tempo para ensaio 11 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).

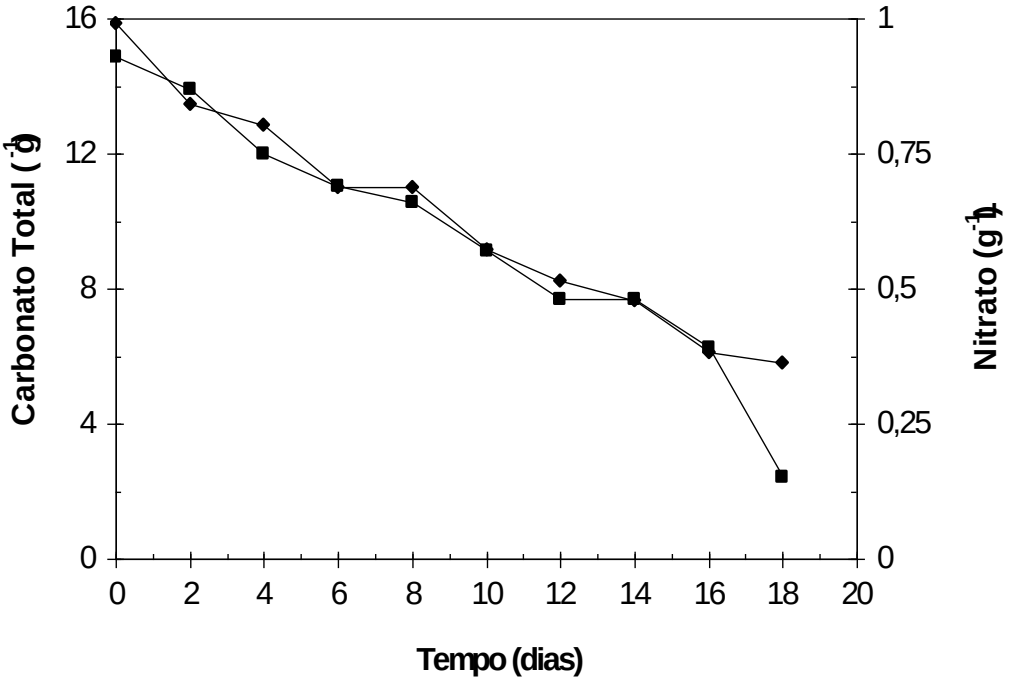


**Figura 43**. Concentração de carbonato total (-♦-) e nitrato (-■-) em função do tempo para experimento 11 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).

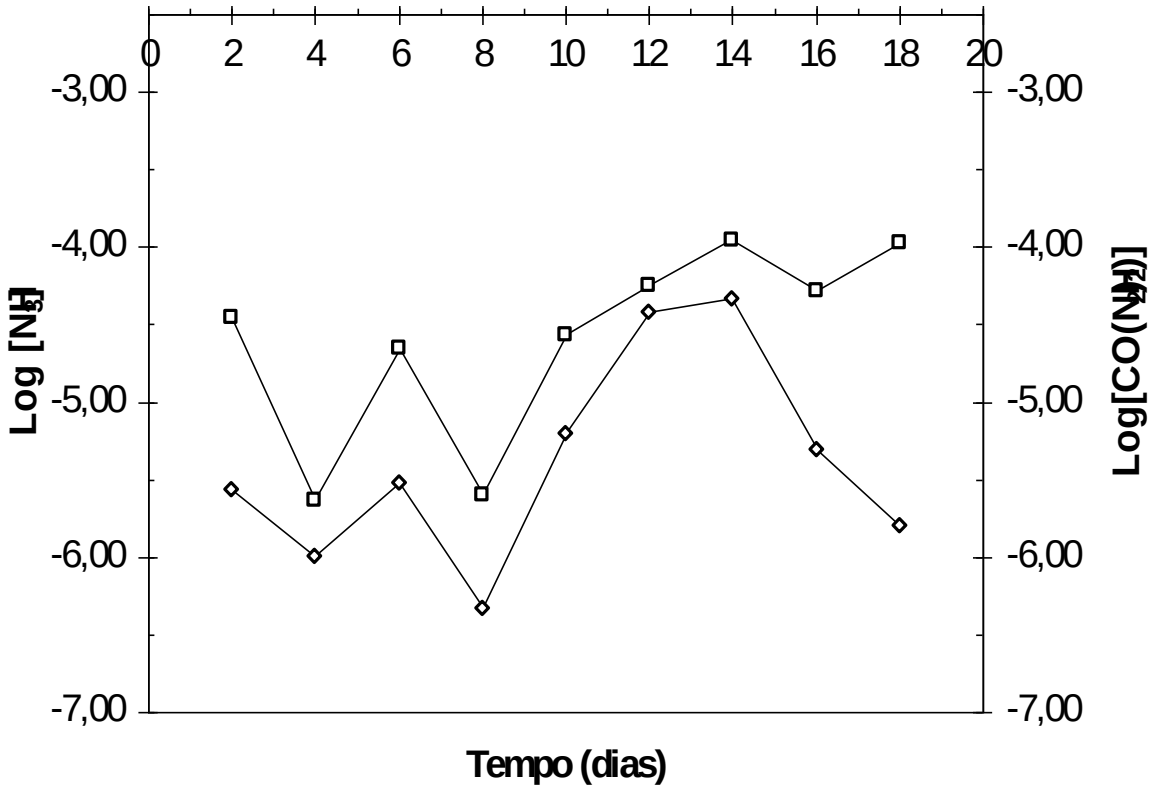


**Figura 44**. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para ensaio 11 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).

**EXPERIMENTO 12**

**Tabela 19** - Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 12 ($KNO_3$, 15 mM (1,51 g $L^{-1}$); Uréia, 7,50 mM (0,45 g $L^{-1}$)).

| Tempo (Dias) | X (mg $L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $L^{-1}$) | Nitrato (g $L^{-1}$) | Amônia (mol $L^{-1}$) | Uréia (mol $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,3 | 15,85 | 0,93 | - | - |
| 1 | 204 | 9,7 | - | - | - | - |
| 2 | 534 | 9,9 | 14,68 | 0,90 | $2,3588 \times 10^{-6}$ | $8,5015 \times 10^{-6}$ |
| 3 | 938 | 10,0 | - | - | - | - |
| 4 | 1738 | 10,1 | 13,76 | 0,75 | $7,3810 \times 10^{-7}$ | $1,5614 \times 10^{-5}$ |
| 5 | 2407 | 10,3 | - | - | - | - |
| 6 | 2786 | 10,4 | 12,84 | 0,66 | $1,7542 \times 10^{-6}$ | $1,0513 \times 10^{-5}$ |
| 7 | 3061 | 10,5 | - | - | - | - |
| 8 | 3823 | 10,7 | 12,54 | 0,53 | $1,7097 \times 10^{-5}$ | $3,1114 \times 10^{-5}$ |
| 9 | 4082 | 10,8 | - | - | - | - |
| 10 | 4445 | 10,9 | 12,54 | 0,44 | $1,6084 \times 10^{-6}$ | $1,9796 \times 10^{-6}$ |
| 11 | 4527 | 11,0 | - | - | - | - |
| 12 | 4703 | 11,0 | 11,62 | 0,37 | $2,0506 \times 10^{-5}$ | $2,0424 \times 10^{-5}$ |
| 13 | 4903 | 11,0 | - | - | - | - |
| 14 | 5206 | 10,7 | 11,01 | 0,07 | $2,3119 \times 10^{-5}$ | $3,6469 \times 10^{-6}$ |
| 15 | 5726 | 10,5 | - | - | - | - |
| 16 | 6046 | 10,5 | 9,48 | 0,01 | $5,8007 \times 10^{-6}$ | $1,1083 \times 10^{-5}$ |
| 17 | 6179 | 10,4 | - | - | - | - |
| 18 | 6041 | 10,4 | 8,26 | 0,01 | - | - |
| 19 | 5843 | 10,5 | - | - | - | - |

-: Amostras não analisada.

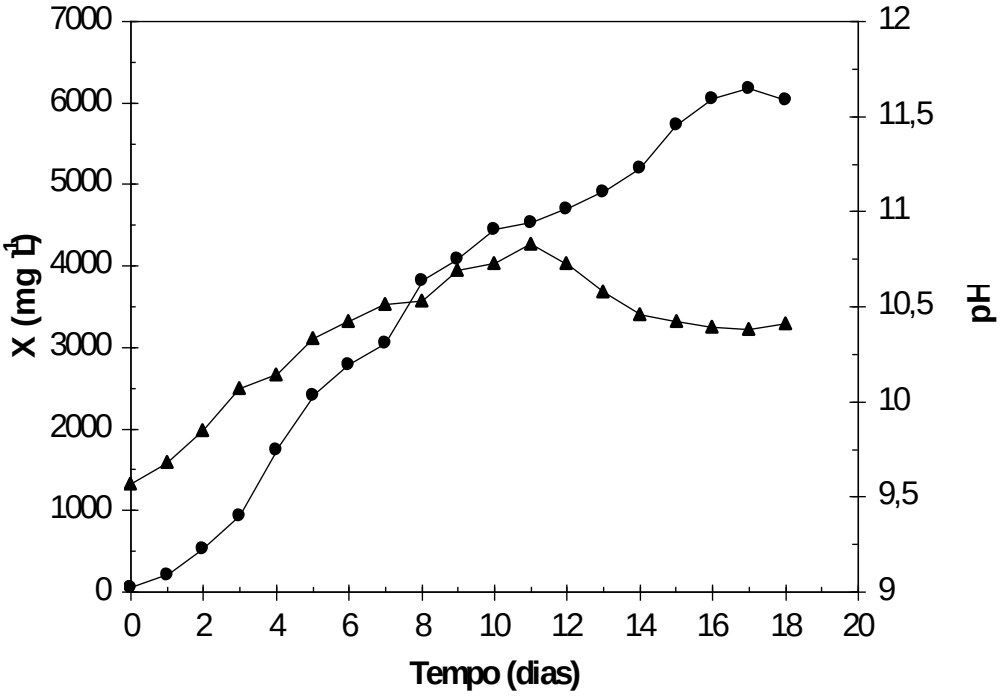


**Figura 45**. Concentração de celular (X -◆-) e pH (-▲-) em função do tempo para ensaio 12 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).

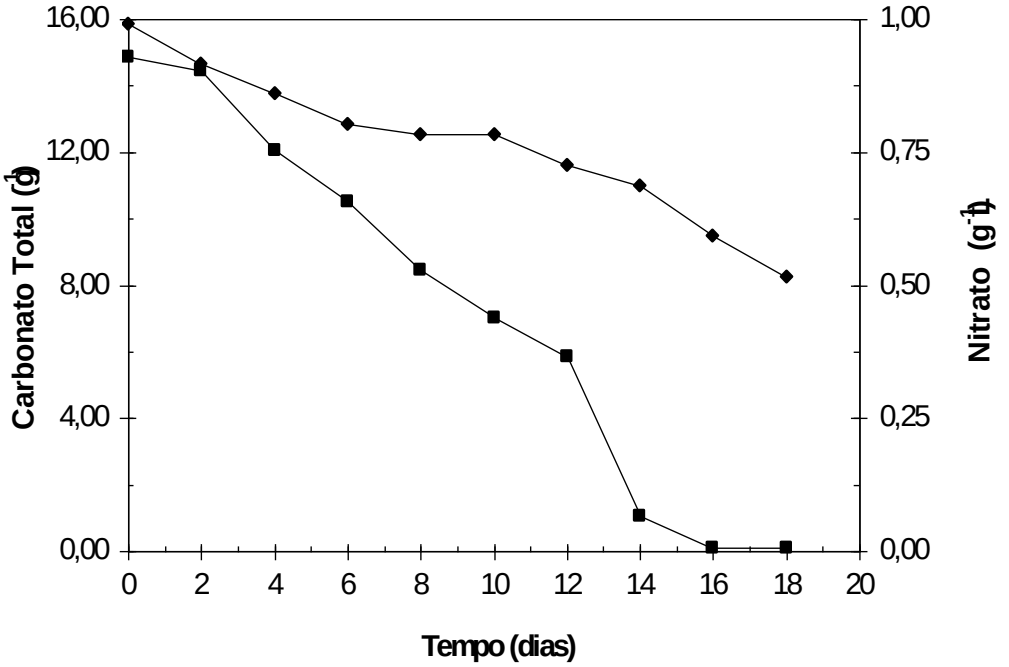


**Figura 46**. Concentração de carbonato total (-◆-) e nitrato (-■-) em função do tempo para experimento 12 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).

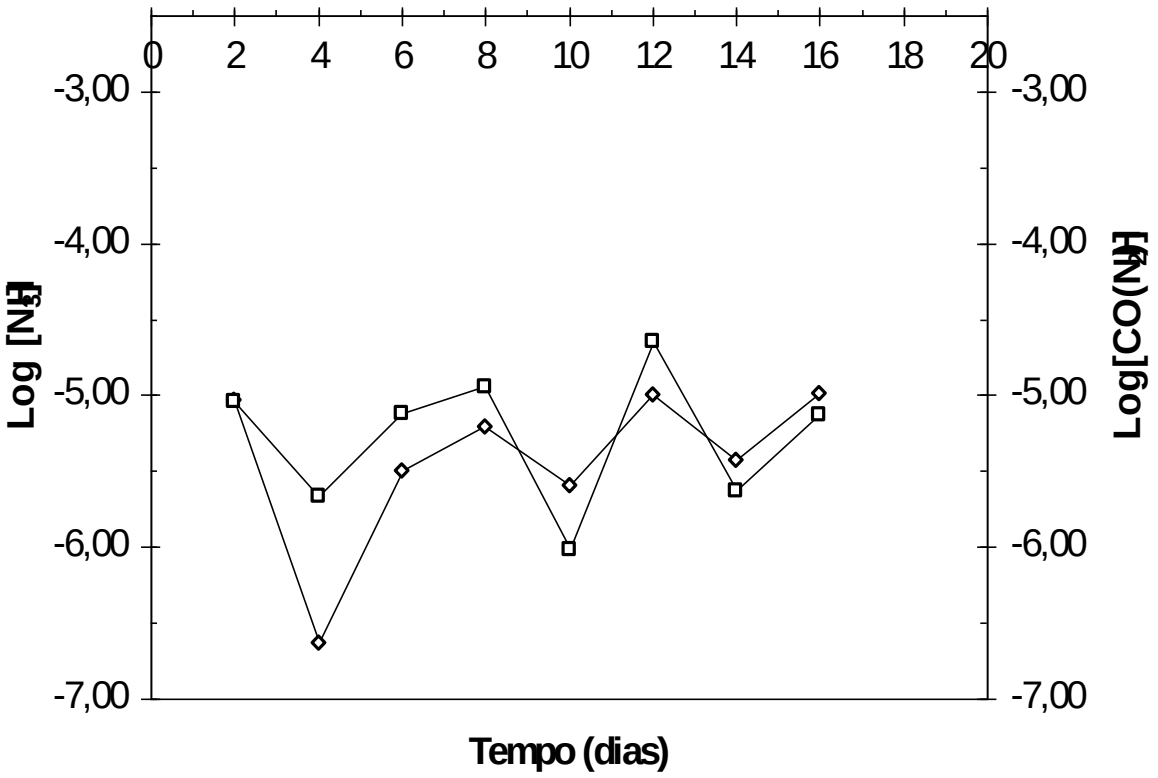


**Figura 47**. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para ensaio 12 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).

**EXPERIMENTO 13**

**Tabela 20** - Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 13 ($KNO_3$, 15 mM (1,51 g $L^{-1}$); Uréia, 7,50 mM (0,45 g $L^{-1}$)).

| Tempo (Dias) | X (mg $L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $L^{-1}$) | Nitrato (g $L^{-1}$) | Amônia (mol $L^{-1}$) | Uréia (mol $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,57 | 15,85 | 0,93 | - | - |
| 1 | 208 | 9,7 | - | - | - | - |
| 2 | 511 | 9,9 | 15,59 | 0,92 | $9,2834 \times 10^{-6}$ | $9,2066 \times 10^{-6}$ |
| 3 | 957 | 10,0 | - | - | - | - |
| 4 | 1637 | 10,1 | 14,98 | 0,83 | $2,3443 \times 10^{-7}$ | $2,1727 \times 10^{-6}$ |
| 5 | 1927 | 10,3 | - | - | - | - |
| 6 | 2062 | 10,4 | 12,54 | 0,75 | $3,1638 \times 10^{-6}$ | $7,6555 \times 10^{-6}$ |
| 7 | 2204 | 10,5 | - | - | - | - |
| 8 | 2844 | 10,6 | 11,31 | 0,56 | $6,2293 \times 10^{-6}$ | $1,1336 \times 10^{-5}$ |
| 9 | 3444 | 10,6 | - | - | - | - |
| 10 | 3919 | 10,5 | 10,30 | 0,43 | $1,6084 \times 10^{-6}$ | $9,6544 \times 10^{-7}$ |
| 11 | 4286 | 10,6 | - | - | - | - |
| 12 | 4541 | 10,6 | 9,48 | 0,40 | $2,5381 \times 10^{-6}$ | $2,2752 \times 10^{-5}$ |
| 13 | 4569 | 10,4 | - | - | - | - |
| 14 | 4898 | 10,4 | 7,34 | 0,19 | $3,7722 \times 10^{-6}$ | $2,3413 \times 10^{-6}$ |
| 15 | 5170 | 10,4 | - | - | - | - |
| 16 | 5440 | 10,4 | 7,03 | 0,14 | $1,0312 \times 10^{-5}$ | $7,4604 \times 10^{-6}$ |
| 17 | 5606 | 10,4 | - | - | - | - |
| 18 | 6075 | 10,4 | 5,20 | 0,14 | - | - |
| 19 | 5910 | 10,5 | - | - | - | - |

-: Amostras não analisada.

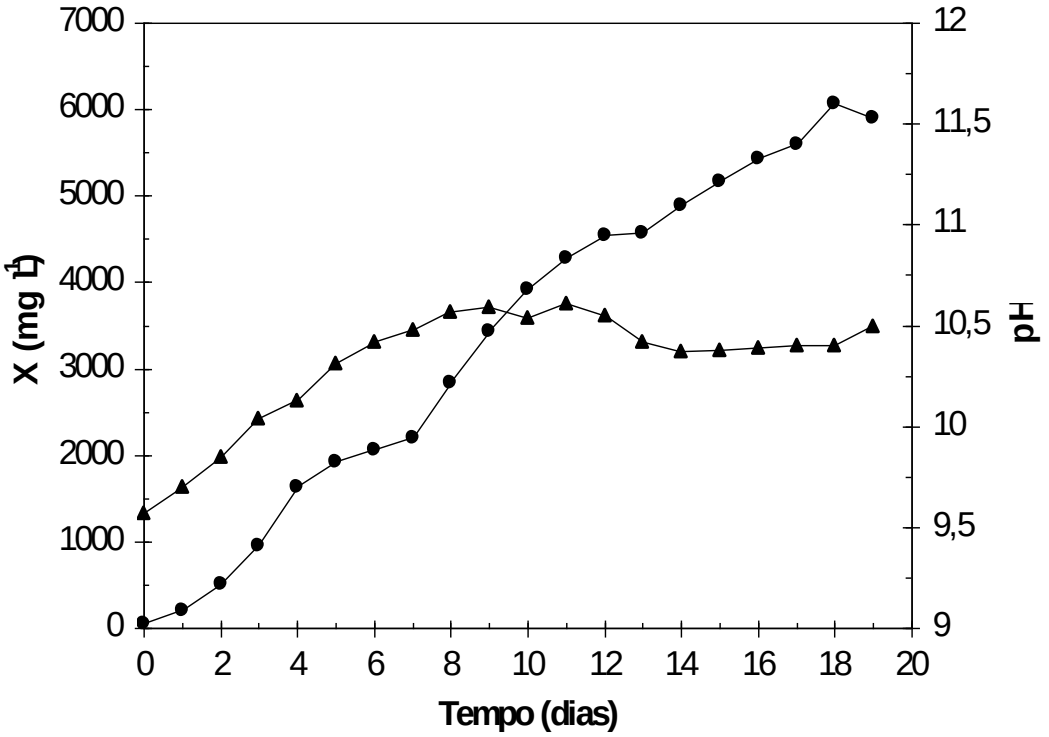


**Figura 48**. Concentração de celular (X –◆–) e pH (–▲–) em função do tempo para ensaio 13 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).

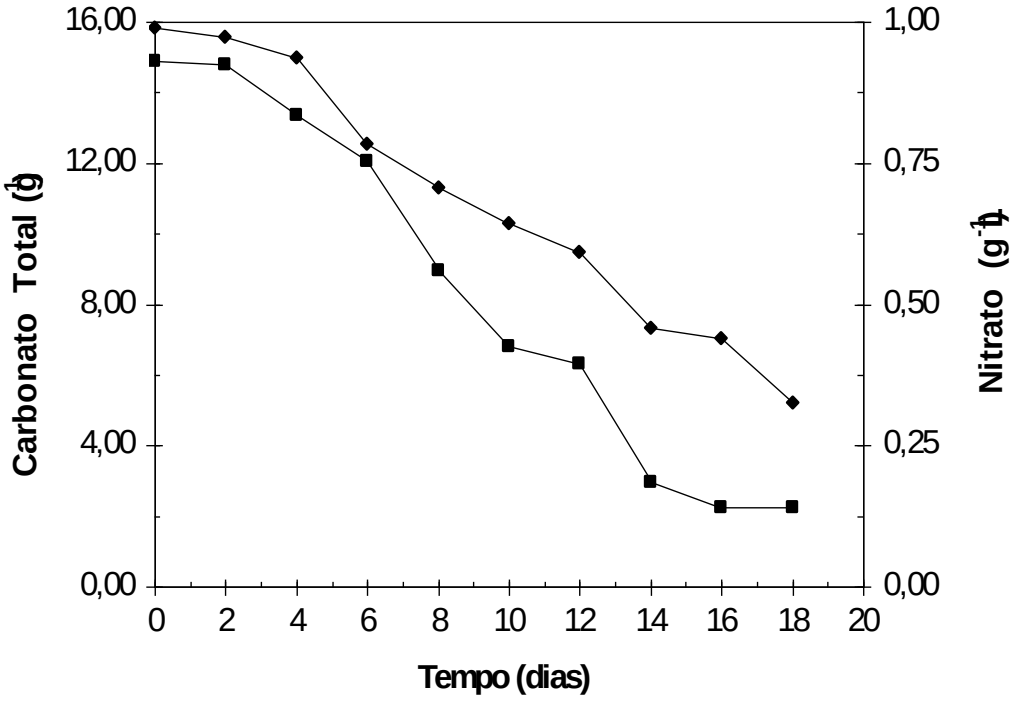


**Figura 49**. Concentração de carbonato total (–◆–) e nitrato (–■–) em função do tempo para experimento 13 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).

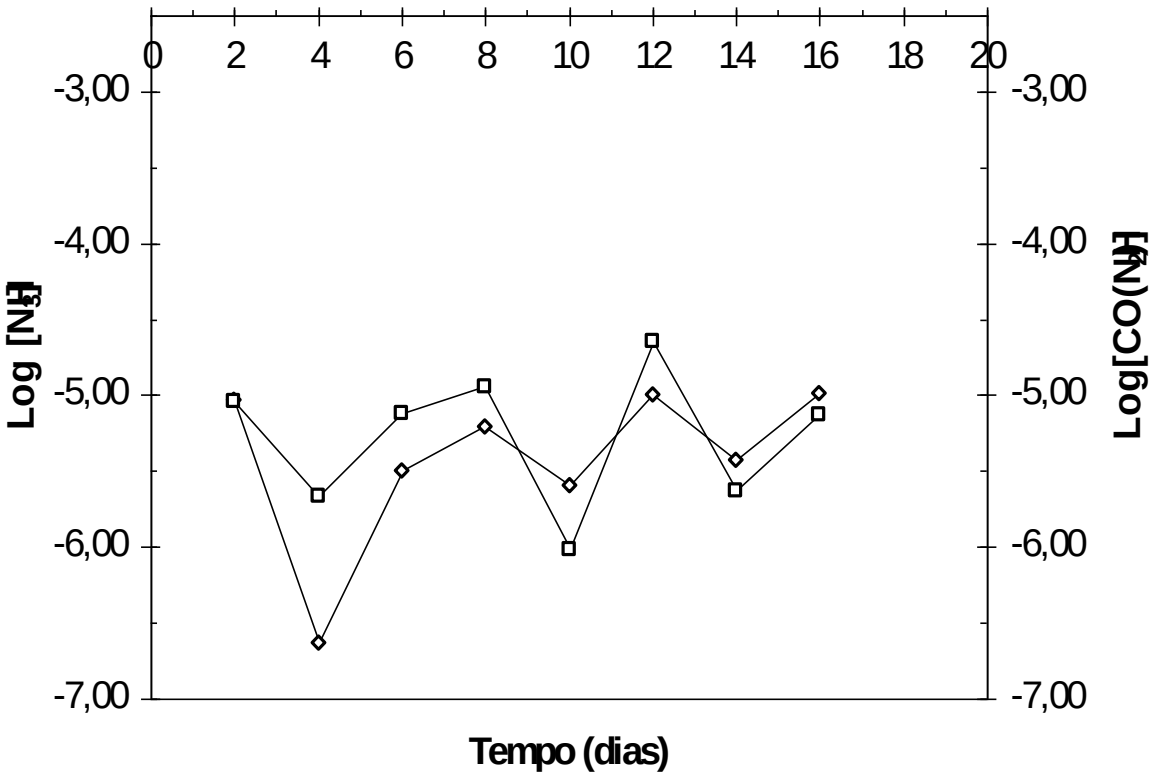


**Figura 50**. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para ensaio 13 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).

**EXPERIMENTO 14**

**Tabela 21** - Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 14 ($KNO_3$, 15 mM (1,51 g $L^{-1}$); Uréia, 7,50 mM (0,45 g $L^{-1}$)).

| Tempo (Dias) | X (mg $L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $L^{-1}$) | Nitrato (g $L^{-1}$) | Amônia (mol $L^{-1}$) | Uréia (mol $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,57 | 15,85 | 0,93 | - | - |
| 1 | 191 | 9,7 | - | - | - | - |
| 2 | 501 | 9,9 | 10,70 | 0,75 | $1,6024 \times 10^{-6}$ | $3,2169 \times 10^{-5}$ |
| 3 | 876 | 10,1 | - | - | - | - |
| 4 | 1423 | 10,2 | 10,40 | 0,61 | $2,1620 \times 10^{-7}$ | $1,0271 \times 10^{-6}$ |
| 5 | 1736 | 10,3 | - | - | - | - |
| 6 | 2809 | 10,5 | 10,09 | 0,52 | $2,5067 \times 10^{-6}$ | $9,5349 \times 10^{-6}$ |
| 7 | 3396 | 10,6 | - | - | - | - |
| 8 | 3767 | 10,7 | 9,78 | 0,50 | $8,4805 \times 10^{-6}$ | $8,3201 \times 10^{-6}$ |
| 9 | 3873 | 10,8 | - | - | - | - |
| 10 | 3981 | 10,8 | 8,87 | 0,44 | $2,0257 \times 10^{-6}$ | $3,7244 \times 10^{-6}$ |
| 11 | 4083 | 10,8 | - | - | - | - |
| 12 | 4359 | 10,7 | 8,26 | 0,29 | $4,7599 \times 10^{-5}$ | $1,0540 \times 10^{-6}$ |
| 13 | 4555 | 10,6 | - | - | - | - |
| 14 | 5206 | 10,7 | 8,26 | 0,04 | $2,990 \times 10^{-5}$ | $4,4329 \times 10^{-7}$ |
| 15 | 5704 | 10,4 | - | - | - | - |
| 16 | 5938 | 10,4 | 6,42 | 0,01 | $7,0839 \times 10^{-6}$ | $1,5047 \times 10^{-5}$ |
| 17 | 5972 | 10,5 | - | - | - | - |
| 18 | 6024 | 10,6 | 6,12 | 0,01 | - | - |
| 19 | 5933 | 10,6 | - | - | - | - |

-: Amostras não analisada.

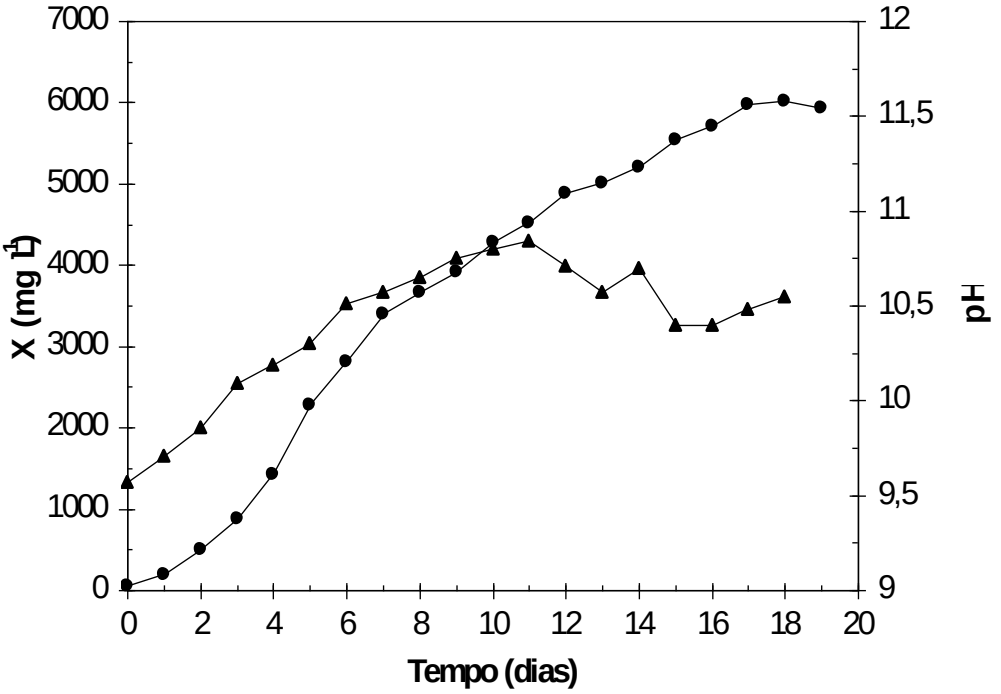


**Figura 51**. Concentração de celular (X -◆-) e pH (-▲-) em função do tempo para ensaio 14 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).

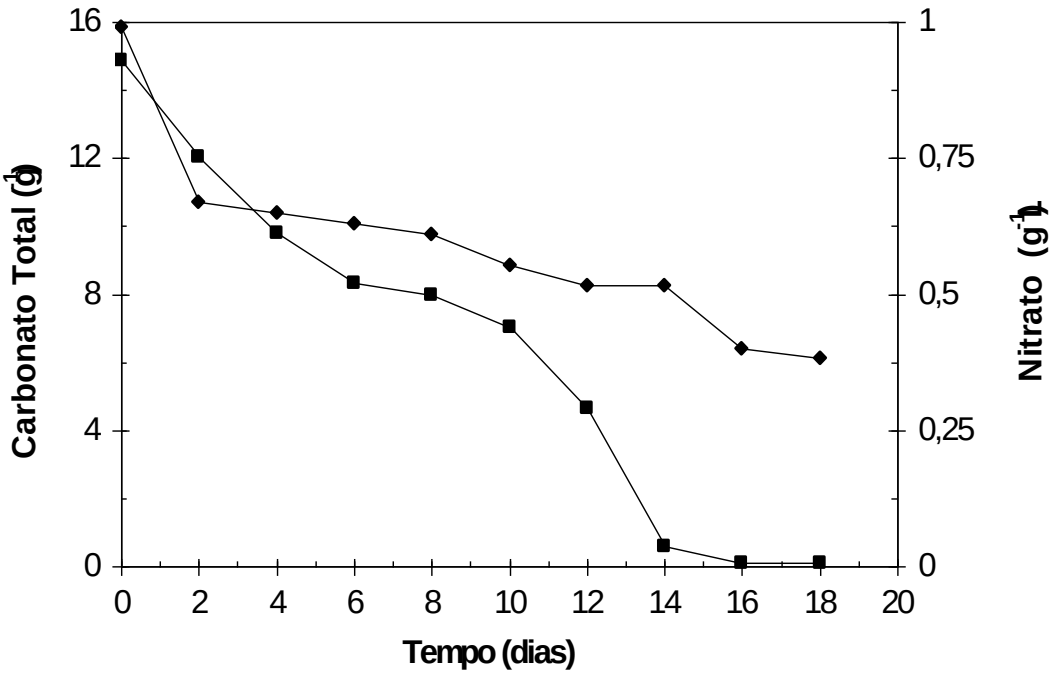


**Figura 52**. Concentração de carbonato total (-◆-) e nitrato (-■-) em função do tempo para ensaio 14 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).

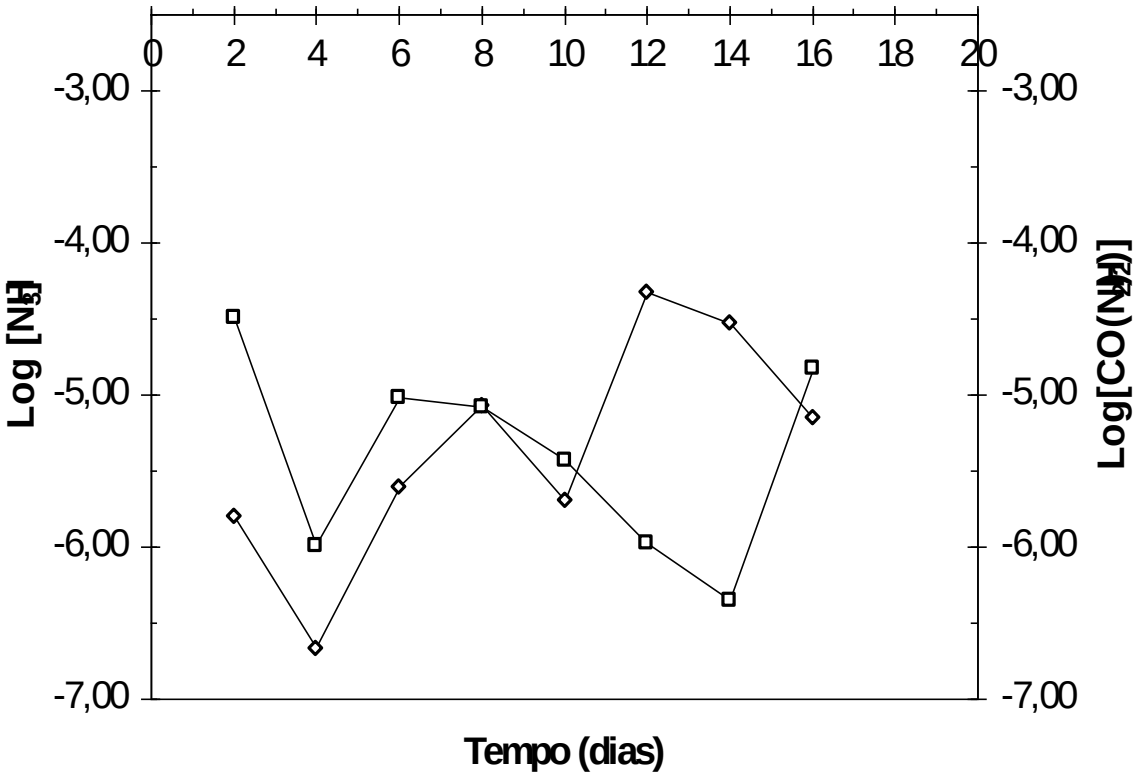


**Figura 53**. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–)em função do tempo para ensaio 14 ($KNO_3$, 15 mM; Uréia, 7,50 mM).

**EXPERIMENTO 15**

**Tabela 22** - Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 15 ($KNO_3$, 17,3 mM (1,74 g $L^{-1}$); Uréia, 8,90 mM (0,53 g $L^{-1}$)).

| Tempo (Dias) | X (mg $L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $L^{-1}$) | Nitrato (g $L^{-1}$) | Amônia (mol $L^{-1}$) | Uréia (mol $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,57 | 15,85 | 1,10 | - | - |
| 1 | 179 | 10,0 | - | - | - | - |
| 2 | 452 | 10,3 | 15,29 | 1,08 | $1,012 \times 10^{-4}$ | $2,3655 \times 10^{-4}$ |
| 3 | 664 | 10,4 | - | - | - | - |
| 4 | 785 | 10,6 | 14,06 | 1,05 | $2,5924 \times 10^{-4}$ | $2,7444 \times 10^{-4}$ |
| 5 | 939 | 10,8 | - | - | - | - |
| 6 | 1441 | 10,9 | 12,23 | 0,99 | $2,8277 \times 10^{-4}$ | $2,9484 \times 10^{-5}$ |
| 7 | 1557 | 11,0 | - | - | - | - |
| 8 | 1715 | 11,1 | 10,40 | 0,78 | $3,2800 \times 10^{-4}$ | $4,7405 \times 10^{-5}$ |
| 9 | 1917 | 11,1 | - | - | - | - |
| 10 | 2136 | 11,1 | 8,56 | 0,57 | $9,2942 \times 10^{-7}$ | $1,7584 \times 10^{-6}$ |
| 11 | 2590 | 11,0 | - | - | - | - |
| 12 | 3140 | 11,0 | 7,95 | 0,45 | $2,8401 \times 10^{-6}$ | $4,9217 \times 10^{-6}$ |
| 13 | 3691 | 11,1 | - | - | - | - |
| 14 | 4351 | 11,0 | 5,20 | 0,40 | $2,2055 \times 10^{-4}$ | $6,1456 \times 10^{-4}$ |
| 15 | 4771 | 11,0 | - | - | - | - |
| 16 | 5159 | 10,9 | 4,28 | 0,22 | $1,8683 \times 10^{-5}$ | $6,5221 \times 10^{-5}$ |
| 17 | 5526 | 10,9 | - | - | - | - |
| 18 | 5848 | 10,9 | - | - | - | - |
| 19 | 5715 | 11,0 | - | - | - | - |

-: Amostras não analisada.

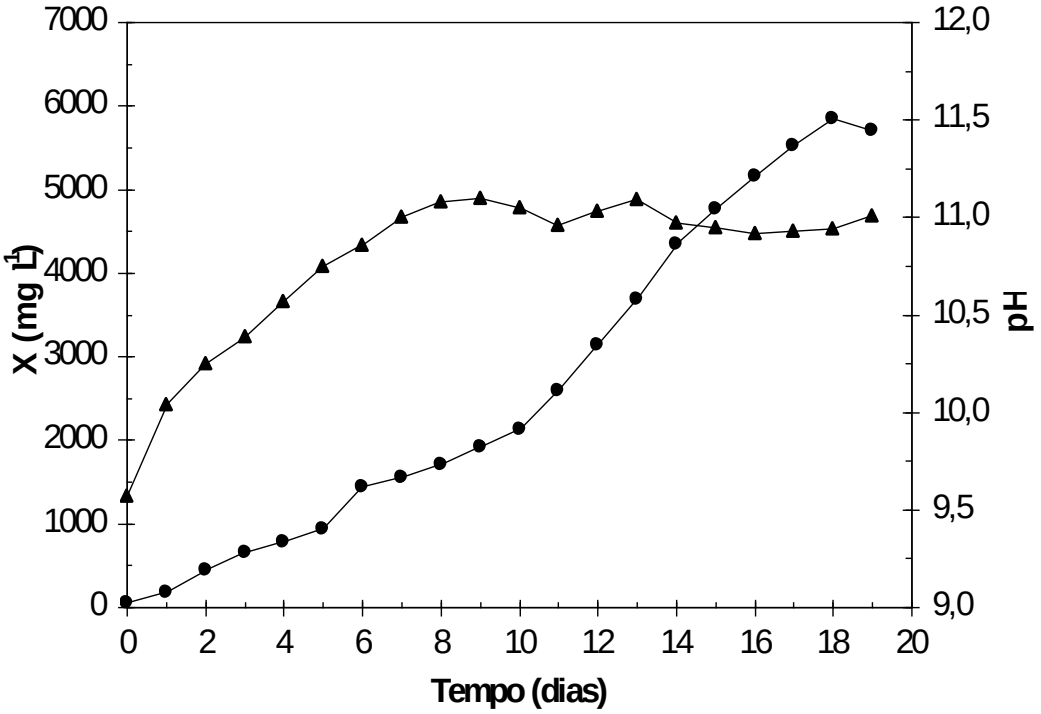


**Figura 54**. Concentração de celular (X -◆-) e pH (-▲-) em função do tempo para ensaio 15 ($KNO_3$, 17,3 mM; Uréia, 8,90 mM).

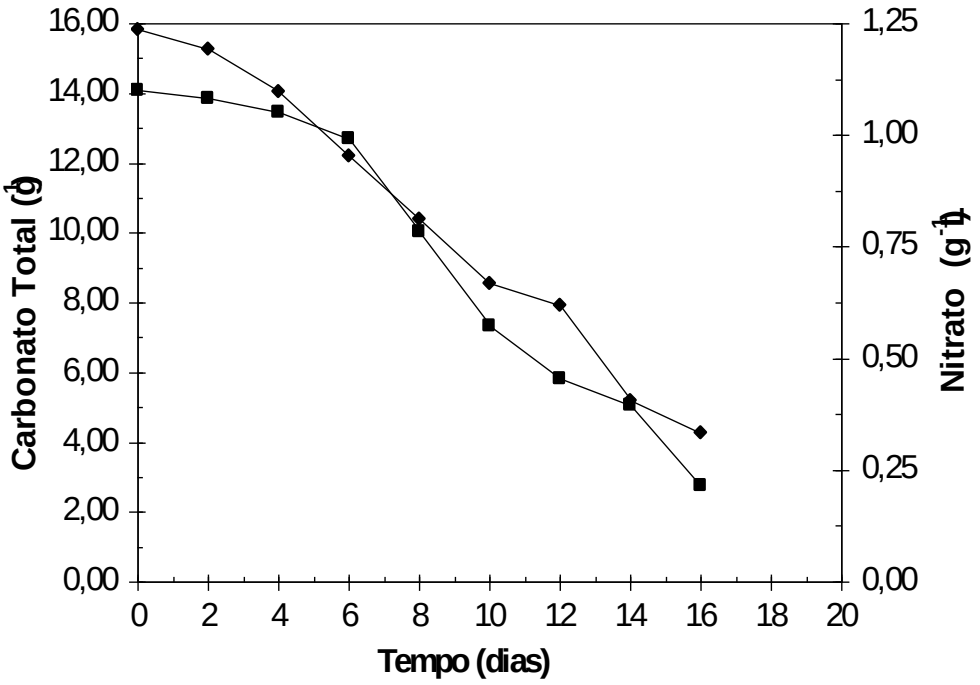


**Figura 55**. Concentração de carbonato total (-◆-) e nitrato (-■-) em função do tempo para experimento 15 ($KNO_3$, 5,1 mM; Uréia, 8,9 mM).

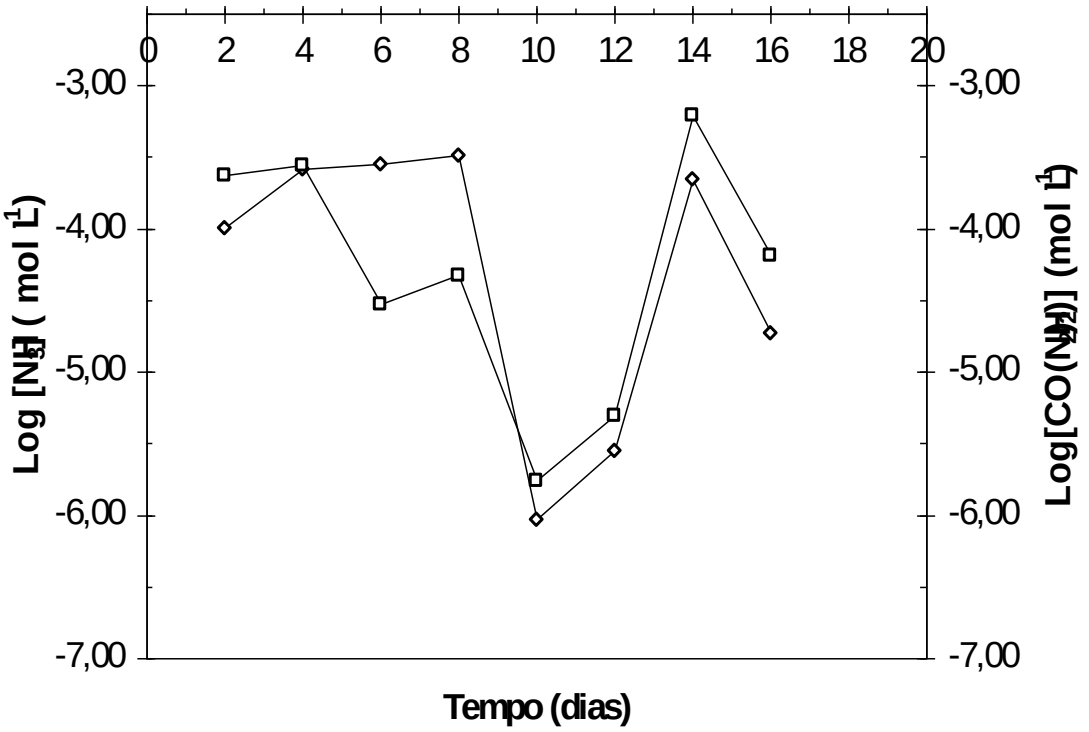


**Figura 56**. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para ensaio 15 ($KNO_3$, 17,3 mM; Uréia, 8,90 mM).

**Experimento 16**

**Tabela 23** - Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 16 (($KNO_3$, 17,3 mM (1,74 g $L^{-1}$); Uréia, 8,90 mM (0,53 g $L^{-1}$)).

| Tempo (Dias) | X (mg $L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $L^{-1}$) | Nitrato (g $L^{-1}$) | Amônia (mol $L^{-1}$) | Uréia (mol $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,57 | 15,85 | 1,10 | - | - |
| 1 | 186 | 10,0 | - | - | - | - |
| 2 | 528 | 10,3 | 15,59 | 1,05 | $1,1294 \times 10^{-4}$ | $2,7913 \times 10^{-4}$ |
| 3 | 665 | 10,4 | - | - | - | - |
| 4 | 866 | 10,6 | 14,98 | 0,84 | $1,9966 \times 10^{-4}$ | $1,7498 \times 10^{-4}$ |
| 5 | 1015 | 10,8 | - | - | - | - |
| 6 | 1386 | 10,9 | 10,09 | 0,78 | $2,8277 \times 10^{-4}$ | $2,9484 \times 10^{-5}$ |
| 7 | 1665 | 11,0 | - | - | - | - |
| 8 | 2120 | 11,1 | 9,78 | 0,75 | $4,0722 \times 10^{-4}$ | $6,2315 \times 10^{-5}$ |
| 9 | 2458 | 11,1 | - | - | - | - |
| 10 | 2697 | 11,2 | 9,17 | 0,57 | $1,6084 \times 10^{-6}$ | $9,1751 \times 10^{-7}$ |
| 11 | 3492 | 11,0 | - | - | - | - |
| 12 | 4189 | 11,1 | 7,03 | 0,51 | $3,2291 \times 10^{-6}$ | $4,0208 \times 10^{-6}$ |
| 13 | 4520 | 11,1 | - | - | - | - |
| 14 | 5109 | 11,0 | 6,73 | 0,45 | $7,2761 \times 10^{-4}$ | $1,0527 \times 10^{-4}$ |
| 15 | 5510 | 10,9 | - | - | - | - |
| 16 | 5771 | 11,0 | 4,59 | 0,37 | $1,8762 \times 10^{-5}$ | $6,1804 \times 10^{-5}$ |
| 17 | 5950 | 11,0 | - | - | - | - |
| 18 | 6209 | 11,0 | - | - | - | - |
| 19 | 6116 | 10,9 | - | - | - | - |

-: Amostras não analisada.

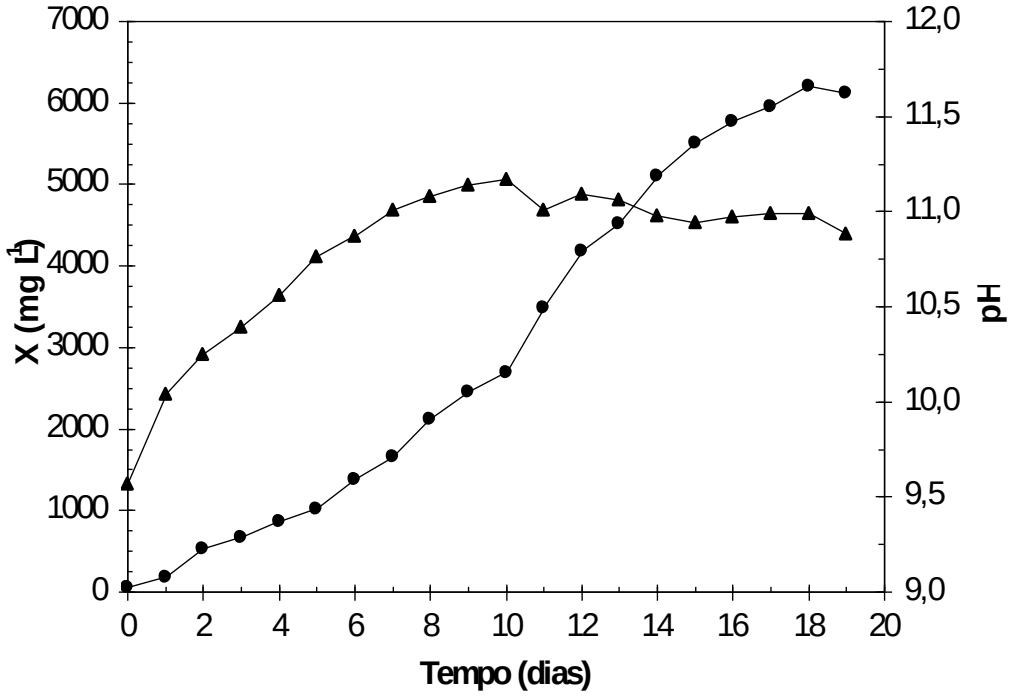


**Figura 57**. Concentração de celular (X -◆-) e pH (-▲-) em função do tempo para ensaio 16 ($KNO_3$, 17,3 mM; Uréia, 8,90 mM).

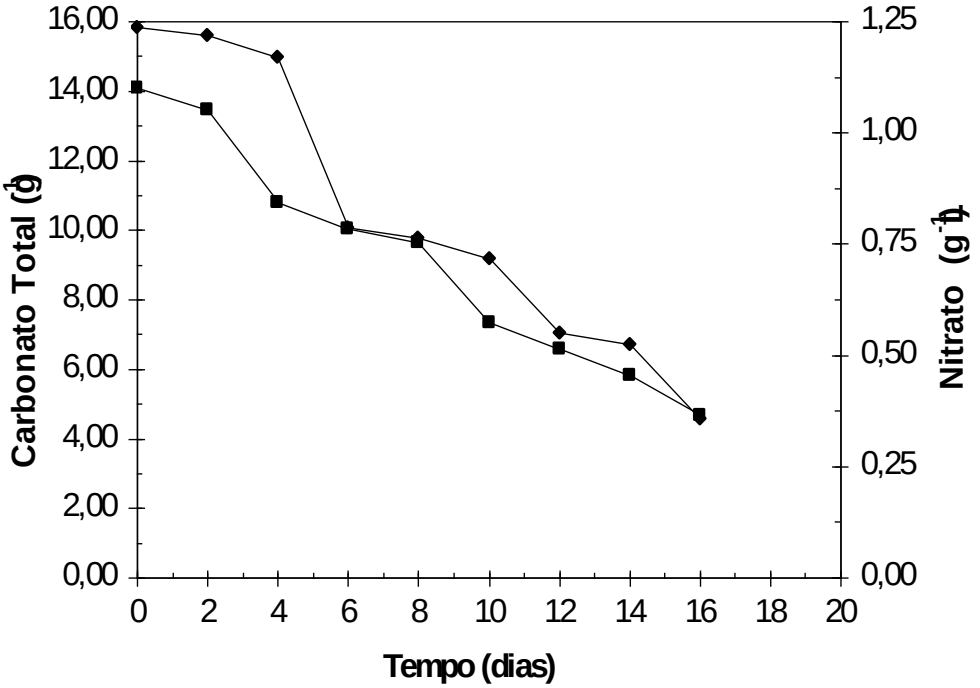


**Figura 58**. Concentração de carbonato total (-◆-) e nitrato (-■-) em função do tempo para experimento 16 ($KNO_3$, 17,3 mM; Uréia, 8,9 mM).

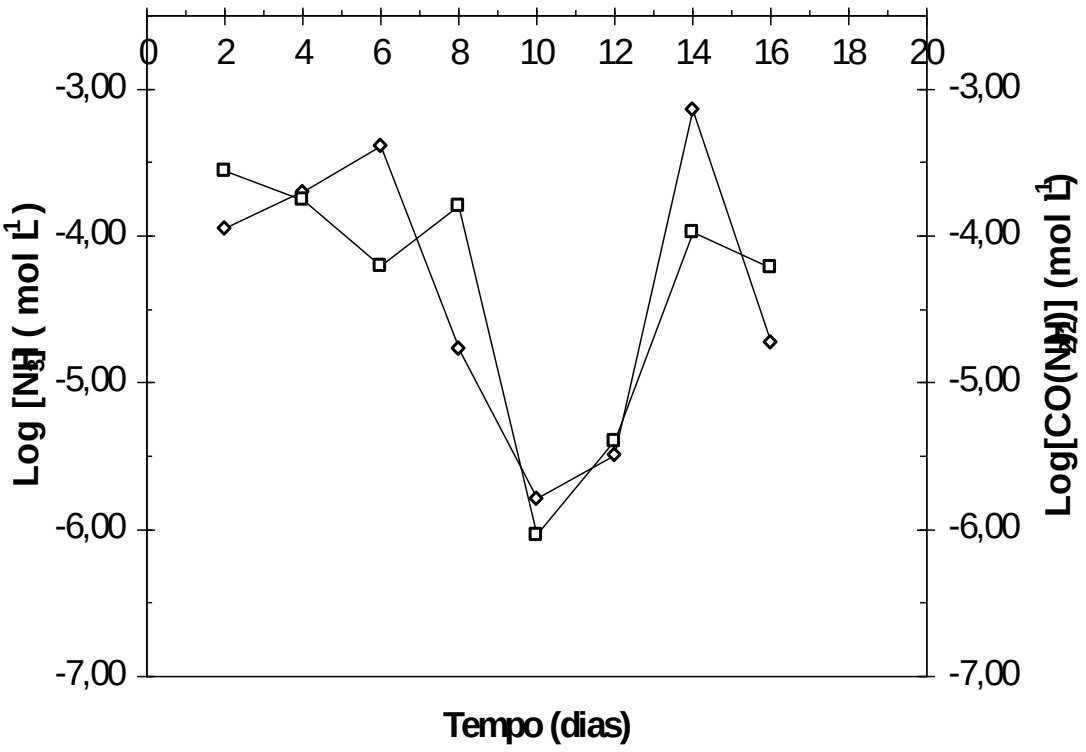


**Figura 59**. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para ensaio 16 ($KNO_3$, 17,3 mM; Uréia, 8,90 mM).

**Experimento 17**

**Tabela 24** - Concentração celular (X), valor de pH, concentração de nitrato, concentração de carbonato total, concentração de amônia, concentração de uréia em função do tempo para experimento 17 ($KNO_3$, 17,3 mM (1,74 g $L^{-1}$); Uréia, 8,90 mM (0,53 g $L^{-1}$)).

| Tempo (Dias) | X (mg $L^{-1}$) | pH | Carbonato Total (g $L^{-1}$) | Nitrato (g $L^{-1}$) | Amônia (mol $L^{-1}$) | Uréia (mol $L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 50 | 9,6 | 15,85 | 1,10 | - | - |
| 1 | 201 | 10,0 | - | - | - | - |
| 2 | 506 | 10,3 | 13,76 | 1,08 | $9{,}1102 \times 10^{-5}$ | $1{,}0077 \times 10^{-4}$ |
| 3 | 666 | 10,4 | - | - | - | - |
| 4 | 884 | 10,6 | 12,23 | 0,75 | $4{,}8006 \times 10^{-7}$ | $1{,}8863 \times 10^{-6}$ |
| 5 | 1026 | 10,8 | - | - | - | - |
| 6 | 1101 | 10,9 | 11,01 | 0,69 | $3{,}1279 \times 10^{-4}$ | $7{,}8565 \times 10^{-4}$ |
| 7 | 1731 | 11,1 | - | - | - | - |
| 8 | 2141 | 11,2 | 9,17 | 0,63 | $4{,}6925 \times 10^{-5}$ | $2{,}0909 \times 10^{-5}$ |
| 9 | 2281 | 11,2 | - | - | - | - |
| 10 | 2491 | 11,2 | 8,56 | 0,45 | $6{,}3932 \times 10^{-7}$ | $1{,}1054 \times 10^{-6}$ |
| 11 | 3131 | 11,4 | - | - | - | - |
| 12 | 3809 | 11,4 | 7,64 | 0,34 | $3{,}9162 \times 10^{-5}$ | $3{,}1948 \times 10^{-5}$ |
| 13 | 4580 | 11,3 | - | - | - | - |
| 14 | 5243 | 11,2 | 5,81 | 0,22 | $7{,}7002 \times 10^{-7}$ | $1{,}0867 \times 10^{-5}$ |
| 15 | 5832 | 11,1 | - | - | - | - |
| 16 | 6087 | 11,1 | 4,59 | 0,19 | $1{,}7988 \times 10^{-5}$ | $3{,}2341 \times 10^{-5}$ |
| 17 | 6174 | 11,0 | - | - | - | - |
| 18 | 6156 | 11,0 | - | - | - | - |
| 19 | 6024 | 10,9 | - | - | - | - |

-: Amostras não analisada.

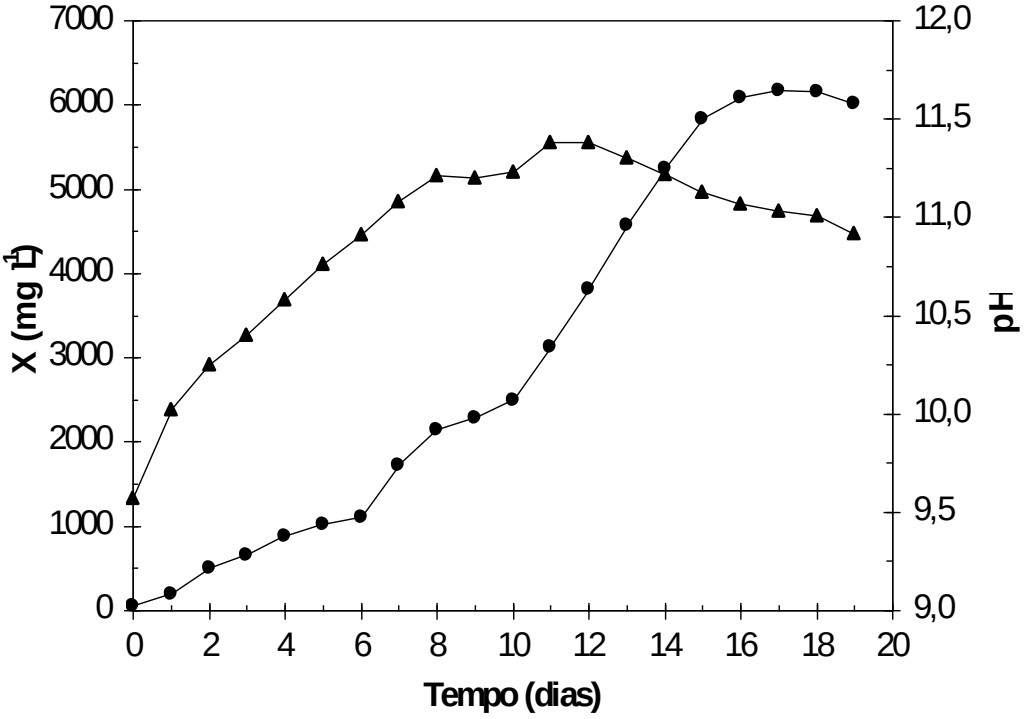


**Figura 60**. Concentração de celular (X –◆–) e pH (–▲–) em função do tempo para ensaio 17 ($KNO_3$, 17,3 mM; Uréia, 8,90 mM).

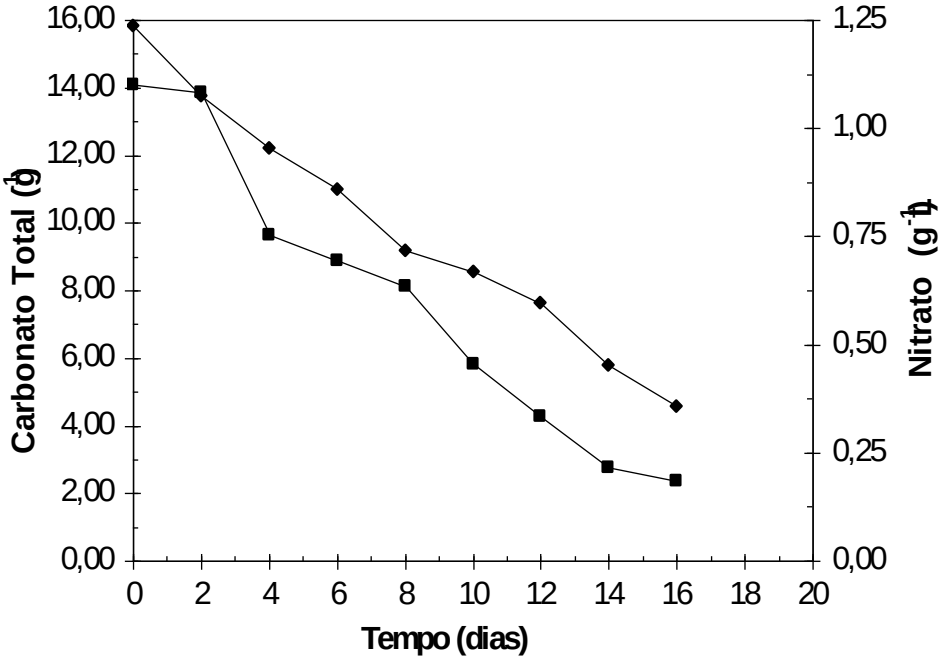


**Figura 61**. Concentração de carbonato total (–◆–) e nitrato (–■–) em função do tempo para experimento 17 ($KNO_3$, 17,3 mM; Uréia, 8,9 mM).

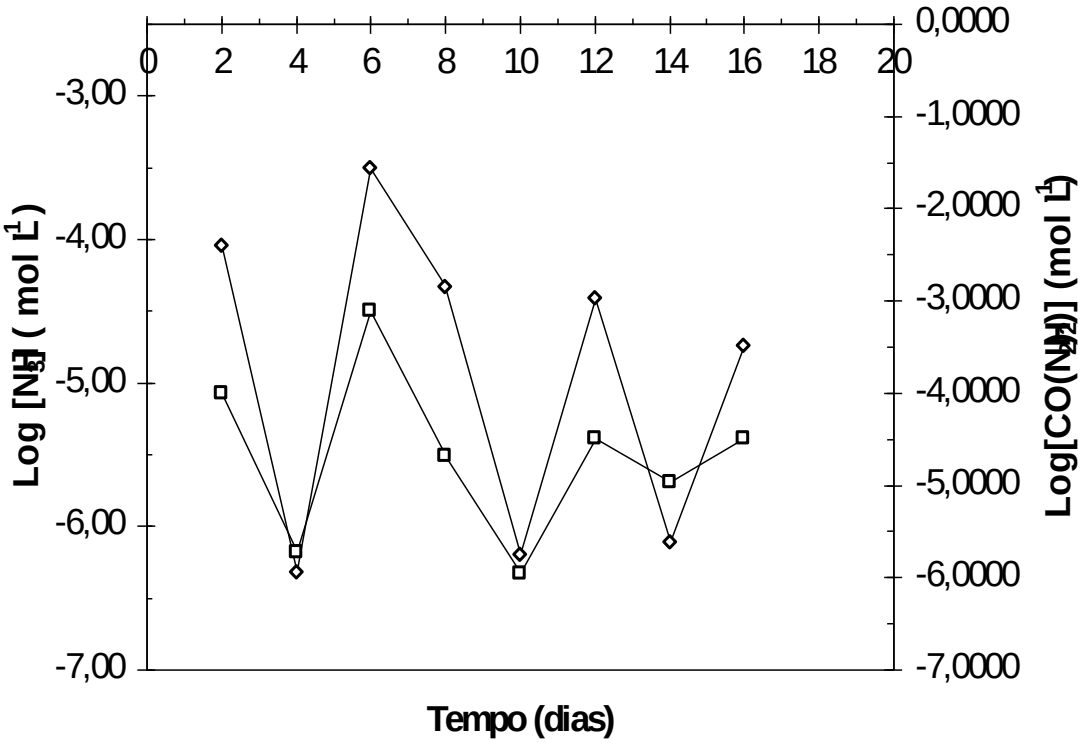


**Figura 62**. Log da concentração de amônia (–□–) e Uréia (–◇–) em função do tempo para ensaio 17 ($KNO_3$, 17,3 mM; Uréia, 8,90 mM).

5.5.1 Discussão

Nos experimentos de 1 a 17, partiu-se de uma concentração inicial de células de 50 mg $L^{-1}$, e entre 17 a 19 dias de cultivo atingiram-se concentrações celulares que variaram de 4431 a 6179 mg $L^{-1}$ (Tabelas 8 a 24).

A utilização do processo descontínuo alimentado para o cultivo de *Spirulina platensis* permitiu a obtenção de resultados bastante satisfatórios com o uso de uréia como fonte de nitrogênio (RANGEL, 2000; DANESI, 2001; SANCHEZ-LUNA et al., 2003), reduzindo os níveis da concentração de amônia no decorrer do cultivo, e adequando-os aos níveis indicados como ótimos para o crescimento celular (BOUSSIBA, 1989). Também tem favorecido o uso de águas de lagoas para cultivo de *S. platensis*, com complementação de uréia no decorrer do cultivo (COSTA et al., 2004).

O $KNO_3$ adicionado em batelada no início do cultivo permitiu uma reserva na forma de nitrato, que reduzido, através da ação das enzimas nitrato e nitrito redutases, quando necessário, impediu qualquer tipo de carência dessa fonte para as células. De fato, a associação da uréia com o $KNO_3$ pode ter sido responsável pelos resultados ainda melhores do que os obtidos anteriormente com o emprego de uréia como única fonte de nitrogênio (RANGEL, 2000; DANESI, 2001; SANCHEZ-LUNA et al., 2003; SOLETTO et al., 2005; resultados preliminares deste trabalho), com o $KNO_3$ suprindo a deficiência de nitrogênio no início do cultivo, onde são empregadas menores velocidades de adição de uréia. Assim, as células foram ao mesmo tempo beneficiadas pelo uso de uma fonte de nitrogênio mais prontamente utilizável (uréia) e uma fonte reserva ($KNO_3$), não sofrendo carência de nitrogênio no decorrer do cultivo.

Em processo descontínuo alimentado, o nutriente pode ser adicionado de forma contínua ou intermitente (CARVALHO & SATO, 2001). Em trabalho prévio, Sanches-Luna et al. (2004) obtiveram resultados similares entre as formas de alimentação contínua e intermitente a cada 24 horas. Por isso, neste trabalho optou-se por utilizar a forma de adição a cada 24 horas, facilitando as operações de trabalho e dispensando uma bomba peristáltica para alimentação.

Nos cultivos da *S. platensis* com uréia associada ao nitrato de potássio, não foram observadas fases lag de crescimento celular, devido à semelhança nas condições de cultivo, tais como composição química do meio de cultura e

temperatura de crescimento entre a preparação do inóculo e o cultivo, além do fato que, a uréia também proporciona a presença de amônia no meio de cultivo, seja devido à ação de urease (CARVAJAL et al., 1980; SHIMAMATZU, 2004), ou devido à hidrólise da uréia em pH alcalino (DANESI et al., 2002).

Quando amônia e nitrato estão presentes juntos no meio de cultivo, a amônia é preferencialmente assimilada (BOUSSIBA, 1989). Contudo, a amônia (proveniente da hidrólise da uréia) pode ser tóxica à *Spirulina platensis*, quando presente em altas concentrações (ABELIOVICH & AZOV, 1976) e, por isso, faz-se necessário o emprego de um processo de adição continuada ao longo do período de crescimento deste microrganismo.

Embora, os meios de cultivo tradicionais para *Spirulina platensis* utilizem sais de nitrato, como fonte de nitrogênio, a utilização de uréia acarreta ganho do ponto de visa energético. Em meio alcalino, a uréia sofre hidrólise gerando amônia, que é facilmente aproveitada pelas células. No caso do nitrato, o microrganismo precisa reduzí-lo a nitrito e posteriormente a amônia, processos que envolvem gastos energéticos (HATORI & MYERS, 1966).

Além disso, o nitrogênio proveniente da uréia é muito mais barato que os nitratos tradicionalmente utilizados nos meios de cultivo de *Spirulina* (ZARROUK, 1966; PAOLETTI et al., 1975; SCHLÖSSER, 1982). Segundo Piorreck et al. (1984), o meio de cultura é o fator, que mais encarece o cultivo de microalgas, justificando assim a utilização da uréia como forma de redução de custos. Embora neste trabalho seja empregado também o nitrato de potássio, sua quantidade pôde ser reduzida em relação ao utilizado no meio de Paoletti et al. (1975) (25,4 mM (2,47g $L^{-1}$ ) ).

A associação das duas fontes (uréia e nitrato de potássio) foi benéfica para o cultivo, havendo um aumento da concentração celular máxima e da produtividade em células, quando comparado com o uso apenas de uma das fontes (DANESI et al., 2002; RANGEL-YAGUI et al., 2004; experimentos preliminares deste trabalho; experimentos P3 e P4, apresentados no item 5.4). Isso pode ser explicado pelo fato que nos instantes iniciais (primeiros 7 dias de cultivo), os cultivos com uréia associada ao $KNO_3$ apresentaram maior velocidade de crescimento.

Para todos os cultivos, observa-se um aumento do pH acompanhando o crescimento celular, seguido de um patamar. A explicação do aumento do pH, com o decorrer do cultivo basicamente está associado ao consumo da fonte de carbono e ao uso do nitrato. Os íons bicarbonato são transportados ativamente, para o interior celular, convertidos à carbonato e gás carbônico, que é utilizado na fotossíntese. Para cada molécula de $CO_2$ utilizada pela célula ocorre a liberação de um íon carbonato (RUSSEL, 1982). Deste modo, além do pH, a quantidade de íons bicarbonato consumido, também tende a aumentar ao longo do crescimento. Como assinala Goldman et al., 1982, outro nutriente que pode levar a um aumento do pH quando do seu consumo é o nitrato, com liberação de hidroxila no meio de cultivo.

O pH, além de determinar a forma ideal de aproveitamento da fonte de carbono pela microalga, determina também o equilíbrio da fonte de nitrogênio amoniacal, que pode se apresentar na forma de amônia livre ou protonada (amônio) (DANESI, 2001). Em pH ótimo, meio alcalino, a entrada de amônia na célula é primeiramente um processo de difusão direcionado pelo gradiente de pH e pela assimilação de amônia intracelular (BOUSSIBA, 1989). Outro fator a ser considerado é que, quanto mais alcalino se torna o meio de cultivo, maior é a concentração de amônia em relação ao amônio, e, por conseguinte, maior é a perda de amônia por volatilização. No caso de cultivo com uréia, como fonte de nitrogênio, o aumento do pH pode levar a um aumento da velocidade de hidrólise desta, com maior formação de amônia no meio de cultivo.

Durante o cultivo, a concentração de amônia total foi medida ao longo dos cultivos, para verificar a ocorrência de níveis considerados tóxicos para o microrganismo. Os dados foram satisfatórios porque, como se pode observar nas tabelas de acompanhamento dos cultivos (Tabelas 8 a 24), em nenhum momento a concentração de amônia total atingiu valores tóxicos, ficando em quase todos os casos com valores da ordem $10^{-5}$ mol $L^{-1}$, ou até mesmo menores, bastante abaixo dos 10 mM, considerados inibitórios por Belkin & Boussiba (1991).

Em todos os experimentos, tanto o nitrato quanto a uréia foram consumidos quase que totalmente, o que demonstra que o fornecimento de nitrogênio não foi excessivo, sendo o bastante para suportar a demanda para o crescimento da *S. platensis*. Isso seria uma vantagem em relação a meios onde se usa somente $KNO_3$ como única fonte de nitrogênio. Neste caso, para que o cultivo se desenvolva adequadamente, ocorre à necessidade da adição das concentrações de nitrogênio

sugeridas pelos meios padrões (FAINTUCH, 1989), com conseqüente sobra de grandes quantidades de nitrato ao final do cultivo (RANGEL-YAGUI et al., 2004).

A maior concentração celular obtida foi 6179 mg $L^{-1}$, quando a concentração total de uréia foi de 7,5 mM e a concentração de $KNO_3$ de 15 mM.

Nos experimentos, como comentado anteriormente, as maiores concentrações celulares foram alcançadas entre o 17º e 19º dia de cultivo, indicando que o tempo de alimentação adotado foi adequado, suprindo a uréia durante todo o crescimento da *S. platensis*.

Mesmo o experimento, que utilizou a mais baixa concentração de $KNO_3$ (experimento 6) apresentou concentração celular elevada, em relação a cultivos utilizando somente uréia como fonte de nitrogênio (RANGEL, 2000; DANESI, 2001; SANCHEZ-LUNA et al., 2003; resultados preliminares deste trabalho), indicando que apenas uma pequena complementação de $KNO_3$ seria suficiente para que cultivos com uréia com fonte de nitrogênio levassem a altas concentrações celulares.

O conteúdo de clorofila na biomassa foi maior nos experimentos correspondentes aos pontos centrais do planejamento experimental, e nos experimentos correspondentes ao ponto de ótimo (Tabela 25). No entanto, no experimento 7, onde se empregou a maior quantidade de uréia, nota-se que o valor do teor de clorofila, também foi elevado, indicando que também esta fonte de nitrogênio pode favorecer a formação de clorofila. De fato, comparando os resultados dos experimentos 1 e 3, bem como 2 e 4, correspondentes a adições de $KNO_3$ de 8 mM e 22 mM, respectivamente, nota-se que o aumento do fornecimento de uréia levou a um aumento do teor de clorofila na biomassa. O mesmo efeito ocorre com o aumento do fornecimento de $KNO_3$, observado pela comparação dos teores de clorofila dos experimentos 1 e 2 , bem como dos experimentos 3 e 4.

O valor do teor de clorofila encontrado em todos os experimentos (Tabela 25) foi muito maior do que os das fontes vegetais como o espinafre (0,6 mg g-1) (GROSS, 1991).

O conteúdo de proteínas parece não ter sido afetado pelas condições experimentais (Tabela 25). Segundo Danesi et al. (2002), a utilização de uréia como única fonte de nitrogênio não causa mudanças no conteúdo de proteínas, em relação aos cultivos realizados somente com $KNO_3$ como fonte de nitrogênio. E neste caso, onde se empregou simultaneamente as duas fontes de nitrogênio, pôde-se verificar que as condições experimentais também não exerceram influência sobre

este parâmetro. Estes resultados são da mesma ordem de grandeza do que, aqueles obtidos por Matsudo et. al. (2007), que cultivaram *S. platensis* por processo descontínuo alimentado repetitivo utilizando uréia como fonte de nitrogênio.

**Tabela 25** – Teor proteínas, lipídios e clorofila nas biomassas secas de *Spirulina platensis*.

| Experimento | Proteínas (%) | Lipídios (%) | Cl-a (mg $g^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| 1 | 57,1 | 20,5 | 12,4 |
| 2 | 65,6 | 12,4 | 15,3 |
| 3 | 48,5 | 14,9 | 14,1 |
| 4 | 68,5 | 14,1 | 16,6 |
| 5 | 59,9 | 8,6 | 14 |
| 6 | 68,5 | 13,7 | 13,6 |
| 7 | 65,6 | 17,62 | 24 |
| 8 | 62,8 | 18,9 | 19 |
| 9 | 48,5 | 20,6 | 20,5 |
| 10 | 54,2 | 23,7 | 21,1 |
| 11 | 45,7 | 23,9 | 22,6 |
| 12 | 48,5 | 26,9 | 19,2 |
| 13 | 42,8 | 21,2 | 20,2 |
| 14 | 51,4 | 22 | 22,9 |
| 15 | 45,7 | 24,9 | 25,1 |
| 16 | 48,5 | 27,7 | 23,9 |
| 17 | 42,8 | 24,2 | 23,1 |

Syrett (1962) descreve que o nitrogênio assimilado pelo microrganismo é utilizado primeiro para o crescimento celular e, posteriormente, para formação de nitrogênio orgânico como material de reserva. De fato, Sassano (2004) observaram que os teores de proteínas, nas biomassas decaíram significativamente, a valores que chegaram a 16,5%, em cultivos realizados sob limitação de nitrogênio. Neste trabalho, os teores de proteínas compreenderam a faixa relatada, para os teores de proteínas, para biomassas de *Spirulina platensis* (VONSHAK, 1997b). Isso indica que em todos os ensaios, houve disponibilidade de nitrogênio suficiente tanto para o crescimento celular, quanto para a produção de nitrogênio orgânico, na forma de proteínas, como material de reserva da célula.

Da mesma forma, que Danesi et. al. (2002), não se pôde evidenciar uma influência das condições experimentais no conteúdo de lipídios das biomassas obtidas nos cultivos realizados sob diferentes condições experimentais (Tabela 25).

Isto pode ter sido decorrente da característica desta microalga em variar mais a composição de proteínas do que de lipídios em decorrência de variações experimentais, das condições de fornecimento de nitrogênio (SASSANO, 2004), indicando que, provavelmente, as alterações de metabolismo com vistas a armazenar energia e/ou nitrogênio seriam mais flexíveis na produção de moléculas protéicas do que lipídicas.

### 5.5.2 Análise de custo da fonte de nitrogênio

A utilização da uréia como fonte de nitrogênio reduz o custo da produção da *Spirulina platensis*, o que torna a produção da biomassa economicamente mais viável do que utilizar nitratos como fontes de nitrogênio.

Neste trabalho onde se utilizou simultaneamente uréia e nitrato de potássio como fontes de nitrogênio, também houve uma redução dos custos.

Em um cultivo tradicional onde se utiliza o meio de Paoletti (PAOLETTI et al., 1975) para produzir *Spirulina* o custo da fonte da fonte de nitrogênio (nitrato de potássio, $X_m$ aproximadamente 4200 mg $L^{-1}$) (FARIA et al, 2007) é de R$ 0,13/g de biomassa, ao passo que quando se utiliza a uréia e $KNO_3$ ($KNO_3$, 17 mM (1,74 g $L^{-1}$); Uréia, 8,90 mM (0,53 g $L^{-1}$), $X_m$ = 6077 mg $L^{-1}$) o custo será de R$ 0,05/g de biomassa.

## 5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros $X_m$ (concentração celular máxima), $P_x$ (produtividade em células) e $Y_{X/N}$ (fator de conversão de nitrogênio em células) dos experimentos realizados (Tabela 26) foram avaliados por análise de regressão multivariável (aplicada aos resultados dos experimentos 1 a 14, Tabela 26), com o objetivo de facilitar a compreensão da influência das variáveis independentes em estudo (tempo de alimentação e intensidade luminosa), nas respostas de interesse (variáveis dependentes).

A equação geral

$$y_i = a_i + \sum_j b_{ij}x_j + \sum_j c_{ij}x_j^2 + \sum_j d_{ijj'}x_j x_{j'} \qquad \text{( Equação 4)}$$

é proposta para estimar a resposta das variáveis selecionadas (yi), especificamente $y_1 = X_m$, $y_2 = P_x$ e $y_3 = Y_{X/N}$ como conseqüência da variação das variáveis codificadas $X_1$ (quantidade inicial de $KNO_3$) e $X_2$ (concentração total de uréia por unidade de volume de meio de cultura). Nesta equação i e j representam

as variáveis dependentes e independentes respectivamente j´ indica suas interações e $a_i$ é o intercepto, $b_{ij}$ são os coeficientes lineares, $c_{ij}$ são os coeficientes quadráticos e $d_{ijj'}$ são os coeficientes de interação

Nas análises de regressão para os testes de coeficientes analisados foi considerado $p<0,1$, enquanto que $p<0,2$ também foi considerado quando a inclusão do correspondente fator levou a um maior valor do coeficiente de determinação ($R^2$), ou uma diminuição no valor do nível descritivo (p) na análise de variância da regressão

As regressões foram aceitas somente quando as análises de variância das respectivas regressões apresentaram um valor de nível descritivo (p) inferior a 0,05.

**Tabela 26** – Concentração celular máxima ($X_m$), produtividade em células ($P_X$) e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) obtidos nos experimentos realizados.

| Experimentos | $X_m$ (mg $L^{-1}$) | $P_X$ (mg $L^{-1}d^{-1}$) | $Y_{X/N}$ (mg $mg^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| 1 | 5257 | 289,3 | 18,58 |
| 2 | 5520 | 287,9 | 13,02 |
| 3 | 5921 | 326,2 | 14,00 |
| 4 | 5848 | 322,1 | 9,41 |
| 5 | 4431 | 243,4 | 15,57 |
| 6 | 5569 | 306,6 | 19,61 |
| 7 | 5754 | 316,9 | 10,21 |
| 8 | 5904 | 325,2 | 10,46 |
| 9 | 6127 | 357,5 | 14,47 |
| 10 | 6024 | 351,4 | 14,22 |
| 11 | 6144 | 338,5 | 14,74 |
| 12 | 6179 | 360,5 | 14,59 |
| 13 | 6075 | 334,7 | 14,34 |
| 14 | 6024 | 351,4 | 14,22 |

**Concentração celular máxima ($X_m$)**

Na Figura 63 são apresentados os valores de Xm obtidos nas condições experimentais estudadas.

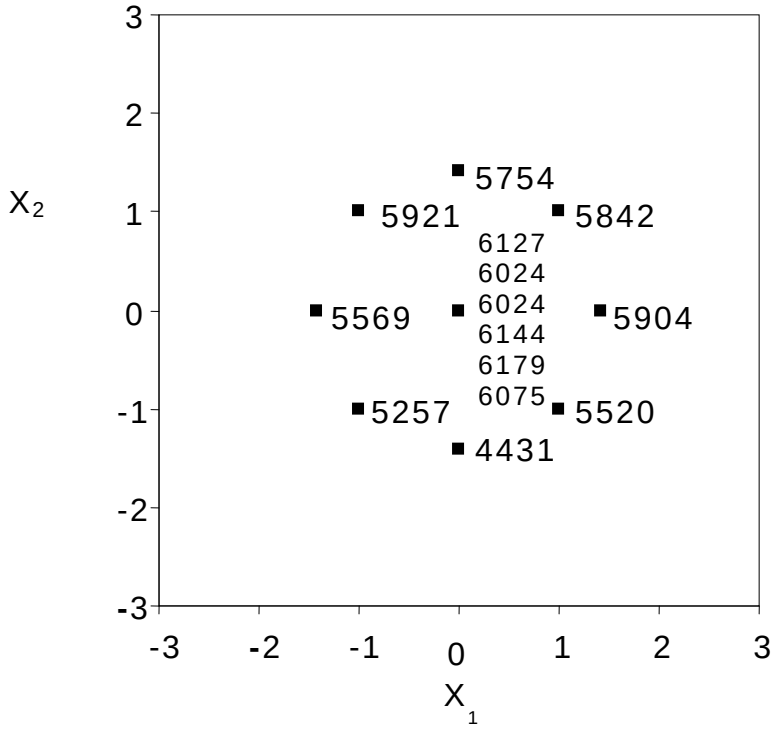


**Figura 63**. Concentração celular máxima obtida nas diferentes condições experimentais avaliadas ($X_1$ = Valor codificado da quantidade inicial de $KNO_3$ por unidade de volume de meio de cultivo; $X_2$ = Valor codificado da quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume de meio de cultivo).

Nas Tabelas 27 e 28 estão apresentados os resultados de análise de regressão quadrática multivariável para concentração celular máxima ($X_m$) em função das variáveis independentes codificadas: quantidade inicial de $KNO_3$ por unidade de volume de meio de cultivo ($X_1$) e quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume de meio de cultivo ($X_2$), bem como os resultados da análise de variância dessa regressão respectivamente.

**Tabela 27** – Análise da regressão multivariável para a concentração celular máxima ($X_m$).

| Fator | Coeficiente de regressão | Erro padrão | Valor t | *p* |
|---|---|---|---|---|
| Constante | 6095,48 | 68,67 | 88,77 | 0,0000 |
| $X_1$ | 83,00 | 59,47 | 1,40 | 0,1964 |
| $X_2$ | 357,89 | 59,47 | 6,02 | 0,0002 |
| $X_1^2$ | -123,97 | 61,91 | -2,00 | 0,0762 |
| $X_2^2$ | -446,07 | 61,91 | -7,21 | 0,0001 |

$R^2$ ajustado = 0,871

$X_1$ = Valor codificado da quantidade inicial de $KNO_3$ por unidade de volume de meio de cultivo.

$X_2$ = Valor codificado da quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume de meio de cultivo.

**Tabela 28** – Análise de variância do modelo de regressão para a concentração celular máxima ($X_m$).

| Fator de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | F-Calculado | *p* |
|---|---|---|---|---|---|
| Modelo | 2608147 | 4 | 652037 | 23,0489 | 0,0001 |
| Erro | 254604 | 9 | 28289 | | |
| Total | 2862750 | 13 | | | |

$R^2$ ajustado = 0,871

$X_1$ = Valor codificado da quantidade inicial de $KNO_3$ por unidade de volume de meio de cultivo.

$X_2$ = Valor codificado da quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume de meio de cultivo.

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

$$X_m = 6095,48 + 83,00. X_1 + 357,89. X_2 – 123,97. X_1^2 – 446,07. X_2^2 \quad \text{(Equação 5)}$$

ou

$$X_m = 2533,41 + 88,86. K + 648,41. mT – 2,53.K^2 – 36,41. mT^2 \quad \text{(Equação 6)}$$

Sendo K = a quantidade inicial de $KNO_3$ e mT a quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume de meio de cultivo.

A equação 5 está descrita em função das variáveis codificadas e a equação 6 está descrita em função das variáveis originais.

A partir da análise de regressão quadrática múltipla, observaram-se os níveis de significância referentes aos coeficientes associados aos fatores avaliados e o coeficiente de determinação do modelo. Para um bom ajuste do modelo, houve a necessidade de eliminação da interação entre as variáveis $X_1$ e $X_2$. Esses dados demonstram que, a quantidade inicial de $KNO_3$ teve menor influência que, a quantidade total de uréia nos cultivos (Tabela 27).

A análise estatística mostrou que a concentração celular máxima é uma função quadrática da quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume de meio de cultivo e da quantidade inicial de $KNO_3$ (Tabela 27).

O coeficiente negativo de $X_1^2$ e $X_2^2$ demonstra um ponto de ótimo na região do planejamento experimental, como pode ser observado no gráfico de superfície de resposta (Figura 64).

O valor de *p* da análise de variância do modelo foi inferior a 0,05 (Tabela 28), comprovando ser o ajuste do modelo adequado aos dados experimentais.

Com base nesses resultados, pela derivação da equação (5), foi possível a obtenção dos valores codificados da quantidade total de uréia e de $KNO_3$ adicionadas por unidade de volume de reator que maximizassem $X_m$: $X_1$ e $X_2$ equivalentes a 0,34 e 0,40, respectivamente. Esses valores correspondem aos valores reais de 17,3 e 8,9 mM de $KNO_3$ e uréia, respectivamente.

Dessa forma, foram realizados experimentos nas condições experimentais correspondentes ao ponto de ótimo estimado, por essa equação (quantidade inicial de $KNO_3$ por unidade de volume de reator e quantidade total de uréia adicionada por

unidade de volume líquido de reator igual a 17,3 e 8,9 mM, respectivamente), cujos resultados são apresentados nas Tabelas 22 a 24.

Como, pode ser observado nos experimentos de 15, 16 e 17 (Tabelas 22 a 24), o valor médio da concentração celular máxima referente aos 3 experimentos (Xm = 6077 mg $L^{-1}$) não difere significativamente do valor estimado a partir da equação (5) (6181 mg $L^{-1}$), confirmando a utilidade da regressão multivariável na otimização das condições experimentais para maximização de $X_m$.

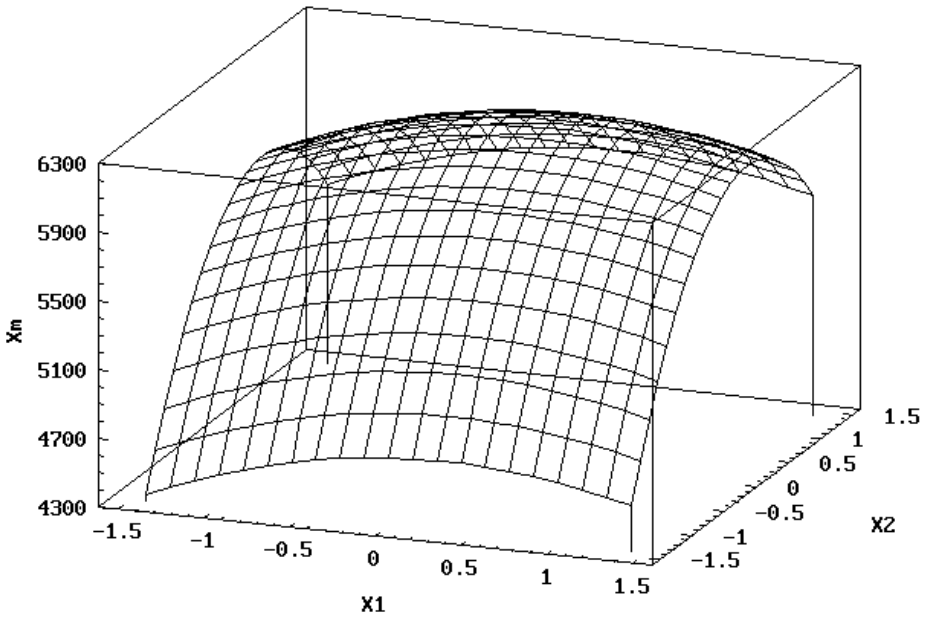


**Figura 64**. Superfície de resposta para a concentração celular máxima ($X_m$; mg $L^{-1}$) em função de $X_1$ (Valor codificado da quantidade inicial de $KNO_3$ por unidade de volume de meio de cultivo) e $X_2$ (Valor codificado da quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume de meio de cultivo).

**Produtividade em células ($P_x$)**

Nas Tabelas 29 e 30 estão apresentados os resultados de análise de regressão quadrática multivariável para produtividade em células ($P_x$), em função das variáveis independentes codificadas: quantidade inicial de $KNO_3$ por unidade de volume de meio de cultivo ($X_1$) e quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume de meio de cultivo ($X_2$), bem como os resultados da análise de variância dessa regressão respectivamente.

**Tabela 29** – Análise da regressão multivariável para produtividade em células ($P_x$).

| Fator | Coeficiente de regressão | Erro padrão | Valor t | *p* |
|---|---|---|---|---|
| Constante | 349,01 | 4,055 | 86,075 | 0,0000 |
| $X_2$ | 21,88 | 3,512 | 6,231 | 0,0001 |
| $X_1^2$ | -14,47 | 3,656 | -3,958 | 0,0027 |
| $X_2^2$ | -32,35 | 3,656 | -8,849 | 0,0000 |

$R^2$ ajustado = 0,905

$X_1$ = Valor codificado da quantidade inicial de $KNO_3$ por unidade de volume de meio de cultivo.

$X_2$ = Valor codificado da quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume **de meio de cultivo**.

**Tabela 30** – Análise de variância do modelo de regressão para a produtividade em células (Px).

| Fator de variação | Soma dos quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | F-Calculado | *p* |
|---|---|---|---|---|---|
| Modelo | 12621,8 | 3 | 4207,26 | 42,65 | 0,0000 |
| Erro | 986,5 | 10 | 98,65 | | |
| Total | 13608,2 | | | | |

$R^2$ ajustado = 0,905

A equação obtida na análise de regressão para a produtividade em células ($P_x$) foi

$$P_x = 349,01 + 21,88.\ X_2 - 14,47.\ X_1^2 - 32,35.\ X_2^2 \qquad \text{(Equação 7)}$$

$$P_x = -651,78 + 57,87.\ K + 144,89.mT - 1,93.K^2 - 9,24.\ mT^2 \qquad \text{(Equação 8)}$$

Sendo K = a quantidade inicial de $KNO_3$ e mT a quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume de meio de cultivo.

A equação 7 está descrita em função das variáveis codificadas e a equação 8 está descrita em função das variáveis originais.

A partir da análise de regressão quadrática múltipla, observaram-se os níveis de significância referentes aos coeficientes associados aos fatores avaliados e o coeficiente de determinação do modelo. Para um melhor ajuste do modelo foi eliminada a interação entre as variáveis $X_1$ e $X_2$, e o fator $X_1$.

Esses dados demonstram que, assim como no caso da concentração celular máxima, a quantidade inicial de $KNO_3$ influenciou menos nos cultivos.

A análise estatística mostrou que a produtividade em células é uma função quadrática da quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume de reator e da quantidade de $KNO_3$ (Tabela 29).

Os coeficientes negativos de $X_2^2$ e de $X_1^2$ indicam que o valor máximo da produtividade em célula está, em relação à quantidade total de uréia adicionada e de $KNO_3$, dentro da faixa do planejamento experimental executado (Figura 65).

O valor de *p* da análise de variância do modelo foi inferior a 0,05 (Tabela 30), comprovando ser o ajuste do modelo adequado aos dados experimentais.

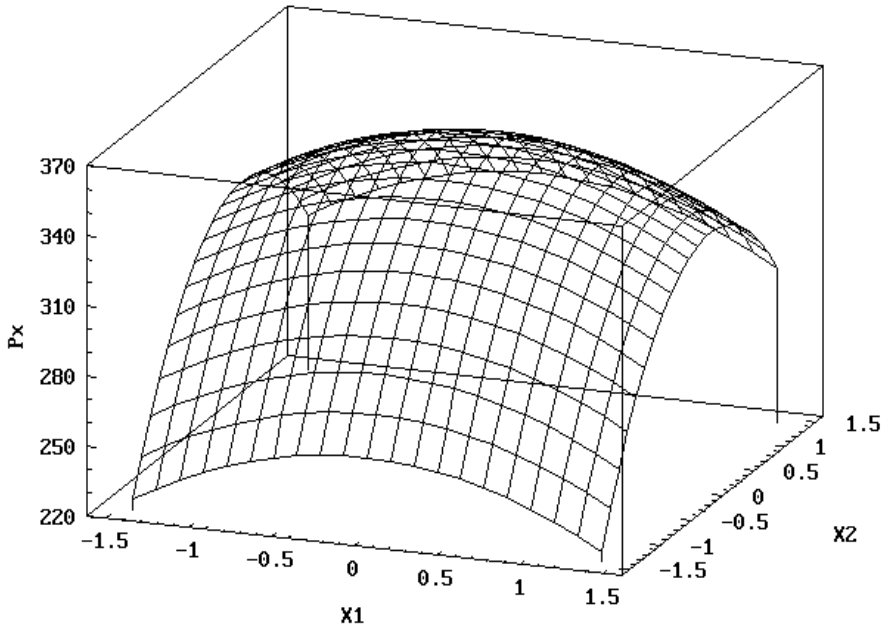


**Figura 65**. Superfície de resposta para a produtividade em células ($P_x$; mg $L^{-1}$ $dia^{-1}$) em função de $X_1$ (Valor codificado da quantidade inicial de $KNO_3$ por unidade de volume) e $X_2$ (Valor codificado da quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume de meio de cultivo).

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

Nas Tabelas 31 e 32 estão apresentados os resultados de análise de regressão quadrática multivariável, para o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função das variáveis independentes codificadas: quantidade inicial de $KNO_3$ por unidade de volume de meio de cultivo e quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume de meio de cultivo bem como os resultados da análise de variância dessa regressão respectivamente.

**Tabela 31** – Análise da regressão multivariável para o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$)

| Fator | Coeficiente de regressão | Erro padrão | Valor t | *p* |
|---|---|---|---|---|
| Constante | 14,557 | 0,152 | 95,821 | 0,0000 |
| $X_1$ | -2,886 | 0,158 | -18,254 | 0,0000 |
| $X_2$ | -1,971 | 0,158 | -12,467 | 0,0000 |
| $X_2^2$ | -0,824 | 0,164 | -5,022 | 0,0005 |

$R^2$ ajustado = 0,975

$X_1$ = Valor codificado da quantidade inicial de $KNO_3$ por unidade de volume de meio de cultivo.

$X_2$ = Valor codificado da quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume de meio de cultivo.

**Tabela 32** – Análise de variância do modelo de regressão para o fator de conversão de nitrogênio em célula ($Y_{X/N}$).

| Fator de variação | Soma dos Quadrados | Graus de liberdade | Quadrado médio | F- Calculado | *p* |
|---|---|---|---|---|---|
| Modelo | 102,774 | 3 | 34,258 | 171,279 | 0,0000 |
| Erro | 2,000 | 10 | 0,200 | | |
| Total | 104,775 | 13 | | | |

**$R^2$ ajustado = 0,975**

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

$$Y_{X/N} = 14,557 – 2,886. X_1 – 1,971. X_2 – 0,824 X_2^2 \quad \text{(Equação 9)}$$

$$Y_{X/N} = 18,36 -0,38. K +1,09.mT – 0,11. mT^2 \quad \text{(Equação 10)}$$

Sendo K = a quantidade inicial de $KNO^3$ e mT a quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume de meio de cultivo.

A equação 9 está descrita em função das variáveis codificadas, e a equação 10 está descrita em função das variáveis originais.

Como esperado não se obteve uma relação quadrática para $X_1$ (equação 9), porque os maiores valores de concentração de $KNO_3$ avaliados não são considerados inibitórios, uma vez que estão abaixo da concentração indicada por Paoletti et al. (1975), que corresponde a 25.4 mM.

Como se pode inferir a partir da observação da Figura 66, o fator de conversão de nitrogênio em células foi maior, quando do emprego de menores concentrações iniciais de $KNO_3$ enquanto que para a uréia, um pequeno aumento inicial na quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume de meio de cultivo levou a um aumento de $Y_{X/N}$, resultante do efeito benéfico desta fonte de nitrogênio no crescimento da *S. platensis*, quando quantidades adequadas desta são adicionadas no cultivo. Porém, um superior aumento da quantidade adicionada leva a um decréscimo deste fator de conversão. De fato, o aumento da quantidade adicionada da fonte de nitrogênio leva a uma sobra maior de nitrogênio no caso do $KNO_3$ e, no caso da uréia, a uma perda relativamente maior, na forma de amônia (SÁNCHEZ-LUNA et al., 2004).

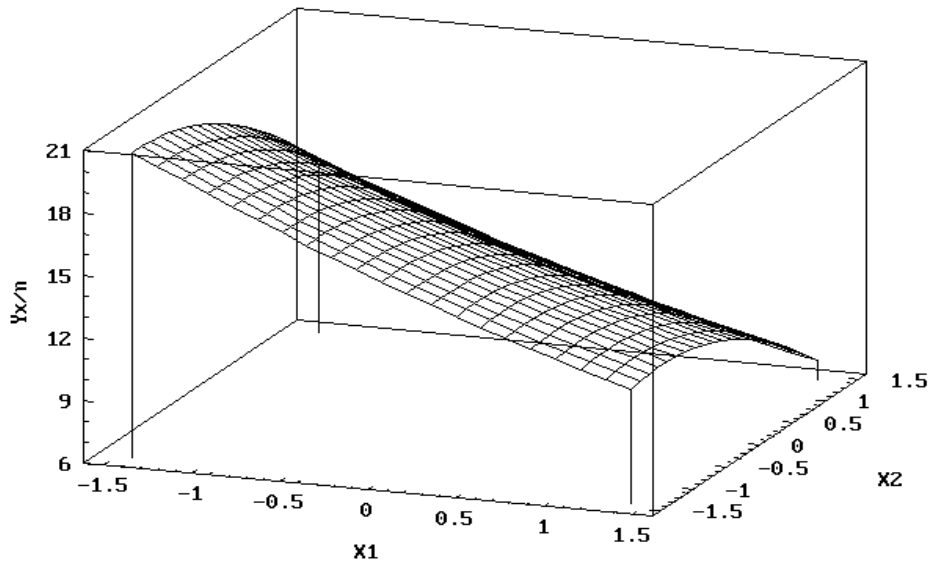


**Figura 66**. Superfície de resposta para o fator de conversão de nitrogênio em célula ($Y_{X/N}$; mg $mg^{-1}$) em função de $X_1$ (Valor codificado da quantidade inicial de $KNO_3$ por unidade de volume de meio de cultivo) e $X_2$ (Valor codificado da quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume de meio de cultivo).

# 6. CONCLUSÕES

- A associação de nitrato de potássio e uréia, com alimentação desta no decorrer do cultivo, levou a elevados valores de concentração celular máxima em minitanques maiores que aqueles onde se utilizou apenas uréia como fonte de nitrogênio.

- O processo foi otimizado satisfatoriamente com a metodologia de superfície de resposta. A condição ótima obtida pela análise de regressão multivariável para concentração celular máxima (Xm) foi 17,3 mM de $KNO_3$ e 8,90 mM de uréia. Nessas condições foram obtidos Xm = 6077 ±199 mg/L.

- A influência da variável quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume teve maior influência em Xm que a quantidade inicial de $KNO_3$ nos cultivos realizados.

- Foi possível o ajuste de uma equação satisfatória para representar a variável produtividade em células em função das variáveis independentes avaliadas neste trabalho.

- O fator de conversão de nitrogênio em células foi uma função linear decrescente da quantidade inicial de $KNO_3$ adicionada e parabólica decrescente em relação à quantidade total de uréia adicionada por unidade de volume.

- As condições de cultivo não afetaram a produção de lipídios e proteínas e o aumento de fornecimento de ambas as fontes de nitrogênio pareceu favorecer o aumento do conteúdo de clorofila na biomassa.

- A aplicação do processo descontinuo alimentado utilizando simultaneamente nitrato de potássio e uréia como fonte de nitrogênio foi viável na produção de biomassa de *Spirulina plantensis*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBIOGRÁFICAS

AARONSON, S.; BERNER, T.; DUBINSKY, Z. Microalgae as a source of chemicals and natural products. In: SHELEF, G.; SOEDER, C.J.; BALABAN, M., eds. **Algae biomass**: production and use. Amsterdam: Elsevier; New York: North-Holland Biochemical Press, 1980. p.575-601. (International Symposium on the Production and Use of Micro-Algae Biomass, Acre, Israel, 1978).

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

ABDIN EL SHERIF, S.A.; CLEMENT, G. Spirulina sp. food algae: discovery of natural lakes at wadi el natrun in the Arab Republica of Egypt. **Revue de l'Instituit Francais du Petrole et Annales des Combustibles Liquides**, v.37, p.123-130, 1982.

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

ARAÚJO, K.G.L.; FACCHINETTI, A.D.; SANTOS, C.P. Influência da ingestão de biomassas de spirulina (Arthrospira sp.) sobre o peso corporal e consumo de ração em ratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.1, p.6-9, 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 14.ed. Arlington: AOAC, 1984. p.1141.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. 2.ed. Campinas: UNICAMP, 1996. 299p. (Série manuais).

BECKER, E.W.; VENKATARAMAN, L.V. Production and utilization of the blue-green alga Spirulina in India. **Biomass**, v.4, n.22, p.105-125, 1984.

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

BELAY, A.; OTA, Y.; MIYKAWA, K.; SHIMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. **Journal of Applied Phycology**, v.5, n.2, p.235-241, 1993.

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

BEZERRA, R.P. **Influência do tempo de alimentação e da intensidade luminosa no cultivo de *Spirulina platensis* sob alimentação com cloreto de amônia**. São

Paulo, 2006. 153p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

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

BOHN T.; WALCZYK S.; LEISIBACH S.; HURRELL R.F. Chlorophyll-bound magnesium in commonly consumed vegetables and fruits: relevance to magnesium nutrition. **Journal of Food Science**, v. 69, n.9, p. 347-350, 2004.

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

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

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Portaria n.222, de 24 de março de 1998**. Aprova o Regulamento Técnico referente a Alimentos para Praticantes de Atividade Física. Disponível em: http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=56. Acesso em: 13 set. 2007.

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

CARVAJAL, N., FERNÁNDEZ, M., RODRÍGUEZ, J.P., DONOSO, M. Urease of *Spirulina maxima*. **Phytochemistry**, v.21, p.2821-2823, 1980.

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

CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Fermentação descontínua alimentada. In: BORZANI, W.; SCHMIDELL NETTO, W.; ALMEIDA-LIMA, U.; AQUARONE, E., coords. **Biotecnologia industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v.2, p.205-218.

CASTENHOLZ, R.W. Subsection III, order oscilatoriales. In: WILLIAM, S.T.; SHARP, E.; HOLT, J.G.; STALEY, J.T., eds. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: William and Wilkins, 1989. v.3, p.1771.

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

CHAMORRO, G.; SALAZAR, M.; ARAUJO, K.G.; SANTOS, C.P.; CEBALHOS, G.; CASTILLO, L.F. Update on the pharmacology of Spirulina (Arthrospira), an unconventional food. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.52, n.3, p.232-240, 2002.

CHAUMONT, D. Biotechnology of algal biomass production: a review of systems for outdoor mass culture. **Journal of Applied Phycology**, v.5, p.593-604, 1993.

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

CHERNOMORSKY, S.A.; SEGELMAN, A.B. Biological activities of chlorophyll derivatives. **New Jersey Medicine**, v. 85, n. 8, p.669-673, 1988.

CHRONAKIS, I.S.; GALATANU, A.N.; NYLANDER, T.; LINDMAN, B. The behavior of protein preparations from blue-green algae (Spirulina platensis strain Pacifica) at the air/water interface. **Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.173, n.1/3, p.181-192, 2000.

CHUNTAPA, B.; POWTONGSOOK, S.; MENAAVETA, P. Water quality control using Spirulina platensis in shrimp culture tanks. **Aquaculture**, v.220, p.355-366, 2003.

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

CLÉMENT, G. Production et constituants caractéristiques des algues *Spirulina platensis* et maxima. **Annales de la Nutrition et de l'Alimentation**, v.29, p.477-488, 1975.

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

COHEN, Z.V.; NORMANN, H.A.; HEIMER, Y. Potencial use of substituted pyridazinones for selecting polynsatured fatty acid overproducing cell lines of algae. **Phytochemistry**, v.33, n.2, p.259-264, 1993.

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

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

COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M.; DUARTE, P.F. Improving Spirulina platensis biomass yield using a fed-batch process. **Bioresource Technology**, v.92, p.237-241, 2004.

CREUS, B,N. **Estudi d'un bucle di bioreactores pel desenvolupament d'um sistema de suport de vida biològic**. Barcelona, 2003. Tese de Doutorado - Escola Técnica Superior d'Enginyeria - Universitat Autônoma de Barcelona.

D´ANJOU, M.C.; DAUGULIS, A. Mixed-feed exponential feeding for fed-batch culture of recombinant methylotrophic yeast. **Biotechnology Letters**, v.22, p.341–346, 2000.

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

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

DE CAIRE, G.Z.; DE CANO, M.S.; DE MULE, M.C.Z.; DE HALPERIN, D.R.; GALVAGNO, M.A. Action of cell-free extracts and extracellular products of Nostoc muscorum on growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Phyton**, v.47, p.43–46, 1987.

DE CANO, M.S.; DE CAIRE, G.Z.; DE MULE, M.C.Z.; DE HALPERIN, D.R. Inhibition of Candida albicans and *Staphylococcus aureus* by phenolic compounds from the terrestrial cyanobacterium Nostoc muscorum. **Journal of Applied Phycology**, v.2, p.79–81, 1990.

DILLON, J.C.; PHAN, P.A. *Spirulina* as source of protein in human nutrition. **Bulletin de l'Institut Océanographique**, v.12, p.103-107, 1993.

DILLON, J.C.; PHUC, A.P.; DUBACQ, J.P. Nutritional value of the alga *Spirulina*. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v.77, p.32-46, 1995.

DURAND-CHASTEL, H. Production and use of Spriulina in Mexico. In: SHELEF, G.; SOEDER, C.J.; BALABAN, M., eds. **Algae biomass**: production and use. Amsterdam: Elsevier; New York: North-Holland Biochemical Press, 1980. p.51-64.

(International Symposium on the Production and Use of Micro-Algae Biomass, Acre, Israel, 1978).

ESTRADA, J.E.; BESCOS, P.; VILLAR DEL FRESNO, A.M. Antioxidant activity of different fractions os *Spirulina plantesis* protean extract. **Farmaco**, v.56, p.497-500, 2001.

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

FARIA, R.P.O.; RODRIGUES, M.S.; CARVALHO, J.C.M. **Avaliação de cultivos de *Spirulina platensis* com $NH_4Cl$ e $KNO_3$**. In 15º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, 2007 – Resumo.

FERRAZ, C.A.M. Produção de *Spirulina máxima*: influência de ecofatores e uso de um sub produto da indústria alcooeira. **Revista de Microbiologia**, v.17, n.1, p.70-74, 1986.

FUNTEU, F.; GUËT, C.; WU, B.; TREMOLIERES, A. Effects of environmental factors on the lipid metabolism in Spirulina platensis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.35, n.1, p.63-71, 1997.

GEITLER, L. Cyanophyceae. In: RABENHORST, L., ed. **Kryptogamen-flora Deutschland, Österreich und der Schweitz**. Leipzig: Akad Verlag, 1932. p.916.

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

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

GOMES-CORONADO, D.J.; IBANEZ, E.; RUPEREZ, F.J.; BARBAS, C. Carotenoids and tocopherol measurement in edible products of vegetale origin. **Journal of Chromatography, A**, v.1054, n.1/2, p.227-233, 2004.

GOMONT, M.A. Monographie des oscillariès. **Annales des Sciences Naturelles, Botanique et Biologie Vegetale**, v.15, p.263, 1892.

GREGERSEN, L.; JORGENSEN, S.B. Supervision of fed-batch fermentations. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v.75, p.69-76, 1999.

GROSS, J. Chlorophylls. In: REINHOLD, V.N., ed. **Pigments in vegetables**: chlorophylls and carotenoids. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. p.3-74. (AVI book).

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

HATORI, A.; MYERS, J. Reduction of nitrate and nitrite by subcellular preparations of Anabaena cylindrica. I. Reduction of nitrite to amonia. **Journal of Plant Physiology**, v.41, p.1031, 1966.

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

HERRERO, M.; IBÁÑEZ, E.; SIÑORÁNS, J.; CIFUENTES, A. Pressurized liquid extracts from *Spirulina platensis* microalga determination of their antioxidant activity and preliminary analysis by micellar eletrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography, A**, v.1047, p.195-203, 2004.

HO, C.T. Phenolic compounds in food: an overview. In: HUANG, M.-T.; HO, C.-T.; LEE, C.Y., eds. **Phenolic compounds in food and their effects on health**. Washington: American Chemical Society, 1992. v.2, p.2-7. (ACS Symposium Series, 507).

HUNG, C.C.; WONG, G.T.F.; LIU, K.K.; SHIAH, F.K.; GONG, G.C. The effects of light and nitrate levels on the relatonship between nitrate reductase activity and NO3- uptake: field observations in the East China Sea. **Limnology and Oceanography**, v.45, n.4, p.836-848, 2000.

ILTS, A. Ecologie de *Spirulina platensis* dans le milieux natronés d'Afrique Sahélienne. In: MATTERASI, F. **Prospettive dekka ciltura di Spirulina in Italia**. Firenze: Att., 1980. p.41-48.

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

KAMAT, J.P.; BOLOOR, K.K. Devasagayam TP. Chlorophyllin as an effective antioxidant against membrane damage in vitro and ex vivo**. Biochimica et Biophysica Acta, v**.1487, n.2-3, p.113-127, 2000.

KAPLAN, A.; REINHOLD, L. $CO_2$ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, p.539–570, 1999.

KATAOKA, N.; MISAKI, A. Glycolipids isolated from *Spirulina* maxima: structure and fatty acid composition. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.47, n.10, p.2349-2355, 1983.

KATES, M.; HAGEN, P.O. Influence of temperature of fatty acid composition of psychrophilic and mesophilic Serratia species. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.42, n.4, p.481-488, 1964.

KEBEDE, E. Response of *Spirulina platensis* (=*Arthrospira fusiformis*) from Lake Chitu, Ethiopia, to salinity stress from sodium salts. **Journal of Applied Phycology**, v.9, n.6, p.551-558, 1997.

KEHRER, J.P.; SMITH, C.V. Free radical in biology: sources, reactivities, and roles in the etiology of human disease. In: BALZ, Frei, ed. **Natural antioxidants in human health and disease**. San Diego, London: Academic Press, 1994. p.25-62.

KOBAYASHI, M.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N.; NAGAI, S.; KUKIMURA, Y.; TSUJI, Y. Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.48, p.351-356, 1997.

KULIK, M.M. The potential for using cyanobacteria (blue–green algae) and algae in the biological control of plant pathogenic bacteria and fungi. **European Journal of Plant Pathology**, v.101, p.585–599, 1995.

LACAZ-RUIZ, R. Espirulina e zootecnia. In: LACAZ-RUIZ, R., ed. **Espirulina**: estudos & trabalhos. São Paulo: Roca, 2003. p.1-34.

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

LEDUY, A.; THERIEN, N. An improved method for optical density measurement of the semicroscopic blue algae *Spirulina maxima*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.19, p.1219-1224, 1977.

LI, D.M.; QI, Y.Z. Spirulina industry in China: present status and future prospects. **Journal of Applied Phycology**, v.9, p.25–28, 1997.

LI, Z.Y.; GUO, S.Y.; LI, L. Bioeffects of selenite on the growth of Spirulina platensis and its biotransformation. **Bioresource Technology**, v.89, p.171-176, 2003.

MAEHLER, A.R.; COSTA, J.A.; PIRES, J.L.F.; RAMBO, L. Grain quality in two soybean cultivars in relation to the water availability and plant arrangement. **Ciência Rural**, v.33, p.213-218, 2003.

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

MATSUDO, M.C.; BEZERRA, R.P.; SATO, S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J.C.M. Repeated fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* using urea as nitrogen source. **Bioresource Technology**, 2007. [No prelo].

McKASKLE, A. Human utilization of algal biomass from *Spirulina.* Disponível em: http://ag.arizona.edu/azaqua/algaeclass/spiro2.htm. Acesso em: 26 out. 2003.

MENDES, R.L.; NOBRE, B.P.; CARDOSO, M.T.; PERREIRA, A.P.; PALAVRA, A.F. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. **Inorganica Chimica Acta**, v.356, p.328-334, 2003.

MIKI, W. Biological functions and activities of animal carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v.63, n.1, p.141-146, 1991.

MIRANDA, M.S.; CINTRA, R.G.; BARROS, S.B.; MANCINI FILHO, J. Antioxidant activity of the microalga Spirulina maxima. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, n.8, p.1075-1079, 1998.

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

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagenics in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.29, n.4, p.273-300, 1990.

OLGUÍN, E.J.; GALICIA, S.; HERNÁDEZ, 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.

OLGUÍN, E.J. The cleaner production strategy applied to animal production. In: OLGUÍN, E.J.; SÁNCHEZ, G.; HERNÁDEZ, E., eds. **Environmental biotechnology and clearner bioprocesses**. London: Taylor & Francis, 2000. p.227-241.

PANIAGUA-MICHEL, J.; DUJARDIN, E.; SIRONVAL, C. Cronica Azteca: el tecuitlatl, concentrado de algas espirulinas fuente de proteínas comestibles del pueblo de los Aztecas. **Cahiers Agricultures**, v.2, p.283-287, 1993.

PAOLETTI, C.; PUSHPARAJ, B.; TOMASELLI FEROCI, L. Ricerche sulla nutrizione minerale di *Spirulina platensis*. In: CONGRESSO NAZIONALE DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI MICROBIOLOGIA, 17, Padua, 1975. **Atti**. Padua: Italian Society of Microbiology, 1975. p.833-839.

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

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

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

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

PHAM QUOC, K.; DUBACQ, J.P. Effect of growth temperature on the biosynthesis pf eukaryotic lipid molecular species by the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1346, p.237-246, 1997.

PIERCE, W.C.; HAENISH, E.L. **Quantitative analysis**. 3.ed. New York: John Willey, 1948.

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

PIRT, S.J.; WALACH, M.R.; BAZIN, M.J. Computer control of carbon-nitrogen ratio in *Spirulina platensis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.24, p.520-528, 1987.

POWELL, R.C.; NEVELS, E.M.; McDOWELL, M.E. Algae feeding in humans. **Nutrition Journal**, v.75, p.7-12, 1961.

PRATT, E. Natural antioxidants from plant material. In: HUANG, M.T.; HO, C.T.; LEE, C.Y., eds. **Phenolic compounds in food and their effects on health**: antioxidants and cancer prevention. Washington: American Chemical Society, 1992. v.2, p.54-71. (ACS Symposium Series, 507).

PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.57, p.287–293, 2001.

PUSTIZZI, F.; MACINTYRE, H.; WARNER, M.E.; HUTCHINS, D.A. Interaction of nitrogen source and light intensity on the growth and photosynthesis of the brown tide alga *Aureococcus anophagefferens*. **Harmful Algae**, v.3, n.4, p.343-360, 2004.

RAMÍREZ, M.E.; OLGUÍN, E.J.; GUITIÉRREZ, M.; SALAZAR, M. The effect of nitrogen concentration on the flotation capacity of *Spirulina* sp. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON APPLIED ALGOLOGY, 8, Montecatini Terme, 1999. **Abstracts**. Montecatini Terme: Università degli Studi di Firenze, 1999. p.27.

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

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

REDDY, C.M.; BHAT, V.B.; KIRANMAI, G.; REDDY, M.N.; REDDANNA, P.; MADYASTHA, K.M. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by Cphycocyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.277, p.599–603, 2000.

RICHMOND, A. Spirulina. In: BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J., eds. **Micro-algal biotechnology**. Cambridge, New York: Cambridge University Press, 1989. p.85-119.

RICHMOND, T.; LICHTENBERG, B.; STAHL, B.; VONSHAK, A. Quantitative assessment of the major limitations os productivity os *Spirulina platensis* in open receways. **Journal of Applied Phycology**, v.2, p.195-206, 1990.

RIPPKA, R.; WATERBURY, J.B.; STANIER, R.Y. Provisional generic assignments for Cyanobacteria in pure culture. In: STARR, M.P.; STOLP, H.; TRÜPER, H.G.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H.G., eds. **The Prokaryotes**: a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria. Berlin: Springer-Verlag, 1981. v.1, p.247-256.

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

SAKATA, K.; YAMAMOTO, K.; WATANABLE, N. Antioxidative compounds from marine organisms. In: HO, C.T.; OSAWA, T.; HUANG, M.T.; ROSE, R.T., eds. **Food phytochemicals for cancer prevention II**: teas, spices, and herbs. 204th National Meeting of the American Chemical Society, Washington, D.C., August 23-28, 1992.

SALAZAR, M.; MARTÍNEZ, E.; MADRIGAL, E.; RUIZ, L.E.; CHAMORRO, G.A. Subchronic toxicity study in mice fed *Spirulina maxima*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.62, p.235-241, 1998.

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

SÁNCHEZ, M.; BERNAL-CASTILHO, J.; ROZO, C.; RODRÍGUEZ, I. *Spirulina* (*Arthrospira*): an edible microorganism: a review. **Universitas Scientarum**, v.8, n.1, 2003. In: PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA. Institucional. Facultades. Ciências. Publicaciones. Disponível em:

http://www.javeriana.edu.co/ciencias/universitas/vol8n1/J_bernal.htm. Acesso em: 13 jul. 2005.

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

SANCHEZ-LUNA, L.D.; TONINI, G.C.; SATO, S.; CARVALHO, J.C.M. Avaliação do crescimento de *Spirulina platensis* por processo descontínuo alimentado utilizando metodologia de superfície de resposta. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, supl.3, p.157-159, 2003. [VIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP, São Paulo - Brasil, 13 a 17 de outubro de 2003].

SANSAWA, H.; ENDO, H. Production of intracellular Phytochemicals in *Chlorella* under heterotrophic conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.98, n.6, p.437-444, 2004.

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

SASSANO, C.E.N. **Influência da uréia no crescimento e no teor do ácido graxo ϒ-linolênico na biomassa de *Spirulina platensis***. São Paulo, 1999. 144p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

SCHELDEMAN, P.; BAURAIN, D.; BOUHY, R.; SCOTT, M.; MÜHLING, M.; WHITTON, B.A.; BELAY, A.; WILMOTTE, A. Arthrospira (Spirulina) strains from four continents are resolved into only two clusters, based on amplified ribosomal DNA restriction analysis of the internally transcribed spacer. FEMS Microbiology Letters, v.172, n.2, p.213-222, 1999.

SCHLÖSSER, U.G. Sammlung von algenkulturen. **Berichte de Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v.95, p.181-276, 1982.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. VisaLegis. **Portaria n.222, de 24 de março de 1998**. Disponível em: www.e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=56-39k. Acesso em: 10 abr.2007.

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

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

SILVA, P.C.; BASSON, P.W.E.; MOE, R.L. **Catalogue of the benthic marine algae of the Indian Ocean**. Berkeley: University of California, 1996. 1259p. (University of California publications in botany, v.79).

SINGH, S.C.; SINHA, R.P.; HÄDER, D.P. Role of lipids and fatty acids in stress tolerance in cyanobacteria. **Acta Protozoologica**, v.41, p.297–308, 2002.

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

SPECKTOROVA, L.; LEROY CRESWELL, R.; VAUGHAN, D. Closed tubular cultivators: an innovative system for commercial culture of microalgae. **Journal of the World Aquaculture Societ**y, v.28, p.39-43, 1997.

STANCA, D.; POPOVICI, E. Urea as nitrogen source in modified zarrouk medium. **Revue Roumaine de Biologie, Serie de Biologie Vegetale**, v.41, n.1, p.25-31, 1996.

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

TAM, N.F.Y.; WONG, Y.S. Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. **Bioresource Technology**, v.57, p.54-50, 1996.

TAM, N.F.Y.; WONG, Y.S. The comparison of growth and nutrient remocal efficiency of *Chlorella pyrenoidosa* in settle and activated sewages. **Environmental Pollution**, v.65, p.93-108, 1990.

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

TOMASELLI, L.; GIOVANNETTI, L.; TORZILLO, G. Physiology of stress response in *Spirulina spp.* In: DOUMENOE, F.; DURAND-CHASTEL, H.; TOULEMONT, A., eds. **Spiruline Ague de Vie Salletin de Insitut Occeanographique**, Monaco, n.2, p.65-75, 1993

TSUKADA, O.; KAWAHARA, T.; MIYACHI, S. Mass culture chlorela in Asian coutris. In: MITSUI, A.; MIYACHI, S.; SAN PIETRO, A.; TAMURA, S., eds. **Biological solar energy conversion**. New York: Academic Press, 1977. p.363-365.

VOGEL, A.I. **Análise química quantitativa**. 5.ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1992. p.250.

VONSHAK, A. Outdoor mass production of *Spirulina*: the basic concept. In: VONSHAK, A., ed. ***Spirulina platensis (Arthrospira)***: physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor and Francis, 1997a. p.79-99.

VONSHAK, A. Appendices. In: VONSHAK, A., ed. ***Spirulina platensis (Arthrospira)***: physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor and Francis, 1997b. p.213-226.

WADA, H.; MURATA, N. Temperature-induced changes in the fatty acid composition of the *cyanobacterium, Synechocystis* PCC6803. **Plant Physiology**, v.92, n.4, p.1062-1069, 1990.

WARD, O. **Biotecnologia de la fermentacion**: principios, processos y productos. Zaragoza: Editorial Acribia, 1989. 274p.

YAMAZAKI H.; FUJIEDA M.; TOGASHI M. Effects of the dietary supplements, activated charcoal and copper chlorophyllin, on urinary excretion of trimethylamine in Japanese trimethylaminuria patients**. Life Sciences**, v.74, n.22, p.2739-2747, 2004.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée**: influence de divers facteurs physiques er chimiques sur la croissance er la photosynthése de *Spirulina maxima* (Setch. Et Gardner) Geitler. Paris, 1966. Dissertação de Doutorado – Universidade de Paris.