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

**“INFLUÊNCIA DA URÉIA NO CRESCIMENTO E NO TEOR
DO ÁCIDO GRAXO γ -LINOLÊNICO DA BIOMASSA DE
Spirulina platensis”**

Carlos Eduardo Nascimento Sassano

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

**Orientador:
Prof. Dr. JOÃO CARLOS MONTEIRO DE CARVALHO**

**São Paulo
1999**

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

S252i Sassano, Carlos Eduardo Nascimento
Influência da uréia no crescimento e no teor do ácido graxo γ -
Linolênico da biomassa de *spirulina platensis* / Carlos Eduardo
Nascimento Sassano. -- São Paulo, 1999.
144p.

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

Orientador: Carvalho, João Carlos Monteiro de

1. Biotecnologia 2. Lipídio : Aplicação : Biotecnologia
I. T. II. Carvalho, João Carlos Monteiro de. orientador.

620.8 CDD

CARLOS EDUARDO NASCIMENTO SASSANO

INFLUÊNCIA DA URÉIA NO CRESCIMENTO E NO
TEOR DO ÁCIDO GRAXO γ -LINOLÊNICO DA
BIOMASSA DE
SPIRULINA platensis

COMISSÃO JULGADORA

*Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE*

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

*Profa. Dra. Telma Mary Kaneko
1º Examinador*

*Prof. Dr. Sunao Sato
2º Examinador*

SÃO PAULO, 26 de novembro de 1999

Ao grande amor da minha
vida, minha esposa Lucíola, sem a qual
este trabalho não poderia ser
realizado, e aos meus pais, por todo o
esforço e dedicação com minha
educação.

À COORDENADORIA DE
APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL
DE NÍVEL SUPERIOR-CAPES, PELO
APOIO FINANCEIRO E PELA
BOLSA DE ESTUDO CONCEDIDA.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Titular Sunao Sato, pela oportunidade, confiança e amizade durante o decorrer da dissertação.

Ao Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho, um amigo e orientador, pelas preciosas sugestões, paciência e pela sua valiosa amizade.

Ao Prof. Assoc. Luiz Antonio Gioielli, pelas preciosas informações técnicas.

Ao Prof. Dr. Eugênio Aquarone, responsável pela introdução das cianobactérias no departamento.

Ao grande amigo Dante Augusto Moraes, pelo apoio, ajuda e sugestões. A grande amiga e colega Lúcia Helena Pelizer, pela troca de informações e bons momentos que passamos juntos. A minha grande amiga Rachel Abzaga, pela colaboração e amizade

Aos estagiários Willian de Paula Amado e Fernando de R. Francisco e aos amigos e técnicos Kléber A. de Almeida e Mauro Sérgio Cândido, pelo auxílio no laboratório.

A minha grande amiga Andréia Carla Barreto, pelo incentivo e pela amizade sempre presente em minha vida.

A UNG (Universidade de Guarulhos), em nome da amiga e coordenadora do curso de Engenharia Química Prof. Dr. Iracema de Oliveira Moraes, pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Celso de Barros Gomes (meu tio), que mais uma vez me ajuda em uma fase importante de minha vida.

Ao meu sogro Antonio Ferreira e minha sogra Nena, por todo o apoio e amizade dado no transcorrer do trabalho.

A toda minha querida família, por sempre estarem presentes

Ao Juarez Vieira de Souza, Rosemary Colombo Lima, Maria do Rosário P. Chamon, Míriam Bernardes Lopes, a todos do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica , e a todos que colaboraram direta ou indiretamente na finalização deste trabalho, pela amizade, colaboração, paciência e gentileza. Meu muito obrigado!

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
NOMENCLATURA	iii
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	x
1 – INTRODUÇÃO	01
2 – OBJETIVOS	04
3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	05
3.1-GENERALIDADES	05
3.2-TAXONOMIA	07
3.3-FATORES QUE CONTRIBUEM PARA O CRESCIMENTO	10
3.3.1-UTILIZAÇÃO do CO ₂	10
3.3.2-UTILIZAÇÃO DE UMA FONTE DE NITROGÊNIO	14
3.3.3-INTENSIDADE LUMINOSA	16
3.3.4-EFEITO DO SOMBREAMENTO	16
3.3.5-FASES DE CRESCIMENTO	17
3.3.6-OUTROS FATORES QUE INTERFEREM NO	17
CRESCIMENTO DA SPIRULINA	
3.4-ASPÉCTOS ECONÔMICOS DA UTILIZAÇÃO DE SPIRULINA	18

COMO BIOMASSA	
3.5-PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO	19
3.6-ÁCIDOS GRAXOS	21
3.6.1-NOTAÇÃO QUÍMICA DOS ÁCIDOS GRAXOS	21
3.6.2-PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS	21
PELA <i>SPIRULINA platensis</i>	
3.6.3-PRODUÇÃO DO γ -LINOLÊNICO POR OUTRAS FONTES	24
3.6.4-IMPORTÂNCIA DO γ -LINOLÊNICO(GLA)	25
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1-CEPA EMPREGADA	27
4.2-TEMPERATURA	27
4.3-LUMINOSIDADE	27
4.4-DISPOSITIVO PARA CULTURA	28
4.5-MANUTENÇÃO DA CULTURA	28
4.6-PREPARO DO INÓCULO	29
4.7-MEIO UTILIZADO	29
4.8- PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	31
4.8.1-NÚMERO DE EXPERIMENTOS E VALORES DOS NÍVEIS	31
DAS VARIÁVEIS	
4.8.2-NÍVEIS DAS VARIÁVEIS E O PONTO CENTRAL	32
4.9-TÉCNICAS ANALÍTICAS	35
4.9.1-ACOMPANHAMENTO DA FERMENTAÇÃO	35
4.9.1.1-DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO	35
CELULAR	

4.9.1.2-AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE LUMINOSA	35
4.9.1.3-CALCULO DO CONSUMO DE CARBONO TOTAL PELA CÉLULA COM O DECORRER DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO	35
4.9.1.4-DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AMÔNIA LIVRE	35
4.9.1.5- DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AMÔNIA TOTAL E URÉIA RESIDUAL	36
4.9.1.6-DETERMINAÇÃO DO PH DO MEIO DE CULTURA	37
4.9.2-AVALIAÇÃO DA BIOMASSA OBTIDA	37
4.9.2.1-PROTEINAS TOTAIS	37
4.9.2.2LIPÍDEOS	37
4.9.2.2.1- LIPÍDEOS TOTAIS	37
4.9.2.2.2-ESTERIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS	38
4.9.2.2.3-PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS PRODU ZIDOS	38
4.9.2.3-CINZAS	38
4.9.2.4-UMIDADE	38
4.9.2.5-CARBOIDRATOS TOTAIS	39
5-RESULTADOS	40
5.1-MONITORAMENTO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE <i>SPIRULINA platensis</i>	40
6-DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	82

6.1-CONSIDERAÇÕES GERAIS	82
6.2-ANÁLISE DE REGRESSÃO MULTIVARIÁVEL	90
6.2.1-CONCENTRAÇÃO MÁXIMA ATINGIDA (X_{max}) EM FUNÇÃO DE T_{ac} E MUT_c	92
6.2.2-PRODUTIVIDADE EM CÉLULAS (P_x) EM FUNÇÃO DE T_{ac} E MUT_c	96
6.2.3-FATOR DE CONVERSÃO DE NITROGÊNIO EM CÉLULAS EM FUNÇÃO DE T_{ac} E MUT_c	99
6.2.4-PORCENTAGEM RELATIVA DO ÁCIDO GRAXO γ -LINOLÊNICO EM FUNÇÃO DE T_{ac} E MUT_c	102
6.2.5-PORCENTAGEM DE PROTEÍNA NA BIOMASSA EM FUNÇÃO DE T_{ac} E MUT_c	106
6.2.6-TEOR DE GORDURA NA BIOMASSA (%GORDURA) EM FUNÇÃO DE T_{ac} E MUT_c	109
6.2.7-TEOR DO ÁCIDO GRAXO PALMÍTICO (%PALMÍTICO) EM FUNÇÃO DE T_{ac} E MUT_c	110
6.2.8- TEOR DO ÁCIDO GRAXO PALMITOLÊICO (%PALMITOLÊICO) EM FUNÇÃO DE T_{ac} E MUT_c	113
6.2.9- TEOR DO ÁCIDO GRAXO PALMITOLÊICO N-7 (%PALMITOLÊICO N-7) EM FUNÇÃO DE T_{ac} E MUT_c	114
6.2.10-TEOR DO ÁCIDO GRAXO OLÊICO (%OLÊICO) EM FUNÇÃO DE T_{ac} E MUT_c	117
6.2.11-TEOR DO ÁCIDO GRAXO LINOLÊICO (%LINOLÊICO) EM FUNÇÃO DE T_{ac} E MUT_c	119

7-CONCLUSÕES	121
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
9- APÊNDICE	132
9.1-APÊNDICE A –OBTENÇÃO DA MASSA DE URÉIA INICIAL, A SER ADICIONADA NOS EXPERIMENTOS	132
9.2-APÊNDICE B-VALORES ADICIONADOS DE URÉIA, BEM COMO A MASSA ACUMULADA DE URÉIA DIÁRIA NOS TANQUES DE FERMENTAÇÃO	136

RESUMO

Realizou-se um estudo do processo descontínuo alimentado de fermentação, buscando encontrar as melhores condições de produção do ácido graxo gama-linolênico. Empregou-se como fonte de nitrogênio no meio de fermentação a uréia, que foi adicionada de forma exponencialmente crescente e como inóculo usou-se uma cepa de *Spirulina platensis*.

Utilizou-se planejamento experimental e aplicou-se a metodologia de superfície de resposta, o qual permitiu a obtenção de equações que relacionaram as variáveis dependentes, como produtividade em células, conversão de nitrogênio em células, concentração máxima atingida de biomassa, porcentagem relativa de produção de ácido graxo gama-linolênico. com as variáveis independentes tempo de alimentação (T_a) e massa total de uréia adicionada (MUT).

Os melhores resultados obtidos foram os seguintes: $P_x=117,26$ mg/L.dia; $Y_{x/n}= 4,9$; $X_{max}= 1759$ mg/L e porcentagem de ácido graxo γ -linolênico na fração lipídica de 23,5 %, com 14 dias (T_a) e 1750 mg (MUT).

ABSTRACT

A Study on the fed-batch fermentation process was made seeking for the best Gamma-linolenic production condition. Mineral media was employed with urea as nitrogen source that was add with exponentially increasing feeding rates and *Spirulina platensis* as inoculum.

Experimental design and a Response Surface Methodology were applied . It was composed by an experimental design which allowed a reduced number of the experiments and by the analysis of the results using equations which combined the interest variables dependent as: Productivity, best Gamma-linolenic production condition, Nitrogen conversion in Biomass, Highest Concentration and the study variables independent (Ta-feeding time and add urea-MUT)

The best results were with (Ta-feeding time=14 days; add urea-MUT=1750 mg). In this conditions we had :

- Productivity=117,26 mg/L.day
- Best Gamma-linolenic production condition=23,5 per cent
- Nitrogen conversion in Biomass=4,9
- Biggest Concentration.=1759 mg/L

NOMENCLATURA

MUT -Massa de Uréia Total Adicionada nos Tanques de Fermentação

Ta-Tempo de Alimentação dos Tanques de Fermentação em Dias

M-Molaridade

Ma-Massa de Uréia Adicionada num tempo t

Klux-Illuminância

M0-Massa Inicial de Uréia

e-Base do Logarítimo Neperiano

f-Número de Variáveis ou Fatores

K-Constante de Tempo (dias)

P-Nível Descritivo. Na análise de Regressão, é o menor erro em que se incorre ao afirmar que um parâmetro tem Influência na determinação do parâmetro estudado

Carbonato-Concentração de Carbonato gramas por litro, proveniente dos tanques

Amônia livre-Concentração de Amônia livre em Mol por litro, proveniente dos Tanques

Amônia Total-Concentração de Amônia Total em Mol por litro, proveniente dos Tanques

Uréia-Concentração de Uréia Residual em gramas por Litro, proveniente dos Tanques

Xmax-Concentração Celular Máxima atingida em miligramas por Litro em cada experimento

Y(x./n)-Conversão de Nitrogênio em Células

P(x)-Produtividade em Células em miligramas por dia por litro

Carbonato-Concentração em gramas por litro de carbonato

RPM-Rotações por Minuto

X-Concentração Celular em miligramas por litro

pH-Medida Pôtemciométrica das Concentrações de Soluções Aquosas

(%Ptn)-Teor de Proteína em porcentagem

(%Gordura)-Teor de Gordura em porcentagem

(%Cinzas)-Teor de Cinzas em porcentagem

(%Carboidratos)-Teor de carboidratos em porcentagem

(%Palmítico)-Teor do ácido graxo Palmítico em porcentagem

(%Linolêico)-Teor do ácido graxo linolêico em porcentagem

(%GLA)-Teor do ácido graxo linolênico em porcentagem

(%Palmitolêico)-Teor do ácido graxo palmitolêico em porcentagem

(%Palmitolêico-n-7)-Teor do ácido graxo Palmitolêico n-7 em porcentagem

(%Olêico)-Teor do ácido graxo olêico em porcentagem

MUTc-Massa de Uréia Total codificada

Tac-Tempo de Alimentação codificado

T-Tempo de Fermentação (dias)

LDL-Lipoproteínas de baixa densidade (mau colesterol)

HDL-Lipoproteínas de alta densidade (Bom colesterol)

GLA-Ácido Gama Linolênico

LISTA DE TABELAS

	Pág.
TABELA I :Classificação dos Ácidos Graxos	22
TABELA II :Nível da Variáveis Independentes e o Ponto Central	32
TABELA III:Matriz do Planejamento Experimental, com os Respectivos Experimentos Padrão	33
TABELA IV:Matriz do Planejamento Experimental com Valores Codificados	34
TABELA 1 :Resultados do Monitoramento do Processo de Produção de <i>Spirulina platensis</i> relativos ao Experimento 1	41
TABELA 2 : Resultados do Monitoramento do Processo de Produção de <i>Spirulina platensis</i> relativos ao Experimento 2	43
TABELA 3 : Resultados do Monitoramento do Processo de Produção de <i>Spirulina platensis</i> relativos ao Experimento 3	45
TABELA 4 : Resultados do Monitoramento do Processo de Produção de <i>Spirulina platensis</i> relativos ao Experimento 4	47
TABELA 5 : Resultados do Monitoramento do Processo de Produção de <i>Spirulina platensis</i> relativos ao Experimento 5	49
TABELA 6 : Resultados do Monitoramento do Processo de Produção de <i>Spirulina platensis</i> relativos ao Experimento 6	51
TABELA 7 : Resultados do Monitoramento do Processo de Produção de <i>Spirulina platensis</i> relativos ao Experimento 7	53
TABELA 8 : Resultados do Monitoramento do Processo de Produção de <i>Spirulina platensis</i> relativos ao Experimento 8	55
TABELA 9 : Resultados do Monitoramento do Processo de Produção de <i>Spirulina platensis</i> relativos ao Experimento 9	57
TABELA10 : Resultados do Monitoramento do Processo de Produção de <i>Spirulina platensis</i> relativos ao Experimento 10	59
TABELA 11 : Resultados do Monitoramento do Processo de Produção de <i>Spirulina platensis</i> relativos ao Experimento 11	61
TABELA 12 : Resultados do Monitoramento do Processo de Produção de <i>Spirulina platensis</i> relativos ao Experimento 12	63
TABELA13 : Resultados do Monitoramento do Processo de Produção de <i>Spirulina platensis</i> relativos ao Experimento 13	65

TABELA 14 : Resultados do Monitoramento do Processo de Produção de <i>Spirulina platensis</i> relativos ao Experimento 14	67
TABELA 15 : Resultados do Monitoramento do Processo de Produção de <i>Spirulina platensis</i> relativos ao Experimento 15	69
TABELA16 :A Concentração Máxima de cada Experimento Relacionada com MUT e Ta	71
TABELA 17 :A Conversão de Nitrogênio em Células de cada Experimento Relacionada com MUT e Ta	71
TABELA 18 :A Produtividade de cada Experimento Relacionada com MUT e Ta	72
TABELA19 :Composição Centesimal da Biomassa Obtida em cada Experimento	73
TABELA 20 :Média da Porcentagem dos Ácidos Graxos Produzidos pela Biomassa de <i>Spirulina platensis</i> Obtida no Experimento 1	74
TABELA 21 : Média da Porcentagem dos Ácidos Graxos Produzidos pela Biomassa de <i>Spirulina platensis</i> Obtida no Experimento 2	74
TABELA22 : Média da Porcentagem dos Ácidos Graxos Produzidos pela Biomassa de <i>Spirulina platensis</i> Obtida no Experimento 3	75
TABELA 23 : Média da Porcentagem dos Ácidos Graxos Produzidos pela Biomassa de <i>Spirulina platensis</i> Obtida no Experimento 4	75
TABELA 24 : Média da Porcentagem dos Ácidos Graxos Produzidos pela Biomassa de <i>Spirulina platensis</i> Obtida no Experimento 5	76
TABELA25 : Média da Porcentagem dos Ácidos Graxos Produzidos pela Biomassa de <i>Spirulina platensis</i> Obtida no Experimento 6	76
TABELA 26 : Média da Porcentagem dos Ácidos Graxos Produzidos pela Biomassa de <i>Spirulina platensis</i> Obtida no Experimento 7	77
TABELA 27 : Média da Porcentagem dos Ácidos Graxos Produzidos pela Biomassa de <i>Spirulina platensis</i> Obtida no Experimento 8	77
TABELA28 : Média da Porcentagem dos Ácidos Graxos Produzidos pela Biomassa de <i>Spirulina platensis</i> Obtida no Experimento 9	78
TABELA 29 : Média da Porcentagem dos Ácidos Graxos Produzidos pela Biomassa de <i>Spirulina platensis</i> Obtida no Experimento 10	78
TABELA 30 : Média da Porcentagem dos Ácidos Graxos Produzidos pela	79

Biomassa de <i>Spirulina platensis</i> Obtida no Experimento 11	
TABELA31 : Média da Porcentagem dos Ácidos Graxos Produzidos pela Biomassa de <i>Spirulina platensis</i> Obtida no Experimento 12	79
TABELA 32 : Média da Porcentagem dos Ácidos Graxos Produzidos pela Biomassa de <i>Spirulina platensis</i> Obtida no Experimento 13	80
TABELA 33 : Média da Porcentagem dos Ácidos Graxos Produzidos pela Biomassa de <i>Spirulina platensis</i> Obtida no Experimento 14	80
TABELA34 : Média da Porcentagem dos Ácidos Graxos Produzidos pela Biomassa de <i>Spirulina platensis</i> Obtida no Experimento 15	81
TABELA 35 :Valores de Concentração Máxima, Produtividade, Conversão de Nitrogênio em Células, Relacionados com MUTc, Tac e MUT e Ta	91
TABELA 36 :Análise de Regressão Linear Multivariável para Xmax em Função de MUTc , Tac e MUTc.Tac	92
TABELA37 :Análise de Variância do Modelo de Regressão Linear para Xmax em Função de MUTc, Tac e MUTc.Tac	93
TABELA 38 : Análise de Regressão Linear Multivariável para Px em Função de MUTc, Tac e MUTc.Tac	96
TABELA 39 : Análise de Variância do Modelo de Regressão Linear para Px em Função de MUTc, Tac e MUTc.Tac	97
TABELA40 : Análise de Regressão Quadrática Multivariável para Y(x/n) em Função de MUTc, Tac e MUTc.Tac	99
TABELA 41 : Análise de Variância do Modelo de Regressão Quadrática para Y(x/n) em Função de MUTc, Tac e MUTc.Tac	100
TABELA 42 : Análise de Regressão Linear Multivariável para (%GLA) em Função de MUTc e MUTc.Tac	102
TABELA43 : Análise de Variância do Modelo de Regressão Linear para (%GLA) em Função de MUTc e MUTc.Tac	103
TABELA 44 : Análise de Regressão Linear Multivariável para (%PTn) em Função de Tac	106
TABELA 45 : Análise de Variância do Modelo de Regressão Linear para (%Ptn) em Função de Tac	107
TABELA46 : Análise de Regressão Linear Multivariável para (%Gord) em Função de MUTc , Tac e MUTc.Tac	109

TABELA47 : Análise de Variância do Modelo de Regressão Linear para (%Gord) em Função de MUTc, Tac e MUTc.Tac	110
TABELA48 : Análise de Regressão Linear Multivariável para (%Palmítico) na Fração Lipídica em Função de MUTc.Tac	111
TABELA49 : Análise de Variância do Modelo de Regressão Linear para (%Palmítico) na Fração Lipídica em Função de MUTc.Tac	111
TABELA50 : Análise de Regressão Linear Multivariável para (%Palmitoleico) na Fração Lipídica em Função de MUTc, Tac e MUTc.Tac	113
TABELA51 : Análise de Variância do Modelo de Regressão Linear para (%Palmitoleico) na Fração Lipídica em Função de MUTc, Tac e MUTc.Tac	114
TABELA52 : Análise de Variância Regressão Linear para (%Palmitoleico-n7) na Fração Lipídica em Função de MUTc.Tac	115
TABELA53 : Análise de Variância do Modelo de Regressão Linear para (%Palmitoleico-n7) na Fração Lipídica em Função de MUTc.Tac	115
TABELA 54 : Análise de Regressão Linear Multivariável para (%Oleico) na Fração Lipídica em Função de MUTc	117
TABELA 55 : Análise de Variância do Modelo de Regressão Linear para (%Oleico) na Fração Lipídica em Função de MUTc	117
TABELA 56 : Análise de Regressão Linear Multivariável para (%Linoleico) na Fração Lipídica em Função de MUTc, Tac e MUTc.Tac	119
TABELA 57 : Análise de Variância do Modelo de Regressão Linear para (%Linoleico) na Fração Lipídica em Função de MUTc, Tac e MUTc.Tac	120
TABELA A1:Acompanhamento da Concentração Celular com um Experimento com Massa Inicial de Uréia de 200 mg e Massa Total de Uréia de 2250 mg	134
TABELA A2: Acompanhamento da Concentração Celular com um Experimento com Massa Inicial de Uréia de 400 mg e Massa Total de Uréia de 2250 mg	135
TABELA B1:Experimento Realizado com suas Respectivas Variáveis Independentes e Valores Adicionados de Uréia bem como a Massa Acumulada de Uréia Diária nos Tanques de Fermentação (MUT= 2500 mg, Ta=12 dias)	136
TABELA B2:Experimento Realizado com suas Respectivas Variáveis Independentes e Valores Adicionados de Uréia bem como a Massa Acumulada	137

de Uréia Diária nos Tanques de Fermentação (MUT= 2500 mg, Ta=15 dias)	
TABELA B3:Experimento Realizado com suas Respectivas Variáveis	138
Independentes e Valores Adicionados de Uréia bem como a Massa Acumulada	
de Uréia Diária nos Tanques de Fermentação (MUT= 3250 mg, Ta=14 dias)	
TABELA B4:Experimento Realizado com suas Respectivas Variáveis	139
Independentes e Valores Adicionados de Uréia bem como a Massa Acumulada	
de Uréia Diária nos Tanques de Fermentação (MUT= 1375 mg, Ta=12 dias)	
TABELA B5:Experimento Realizado com suas Respectivas Variáveis	140
Independentes e Valores Adicionados de Uréia bem como a Massa Acumulada	
de Uréia Diária nos Tanques de Fermentação (MUT= 1750 mg, Ta=10 dias)	
TABELA B6:Experimento Realizado com suas Respectivas Variáveis	141
Independentes e Valores Adicionados de Uréia bem como a Massa Acumulada	
de Uréia Diária nos Tanques de Fermentação (MUT= 1750 mg, Ta=14 dias)	
TABELA B7:Experimento Realizado com suas Respectivas Variáveis	142
Independentes e Valores Adicionados de Uréia bem como a Massa Acumulada	
de Uréia Diária nos Tanques de Fermentação (MUT= 3250 mg, Ta=10 dias)	
TABELA B8:Experimento Realizado com suas Respectivas Variáveis	143
Independentes e Valores Adicionados de Uréia bem como a Massa Acumulada	
de Uréia Diária nos Tanques de Fermentação (MUT= 3625 mg, Ta=12 dias)	
TABELA B9:Experimento Realizado com suas Respectivas Variáveis	144
Independentes e Valores Adicionados de Uréia bem como a Massa Acumulada	
de Uréia Diária nos Tanques de Fermentação (MUT= 2500 mg, Ta=9 dias)	

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA I :Fotografia eletrônica ampliada da <i>Spirulina platensis</i>	7
FIGURA II :Efeito do pH nas concentrações relativas de CO_2 , HCO_3^- , e CO_3^{2-}	13
FIGURA III:Fotografia dos minitanques utilizados para a realização dos experimentos	28
FIGURA 1 :Curva de crescimento da <i>Spirulina platensis</i> no experimento 1	41
FIGURA 2 :Variação do pH no experimento 1	42
FIGURA 3 :Variação da concentração de carbonato no experimento 1	42
FIGURA 4 :Curva de crescimento da <i>Spirulina platensis</i> no experimento 2	43
FIGURA 5 :Variação do pH no experimento 2	44
FIGURA 6 :Variação da concentração de carbonato no experimento 2	44
FIGURA 7 :Curva de crescimento da <i>Spirulina platensis</i> no experimento 3	45
FIGURA 8 :Variação do pH no experimento 3	46
FIGURA 9 :Variação da concentração de carbonato no experimento 3	46
FIGURA10 :Curva de crescimento da <i>Spirulina platensis</i> no experimento 4	47
FIGURA 11 :Variação do pH no experimento 4	48
FIGURA 12 :Variação da concentração de carbonato no experimento 4	48
FIGURA13 :Curva de crescimento da <i>Spirulina platensis</i> no experimento 5	49
FIGURA 14 :Variação do pH no experimento 5	50
FIGURA 15 :Variação da concentração de carbonato no experimento 5	50
FIGURA16 :Curva de crescimento da <i>Spirulina platensis</i> no experimento 6	51
FIGURA 17 :Variação do pH no experimento 6	52
FIGURA 18 :Variação da concentração de carbonato no experimento 6	52
FIGURA19 :Curva de crescimento da <i>Spirulina platensis</i> no experimento 7	53
FIGURA 20 :Variação do pH no experimento 7	54
FIGURA 21 :Variação da concentração de carbonato no experimento 7	54
FIGURA22 :Curva de crescimento da <i>Spirulina platensis</i> no experimento 8	55
FIGURA 23 :Variação do pH no experimento 8	56
FIGURA 24 :Variação da concentração de carbonato no experimento 8	56
FIGURA25 :Curva de crescimento da <i>Spirulina platensis</i> no experimento 9	57
FIGURA 26 :Variação do pH no experimento 9	58

FIGURA 27 :Variação da concentração de carbonato no experimento 9	58
FIGURA28 :Curva de crescimento da <i>Spirulina platensis</i> no experimento10	59
FIGURA 29 :Variação do pH no experimento 10	60
FIGURA 30 :Variação da concentração de carbonato no experimento 10	60
FIGURA31 :Curva de crescimento da <i>Spirulina platensis</i> no experimento11	61
FIGURA 32 :Variação do pH no experimento 11	62
FIGURA 33 :Variação da concentração de carbonato no experimento 11	62
FIGURA34 :Curva de crescimento da <i>Spirulina platensis</i> no experimento12	63
FIGURA 35 :Variação do pH no experimento 12	64
FIGURA 36 :Variação da concentração de carbonato no experimento 12	64
FIGURA37 :Curva de crescimento da <i>Spirulina platensis</i> no experimento13	65
FIGURA 38 :Variação do pH no experimento 13	66
FIGURA 39 :Variação da concentração de carbonato no experimento 13	66
FIGURA40 :Curva de crescimento da <i>Spirulina platensis</i> no experimento14	67
FIGURA 41 :Variação do pH no experimento 14	68
FIGURA 42 :Variação da concentração de carbonato no experimento 14	68
FIGURA43 :Curva de crescimento da <i>Spirulina platensis</i> no experimento15	69
FIGURA 44 :Variação do pH no experimento 15	70
FIGURA 45 :Variação da concentração de carbonato no experimento 15	70
FIGURA46 :Superfície de resposta para X_{max} em função de T_{ac} , MUT_c e $MUT_c \cdot T_{ac}$	95
FIGURA47 :Superfície de resposta para P_x em função de T_{ac} , MUT_c e $MUT_c \cdot T_{ac}$	98
FIGURA48 :Superfície de resposta para $Y_{x/n}$ em função de MUT_c^2 , MUT_c e $MUT_c \cdot T_{ac}$	101
FIGURA49 :Superfície de resposta para (%GLA) em função de MUT_c e $MUT_c \cdot T_{ac}$	105
FIGURA50 :Superfície de resposta para (%Proteína) em função de T_{ac}	108
FIGURA51 :Superfície de resposta para (%Palmitico) em função de MUT_c e $MUT_c \cdot T_{ac}$	112
FIGURA52 :Superfície de resposta para (%Palmitolêico n-7)	116

em função de MUTc .Tac

FIGURA53 :Superfície de resposta para (%Oleico)

118

em função de MUTc

1- INTRODUÇÃO

A cultura de microrganismos fotossintetizantes pode apresentar uma fonte alternativa e, inclusive, vantajosa para a produção de proteínas de apreciável valor biológico para consumo animal e humano. Ao lado de tal perspectiva, temos a possibilidade de obtenção de produtos de “química fina”, dentre os quais: pigmentos, carotenóides, esteróides, vitaminas e lipídeos, pois a biomassa fotossintética microbiana pode apresentar tais componentes em quantidades e qualidades apreciáveis, principalmente com relação a ácidos graxos polinsaturados (COHEN et al., 1987; ROUGHAM, 1988; COHEN & VONSHAK, 1990; COHEN et al., 1991). Estudos neste sentido têm sido realizados desde o início da década de 50, principalmente com dois gêneros de microalgas verdes: *Chlorella* e *Scenedesmus*. Entretanto, surgiram problemas para sua utilização, devido aos elevados custos de extração e secagem da biomassa, além da presença de parede celulósica, de baixa digestibilidade. Estes são notavelmente atenuados com o emprego da *Spirulina* (TEL-OR et al., 1980; COHEN & VONSHAK, 1990). Tal gênero é representado por microrganismos fotoautótrofos, pluricelulares, coloniais, de morfologia espiralada e filamentosa, presente em habitat aquoso de elevada salinidade. A tendência atual é considerá-lo pertencente ao reino monera, classe *Cyanophyceae*, família *Oscillatoriaceae* (BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, VOLUME-31, 1974). O gênero *Spirulina* têm sido usado como alimento humano desde tempos remotos em certas regiões do México e África (RICHMOND, 1983; CIFERRI & TIBONI, 1985). Estudos nutricionais demonstraram ser um dos microrganismos de maior teor protéico já encontrado, possuindo elevado valor nutricional, boa digestibilidade e todos aminoácidos essenciais em proporções recomendadas pela FAO, com exceção da metionina (BALLONI et al., 1980; DURAND & CHASTEL, 1980). Quanto aos aspectos tecnológicos de cultivo da *Spirulina*, esta apresenta vantagens em relação aos demais fotoautótrofos, entre elas, a

separação fácil e econômica do meio de cultivo devido à forma espiralada e maiores dimensões (diâmetro de aproximadamente 10µm e comprimento de dezenas a centenas de µm) (RICHMOND, 1983; PIORRECK et al., 1984; FERRAZ, 1986).

Espécies do gênero *Spirulina* apresentam-se largamente distribuídas pelo mundo, sendo encontradas na Ásia, nas Américas e África. A espécie africana *Spirulina platensis* se desenvolve maciçamente em condições naturais na zona semi-desértica, que apresenta baixa pluviosidade ($< 300 \text{ mm}^3 / \text{ano}$), elevada insolação (> 9 horas diárias), médias térmicas elevadas ($25\text{-}26^\circ\text{C}$), pH elevados (9,5-11), e teores salinos que variam de 8,5 a 200 gramas/litro, com a produção maior de *Spirulina* nas concentrações de 22 a 60 gramas/litro (ILTIS, 1980). Do ponto de vista da composição química da água, o sódio é o maior representante entre os cátions; entre os ânions, os carbonatos e bicarbonatos são predominantes, e, em alguns ambientes, podem ser encontradas quantidades apreciáveis de cloretos e sulfatos (ILTS, 1980; FERRAZ, 1986).

Em relação à biomassa algal, esta é principalmente avaliada com base no seu conteúdo de proteínas. Porém, outros constituintes estão tendo cada vez mais importância no valor nutricional de um alimento, isto é, particularmente verdade para a fração lipídica, principalmente na quantidade e qualidade dos ácidos graxos constituintes desta (MATERASSI et al., 1980).

A fração lipídica desempenha funções importantes em nosso organismo como componente estrutural nas membranas celulares; são precursores de hormônios e ácidos biliares; são fontes de vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K); fornecem componentes nutricionais específicos como os ácidos graxos essenciais (COENEN, 1974; HARTMAN & ESTEVES, 1982; DZIEZAK, 1989).

Segundo SONNTAG (1979), os ácidos graxos são os principais componentes da fração lipídica. São ácidos carboxílicos de cadeia longa, podendo ser saturados ou insaturados.

Os ácidos graxos essenciais (linoléico, linolênico, e araquidônico) não são sintetizados em organismos animais , devendo ser fornecidos pela alimentação (GUNSTONE, 1983; HOFFMAN, 1989), daí a grande preocupação de indústrias, atualmente em fazerem a inclusão destes tipos de nutrientes como suplementação dos alimentos *in natura* e outros tipos de alimentos formulados.

2- OBJETIVO

O presente trabalho objetivou o estudo da influência do tempo de alimentação (Ta) e da quantidade total de uréia adicionada (MUT), assim como, a substituição do nitrato de potássio pela uréia, na produção de ácidos graxos polinsaturados, principalmente no que se refere ao ácido γ -linolênico da biomassa algal da *Spirulina platensis*.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- GENERALIDADES

A *Spirulina* é um organismo onipresente e pode ser largamente encontrada em diferentes ambientes como: solos, pântanos, água do mar fresca e salobra. A *Spirulina* pode colonizar ambientes extremos que são inabitados por outros organismos. Exemplos típicos são *Spirulina maxima* e *Spirulina platensis*, que podem crescer profusamente em alguns lagos alcalinos da América e da África.

No Chad onde a *Spirulina* tem sido intensamente estudada é espécie dominante, e assim apresenta alta densidade e proporciona a utilização como alimento pela população desde tempos remotos. (Ilts, 1980). O Lago Chad se estende entre 12° e 20°N e entre 15° e 30°E. Devido a sua localização o clima é sub-desértico, com uma longa estação seca alternando com uma estação chuvosa de, em média, 4 meses. A média pluviométrica anual é de 400 mm³. A média anual da temperatura da água é de 27°C, com duas máximas em junho e setembro. Existe uma mínima luminosidade em agosto durante a estação chuvosa e outra mais pronunciada em janeiro.

O lago é raso, com uma média de profundidade de 3,5 metros e uma área flutuante de 20.000 a 24.000 km² (devido a variação no suprimento de água do rio Chari, o principal afluente do rio Chad). A variação no nível da água resulta em uma formação de vários biótipos, incluindo águas abertas, arquipélagos e brejos. O pH da água varia entre 7,2 e 9,0 e a química da água é dominada por HCO₃⁻, com SO₄⁻² e CL⁻¹, ocorrendo somente em pequenas quantidades. A condutividade varia entre 60 µmhos cm⁻¹ no delta Chari para

800 $\mu\text{mhos cm}^{-1}$ na parte do norte do lago. A transparência da água excede um metro somente nas enseadas do arquipélago e nas zonas onde a vegetação submarina é abundante.

Variações sazonais significantes do fitoplâncton foram observadas durante 15 meses em dois lagos alcalinos. Cianofíceas e Bacilofíceas são dominantes no fitoplancton, a *Spirulina platensis* é a variedade característica e, geralmente a espécie mais abundante (ILTS, 1980).

Lagos com concentração de sal abaixo de $2,5 \text{ g L}^{-1}$ suportam uma variedade populacional de microrganismos pertencentes a Clorofíceas, Cianofíceas, e Bacilofíceas. Em lagos com uma concentração de sal variando de $2,5$ a 30 g L^{-1} , a população de cianobactérias compreende muitas espécies.

Segundo CIFERRI & TIBONI, 1985, em lagos alcalinos contendo concentrações de sal acima de 30 g L^{-1} , a população de cianobactérias é praticamente monoespecífica, com a *Spirulina* sendo quase que o único microrganismo presente. A *Spirulina platensis* é encontrada em águas contendo de 70 a 85 g L^{-1} de sal

Estes autores resumiram uma investigação detalhada de dois lagos no Chad, lago Rombou e lago Bodou, ambos caracterizados por pH muito alcalino (10 a $10,3$ e $10,2$ a $10,4$, respectivamente).

3.2- TAXONOMIA

A *Spirulina* é uma alga azul-esverdeada multicelular e filamentosa. Apresenta-se constituída de filamentos azul-esverdeados de 1 a 12 micrômetros de diâmetro com células cilíndricas com tricomas helicoidais sem ramificação. Os filamentos são móveis, deslizando ao longo de suas áxis não contendo heterócitos.

Na figura I, podem ser observados células de *Spirulina platensis*

Figura I -Foto-Spirulina platensis

A *Spirulina* pode crescer rapidamente, alcançando filamentos de alta densidade em lagos mornos, rasos e salobros. É um dos microrganismos (microalgas) mais comuns e abundantes em muitos lagos alcalinos na África e América (RICHMOND, 1983).

LEWIN (1976) mostrou que o gênero das algas azul-esverdeadas têm geralmente sido distinguido com base nas características morfológicas, entretanto, apenas um número limitado delas pode ser usado. A maioria dos membros das Oscilatórias, tem filamentos cilíndricos não ramificados de tamanho indefinido e, desde a cor dos tricomas como outras características, variam consideravelmente com as condições ambientais. A classe taxonômica deste grupo é largamente confinada por considerações de tamanho e forma das células. A forma helicoidal dos tricomas é característica do gênero *Spirulina*, mas a inclinação e tamanho das hélices variam consideravelmente

com as espécies, até mesmo dentro da mesma espécie. A forma helical é mantida somente em meios líquidos, e os filamentos tornam-se verdadeiras espirais no meio sólido. A transição da forma hélice para a forma plana espiral é vagarosa, entretanto o reverso ocorre rapidamente (CIFERRI & TIBONI, 1985).

Embora a forma de hélice seja usada como característica taxonômica ao nível de espécie, ela é somente dependente como uma característica genérica. LEWIN (1980) descreveu uma cultura pura inicializada com um único filamento de *Spirulina platensis* isolada de uma costa salina na

Califórnia com 8-10 micrômeros de largura de filamento, 5-10 micrômeros de comprimento de célula, e uma altura de hélice de 110 micrômeros. A razão da inclinação das hélices foi de 1 para 2, os espirais sendo geralmente de largura constante, e as células contendo abundante vacúolos de gás. Depois de alguns meses em uma cultura, uma variação considerável das formas das hélices foram observadas, embora não tinham sido aparentes na primeira vez em que os microrganismos foram isolados.

Na sub-cultura os tipos de filamentos foram isolados e mantidas suas características: os subclones helicoidais foram distinguidos por larguras de hélice de 50 micrômeros, e não mostraram nenhuma tendência para reverter a forma helicoidal.

BAI & SESHADI (1980) reconheceram três distintas variantes morfológicas em uma cultura isolada de *Spirulina fusiformis* de Madurai: uma variante tipo S, com tricomas espiralados com distâncias regulares; uma variante tipo C, de tricomas com forma de espirais muito fechadas; e uma tipo H com tricomas formando sinos muito fechados. Os pesquisadores notaram que estes distintos tipos são facilmente transformados de um tipo para o outro. Em um estudo para identificar os fatores ambientais que influenciam estas conversões, eles constataram que a alta intensidade de luz, bem como a alta concentração de nutrientes afetam a transformação do tipo S para o tipo C, entretanto, a alta intensidade de luz assim como a baixa

concentração de nutrientes realçam a formação do tipo H. O fenômeno destas transformações morfológicas é reconhecido como polimorfismo. Realmente muita controvérsia existe nas espécies taxonômicas, devido à grande variabilidade morfológica deste gênero.

A ultraestrutura da *Spirulina* é similar a de outras algas azul-esverdeadas. A ultraestrutura e morfologia da *Spirulina platensis* é significativamente afetada pelas condições ambientais e fatores nutricionais. A temperatura influencia o tamanho das células e a ocorrência de diferentes organelas. O aumento da intensidade luminosa causa um aumento na concentração de vesículas de gás, no tamanho do tricoma, e um decréscimo nos ficobilossomos

CARR & WHITTON, 1973, mostraram também que a parede celular da *Spirulina platensis* consiste de peptídeo-glucano, e tem quatro camadas (L1;L2;L3;L4;), as quais tem de espessura 10 -15 nm. A camada L1 e L3 são elétron-transparentes com componentes fibrilares, e as camadas L2 e L4 são eletronicamente densas. A espessura total da parede é de 60 nm. A parede externa tem todas as quatro camadas, entretanto, a parede septal consiste da camada L2 espremida entre duas camadas L1.

3.3-FATORES QUE CONTRIBUEM PARA O CRESCIMENTO

3.3.1- UTILIZAÇÃO DO CO₂

As cianobactérias tornam-se dominantes em pH alcalinos porque são capazes de utilizar CO₂ em baixas concentrações com uma eficiência maior que as microalgas verdes (SIMMONS et al., 1979). Estes autores demonstraram que lagos dominados por cianobactérias, ao serem agitados, passaram a ser dominados por algas verdes (a agitação de um lago extratificado corresponde quimicamente ao acréscimo de CO₂).

Segundo MILLER & COLMAN, (1980) a forma de carbono preferencialmente assimilada por cianobactérias é o bicarbonato, sendo pH ideal de cultivo, aquele que assegure o maior deslocamento do equilíbrio químico no sentido de sua formação.

A seguir, baseado no exposto por RUSSEL (1982), são apresentados considerações sobre o efeito do pH na forma em que a fonte de carbono inorgânica (CO₂) prevalece no meio para a utilização da Spirulina

O ácido carbônico (H₂CO₃) é um ácido diprótico fraco. Para fins práticos, podemos considerar como formas equivalentes do ponto de vista químico, o ácido carbônico e o gás carbônico hidratado (RUSSEL, 1982).

Assim teríamos:

onde k^1 e k^2 representam, respectivamente, a primeira e a segunda constantes de dissociação do ácido carbônico.

Note-se que neste primeiro equilíbrio parcial, temos:

$$K^1 = \frac{[\text{H}^+]. [\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]}, \quad [\text{H}^+] = [\text{H}_3\text{O}^+]$$

onde a concentração de ácido carbônico inclui o CO_2 total dissolvido, estando ou não realmente hidratado. Logo K^1 leva em consideração o carbono total dissolvido na fase líquida.

Para o segundo equilíbrio parcial temos :

$$K^2 = \frac{(\text{H}^+) \cdot (\text{CO}_3^{2-})}{(\text{HCO}_3^-)}, \quad (\text{H}^+) = (\text{H}_3\text{O}^+)$$

$$\frac{(\text{HCO}_3^-)}{(\text{CO}_3^{2-})}$$

Aplicando a equação de Henderson-Hasselbach, para ambos equilíbrios parciais, temos:

$$\text{pH} = \text{pK}^1 - \log \frac{[\text{CO}_2]}{[\text{HCO}_3^-]}$$

$$\text{onde } \text{pK}^1 = -\log k^1 \longrightarrow \text{pK}^1 = 6,38$$

$$\text{e } \text{pH} = \text{pK}^2 - \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_3^{2-}]}$$

$$\text{onde } \text{pK}^2 = -\log k^2 \longrightarrow \text{pK}^2 = 10,25$$

De posse destas equações, pode-se impor um determinado valor de pH, resultando daí a proporção entre os íons considerados.

Ilustremos o mecanismo tomando como exemplo o valor 8,5 para o pH:

$$8,5 = 6,38 - \log \frac{[\text{CO}_2]}{[\text{HCO}_3^-]} \longrightarrow \frac{[\text{CO}_2]}{[\text{HCO}_3^-]} = 0,0076$$

$$8,5 = 10,25 - \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_3^{2-}]} \longrightarrow \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_3^{2-}]} = 56,2341$$

Como consequência, conclui-se que a ordem crescente de prevalência das espécies químicas consideradas é:

$[\text{CO}_2] < [\text{CO}_3^-] < [\text{HCO}_3^-]$ onde, a concentração de bicarbonato é cerca de 56 vezes maior que a de carbonato e cerca de 132 vezes maior que a de gás carbônico.

Buscando-se uma análise comparativa, entre as concentrações destas espécies químicas, pode-se impor que:

$$100\% \text{ do C} = [\text{CO}_2] + [\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_3^-]$$

$$100\% = 0,0076 [\text{HCO}_3^-] + [\text{HCO}_3^-] + [\text{HCO}_3^-]$$

$$\text{-----}$$

$$56,234$$

$$100\% = 1,025 [\text{HCO}_3^-]$$

$$[\text{HCO}_3^-] = 97,6\% \text{ do C}$$

$$\text{daí, } [\text{CO}_3^-] = 97,6\text{-----} = 1,7\% \text{ do C}$$

$$\text{e, } \text{CO}_2 = 0,0076 \cdot 56,234 = 0,5\% \text{ do C}$$

Através deste procedimento pode-se construir a Figura II com valores de pH e as respectivas porcentagens relativas dos íons carbonato, bicarbonato e o gás carbônico.

Figura II-Concentração de Gás Carbônico, Bicarbonato e Carbonato, segundo o valor do pH

Figura II-Efeito do pH nas concentrações relativas de CO_2 , HCO_3^- , CO_3^{2-}

Na figura II, nota-se que abaixo de pH 6,0 predomina a forma CO_2 . Entre pH 6,0 e 10,0 a forma HCO_3^- é dominante e acima do pH 10,0 a forma CO_3^{2-} é dominante. A partir do pH 13,0 o íon carbonato torna-se exclusivo.

Dentre os principais nutrientes do meio em fermentação para as microalgas, a fonte de carbono é o maior responsável pelo pH básico (SIMMONS et al., 1979).

3.3.2 UTILIZAÇÃO DE UMA FONTE DE NITROGÊNIO

A *Spirulina* não fixa nitrogênio atmosférico, exceto a *Spirulina labyrinthiformis*, que é uma espécie termofílica, sendo com isto obrigatória a suplementação deste nutriente no meio de cultivo (CIFERRI & TIBONI, 1985).

Segundo BOUSSIBA (1989), a uréia como fonte de nitrogênio pode servir como ótima fonte para o crescimento de microalgas verde-azuladas.

O mesmo autor verificou que a *Spirulina platensis* pode crescer perfeitamente em duas fontes de nitrogênio, nitrato e amônia, dando preferência para o segundo.

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 dos ácidos graxos pode ser afetada pela condições drásticas de falta deste nutriente (FUNTEU et al., 1997).

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

Em todas microalgas, aumentando-se a quantidade de nitrogênio, no meio aumenta-se a quantidade de biomassa produzida (PIORRECT et al., 1984).

Segundo MAHAJAN & KAMAT (1995), a uréia como fonte de nitrogênio tem mostrado ser o mais efetivo composto para a produção de biomassa bem como para a produção do ácido graxo γ -linolênico.

O mesmo autor verificou que dentre diversas fontes de nitrogênio estudadas, KNO_3 , NaNO_3 , uréia, NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nas concentrações de 0,01, 0,03 e 0,05M, a uréia à de 0,01M suportou uma maior quantidade de γ -linolênico, o qual foi de 20,8 $\mu\text{g/ml}$, além disso a uréia apresenta menor custo e sua aquisição é controlada.

Foi também verificado pelo mesmo autor que aumentando a quantidade de nitrogênio no tanque de fermentação, aumenta a concentração de biomassa, e que, com baixas quantidades de nitrogênio, a microalga continha altas concentrações de lipídeos (45% da biomassa), sendo que mais de 75% destes lipídeos eram neutros. Foi também constatado que com altas quantidades de nitrogênio, esta quantidade de lipídeos caiu para 20 % do peso seco da microalga, e com isto a quantidade de proteína poderia subir de 8 até 54% da matéria seca.

Adicionalmente, FAITUCH (1989) concluiu que a *Spirulina* sobrevive satisfatoriamente em meios pouco concentrados de uréia em tanques fechados em processos de batelada simples. Por outro lado, o mesmo autor verificou que na concentração acima de 300 miligramas por litro, em recipientes fechados, existe uma inibição da microalga por este substrato.

Confirmando esses resultados, CEZARE (1998) concluiu que no processo por batelada simples, em frascos erlenmeyers, a *Spirulina platensis* resistiu satisfatoriamente a adição de 0,1 grama de uréia por litro de meio de cultura, com concentração celular inicial no cultivo igual a 50 miligramas por litro (expressa em massa seca) . A mesma autora também concluiu que acima de 0,5 gramas por litro de uréia no meio de cultivo, as células não resistiam mais que 48 horas nas mesmas condições de cultivo.

3.3.3- *INTENSIDADE LUMINOSA*

Observa-se a dependência do crescimento celular em função da intensidade luminosa. Assim há correspondência entre o aumento da energia luminosa recebida e o crescimento celular, entretanto, limitada por certos mecanismos enzimáticos do microrganismo. Este limite é denominado ponto de saturação luminosa, sendo da ordem de 5 a 10 Klux para cianobactérias (BALLONI et al., 1980). Tal constatação experimental indica que a máxima velocidade de crescimento celular é limitada por outros processos, além da assimilação de carbono e nitrogênio.

3.3.4- *EFEITO DO SOMBREAMENTO*

Além das limitações fisiológicas para o aumento celular, devemos considerar o sombreamento. Tal efeito é a consequência do aumento populacional microbiano. Através deste aumento celular, a quantidade de luz disponível para cada célula é atenuada, passando a não ser mais homogênea sua distribuição na cultura. Quando o efeito do sombreamento passa a ser significativo, isto é, limita a luz disponível, o crescimento celular passa para uma fase linear, na qual a quantidade de biomassa produzida por unidade de tempo depende principalmente da quantidade de luz que a célula recebe (RICHMOND, 1983).

3.3.5- FASES DE CRESCIMENTO

Durante os experimentos, verifica-se a presença de uma fase de indução (lag) fase, após o qual a velocidade específica de crescimento aumenta até o valor máximo, característico das condições da cultura (PIRT, 1975).

Com respeito a verdadeira fase lag (indução), têm-se como causas: alteração de nutrientes; mudanças nas condições físicas do meio; presença de inibidores; germinação de esporos e condições de inóculo (PIRT, 1975).

A duração da fase exponencial é diretamente proporcional à intensidade luminosa e inversamente proporcional à concentração celular inicial (TAMYA, 1979).

Após o período de crescimento, a cultura entra em fase estacionária, a qual é causada por exaustão de nutrientes, inibição química ou estresse (fadiga física). A fase de declínio, caracterizada por autólise e decréscimo de biomassa, pode se iniciar após a fase estacionária ou imediatamente após o término do crescimento.

3.3.6-Outros Fatores que interferem no Crescimento da *Spirulina*

Os três principais fatores ambientais que governam a produção de biomassa algal são nutrientes, temperatura e luz (PIRT, 1975).

A agitação, também é um fator importante a ser considerado no crescimento da *Spirulina*, pois com esta agitação mantém-se as células em suspensão no meio líquido, prevenindo assim a sedimentação de nutrientes e fornecendo a célula igual distribuição de luz, garantindo assim a homogeneização da cultura (BECKER & VENKATARAMAN, 1980).

3.4- ASPECTOS ECONÔMICOS DA UTILIZAÇÃO DE *Spirulina* Como Biomassa

PIORRECT et al., (1984) demonstraram que com o uso da *Spirulina* a cultura de microalgas teve um avanço muito grande, pois estas não apresentavam problemas como as microalgas *Chlorella* e *Scenedesmus*, utilizadas anteriormente.

Estes problemas são atenuados, segundo o autor, principalmente por que espécies de *Spirulina* apresentam :

- menor risco de contaminação no cultivo, pois a *Spirulina* por ter um pH alto em seu meio de cultivo é muito menos propensa à contaminação;

- tamanho maior, o que facilita a separação do meio de cultura;

- fácil digestão, já que as anteriores, (*Chlorella* e *Scenedesmus*) possuem uma parede celulósica de baixa digestibilidade;

- proteínas com baixa quantidade ácidos nucléicos , o que não ocorre com as outras espécies de microalgas citadas.

- biomassa e outros componentes, tais como: vitaminas A, clorofila, ácidos graxos essenciais, etc, proporcionando características para que seja considerado um complemento alimentar de grande importância.

Corroborando com o assinalado por PIORRECT et al., (1984), CIFERRI & TIBONI (1985) mostraram que a composição da biomassa de

Spirulina incluindo o alto teor de proteína, a baixa concentração de ácidos nucleicos, a ocorrência de alta concentração de vitaminas e outros fatores, como por exemplo, o baixo uso de energia para a coleta da biomassa, fazem da *Spirulina* uma ótima fonte de componentes nutricionais, de alto valor nutritivo.

3.5-PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO

Processo descontínuo alimentado é definido como sendo aquele em que o fermentador é continuamente alimentado com substrato sem que haja saída do meio em fermentação, a não ser no final desta.(DUNN & MOR, 1975)

Como consequência, este tipo de operação leva ao aumento contínuo do volume da dorna. Terminada a fermentação, a descarga pode ser efetuada total ou parcialmente, sendo neste último caso denominado processo descontínuo alimentado cíclico.(PIRT, 1974)

PIRT (1974) afirmou que “talvez a aplicação mais importante do processo descontínuo alimentado está no controle de metabólitos secundários ou na formação de produtos não ligados ao crescimento celular ”.

JONES & ANTHONY (1972) argumentaram que a flexibilidade do processo descontínuo alimentado tem sido um dos maiores fatores que determinam a utilização deste em escala industrial.

DUNN & MOR (1975) citam que o processo descontínuo alimentado e contínuo têm aplicações equivalentes em pesquisa na área de bio-engenharia.

CHEN & ZHANG (1997) mostraram que em culturas de *Spirulina*, no processo descontínuo alimentado, a concentração celular e a produção de ficocianinas é 5,1 e 2,8 maior que no processo por batelada.

O processo descontínuo alimentado com alimentação exponencialmente crescente, é muito utilizado em culturas nas quais poderemos ter uma inibição do microrganismo cultivado pelo substrato. Pois, a forma como são adicionados os nutrientes no meio de cultura atende as exigências do crescimento do microrganismo com o decorrer do tempo de cultivo, ou seja, as maiores taxas de alimentação de nutrientes ocorrerá nos instantes finais, correspondentes a maiores concentrações celulares.

Dessa forma, CEZARE (1998), em trabalho com uréia como fonte de nitrogênio, obteve produção de *Spirulina platensis* com concentrações no meio de cultivo equivalentes àquelas obtidas em meio com nitrato de potássio, como fonte de nitrogênio, que foi da ordem de 1200 mg de biomassa seca por litro de meio.

Além da batelada alimentada, outros tipos de processos de fermentação podem ser empregados para produção de biomassa. Dentre eles merecem destaque o processo de batelada clássica e o processo contínuo.

A biomassa algal pode crescer em sistemas classificados como abertos ou fechados. Nos sistemas fechados (batelada), a taxa de crescimento tende a zero, pois o acúmulo de produtos vai impedir o crescimento contínuo da biomassa e pode haver a falta de um certo tipo de nutriente específico com o decorrer da fermentação (PIRT, 1975).

O cultivo comercial de microalga por batelada clássica, significa, em termos práticos, que o crescimento da cultura é permitido até a término da fase exponencial, para então a biomassa será totalmente removida e uma nova batelada será inicializada.

No processo contínuo, como o nome já diz, a cultura cresce continuamente, a taxa de crescimento não tende a zero e não há falta de nenhum tipo de nutriente, pois há o fornecimento contínuo. Portanto, todo o crescimento é mantido na fase exponencial, sendo o produto retirado continuamente.

3.6-ÁCIDOS GRAXOS

3.6.1 – NOTAÇÃO QUÍMICA DOS ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos pode ser representados, no modo resumido, pelo número de átomos de carbono da molécula, seguido pelo número de duplas ligações da cadeia carbônica, estando entre parênteses a posição das duplas ligações, contando a partir do grupo carboxila . Por exemplo, o ácido carboxílico 18:2 (9,12), é um ácido graxo com 18 carbonos, 2 insaturações nos carbonos 9 e 12, contando do grupo carboxila. Outra forma de representar de modo resumido os ácidos graxos, em estudos bioquímicos e de nutrição, é citar a posição da primeira dupla ligação, contando a partir do grupo CH₃ metil terminal da molécula e assumindo que as demais duplas ligações estão em padrão metileno-interrompido e na conformação cis. Desta forma, os ácidos graxos podem ser divididos em famílias como n-9 ou w-9 (oléico-18:1), n6 ou w6 (linoléico-18:2, gama-linolênico-18:3) e n3 ou w3 (alfa-linolênico-18:3), onde n e w , representam o intervalo de carbonos entre as duplas ligações, até o número total de insaturações das respectivas moléculas dos ácido graxos (GUNSTONE & NORRIS, 1983;BELITZ & GROSCH, 1987).

3.6.2 - PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS PELA *SPIRULINA platensis*

Lipídeos são substâncias insolúveis em água, menos densas que ela, solúveis em solventes orgânicos e formados por cadeias carbônicas longas, estando presente em organismos vivos ou sendo obtido deles.

Segundo SONNTAG, (1979) e BELITZ & GROSCH, (1987) os ácidos graxos são os principais componentes da fração lipídica. São ácidos carboxílicos de cadeia longa podendo ser saturados ou insaturados.

Os ácidos graxos naturais, saturados ou insaturados, são normalmente compostos de cadeia reta com número par de átomos de carbono na molécula (ácidos ímpares, ramificados e cíclicos também existem) (GUNSTONE & NORRIS, 1983).

Na tabela I encontra-se a classificação de lipídeos, com seus respectivos ácidos graxos, mostrando a importância que fazem para constituição dos seres vivos.

Tabela I-Classificação dos Ácidos Graxos, segundo (NAWAR, 1985)

Classificação	Constituintes
<i>SIMPLES</i>	
ACILGLICERÓIS-	GLICEROL + ÁCIDOS GRAXOS
CERAS	ÁLCOOL GRAXO+ ÁCIDOS GRAXOS
<i>COMPOSTOS OU COMPLEXOS</i>	
FOSFOÁCILGLICERÓIS-	GLICEROL + ÁCIDOS GRAXOS + FOSFATO + GRUPO COM NITROGÊNIO
ESFINGOMIELINAS-	ESFINGOSINA + ÁCIDOS GRAXOS + FOSFATO +COLINA
CEREBRÓSIDOS-	ESFINGOSINA + ÁCIDOS GRAXOS + AÇUCAR SIMPLES
GANGLIÓSIDOS-	ESFINGOSINA + ÁCIDOS GRAXOS + AÇUCAR COMPLEXO
ÉSTERES DE ESTEROL-	ESTEROL + ÁCIDOS GRAXOS
<i>DERIVADOS</i>	
CAROTENÓIDES, ESTERÓIDES, VITAMINAS LIPOSSOLÚVEIS HIDROCARBONETOS.	

Os ácidos graxos essenciais (linoléico, linolênico, e araquidônico) não são sintetizados em organismos animais, devendo ser fornecidos pela alimentação (GUNSTONE, 1983; HOFFMAN, 1989)

A taxa de γ -linolênico do total de ácidos graxos das sementes de prímula chega a 7%, 8 % para *Mortierella* e para a *Spirulina platensis* varia de 8 a 31%, dependendo de como ela é cultivada (HIRANO et al., 1990)

Foi demonstrado por PIORRECK e BAACCH & POHL, (1984) em um estudo feito com várias microalgas, que, em todas elas, o metabolismo dos ácidos graxos e lipídeos era influenciado pela quantidade de nitrogênio no meio de cultivo, e que as microalgas tem a tendência para sintetizar lipídeos neutros com ácidos graxos com poucas insaturações com baixas quantidades de nitrogênio, e com altas quantidades de nitrogênio os lipídeos tendem a polaridade com ácidos graxos com maior número de insaturações. Foi demonstrado pelo mesmo autor que algas azul-esverdeadas podem ser manipuladas para produzirem uma quantidade específica de ácido graxo desejado e as algas verdes não apresentam esta característica.

COHEN, (1987) estudou 19 linhagens de *Spirulina* e verificou que apenas uma não continha o ácido graxo γ -linolênico, e que a quantidade e o perfil destes ácidos graxos desta alga depende das condições de como ela é cultivada, principalmente da temperatura, fonte de nitrogênio e intensidade luminosa. O mesmo autor verificou que com o decorrer do cultivo todas as linhagens de *Spirulina* aumentaram o teor do ácido graxo γ -linolênico. A temperatura de 30-35° mostrou ser a mais efetiva para a produção do γ -linolênico para a maior parte das linhagens, e que altas intensidades de luz e altas temperaturas não afetaram a composição dos ácidos graxos mas afetaram drasticamente a quantidade dos mesmos.

GRATTAN, (1989) observou que o ácido graxo γ -linolênico constituiu acima de 40% do total de ácidos graxos, dentro dos

galactolipídeos isolados da *Spirulina* e uréia como fonte de nitrogênio é mais efetiva dando uma produção maior do ácido γ -linolênico do que em outras fontes de nitrogênio. O mesmo autor verificou que a *Spirulina* é uma rica fonte de proteínas, vitaminas hidrossolúveis, beta caroteno e principalmente de ácidos graxos polinsaturados

Foi demonstrado por COHEN, (1990) que a *Spirulina* é uma grande produtora de ácidos graxos polinsaturados (18:3), (16:1), (16:2). MAHAJAM & KAMAT, (1995) mostraram que uréia como fonte de nitrogênio pode aumentar a quantidade do ácido graxo γ -linolênico na *Spirulina platensis*, e demonstraram também, que a produção deste ácido graxo depende da temperatura de cultivo, bem como do tempo de cultivo, pois em cultivos mais antigos (144 horas de cultivo) a biomassa apresentou 26 % a mais do ácido graxo γ -linolênico do que em cultivos novos.

3.6.3–PRODUÇÃO DO γ -LINOLÊNICO POR OUTRAS FONTES

Foi relatado por COHEN (1993) que o ácido graxo γ -linolênico é encontrado em quantidades razoáveis nas sementes de primula, frutos de groselhas pretas, e borragem e também pode ser encontrado em fungos e cianofíceas.

MAHAJAN & KAMAT (1995), complementaram as informações de COHEN (1993), citando os teores em que o ácido aparece nesses materiais: nos óleos de sementes de Primula (7-10 %), nos frutos de groselhas pretas (15-20 %), nas borragens (21-25 %). Adicionalmente, afirmaram que o γ -linolênico também é produzido por fungos: os *Rhizopus*, *Mucor* e *Mortierella*, sendo nos últimos encontrados em teores de 3% da matéria seca.

Foi demonstrado por GRATTAN (1989), que na *Spirulina*, o ácido graxo γ -linolênico, é quatro vezes maior do que nas sementes de evening primrose.

PIORRECK et al., (1984) apresentam *Microscystis aeruginosa* como uma grande produtora do ácido graxo γ -linolênico. Não esgotando as fontes de γ -linolênico, COHEN et al.,(1991) relatam que microalgas marinhas vermelhas como *Porphyridium cruentum* também são produtoras do γ -linolênico.

3.6.4-IMPORTÂNCIA DO γ -linolênico

O ácido graxo γ -linolênico (GLA) é um ácido graxo essencial, não sendo sintetizado pelo organismo tendo que ser ingerido por uma alimentação suplementar.

JAMES & CARTER, (1988) demonstraram que uma quantidade de ácido graxo γ -linolênico que deveria ser encontrada no plasma sanguíneo de humanos seria de aproximadamente 25 mg/ml.

O ácido graxo γ -linolênico (GLA) mostrou ter muitas atividades terapêuticas (HUANG et al., 1984). Testes em crianças têm mostrado que o GLA é um benefício para tratamentos de eczemas tópicos (WRIGHT & BURTTON, 1982), enquanto que, em mulheres, ele reduz a severidade do síndrome pré-menstrual (HORROBIN, 1983).

Segundo MARSIC & YODICE (1992), considerando a composição em ácidos graxos dos principais óleos e gorduras vegetais e animais utilizados na alimentação humana, existe uma proporção maior de ácidos graxos saturados, o que favorece o aumento do nível de colesterol sanguíneo (mau colesterol LDL).

Foi verificado pelos mesmos autores que a ingestão de ácidos graxos polinsaturados levam a formação do HDL (bom colesterol), que

ajuda a retirar o excesso do mau colesterol (LDL) da corrente sanguínea.

Ainda segundo COHEN et al., (1987), o ácido graxo γ -linolênico tem efeito positivo em doenças do coração, mal de Parkinson e em casos de esclerose múltipla .

4-MATERIAL E MÉTODOS

4.1-Cepa Empregada

A cepa *Spirulina platensis*, proveniente do Laboratório de Microbiologia Zootécnica da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga, foi , gentilmente cedida pelo Prof. Dr Rogério Lacaz Ruiz.

4.2-Temperatura

Foram empregadas temperaturas de 25 °C (LYNCH & THOMPSON , 1984). A temperatura do meio em fermentação foi mantida por aquecimento com auxílio de resistências e controlada por meios de termostatos. O tanque de fermentação era colocado em uma sala com temperatura controlada (17°C) para um melhor controle da temperatura interna (do meio) e externa (temperatura ambiente).

4.3-Luminosidade

As luminosidades empregadas foram de 3,5 Klux (FAINTUCH, 1989) , que foram obtidas por meio de lâmpadas fluorescentes de 40 watts.

4.4-Dispositivo para cultura

Dentre os inúmeros sistemas de algacultura descritos na literatura (KOSARIC et al., 1974; BALONNI et al., 1981, 1983), adotamos os mini-tanques (mini ponds) de forma alongada. Estes tanques foram construídos de lâminas de PVC de cor branca. A movimentação da cultura foi executada por pás rotativas na frequência de 23 rotações por minuto, sendo a iluminação feita de acordo como descrito anteriormente (item 4.3).

Uma fotografia dos tanques pode ser vista na figura III

Figura III-Fotografia dos mini-tanques utilizados para a realização dos experimentos

4.5-Manutenção da cultura

Foi utilizado o meio mineral (item 4.7), onde eram colocados 200 ml de meio puro, mais um volume da suspensão de *Spirulina platensis* (1 ml). Este repique da cepa era executado assepticamente em câmara de fluxo laminar. Após o repique os erlenmeyers eram colocados em shakers (100 RPM) a uma temperatura de 30 °C, com uma intensidade luminosa de 3,5 Klux.

4.6-Preparo do inóculo

O inóculo era preparado usando um volume de suspensão de *Spirulina* em crescimento exponencial, isenta de contaminação, de tal forma que a concentração inicial (em massa seca) fosse de 50 miligramas/litro, e que o volume da suspensão de inóculo não exceda 10% do volume útil dos mini-tanques.

4.7-Meio Utilizado

Utilizou-se meio mineral (PAOLETTI et al. 1975), modificando sua fonte de nitrogênio de nitrato de potássio por uréia, para o crescimento, cuja composição, em gramas por litro, é a seguinte:

NaCl	0,92
Na ₂ SO ₄	1,88
Na ₂ HPO ₄	0,50
Na ₂ CO ₃	8,89
NaHCO ₃	15,15
CaCl ₂ .H ₂ O	0,05
* KNO ₃	2.57
MgSO ₄ .7H ₂ O	2.57
solução de Fe-EDTA	1,0 ml
solução de microelementos	1,0 ml

- Solução de Fe EDTA: (miligramas por litro)

EDTA-Na ₂	29,8
FeSO ₄ 7H ₂ O	24,9

- Solução de microelementos(miligramas por litro)

Sn.Cl ₂ .2H ₂ O	304
Mn.Cl ₂ .4H ₂ O	173
Co.Cl ₂ .6H ₂ O	194
Se.Cl ₂ .6H ₂ O	146
BaCl ₂ .2H ₂ O	183
Li.Cl	293
CuSO ₄ .5H ₂ O	186
FeSO ₄ .7H ₂ O	704
NiSO ₄ .6H ₂ O	717
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	121

OBSERVAÇÕES

*Foi utilizada neste trabalho, uma outra fonte de nitrogênio (uréia), substituindo assim o KNO₃, como já foi dito no item 2 (objetivo).

O valor para a quantidade de uréia total a ser adicionado no tanque durante todo o cultivo foi inicialmente baseado no trabalho de CEZARE (1998), que cultivou *Spirulina platensis* tendo uréia como fonte de nitrogênio. No seu trabalho, o cultivo foi feito em frascos erlenmeyers contendo 200ml de meio.

Foram feitos testes para verificação da melhor massa inicial de uréia. A massa inicial de uréia foi determinada como 400mg por 5 litros, ou seja 80 mg por litro, valor maior que no trabalho de CEZARE (1998), que foi de 40 mg por litro.

Após estes testes preliminares, também se optou pelo aumento da quantidade total de uréia adicionada por volume de meio, levando-se em conta que o tanque era aberto, ao contrário do trabalho de CEZARE (1998), facilitando-se assim a evaporação de amônia do meio para o ambiente.

4.8-PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram conduzidos seguindo um planejamento estatístico, com duas variáveis, fatorial de 2 níveis com ponto central rotacional octogonal, resultando num planejamento tipo estrela, onde se trabalha com 5 níveis das variáveis independentes.

As variáveis estudadas foram MUT(massa total de uréia adicionada), Ta (tempo de alimentação). Através deste planejamento, verificou-se a influência destes parâmetros simultaneamente no processo fotossintético.

4.8.1-NÚMEROS DE EXPERIMENTOS E VALORES DOS NÍVEIS DAS VARIÁVEIS

Através do método estatístico escolhido (NETO et al., 1986), chegamos ao o número de experimentos a serem realizados. Através da equação $M_a = M_0 \cdot e^{+K \cdot T}$, fixando M_0 , MUT e Ta conseguimos encontrar os valores de K (constante de tempo- (dia^{-1}) para cada tipo de processo. Devemos salientar que quando $T = T_a$, $M_a = \text{MUT}$. Com este valor de K encontrado e seguindo a mesma equação $M_a = M_0 \cdot e^{+K \cdot T}$ conseguiu-se encontrar M_a (massa de uréia adicionada até o instante T) para cada dia . Por diferença entre o valor de M até o instante T e o valor que foi adicionado até (T^{-1}), chegamos ao valor da massa a ser adicionada no correspondente instante T. No apêndice B, estão as tabelas correspondentes as adições de uréia, que foram feitas diariamente até $T = T_a$

Os valores para M_0 igual a 400mg/L (massa inicial de uréia) foram conseguidos através de testes preliminares, como pode ser visto no apêndice A, nas tabelas A1 e A2.

4.8.2-NÍVEIS DAS VARIÁVEIS INDEPENDENTES E O PONTO CENTRAL

Tabela II- Nível das Variáveis independentes e o ponto central com seus valores codificados

VARIÁVEL	VALOR ORIGINAL			VALOR CODIFICADO		
tempo de alimentação(dias)	10	12	14	-1	0	1
Ta						
massa de uréia total adicionada (mg)	1750	2500	3250	-1	0	1
MUT						

Como este estudo apresentou 2 variáveis e foi feito a variabilidade do ponto central (MUT = 2500 mg; Ta= 12 dias), experimento 2 e 6 , ver tabela III, resultou num total de experimentos igual a dez (10), ou seja 8 (oito) experimentos diferentes mais duas vezes o ponto central

Devemos neste ponto fazer alguns esclarecimentos:

*O experimento 14 não estava previsto no planejamento experimental, só sendo feito para confirmar resultados.

**A cada conjunto de três experimentos do planejamento experimental, foi acompanhado um experimento padrão, no qual o processo foi por batelada, e a fonte de nitrogênio era o KNO₃. Isto foi feito para comparação de resultados, visto que não se tem na literatura comparações entre crescimento de *Spirulina* em meio de KNO₃ como

fonte de nitrogênio e uréia, adicionada no decorrer do processo fermentativo, em escala de mini-tanques.

Tabela III- matriz do planejamento experimental, com os respectivos experimentos padrão para cada grupo de três experimentos realizados.

Experimento	MUT (mg)	Ta (dias)
1	Padrão	Padrão
2	2500	12
3	2500	15
4	3250	14
5	Padrão	Padrão
6	2500	12
7	1375	12
8	1750	10
9	Padrão	Padrão
10	1750	14
11	3250	10
12	3625	12
13	Padrão	Padrão
14	3250	10
15	2500	9

MUT-massa de uréia total adicionada

Ta-Tempo de alimentação

Tabela IV- matriz do planejamento experimental com valores codificados, com os respectivos experimentos padrão para cada grupo de três experimentos realizados.

Experimento	MUTc (mg)	Tac (dias)
1	Padrão	Padrão
2	0	0
3	0	1,5
4	1	1
5	Padrão	Padrão
6	0	0
7	-1,5	0
8	-1	-1
9	Padrão	Padrão
10	-1	1
11	1	-1
12	1,5	0
13	Padrão	Padrão
14	1	-1
15	0	-1,5

MUTc=valor codificado de MUT;

Tac =valor codificado de Ta

4.9-TÉCNICAS ANALÍTICAS

4.9.1 Acompanhamento da Fermentação

A biomassa de *Spirulina platensis* era coletada por filtração em tela de polyester com diâmetro médio dos poros de 50 micras.

4.9.1.1-Determinação da concentração celular

Diariamente, uma amostra de 10ml de *Spirulina platensis*, era coletada, homogeneizada mecanicamente por agitador magnético. O material era então transferido para cubetas e analisado em espectrofotômetro a 560 nm, utilizando como branco água destilada. A nível laboratorial, para determinação da concentração celular usamos a relação entre concentração, em matéria seca e transmitância.

4.9.1.2-Avaliação da intensidade luminosa

Neste estudo optou-se por medidas fotométricas da intensidade de luz. Foi usado um fotômetro para fazer tais medidas.

4.9.1.3-Cálculo do consumo de carbono total pela célula com o decorrer do tempo de fermentação.

Foi utilizado um método químico no qual toda fonte de carbono será convertida para carbonato (CO_3^{--}) pelo deslocamento do equilíbrio, com adição de hidróxido de sódio, assegurando que o pH do meio permaneça no mínimo em 13, daí fazendo uma titulação com ácido clorídrico

4.9.1.4-Determinação da Concentração de Amônia Livre

O meio de fermentação era filtrado em filtro millipore em membranas de 10 micrômetros, era coletado 10 mL de amostra para a leitura da concentração de amônia livre. Esta leitura era feita com um eletrodo seletivo de amônia marca ORION, modelo 71A.

Como existe no meio de cultura um equilíbrio dos íons amônia e amônio, e o eletrodo foi sensível apenas aos íons amônia, foi necessário utilizar uma solução de hidróxido de sódio para aumentar o pH da amostra coletada.

Com o aumento do pH, em torno de 13, todo o íon amônio era convertido para amônia, pode-se assim ser detectado pelo aparelho.

Este método exigia uma curva de calibração diária, com cinco diluições diferentes de uma solução padrão de 1 molar de cloreto de amônio que eram de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , as quais eram adicionados de base (NaOH), para o pH se tornar básico. Com isto eram determinadas as relações de milivoltagem e concentrações. Obtinha-se assim uma curva que relacionava o logaritmo da concentração de amônia e a leitura no aparelho em milivolts.

4.9.1.5-Determinação da Concentração de Amônia Total e Uréia Residual

Para que fosse feita esta análise, realizou-se a hidrólise da uréia em um bloco digestor.

Vários testes preliminares foram feitos para que se chegasse a um tempo padronizado de digestão e volume de ácido sulfúrico ao fim de que toda a uréia presente no meio sofresse uma hidrólise ácida.

Eram colocados tubos no bloco digestor com amostras do meio em fermentação, foi adicionado um volume de ácido sulfúrico com um tempo de reação de no mínimo de 10 horas.

Feita a hidrólise, a solução era colocada em tubos de ensaio para se medir a quantidade de amônia total, com o mesmo procedimento da amônia livre.

Considerou-se amônia total, a amônia livre que já está disponível a célula que foi medida anteriormente mais a amônia proveniente da hidrólise da uréia.

Através deste procedimento, por diferença, e sabendo-se que na decomposição de 1 mol de uréia formam-se 2 moles de amônio, conseguiu-se determinar a quantidade de uréia residual ao longo do processo fermentativo.

4.9.1.6-Determinação do pH do meio de Cultura

O valor do pH do meio de cultura foi medido diariamente, com um potenciômetro ANALYSER, modelo pH ION, modelo 400.

Eram coletados aproximadamente 7 ml dos frascos em agitação para a análise do pH.

4.9.2-Avaliação da Biomassa Obtida

4.9.2.1-Proteínas totais

Determinou-se o teor protéico total através do clássico método de KJELDHAL, adotando-se o fator de 6,25 para a correlação a partir dos teores de nitrogênio total (OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS, 1984)

4.9.2.2.-Lipídeos

4.9.2.2.1-Lipídeos Totais

A fração lipídica total foi obtida por extração com solvente orgânico. A amostra era triturada em gral e então transferida para um extrator contínuo de Soxhlet com refluxo de hexano por 4 horas. O resíduo era submetido a uma nova extração com solvente mais polar, no caso, a mistura de clorofórmio-metanol (2:1 v/v) por mais 4 horas. Os extratos obtidos foram reunidos e lavados a seco em evaporador rotativo a vácuo. O material obtido reúne ácidos graxos, triglicerídeos, fosfolipídeos, carotenóides, pigmentos fotossintetizantes, esteróides e hidrocarbonetos, sendo chamados de fração lipídica total (FERRAZ et al., 1983).

4.9.2.2.2-Esterificação de ácidos graxos

Efetuuou-se a metilação dos ácidos graxos, segundo HARTMAN & LAGO (1973), com KOH 0,5 N e solução reagente em metanol, visando a análise por cromatografia gasosa.

4.9.2.2.3-Perfil dos ácidos graxos produzidos.

A cromatografia gasosa, para análise de ácidos graxos, foi realizada em cromatógrafo VARIAN modelo 3300, equipado com: detector por ionização em chama; injetor split, razão de 100:1; coluna capilar de sílica fundida, 30 m de comprimento x 0,30 mm de diâmetro interno e contendo 0,25µm de polietileno glicol (DB-WAX da J & W Scientific, Califórnia, USA) e integrador processador INTRALAB 4290. As condições cromatográficas serão: temperatura da coluna de 150°C por 11 min, programada até 210°C numa razão de 3°C/min; gás de arraste, hidrogênio numa vazão de 1,26ml/min com velocidade linear de 39,4 cm/s; gás “make-up”, nitrogênio a 30 ml/min; temperatura do injetor; 250°C; e temperatura do detector, 280°C.(BRAGAGNOLO, 1997)

4.9.2.3-Cinzas

O teor de cinzas foi obtido por gravimetria calcinando-se a biomassa, previamente dessecada, em mufla a 550°C

4.9.2.4-Umidade

A biomassa de *Spirulina platensis* era separada por filtração em telas de poliéster (diâmetros dos poros de 50 micras) e lavada com água destilada. O concentrado obtido apresenta cerca de 85% de água, sendo levado a secar em estufa por cerca de 24 horas (37°C) e posteriormente a 57°C até massa constante. Neste estágio o material obtido pode ser

conservado embalado e armazenado a temperatura de freezer por vários meses sem alterações. Para análise química da biomassa usou-se o mesmo processo. Esta foi seca em estufa a 37°C por 24 horas e depois a 57°C até massa constante (TREDICI, 1984).

4.9.2.5-*Carboidratos Totais*

Os carboidratos totais foram conseguidos por diferença.

5- RESULTADOS

Todos os dados são apresentados a seguir em tabelas e gráficos como concentração celular (X), pH e concentração de carbonato, medidos conforme procedimentos já descritos.

As tabelas onde não são encontrados valores para amônia livre, amônia total e uréia residual são as tabelas relacionadas aos experimentos padrão, onde a fonte de nitrogênio era o nitrato de potássio. Estes experimentos foram feitos para acompanhamento das fermentações dos experimentos em que a fonte de nitrogênio eram com uréia. Nestes experimentos padrões o processo fermentativo foi de batelada simples, diferente dos outros, onde o processo fermentativo era por batelada alimentada, com alimentação exponencialmente crescente.

*5.1 – MONITORAMENTO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE *S. platensis**

Foram acompanhados diariamente a concentração celular, pH, concentração de amônia livre e amônia total, concentração de uréia residual, com seus resultados apresentados nas seguintes tabelas (1 a 15) e figuras (1 a 45).

TABELA 1: Resultados do monitoramento do processo de produção de *S. platensis* relativos ao experimento 1-Experimento padrão

T (dias)	X. (mg/L)	Carbonato (g/L)	pH
0	39	-	9,8
1	83	-	9,8
2	122	18,31	10,1
3		-	
4	260	17,0	10,4
5	358	-	10,0
6	428	13,51	10,2
7	475	-	10,3
8	585	13,51	10,4
9			
10	600	13,51	10,5
11	644	-	10,5
12	659	11,33	10,3
13	895		10,5
14	765	11,33	10,3
15	734	-	10,7
16	1015	10,9	10,6
17		-	
18	928	10,02	10,5
19	928

FIGURA 1: Crescimento celular da *S.platensis* no experimento 1

FIGURA 2: Variação do pH no experimento 1

FIGURA 3: Variação da concentração de carbonato no experimento 1

TABELA 2: Resultados do monitoramento do processo de produção de *S. platensis* relativos ao experimento 2-(MUT=2500 mg, Ta=12 dias)

T (dias)	X. (mg/L)	Carbonato (g/L)	Amônia livre (mol/L)	Amônia total (mol/L)	Uréia (mg/L)	pH
0	38	-				9,7
1	97	-				9,8
2	190	16,96	0,000104	0,000991	26,6	10,1
3		-				
4	391	15,68	5,57E-06	0,000286	8,4	10,4
5	419	-				10,1
6	629	14,84	1,42E-05	0,000113	3,0	10,3
7	760	-				10,2
8	895	13,99	1,32E-05	8,88E-05	2,3	10,5
9		-				
10	911	12,29	3,77E-05	7,9E-05	1,2	10,6
11	997	-				10,5
12	1105	11,87	1,88E-05	0,000406	11,6	10,5
13	1181					10,5
14	1200	11,87	5,89E-06	0,000108	3,0	10,4
15	1259	-				10,7
16	1341	11,66	2,79E-05	8,32E-05	1,7	10,8
17		-				
18	1470	11,44				10,6
19	1470					

experimento 2

FIGURA 4: Crescimento celular da *S. platensis* no experimento 2

FIGURA 5: Variação do pH no experimento2

FIGURA 6: Variação da concentração de carbonato no experimento 2

TABELA 3: Resultados do monitoramento do processo de produção de *S. platensis* relativos ao experimento 3 (MUT=2500 mg, Ta= 15 dias)

T (dias)	X. (mg/L)	Carbonato (g/L)	Amônia livre (mol/L)	Amônia total (mol/L)	Uréia (mg/L)	pH
0	38	-				9,7
1	93	-				9,7
2	178	15,69	8,38E-05	0,00072	19,1	9,9
3		-				
4	380	15,26	5,01E-06	0,000216	6,3	10,5
5	393	-				10,0
6	594	15,13	3,19E-05	5,93E-05	0,8	10,3
7	717	-				10,3
8	856	13,08	5,9E-06	0,000267	7,8	10,5
9		-				
10	895	12,95	2,64E-05	5,55E-05	0,9	10,6
11	845	-				10,5
12	980	12,64	9,02E-06	0,000262	7,6	10,5
13	1259					10,5
14	1280	12,08	2,86E-06	7,85E-05	2,3	10,5
15	1320	-				10,6
16	1493	12	2,97E-05	0,00013	3,0	10,6
17		-				
18	1515	10,02				10,6
19	1493					

experimento 3

FIGURA 7: Crescimento celular da *S. platensis* no experimento 3

FIGURA 8: Variação do pH no experimento 3

FIGURA 9: Variação da concentração de carbonato no experimento 3

TABELA 4: Resultados do monitoramento do processo de produção de *S. platensis* relativos ao experimento 4 (MUT= 3250 mg, Ta= 14 dias)

T (dias)	X. (mg/L)	Carbonato (g/L)	Amônia livre (mol/L)	Amônia total (mol/L)	Uréia (mg/L)	pH
0	38	-				9,7
1	90	-				9,7
2	166	18,31	9,81E-05	0,000512	12,4	9,8
3		-				
4	338	17,44	3,93E-06	0,000313	9,3	10,4
5	320	-				9,9
6	568	17,00	7E-06	0,000151	4,3	10,2
7	639	-				10,1
8	760	15,69	3,15E-06	0,000262	7,8	10,4
9		-				
10	674	13,73	5,81E-06	9,62E-05	2,7	10,5
11	750	-				10,4
12	895	13,73	8,3E-06	8,69E-05	2,4	10,4
13	997					10,4
14	1015	13,73	1,75E-05	7,7E-05	1,8	10,3
15	895	-				10,4
16	1162	13,95	1,28E-05	0,000152	4,2	10,5
17		-				
18	1069	12,2				10,5
19	1069

FIGURA 10: Crescimento celular da *S. platensis* no experimento 4

FIGURA 11: Variação do pH no experimento 4

FIGURA 12: Variação da concentração de carbonato no experimento 4

TABELA 5: Resultados do monitoramento do processo de produção de *S. platensis* relativos ao experimento 5 (Experimento padrão)

T (dias)	X. (mg/L)	Carbonato (g/L)	pH
0	40	-	9,8
1	49	-	9,5
2		17,87	10,1
3		-	
4	127	17,44	10,2
5	178	-	10,1
6	223	17,00	10,2
7	297	-	10,0
8	368	15,26	10,4
9		-	
10	414	14,82	10,5
11	629	-	10,5
12	516	14,82	10,5
13	757		10,6
14	737	14,38	10,7
15		-	
16		11,33	

experimento 5

FIGURA 13: Crescimento celular da *S.platensis* no experimento 5

FIGURA 14: Variação do pH no experimento 5

FIGURA 15: Variação da concentração de carbonato no experimento 5

TABELA 6: Resultados do monitoramento do processo de produção de *S. platensis* relativos ao experimento 6 (MUT=2500 mg, Ta= 12 dias)

T (dias)	X. (mg/L)	Carbonato (g/L)	Amônia livre (mol/L)	Amônia total (mol/L)	Uréia (mg/L)	pH
0	53	-				9,7
1	140	-				9,5
2		19,58	0,000152	0,001249	32,9	10,0
3		-				
4	469	18,31	1,63E-05	0,000269		7,6
5	447	-				10,2
6	697	16,13	2,29E-05	0,000165	4,3	10,4
7	806	-				10,1
8	958	15,26	3,38E-06	0,000168	5,0	10,5
9		-				
10	1141	15,26	6,45E-05	0,000899	25,0	10,7
11	1188	-				10,6
12	1246	14,82	1,17E-05	0,000222	6,3	10,6
13	1456					10,7
14	1456	14,82	0,000133	0,000905	23,2	10,8
15		11,33				
16						

experimento 6

FIGURA 16: Crescimento celular da *S.platensis* no experimento 6

FIGURA 17: Variação do pH no experimento 6

Figura 18: Variação da Concentração de carbonato no experimento 6

TABELA 7: Resultados do monitoramento do processo de produção de *S. platensis* relativos ao experimento 7 (MUT=1375 mg, Ta=12 dias)

T (dias)	X. (mg/L)	Carbonato (g/L)	Amônia livre (mol/L)	Amônia total (mol/L)	Uréia (mg/L)	pH
0	53	-				9,7
1	127	-				9,5
2		18,31	5,66E-05	0,001811	52,6	10,0
3		-				
4	403	17,00	4,18E-05	0,001218	35,3	10,2
5	447	-				10,1
6	603	16,59	1,6E-05	0,000323	9,2	10,3
7	697	-				10,1
8	804	15,69	0,000107	0,000374	8,0	10,5
9		-				
10	958	15,26	4,02E-05	0,000653	18,4	10,7
11	1104	-				10,6
12	1175	14,82	3,71E-06	0,000212	6,3	10,6
13	1477					10,7
14	1435	14,82	1,16E-05	0,000322	9,3	10,8
15		-				
16		11,33	1,74E-05	0,000297	8,4

FIGURA 19: Crescimento celular da *S. platensis* no experimento 7

FIGURA 20: Variação do pH no experimento 7

FIGURA 21: Variação da concentração de carbonato no experimento 7

TABELA 8: Resultados do monitoramento do processo de produção de *S. platensis* relativos ao experimento 8 (MUT=1750 mg, Ta=10 dias)

T (dias)	X (mg/L)	Carbonato (g/L)	Amônia livre (mol/L)	Amônia total (mol/L)	Uréia (mg/L)	pH
0	50	-				9,7
1	122	-				9,6
2		17,87	7,78E-05	0,001064	29,6	10,0
3		-				
4	391	16,56	2,84E-05	0,000223	5,8	10,3
5	461	-				10,2
6	536	15,26	6,12E-06	5,65E-05	1,5	10,3
7	728	-				10,0
8	713	15,26	1,05E-06	0,000717	21,5	10,5
9		-				
10	931	14,82	8,42E-06	0,000971	28,9	10,6
11	965	-				10,6
12	1108	14,82	7,51E-06	0,000198	5,7	10,6
13	1241					10,7
14	1088	13,08	8,2E-06	0,00139	41,4	10,7
15		-				
16		11,33

FIGURA 22: Crescimento celular da *S.platensis* no experimento 8

FIGURA 23: Variação do pH no experimento 8

FIGURA 24: Variação da concentração de carbonato no experimento 8

TABELA 9: Resultados do monitoramento do processo de produção de *S. platensis* relativos ao experimento 9 (Experimento Padrão)

T dias)	X (mg/L)	Carbonato (g/L)	pH
0	47	-	9,7
1	84	-	9,2
2	141	19,7	9,7
3	200	-	9,6
4	290	18,29	9,8
5		-	10,0
6	449	18,29	10,4
7	570	-	10,2
8		18,29	10,2
9	606	-	10,3
10	841	15,94	
11		-	10,3
12	1015	14,07	10,4
13	1335		10,4
14	1164	14,07	10,5
15	1053	-	10,6
16	1248	12,66	
17	1439		

experimento 9

FIGURA 25: Crescimento celular da *S. platensis* no experimento 9

FIGURA 26: Variação do pH no experimento 9

FIGURA 27: Variação da concentração de carbonato no experimento 9

TABELA 10: Resultados do monitoramento do processo de produção de *S. platensis* relativos ao experimento 10 (MUT=1750 mg, Ta=14 dias)

T (dias)	X (mg/L)	Carbonato (g/L)	Amônia livre (mol/L)	Amônia total (mol/L)	Uréia (mg/L)	pH
0	43	-				9,6
1	80	-				9,2
2	166	20,64	6,63E-05	0,001687	48,6	9,7
3	267	-				9,7
4	381	17,82	5,41E-05	0,002024	59,1	9,9
5		-				10,1
6	631	17,82	5,41E-06	0,001641	49,1	10,4
7	713	-				10,2
8	843	16,41	6,8E-05	0,002821	82,6	10,3
9	799	-				10,3
10	1083	15,94	8,58E-05	0,002252	65,0	
11		-				10,3
12	1356	14,54	1,06E-05	0,002218	66,2	10,4
13	1347					10,5
14	1512	13,6	0,000195	0,000854	19,8	10,5
15	1759	-				10,5
16	1702	12,66	6,52E-05	0,000337	8,2	
17	1692

FIGURA 28: Crescimento celular da *S. platensis* no experimento 10

FIGURA 29: Variação do pH no experimento 10

FIGURA 30: Variação da concentração de carbonato no experimento 10

TABELA 11: Resultados do monitoramento do processo de produção de *S. platensis* relativos ao experimento 11 (MUT=3250 mg, Ta=10 dias)

T (dias)	X. (mg/L)	Carbonato (g/L)	Amônia livre (mol/L)	Amônia total (mol/L)	Uréia (mg/L)	pH
0	47	-				9,6
1	93	-				9,2
2	171	19,7	5,66E-05	0,001811	52,6	9,7
3	271	-				9,7
4	368	18,29	4,18E-05	0,001218	35,3	9,9
5		-				10,1
6	673	18,76	1,6E-05	0,000323	9,2	10,3
7	730	-				10,2
8	935	17,82	0,000107	0,000374	8,0	10,3
9	920	-				10,2
10	1109	16,41	4,02E-05	0,000653	18,4	
11						10,3
12	1299	16,41	3,71E-06	0,000212	6,3	10,3
13	1356					10,3
14	1293	16,41	1,16E-05	0,000322	9,3	10,4
15	1543	-				10,5
16	1594	13,60	1,74E-05	0,000297	8,4	
17	1580

FIGURA 31: Crescimento celular da *S.platensis* no experimento 11

FIGURA 32: Variação do pH no experimento 11

FIGURA 33: Variação da concentração de carbonato no experimento 11

TABELA 12: Resultados do monitoramento do processo de produção de *S. platensis* relativos ao experimento 12 (MUT=3625 mg, Ta=12 dias)

T (dias)	X (mg/L)	Carbonato (g/L)	Amônia livre (mol/L)	Amônia total (mol/L)	Uréia (mg/L)	pH
0	44	-				9,7
1	89	-				9,1
2	166	23,45	6,66E-05	0,001888	54,6	9,7
3	220	-				9,7
4	356	19,23	2,25E-05	0,001228	36,2	9,8
5		-				10,0
6	562	19,23	6,35E-06	0,000528	15,7	10,3
7	648	-				10,2
8	751	17,35	9,54E-05	0,000286	5,7	10,2
9	689	-				10,2
10	743	17,35	1,83E-05	0,000849	24,9	
11		-				10,3
12	1095	15,94	8,09E-06	0,000138	3,9	10,3
13	1161					10,3
14	1315	15,01	5,86E-06	0,000686	20,4	10,4
15	1327	-				10,5
16	1331	13,13	1,34E-05	0,000367	10,6	
17	1335

FIGURA 34: Crescimento celular da *S.platensis* no experimento 12

FIGURA 35: Variação do pH no experimento 12

FIGURA 36: Variação da concentração de carbonato no experimento 12

TABELA 13: Resultados do monitoramento do processo de produção de *S. platensis* relativos ao experimento 13 (Experimento padrão)

T (dias)	X. (mg/L)	Carbonato (g/L)	pH
0	57	-	9,8
1	136	-	10,1
2		18,76	10,4
3		-	10,7
4	290	17,82	9,6
5		-	
6	438	17,82	9,7
7	628	-	9,8
8	792	15,48	9,6
9	1047	-	9,7
10	940	14,54	9,9
11		-	
12	917	13,60	9,9
13	1105		10,1

FIGURA 37: Crescimento celular da *S.platensis* no experimento 13

FIGURA 38: Variação do pH no experimento 13

FIGURA 39: Variação da concentração de carbonato no experimento 13

O experimento 14, não estava previsto no planejamento experimental, só sendo feito para confirmar resultados

TABELA 14: Resultados do monitoramento do processo de produção de *S. platensis* relativos ao experimento 14 (MUT= 3250 mg, Ta=10 dias)

T (dias)	X. (mg/L)	Carbonato (g/L)	Amônia livre (mol/L)	Amônia total (mol/L)	Uréia (mg/L)	pH
0	59	-				9,8
1	142	-				10,1
2	229	18,76	0,000161	0,001006	25,4	10,5
3	335	-				10,7
4	441	17,82	4,39E-05	0,000611	17,0	9,7
5		-				
6	689	17,35	1,02E-05	0,000388	11,3	9,8
7	780	-				9,9
8	901	16,88	0,000106	0,001029	27,7	9,7
9	1286	-				9,8
10	1301	16,41	0,00023	0,002696	74,0	9,9
11		-				
12	1303	15,48				10,0
13	1030					10,1

FIGURA 40: Crescimento celular da *S.platensis* no experimento 14

FIGURA 41: Variação do pH no experimento 14

FIGURA 42: Variação da concentração de carbonato no experimento 14

TABELA 15: Resultados do monitoramento do processo de produção de *S. platensis* relativos ao experimento 15 (MUT=2500 mg, Ta= 9 dias)

T (dias)	X (mg/L)	Carbonato (g/L)	Amônia livre (mol/L)	Amônia total (mol/L)	Uréia (mg/L)	pH
0	57	-				9,8
1	127	-				10,1
2	216	17,82	0,000141	0,002002	55,8	10,5
3	303	-				10,8
4	366	16,41	5,06E-05	0,000881	24,9	9,6
5		-				
6	578	15,94	5,59E-05	0,000341	8,6	9,7
7	656	-				9,8
8	778	15,48	9,66E-05	0,000589	14,8	9,8
9	1149	-				9,8
10	1030	13,13	0,000212	0,001075	25,9	9,9
11		-				
12	1134	12,19				9,9
13	1111					10,1

FIGURA 43: Crescimento celular da *S. platensis* no experimento 15

FIGURA 44: Variação do pH no experimento 15

FIGURA 45: Variação da concentração de carbonato no experimento 15

A concentração máxima X_{max} de cada experimento relacionada com MUT e Ta é mostrada na tabela 16

TABELA 16: A concentração máxima X_{max} nos experimentos pode ser observada na tabela 16, em função de Ta e MUT

Experimento	MUT (mg)	Ta (dias)	X_{max} (mg/L)
1	Padrão	Padrão	1015
2	2500	12	1470
3	2500	15	1515
4	3250	14	1162
5	Padrão	Padrão	757
6	2500	12	1456
7	1375	12	1477
8	1750	10	1241
9	Padrão	Padrão	1439
10	1750	14	1759
11	3250	10	1594
12	3625	12	1335
13	Padrão	Padrão	1105
14	3250	10	1303
15	2500	9	1149

A conversão de nitrogênio em células $Y(x/n)$ de cada experimento relacionada com MUT e Ta é mostrada na tabela 17

TABELA 17: Conversão de nitrogênio em células ($Y_{x/n}$) da biomassa de *S. platensis* obtida nos experimentos

Experimento	MUT (mg)	Ta (dias)	$Y(x/n)$
1	Padrão	Padrão	1,97
2	2500	12	2,86
3	2500	15	2,95
4	3250	14	1,72
5	Padrão	Padrão	1,39
6	2500	12	2,8
7	1375	12	5,17
8	1750	10	3,4
9	Padrão	Padrão	2,7
10	1750	14	4,9
11	3250	10	2,38
12	3625	12	1,78
13	Padrão	Padrão	2,03
14	3250	10	1,91
15	2500	9	2,18

A produtividade de cada experimento relacionada com MUT e Ta é mostrada na tabela 18.

TABELA 18: Produtividade P(x) da biomassa de *S. platensis* obtida nos experimentos

Experimento	MUT (mg)	Ta (dias)	P(x) (mg/dia*L)
1	Padrão	Padrão	63,45
2	2500	12	81,66
3	2500	15	84,2
4	3250	14	72,62
5	Padrão	Padrão	58,29
6	2500	12	104,03
7	1375	12	113,67
8	1750	10	95,5
9	Padrão	Padrão	84,68
10	1750	14	117,26
11	3250	10	99,63
12	3625	12	78,52
13	Padrão	Padrão	85,01
14	3250	10	108,58
15	2500	9	114,96

A partir dos cultivos, coletou-se a biomassa logo após se confirmar a parada do crescimento celular, antes de entrarem na fase de morte celular.

Com esta biomassa, foram realizados testes, para avaliação da composição centesimal, apresentadas na tabela 19, e verificação do perfil dos ácidos graxos obtidos (tabela 20 a 34)

Tabela 19: Composição centesimal da biomassa de *S. platensis* obtida nos experimentos

Experimento	MUT (mg)	Ta (dias)	Proteína (%)	Gordura (%)	Cinzas (%)	Carboidrato- total (%)
1	Padrão	Padrão	74,39	15,29	9,62	0,70
2	2500	12	56,95	14,30	9,62	19,13
3	2500	15	70,28	14,89	8,00	6,83
4	3250	14	77,23	15,19	6,00	1,58
5	Padrão	Padrão	65,74	10,55	9,67	14,04
6	2500	12	58,93	18,49	9,66	12,92
7	1375	12	69,44	17,24	9,65	3,67
8	1750	10	60,77	12,21	9,67	17,35
9	Padrão	Padrão	60,26	15,30	9,60	14,84
10	1750	14	67,37	14,37	9,63	8,63
11	3250	10	57,82	15,98	9,65	16,55
12	3625	12	58,32	14,86	9,67	17,15
13	Padrão	Padrão	70,37	10,45	9,60	9,58
14*	3250	10	55,38	12,78	6,63	25,21
15	2500	9	50,11	12,09	9,62	28,18

TABELA 20 : Média da porcentagem dos ácidos graxos produzidos pela biomassa de *Spirulina platensis* obtida no experimento 1

Ácidos Graxos	Tempo * (Minutos)	Ácidos Graxos Produzidos (% relativa) * *
PALMÍTICO-16:0	(14,3-14,6)	43,24
PALMITOLÊICO---16:1---N?	(15)	5,5
PALMITOLÊICO---16:1---N-7	(15,4)	6,3
ESTEÁRICO 18:0	(21,8-21,9)	0
OLÊICO 18:1	(22,3-22,4)	12,05
LINOLÊICO 18:2	(23,9)	11,7
γ -LINOLÊNICO W6---18:3	24,6-25	21,21
α -LINOLÊNICO W3---18:3	25,65	0

*Tempo correspondente para o éster do ácido graxo percorrer a coluna até o detector, na análise por cromatografia gasosa.

**Média de duas determinações

TABELA 21 : Média da porcentagem dos ácidos graxos produzidos pela biomassa de *Spirulina platensis* obtida no experimento 2

Ácidos graxos	Tempo * (minutos)	Ácidos Graxos Produzidos (% realativa) * *
PALMÍTICO-16:0	(14,3-14,6)	43,2
PALMITOLÊICO---16:1---N?	(15)	5
PALMITOLÊICO---16:1---N-7	(15,4)	5,75
ESTEÁRICO 18:0	(21,8-21,9)	0
OLÊICO 18:1	(22,3-22,4)	9,05
LINOLÊICO 18:2	(23,9)	13
γ -LINOLÊNICO W6---18:3	24,6-25	24
α -LINOLÊNICO W3---18:3	25,65	0

*Tempo correspondente para o éster do ácido graxo percorrer a coluna até o detector, na análise por cromatografia gasosa.

**Média de duas determinações

TABELA 22: Média da porcentagem dos ácidos graxos produzidos pela biomassa de *Spirulina platensis* obtida no experimento 3

Ácidos Graxos	Tempo * (Minutos)	Ácidos Graxos Produzidos (% relativa) * *
PALMÍTICO-16:0	(14,3-14,6)	43,4
PALMITOLÊICO---16:1---N?	(15)	7,05
PALMITOLÊICO---16:1---N-7	(15,4)	5,55
ESTEÁRICO 18:0	(21,8-21,9)	0
OLÊICO 18:1	(22,3-22,4)	10
LINOLÊICO 18:2	(23,9)	12
γ -LINOLÊNICO W6—18:3	24,6-25	22
α -LINOLÊNICO W3---18:3	25,65	0

***Tempo correspondente para o éster do ácido graxo percorrer a coluna até o detector, na análise por cromatografia gasosa.**

****Média de duas determinações**

TABELA 23: Média da porcentagem dos ácidos graxos produzidos pela biomassa de *Spirulina platensis* obtida no experimento 4

Ácidos Graxos	Tempo * (Minutos)	Ácidos Graxos Produzidos (% relativa) * *
PALMÍTICO-16:0	(14,3-14,6)	41,05
PALMITOLÊICO---16:1---N?	(15)	6,7
PALMITOLÊICO---16:1---N-7	(15,4)	5,8
ESTEÁRICO 18:0	(21,8-21,9)	0
OLÊICO 18:1	(22,3-22,4)	11,8
LINOLÊICO 18:2	(23,9)	11,95
γ -LINOLÊNICO W6—18:3	24,6-25	22,7
α -LINOLÊNICO W3---18:3	25,65	0

***Tempo correspondente para o éster do ácido graxo percorrer a coluna até o detector, na análise por cromatografia gasosa.**

****Média de duas determinações**

TABELA 24: Média da porcentagem dos ácidos graxos produzidos pela biomassa de *Spirulina platensis* obtida no experimento 5

Ácidos Graxos	Tempo * (Minutos)	Ácidos Graxos Produzidos (% relativa) * *
PALMÍTICO-16:0	(14,3-14,6)	41,4
PALMITOLÊICO---16:1---N?	(15)	8,65
PALMITOLÊICO---16:1---N-7	(15,4)	6,25
ESTEÁRICO 18:0	(21,8-21,9)	0
OLÊICO 18:1	(22,3-22,4)	7,8
LINOLÊICO 18:2	(23,9)	12,4
γ -LINOLÊNICO W6—18:3	24,6-25	23,5
α -LINOLÊNICO W3---18:3	25,65	0

***Tempo correspondente para o éster do ácido graxo percorrer a coluna até o detector, na análise por cromatografia gasosa.**

****Média de duas determinações**

TABELA 25: Média da porcentagem dos ácidos graxos produzidos pela biomassa de *Spirulina platensis* obtida no experimento 6

Ácidos Graxos	Tempo * (Minutos)	Ácidos Graxos Produzidos (% relativa) * *
PALMÍTICO-16:0	(14,3-14,6)	40
PALMITOLÊICO---16:1---N?	(15)	8,2
PALMITOLÊICO---16:1---N-7	(15,4)	5,7
ESTEÁRICO 18:0	(21,8-21,9)	0
OLÊICO 18:1	(22,3-22,4)	9,5
LINOLÊICO 18:2	(23,9)	15
γ -LINOLÊNICO W6—18:3	24,6-25	21,5
α -LINOLÊNICO W3---18:3	25,65	0

***Tempo correspondente para o éster do ácido graxo percorrer a coluna até o detector, na análise por cromatografia gasosa.**

****Média de duas determinações**

TABELA 26: Média da porcentagem dos ácidos graxos produzidos pela biomassa de *Spirulina platensis* obtida no experimento 7

Ácidos Graxos	Tempo * (Minutos)	Ácidos Graxos Produzidos (% relativa) * *
PALMÍTICO-16:0	(14,3-14,6)	42,25
PALMITOLÊICO---16:1---N?	(15)	6
PALMITOLÊICO---16:1---N-7	(15,4)	5,6
ESTEÁRICO 18:0	(21,8-21,9)	0
OLÊICO 18:1	(22,3-22,4)	4,15
LINOLÊICO 18:2	(23,9)	17
γ -LINOLÊNICO W6—18:3	24,6-25	25
α -LINOLÊNICO W3---18:3	25,65	0

***Tempo correspondente para o éster do ácido graxo percorrer a coluna até o detector, na análise por cromatografia gasosa.**

****Média de duas determinações**

TABELA 27: Média da porcentagem dos ácidos graxos produzidos pela biomassa de *Spirulina platensis* obtida no experimento 8

Ácidos Graxos	Tempo * (Minutos)	Ácidos Graxos Produzidos (% relativa) * *
PALMÍTICO-16:0	(14,3-14,6)	41,3
PALMITOLÊICO---16:1---N?	(15)	10
PALMITOLÊICO---16:1---N-7	(15,4)	5,2
ESTEÁRICO 18:0	(21,8-21,9)	0
OLÊICO 18:1	(22,3-22,4)	7
LINOLÊICO 18:2	(23,9)	9
γ -LINOLÊNICO W6—18:3	24,6-25	27,5
α -LINOLÊNICO W3---18:3	25,65	0

***Tempo correspondente para o éster do ácido graxo percorrer a coluna até o detector, na análise por cromatografia gasosa.**

****Média de duas determinações**

TABELA 28: Média da porcentagem dos ácidos graxos produzidos pela biomassa de *Spirulina platensis* obtida no experimento 9

ÁCIDOS GRAXOS	TEMPO * (MINUTOS)	ÁCIDOS GRAXOS PRODUZIDOS (% relativa) * *
PALMÍTICO-16:0	(14,3-14,6)	45,45
PALMITOLÊICO---16:1---N?	(15)	5,6
PALMITOLÊICO---16:1---N-7	(15,4)	5,45
ESTEÁRICO 18:0	(21,8-21,9)	0
OLÊICO 18:1	(22,3-22,4)	12,5
LINOLÊICO 18:2	(23,9)	11
γ -LINOLÊNICO W6—18:3	24,6-25	20
α -LINOLÊNICO W3---18:3	25,65	0

*Tempo correspondente para o éster do ácido graxo percorrer a coluna até o detector, na análise por cromatografia gasosa.

**Média de duas determinações

TABELA 29: Média da porcentagem dos ácidos graxos produzidos pela biomassa de *Spirulina platensis* obtida no experimento 10

Ácidos Graxos	Tempo * (Minutos)	Ácidos Graxos PRODUZIDOS (% relativa) * *
PALMÍTICO-16:0	(14,3-14,6)	43,4
PALMITOLÊICO---16:1---N?	(15)	7
PALMITOLÊICO---16:1---N-7	(15,4)	6,1
ESTEÁRICO 18:0	(21,8-21,9)	0
OLÊICO 18:1	(22,3-22,4)	8,5
LINOLÊICO 18:2	(23,9)	11,5
γ -LINOLÊNICO W6—18:3	24,6-25	23,5
α -LINOLÊNICO W3---18:3	25,65	0

*Tempo correspondente para o éster do ácido graxo percorrer a coluna até o detector, na análise por cromatografia gasosa.

**Média de duas determinações

TABELA 30: Média da porcentagem dos ácidos graxos produzidos pela biomassa de *Spirulina platensis* obtida no experimento 11

Ácidos Graxos	Tempo * (Minutos)	Ácidos Graxos Produzidos (% relativa) * *
PALMÍTICO-16:0	(14,3-14,6)	43,5
PALMITOLÊICO---16:1---N?	(15)	8
PALMITOLÊICO---16:1---N-7	(15,4)	6
ESTEÁRICO 18:0	(21,8-21,9)	0
OLÊICO 18:1	(22,3-22,4)	11
LINOLÊICO 18:2	(23,9)	10
γ-LINOLÊNICO W6—18:3	24,6-25	21,5
α-LINOLÊNICO W3---18:3	25,65	0

***Tempo correspondente para o éster do ácido graxo percorrer a coluna até o detector, na análise por cromatografia gasosa.**

****Média de duas determinações**

TABELA 31: Média da porcentagem dos ácidos graxos produzidos pela biomassa de *Spirulina platensis* obtida no experimento 12

Ácidos Graxos	Tempo * (Minutos)	Ácidos Graxos Produzidos (% relativa) * *
PALMÍTICO-16:0	(14,3-14,6)	44,15
PALMITOLÊICO---16:1---N?	(15)	8
PALMITOLÊICO---16:1---N-7	(15,4)	5,85
ESTEÁRICO 18:0	(21,8-21,9)	0
OLÊICO 18:1	(22,3-22,4)	10,5
LINOLÊICO 18:2	(23,9)	10
γ-LINOLÊNICO W6—18:3	24,6-25	21,5
α-LINOLÊNICO W3---18:3	25,65	0

***Tempo correspondente para o éster do ácido graxo percorrer a coluna até o detector, na análise por cromatografia gasosa.**

****Média de duas determinações**

TABELA 32: Média da porcentagem dos ácidos graxos produzidos pela biomassa de *Spirulina platensis* obtida no experimento 13

Ácidos Graxos	Tempo * (Minutos)	Ácidos Graxos Produzidos (% relativa) * *
PALMÍTICO-16:0	(14,3-14,6)	44
PALMITOLÊICO---16:1---N?	(15)	7
PALMITOLÊICO---16:1---N-7	(15,4)	6
ESTEÁRICO 18:0	(21,8-21,9)	0
OLÊICO 18:1	(22,3-22,4)	11,5
LINOLÊICO 18:2	(23,9)	9
γ -LINOLÊNICO W6—18:3	24,6-25	22,5
α -LINOLÊNICO W3---18:3	25,65	0

***Tempo correspondente para o éster do ácido graxo percorrer a coluna até o detector, na análise por cromatografia gasosa.**

****Média de duas determinações**

TABELA 33: Média da porcentagem dos ácidos graxos produzidos pela biomassa de *Spirulina platensis* obtida no experimento 14

Ácidos Graxos	Tempo * (Minutos)	Ácidos Graxos Produzidos (% relativa) * *
PALMÍTICO-16:0	(14,3-14,6)	47,7
PALMITOLÊICO---16:1---N?	(15)	6,5
PALMITOLÊICO---16:1---N-7	(15,4)	5,5
ESTEÁRICO 18:0	(21,8-21,9)	0
OLÊICO 18:1	(22,3-22,4)	10,5
LINOLÊICO 18:2	(23,9)	9,75
γ -LINOLÊNICO W6—18:3	24,6-25	20,05
α -LINOLÊNICO W3---18:3	25,65	0

***Tempo correspondente para o éster do ácido graxo percorrer a coluna até o detector, na análise por cromatografia gasosa.**

****Média de duas determinações**

TABELA 34: Média da porcentagem dos ácidos graxos produzidos pela biomassa de *Spirulina platensis* obtida no experimento 15

Ácidos Graxos	Tempo * (Minutos)	Ácidos Graxos Produzidos (% relativa) * *
PALMÍTICO-16:0	(14,3-14,6)	43
PALMITOLÊICO---16:1----N?	(15)	8
PALMITOLÊICO---16:1---N-7	(15,4)	5,85
ESTEÁRICO 18:0	(21,8-21,9)	0
OLÊICO 18:1	(22,3-22,4)	11,15
LINOLÊICO 18:2	(23,9)	9,5
γ-LINOLÊNICO W6—18:3	24,6-25	22,5
α-LINOLÊNICO W3---18:3	25,65	0

***Tempo correspondente para o éster do ácido graxo percorrer a coluna até o detector, na análise por cromatografia gasosa.**

****Média de duas determinações**

6-Discussão dos Resultados

6.1-Considerações Gerais

Inicialmente, neste capítulo julgou-se necessário fazer uma abordagem geral dos experimentos realizados, no que diz respeito aos resultados apresentados anteriormente.

Verificou-se que, nas condições estudadas, não foi constatada a presença da *lag fase*, onde o microrganismo está ainda se adaptando ao seu meio de crescimento e onde a velocidade deste crescimento é nula, conforme apresentada em outros trabalhos (PIRT et al., 1975). Isto possivelmente se deve a alguns fatores como: - a) a manutenção do microrganismo é feita em um meio de cultura muito próximo, na sua composição, com o meio utilizado no experimentos.- b) as condições do meio e do inóculo eram preservadas com muita atenção. Em alguns experimentos, a velocidade de crescimento era muito pequena, mas nunca negativa, que é característico de uma *fase lag*. Em relação ainda ao crescimento do microrganismo, pode-se constatar que, em quase todos os experimentos em que foi utilizada uréia como fonte de nitrogênio, no lugar do nitrato de potássio (experimentos padrão), o perfil da curva de crescimento, bem como a produtividade foi maior que nos experimentos em que foram utilizados nitrato de potássio como fonte de nitrogênio. Os experimentos onde não ocorreram este fato (experimento 12), possivelmente é explicado pelo fato de que neste experimento a quantidade de uréia total a ser adicionado, era muito grande, e que, este tipo de nutriente (amônia) colocado em altas concentrações leva a concentrações de amônia que podem ser tornar inibitórias para o crescimento celular (CEZARE, 1998). No entanto nesta dissertação não ficou evidenciado a presença de níveis tóxicos de amônia, que de acordo

com varios trabalhos experimentais é de acima de 10^{-3} M (ABELIOVICH & AZOV (1976))

A concentração máxima de células foi conseguida no experimento número 10, onde a fonte de nitrogênio usada era a uréia. A massa total de uréia adicionada foi de 1750 miligramas e o tempo de alimentação foi de 14 dias. Esta concentração máxima chegou a 1759,5 mg/L, maior que todos os outros experimentos padrão, e maior também que todos os outros experimentos com uréia. A concentração máxima já era esperada em um experimento em que fonte de nitrogênio fosse a uréia, pois segundo BOUSSIBA (1989) e KAMAT & MAHAJAM (1995), uréia como fonte de nitrogênio é mais efetiva para o crescimento celular que outras fontes de nitrogênio. Uma possível explicação para o experimento número 10 chegar à maior concentração celular seria que, neste experimento, a quantidade de uréia adicionada diariamente estaria mais próxima das necessidades da microalga, pois como já foi verificado por CEZARE (1998) e por FAINTUCH (1989), a quantidade de amônia formada no meio de cultura pode ser tóxica para a microalga, e a carência desta fonte de nitrogênio pode afetar o crescimento celular (PIORRECK, BAASCH & POHL, 1984). Já neste experimento, temos, entre todos os realizados, a menor quantidade de nitrogênio adicionada diariamente com um resultado bom, pois abaixo desta quantidade, como pode ser visto no experimento 7, onde a quantidade de uréia adicionada foi de 1375 mg e o tempo de alimentação foi de 12 dias, tivemos um resultado menos satisfatório que no experimento 10 em relação a concentração máxima atingida.

A maior produtividade se obteve também no experimento 10, que foi de 117,26 mg/L.dia (tabela 18) Possivelmente esta maior produtividade se deu por causa da quantidade de uréia adicionada ser completamente compatível com a necessidade da célula. Nos outros experimentos, devido a amônia em certas concentrações ser tóxica, e nesses experimentos se adicionar maiores concentrações de uréia do que no experimento 10 , acabou influenciando negativamente no

metabolismo da microalga. Este fato também foi verificado por CEZARE (1998) e FAITUCH (1989).

Pode-se confirmar também que, nas condições estudadas, o nitrogênio é um nutriente importante para o crescimento da microalga. A *Spirulina* utilizada consegue crescer em boas condições nas duas fontes pesquisadas (BOUSSIBA, 1989). A preferência do microrganismo pela uréia é evidente. Possivelmente isto aconteça devido ao microrganismo utilizar menos energia para converter a uréia em amônia, que o sal em amônia, corroborando com os resultados de BOUSSIBA (1989).

Quanto ao fator conversão da fonte de nitrogênio em células (Y_x/n), que significa quanto de nitrogênio adicionado está efetivamente se convertendo em biomassa, obteve-se o melhor resultado no experimento número 7, que foi de 5,2 mg /mg, no qual a massa de uréia total adicionada foi de 1375 miligramas e o tempo de alimentação foi de 12 dias. No experimento número 10, onde tivemos a melhor produtividade e a maior concentração atingida de todos os experimentos, conseguimos um valor de Y_x/n de 4,9, um valor muito próximo do melhor resultado obtido. Este resultado vem de encontro à literatura (CEZARE, 1998; BOUSSIBA, 1989; KAMAT & MAHAJAM, 1995), confirmando que a uréia como fonte de nitrogênio é mais efetiva do que outras fontes.

Foi verificado em todos os experimentos que o carbono não foi um nutriente crítico para o crescimento do microrganismo, pois em todos os experimentos mesmo quando a concentração de microalga estava em declínio, a quantidade de carbono no meio não havia se esgotado.

Foi constatado também que a fonte de carbono utilizada é a grande responsável pelo pH do meio. Isto se deve principalmente pela quantidade deste nutriente no meio e pela sua alta capacidade de se

transformar em vários compostos como gás carbônico, bicarbonatos e carbonatos. Isto já foi verificado e demonstrado por SIMMONS (1989).

Conforme já mencionado neste trabalho, embora a uréia seja uma promissora fonte de nitrogênio para produção de ácidos graxos polinsaturados ou para produção de biomassa (BOUSSIBA 1989; MAHAJAM & KAMAT 1995), há uma grande preocupação com a toxicidade da amônia (CEZARE 1998 ; FAINTUCH 1989).

Apesar da amônia em grandes quantidades ser considerada um nutriente tóxico para a célula, em nenhum experimento foi notada a morte celular devido a este fato. Isto se deve principalmente por o processo escolhido ser o descontínuo alimentado, onde se adiciona o nutriente conforme a necessidade das células no processo, e principalmente, ao fato de se ter um cuidado com esta concentração letal para a célula no meio de cultura, obtendo-se esta concentração limite em outros trabalhos já existentes na literatura (ABELIOVICH & AZOV (1976))

Em todos os experimentos realizados neste trabalho, a faixa de pH variou sempre de 9,3 até o máximo de 10,8, sendo que, em quase todos, quando o pH chegava na faixa de 10,5 , a concentração de biomassa começava a cair.

Isto pode ser explicado possivelmente pois, acima do pH 10,2, a fonte de carbono predominante segundo RUSSEL (1982), é o carbonato, e para a microalga, como já visto por PIRT (1975) e MILLER & COLMAN (1980) a fonte de carbono preferencial é o bicarbonato, e devido a esta razão a concentração celular começa a cair. A variação do pH já era esperada pois, a tendência , durante o processo é que o pH suba devido a utilização da fonte de carbono pela célula (bicarbonato),

deslocando o equilíbrio para a formação de compostos básicos como NaOH. No entanto como o meio de cultura em questão é um meio com propriedades tamponantes, a variação do pH é minimizada. O pH só começa a subir abruptamente quando este efeito tamponante do meio perde seu efeito.

Verificou-se, nas condições estudadas, que a composição centesimal da microalga é bastante variável com as condições do meio de cultivo na qual ela é cultivada. A faixa de porcentagem de proteína na biomassa obtida foi de 50,1% (para o experimento número 15)

Pode-se constatar também que as maiores porcentagens de proteínas na biomassa ocorreram nos experimentos números 1, 4, 13, que ficaram na faixa dos 70%. Nestes resultados podemos observar que as massas de uréia total eram sempre altas se comparadas aos dos outros experimentos. No experimento número 1, temos um experimento padrão onde a microalga tinha toda a fonte de nitrogênio a seu dispor no meio de cultura, já que nos experimentos padrão a fermentação era por batelada simples, ou seja, todos os nutrientes do meio de fermentação são colocados de uma só vez para utilização pela microalga. Podemos observar que o mesmo acontece no experimento número 13.

No experimento número 4, onde o processo foi por batelada alimentada, observamos que a massa total de uréia adicionada foi uma das maiores, se comparada com outros experimentos, e principalmente o tempo de alimentação foi o maior, demonstrando assim que o tempo de alimentação é um fator muito importante para a microalga, já que em casos de alimentação de quantidades de uréia (maiores valores de MUT) a distribuição dessa massa em períodos maiores de tempo leva à minimização de possíveis efeitos de inibição por amônia no meio de cultivo.

O fato de que a quantidade de nitrogênio pode afetar significativamente o perfil da porcentagem de proteína na microalga, também foi verificado por vários autores na literatura (MAHAJAM & KAMAT, 1995).

Adicionalmente foi observado por PIRT et al., (1987) que microalgas com carência de nitrogênio perdem a sua cor verde-azulada no decorrer dos experimentos.

Foi constatado no experimento número 5, a menor porcentagem de gordura de todos experimentos. Este fato pode ser explicado possivelmente pois neste experimento, por ser padrão, onde todos os nutrientes são adicionados de uma só vez, não existe a falta do nutriente nitrogênio no meio de fermentação, e, segundo MAHAJAN & KAMAT (1995), a microalga produz baixas quantidades de gordura quando no seu meio de fermentação se encontram altas quantidades de nitrogênio

Nos experimentos número 6 e 7 temos as duas maiores porcentagens de gordura produzidas pela microalga de todos os experimentos.

No experimento número 7, possivelmente a explicação se deve ao fato da escassez de nitrogênio, pois trata-se da menor massa de uréia adicionada de todos os experimentos (1375 mg), e de um tempo de alimentação não muito baixo (12 dias). Isso provavelmente, levou a microalga a produzir uma fonte de reserva para a utilização em condições adversas, confirmando resultados obtidos por outros autores MAHAJAN & KAMAT (1995).

No experimento número 6, apesar da quantidade de nitrogênio disponível para a microalga não ser deficitário (2500 mg), e o tempo de alimentação não ser muito longo ($T_a = 12$ dias), o que levaria a um fornecimento de nitrogênio insuficiente, o caminho bioquímico utilizado pela microalga foi o de síntese a de produção de gordura, pois podemos observar que a quantidade de proteína é muito baixa (58,9%) e a

porcentagem de gordura é muito alta (18,5%) se comparado com os outros experimentos. Para este fato não encontramos uma justificativa, embora se saiba que a síntese de lipídeos esteja envolvida com condições adversas para a microalga, o que não foram detectadas neste experimento

Quanto à porcentagem de cinzas produzida, não houve uma diferença significativa entre os experimentos, ficando na faixa de 7 a 9 %. Este fato possivelmente aconteceu pois a composição de cinzas originou-se de um meio de cultura com composição básica semelhante, apenas variando-se a massa de uréia adicionada e o tempo de alimentação do processo fermentativo.

A porcentagem de carboidratos totais produzida foi determinada por diferença, entre os nutrientes descritos acima (proteína, gordura, cinzas).

Toda esta variação da composição centesimal da microalga vem de encontro com as informações da literatura, que demonstram que a forma de como a microalga é cultivada é que vai dar sua composição, principalmente no seu teor de proteína e gordura (MAHAJAM & KAMAT, 1995).

Com relação à quantidade de ácidos graxos polinsaturados produzidos, ocorreu uma larga faixa de produção entre os experimentos, pois a quantidade e o perfil destes ácidos graxos estão totalmente relacionados com a forma como a microalga é cultivada.(FUNTEAU et al., (1997); MAHAJAN & KAMAT, 1995; PIORRECK et al., 1984)

Pude-se notar, pela média dos ácidos graxos produzidos pela *Spirulina platensis*, que todos os experimentos produziram uma grande quantidade de ácidos graxos polinsaturados como o linoléico e o linolênico, e que, em todos os experimentos analisados, a microalga produziu o ácido graxo γ -linolênico, confirmando resultados da literatura (COHEN, 1990; MAHAJAM & KAMAT, 1995).

Analisando-se a porcentagem e o perfil dos ácidos graxos produzidos nos experimentos, pode-se constatar que a maior porcentagem foi obtida na biomassa resultante no experimento número 8 (MUT= 1750 mg; Ta = 10 dias) com 27,5 % dos ácidos graxos produzidos e a segunda maior foi no experimento 2, onde tivemos uma massa total de uréia adicionada de 2500 miligramas e um tempo total de adição desta uréia de 12 dias, com 24 % dos ácidos graxos produzidos. Nestes dois maiores valores de porcentagem de ácidos graxos produzidos pela microalga, a fonte de nitrogênio usada foi a uréia. Este fato experimental também foi observado por MAHAJAM & KAMAT (1995) que demonstraram que uréia como fonte de nitrogênio pode aumentar a quantidade do ácido graxo γ -linolênico na *Spirulina platensis* em comparação com outras fontes de nitrogênio. Também verificaram que a produção do ácido graxo γ -linolênico também depende da temperatura de cultivo, bem como do tempo de cultivo, pois em cultivos mais antigos a biomassa apresentava 26 % a mais do ácido graxo γ -linolênico do que em cultivos novos. Este fato não pode ser levado em conta neste trabalho, pois a temperatura usada em todos os experimentos foi a mesma, e os experimentos, eram todos coletados na mesma fase de crescimento (entre o final da fase exponencial e começo da fase estacionária), para que este fator não influísse nos resultados

6.2-Análise de Regressão Multivariável

Os dados foram analisados através de análise de variância (NETO et al., 1996), por regressão multivariável

Na análise de regressão, os valores de (p) indicam o menor erro que se incorre ao afirmar que um determinado coeficiente tem influência na determinação do parâmetro estimado.

Para cada resposta (variável dependente) foi feita uma análise de regressão quadrática ou linear multivariável (dependendo do melhor resultado obtido), onde eram considerados todos os fatores, representando as duas variáveis independentes estudadas e suas possíveis interações, além do valor p, conforme citado acima. Para os fatores que apresentam um valor p menor que 15% ($p < 0,15$), realizou-se uma nova regressão multivariável, a partir da qual foram feitas as análises dos resultados aqui apresentados.

Se um fator não apresentava nenhum valor (p) menor que 15 %, também foram apresentadas todas as variáveis de estudo deste fator bem como sua análise de regressão, de variância para melhor ilustração do fator estudado.

Após cada análise de regressão, seguida de análise de variância do modelo de regressão e equação da regressão, respectivamente, procurou-se realizar uma discussão abrangente acerca da resposta de interesse em questão, sem deixar de considerar os resultados apresentados no capítulo anterior. Nesta discussão foram ainda inseridas superfícies de respostas relativas a cada variável dependente, as quais foram obtidas da equação da regressão correspondente.

Os dados foram tratados com as variáveis independentes sob a forma codificada (MUTc e Tac)

Na tabela 35 estão apresentados um resumo dos dados obtidos nos experimentos e utilizados nas regressões multivariáveis

TABELA 35- Valores de concentração máxima (Xmax), produtividade (Px), e conversão de nitrogênio em células (Yx/n), relacionados com MUTc e Tac e MUT e Ta

Experimento	MUTc	Tac	MUT (mg)	Ta (dias)	Xmax mg/L	Px mg/L.dia	Yx/n
1	Padrão	Padrão	Padrão	Padrão	1015	63,45	1,97
2	0	0	2500	12	1470	81,66	2,86
3	0	1,5	2500	15	1515	84,2	2,95
4	1	1	3250	14	1162	72,62	1,72
5	Padrão	Padrão	Padrão	Padrão	757	58,29	1,39
6	0	0	2500	12	1456	104,03	2,8
7	-1,5	0	1375	12	1477	113,67	5,17
8	-1	-1	1750	10	1241	95,5	3,4
9	Padrão	Padrão	Padrão	Padrão	1439	84,68	2,7
10	-1	1	1750	14	1759	117,26	4,9
11	1	-1	3250	10	1594	99,63	2,38
12	1,5	0	3625	12	1335	78,52	1,78
13	Padrão	Padrão	Padrão	Padrão	1105	85,01	2,03
14	1	-1	3250	10	1303	108,58	1,91
15	0	-1,5	2500	9	1149	114,96	2,18

6.2.1-CONCENTRAÇÃO CELULAR MÁXIMA ATINGIDA (X_{max}) em função de Tac e MUTc

Para a resposta da concentração celular máxima atingida (X_{max}), os coeficientes que tiveram na análise de regressão multivariável global, um valor de p menor que 15% foram:

MUTc- massa de uréia total adicionada codificada

Tac- tempo de alimentação total codificado

MUTc . Tac (interação entre as variáveis Tac e MUTc)

Nas tabelas 36 e 37, estão expostos os resultados da análise de regressão linear multivariável para X_{max} em função dos fatores acima citados, bem como a análise de variância dessa regressão, respectivamente.

Tabela 36 - Análise de regressão linear multivariável para X_{max} em função de MUTc e Tac e MUTc . Tac

FONTE DE VARIAÇÃO		Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	Valor t	p
Constante	1402,380891	31,407589	44,6510		0,0000
MUTc	-70,375423	33,863334	-2,0782		0,0763
Tac	91,116599	33,863334	2,6907		0,0311
MUTc . Tac	-202,602226	47,085462	-4,3029		0,0036
<hr/>					
R ² =0,7010					

TABELA 37- Análise de variância do modelo de regressão linear para Xmax em função de MUTc , Tac e MUTc . Tac

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F Calculado	p
MODELO	278394	3	927980,0	8,81398	0,0089
ERRO	736995	7			
Total=	352094	10			

A equação obtida na análise de regressão para a concentração máxima atingida, Xmax, em função de Tac , MUTc foi :

$$X_{\max} = 1402,380891 - 70,375423 \text{ MUTc} + 91,116599 \text{ Tac} - 202,602226 \text{ MUTc} \cdot \text{Tac} \quad (1)$$

Podemos observar pela análise de regressão na tabela 36, que, todos os fatores têm uma grande influência na variável estudada (Xmax). Segundo a mesma tabela, podemos observar que há uma significativa interação entre MUTc e Tac ($p=0,0036$) , e podemos observar também que cada variável sozinha também exerce uma grande influência nesta concentração máxima atingida (Xmax).

Podemos observar, na figura 46, que a tendência de obtenção de maiores valores para Xmax, serão conseguidos para os maiores valores de tempo de alimentação e menores valores de massa de uréia adicionada, o que de certa forma, está de acordo com os resultados obtidos.

Foi constatado também que o modelo alcançado pela regressão foi satisfatório, conseguindo um $p= 0,0089$, na análise de variância da regressão

Este modelo matemático alcançado (equação 1) , vem de encontro com alguns trabalhos feitos por autores, que conseguiram

comprovar os mesmos efeitos observados . Ou seja , como estamos trabalhando com substrato que se adicionado em altas concentrações para a célula, pode agir negativamente no efeito crescimento celular (FAITUCH (1989); CEZARE (1998)).

Figura-46 Superfície de Resposta para X_{max} (mg/L) em função de MUT_c , Tac e $MUT_c \cdot Tac$

6.2.2-Produtividade em Células (Px), em função de Tac e MUTc

Para a resposta da Produtividade em Células(Px), os coeficientes dos fatores que tiveram, na análise de regressão multivariável , um valor de p menor que 15% foram:

MUTc-massa de uréia total adicionada codificada

Tac- tempo de alimentação total codificado

MUTc . Tac (produto entre as variáveis Tac e MUTc)

Nas tabelas 38 e 39 , estão apresentados os resultados da análise de regressão linear multivariável para Px em função dos fatores acima citados, bem como a análise de variância dessa regressão, respectivamente.

Tabela 38 - Análise de regressão linear multivariável para Px em função de MUTc e Tac e MUTc . Tac

FONTE DE VARIAÇÃO	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	Valor t	p
Constante	96,477792	2,564341	37,6228	0,0000
MUTc	-10,542009	2,764846	-3,8129	0,0066
Tac	-6,366814	2,764846	-2,3028	0,0548
MUTc . Tac	-13,099481	3,844395	-3,4074	0,0113
<hr/> R ² =0,7236 <hr/>				

TABELA 39- Análise de variância do modelo de regressão linear para (Px) em função de MUTc , Tac e MUTc . Tac

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	p
MODELO	2047,99	3	682,662	9,72650	0,0068
ERRO	491,300	7	70,1858		
Total=	2539,29	10			

A equação (2), obtida na análise de regressão para a produtividade em células (Px), em função de Tac , MUTc e Tac . MUTc, está representada a seguir:

$$Px = 96,477792 - 10,542009 \text{ MUTc} - 6,366814 \text{ Tac} - 13,099481 \text{ MUTc} \cdot \text{Tac} \quad (2)$$

Como para (Xmax), também no modelo para a produtividade em células, podemos observar que o modelo linear matemático conseguido na equação (2), representa bem o fenômeno. Verificou-se que a interação das duas variáveis independentes é significativa. De fato, embora o aumento da massa de uréia adicionada possa levar a concentrações celulares mais elevadas, se for adicionada num tempo curto (comparar experimento 8 e 11- tabela 35), temos, por outro lado um tempo de fermentação mais longo, o que, em termos de produtividade em células , leva a um equilíbrio, de tal forma que as produtividades em células nesses experimentos (8 e 11), são da ordem de 96 a 100 mg/ L.dia, respectivamente. Mas podemos observar também, que todas as variáveis independentes tem uma grande influência no fator estudado.

Segundo a análise de variância da regressão da tabela 39, pudemos constatar que o modelo linear conseguido tem uma boa aproximação com os resultados obtidos (p=0,0068).

Os maiores valores para P_x , segundo a faixa estudada neste trabalho, serão com valores de MUT_c de -1.5 e Tac de -1.5 , o que pode ser visto na figura 47.

Figura-47 Superfície de Resposta para P_x (mg/dia*L) em função de MUT_c , Tac e $MUT_c.Tac$

6.2.3-Fator de Conversão de Nitrogênio em Células $Y(x/n)$, em função de Tac e MUTc

Para a resposta, Fator de Conversão de Nitrogênio em Células (Yx/n), os coeficientes dos fatores que apresentaram na análise de regressão multivariável global, um valor de p menor que 15% foram:

MUTc-massa de uréia total adicionada codificada

MUTC²-massa de uréia adicionada codificada elevada ao quadrado
 Tac- tempo de alimentação total codificado

MUTc . Tac (produto entre as variáveis Tac e MUTc)

Nas tabelas 40 e 41 , estão relacionados os resultados da análise de regressão quadrática multivariável para o Fator de Conversão de Nitrogênio em Células (Yx/n), em função dos fatores acima citados, bem como a análise de variância dessa regressão, respectivamente.

Tabela 40 - Análise de regressão quadrática multivariável para Conversão de Nitrogênio em Células (Yx/n), em função de MUTc e Tac e MUTc . Tac

FONTE DE VARIACÃO	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	Valor t	p
Constante	2,697106	0,078367	34,4164	0,0000
MUTc	-1,119719	0,055776	-19,3857	0,0000
MUTC ²	0,344545	0,066554	5,1905	0,0020
Tac	0,262072	0,05776	4,5379	0,0039
MUTc.Tac	-0,481847	0,08322	-5,9990	0,0010
<hr/> R ² =0,9779 <hr/>				

TABELA 41- Análise de variância do modelo de regressão quadrática para $Y_{x/n}$ em função de MUT_c , Tac e $MUT_c \cdot Tac$

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	p
MODELO	13,6469	4	3,41172	111,399	0,0000
ERRO	0,183757	6	0,0306262		
Total=	13,8307	10			

A equação obtida na análise de regressão para conversão de nitrogênio em células $Y_{x/n}$, em função de Tac , MUT_c e $Tac \cdot MUT_c$ foi:

$$Y_{x/n} = 2,697106 - 1,119719 MUT_c + 0,344545 MUT_c^2 + 0,262072 Tac - 0,481847 MUT_c \cdot Tac \quad (3)$$

Para a conversão de nitrogênio em células ($Y_{x/n}$), podemos observar que a regressão quadrática obteve o melhor resultado, tendo um erro da sua análise de variância (p) igual a zero (TABELA 41).

Quanto à análise de regressão da tabela (40), podemos verificar que todas as variáveis independentes tem uma grande influência na variável dependente estudada ($Y_{x/n}$).

A variável independente de maior significância foi MUT_c .

Pode-se observar também que o maior valor de $Y_{x/n}$, será conseguido para valores de MUT_c de -1.5 , o menor valor de MUT_c para a faixa estudada neste trabalho (figura 48)

Ainda analisando a figura 48, pode-se constatar também que o aumento do tempo de alimentação, para baixos valores de massa de uréia adicionada, levam a maiores valores de $Y_{x/n}$

Figura-48 Superfície de Resposta para $Y_{x/n}$ (mg/mg) em função de MUT_c , MUT_c^2 , Tac e $MUT_c \cdot Tac$

6.2.4-Porcentagem Relativa do Ácido Graxo γ -Linolênico (% GLA), em função de Tac e MUTc

Para resposta deste item (%GLA), os fatores que tiveram na análise de regressão multivariável global, um valor de p menor que 15% foram:

MUTc-massa de uréia total adicionada codificada

MUTc .Tac (produto entre as variáveis Tac e MUTc)

Nas tabelas 42 e 43 , estão expostos os resultados da análise de regressão linear multivariável para (%GLA) em função dos fatores acima citados, bem como a análise de variância dessa regressão, respectivamente.

Tabela 42 - Análise de regressão linear multivariável para (%GLA), em função de MUTc e MUTc . Tac

FONTE DE VARIACÃO	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	Valor t	p
Constante	22,930762	0,36515	62,7983	0,0000
MUTc	-1,640281	0,393497	-4,1685	0,0031
MUTc . Tac	1,398096	0,544772	2,5664	0,0333
$R^2=0,7168$				

TABELA 43- Análise de variância do modelo de regressão linear para (%GLA) em função de MUTc e MUTc . Tac

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	p
MODELO	39,0806	2	19,5403	13,6566	0,0026
ERRO	11,4467	8	1,43083		
Total=	50,5293	10			

A equação obtida na análise de regressão (%GLA), em função de MUTc e Tac . MUTc foi :

$$\% \text{Gama linolênico} = 22,930762 - 1,640281 \text{ MUTc} + 1,398096 \text{ MUTc} \cdot \text{Tac} \quad (4)$$

O modelo conseguido pela equação acima, apresentou um erro (p), de 0,0026 na análise de variância da regressão (tabela 43), o que foi considerado muito satisfatório.

Para a porcentagem do ácido graxo gama linolênico, tivemos dois fatores com um alto grau de significância na variável dependente estudada, que foram MUTc e MUTc . Tac. (p=0,0333)

Pela figura 49, pode-se constatar que as maiores porcentagens de gama-linolênico serão alcançadas para valores de MUTc negativos, e que, na faixa estudada teremos maiores porcentagens de gama-linolênico para valor de MUTc de -1,5. Pode -se observar também que em condições que levam a maiores adições de uréia (MUTC= 1,5; Ta=-1,5) são as que levam a menores teores de (%GLA)na biomassa. Embora este efeito não seja tão pronunciado, nota-se que a (%GLA) na biomassa tende a cair para condições de mínima taxa de alimentação de uréia (MUTc=-1,5; Tac=1,5)

A variável Tac, não teve significância na % de gama-linolênico, mas a interação de Tac com MUTc teve uma grande influência no fator estudado, o que pode ser observado segundo a equação acima.

Segundo a equação conseguida, observamos que a maior porcentagem de gama-linolênico produzida pela microalga, dá-se com MUTc com valores negativos, e que a maior porcentagem na faixa estudada se dá para um valor de MUTc de -1.5 .

A grande influência da Massa de uréia adicionada na porcentagem de gama-linolênico produzido também foi verificado por (MAHAJAN & KAMAT, 1995), que observou que a uréia como fonte de nitrogênio tem mostrado ser o mais efetivo composto para a produção de biomassa, bem como do ácido graxo γ -linolênico. Também foi verificado por estes autores que uréia como fonte de nitrogênio dá um aumento de 13,5 mg γ -linolênico/g biomassa seca

O mesmo resultado foi demonstrado por (PIORRECK et al., 1984), que observou em um estudo feito com várias microalgas, que, em todas elas o metabolismo dos ácidos graxos e lipídeos era influenciado pela quantidade de nitrogênio no meio de cultivo.

Também foi demonstrado por COHEN (1987), que estudou linhagens de *Spirulina*, que apenas uma não continha o ácido graxo γ -linolênico, e que, a quantidade e o perfil destes ácidos graxos desta alga depende das condições de como ela é cultivada.

Figura-49 Superfície de Resposta para (%GLA)) em função de MUT_c e MUT_c . Tac

6.2.5-Porcentagem de Proteína na Biomassa (% Ptn), em função de Tac e MUTc

Os fatores que influenciaram no teor de proteína na biomassa (%Ptn), considerando a análise multivariável ($p < 0,15$), foi o tempo de alimentação.

Nas tabelas 44 e 45, estão expostos os resultados da análise de regressão linear multivariável para Porcentagem de Proteína na Biomassa (%Ptn), em função do tempo de Alimentação (com valores codificados), bem como a análise de variância da regressão, respectivamente.

Tabela 44- Análise de regressão linear multivariável para Porcentagem de Proteína na Biomassa (%Ptn), em função de Tac

Fonte de Variação	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	Valor t	p
Constante	62,662657	1,48526	42,1897	0,0000
Tac	6,689227	1,5982221	4,1854	0,0024
$R^2=0,6229$				

TABELA 45- Análise de variância do modelo de regressão linear para Porcentagem de Proteína na Biomassa (%Ptn), em função de Tac

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	p
MODELO	421,017	1	421,017	17,5177	0,0024
ERRO	216,304	9	24,0338		
Total=	637,321	10			

Analisando as tabelas 44 e 45, podemos indicar que a relação de porcentagem de proteína na biomassa é dada pela expressão.

$$(\%Ptn)=62,662657 + 6,989227 \text{ Tac} \quad (5)$$

Verificou-se , pela figura 50, que os maiores teores de proteína na biomassa foram obtidas para maiores tempos de alimentação.

Figura-50 Superfície de Resposta para (%Proteína) em função de Tac

6.2.6-Teor de Gordura na Biomassa (% gordura), em função de Tac e MUTc

Para a resposta do Teor de Gordura na Biomassa (% gordura), os coeficientes respectivos aos fatores que levaram, aos menores valores de nível descritivo foram:

Todos os fatores analisados foram:

MUTc-massa de uréia total adicionada codificada

Tac- tempo de alimentação total codificado

MUTc . Tac (produto entre as variáveis Tac e MUTc)

Nas tabelas 46 e 47 , estão expostos os resultados da análise de regressão linear multivariável desta variável dependente (% Gordura), em função dos fatores acima citados, bem como a análise de variância dessa regressão, respectivamente.

Tabela 46- Análise de regressão linear multivariável para (% Gordura), em função de MUTc e Tac e MUTc . Tac

Fonte de Variação	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	Valor t	p
Constante	14,80692	0,660788	22,4082	0,0000
MUTc	-0,056564	0,712455	-0,0794	0,9389
Tac	0,831859	0,712455	1,1676	0,2812
MUTc . Tac	-0,362301	0,990637	-0,3657	0,7254
$R^2=0,000$				

TABELA 47- Análise de variância do modelo de regressão linear para Porcentagem de gordura na biomassa (%gordura), em função de MUTc , Tac e MUTc .Tac

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	p
MODELO	6,68579	3	2,222860	0,47820	0,7075
ERRO	32,6227	7			
Total=	39,3085	10			

Com base na tabela acima, podemos concluir que para a produção de gordura pela microalga, podemos observar que nenhuma variável independente teve alguma influência significativa na faixa de valores estudados.

Devemos salientar que se tentou também a utilização de outros modelos , sem obtenção de sucesso. Isso vem a fortalecer a análise feita anteriormente (itém 6.1), onde se ressaltou que o teor de gordura foi alto para dois experimentos conduzidos por condições de alimentação bastante diferentes

6.2.7-Teor do Ácido Graxo Palmítico na fração lipídica(% Palmítico), em função de Tac e MUTc

Para a resposta do Teor do Ácido Graxo Palmítico na fração lipídica(% Palmítico), o fator que teve na análise de regressão multivariável , um valor de p menor que 15% foi:

MUTc . Tac (produto entre as variáveis Tac e MUTc)

Nas tabelas 48 e 49, estão expostos os resultados da análise de regressão linear multivariável para Teor do Ácido Graxo Palmítico na fração lipídica(% Palmítico), em função dos fatores acima citados, bem como a análise de variância dessa regressão, respectivamente.

Tabela 48- Análise de regressão linear multivariável para Teor do Ácido Graxo Palmítico na fração lipídica(% Palmítico), em função de MUTc . Tac

Fonte de Variação	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	Valor t	p
Constante	41,528704	0,495822	83,7573	0,0000
MUTc . Tac	-1,584259	0,735423	-2,1542	0,0596

$R^2=0,2669$

TABELA 49- Análise de variância do modelo de regressão linear para Teor do Ácido Graxo Palmítico na fração lipídica(% Palmítico), em função de MUTc . Tac

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	p
MODELO	12,3212	1	12,3212	4,64064	0,0596
ERRO	23,8956	9	2,65507		
Total=	36,2168	10			

A equação obtida na análise de regressão para o Teor do Ácido Graxo Palmítico na fração lipídica(% Palmítico), em função de Tac.MUTc foi :

$$(\% \text{Palmítico}) = 41,528704 - 1,584259 \text{ MUTc} \cdot \text{Tac} \quad (6)$$

Podemos notar que o efeito da interação entre essas variáveis é bastante pronunciado em relação aos efeitos individuais. Nota-se pela análise de da figura 51, que os maiores valores de (%Palmítico) são obtidos para combinações de altos valores Tac e baixos valores de MUTc

Figura 51- Superfície de Resposta para (% Palmítico) em função de MUTc e MUTc . Tac

6.2.8 Teor do Ácido Graxo Palmitolêico na Fração lipídica da Biomassa (%Palmitolêico), em função de Tac e MUTc

Como pode ser visto pela tabela 50, não há nenhuma influência das variáveis independentes em relação ao fator estudado.

Verificamos também que o modelo linear alcançado é muito grosseiro ($p = 0,5436$) (tabela 51)

Também aqui podemos relatar que outros modelos foram testados, mas sem sucesso.

Tabela 50- Análise de regressão linear multivariável para Teor do Ácido Graxo Palmitolêico na Fração lipídica da Biomassa (%Palmitolêico), em função de MUTc e Tac e MUTc . Tac

Fonte de Variação	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	Valor t	p
Constante	7,317672	0,421666	17,3542	0,0000
MUTc	-0,008622	0,454636	-0,0190	0,9854
Tac	-0,582555	0,454636	-1,2814	0,2409
MUTc . Tac	0,618321	0,632151	0,9781	0,3606
$R^2 = 0,000$				

TABELA 51- Análise de variância do modelo de regressão linear para para Teor do Ácido Graxo Palmitolêico na Fração lipídica da Biomassa (%Palmitolêico), em função de MUTc , Tac e MUTc . Tac

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	p
MODELO	4,41635	3	1,47212	0,775726	0,5436
ERRO	13,2841	7			
Total=	17,7005	10			

6.2.9 Teor do Ácido Graxo Palmitolêico n-7 na Fração lipídica (%Palmitolêico n-7 em função de Tac e MUTc

Para a resposta do Teor do Ácido Graxo Palmitolêico n-7 na Fração lipídica (%Palmitolêico n-7), os fatores que tiveram na análise de regressão multivariável global, um valor de p menor que 15% foram:

MUTc. Tac (produto entre as variáveis Tac e MUTc)

Nas tabelas 52 e 53, estão expostos os resultados da análise de regressão linear multivariável para o Teor do Ácido Graxo Palmitolêico n-7 na Fração lipídica (%Palmitolêico n-7), em função dos fatores acima citados, bem como a análise de variância dessa regressão, respectivamente.

Tabela 52- Análise de regressão linear multivariável para o Teor do Ácido Graxo Palmitolêico n-7 na Fração lipídica (%Palmitolêico n-7), em função de MUTc . Tac

Fonte de Variação	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	Valor t	p
Constante	5,701852	0,069386	82,1757	0,0000
MUTc . Tac	-0,17963	0,102916	-1,7454	0,1149
$R^2=0,16$				

TABELA 53- Análise de variância do modelo de regressão linear para o Teor do Ácido Graxo Palmitolêico n-7 na Fração lipídica (%Palmitolêico n-7), em função de MUTc . Tac

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	p
MODELO	0,158401	1	0,158401	3,04641	0,1149
ERRO	0,467963	9	0,0519959		
Total=	0,626364	10			

A equação obtida na análise de regressão para o Teor do Ácido Graxo Palmitolêico n-7 na Fração lipídica (%Palmitolêico n-7), em função de Tac . MUTc foi:

$$(\% \text{Palmitoleico n-7}) = 5,701852 - 0,17963 \text{ MUTc} \cdot \text{Tac} \quad (7)$$

Como podemos observar na tabela 52 , a única variável independente que influencia o fator estudado , é a interação entre MUTc e Tac.

Por outro lado, o resultado obtido na regressão não é satisfatório.

Figura 52- Superfície de Resposta para (% Palmitolêico n-7) em função de MUTc . Tac

6.2.10 Teor do Ácido Graxo Oleico na fração lipídica da biomassa (% Oleico), *em função de Tac e MUTc*

Nesta variável, o único fator que teve influência foi a massa total de uréia adicionada, como pode ser observado nas tabelas 54 e 55.

Tabela 54- Análise de regressão linear multivariável para o Teor do Ácido Graxo Oleico na fração lipídica da biomassa (% oleico), *em função de MUTc*

Fonte de Variação	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	Valor t	p
Constante	9,052415	0,323116	28,0160	0,0000
MUTc	1,92343	0,347691	5,5320	0,0004
$R^2=0,7475$				

TABELA 55- Análise de variância do modelo de regressão linear para o Teor do Ácido Graxo Oleico na fração lipídica da biomassa (% oleico), *em função de MUTc*

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	p
MODELO	34,8097	1	34,8097	30,6031	0,0004
ERRO	10,2371	9	1,13746		
Total=	45,0468	10			

A equação obtida na análise de regressão para o Teor do Ácido Graxo Oleico na fração lipídica da biomassa, *em função de MUTc* foi :

$$(\% \text{Oleico}) = 9,052415 + 1,92343 \text{ MUTc} \quad (8)$$

Esse modelo mostrou-se satisfatório ($p=0,0004$), e como pode ser observado na figura 53, os maiores teores deste ácido graxo na fração lipídica da biomassa são obtidas de uma maneira geral, para maiores quantidades de uréia adicionada

Figura 53- Superfície de Resposta para (% Oleico) em função de MUTc

6.2.11 Teor do Ácido Graxo Linolêico na Fração Lipídica da Biomassa (%Linolêico), em função de Tac e MUTc

Também para este ácido graxo, não se conseguiram bons resultados nas regressões. Apenas a título de ilustração, nas tabelas 56 e 57 são apresentados os resultados da regressão linear multivariável e a respectiva análise de variância desta regressão

Tabela 56 - Análise de regressão linear multivariável para o Teor do Ácido Graxo Linolêico na Fração Lipídica da Biomassa (%Linolêico), em função de MUTc e Tac e MUTc . Tac

Fonte de Variação	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	Valor t	p
Constante	11,926345	0,740122	16,1140	0,0000
MUTc	-1,02782	0,797991	-1,2880	0,2387
Tac	0,927829	0,797991	1,1627	0,2830
MUTc . Tac	-0,215863	1,109571	-0,1945	0,8513
$R^2=0,0282$				

TABELA 57- Análise de variância do modelo de regressão linear para o Teor do Ácido Graxo Linolêico na Fração Lipídica da Biomassa (%Linolêico), em função de MUTc , Tac e MUTc . Tac

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	p
MODELO	19,2352	3	6,41172	1,096666	0,4117
ERRO	40,9262	7			
Total=	60,1114	10			

7 -CONCLUSÕES

Conseguiu-se ajustar equações lineares ou quadráticas multivariáveis para estimar as respostas produtividade, concentração máxima de células, fator de conversão de nitrogênio em células e porcentagem do ácido graxo gama-linolênico, em função do tempo de alimentação e da massa de uréia total adicionada.

O cultivo de *Spirulina platensis* em mini-tanques foi plenamente satisfatório, com resultados semelhantes a cultivos em frascos Erlenmeyers, em agitadores rotativos

A microalga estudada (*Spirulina platensis*), mostrou-se com um crescimento bastante satisfatório nas duas fontes de nitrogênio testadas, sendo a uréia uma ótima alternativa econômica em comparação com o nitrato de potássio.

Todos os valores da composição centesimal, bem como do perfil dos ácidos graxos produzidos pela microalga, foram considerados dentro de um limite estabelecido por outros trabalhos da literatura.

Considerando a produção de células, as melhores condições para a concentração máxima (X_{max}), foi no experimento 10 (1750 mg de MUT e 10 dias de T_a) com 1759 mg/L. Para conversão de nitrogênio em células ($Y_{x/n}$), tivemos as melhores condições no experimento 7 (1375 mg de MUT e 12 dias de T_a) com 5,17. Para a produtividade em células (P_x), as melhores condições também foram no experimento 10, com 117,26 mg/L.dia.

Para a produção do ácido graxo (GLA), tivemos o experimento número 8, (1750 mg de MUT e 10 dias de tempo de alimentação) com maior porcentagem (27,5%), mas tivemos os experimentos 7 e 10 com altas porcentagens deste ácido graxo também, com 25% e 23,5% respectivamente.

8.0-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

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

-BAI, J.; SESHADAI, C. V. **Arch. Fuer Hydrobiol.**, Beihefte, v.60, n.32, 1980.

-BALLONI, W.; TOMASELLI, L.; GIOVANNETTI, L. & MARGHERI, M. C. Biologia fondamentale del genere *Spirulina*. **Convegno Prospective della coltura di Spirulina in Itália.** ,Firenze, 1980.

-BALLONI, W.; FILPI, C.; FLORENZANO, G. Recent Trends in the Research on wastewater reclamation by photosynthetic bacterial and algal system. **Algae Biomass.**, Firenze, 1980.

-BALLONI, W.; MATERASSI, R.; PELOSI, E.; PUSHPARAJ, B.; FLORENZANO, G.; STENGEL, E. & SOEDER, C. J. Comparasion of two different culture devices for mass production of microalgae at Firenze (italy) and Dortmund (Germany). I Yields of *Scenedesmus obliquus* and *Coelastrum sphaericum* at Firenze. **Arch. Hydrobiol. Suppl.**, Stuttgart, v.60, n.3, p. 324-331, 1981.

-BALLONI, W.; FLORENZANO, G.; MARERASSI, R.; TREDICI, M.; SOEDER, C. & WAGENER, K. Mass culture of algae for energy farming in coastal deserts. **Energy from biomass Applied Science Publishes.**, London, 1983.

-BECKER, E. W.; VENKATARAMAN, L. V. Production and Processing of Algae in Pilot Plant Scale Experiences of the Indo-German Project. **North-Holland Biomedical Press.**, India, 1980.

-BELITZ, H. D. ; GROSCH, W. **Food Chemistry.**, p. 472-493, 1987.

BERGEYS MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, V. 31,
The Willians Et Wilkins Co, 1994.

-BRAGAGNOLO, N. Fatores que influenciam o nível de colesterol, lipídeos totais e composição de ácidos graxos em camarão e carne. Campinas, 1997, (Tese de Doutorado-UNICAMP).

-BOUSSIBA, B. Amonia Up take in the Alkalophilic Cianobacterium *Spirulina platensis*. **Plant Cell Physiol.**, Israel, v.30, n.2, p.303-308, 1989.

-CARR, N. G. & WHITTON, B. A The Biology of the Blue-Green Algae. **Blackwell Scientific Publication.**, London, 1973.

-CHEN, F.; ZHANG, Y. High Cell Density Mixotrophic Culture of *Spirulina pltensis* on Glucose for Phycocyanin Production Using a Fed-Batch System. **Enzyme-Microb. Technol.**, Hong Kong, v.20, n.3, p.221-224, , 1997.

-CIFERRI, O., TIBONI, O. The Biochemistry and Industrial Potential of *Spirulina*. **Microbiol.**, Italy, v. 39, p.503-526, 1985.

-COENEN, J. W. E. Modification of Oils and Fats. **Enzyme-Microb. Technol**, London, p.15-54, 1974.

-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, (Dissertação de Mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas- USP).

-COHEN, Z. V.; DIDI, S.; HEIMER, Y. Overproduction of Gamma-Linolenic and Eicosapentaenoic Acids by Algae. **Plant Physiol.**, v. 98, p. 569-572, 1991.

-COHEN, Z. V.; NORMANN, H. A.; HEIMER, Y. M. Potential Use of Substituted Pyridazinones for Selecting Polynsaturated Fatty Acid Overproducing Cell Lines of Algae. **Phytochemistry**, vol 33, n.2, p. 259-264, 1993.

-COHEN, Z. V.; VONSHAK, A. Fatty acid composition of Spirulina and Spirulina-like cyanobacteria in relation to their chemotaxonomy. **Phytochemistry.**, Italy, v.30, n.1, pp 205-206, 1990.

-COHEN, Z. V.; VONSHAK A. ; RICHMOND A. Fatty acid Composition of Spirulina Strains Grown Under Various Enviromental Conditions. **Phytochemistry.**, v.26, n. 8, pp 2255-2258, 1987.

-DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry.**, Washington, v.28, n.8, p.350-356, 1956.

-DUNN, I. J.; MOR, J. R. Variable-Volume Continuous Cultivation. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v. 17, n.12, p.1805-1822, 1975.

-DUNN, I. J.; MOR, J.R. Variable volume continuous cultivation. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.2, p.283-288, 1977.

-DURAND-CHASTEL, H. Production and Use of Spirulina in México. **Biomedical Press.**, Holanda, 851 p, 1980

-DZIEZAK, J. D. Fats Oils and Fat Substitutes. **Food Technol.**, Chicago, v. 43, n-7, p. 66-74, 1989.

-FAINTUCH, B. L. Análise Comparativa da Produção de Biomassa a partir de três Cianobactérias Empregando Distintas Fontes Nitrogenadas. São Paulo, 1989, (Dissertação de Mestrado-Faculdade de Ciências Farmaceuticas da USP).

-FERRAZ, C. A. M. Produção de *Spirulina Maxima*: Influência de Ecocofatores E Uso de um Sub Produto da Indústria Alcooeira. São Paulo, 1986, (Dissertação de Mestrado-Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP).

-FERRAZ, C. A. M.; FREY, K. G. & AQUARONE, E. Influência do acetato de sódio na produção celular de lipídeos e no “up-take” de Mn e Fe de *Chlorella vulgaris*. **Rev. Microbiol.**, São paulo, v.14, n.2, p.78-83, 1983

-FUNTEU, F.; GUET, C.; WU, B.; TRÉMOLIÉRES, A. Effects of Environmental Factors on the Lipid Metabolism in *Spirulina platensis*. **Plant Physiol Biochem.**, France, v.35, n.1, p.63-71, , 1997.

-GRATTAN, R. P. SPIRULINA : A Source of Dietary Gamma-Linolenic Acid ?. **J. Sci. Food Agric.**, v. 47, p.85-93, 1989.

-GUSTONE, F. D., NORRIS, F. Lipids in Foods. **Chemistry, Biochemistry and Technology.** , Oxford, p. 29-42, 1983.

-HARTMAN, L., ESTEVES, W. **Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais**. São Paulo, Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia Agroindustrial, 1982, p. 67-131,.

-HARTMAN, L., LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Appl. Microbiol. Biotech.**, london, v.22, p.475-476, 1973.

-HIRANO, M.; MORI, H.; MIURA, Y.; MATSUNAGA; NAKAMURA, N.; γ -Linolênic acid production by microalgae. **Appl. Microbiol. Biotech.**, v. 24, n.25, p.183-191, 1990.

-HOFFMAN, G. The Chemistry of Technology of Edible Oils and Fats and their high Fat Products. **Academic Press.**, London, p. 1-28, 1989

-HORROBIN, D. F. **J. Reprod. Med.**, v. 28, p.465-482, 1983.

-HUANG, Y. S., MANKU, M. S. & HORROBIN, D. F. **Lipids.**, v.19, p.661-664, 1984

-ILTS, A. Ecologie de *Spirulina platensis* dans le milieux natronés d'Afrique Sahélienne. **Convegno Prospective della coltura di Spirulina in Itália.**, Firenze, 1980.

-JAMES, P.; CARTER, M. D. Gamma-Linolenic acids as a nutrient. **Food tech.**, v.42, p.72-82, 1988

-JONES, R.C., ANTHONY, R.M. The relationship between nutrient feed rate and specific growth rate in fed-batch cultures. **European J. Appl. Microbiol.**, Berlin, v.4, p.87-92, 1972.

- KOSARIC, N.; NGUYEN, H. T. & BERGOUGNON, M. A. Growth of *Spirulina maxima* algae in effluents from secondary waste-water treatment plants. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.26, p.881-896, 1974.

- LE DUY, A. & ZAJIC, J. E. A geometrical approach for differentiation of an experimental function at a point: applied to growth and product formation. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.25, p.805-810, 1973.

- LEWIN, R. A. The Genetics of Algae. **Arch. Hydrobiol.**, Berkeley, 1976.

- LEWIN, R. A. **Arch. Hydrobiol.**, v.26, n.60, p.48-52, 1980.

- LYNCH, D. V.; THOMPSON, G. ^a Microsomal Phospholipid Molecular Species Alternation During Low Temperatures Acclimation in *Dunaliella*. **Plant Physiol.**, v.74, p.193-197, 1984.

- MAHAJAN, G. & KAMAT, M. γ -Linolenic acid production from *Spirulina platensis*. **Microbiol. Biotechnol.**, v.43, p. 466-469, 1995.

- MARSIC, V.; YODICE, R. The Dietary Role of Monounsaturates. **Plant Physiol.**, Champaign, v. 3, n. 6, p. 681-686, 1992.

- MATERASSI, R.; PAOLETTI, C.; BALLONI, W. & FLORENZANO, G. Some considerations on the production of lipid substances by microalgae and cyanobacteria. **Algae biomass.**, Amsterdam, 1015 p, 1980.

- MILLER, A. G. & COLMAN, B. Evidence for Carbonate Transport by the Blue-Green Alga (cyanobacterium). **Plant Physiol.**, Ontario, v. 65, p. 397-402, 1980.

-NAWAR, W. W. Lipids. In FENNEMA, O R. **Food Chemistry**, New York, p.139-244, 1985.

-NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**, Campinas, Ed UNICAMP, 1996.

-Williams, S. **Official Methods of Analysis**. Arlington , 1984 , 1141p.

-PAOLETTI, C.; PUSHPARAJ, B. & TOMASELLI, L. Ricerche sulla nutrizione minerale di *Spirulina platensis*. **Microbiol.**, Padova. v.17, 1975.

-PIORRECK, M., BAASCH, K. L., POHL, P. Biomass Production, Total Protein, Lipids and Fatty Acids of Freshwater Green and Blue-Green Algae Under Different Nitrogen Regimes. **Phytochemistry**, Germany, v. 23, n 2, p. 207-213, 1984.

-PIRT, J. Principles of microbe and cell cultivation. **Phytochemistry.**, New York, 1975.

-PIRT, S.J. The theory of fed-batch with reference to penicillin fermentation. **J. Appl. Chem. Biotechnol.**, London, v.24, n.7, p. 415-424, 1974.

-PIRT, S. J. ; WALACH, M. R. ; BAZIN, M. J. Computer Control of Carbon-Nitrogen Ratio in *Spirulina platensis*. **Biotechnology. and Bioengineering.**, London, , v. 24, p. 520-528, 1987.

-RICHMOND, A. Phototropic microalgae. **Biotechnology.**, v.3, Weinhein, 1983

-ROUGHAN, P. G. Spirulina: A Source of Dietary Gamma-Linolenic Acid. **J. Sci. Food Agric.**, New Zeland, v. 47, p. 85-93, 1988.

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

-SIMMONS JR.; G. M.; PARKER, B. C.; ALLNUT, F. T. C.; BROWN, D.; CATHEY, D. & SEABURG, K. G. Ecological comparison of oasis lakes and soils. **J. U. S.**, v.14, p.181-189, 1979.

-SONTAG, N. V. Structure and Composition of Fats and Oils. **J. Industrial Oil and Fat Products.**, New York, v. 1, p. 1-98, 1979.

STATGRAPHICS, **USER GUIDE**, Versão 5, Statistics Graphics Corporation, 1985

-TAMYA, H. Culture medium for lower algae. **Plant. Physiol.**, Langford, 1979

-TELOR, E., BOUSSIBA, S., RICHMOND, E. Products and Chemicals from *Spirulina platensis*. **Biomedical Press**, Israel, 1980.

-TREDICI, M., Firenze, 1984.

-YOSHIDA, F., YAMANE, T. NAKAMOTO, K.I. Fed-batch hydrocarbon fermentation with colloidal emulsion feed. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.15, p. 257-270, 1973.

-WRIGHT, S.; BURTON, J. **Lancet**, v.73, 1982.

LEITURAS COMPLEMENTARES

-GIOIELLI, L. A **Modificação Industrial de Óleos e Gorduras**, Apostila do Curso de Pós Graduação , Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 1997.

-CARVALHO, J. C. M. Influência de Vazão Exponencialmente Decrescente do Mosto de Melaço de Cana de Açúcar no Processo Descontínuo Alimentado de Fermentação Alcoólica. São Paulo, 1989, (Dissertação de Mestrado-Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP).

-CARVALHO, J. C. M Contribuição ao Estudo dos Processos Descontínuo e Descontínuo Alimentado de Fermentação Alcoólica. São Paulo, 1994. (Tese de Doutorado-Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP).

9-APÊNDICE

9.1-Apendice A- Obtenção da Massa de Uréia Inicial , a ser Adicionada nos Experimentos (M0)

Foram feitos alguns testes preliminares para se conseguir a melhor massa de uréia inicial que iria ser adicionada nos experimentos.

Para a escolha desta massa inicial de uréia, foram feitos dois experimentos, um com uma massa de uréia inicial de 200 miligramas e outro com uma massa de uréia inicial de 400 miligramas. A massa total de uréia adicionada dos dois experimentos foram de 2250 miligramas.

Foi acompanhado a concentração dos dois experimentos, como pode ser visto abaixo, e escolheu-se o que teve maior produtividade, que foi o experimento com 400 miligramas de uréia inicial.

A massa de uréia inicial de 200 miligramas foi o melhor resultado conseguido por (CEZARE, 1998), onde os ensaios foram feitos em erlenmeyers fechados com algodão hidrofóbico fechando a boca dos frascos.

Para este trabalho, como os tanques eram abertos, imaginou-se que a uréia, um composto muito volátil iria se perder para o ambiente antes de ser utilizado pela microalga, em uma proporção muito maior do que em um erlenmayer fechado. Daí a idéia de se aumentar a quantidade de uréia inicial adicionada ao tanque.

Com o acompanhamento da concentração celular, este fato foi realmente verificado.

A escolha da massa de uréia inicial de 400 mg, foi baseado na comparação de P_x , X_{max} e Y_x/n , sendo que o resultado foi melhor para o experimento com massa inicial de uréia com 400 mg.

Produtividade do experimento com massa inicial de uréia de 200 mg= 30,71 mg/ L*dia

Produtividade do experimento com massa inicial de uréia de 400 mg= 34,67 mg/ L*dia

X_{max} do experimento com massa inicial de uréia de 200 mg=
337,84 mg/L

X_{max} do experimento com massa inicial de uréia de 400 mg=
381,43 mg/L

Y_{x/n} do experimento com massa inicial de uréia de 200 mg= 0,62

Y_{x/n} do experimento com massa inicial de uréia de 400 mg= 0,72

Tabela-A1

O acompanhamento da concentração celular foi feito durante 11 dias , com o experimento com massa inicial de uréia de 200 mg e massa total de uréia de 2250 mg, e é mostrado a seguir

Tempo (dias)	X (mg/L)
0	56
1	68
2	118
3	179
4	219
5	236
6	254
7	324
8	320
9	313
10	330
11	337

Tabela A2

O acompanhamento da concentração celular foi feito durante 11 dias , com o experimento com massa inicial de uréia de 400 mg e massa total de uréia de 2250 mg, e é mostrado a seguir

Tempo (dias)	X (mg/L)
0	58
1	74
2	125
3	206
4	204
5	266
6	294
7	316
8	340
9	372
10	378
11	381

9.2-Apêndice B- VALORES ADICIONADOS DE URÉIA BEM COMO A MASSA ACUMULADA DE URÉIA DIÁRIA NOS TANQUES DE FERMENTAÇÃO

Tabela B1-Experimento realizado com suas respectivas variáveis independentes e valores adicionados de uréia bem como a massa acumulada de uréia diária nos tanques de fermentação

(MUT=2500 mg-Ta= 12 dias)

T (dias)	MUT (mg)	Ma (mg)
0	400	400
1	466	66
2	543	77
3	632	89
4	737	105
5	858	121
6	1000	142
7	1164	165
8	1357	192
9	1581	224
10	1842	261
11	2146	304
12	2500	354

Ma= massa de uréia adicionada diariamente (mg)

MUT= massa total de uréia adicionada (mg)

Ta=tempo total de alimentação (dias)

T= Instante T (dias)

Tabela B2-Experimento realizado com suas respectivas variáveis independentes e valores adicionados de uréia bem como a massa acumulada de uréia diária nos tanques de fermentação

MUT= 2500 mg- Ta= 15 dias

T (dias)	MUT (mg)	Ma (mg)
0	400	400
1	451	51
2	510	59
3	577	67
4	652	75
5	736	85
6	832	96
7	940	108
8	1062	122
9	1201	138
10	1357	156
11	1533	176
12	1732	199
13	1958	225
14	2212	254
15	2500	287

Ma= massa de uréia adicionada diariamente (mg)

MUT= massa total de uréia adicionada (mg)

Ta=tempo total de alimentação (dias)

T= Instante T (dias)

Tabela B3-Experimento realizado com suas respectivas variáveis independentes e valores adicionados de uréia bem como a massa acumulada de uréia diária nos tanques de fermentação

MUT=3250 mg-ta=14 dias

T (dias)	MUT (mg)	Ma (mg)
0	400	400
1	464	64
2	539	75
3	626	87
4	727	101
5	845	117
6	981	136
7	1140	158
8	1324	184
9	1537	213
10	1786	248
11	2074	288
12	2409	334
13	2798	388
14	3250	451

Ma= massa de uréia adicionada diariamente (mg)

MUT= massa total de uréia adicionada (mg)

Ta=tempo total de alimentação (dias)

T= Instante T (dias)

Tabela B4-Experimento realizado com suas respectivas variáveis independentes e valores adicionados de uréia bem como a massa acumulada de uréia diária nos tanques de fermentação

MUT= 1375 mg-Ta= 12 dias

T (dias)	MUT (mg)	Ma (mg)
0	400	400
1	443	43
2	491	48
3	544	53
4	603	59
5	669	65
6	741	72
7	821	80
8	911	89
9	1009	98
10	1119	109
11	1240	121
12	1375	134

Ma= massa de uréia adicionada diariamente (mg)

MUT= massa total de uréia adicionada (mg)

Ta=tempo total de alimentação (dias)

T= Instante T (dias)

Tabela B5-Experimento realizado com suas respectivas variáveis independentes e valores adicionados de uréia bem como a massa acumulada de uréia diária nos tanques de fermentação

MUT= 1750mg Ta= 10 dias

T (dias)	MUT (mg)	Ma (mg)
0	400	400
1	463	63
2	537	73
3	622	85
4	721	99
5	836	114
6	969	133
7	1123	154
8	1302	178
9	1509	207
10	1750	1240

Ma= massa de uréia adicionada diariamente (mg)

MUT= massa total de uréia adicionada (mg)

Ta=tempo total de alimentação (dias)

T= Instante T (dias)

Tabela B6-Experimento realizado com suas respectivas variáveis independentes e valores adicionados de uréia bem como a massa acumulada de uréia diária nos tanques de fermentação

MUT= 1750mg Ta=14 dias

T (dias)	MUT (mg)	Ma (mg)
0	400	400
1	444	44
2	493	49
3	548	54
4	609	61
5	677	67
6	752	75
7	836	83
8	929	93
9	1033	103
10	1147	114
11	1275	127
12	1417	141
13	1574	157
14	1750	176

Ma= massa de uréia adicionada diariamente (mg)

MUT= massa total de uréia adicionada (mg)

Ta=tempo total de alimentação (dias)

T= Instante T (dias)

Tabela B7-Experimento realizado com suas respectivas variáveis independentes e valores adicionados de uréia bem como a massa acumulada de uréia diária nos tanques de fermentação

MUT= 3250 mg Ta=10 dias

T (dias)	MUT (mg)	Ma (mg)
0	400	400
1	493	93
2	608	114
3	749	141
4	924	174
5	1140	215
6	1405	265
7	1733	327
8	2137	404
9	2635	498
10	3250	614

Ma= massa de uréia adicionada diariamente (mg)

MUT= massa total de uréia adicionada (mg)

Ta=tempo total de alimentação (dias)

T= Instante T (dias)

Tabela B8-Experimento realizado com suas respectivas variáveis independentes e valores adicionados de uréia bem como a massa acumulada de uréia diária nos tanques de fermentação

MUT= 3625 mg Ta=12 dias

T (dias)	MUT (mg)	Ma (mg)
0	400	400
1	480	80
2	577	96
3	694	116
4	833	139
5	1002	168
6	1204	202
7	1446	242
8	1738	291
9	2069	350
10	2510	421
11	3016	506
12	3625	606

Ma= massa de uréia adicionada diariamente (mg)

MUT= massa total de uréia adicionada (mg)

Ta=tempo total de alimentação (dias)

T= Instante T (dias)

Tabela B9-Experimento realizado com suas respectivas variáveis independentes e valores adicionados de uréia bem como a massa acumulada de uréia diária nos tanques de fermentação

MUT= 2500 mg Ta= 9 dias

T (dias)	MUT (mg)	Ma (mg)
0	400	400
1	490	90
2	601	110
3	736	135
4	903	166
5	1107	203
6	1357	250
7	1663	306
8	2039	375
9	2500	460

Ma= massa de uréia adicionada diariamente (mg)

MUT= massa total de uréia adicionada (mg)

Ta=tempo total de alimentação (dias)

T= Instante T (dias)