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

Cultivo descontínuo alimentado de *Arthrospira (Spirulina)*
platensis em fotobiorreator tubular utilizando nitrato de amônio como
fonte de nitrogênio

Lina Carolina Cruz Martínez

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

São Paulo
2010

Lina Carolina Cruz Martínez

Cultivo descontínuo alimentado de *Arthrospira (Spirulina) platensis* em fotobiorreator tubular utilizando nitrato de amônio como fonte de nitrogênio

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

Orientador/Presidente

Prof. Tit. Sunao Sato

1º Examinador

Prof. Dr. Marcelo Palma Sircili

2º Examinador

São Paulo, Abril de 2010.

*“Dedicado a toda mi querida familia, en la que siempre he de encontrar de forma incondicional amor, comprensión, fortaleza, apoyo, fe, esperanza y sabiduría aún en la distancia.
Porque todo en la vida se lo debo a ellos”.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho e Prof. Tit. Sunao Sato pela oportunidade de trabalhar junto, a paciência, a confiança, a amizade, a orientação e os ensinamentos no decorrer deste trabalho.

Aos companheiros de Laboratório Livia, Mayla, Iván, Marcelo, Ana e Raquel pela convivência dia a dia, o apoio e contribuição á minha formação.

Às alunas de iniciação científica Camila e Laís, e aos técnicos do laboratório Elias e Dante pela ajuda recebida para a realização deste trabalho.

Aos professores do curso da pós-graduação em Tecnologia Bioquímico - Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP pelos ensinamentos.

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Tecnologia Bioquímico - Farmacêutica Miriam, Juarez e Elza, e aos funcionários da Secretaria de Pós- graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Elaine e Jorge, por estarem sempre dispostos para ajudar.

Aos meus amigos na vida Álvaro Santoro, Erika Delgado, Lina Maria Velasco e Paola Galindo, que sem importar o que aconteça estão sempre comigo, pelos conselhos, pelos momentos compartilhados e pelas lições de vida que terem me brindado.

Às amigas e companheiras de apartamento Gisele Medeiros e Aline Ramos, pelo apoio e companhia desde que cheguei em São Paulo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Às pessoas que de qualquer outra forma terem contribuído durante esta etapa da minha vida. Agradeço muito a todos.

"No despreciéis el recuerdo del camino recorrido. Ello no retrasa vuestra carrera, sino que la dirige; el que olvida el punto de partida pierde fácilmente la meta."
Paulo VI

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1	Classificação taxonômica de <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i>
Tabela 2	Teor protéico de diferentes alimentos
Tabela 3	Propriedades físico-químicas do nitrato de amônio
Tabela 4	Usos e aplicações de <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i>
Tabela 5	Composição da biomassa de <i>Arthrospira platensis</i>
Tabela 6	Pigmentos presentes na biomassa de <i>Arthrospira platensis</i>
Tabela 7	Aminoácidos presentes na biomassa de <i>Arthrospira platensis</i>
Tabela 8	Ácidos graxos essenciais presentes na biomassa de <i>Arthrospira platensis</i>
Tabela 9	Minerais presentes na biomassa de <i>Arthrospira platensis</i>
Tabela 10	Condições de crescimento estabelecidas para o cultivo de <i>A. platensis</i>
Tabela 11	Planejamento experimental
Tabela 12	Experimentos do ponto de ótimo realizados usando nitrato de amônio
Tabela 13	Experimentos de referência realizados usando nitrato de sódio
Tabela 14	Valores de concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 1 (NH_4NO_3 7,5 mM; 60 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Tabela 15	Valores de concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 2 (NH_4NO_3 7,5 mM; $180 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	60
Tabela 16	Valores de concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 3 (NH_4NO_3 22,5 mM; $60 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	61
Tabela 17	Valores de concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 4 (NH_4NO_3 22,5 mM; $180 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	61
Tabela 18	Valores de concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 5 (NH_4NO_3 4,4 mM; $120 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	62
Tabela 19	Valores de concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 6 (NH_4NO_3 15,0 mM; $35 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	62
Tabela 20	Valores e concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 7 (NH_4NO_3 25,6 mM; $120 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	63
Tabela 21	Valores de concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 8 (NH_4NO_3 15,0 mM; $205 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	63
Tabela 22	Valores de concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 9 (NH_4NO_3 15,0 mM; $120 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	64
Tabela 23	Valores de concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 10 (NH_4NO_3 15,0 mM; $120 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	64
Tabela 24	Valores de concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 11 (NH_4NO_3 15,0 mM; $120 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	65
Tabela 25	Valores de concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 12 (NH_4NO_3 9,7 mM; $148 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	80

Tabela 26	Valores de concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 13 (NH_4NO_3 9,7 mM; $148 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	80
Tabela 27	Valores de concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 14 (NH_4NO_3 9,7 mM; $148 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	81
Tabela 28	Valores de concentração celular, nitrato, carbonato e pH durante o experimento 15 (NaNO_3 30 mM; $120 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	84
Tabela 29	Valores de concentração celular, nitrato, carbonato e pH durante o experimento 16 (NaNO_3 30 mM; $120 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	85
Tabela 30	Par\u00e2metros de crescimento calculados nos experimentos realizados com nitrato de am\u00f4nio, incluindo o ponto de \u00f3timo e os cultivos de refer\u00eancia	87
Tabela 31	An\u00e1lise da regress\u00e3o multivari\u00e1vel para concentra\u00e7\u00e3o celular m\u00e1xima X_m em fun\u00e7\u00e3o dos fatores avaliados	89
Tabela 32	An\u00e1lise de vari\u00e2ncia do modelo de regress\u00e3o multivari\u00e1vel para o par\u00e2metro X_m	89
Tabela 33	An\u00e1lise da regress\u00e3o multivari\u00e1vel para produtividade em c\u00e9lulas P_X em fun\u00e7\u00e3o dos fatores avaliados	92
Tabela 34	An\u00e1lise de vari\u00e2ncia do modelo de regress\u00e3o multivari\u00e1vel para o par\u00e2metro P_X	92
Tabela 35	An\u00e1lise da regress\u00e3o multivari\u00e1vel para o fator de convers\u00e3o de nitrog\u00eanio em c\u00e9lulas $Y_{X/N}$ em fun\u00e7\u00e3o dos fatores avaliados	94
Tabela 36	An\u00e1lise de vari\u00e2ncia do modelo de regress\u00e3o multivari\u00e1vel para o par\u00e2metro $Y_{X/N}$	94

Tabela 37	Composição em porcentagem da biomassa de <i>A. platensis</i> após do cultivo com nitrato de amônio	96
Tabela 38	Análise da regressão multivariável para o teor de lipídios na biomassa de <i>A. platensis</i> em função dos fatores avaliados	97
Tabela 39	Análise de variância do modelo de regressão multivariável para o parâmetro teor de lipídios	97
Tabela 40	Análise da regressão multivariável para o teor de proteína de <i>A. platensis</i> em função dos fatores avaliados	99
Tabela 41	Análise de variância do modelo de regressão multivariável para o parâmetro teor de proteína	99
Tabela 42	Custo do cultivo gerado pelo emprego de nitrato de amônio e do nitrato de sódio como fonte de nitrogênio	103

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

		Pág.
Figura 1	<i>Arthrospira platensis</i> UTEX 1926	25
Figura 2	Assimilação de nitrogênio em cianobactérias	33
Figura 3	Fontes de nitrogênio usadas no cultivo de <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i>	34
Figura 4	Composição estrutural do nitrato de amônio	34
Figura 5	Esquematização do uso de nitrato de amônio como fonte de nitrogênio	35

GRÁFICOS

Gráfico 1	Concentração (%) de Amônia e Amônio em função do pH	39
Gráfico 2	Configuração de estrela referente aos cultivos do planejamento experimental (cultivos 1 – 11)	54
Gráfico 3	Valores de concentração celular (♦) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 1 (NH_4NO_3 7,5 mM; $60 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	68
Gráfico 4	Valores de concentração celular (♦) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 2 (NH_4NO_3 7,5 mM; $180 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	69
Gráfico 5	Valores de concentração celular (♦) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 3 (NH_4NO_3 22,5 mM; $60 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	70
Gráfico 6	Valores de concentração celular (♦) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 4 (NH_4NO_3 22,5 mM; $180 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	71

Gráfico 7	Valores de concentração celular (◆) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 5 (NH_4NO_3 4,4 mM; $120 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	72
Gráfico 8	Valores de concentração celular (◆) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 6 (NH_4NO_3 15,0 mM; $35 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	73
Gráfico 9	Valores de concentração celular (◆) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 7 (NH_4NO_3 25,6 mM; $120 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	74
Gráfico 10	Valores de concentração celular (◆) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 8 (NH_4NO_3 15 mM; $205 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	75
Gráfico 11	Valores de concentração celular (◆) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 9 (NH_4NO_3 15 mM; $120 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	76
Gráfico 12	Valores de concentração celular (◆) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 10 (NH_4NO_3 15,0 mM; $120 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	76
Gráfico 13	Valores de concentração celular (◆) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 11 (NH_4NO_3 15,0 mM; $120 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	77
Gráfico 14	Valores de concentração celular (◆) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 12 (NH_4NO_3 9,7 mM; $148 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	82
Gráfico 15	Valores de concentração celular (◆) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 13 (NH_4NO_3 9,7 mM; $148 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	83
Gráfico 16	Valores de concentração celular (◆) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 14 (NH_4NO_3 9,7 mM; $148 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	83
Gráfico 17	Valores de concentração celular (◆) e da concentração de nitrato (■) durante o experimento 15 (NaNO_3 30 mM; $120 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	86

Gráfico 18	Valores de concentração celular (◆) e da concentração de nitrato (■) durante o experimento 16 (NaNO_3 30 mM; $120 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	86
Gráfico 19	Superfície de resposta para a concentração celular máxima (X_m) em função dos valores codificados da intensidade luminosa (X_1) e da massa de nitrato de amônio adicionada (X_2)	91
Gráfico 20	Superfície de resposta para a produtividade em células (P_x) em função dos valores codificados da intensidade luminosa (X_1) e da massa de nitrato de amônio adicionada (X_2)	93
Gráfico 21	Superfície de resposta para o fator de conversão de nitrogênio em células $Y_{X/N}$ em função dos valores codificados das variáveis estudadas intensidade luminosa (X_1) e massa de nitrato de amônio adicionada (X_2)	95
Gráfico 22	Superfície de resposta para o fator de conversão de nitrogênio em células $Y_{X/N}$ em função dos valores codificados das variáveis estudadas intensidade luminosa (X_1) e massa de nitrato de amônio adicionada (X_2)	100

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	22
2.1. OBJETIVO GERAL	22
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1. ANTECEDENTES / HISTÓRIA	23
3.2. CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA	24
3.3. MORFOLOGIA	24
3.4. COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA	27
3.4.1. Proteínas	27
3.4.2. Carboidratos	28
3.4.3. Lipídios	28
3.4.4. Vitaminas e Pigmentos	29
3.4.5. Minerais	29
3.4.6. Ácidos nucléicos	29
3.5. CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO	30
3.5.1. Cinética de Crescimento	31
3.6. NUTRIENTES	32
3.6.1. Fonte de Nitrogênio	32
3.6.1.1. Nitrato de Amônio	34
3.6.2. Fonte de carbono	36
3.6.3. Outros Nutrientes	37
3.7. LUZ	37
3.8. pH	38
3.9. TEMPERATURA	39

3.10. AGITAÇÃO	39
3.11. APLICAÇÕES DE <i>Arthrospira (Spirulina)</i>	40
3.12. FOTOBIORREACTORES	44
3.13. CULTIVO DESCONTÍNUO ALIMENTADO	46
4. MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1. MICRORGANISMO E MANUTENÇÃO	47
4.2. MEIO DE CULTURA	47
4.3. PREPARO DO INÓCULO	48
4.4. DESCRIÇÃO DO REATOR	48
4.5. DESCRIÇÃO DE UM EXPERIMENTO	49
4.6. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA ACOMPANHAMENTO DOS CULTIVOS	50
4.6.1. Determinação da concentração celular	50
4.6.2. Determinação da concentração de amônia total	50
4.6.3. Determinação da concentração de nitrato	51
4.6.4. Determinação da concentração de carbonato total	51
4.6.5. Determinação do pH	52
4.7. AVALIAÇÃO DA BIOMASSA	52
4.7.1. Determinação do teor de lipídios	52
4.7.2. Determinação do teor de proteínas	53
4.7.3. Determinação de cinzas	53
4.7.4. Determinação de carboidratos totais	53
4.8. EXPERIMENTOS REALIZADOS	54
4.9. ANÁLISE DOS RESULTADOS	57
4.9.1. Análise estatística	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR	59
5.2. PONTO DE ÓTIMO	79

5.3. CULTIVOS DE REFERÊNCIA	84
5.4. AVALIAÇÃO DOS PARÂMENTROS X_m, P_x E $Y_{x/N}$	87
5.4.1. Concentração celular máxima (X_m)	88
5.4.2. Produtividade em células (P_x)	91
5.4.3. Fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{x/N}$)	93
5.5. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA DE <i>Arthrospira platensis</i>	96
5.5.1. Teor de lipídios	97
5.5.2. Teor de proteínas	99
5.5.3. Outros componentes	102
5.6. IMPLICAÇÕES ECONÔMICAS	103
6. CONCLUSÕES	105
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
APÊNDICES	118
APÊNDICE 1. CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR	118
APÊNDICE 2. CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE AMÔNIA TOTAL PELO MÉTODO DE FENOL-HIPOCLORITO	119

LISTA DE ABREVIACÕES E SIMBOLOS

F	Valor do Teste F da análise de variância da regressão multivariável
K	Constante de determinação do perfil de alimentação do sistema
Mt	Molaridade total de nitrato de amônio adicionada (mM)
N	Nitrogênio
Nt	Quantidade total de nitrogênio adicionado (mg)
p	Valor de nível descritivo
pH	Potencial hidrogeniônico
P_x	Produtividade em células (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)
R²	Coefficiente de determinação
T	Instante de adição de nitrato de amônio (dias)
t	Valor do Teste t da regressão multivariável
T_c	Tempo de cultivo (dias)
V	Volume do meio (L)
X₁	Valores codificados do planejamento experimental referentes a nitrato de amônio
X₂	Valores codificados do planejamento experimental referentes a nitrato de amônio
X_i	Concentração celular inicial (mg L ⁻¹)
X_m	Concentração celular máxima (mg L ⁻¹)
Y_{X/N}	Fator de conversão de nitrogênio em células (mg mg ⁻¹)

RESUMO

MARTÍNEZ, L. C. C. **Cultivo descontínuo alimentado de *Arthrospira (Spirulina) platensis* em fotobiorreator tubular utilizando nitrato de amônio como fonte de nitrogênio.** 2010. 119 p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil.

A produção da cianobactéria *Arthrospira (Spirulina) platensis* é considerada de interesse nas indústrias de alimentos, farmacêuticas e químicas. Diferentes fontes de nitrogênio alternativas têm sido sugeridas na literatura para seu cultivo, incluindo uréia e sais de amônio, visando à diminuição no custo do meio de cultivo. A perda de amônia por degasificação ocorre quando utilizados tanques abertos, justificando dessa forma o uso da associação de fontes de nitrato e de amônia em fotobiorreatores fechados. O nitrato de amônio (NH_4NO_3) contorna estas condições, proporcionando ao cultivo uma fonte de nitrogênio prontamente assimilável (amônio) e outra de reserva (nitrato), no mesmo composto. Neste trabalho verificou-se, pelo uso de um planejamento fatorial 2^2 com configuração de estrela, a influência da intensidade luminosa (I) e da adição de diferentes concentrações de NH_4NO_3 (mM), no crescimento e composição da biomassa de *A. platensis* em cultivos realizados em fotobiorreator tubular por processo descontínuo alimentado, utilizando um tempo de 6 dias alimentação para a fonte de nitrogênio. Parâmetros cinéticos de crescimento, como concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_X) e o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$), bem como o teor de proteínas e lipídios na biomassa foram avaliados. Através do uso da regressão multivariável para a otimização das condições experimentais, foram obtidos valores de X_m e de P_X correspondentes a 4710 mg L^{-1} e $478,9 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$, respectivamente, pelo emprego de $I = 148 \text{ } \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e a adição de $9,7 \text{ mM}$ de NH_4NO_3 . O maior valor de $Y_{X/N}$ registrado foi $8,1 \text{ mg mg}^{-1}$, sendo superior aos obtidos com nitrato de sódio ($0,80 \text{ mg mg}^{-1}$). Os teores de proteína e de lipídios alcançaram valores de até 63,2 e 17,3 %, respectivamente. O emprego de NH_4NO_3 conduziu à redução dos custos de produção, sendo gastos em média R\$ 15,97 da fonte de nitrogênio por quilograma de células, valor inferior se comparado com outras fontes usadas no cultivo de *A. platensis* como NaNO_3 (R\$ 59,10 por quilograma de células). O uso do NH_4NO_3 em fotobiorreator tubular mostrou-se promissor para o cultivo de *A. platensis*, ao proporcionar um aumento na produção de biomassa e diminuir a perda de amônia por degasificação.

Palavras-chave: *Arthrospira (Spirulina) platensis*, processo descontínuo alimentado, nitrato de amônio, intensidade luminosa, fotobiorreator tubular, planejamento fatorial.

ABSTRACT

MARTÍNEZ, L. C. C. **Fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in tubular photobioreactor using ammonium nitrate as nitrogen source.** 2010. 119 p. Master Dissertation – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo. São Paulo, Brazil.

The production of the cyanobacterium *Arthrospira (Spirulina) platensis* is considered of interest to the food, pharmaceutical and chemical industries. Alternative nitrogen sources have been suggested in literature, including urea and ammonium salts, in order to reduce the cost of cultivation medium. Ammonia off-gassing occurs when open ponds are used, thus justifying the utilization of nitrate and ammonia sources association. Ammonium nitrate (NH_4NO_3) attend this condition, providing the cultivation with a nitrogen source readily assimilated (ammonium) and with one of reserve (nitrate), in the same molecule. In this work, it was verified, using a 2^2 factorial design with star configuration, the influence of light intensity (I) and the addition of different concentrations of NH_4NO_3 (mM) on the growth and biomass composition of *A. platensis* in cultures carried out in tubular photobioreactor by fed-batch process, using a 6-day feeding time of the nitrogen source. Kinetic growth parameters, such as maximum cell concentration (X_m), cell productivity (P_x) and yield of nitrogen to biomass ($Y_{X/N}$), as well the biomass content of protein and lipids, were evaluated. Through the use of regression analysis for the optimization of experimental conditions, values of X_m and P_x such as 4710 mg L^{-1} and $478.9 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$, respectively, were obtained by the use of $I = 148 \text{ } \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and the addition of 9.7 mM of NH_4NO_3 . The highest value of $Y_{X/N}$ obtained was 8.1 mg mg^{-1} , higher than that provided by the use of sodium nitrate (0.80 mg mg^{-1}). The levels of protein and lipid achieved up to 63.2 and 17.3 %, respectively. The use of NH_4NO_3 led to the reduction of culture medium costs, in which R\$ 15.97 (Real/Brazil) were spent on nitrogen source per kilogram of cells, value that is lower if compared to other common sources used for *A. platensis* growth, such as NaNO_3 (R\$ 59.10 per kilogram of cells, Real/Brazil). The use of NH_4NO_3 in tubular photobioreactor proved to be promising for the cultivation of *A. platensis*, leading to an increase in biomass production and diminishing the ammonia lost by off-gassing.

Keywords: *Arthrospira (Spirulina) platensis*, fed-batch process, ammonium nitrate, light intensity, tubular photobioreactor, factorial design.

1. INTRODUÇÃO

A geração de fontes alternativas de alimentos é considerada um aspecto importante para garantir a segurança alimentar em todos os países do mundo, especialmente naqueles com maiores problemas para suprir as necessidades básicas da população. O emprego de microrganismos na produção de alimentos constitui um dos principais focos recentes de estudos biotecnológicos. Nesse contexto, microrganismos fotossintetizantes, como as cianobactérias, são de especial interesse por gerarem, além de alimento protéico, diversos outros compostos com as mais diversas aplicações.

Arthrospira (Spirulina) platensis é considerada uma dessas alternativas, principalmente em decorrência das suas propriedades nutricionais relacionadas ao conteúdo de proteínas, lipídios, vitaminas, carboidratos, e até mesmo sais minerais. O teor e a qualidade de pigmentos que esta cianobactéria apresenta são também considerados de grande interesse comercial nas indústrias farmacêuticas e de alimentos. *Arthrospira* apresenta ainda uso promissor na área ambiental, como no tratamento de efluentes industriais e na remoção de metais pesados de corpos d'água, bem como na área de energia, como fonte de biocombustíveis. Pode-se dizer que o cultivo de *Arthrospira* é uma técnica ecologicamente correta, pois não gera um gasto elevado de energia e, pelo fato de não deteriorar e não poluir o seu habitat natural representa um bom exemplo para uma produção sustentável, quer dizer, sem efeitos prejudiciais ao meio ambiente.

Arthrospira foi usada como suplemento alimentar com segurança em diferentes períodos da história humana durante séculos (RICHMOND, 1990). A partir da segunda metade do século XX, foi testada a sua segurança comercial para poder ser reintegrada ao consumo humano e animal dentro dos padrões alimentares estabelecidos ao redor do mundo. *Arthrospira* é legalmente autorizada como complemento alimentar na Europa, Japão e Estados Unidos pelo FDA (*Food and Drug Administration*), sem efeitos tóxicos ao organismo (BELAY *et al.*, 1993; VON DER WEID *et al.*, 2000). No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) permite sua comercialização desde que o produto final no qual o microrganismo tenha sido adicionado esteja devidamente registrado (AMBROSI *et al.*, 2008). Como suplemento usado na alimentação humana e animal, este microrganismo é tido como uma proteína completa devido ao fato de conter todos os aminoácidos essenciais. Ao contrário de algumas outras formas de proteína, aquela proveniente de *Arthrospira* é digerível em uma taxa de 85 a 95 % - uma das mais altas encontradas entre as disponíveis atualmente.

O crescimento de microrganismos como *Arthrospira (Spirulina) platensis* é controlado basicamente por uma variedade de fatores ambientais e para seu cultivo são necessárias condições adequadas de nutrientes, temperatura, potencial hidrogeniônico e iluminação. O crescimento em pH alto é considerado importante na prevenção da contaminação do cultivo por microrganismos estranhos (BOROWITZKA, 1999). A fácil separação do meio de cultivo das células, devido à forma espiralada e maiores dimensões destas (PIORRECK *et al.*, 1984), e o baixo custo de operação são algumas das vantagens da produção desta cianobactéria em relação a outras. Os cultivos podem ser desenvolvidos em meios essencialmente inorgânicos, em que os constituintes principais são as fontes minerais de carbono (carbonatos, bicarbonatos), fósforo e nitrogênio (normalmente, nitratos), e cresce bem em temperaturas da ordem de 30° C (VONSHAK, 1997).

Os conteúdos de proteínas e lipídios da biomassa são influenciados tanto por condições de fornecimento de nutriente (SASSANO, 2004) como pelas condições de iluminação do sistema (BEZERRA *et al.*, 2008). A intensidade luminosa tem um papel fundamental no crescimento de microrganismos fotossintetizantes, uma vez que é a responsável pelo fornecimento de energia, sendo primordial a avaliação do seu efeito quando do estudo de novos tipos de reatores e usos de nutrientes alternativos no cultivo de microrganismos fotossintetizantes (OLGUIN, 1997; TORZILLO & VONSHAK, 1994).

Muitos trabalhos foram realizados visando à utilização de diversas fontes de nitrogênio para o cultivo de *Arthrospira*, sendo os melhores resultados, em termos de biomassa produzida, atribuídos aos nitratos (CORNET *et al.*, 1998), o que confirma a ampla utilização de meios que usam como fonte de nitrogênio o KNO₃ (PAOLETTI, 1975) ou NaNO₃ (SCHLÖSSER, 1982; ZARROUK, 1966). Estudos que vem sendo desenvolvidos para a otimização da utilização de fontes de nitrogênio alternativas, como os sais de amônio e a uréia, possibilitam uma diminuição do custo de produção. Uma vez que tais fontes alternativas se apresentam como potencialmente tóxicas à cianobactéria quando em altas concentrações, devido à presença de amônia no meio líquido, a utilização do processo descontínuo alimentado é necessária para obtenção de resultados satisfatórios quanto ao crescimento celular (CARVALHO *et al.*, 2004; BEZERRA *et al.*, 2008; FERREIRA, 2008).

O nitrato de amônio, por ser um sal que apresenta tanto o nitrato como o amônio em sua composição, suprimindo o cultivo com uma fonte de nitrogênio prontamente utilizável (amônia) e uma fonte de nitrogênio de reserva (nitrato), pode contribuir para a viabilização da produção de *A. platensis*. A amônia, por ser a forma de nitrogênio preferencial da *A. platensis* (BOUSSIBA, 1989), é responsável pelas possíveis altas velocidades de crescimento ao longo

do cultivo, sendo assegurada de igual forma a reserva de nitrogênio no meio de cultivo pela presença de nitrato.

O uso de fotobiorreatores fechados para o cultivo de *A. platensis* permite a solução de vários problemas que apresentam os fotobiorreatores abertos: minimiza a perda de água por evaporação, melhora o aproveitamento de fontes de nitrogênio de tipo amoniacal, evitando sua volatilização, maximiza a utilização de CO₂ e como resultado, permite a obtenção de biomassa de maior pureza em concentrações superiores.

Este trabalho buscou avaliar a viabilidade do emprego do nitrato de amônio no crescimento de *Arthrospira platensis* em fotobiorreator tubular mediante a técnica de cultivo descontínuo alimentado, visando um melhor aproveitamento do nitrogênio adicionado em termos da quantidade e composição da biomassa obtida. Também foi avaliado o comportamento celular frente à intensidade luminosa. Até o presente momento, não existem relatos na literatura sobre o emprego de nitrato de amônio como fonte de nitrogênio para o crescimento de *Arthrospira platensis* sob as condições de cultivo estabelecidas no presente trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Verificar a influência de fatores como a intensidade luminosa e a concentração total de nitrato de amônio, expressa em molaridade, adicionada ao cultivo de *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* em fotobiorreator tubular utilizando o processo descontínuo alimentado.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar parâmetros cinéticos como concentração celular máxima e produtividade em células.
- Analisar o fator de conversão de nitrogênio em células, assim como o teor de proteínas e de lipídeos na biomassa obtida.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. ANTECEDENTES / HISTÓRIA

O consumo da cianobactéria *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* está registrado há séculos em diversos lugares ao redor do mundo. Na América Central, por exemplo, os astecas consumiam este microrganismo como parte normal de sua dieta devido aos seus benefícios para a saúde (LACAZ-RUIZ, 2003). Também existem registros de sua produção e seu consumo por populações na África, América do Sul, Ásia, Oceania e alguns lugares de Europa (CIFERRI & TIBONI, 1985; RICHMOND, 1990; LACAZ-RUIZ, 2003).

Os primeiros relatos do uso de *Arthrospira* sp. na alimentação datam da pré-história, a partir da informação de que tribos de caçadores coletavam massas gelatinosas de algas verde-azuladas e as consumiam cruas ou cozidas. Para enriquecer suas dietas, também consumiam algas filamentosas coletadas em lagos alcalinos (Lago Texcoco no México e Lago Chade na África), classificadas no gênero *Arthrospira* (RICHMOND, 1990). Desde o século passado, existem indústrias dedicadas à produção em larga escala da biomassa de *Arthrospira* (*Spirulina*) sp., em diversos países ao redor do mundo, como Índia, Cuba, Chile, China e Estados Unidos, principalmente (SANCHEZ *et al.*, 2003; SPOLAORE *et al.*, 2006).

As cianobactérias, também conhecidas como algas verde-azuladas, ou cianofíceas, apresentam a maior diversidade morfológica entre o grupo dos organismos procarióticos (GIOVANNONI *et al.*, 1988). Atualmente, são conhecidas mais de 2000 espécies destes microrganismos com as mais diversas propriedades fisiológicas e morfológicas, com a possibilidade de crescimento em um amplo número de habitats. São claramente distinguíveis de outras bactérias fotossintetizantes, devido ao uso da água como doador de elétrons e produção de oxigênio molecular, que é liberado para o meio ambiente (REGELSBERGER *et al.*, 2002).

Arthrospira (*Spirulina*) sp., é uma cianobactéria filamentosa, autótrofa, reconhecida também como uma alga verde-azul e que deve seu nome à natureza helicoidal ou espiralada de seus filamentos. Este microrganismo cresce de forma natural em numerosos lugares, especialmente em corpos de água pouco profundos e sob a presença de bicarbonato de sódio, meio alcalino e salinidade elevada (VONSHAK & TOMASELLI, 2000). Seu alto teor nutricional justifica sua produção em elevadas quantidades para sua comercialização no mundo todo. Seu teor de aminoácidos é similar ao de outros microrganismos e alimentos, como ovos e leite (CIFERRI, 1983; COHEN, 1997).

3.2. CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA

As palavras “cianobactéria”, “alga verde-azul” ou “cianofíceas” são consideradas termos compatíveis. O primeiro refere-se à relação taxonômica e filogenética e o segundo representa a correlação ecológica e biológica. *Arthrospira platensis* é um microrganismo fotossintetizante pertencente ao grupo das cianobactérias e que por muito tempo foi classificado como uma alga.

Segundo Tomaselli (1997), *Spirulina* foi reclassificada sob o nome de *Arthrospira* sp., e aceita oficialmente em *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (CASTENHOLZ, 1989). No entanto, o termo *Spirulina* é mais comumente empregado na literatura. A classificação taxonômica do microrganismo *Arthrospira (Spirulina) platensis* é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação taxonômica de *Arthrospira (Spirulina) platensis*

Domínio	Procariota
Reino	Bactéria
Sub Reino	Negibactéria
Filo	Cianobactéria
Classe	<i>Cianofíceae</i>
Subclasse	<i>Oscillatorioophycideae</i>
Ordem	<i>Oscillatoriales</i>
Família	<i>Phormidiaceae</i>
Gênero	<i>Arthrospira (Spirulina)</i>
Espécie	<i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i>

Fontes: ALGAE BASE (2009), NCBI (2009)

3.3. MORFOLOGIA

Os microrganismos do gênero *Arthrospira (Spirulina)* pertencem ao grupo de cianobactérias filamentosas. A palavra latina *Spirulina* significa “espiral pequena” e faz referência a uma estrutura em forma de espiral. Uma de suas principais características é a presença de estruturas denominadas tricomas, os quais são filamentos em espiral formados por células cilíndricas (curtas e largas) (Figura 1) revestidas de uma fina membrana mucilaginosa. As dimensões celulares dependem do enrolamento celular e do comprimento dos filamentos. As condições ambientais de crescimento influem na configuração, mas a

morfologia helicoidal permanece constante (SPILLER *et al.*, 2001). *A. maxima* e *A. platensis* são as espécies mais representativas deste gênero e entre estas também existem diferenças morfológicas em relação aos filamentos, aos vacúolos e a regularidade externa da cápsula de cada filamento, ajudando a identificação e diferenciação taxonômica das espécies (TOMASELLI *et al.*, 1996).

Figura 1. *Arthrospira platensis* UTEX 1926. Fonte: UTEX

A organização celular procariótica da *Arthrospira* está conformada principalmente por duas partes: uma periférica citoplasmática, com a presença dos diferentes pigmentos (cromatoplasma); e outra central conhecida como nucleoplasma. Dentro desta estrutura encontra-se a cápsula, a parede celular pluriestratificada, o cromatoplasma com o sistema fotossintetizante de tilacóides, as fibrilhas de DNA e outras estruturas (GUGLIEMI *et al.*, 1993). A cápsula apresenta uma estrutura fibrilar e cobre cada filamento para sua proteção (SPILLER *et al.*, 2001).

A parede celular de *Arthrospira* está formada por quatro unidades conhecidas como LI, LII, LIII e LIV. As capas LI e LII proporcionam maior rigidez na estrutura celular de *Arthrospira*, pois contêm o polissacarídeo β -1,2-glicano e peptidoglicano (SANCHEZ, 2003). A espessura do tricoma varia de 6 a 12 μm , que é composto por células cilíndricas que apresentam uma coloração verde-azulada, com constrição na parede celular. O diâmetro da hélice varia de 30 até 70 μm e o comprimento de uma série de tricomas chega por volta dos 500 μm ; no entanto, essa medida pode ser bem menor quando as células são cultivadas sob agitação (TOMASELLI *et al.*, 1996). A forma helicoidal de *Arthrospira* predomina em cultivos líquidos, nos quais os tricomas se contorcem para dar voltas em espiral sobre seu

eixo. Estas mudanças morfológicas são devidas à hidratação ou desidratação progressiva de oligopeptídeos na capa de peptidoglicano (CIFERRI & TIBONI, 1985). Em análise microscópica, os espirais de *Arthrospira* aparecem como filamentos verde-azulados devido à presença de dois pigmentos: clorofila exclusivamente do tipo “a” (verde) e ficocianina (azul) (TOMASELLI, 1997).

Os pigmentos funcionais característicos (clorofila a, carotenóides e ficobilinas, que contêm ficocianina) se localizam no sistema de tilacóides, estruturas análogas aos cloroplastos e onde estão localizados os fotossistemas I e II. O espaço intertilacoidal é limitado pela presença de vesículas protéicas transparentes que contêm gás, e devido á estrutura tubular da *Arthrospira*, colabora para a capacidade desta cianobactéria de flutuar em meios aquáticos. *Arthrospira* também possui várias inclusões periféricas típicas e associadas aos tilacóides: grânulos de cianoficina, corpos poliédricos, grânulos de poliglicanos, grânulos de lipídeos, grânulos de polifosfatos, além de uma substância chamada metacromatina ou volutina. Os grânulos de cianoficina ou grânulos de reserva são importantes na síntese de ficocianina. Os corpos poliédricos ou carboxissomas contêm principalmente a enzima ribulose 1,5-difosfato carboxilase que permite a fixação do CO₂ nos organismos fotossintetizantes e exerce uma função de reserva energética na célula (CIFERRI & TIBONI, 1985). Os grânulos de poliglicano ou grânulos de glicogênio são polímeros de glicose, pequenos, circulares e muito difundidos no espaço intertilacoidal e que contribuem à formação de glicoproteína por serem produtos do metabolismo fotossintetizante. Os grânulos de lipídeos, β -grânulos ou grânulos osmofílicos formam o depósito de reserva, constituído por poli-B-hidroxibutirato (PHB), comumente encontrado como reserva energética em organismos procariotas (ABBAYES, 1989).

A reprodução de *Arthrospira* sp. ocorre com a quebra do tricoma em uma célula intercalaria que perde seu citoplasma e é convertida em necrídeo, considerada uma célula especializada com aspecto granuloso. Os tricomas quebrados em necrídeos originam cadeias menores, denominadas hormogônios, que diferem dos tricomas maduros pela falta de mobilidade, tamanho celular reduzido e morfologia diferenciada (CIFERRI & TIBONI, 1985). Em síntese, são três etapas fundamentais de reprodução: a) fragmentação dos tricomas, b) ampliação das células em hormogônios, e c) maturação e alongamento dos novos tricomas.

3.4. COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA

Arthrospira possui um tipo de parede celular característica que permite sua digestibilidade, e seus constituintes são totalmente assimiláveis sem necessidade de um tratamento prévio. Assim, até os compostos mais frágeis, como as vitaminas e os ácidos graxos essenciais, são disponibilizados no organismo em sua forma integral, sem nenhuma degradação, quando do consumo da cianobactéria em sua forma líquida. A composição química de *Arthrospira* constitui o fator mais importante na produção desta cianobactéria como potencial fonte de alimento (BELAY, 2002), em especial no que se refere a vitamina B12, pigmentos carotenóides, ferro e ácidos graxos essenciais.

3.4.1 Proteínas

Arthrospira apresenta teor de proteínas entre 50 e 70 % da massa seca, considerando-se uma variação neste valor (10 - 15 %) dependendo das condições de cultivo. Estão presentes uma série de aminoácidos, que representam 47 % do peso total das proteínas (DILLON *et al.*, 1995). Entre eles, oito são estritamente essenciais: isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina (COHEN, 1997). Este alto teor de aminoácidos é considerado excepcional, pois não é encontrado nem nas melhores fontes de proteínas vegetais (PARADA *et al.*, 1998). Na Tabela 2 são apresentados os teores protéicos de alimentos comuns ricos em proteínas, incluindo a *Arthrospira*.

Tabela 2. Teor protéico de diferentes alimentos

Tipo de alimento	Teor de proteína (%)
<i>Arthrospira</i> em pó	65
Ovo	47
Levedura de cerveja	45
Soja	37
Leite em pó	34
Queijo tipo parmesão	34
Gérmen de trigo	27
Amendoim	26
Frango	24
Peixe	22
Carne bovina	22

Fontes: SANCHEZ *et al* (2003); MENDES *et al.* (2004)

3.4.2. Carboidratos

Os carboidratos constituem de 15 a 25 % da massa seca de *Arthrospira*. Os açúcares simples, como glicose, frutose e sacarose, estão presentes em quantidades muito pequenas. Estão presentes também os polióis, como glicerol, manitol e sorbitol (BELAY, 2002). A parte essencial assimilável destes compostos está constituída por polímeros como glicogênio, nas concentrações de 1,9, 9,7 e 0,5 % da massa seca, respectivamente.

3.4.3. Lipídios

Os lipídeos, por sua vez, constituem aproximadamente 6 a 13 % da massa seca da cianobactéria em questão, podendo às vezes atingir valores acima de 15 % (BELAY, 2002; COHEN, 1997; DILLON *et al.*, 1995). O ácido γ -linolênico representa 40 % do total de ácidos graxos, representando quase 4 % do peso total da massa seca de *Arthrospira*. Dessa forma, esta cianobactéria pode ser considerada como uma das principais fontes de tal ácido graxo, depois do leite e de alguns óleos vegetais pouco comuns. Ademais, estão presentes ainda os ácidos palmítico, linolênico e oléico (COHEN, 1993). Nos lipídeos insaponificáveis, denominados esteróis, presentes na biomassa de *Arthrospira*, estão o campesterol e o estigmasterol. Alguns autores relacionam os esteróis com algum tipo de atividade antimicrobiana de *Arthrospira* (CIFERRI & TIBONI, 1985).

3.4.4. Vitaminas e Pigmentos

Autores como Gomes-Coronado *et al.* (2004) e Herrero *et al.* (2004) descrevem que *Arthrospira* é um microrganismo rico em compostos fotoquímicos típicos de vegetais (verdes e amarelos), como carotenóides e outros antioxidantes. O β -caroteno representa 80 % dos pigmentos carotenóides de *Arthrospira* (CARERI *et al.*, 2001). Outros são a ficoxantina e a criptoxantina, e as ficobilinas, que constituem 20 % de proteína celular e são quantitativamente os pigmentos dominantes em *Arthrospira* sp. (RICHMOND, 1988), além da clorofila (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004). Dentre as ficobilinas encontra-se a ficocianina, que auxilia na atividade fotossintética de microalgas e pode ser encontrada em até 20 % da massa seca de *Arthrospira* (VONSHAK, 1997). Importantes teores das seguintes vitaminas podem ser encontrados na biomassa da referida cianobactéria: tocoferóis (E), filoquinona ou fitonadiona (K), piridoxina (B6), tiamina (B1), e cianocobalamina (B12).

3.4.5. Minerais

Os minerais importantes em *Arthrospira* são: ferro, magnésio, cálcio, fósforo e potássio. Sabe-se que o elevado teor de ferro constitui uma vantagem para seu uso como suplemento alimentar (BELAY, 2002).

3.4.6. Ácidos nucleicos

São informadas concentrações de 4 a 6 % de ácidos nucleicos totais na massa seca de *Arthrospira*. Este baixo conteúdo de ácidos nucleicos é bastante inferior a aqueles encontrados na maioria dos microrganismos produtores de proteína unicelular (BELAY, 2002). A baixa concentração de ácidos nucleicos permite sua utilização como complemento nutricional.

3.5. CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO

As cianobactérias são bactérias fotossintetizantes que requerem apenas nutrientes inorgânicos, água e luz para seu crescimento caracterizado este por altas velocidades (CHRONAKIS *et al.*, 2000). Dependendo da finalidade de um cultivo (produção de pigmentos, ou de carotenóides, estudo da composição da biomassa, entre outros), o crescimento de *Arthrospira* está sujeito a diferentes variáveis de estudo. O crescimento desta cianobactéria em habitats alcalinos é devido ao fato de que ao consumir os carbonatos e bicarbonatos do meio, *Arthrospira* aumenta a alcalinidade do líquido, chegando até um pH de 11,5 (WHITTON, 1992). Também, os filamentos de *Arthrospira* formam uma espécie de rede que resulta eficaz na competição por nutrientes e espaço no meio de cultura e evitar dessa forma a proliferação de outras espécies de organismos como *Chlorella* sp. (RHEINHEIMER, 1987; WHITTON, 1992).

Arthrospira é geralmente cultivada de maneira fotoautotrófica, com suplemento de luz e nutrientes, principalmente fontes de nitrogênio e carbono. A concentração de nitrogênio no meio é um dos fatores determinantes de cultivos, uma vez que este nutriente está na constituição de proteínas e ácidos nucléicos, fundamentais para a manutenção e crescimento celular (WATANABE & HALL, 1996), apresentando vantagens em relação aos demais microrganismos fotoautotróficos. Dentre estas, podem ser citadas o crescimento em pH alcalino e meio altamente salino, fatores importantes na prevenção de contaminação no cultivo (WALACH *et al.*, 1987, BOROWITZKA, 1999); e a separação fácil do meio de cultivo das células, devido à forma espiralada e maiores dimensões destas (RICHMOND, 1988; PIORRECK *et al.*, 1984). Desenvolve-se em meios em que os constituintes principais são as fontes minerais de carbono (carbonatos, bicarbonatos), fósforo e nitrogênio (normalmente, nitratos), e cresce bem em temperatura de 30 °C (VONSHAK, 1997). Vários são os fatores que influenciam na produtividade do cultivo de *Arthrospira*, entre eles: intensidade luminosa, temperatura, concentração do inóculo, velocidade de agitação, sólidos dissolvidos, pH, qualidade da água, presença de macro e micronutrientes (CIFERRI, 1983).

3.5.1. Cinética de crescimento

Segundo Becker *et al.* (1982), o crescimento de *Arthrospira* sob condições pré-estabelecidas apresenta as seguintes fases de crescimento: a) fase de adaptação ou fase Lag, b) fase de crescimento exponencial ou fase Log, c) fase de crescimento linear, d) fase estacionária, e) fase de morte celular.

Durante a primeira fase (fase de adaptação), o cultivo de *Arthrospira* se adapta às condições estabelecidas; a velocidade específica de crescimento é baixa, e aumenta de forma gradual de acordo com o tempo de cultivo e a capacidade biológica de adaptação da cepa utilizada. As mudanças na concentração de nutrientes causada pela adaptação são tão baixas que o efeito no crescimento da biomassa não é considerado significativo; nesse ponto, a intensidade luminosa geralmente não é um fator limitante de crescimento (BECKER *et al.*, 1982).

Em um cultivo onde a intensidade luminosa e os nutrientes não são fatores limitantes de crescimento, o incremento na biomassa por unidade de tempo, durante a segunda fase, é proporcional à biomassa inicial do cultivo. O crescimento de *Arthrospira* continua dessa maneira até a terceira fase, na qual uma célula se encontra sobreposta a outra, resultando em uma diminuição da recepção de luz. Este efeito reduz a velocidade específica de crescimento e o incremento de biomassa de *Arthrospira* apresenta um comportamento linear, que pode ser mantido por vários dias caso não haja deficiência ou esgotamento de nutrientes (BECKER *et al.*, 1982).

Já na quarta fase (fase estacionária), com a redução da velocidade de crescimento, a recepção da intensidade luminosa pelas células de *Arthrospira* é também limitada, e assim a respiração aumenta. O metabolismo oxidativo de síntese de substâncias reduz o incremento constante da biomassa. Neste ponto, a curva de crescimento apresenta valor aproximado ao da concentração celular máxima, atingindo o equilíbrio entre esta e a perda celular decorrente dos processos de degradação. Durante a quinta fase (fase de morte), as células de *Arthrospira* morrem, liberando matéria orgânica. Esta fase é causada pelas condições não favoráveis do ambiente: o limitado suplemento de luz e nutrientes, ou a contaminação por outros microrganismos (BECKER *et al.*, 1982).

3.6. NUTRIENTES

3.6.1. Fonte de nitrogênio

O nitrogênio é o segundo mais abundante constituinte da célula de *A. platensis* que precisa ser adicionado no meio de cultivo, influenciando tanto no custo deste como no crescimento celular e na composição da biomassa obtida (STANCA & POPOVICI, 1996; GOLDMAN *et al.*, 1982). O tipo e a quantidade da fonte de nitrogênio usada no meio de cultura têm influência na composição da biomassa, no que diz respeito, principalmente, a proteínas, lipídeos e suas frações, pigmentos, etc.

Existem numerosos estudos sobre o emprego de diferentes fontes de nitrogênio para o cultivo de *A. platensis*, e os melhores resultados obtidos em termos de biomassa produzida são obtidos pelo uso de sais de nitrato (FAINTUCH, 1989; CORNET *et al.*, 1998), o que confirma a ampla utilização dos meios de Paoletti (PAOLETTI *et al.*, 1975), Zarrouk (ZARROUK, 1966) e Schlösser (SCHLÖSSER, 1982), que utilizam KNO_3 e NaNO_3 como fonte de nitrogênio, respectivamente.

Nos cultivos de *A. platensis*, os nitratos são adicionados como fonte de nitrogênio numa concentração de $2,5 \text{ g L}^{-1}$ (SCHLÖSSER, 1982), sem apresentar efeitos negativos sobre o crescimento (BOUSSIBA, 1989). Normalmente, as formas de nitrogênio presentes na natureza são formas oxidadas, como nitrato, nitrito e nitrogênio atmosférico. Em alguns ecossistemas também existem outras formas de nitrogênio, como a uréia. Em geral, todas essas formas de nitrogênio são reduzidas até amônio; processo que requer energia. Essa constitui a razão pela qual a maioria dos organismos fotossintetizantes prefere usar o amônio como fonte de nitrogênio (MURO-PASTOR *et al.*, 2003); é a forma de nitrogênio inorgânico reduzido de maior disponibilidade para assimilação. De acordo com Boussiba (1989), quando a amônia e o nitrato estão presentes no meio de cultura simultaneamente, a amônia é assimilada preferencialmente. Na ausência de amônio, estes organismos apresentam diferentes estratégias para aperfeiçoar a assimilação do nitrogênio através de diversos sistemas que regulam o suplemento de nitrogênio (MURO-PASTOR *et al.*, 2003).

As cianobactérias são os únicos procariontes fotossintetizantes que realizam fotossíntese oxigênica como as plantas. Muitos destes microrganismos podem empregar íons de nitrato, nitrito ou amônio como fontes de nitrogênio e algumas espécies também são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico ou empregar uréia como fonte de nitrogênio. As cianobactérias possuem sistemas de transporte específicos para cada forma de nitrogênio, mas a maioria é incorporada por difusão. Este sistema de transporte é dependente da concentração de

nitrogênio assim como do pH do meio de cultura. O nitrato e o nitrito são reduzidos pelas enzimas nitrato e nitrito redutase, respectivamente; as duas enzimas usam ferredoxina como doador de elétrons (Figura 2).

A assimilação de amônio constitui a principal via metabólica nas cianobactérias ligada à fotossíntese mediante o uso de ATP e seu poder redutor. O amônio entra nas células de duas formas: em forma de amônia ou pela ação de permeases específicas. O amônio tomado diretamente do meio de cultura ou como resultado do metabolismo de outras fontes de nitrogênio é incorporado aos esqueletos carbonados principalmente pela ação das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) (MURO-PASTOR *et al.*, 2003).

Figura 2. Assimilação de nitrogênio em cianobactérias. Fonte: MURO-PASTOR *et al.* (2003).

Na produção comercial de *Arthrospira*, fatores como a composição do meio de cultura devem ser levados em consideração (RICHMOND, 1988). O sucesso para a produção comercial em larga escala desta cianobactéria depende do desenvolvimento de um cultivo econômico e eficaz, pois 15 a 25 % do custo total com a produção de cianobactérias é referente ao meio de cultivo (BELAY, 1997). A fonte de nitrogênio merece destaque, pois é o segundo elemento mais abundante da biomassa de *Arthrospira*, representando até cerca de 10 % do total (CORNET *et al.*, 1992).

Como já mencionado, a fonte de nitrogênio convencional usada para o cultivo de *Arthrospira* são os nitratos de sódio e potássio (SCHOLÖSSER, 1982; PAOLLETI *et al.*, 1975). No entanto, trabalhos desenvolvidos nos últimos anos, têm demonstrado que a substituição das fontes tradicionais por fontes alternativas para suprir o nitrogênio necessário ao cultivo de *Arthrospira*, como cloreto de amônio, uréia e sulfato de amônio geram bons

resultados em termos de biomassa produzida e redução de custos (FERREIRA, 2008; RODRIGUES, 2008; SASSANO *et al.*, 2007; SOLETTTO *et al.*, 2005; DANESI *et al.*, 2002) (Figura 3).

Figura 3. Fontes de nitrogênio usadas no cultivo de *Arthrospira (Spirulina) platensis*.

3.6.1.1. Nitrato de amônio

O nitrato de amônio é um sal inorgânico sólido perolado ou granulado, além de inodoro, Possui em média 35 % de nitrogênio, e apresenta simultaneamente dois íons de fornecimento de nitrogênio: um nitrato (NO_3^-) e outro amônio (NH_4^+) (Figura 4). Algumas de suas propriedades químicas são apresentadas na Tabela 3.

Figura 4. Composição estrutural do nitrato de amônio. Fonte: Handbook of Chemistry & Physics (2009).

Tabela 3. Propriedades físico-químicas do nitrato de amônio

Fórmula molecular	NH_4NO_3
Massa molar	80.04 g/mol
Densidade	1,7 g/cm ³
Ponto de fusão	442 K (169,6 °C)
Ponto de ebulição	483 K (210 °C)
Solubilidade em água	190 g/100 ml (20 °C)

Fonte: Handbook of Chemistry & Physics (2009)

O nitrato de amônio é usado principalmente como fertilizante. Como a forma amoniacal tem carga elétrica positiva (+), pode se ligar aos colóides do solo, principalmente nas argilas, pois estas possuem cargas elétricas negativas. O nitrato tem carga elétrica negativa (-), não sendo absorvido totalmente pelas argilas, originando o processo de perda conhecido como lixiviação ou percolação, que consiste no transporte deste tipo de composto às camadas mais profundas dos solos.

O nitrato de amônio, por ser um sal que apresenta tanto o nitrato como o amônio em sua composição, pois cada molécula deste composto fornece dois átomos de nitrogênio, em comparação com outras moléculas como KNO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl , por exemplo, que aportam apenas 1 átomo de nitrogênio, pode contribuir para a viabilização da produção de *Arthrospira platensis* suprimindo o cultivo com uma fonte de nitrogênio prontamente utilizável (amônio) e uma fonte de nitrogênio de reserva (nitrato) (Figura 5).

Figura 5. Esquematização do uso de nitrato de amônio como fonte de nitrogênio.

Faintuch (1989), estudando diferentes fontes de nitrogênio para o cultivo de *Arthrospira maxima* por processo descontínuo, verificou que a utilização de fontes alternativas de nitrogênio, como cloreto de amônio e uréia, só foi viável com reduzidos níveis de concentração do nutriente no meio de cultura, com a conseqüente diminuição da quantidade de biomassa produzida. Saxena *et al.* (1983), trabalhando com produção de *A. platensis* a partir de águas residuárias domésticas adicionadas de sais, conseguiram bons resultados com uréia a 0,01 % como complementação, embora os teores protéicos maiores tenham sido obtidos para a fonte nitrato de sódio a 0,1 %. No entanto, comparando com o uso de fonte amoniacal, mesmo com a utilização de processo descontínuo alimentado para a alimentação deste nutriente, ensaio com nitrato como fonte de nitrogênio geralmente leva a resultados melhores em relação às concentrações celulares obtidas (CARVALHO *et al.*, 2004), em decorrência de carência de nitrogênio em cultivos com fontes amoniacaais.

3.6.2. Fonte de carbono

As cianobactérias apresentam diferentes esquemas metabólicos que incluem a ausência do ciclo de Krebs completo; assimilam o carbono usando o ciclo de Calvin e guardam energia e carbono em forma de glicogênio. Possuem a capacidade de acumular bicarbonato no meio intracelular quando este está em falta no meio extracelular, e, além disso, utilizam o dióxido de carbono como fonte de carbono para o seu metabolismo (CORNET *et al.*, 1998). *Arthrospira* sp. é cultivada autotroficamente utilizando altos níveis de carbonatos e bicarbonatos como fontes de carbono, por serem de baixo custo e proporcionarem um aumento no pH do meio de cultura .

A principal fonte de carbono é o íon bicarbonato que entra na célula por transporte ativo e posteriormente a enzima anidrase carbônica presente no meio intracelular e/ou na membrana periplasmática age sobre o bicarbonato liberando o dióxido de carbono. Este é incorporado no ciclo de Calvin produzindo moléculas orgânicas, tais como carboidratos, proteínas e lipídeos (KAPLAN & REINHOLD, 1999).

Diversos fatores diferem na assimilação do bicarbonato e do CO₂, como por exemplo: a cinética de saturação; a hiperpolarização da membrana, na qual é observada na assimilação do bicarbonato e não na assimilação do CO₂; a maior concentração de sódio que é requerida na assimilação do HCO₃⁻ em relação à assimilação do CO₂. Um dos trabalhos que explicam este fenômeno é o desenvolvido por Binagui *et al.* (2003), onde foi observado que em meios de cultivo apenas com carbonato o pH se manteve estável e não ocorre incremento na biomassa.

3.6.3. Outros nutrientes

Ânions como PO_4^{-3} , SO_4^{-2} , Cl^- e cátions como Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} , são importantes no meio de cultura, pois são necessários em funções estruturais e metabólicas. Os micronutrientes são requeridos em pequenas quantidades, pois agem principalmente como catalisadores, regulam as reações enzimáticas e os processos fisiológicos.

3.7. LUZ

A iluminação é indispensável para o crescimento de *Arthrospira* devido ao processo de fotossíntese, determinante na sua constituição estrutural. Um filamento individual de *Arthrospira* não agüenta uma exposição prolongada à luz, pois poderia apresentar destruição por fotólise. Existe a necessidade de manter a iluminação controlada mediante períodos regulares de tempo e cada período gera reações particulares. Por exemplo, durante o período de luz, é favorecida a assimilação de CO_2 através do ciclo de Calvin permitindo a formação de glicogênio como material de reserva na célula (VONSHAK *et al.*, 1983).

A taxa de crescimento e o rendimento da produção estão sob influência da intensidade luminosa e da duração da irradiação até o limite conhecido como ponto de saturação luminosa, que, segundo Balloni *et al.* (1980), este ponto está por volta de 60 a 120 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O regime claridade/escuro é afetado pela agitação exercida no reator, da turbulência do fluxo e da densidade populacional (RANGEL, 2000; RICHMOND, 1988).

Ao utilizar baixas intensidades luminosas, a velocidade de crescimento é diminuída, e conseqüentemente, ocorre uma diminuição na produção de biomassa (BALLONI *et al.*, 1980). Por outro lado, uma iluminação muito forte no cultivo de algas e de cianobactérias pode gerar dois efeitos principais: fotoinibição, definida como uma redução na eficiência fotossintética, devido aos danos causados pelo fluxo de fótons, que leva a um decréscimo no rendimento máximo do crescimento; e fotoxidação, que tem efeitos letais nas células, podendo levar à perda total da cultura (JENSEN & KNUTSEN, 1993). O emprego de altos valores de intensidade luminosa favorece parâmetros de crescimento (produção de biomassa), enquanto que valores mais baixos (da ordem de 24 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) favorecem a obtenção de biomassa rica em clorofila (DANESI *et al.*, 2004).

3.8. pH

O controle do pH no meio de cultura é importante para o crescimento de *Arthrospira*. O meio de cultura é alcalino devido ao consumo da fonte de carbono, gerando moléculas de NaOH. A medição do pH pode ser usada como uma forma de avaliar a quantidade de biomassa no meio. Quando a concentração celular é alta, existe maior degradação de bicarbonato e em consequência, a concentração dos grupos OH⁻ no meio aumenta, aumentando dessa forma o pH (PELIZER *et al.*, 2002).

O valor do pH determina a solubilidade do CO₂ e de alguns minerais que influem diretamente no crescimento de *Arthrospira*. O intervalo de pH ótimo para este microrganismo está entre 8 e 11. A adição de CO₂ é feita para regular o pH, pois o aumento do pH está relacionado com a deficiência da fonte de carbono. Com a adição de CO₂ é acelerada a assimilação do carbono. O CO₂ que ingressa ao meio apresenta uma passagem rápida, pois sai do cultivo para se equilibrar com o CO₂ atmosférico. Em pH 10,5 ocorre retenção do CO₂ no meio líquido (DE ALAVA *et al.*, 1997).

O pH determina também o equilíbrio da fonte de nitrogênio amoniacal, que pode se apresentar na forma livre de amônia ou protonada de amônio (DANESI, 2001). Em pH ótimo, meio alcalino, a entrada de amônia na célula é primeiramente um processo de difusão direcionado pelo gradiente de pH e pela assimilação de amônia intracelular (BOUSSIBA, 1989). Outro fator a ser considerado é que, quanto mais alcalino se torna o meio de cultivo, maior é a concentração de amônia em relação ao amônio, e, por conseguinte, maior é a perda de amônia por volatilização (DE ALAVA *et al.*, 1997; SANCHEZ-LUNA *et al.*, 2004).

A variação do pH é devido a três fatores principais: a) concentração de CO₂, pois diminui a alcalinidade e estabiliza o pH (0,05 – 5 % v/v); b) temperatura do meio de cultura; c) atividade metabólica de *Arthrospira*. A adição de CO₂ ao meio de cultura contendo *Arthrospira* gera a seguinte reação:

Schlösser (1982) apresenta um meio padrão utilizado para cultivos de *Arthrospira* que é rico em bicarbonato e carbonato, e a proporção destes sais determinam o pH alcalino deste meio de cultivo. O pH também influencia na disponibilidade de nitrogênio para a célula, pois em pH abaixo de 8,0 há uma predominância do íon amônio. Em pH acima de 10, o nitrogênio encontra-se na forma não protonada de amônia que é a forma facilmente assimilada pelas

células (BOUSSIBA, 1989). Quanto mais alcalino se torna o meio de cultivo, maior é a quantidade de amônia em relação ao amônio, e, portanto, maior é a perda de amônia por volatilização (Gráfico 1, baseada na equação de Henderson-Hasselbach) (FERREIRA, 2008).

Gráfico 1. Concentração (%) de Amônia e Amônio em função do pH. Fonte: FERREIRA, (2008).

3.9. TEMPERATURA

A temperatura do líquido de cultivo tem uma influência direta sobre a velocidade de crescimento de *Arthrospira*, pois abaixo de 20 °C o crescimento é afetado. A máxima velocidade de crescimento está acima de 29 °C (SANCHEZ-LUNA *et al.*, 2007), em temperaturas superiores a 35 °C existe risco da destruição acelerada do cultivo.

3.10. AGITAÇÃO

A agitação é um fator indispensável no cultivo de *Arthrospira*, para favorecer a dispersão homogênea do microrganismo no meio de cultura e a exposição à luz dos filamentos, assim como para a ativação do mecanismo fotossintético. Uma forte agitação leva à formação de espuma, interferindo na penetração da luz e no intercâmbio gasoso do cultivo, além de quebrar os filamentos de *Arthrospira*. A agitação pode ser realizada através da injeção de ar e ser complementada com a adição de CO₂. O uso de CO₂ pode ter varias finalidades: agitação, diminuição do pH e disponibilização de uma maior quantidade de carbono no meio de cultura para o metabolismo celular (RODRIGUEZ-MAROTO *et al.*, 2005).

3.11. APLICAÇÕES DE *Arthrospira* (*Spirulina*)

Na Tabela 4 são apresentadas as aplicações mais conhecidas da cianobactéria *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. Por exemplo, a biomassa é usada para produzir uma variedade de produtos saudáveis comercializados na forma de tabletes, cápsulas, pó ou também para a extração de diferentes substâncias bioativas (Tabela 4). Existem numerosos trabalhos nos quais são avaliadas *in vivo* e *in vitro* as propriedades terapêuticas e a presença de compostos antioxidantes de *Arthrospira* (Tabela 4). Tem sido avaliada a eficácia deste microrganismo no tratamento de algumas alergias, anemias, doenças virais e cardiovasculares, hiperglicemia, hiperlipidemia, processos inflamatórios, entre outros (CHAMORRO *et al.*, 2002; BELAY *et al.*, 2002).

Tabela 4. Usos e aplicações de *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*

Uso nutricional e farmacêutico	Uso terapêutico	Uso ambiental
Proteína unicelular ⁽¹⁾	Ação antialérgica, anticoagulante	Tratamento de águas residuais ⁽⁶⁾
Lípidos e ácidos graxos poliinsaturados ⁽²⁾	Efeito antianêmico e antitóxico	Detoxificação biológica
Polissacarídeos ⁽³⁾	Proteção cardiovascular	Remoção de N e P
Vitaminas ⁽⁴⁾	Imunoestimulante	Bioadsorção de metais pesados
Pigmentos e antioxidantes ⁽⁵⁾		Biocombustíveis ⁽⁷⁾

Fontes: ⁽¹⁾ DANESI *et al.* (2002); TACON & JACKSON, 1985; ⁽²⁾ MAHAJAN & KAMAT, 1995; OGBONNA, 1997; ⁽³⁾ PULZ & SCHEIBENBOGEN, 1998; ⁽⁴⁾ BECKER, 1981; ⁽⁵⁾ CHEN *et al.* (2006); PULZ & SCHEIBENBOGEN, 1998; SPOLAORE *et al.* (2006); BELAY *et al.* (2002); ⁽⁷⁾ CIFERRI & TIBONI, 1985; CHISTI, 2007.

A biomassa da *Arthrospira* é comercializada principalmente como complemento na alimentação de seres humanos e animais devido a sua composição química (Tabela 5). A segurança como alimento tem sido estabelecida por muito tempo através do seu consumo, além dos numerosos estudos toxicológicos (CHAMORRO *et al.*, 2002).

Tabela 5. Composição da biomassa de *Arthrospira platensis*

Proteínas	55 - 70%
Lipídeos	5 - 15%
Carboidratos	10 - 25%
Minerais	7%
Água	3%

Fonte: Earthrise Farms, 2009

Pigmentos como clorofila a (Chl-a), luteína, β -caroteno, ficocianina (PC) e aloficocianina (APC) são os um dos mais importantes compostos bioativos em *A. platensis* e tem sido usados como corantes naturais em alimentos e cosméticos assim como em produtos farmacêuticos (CHEN *et al.*, 2006) (Tabela 6). O efeito nocivo de corantes sintéticos e a tendência da sociedade em utilizar produtos naturais na alimentação e em cosméticos têm conduzido à exploração das microalgas fontes de como corantes naturais.

Tabela 6. Pigmentos presentes na biomassa de *Arthrospira platensis*

Pigmento	Conteúdo mg/10 g de <i>Arthrospira</i>	% total
Ficocianina (azul)	1.500-2.000	15-20
Clorofila a (verde)	115	1,15
Carotenóides (alaranjado)	37	0,37
Betacaroteno	14	0,14

Fonte: Earthrise Farms, 2009

Essa cianobactéria também possui alto teor protéico, com importância quantitativa por apresentar muitos aminoácidos considerados como essenciais, entre outros elementos, adquirindo alto valor nutricional (Tabelas 7, 8 e 9) (MORIST *et al.*, 2001; OGBONNA, 1997; BOROWITZKA, 1986). Outro motivo importante para seu consumo recomendado é que *Arthrospira* apresenta entre 85 e 95 % de digestibilidade, pois não há celulose dentre os polissacarídeos que constituem sua parede celular, permitindo que sua biomassa seja facilmente absorvida pelo corpo humano (LI, 1997).

Tabela 7. Aminoácidos presentes na biomassa de *Arthrospira platensis*

Aminoácido	Conteúdo mg/10 g de <i>Arthrospira</i>	% total
Aminoácidos essenciais		
Fenilalanina	280	4,5
Isoleucina	350	5,6
Leucina	540	8,7
Lisina	290	4,7
Metionina	140	2,3
Treonina	320	5,2
Valina	400	6,5
Triptófano	90	1,5
Aminoácidos não essenciais		
Ácido aspártico	610	9,8
Ácido glutâmico	910	14,6
Alanina	470	7,6
Arginina	430	6,9
Cistina	60	1,0
Glicina	320	5,2
Histidina	100	1,6
Prolina	270	4,3
Serina	320	5,2
Tirosina	300	4,8
Total	6200	100,0

Fonte: Earthrise Farms, 2009

Tabela 8. Ácidos graxos essenciais presentes na biomassa de *Arthrospira platensis*

Ácidos graxos Essenciais	Conteúdo mg/10 g de <i>Arthrospira</i>	% total
Mirístico	1	0,2
Palmítico	244	45,0
Palmitoleico	33	5,6
Heptadecanóico	2	0,3
Estearico	8	1,4
Oléico	12	2,2
Linolênico	97	17,9
Gama - linolênico	135	24,9
Outros	14	2,5
Total	546	100,0

Fonte: Earthrise Farms, 2009

Tabela 9. Minerais presentes na biomassa de *Arthrospira platensis*

Minerais	Conteúdo mg/ 10g de <i>Arthrospira</i>	Ingestão diária recomendada (mg)	% ingestão diária recomendada
Cálcio	100	1000	10
Ferro	15	18	83
Zinco	0,3	15	2
Fósforo	90	1000	9
Magnésio	40	400	10
Cobre	0,12	2	6
Iodo	*	15	*
Sódio	60	2000-5000	1
Potássio	160	6000	3
Manganês	0,5	3	17
Cromo	0,028	0,2	16
Germânio	0,006	*	*
Selênio	0,002	0,1	2

Fonte: Earthrise Farms, 2009; *Sem dados disponíveis

A biomassa de *Arthrospira* também pode ser utilizada no tratamento de águas residuais, renovação da água através da detoxificação biológica e remoção de metais pesados. Por ser um microrganismo fotossintético, tem a capacidade de produzir oxigênio e de remover nutrientes como nitrogênio e fósforo reduzindo a eutrofização nos corpos de água. A biomassa pode ser recuperada e reutilizada também, e pode ainda ser utilizada como combustível ou para produção de metano (CIFERRI & TIBONI, 1985).

3.12. FOTOBIORREATORES

A escolha do biorreator é um importante fator que influencia a produtividade do cultivo da cianobactéria em questão (WATANABE & HALL, 1996). Existe uma ampla variedade de biorreatores utilizados para o cultivo de microrganismos fotossintetizantes como cianobactérias e microalgas – alguns deles são utilizados atualmente para produção industrial destes (LEE, 2001). Os fotobiorreatores abertos são os mais comuns. No entanto possuem certas desvantagens em relação aos fotobiorreatores fechados, dentre as quais a menor eficiência fotossintética e a menor qualidade dos produtos de interesse obtidos a partir dos microrganismos (VONSHAK & RICHMOND, 1988). A baixa eficiência fotossintética ocorre, principalmente, devido ao efeito de sombreamento quando da alta densidade celular.

Os fotobiorreatores fechados são usados para cultivos de microrganismos fotossintéticos visando à produção de ácidos graxos poliinsaturados, pigmentos, vitaminas e polissacarídeos (MOLINA GRIMA *et al.*, 1995; JANSSEN *et al.*, 2002). Têm a vantagem de aumentar a eficiência de utilização de CO₂, controlando o pH da cultivo, e diminuir o nível de contaminantes como bactérias, algas, protozoários e fungos (WATANABE & HALL, 1996). Também, dependendo da configuração do reator, podem ter aumentada a área iluminada, reduzindo o efeito de sombreamento (WATANABE & HALL, 1995).

Com relação ao uso de biorreatores tubulares, estes poderiam ser de extrema valia no cultivo de *Arthrospira* em grande escala, pois como são reatores fechados possuem algumas vantagens em relação aos reatores abertos. Essas vantagens incluem a diminuição de perda de água por evaporação, a possibilidade de obtenção de maiores densidades celulares finais, a diminuição de contaminantes, bem como a menor perda de nutrientes voláteis, entre outras (TREDICI & ZITTELLI, 1998). No entanto, deve ser levado em conta que ainda não há muitos estudos na literatura com esse tipo de reator, de forma que para um uso mais seguro em escalas maiores, ainda são necessários investigações (FERREIRA, 2008).

Entre os diferentes tipos de fotobiorreatores, aqueles do tipo *air lift* apresentam uma maior transferência de massa líquido-gás com menor gasto de energia, proporcionam homogeneidade ao cultivo, podem ter o escoamento do líquido facilmente controlado e a contaminação pode ser prevenida (CHISTI, 2007). Estes tipos de reatores são especialmente recomendados para as culturas de cianobactérias por causa da sua sensibilidade ao estresse de cisalhamento mecânico (SIEGEL & ROBINSON, 1992). O sistema *air lift* também permite a remoção de oxigênio produzido pela fotossíntese, o qual é essencial, pois uma excessiva quantidade de oxigênio dissolvido inibe o processo de fotossíntese (MOLINA *et al.*, 2001).

Outro fator importante para o emprego desses fotobiorreatores é o fornecimento de luz eficientemente através da maximização na relação superfície-volume de iluminação. O suplemento de luz e CO₂ são provavelmente os limitantes para o crescimento de microrganismos fotossintetizantes nestes casos. Além desses fatores, a concentração de nitrogênio também é um fator determinante no cultivo, sabendo-se que este nutriente é utilizado, principalmente, para constituir proteínas e ácidos nucleicos, fundamentais para a manutenção e crescimento celular (WATANABE & HALL, 1996).

Considerando o emprego de CO₂ como fonte de carbono, o emprego de reator tubular facilita a incorporação deste nutriente no meio de cultivo. Nesse sentido, o CO₂ apresenta duas contribuições: mantém o valor de pH do cultivo em um valor ótimo para o crescimento celular e promove a movimentação da cultura (WATANABE & HALL, 1996). No caso de fontes de nitrogênio amoniacais, o emprego de reatores tubulares pode ser considerado como uma vantagem por favorecer a baixa perda de amônia por volatilização, minimizando a necessidade de adição constante de fonte de nitrogênio e em consequência, leva a uma redução no custo de produção e obtendo-se melhor aproveitamento do nitrogênio adicionado, pois em solução, estas fontes formam compostos que podem ser tóxicos quando em elevadas concentrações (CARVALHO *et al.*, 2004).

3.13. CULTIVO DESCONTÍNUO ALIMENTADO

O processo descontínuo alimentado é considerado uma técnica muito empregada em processos microbianos, onde um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo e em que os produtos aí permanecem até o final da fermentação (CARVALHO & SATO, 2001). A utilização do processo descontínuo alimentado para o cultivo de *A. platensis* é uma técnica muito útil quando se trata de evitar fenômenos de inibição por substrato e de adequar condições operacionais em processos fermentativos (CARVALHO *et al.*, 2004).

No processo descontínuo, todo substrato é adicionado no início do cultivo, enquanto no processo descontínuo alimentado o substrato é adicionado em determinados intervalos de tempo durante todo processo (WARD, 1989); com isso é possível adicionar nutrientes potencialmente tóxicos, quando presentes em altas concentrações, como, por exemplo, o íon amônio, sem prejudicar o crescimento microbiano e prevenindo seu acúmulo (CARVALHO *et al.*, 2004). Desta forma, este processo é vantajoso, visto que é possível adicionar a quantidade de nitrogênio necessária para a célula de forma que não seja tóxica (CARVALHO *et al.*, 2004).

No processo descontínuo alimentado, a alimentação pode ser de forma intermitente ou contínua. Segundo Sassano *et al.* (2004), a forma de adição do substrato no reator pode interferir na qualidade e na quantidade da biomassa produzida, uma vez que a presença de nitrogênio é fundamental para o crescimento e manutenção celular. Adicionalmente, o modo de adição é importante para melhorar a produtividade do cultivo (FERREIRA, 2008). De acordo com Gregersen & Jorgensen (1999), a melhor forma de usar o cultivo descontínuo alimentado é começar com uma baixa quantidade de biomassa e de substrato, fazendo a adição do substrato faltante quando o substrato inicial fosse consumido quase em sua totalidade pelo microrganismo cultivado. Esta estratégia é muito útil visando manter sob controle a concentração de substrato adicionado durante o processo.

A utilização do processo descontínuo alimentado para o cultivo de *A. platensis* permitiu a obtenção de resultados bastante satisfatórios com o uso de cloreto de amônio (CARVALHO *et al.*, 2004) e sulfato de amônio (SOLETTO *et al.*, 2005; FERREIRA, 2008) como fonte de nitrogênio, acarretando uma diminuição do custo de produção.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Fermentações do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (São Paulo – SP, Brasil).

4.1. MICRORGANISMO E MANUTENÇÃO

O microrganismo utilizado para a realização dos cultivos foi *Arthrospira (Spirulina) platensis* UTEX1926, cepa proveniente da UTEX (*The Culture Collection of Algae of the University of Texas – USA*). *Arthrospira (Spirulina) platensis* UTEX1926 foi mantida de maneira asséptica, em ágar inclinado (com adição de 2 % de ágar em meio líquido de cultivo padrão), em temperatura ambiente e sem agitação.

4.2. MEIO DE CULTURA

Para a realização deste trabalho foram utilizados dois tipos de meio: um meio de cultura Schlösser padrão com nitrato de sódio como fonte de nitrogênio (SCHLÖSSER, 1982), e o meio Schlösser modificado com a mesma composição do meio padrão, no qual o nitrato de sódio foi substituído pela adição de concentrações pré-estabelecidas de nitrato de amônio. A massa total de nitrato de amônio adicionada por unidade de volume foi uma variável deste trabalho, como explicado no item 4.8.

Composição do meio padrão (g L^{-1}): NaHCO_3 , 13,61; Na_2CO_3 , 4,03; K_2HPO_4 , 0,50; NaNO_3 , 2,50; K_2SO_4 , 1,00; NaCl , 1,00; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,20; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,04. Nesse meio é adicionado: 1 mL de solução de metais (P-IV) e 6 mL de solução de micronutrientes CHU.

- Solução de metais P - IV (mg L^{-1}): Na_2EDTA , 750; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 97; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 41; ZnCl_2 , 5; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4.

- Solução de micronutrientes CHU (mg L^{-1}): Na_2EDTA , 50; H_3BO_3 , 618; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 19,6; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 44; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20.

O meio de cultivo padrão foi utilizado para manutenção do microrganismo, preparo do inóculo e cultivos de referência, enquanto que o meio de cultivo modificado foi utilizado para a realização dos experimentos. O preparo do meio de cultura foi feito pela dissolução dos sais em água destilada.

4.3. PREPARO DO INÓCULO

O microrganismo, mantido em ágar, foi recolhido com auxílio de alça de platina, em condições assépticas e fluxo laminar, e inoculado em tubos de ensaios com 10 mL de meio líquido. Após sete dias, esse material foi utilizado para inocular frascos Erlenmeyer de 500 mL, com 250 mL de meio de cultivo Schlösser, previamente esterilizado em autoclave (121 °C durante 20 minutos). Depois de serem inoculados, os frascos foram dispostos em um agitador rotativo, a 100 rpm, temperatura de 29 °C $\pm$ 1 e sob uma intensidade luminosa de 72 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (CARVALHO *et al.*, 2004; DANESI, 2001).

As células em fase de crescimento exponencial foram utilizadas como inóculo após 10 dias de cultivo em agitador rotativo (PELIZER *et al.*, 2003). Para o emprego da suspensão de células resultante no reator tubular foi necessário realizar previamente um processo de filtração, duas lavagens sucessivas com solução fisiológica para a retirada do nitrato de sódio, e ressuspender novamente as células em meio de cultivo padrão isento de fonte de nitrogênio. Esta suspensão final serviu como inóculo para cada um dos cultivos realizados em reator tubular usando uma concentração celular inicial de 400 mg L⁻¹ (SOLETTO *et al.*, 2008).

4.4. DESCRIÇÃO DO REATOR

O reator empregado foi de tipo tubular mais conhecido como “*air-lift*”, desenvolvido no Laboratório de Tecnologia de Fermentações do Departamento de Tecnologia Bioquímico – Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. O reator é constituído de tubos transparentes de diâmetro interno igual a 1 cm (CARLOZZI & PINZANI, 2005), conectados entre si por mangueiras de silicone com inclinação de 2 % e iluminados com lâmpadas de 20 W. A capacidade total do reator é de 3,5 L, sendo o volume iluminado correspondente a 2,12 L.

4.5. DESCRIÇÃO DE UM EXPERIMENTO

Cada um dos experimentos foi realizado de acordo com as condições apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10. Condições de crescimento estabelecidas para o cultivo de *A. platensis*

Volume de trabalho	3,4 L
Fluxo de circulação	40 L h ⁻¹
Concentração inicial de células	400 mg L ⁻¹
Temperatura	29 ± 1 °C ^[a]
pH	9,5 ± 0,5 ^[b]
	Uso de CO ₂ proveniente de cilindro ^[c]

Fontes: ^[a] SÁNCHEZ-LUNA *et al.*, 2007; ^[b] FERREIRA, 2008; ^[c] CONVERTI *et al.*, 2006.

A intensidade luminosa e a adição de nitrato de amônio (fonte de nitrogênio empregada) foram variáveis de estudo neste trabalho. A adição diária da fonte de nitrogênio (nitrato de amônio) foi efetuada por pulsos (adição intermitente) de acordo à metodologia descrita por MATSUDO (*et al.*, 2009). As diferentes intensidades luminosas foram ajustadas de acordo com o estabelecido no item 4.8, pelo número de lâmpadas acesas e/ou uso de anteparos, com auxílio de um aparelho medidor de intensidade luminosa (LI-COR[®], modelo LI-250A).

Durante o tempo de cultivo (oito dias em média) foram acompanhados os diversos parâmetros avaliados neste trabalho, conforme as técnicas analíticas descritas no item 4.6. Todos os dias, por seis dias, adicionaram-se soluções de nitrato de amônio nas concentrações pré-determinadas (item 4.8), e o volume dos reatores tubulares, devido ao fenômeno de evaporação, foi acertado para 3,4 L através da adição de água destilada. Ao final do cultivo, devido à estabilização do crescimento celular, a suspensão de *A. platensis* foi retirada e filtrada.

4.6. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA ACOMPANHAMENTO DOS EXPERIMENTOS

Diariamente foram retiradas amostras para as determinações correspondentes ao pH e concentração celular. A cada dois dias foram avaliadas as concentrações de carbonato, amônia e nitrato.

4.6.1. Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada de acordo com o método espectrofotométrico descrito por LEDUY & THERIEN (1977). Foram empregadas amostras de 5 mL de meio contendo células de *Arthrospira platensis*, previamente homogeneizado. As amostras (diluídas se necessário) foram analisadas em espectrofotômetro FEMTO 700 Plus usando comprimento de onda de 560 nm e os resultados foram expressos em massa por volume (mg L⁻¹). Para isso foi elaborada uma curva de calibração que correlaciona o logaritmo da transmitância com um determinado valor de concentração celular (APÊNDICE 1).

4.6.2. Determinação da concentração de amônia total

A quantidade de amônia livre presente durante os ensaios foi determinada usando a metodologia do fenol-hipoclorito desenvolvida por SOLORZANO (1969). Nesta metodologia, o fenol e o hipoclorito de sódio reagem com a amônia presente no meio graças ao catalisador nitroprussiato de sódio. Esta reação gera um composto conhecido como indofenol, que apresenta uma coloração azul e sua intensidade depende da concentração de amônia presente no meio. A leitura desta solução é feita em um espectrofotômetro em comprimento de onda de 640 nm. O resultado das diferentes leituras foi interpretado pela elaboração de uma curva de calibração que correlaciona o logaritmo da transmitância com a concentração de amônia expressa em mol L⁻¹ (APÊNDICE 2).

4.6.3. Determinação da concentração de nitrato

A determinação da concentração de nitrato foi realizada de acordo ao método descrito por VOGEL (1992). Este método inclui etapas de redução, destilação e titulação. Para isto, foram utilizados 10 mL de meio isento de células proveniente do cultivo de *Arthrospira platensis*. Durante a etapa de redução, os íons nitrato são convertidos em amônia pela ação da liga de Devarda (composição: 50 % cobre, 45 % alumínio e 5 % zinco) em meio alcalino forte, devido à adição de uma solução de hidróxido de sódio 0,5 N. Na etapa de destilação, a amônia é capturada usando uma solução de ácido clorídrico 0,1 N padronizada. Finalmente, a quantificação da amônia recolhida é feita pela titulação do excesso do ácido usando uma solução padronizada de hidróxido de sódio 0,05 N e como indicador vermelho de metila.

O volume de hidróxido de sódio gasto em mL é convertido e expresso em massa de íons nitrato por litro. A conversão de volume do ácido titulado em massa de íons nitrato foi baseada na informação de que 1 mL de ácido clorídrico 1N corresponde a 0,06201g de íons nitrato (VOGEL, 1992). No emprego de nitrato de amônio como fonte de nitrogênio, para obter a concentração real de nitrato em g L⁻¹ foi necessário subtrair a amônia quantificada pelo método de SOLORZANO (1969).

4.6.4. Determinação da concentração de carbonato total

A quantificação do carbonato total foi feita de acordo ao método descrito por PIERCE & HAENISCH (1948). Se deve adicionar uma solução de hidróxido de sódio 1,5 N (i) em presença do indicador fenolftaleína em uma amostra de 10 mL livre de células proveniente do cultivo de *Arthrospira platensis* e se titular com uma solução de ácido clorídrico 0,5 N (ii) para a conversão do carbonato em bicarbonato. A seguir, são adicionadas umas gotas do indicador alaranjado de metila e se titula de novo com a solução de ácido clorídrico 0,5 N (iii), permitindo a transformação de todo o bicarbonato em ácido carbônico pelo deslocamento de equilíbrio. O carbonato total é calculado utilizando a diferença entre os volumes nas titulações feitas e expresso em gramas por litro.

4.6.5. Determinação do pH

O acompanhamento do pH foi feito diariamente por potenciometria, usando um aparelho METTLER TOLEDO 2100E. A leitura do pH foi realizada mediante a imersão direta do eletrodo em cada uma das amostras analisadas.

4.7. AVALIAÇÃO DA BIOMASSA

Ao final do cultivo, os 3,4 L de meio Schlösser contendo as células de *Arthrospira platensis* foram filtrados, e realizadas duas lavagens sucessivas utilizando água destilada, permitindo dessa forma a remoção do sal adsorvido pelas células. Após os processos de filtração e lavagem, a biomassa úmida foi submetida a um processo de secagem com ventilação a 55 °C durante 12 horas (PELIZER, 1999). Finalmente, a biomassa seca obtida foi triturada e com esse material foram realizadas as análises correspondentes a determinação dos teores de proteínas totais, lipídios e cinzas.

4.7.1. Determinação do teor de lipídios

O teor lipídico da biomassa seca de *Arthrospira platensis* foi quantificado usando a metodologia descrita por PIORRECK (1984) e OLGUÍN *et al.* (2001). As amostras de biomassa triturada foram submetidas ao processo de extração contínuo de Soxhlet com refluxo de mistura de solventes como clorofórmio e metanol na proporção 2:1 (v/v) até o líquido ficar límpido. Os resíduos de lipídios junto aos solventes passaram por um sistema evaporador rotativo a vácuo para a eliminação dos solventes. O material obtido reúne ácidos graxos, triglicerídeos, fosfolipídios, carotenóides, pigmentos fotossintetizantes, esteróides e hidrocarbonetos, sendo chamados de fração lipídica total. Os valores em massa de lipídios foram calculados com base na diferença de massa do balão antes e após o procedimento efetuado.

4.7.2. Determinação do teor de proteínas

Para a quantificação do teor protéico presente na biomassa seca de *Arthrospira platensis* previamente desengordurada e triturada, foi usado método clássico de KJELDAHL. Este método se caracteriza pela destruição da matéria orgânica usando ácido sulfúrico concentrado em presença de um catalisador e submetido a aquecimento intenso, formando nitrogênio inorgânico na forma de sulfato de amônio. Posteriormente, usando um aparelho para destilação de nitrogênio em meio alcalino pela adição de hidróxido de sódio, o sal de amônio é convertido em amônia, mediante um processo de destilação, e esta é recolhida numa solução saturada de ácido bórico. Finalmente, é realizada uma titulação usando uma solução padronizada de ácido clorídrico 0,02 N para determinação do nitrogênio na amostra (FERRAZ, 1986). Foi adotado o fator de 6,25 para a conversão a partir de teores de nitrogênio total (OFFICIAL METHODS OF FOOD ANALYSIS, 1984).

4.7.3. Determinação de Cinzas

O teor de cinzas das células secas foi determinado usando o método de aquecimento, descrito pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985). Neste método, um grama da amostra (biomassa seca) foi pesado em uma cápsula de porcelana previamente aquecida em mufla a 550 °C, depois resfriada usando um dessecador até temperatura ambiente e pesada novamente. A amostra foi seca em estufa a 105 °C, carbonizada usando bico de bunsen em temperatura baixa e incinerada em mufla a 550 °C durante 4 horas, tempo necessário para obter-se massa constante. Posteriormente, foi resfriada novamente em dessecador durante uma hora, até temperatura ambiente e pesada. As cinzas devem ficar brancas ou ligeiramente acinzentadas.

4.7.4. Determinação de carboidratos totais

O teor de carboidratos totais foi determinado usando a diferença entre as porcentagens dos demais componentes analisados.

4.8. EXPERIMENTOS REALIZADOS

Os cultivos foram realizados de acordo com o planejamento experimental apresentado na Tabela 11. O planejamento usado é denominado planejamento fatorial 2^2 , com três pontos centrais, mais a configuração em estrela (BARROS NETO *et al.*, 2003). Este planejamento de composição central é baseado na realização de quatro experimentos nos níveis clássicos do planejamento fatorial 2^n (valores codificados +1,00 e -1,00) e mais quatro experimentos com rotação de 45 graus (valores codificados $+\sqrt{2}$ e $-\sqrt{2}$), que quando sobrepostos aos anteriores, apresentam a configuração de uma estrela (BARROS NETO *et al.*, 2003) (Gráfico 2).

Gráfico 2. Configuração de estrela referente aos cultivos do planejamento experimental (cultivos 1 – 11).

Os valores de intensidade luminosa foram escolhidos em função dos trabalhos de Watanabe & Hall (1995), Ferreira (2008) e Convertei *et al.* (2006). As molaridades totais de nitrato de amônio adicionadas foram fixadas com base no meio de Schlösser (1982), sendo o ponto central definido como aquele que tem molaridade de nitrogênio da mesma ordem de grandeza que a deste meio. A equação de adição foi:

$$M = 1,33 + k.t$$

Onde “M” representa a molaridade de nitrato de amônio adicionada até instante t (d) e 1,33 mM a molaridade inicial de nitrato de amônio adicionada, correspondente à quantidade inicial de nitrogênio utilizada por Matsudo *et al.* (2009). Sendo o tempo total de adição correspondente a 6 dias, de acordo com experiência de projetos que estão em desenvolvimento neste laboratório com este tipo de reator, e sabendo-se o valor de Mt (molaridade total de nitrato de amônio adicionada, Tabela 11) pode-se calcular o k, que corresponde à molaridade diária de nitrato de amônio adicionada.

Tabela 11. Planejamento experimental

Experimento	Valores codificados		Valores reais	
	X_1^a	X_2^b	Intensidade luminosa ($\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Molaridade total de nitrato de am\~{o}nio (mM)
1	-1	-1	60	7,5
2	+1	-1	180	7,5
3	-1	+1	60	22,5
4	+1	+1	180	22,5
5	0	-1,414	120	4,4
6	-1,414	0	35	15,0
7	0	+1,414	120	25,6
8	+1,414	0	205	15,0
9	0	0	120	15,0
10	0	0	120	15,0
11	0	0	120	15,0

^a valor codificado da variável da intensidade luminosa.

^b valor codificado da variável molaridade total de nitrato de amônio adicionada (Mt)

Ao completar todos os ensaios previstos no planejamento experimental, foi aplicada uma regressão multivariável, obtendo-se os valores correspondentes para cada uma das variáveis na determinação do ponto de ótimo (Tabela 12). Foram realizados três ensaios do ponto de ótimo. Também foram realizados dois cultivos de referência com meio padrão de Schlösser (1982), usando como fonte de nitrogênio nitrato de sódio (NaNO_3), nas condições correspondentes ao ponto central de intensidade luminosa (Tabela 13), corrigindo o valor da concentração de nitrato de sódio para seu valor inicial sempre que a concentração cair para um valor inferior a $1,0 \text{ g L}^{-1}$ (FAINTUCH, 1989).

Tabela 12. Experimentos do ponto de ótimo realizados usando nitrato de amônio

Experimento	Valores codificados		Valores reais	
	X_1^a	X_2^b	Intensidade luminosa ($\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Molaridade total de nitrato de am\~{o}nio (mM)
12	0,47	- 0,71	148	9,7
13	0,47	- 0,71	148	9,7
14	0,47	- 0,71	148	9,7

^a valor codificado da variável da intensidade luminosa.

^b valor codificado da variável molaridade total de nitrato de amônio adicionada (Mt)

Tabela 13. Experimentos de referência realizados usando nitrato de sódio

Experimento	Intensidade luminosa ($\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Molaridade total de nitrato de s\~{o}dio (mM)*
15	120	30
16	120	30

* 30 mM de NaNO_3 equivale a $2,5 \text{ g L}^{-1}$

4.9. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Realizou-se uma avaliação das curvas de crescimento e consumo de nutrientes de todos os cultivos. A partir dos resultados de concentração celular obtidos, foram calculados os parâmetros produtividade em células (P_x) e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$).

Produtividade em células

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

Os valores de P_x em miligramas por litro por dia representam a média do crescimento celular diário e foram determinados com base na concentração total de células formadas e no tempo total de cultivo, onde:

P_x	Produtividade em células ($\text{mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$)
X_m	Concentração celular máxima obtida (mg L^{-1})
X_i	Concentração celular inicial (mg L^{-1})
T_c	Tempo de cultivo (d)

Fator de conversão de nitrogênio em células

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

Os valores de $Y_{X/N}$ em miligramas de célula por miligrama de nitrogênio representam quanto do nitrogênio provido aos cultivos foi convertido em células. Foi determinado com base na massa total de células formadas e massa total de nitrogênio adicionada, onde:

$Y_{X/N}$	Fator de conversão de nitrogênio em células (mg mg^{-1})
X_m	Concentração celular máxima (mg L^{-1})
X_i	Concentração celular inicial (mg L^{-1})
V	Volume de meio (L)
N_t	Quantidade total de nitrogênio adicionado (mg)

4.9.1. Análise Estatística

Verificou-se a influência dos fatores estudados (intensidade luminosa empregada e quantidade de nitrato de amônio adicionada ao cultivo), em seus valores codificados, nas variáveis de resposta (X_m , P_X , $Y_{X/N}$, teor de proteínas e de lipídios da biomassa) com auxílio de análise de regressão multivariável usando o programa estatístico S-PLUS 2000, gerando as correspondentes superfícies de respostas. O critério escolhido para otimização das condições experimentais foi baseado na otimização de X_m . Os cultivos de referência não foram avaliados por regressão multivariável, pois foram considerados apenas para efeitos comparativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR

A seguir, nas Tabelas 14 a 24 são apresentados os dados coletados referentes à concentração celular, valor de pH, concentração de amônia, concentração de nitrato e concentração de carbonato total dos ensaios realizados com base no planejamento experimental (ensaios 1 a 11). As Tabelas 25 a 27 representam os dados correspondentes ao ponto de ótimo (experimentos 12 a 14), e nas Tabelas 28 e 29 são apresentados os dados de concentração celular, valor de pH, concentração de nitrato e concentração de carbonato total correspondentes aos cultivos referência (experimentos 15 e 16), usando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio.

Os Gráficos 3 a 13 fazem referência ao comportamento da cianobactéria *Arthrospira platensis* e da concentração de amônia durante cada um dos experimentos previstos no planejamento experimental (item 4.8). Os Gráficos 14 a 16 fazem referência aos experimentos pertencentes ao ponto de ótimo usando a técnica de processo descontínuo alimentado e nitrato de amônio como fonte de nitrogênio. Os Gráficos 17 e 18 representam o comportamento de *Arthrospira platensis* durante os cultivos de referência usando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. Até a presente data, não existem relatos conhecidos na literatura sobre o emprego de nitrato de amônio por processo descontínuo alimentado como fonte de nitrogênio para o crescimento de microrganismos fotossintetizantes como *Arthrospira platensis*.

Durante todos os experimentos, as determinações de concentração celular e pH foram feitas diariamente, enquanto que as medidas de concentração de amônia, de nitrato e de carbonato total, em função dos volumes necessários para a execução das técnicas, foram realizadas a cada dois dias nos experimentos, no caso dos experimentos onde foi usado o nitrato de amônio como fonte de nitrogênio; em quanto que nos cultivos de referência usando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, a concentração de amônia não foi quantificada e a concentração de nitrato foi verificada diariamente com o propósito de corrigir o valor da concentração deste sal no meio de cultura para seu valor inicial ($2,5 \text{ g L}^{-1}$) sempre que a concentração cair para um valor inferior a $1,0 \text{ g L}^{-1}$ como explicado no item 4.8.

Igualmente, são apresentados os resultados referentes aos valores dos parâmetros de crescimento avaliados e obtidos após cada experimento: concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_x) e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) (Tabela

30). Também são mostrados os valores referentes às análises de teores de proteínas e lipídios na biomassa obtida para cada um dos ensaios realizados (Tabela 37).

Tabela 14. Valores de concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 1

(NH_4NO_3 7,5 mM; 60 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Tempo (dias)	X (mg L^{-1})	Nitrato (g L^{-1})	Amônia total (mol L^{-1})	Carbonato (g L^{-1})	pH
0	400	0,08	$1,33 \cdot 10^{-3}$	11,6	9,5
1	653	-	-	-	9,8
2	1080	0,10	$4,81 \cdot 10^{-4}$	10,2	9,7
3	1768	-	-	-	9,9
4	2232	**	$4,29 \cdot 10^{-4}$	10,2	9,8
5	2879	-	-	-	9,7
6	3402	0,01	$1,61 \cdot 10^{-3}$	8,6	9,8
7	3784	-	-	-	9,8
8	3914	**	$5,50 \cdot 10^{-4}$	10,4	10,0
9	3831	-	-	-	9,9

(**) Valor abaixo do limite mínimo detectado pela metodologia; (-) Amostra não analisada

Tabela 15. Valores de concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 2

(NH_4NO_3 7,5 mM; 180 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Tempo (dias)	X (mg L^{-1})	Nitrato (g L^{-1})	Amônia total (mol L^{-1})	Carbonato (g L^{-1})	pH
0	400	0,08	$1,33 \cdot 10^{-3}$	11,6	9,4
1	790	-	-	-	9,9
2	1044	0,23	$4,27 \cdot 10^{-5}$	9,0	10,0
3	1297	-	-	-	10,1
4	2263	0,08	$3,94 \cdot 10^{-5}$	9,6	10,2
5	2613	-	-	-	10,0
6	3472	**	$1,50 \cdot 10^{-5}$	9,0	10,1
7	4012	-	-	-	10,2
8	4555	**	$1,66 \cdot 10^{-5}$	9,3	10,1
9	4716	-	-	-	9,9
10	4834	**	$2,13 \cdot 10^{-5}$	8,4	10,0
11	4749	0,03	$1,57 \cdot 10^{-5}$	9,3	9,9

(**) Valor abaixo do limite mínimo detectado pela metodologia; (-) Amostra não analisada

Tabela 16. Valores de concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 3
(NH_4NO_3 22,5 mM; 60 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Tempo (dias)	X (mg L^{-1})	Nitrato (g L^{-1})	Amônia total (mol L^{-1})	Carbonato (g L^{-1})	pH
0	400	0,08	$1,33 \cdot 10^{-3}$	11,6	9,5
1	415	-	-	-	9,6
2	626	0,40	$8,20 \cdot 10^{-3}$	11,0	9,4
3	707	-	-	-	9,5
4	1037	0,70	$9,41 \cdot 10^{-3}$	10,0	9,5
5	1103	-	-	-	9,4
6	1029	1,04	$1,11 \cdot 10^{-2}$	11,0	9,4

(-) Amostra não analisada

Tabela 17. Valores de concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 4
(NH_4NO_3 22,5 mM; 180 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Tempo (dias)	X (mg L^{-1})	Nitrato (g L^{-1})	Amônia total (mol L^{-1})	Carbonato (g L^{-1})	pH
0	400	0,08	$1,33 \cdot 10^{-3}$	11,6	9,4
1	894	-	-	-	9,9
2	545	0,19	$5,66 \cdot 10^{-3}$	9,6	9,8
3	690	-	-	-	9,9
4	938	0,86	$7,08 \cdot 10^{-3}$	9,0	10,0
5	960	-	-	-	9,8
6	905	1,14	$9,51 \cdot 10^{-3}$	10,5	9,8
7	811	0,90	$1,04 \cdot 10^{-2}$	9,6	9,6

(-) Amostra não analisada

Tabela 18. Valores de concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 5
(NH_4NO_3 4,4 mM; $120 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Tempo (dias)	X (mg L^{-1})	Nitrato (g L^{-1})	Am\u00f4nia total (mol L^{-1})	Carbonato (g L^{-1})	Ph
0	400	0,08	$1,33.10^{-3}$	11,6	9,4
1	765	-	-	-	9,9
2	811	0,30	$3,46.10^{-3}$	12,4	9,6
3	1737	-	-	-	9,9
4	2556	0,10	$1,41.10^{-5}$	9,3	10,2
5	2746	-	-	-	10,0
6	3382	**	$1,74.10^{-5}$	9,6	10,1
7	3422	-	-	-	10,1
8	3249	0,04	$1,43.10^{-5}$	11,7	9,9

(**) Valor abaixo do limite m\u00ednimo detectado pela metodologia; (-) Amostra n\u00e3o analisada

Tabela 19. Valores de concentra\u00e7\u00e3o celular, nitrato, am\u00f4nia, carbonato e pH durante o experimento 6
(NH_4NO_3 15,0 mM; $35 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Tempo (dias)	X (mg L^{-1})	Nitrato (g L^{-1})	Am\u00f4nia total (mol L^{-1})	Carbonato (g L^{-1})	pH
0	400	0,08	$1,33.10^{-3}$	11,6	9,4
1	539	-	-	-	9,9
2	1430	0,09	$8,92.10^{-5}$	9,3	9,6
3	1242	-	-	-	9,9
4	1603	0,68	$7,76.10^{-4}$	11,0	10,2
5	1652	-	-	-	10,0
6	1809	0,55	$5,01.10^{-4}$	11,0	10,1
7	2164	-	-	-	10,1
8	2093	0,78	$8,99.10^{-5}$	10,7	9,9

(-) Amostra n\u00e3o analisada

Tabela 20. Valores e concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 7(NH₄NO₃ 25,6 mM; 120 μmol fótons m⁻² s⁻¹)

Tempo (dias)	X (mg L⁻¹)	Nitrato (g L⁻¹)	Amônia total (mol L⁻¹)	Carbonato (g L⁻¹)	pH
0	400	0,08	1,33.10 ⁻³	11,6	9,4
1	734	-	-	-	9,8
2	403	0,57	7,33.10 ⁻³	10,2	9,7
3	600	-	-	-	9,7
4	676	1,04	1,01.10 ⁻²	9,6	9,8
5	436	-	-	-	9,6

(-) Amostra não analisada

Tabela 21. Valores de concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 8(NH₄NO₃ 15,0 mM; 205 μmol fótons m⁻² s⁻¹)

Tempo (dias)	X (mg L⁻¹)	Nitrato (g L⁻¹)	Amônia total (mol L⁻¹)	Carbonato (g L⁻¹)	pH
0	400	0,08	1,33.10 ⁻³	11,6	9,5
1	520	-	-	-	9,7
2	1135	0,30	2,53.10 ⁻³	10,2	9,8
3	1895	-	-	-	10,1
4	2140	0,28	1,61.10 ⁻³	8,4	10,0
5	3010	-	-	-	9,7
6	3784	0,66	8,87.10 ⁻⁴	8,6	9,7
7	3902	-	-	-	9,8
8	3926	0,63	4,38.10 ⁻⁴	10,7	9,9
9	3836	-	-	-	9,8

(-) Amostra não analisada

Tabela 22. Valores de concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 9(NH₄NO₃ 15,0 mM; 120 μmol fótons m⁻² s⁻¹)

Tempo (dias)	X (mg L ⁻¹)	Nitrato (g L ⁻¹)	Amônia total (mol L ⁻¹)	Carbonato (g L ⁻¹)	pH
0	400	0,08	1,33.10 ⁻³	11,6	9,4
1	769	-	-	-	9,7
2	1332	0,43	5,01.10 ⁻⁴	9,3	9,8
3	1900	-	-	-	10,0
4	2769	0,70	1,39.10 ⁻⁵	7,9	10,0
5	3231	-	-	-	9,7
6	3661	0,85	5,91.10 ⁻⁵	7,6	9,8
7	4012	-	-	-	9,7
8	4194	1,05	1,00.10 ⁻⁴	7,2	9,9

(-) Amostra não analisada

Tabela 23. Valores de concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 10(NH₄NO₃ 15,0 mM; 120 μmol fótons m⁻² s⁻¹)

Tempo (dias)	X (mg L ⁻¹)	Nitrato (g L ⁻¹)	Amônia total (mol L ⁻¹)	Carbonato (g L ⁻¹)	pH
0	400	0,08	1,33.10 ⁻³	11,6	9,4
1	751	-	-	-	9,8
2	1494	0,50	3,70.10 ⁻⁴	7,6	9,9
3	2046	-	-	-	10,0
4	3002	0,67	1,70.10 ⁻⁵	6,9	10,1
5	3231	-	-	-	9,7
6	3739	0,85	4,96.10 ⁻⁵	6,9	9,8
7	3854	-	-	-	9,7
8	3807	0,96	9,92.10 ⁻⁵	9,3	10,0

(-) Amostra não analisada

Tabela 24. Valores de concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 11
(NH₄NO₃ 15,0 mM; 120 μmol fótons m⁻² s⁻¹)

Tempo (días)	X (mg L ⁻¹)	Nitrato (g L ⁻¹)	Amônia total (mol L ⁻¹)	Carbonato (g L ⁻¹)	pH
0	400	0,08	1,33.10 ⁻³	11,6	9,4
1	620	-	-	-	9,7
2	1363	0,48	9,95.10 ⁻⁵	11,0	9,8
3	1972	-	-	-	9,9
4	2777	0,48	6,12.10 ⁻⁵	10,3	10,1
5	3240	-	-	-	10,1
6	3784	0,91	3,70.10 ⁻⁵	10,7	10,0
7	3807	-	-	-	10,0
8	3938	0,64	5,54.10 ⁻⁵	9,6	9,8
9	3902	-	-	-	9,9

(-) Amostra não analisada

Os experimentos apresentaram crescimento celular após terminar o regime de alimentação da fonte de nitrogênio, que foi de 6 dias. Os tempos de cultivo foram de oito a nove dias, correspondentes à concentração celular máxima. Dadas as condições de cultivo e o fornecimento de nitrogênio e de luz, variáveis estudadas neste trabalho e detalhadas no planejamento experimental (item 4.8), foram obtidas concentrações celulares que variaram entre 676 mg L⁻¹ e 4834 mg L⁻¹, sendo este último o melhor resultado, obtido no experimento 2, contendo 7,5 mM de nitrato de amônio (Tabela 15).

Segundo BELAY (1997), durante o cultivo de um microrganismo como *Arthrospira*, a fase estacionária pode ser atingida por diversos motivos, como esgotamento de algum tipo de nutriente, limitação de luz e excreção de metabólitos tóxicos, podendo levar à morte celular. Nos experimentos realizados, não ficou caracterizada a presença de fase lag ou de adaptação no começo do cultivo de *A. platensis*, que iniciou o cultivo crescendo exponencialmente e chegou à fase estacionária geralmente após o oitavo dia de cultivo. A ausência da fase lag ou fase de adaptação foi devido à semelhança das condições de crescimento, que envolve a composição do meio de cultura e a temperatura do cultivo. Adicionalmente, as células utilizadas no inóculo se encontravam em fase exponencial de crescimento, ou seja, o inóculo usado apresentava células jovens e ativas adequadas para o crescimento esperado (PELIZER *et al.*, 2003).

A concentração de carbonato total apresentou um comportamento constante em todos os experimentos realizados, incluindo aqueles correspondentes ao ponto de ótimo e os cultivos de referência, devido à correção diária do pH com uso de CO₂ (Tabelas 14 a 29). Diariamente, houve um aumento do pH em todos os cultivos e sendo uma forma indireta de avaliar o crescimento celular, pois este aumento pode ser explicado pelo consumo da fonte de carbono presente no meio de cultura (PELIZER *et al.*, 2002). Em relação ao nitrato, a quantidade deste composto no meio de cultura foi relacionada com a sua assimilação por parte da *A. platensis*. Nos cultivos correspondentes ao planejamento experimental (experimentos 1 a 11), nos quais houve baixo crescimento celular, o nitrato se encontrava em abundante quantidade (experimentos 3, 4 e 7), chegando ao final do cultivo a valores da ordem de 1 g L⁻¹ (Tabelas 16, 17 e 20). De forma contrária, de um modo geral, nos cultivos que apresentaram uma concentração celular elevada (experimentos 1, 2, 5 e 8), a concentração de nitrato dificilmente superou esse valor (Tabelas 14, 15, 18 e 21).

Os perfis das curvas de crescimento e da concentração de amônia apresentaram dois tipos de comportamento, dependendo da concentração da fonte de nitrogênio empregada. Por uma parte, estão àqueles experimentos nos quais se obtiveram as maiores concentrações celulares em função das relativamente baixas concentrações de amônia ao longo do cultivo (experimentos 1, 2, 8 a 11), cujas curvas de crescimento foram semelhantes (Gráficos 3, 4, 10 a 13). Por outro lado estão os experimentos nos quais a concentração de nitrato de amônio era elevada (experimentos 3, 4, 6 e 7) e as curvas de crescimento apresentam semelhança entre elas em função das elevadas concentrações de amônia presentes nos cultivos (Gráficos 5, 6, 8 e 9).

O nitrato de amônio, usado como fonte de nitrogênio alternativa para o crescimento de *A. platensis* no presente trabalho, forma amônia em pH alcalino, sendo importante a escolha de uma adição adequada para se evitar níveis tóxicos de amônia no meio de cultivo. De fato, as concentrações de amônia quantificadas ao longo do cultivo (Tabelas 14 a 24) estiveram relacionadas com a assimilação da fonte de nitrogênio e seu aproveitamento para o crescimento celular e a posterior composição da biomassa.

Segundo Boussiba (1989), a baixa concentração de nitrogênio no cultivo limita o crescimento celular, enquanto que uma alta concentração de nitrogênio inibe o mesmo, como aconteceu nos experimentos 4 e 7 onde a concentração celular não superou valores de 1000 mg L⁻¹ (Gráficos 6 e 9). Dessa forma, fica evidenciada a importância da adição da fonte de nitrogênio de acordo com a demanda celular, pois determina a quantidade de NH₃ livre presente no meio de cultura.

O uso de um fotobiorreator tubular fechado para a realização dos experimentos permitiu ter um maior controle sobre a evaporação da amônia e melhorar o aproveitamento da fonte de nitrogênio (nitrato de amônio) pela cianobactéria; pois autores como Carvalho (*et al.*, 2004) afirmam que o emprego de fontes amoniacaais em reatores abertos conduz à continua perda da amônia por volatilização.

Para os experimentos realizados com maiores adições de nitrato de amônio ($\geq 22,5$ mM) (experimentos 3, 4 e 7), as concentrações de amônia apresentaram uma tendência de aumento devido à adição de uma quantidade maior de nitrato de amônio (Gráficos 5, 6 e 9). Por outro lado, nos cultivos com adições de nitrato de amônio menores (≤ 15 mM) (experimentos 1, 2, 5, 6, 8 a 11), as concentrações de amônia diminuíram ou se mantiveram em níveis aceitáveis (Gráficos 1, 2, 7, 8, 10 a 13), permitindo um bom acoplamento entre a adição e a assimilação da fonte de nitrogênio presente no meio de cultura. Como esperado, o uso de uma fonte de nitrogênio que permitisse a rápida presença de amônia no meio de cultivo não permitiu como já foi mencionado, a caracterização da fase lag durante crescimento celular, pois a amônia é a fonte inorgânica de nitrogênio preferencialmente utilizada pela *A. platensis* por ser um intermediário intracelular obrigatório na assimilação do nitrogênio (BOUSSIBA, 1989; BELKIN & BOUSSIBA, 1991).

No experimento 1, o emprego de uma concentração de nitrato de amônio menor (7,5 mM) em combinação com uma intensidade luminosa relativamente baixa ($60 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) permitiu um bom desenvolvimento e crescimento da *Arthrospira* obtendo-se uma concentração de até 3900 mg L^{-1} (Gráfico 3).

Gráfico 3. Valores de concentração celular (♦) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 1 (NH_4NO_3 7,5 mM; $60 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

No experimento 2, foi obtida a maior concentração celular dos experimentos realizados (Tabela 15). O emprego de uma intensidade luminosa maior permitiu o crescimento da cianobact\u00e9ria, mas no decorrer do cultivo, a cor verde caracter\u00edstica foi perdida, de forma que a cultura apresentou uma colora\u00e7\u00e3o verde-amarelada, que perdurou at\u00e9 o final. Neste experimento, as concentra\u00e7\u00f5es de am\u00f4nia quantificadas foram baixas, apresentando valores da ordem de $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (Gr\u00e1fico 4), o que permitiu o crescimento do microrganismo e dessa forma atingir uma elevada concentra\u00e7\u00e3o celular. A presen\u00e7a de uma concentra\u00e7\u00e3o de am\u00f4nia relativamente baixa ao longo do cultivo foi importante para o crescimento da cianobact\u00e9ria.

Gráfico 4. Valores de concentração celular (♦) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 2 (NH_4NO_3 7,5 mM; $180 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Nos cultivos nos quais a fonte de nitrog\u00e9nio foi adicionada em altas concentra\u00e7\u00f5es ($\geq 22,5$ mM) (experimentos 3, 4 e 7), a concentra\u00e7\u00e3o de am\u00f4nia alcan\u00e7ou valores que s\u00e3o considerados inibit\u00f3rios, levando a um desacoplamento das condi\u00e7\u00f5es de fornecimento e consumo de nitrog\u00e9nio, o que culminou com a queda de concentra\u00e7\u00e3o celular (Gr\u00e1ficos 5, 6 e 9), obtendo-se baixas concentra\u00e7\u00f5es celulares ao final do cultivo, \u00e9 vis\u00edvel a rela\u00e7\u00e3o inversa entre a concentra\u00e7\u00e3o de am\u00f4nia e a concentra\u00e7\u00e3o celular no cultivo. Em decorr\u00eancia desse fato, os valores de concentra\u00e7\u00e3o celular apresentaram acentuadas oscila\u00e7\u00f5es (Gr\u00e1ficos 5, 6 e 9). Nestes cultivos, os valores de X_m e de produtividade apresentaram os valores mais baixos de todos os experimentos realizados (Tabela 30).

No experimento 3, a concentra\u00e7\u00e3o celular m\u00e1xima obtida foi de 1029 mg L^{-1} sob as condi\u00e7\u00f5es descritas (Tabela 16). No decorrer do cultivo, foi poss\u00edvel observar que as c\u00e9lulas de *Arthrospira platensis* n\u00e3o conseguiram adotar o seu comportamento cl\u00e1ssico, pois a concentra\u00e7\u00e3o de nitrato de am\u00f4nio presente no meio de cultura levou a altos n\u00edveis de am\u00f4nia, que determinou seu efeito inibit\u00f3rio sobre as c\u00e9lulas, como observado no Gr\u00e1fico 5.

Gráfico 5. Valores de concentração celular (♦) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 3 (NH_4NO_3 22,5 mM; $60 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

No experimento 4, o uso conjunto de uma elevada adi\u00e7\u00e3o de nitrato de am\u00f4nio (22,5mM) assim como uma intensidade luminosa maior ($180 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) n\u00e3o permitiu a obten\u00e7\u00e3o de concentra\u00e7\u00f5es celulares elevadas, pois a concentra\u00e7\u00e3o de am\u00f4nia acima de $10^{-3} \text{mol L}^{-1}$ por longo per\u00edodo de tempo teve um efeito inibit\u00f3rio no crescimento da cianobact\u00e9ria (Gr\u00e1fico 6).

Gráfico 6. Valores de concentração celular (♦) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 4 (NH_4NO_3 22,5 mM; $180 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

No experimento 5, apesar do baixo fornecimento de nitrog\u00e2nio (4,4 mM), a cianobact\u00e9ria apresentou um crescimento celular ainda aceit\u00e1vel chegando a concentra\u00e7\u00f5es superiores a 3400 mg L^{-1} (Gr\u00e1fico 7). As concentra\u00e7\u00f5es de am\u00f4nia e de nitrato foram ao mesmo tempo baixas (Tabela 18), pelo qual se pode inferir que o pouco nitrog\u00e2nio presente no meio foi usado para o crescimento celular. Neste experimento, a cianobact\u00e9ria *Arthrospira platensis* perdeu muito pouco da sua colora\u00e7\u00e3o caracter\u00edstica se comparado com outros cultivos sob condi\u00e7\u00f5es similares (ensaio 1).

Gráfico 7. Valores de concentração celular (♦) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 5 (NH_4NO_3 4,4 mM; $120 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

No experimento 6, a concentração celular não superou 2100 mg L^{-1} (Gráfico 8). Apesar de apresentar um bom fornecimento da fonte de nitrogênio (7,5 mM), a baixa intensidade luminosa empregada ($35 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) provavelmente afetou o crescimento de *Arthrospira platensis*, mesmo com baixa concentração de am\u00f4nia no meio de cultura (Tabela 19). O uso desta intensidade luminosa diminuiu visivelmente a concentra\u00e7\u00e3o celular, mas a cianobact\u00e9ria conservou sua cor caracter\u00edstica no decorrer do cultivo.

Gráfico 8. Valores de concentração celular (♦) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 6 (NH_4NO_3 15,0 mM; $35 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

A curva de crescimento de *Arthrospira platensis* correspondente ao experimento 7 é apresentada no Gráfico 9. Este cultivo foi aquele que apresentou a menor duração entre todos os experimentos realizados. As concentrações de amônia presentes no meio de cultura apresentaram elevados valores (da ordem de 10 mM) (Tabela 20; Gráfico 9) que se tornaram t\u00f3xicos para *A. platensis* antes da metade do tempo normal de cultivo. Como resultado, obteve-se a concentra\u00e7\u00e3o celular e a produtividade em c\u00e9lulas com os menores valores em compara\u00e7\u00e3o com os outros experimentos realizados (Tabela 30).

Gráfico 9. Valores de concentração celular (♦) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 7 (NH_4NO_3 25,6 mM; $120 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

No experimento 8, a concentração de amônia não foi considerada um problema para o crescimento da *A. platensis*, como se observa no Gráfico 10. Neste cultivo, a concentração de nitrato de am\u00f4nio empregada (15 mM) permitiu um bom acoplamento entre o fornecimento de nitrog\u00e2nio e o crescimento celular, de modo que n\u00e3o foram observados efeitos de inibi\u00e7\u00e3o por parte da am\u00f4nia. As concentra\u00e7\u00f5es de am\u00f4nia quantificadas no decorrer do tempo de cultivo n\u00e3o chegaram at\u00e9 2 mM, concentra\u00e7\u00e3o considerada por Abielovich & Azov (1976) capaz de ter efeitos inibit\u00f3rios sobre as c\u00e9lulas de alguns microrganismos fotossintetizantes como *Arthrospira*. As baixas concentra\u00e7\u00f5es de am\u00f4nia e de nitrato permitem inferir que todo o nitrog\u00e2nio dispon\u00edvel foi utilizado provavelmente para crescimento (Tabela 21).

Gráfico 10. Valores de concentração celular (♦) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 8 (NH_4NO_3 15,0 mM; 205 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Nos experimentos 9 a 11, a concentração de nitrato de amônio empregada que foi a considerada como o ponto central do planejamento experimental, se assemelha à concentração de nitrato de sódio ($2,5 \text{ g L}^{-1}$) usado no meio Schlösser (SCHLÖSSER, 1982) como apresentado no item 4.8. O comportamento do microrganismo durante o cultivo foi similar durante cada um dos experimentos e ao reportado na literatura quando usadas outras fontes de nitrogênio como nitratos, uréia e sais de amônio (MATSUDO *et al.*, 2009; FERREIRA, 2008). Os valores de X_m foram similares entre si, apresentando valores de 3800 a 4100 mg L^{-1} . A concentração de amônia apresentou o mesmo comportamento nos experimentos correspondentes ao ponto central (experimentos 9 a 11), pois os valores deste componente no cultivo foram mantidos na ordem de $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (Tabelas 22 a 24; Gráficos 11 a 13).

De acordo às curvas de crescimento apresentadas (Gráficos 11 a 13), pode-se dizer que o emprego do nitrato de amônio permitiu a obtenção de valores similares de concentração celular em comparação, por exemplo, do nitrato de sódio (Gráficos 17 e 18), sendo uma opção alternativa e eficaz para o cultivo de *Arthrospira platensis* em termos de concentração celular.

Gráfico 11. Valores de concentração celular (♦) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 9 (NH_4NO_3 15,0 mM; $120 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Gráfico 12. Valores de concentração celular (♦) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 10 (NH_4NO_3 15,0 mM; $120 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Gráfico 13. Valores de concentração celular (◆) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 11 (NH_4NO_3 15,0 mM; $120 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Em rela\u00e7\u00e3o \u00e0 intensidade luminosa, esta vari\u00e1vel \u00e9 muito estudada quando se trabalha com microrganismos fotossintetizantes, pois a luz \u00e9 a fonte de energia utilizada por esses microrganismos. T\u00eam sido avaliados diferentes valores de intensidades luminosas (da ordem de 20 at\u00e9 $2500 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em cultivos de *Arthrospira* sp., usando reatores com diferentes configura\u00e7\u00f5es e volumes (FERREIRA, 2008; SOLETTTO *et al.*, 2008; DANESI *et al.*, 2004; QIANG *et al.*, 1998; OLGU\u00cdN *et al.*, 1997).

No cultivo conduzido com intensidade luminosa de $180 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ as c\u00e9lulas de *A. platensis* apresentaram altas concentra\u00e7\u00f5es celulares, chegando a valores da ordem de 4800 mg L^{-1} (experimento 2), mas desenvolveram uma colora\u00e7\u00e3o amarelada no decorrer do cultivo, devido provavelmente ao baixo fornecimento de nitrog\u00eanio ao cultivo. Um aumento da intensidade luminosa para $205 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (experimento 8) levou a uma biomassa com as mesmas caracter\u00edsticas, al\u00e9m de provocar uma diminui\u00e7\u00e3o do crescimento celular, o que pode ser decorrente de fotoinibi\u00e7\u00e3o. O aparecimento da cor amarela desde o in\u00edcio de cultivo foi um indicador da influ\u00eancia da intensidade luminosa sobre o desenvolvimento e da poss\u00edvel composi\u00e7\u00e3o da biomassa obtida. De fato, sob estas intensidades luminosas, foi observada uma fragmenta\u00e7\u00e3o das c\u00e9lulas. Isso dificultou o processo de filtra\u00e7\u00e3o posterior ao cultivo, o que constitui uma desvantagem em termos de custos.

Por outro lado, nos cultivos nos quais foi empregada uma intensidade luminosa menor ($60 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ no experimento 1), mesmo em condi\u00e7\u00f5es de baixo fornecimento de nitrog\u00eânio, as c\u00e9lulas apresentaram uma colora\u00e7\u00e3o verde-azulada caracter\u00edstica, chegando a valores de concentra\u00e7\u00e3o celular final da mesma ordem de grandeza que no experimento 8. Embora no experimento 1 o fornecimento de nitrog\u00eânio tenha sido mais baixo, o menor crescimento em decorr\u00eancia da baixa intensidade luminosa levou a uma menor demanda de nitrog\u00eânio em compara\u00e7\u00e3o com o ensaio 2, possibilitando que a c\u00e9lula formasse uma maior quantidade de pigmentos, como clorofila e ficocianinas.

Apesar dos bons resultados obtidos de X_m nos cultivos em que foram empregadas intensidades luminosas de $120 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (experimentos 9 a 11), o crescimento celular foi afetado pela concentra\u00e7\u00e3o da fonte de nitrog\u00eânio adicionada ao sistema mais que pelo efeito da intensidade luminosa sobre o cultivo, levando em conta que usando esta intensidade luminosa foram obtidos menores valores de X_m quando do emprego da menor adi\u00e7\u00e3o da fonte de nitrog\u00eânio ($X_m = 3422 \text{ mg L}^{-1}$, ensaio 5) e da maior adi\u00e7\u00e3o da fonte de nitrog\u00eânio ($X_m = 676 \text{ mg L}^{-1}$, ensaio 7).

Altos valores de intensidades luminosas favorecem os par\u00e2metros de crescimento, enquanto que valores mais baixos ($<60 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) favorecem a obten\u00e7\u00e3o de biomassa rica em clorofila (DANESI *et al.*, 2004), o que levaria a uma biomassa com colora\u00e7\u00e3o verde mais intensa. Dessa forma, os resultados obtidos nos experimentos 1, 3 e 6, nos quais foi utilizada uma baixa intensidade luminosa (60 e $35 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ respectivamente), coincidem com as caracter\u00edsticas t\u00edpicas da biomassa descritas na literatura, pois sob esta condi\u00e7\u00e3o o microrganismo conservou sua cor verde caracter\u00edstica. No experimento 3, a baixa concentra\u00e7\u00e3o celular obtida ao final do cultivo (1029 mg L^{-1}) foi causada mais pelo efeito t\u00f3xico da fonte de nitrog\u00eânio que pela intensidade luminosa empregada.

Mesmo com o uso de uma baixa intensidade luminosa (60 e $35 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) (experimentos 1 e 6 respectivamente), houve crescimento celular, atingindo concentra\u00e7\u00f5es de at\u00e9 3914 mg L^{-1} (Gr\u00e1fico 3) e de 2164 mg L^{-1} (Gr\u00e1fico 8). Estes resultados s\u00e3o maiores que os reportados na literatura para tanques abertos com intensidades luminosas da mesma ordem de grandeza, que foram de 1799 mg L^{-1} (DANESI *et al.*, 2004) e 1149 mg L^{-1} (BEZERRA *et al.*, 2008) utilizando ur\u00e9ia e cloreto de am\u00f4nio como fontes de nitrog\u00eânio, respectivamente. Isto pode ser decorr\u00eancia da melhor disponibilidade de luz em reatores tubulares (PULZ, 2001), o que aperfei\u00e7oa o fornecimento de energia luminosa. Apesar do experimento 6 apresentar uma

concentração celular que se encontrava acima dos dados reportados na literatura, este ensaio foi considerado como não satisfatório frente aos outros resultados de X_m obtidos neste trabalho, mesmo com uma concentração de nitrato de amônio adequada (15 mM) e tendo conservado totalmente sua cor verde característica. Isso foi decorrente da mais baixa intensidade luminosa empregada, o que levou provavelmente a uma limitação do crescimento celular.

5.2. PONTO DE ÓTIMO

Depois de realizados todos os experimentos previstos no planejamento experimental (Tabela 11), foi feita uma regressão multivariável em função dos valores de X_m obtidos como ferramenta estatística para a obtenção dos valores correspondentes ao ponto de ótimo das variáveis estudadas neste trabalho. Segundo a regressão multivariável realizada, a concentração celular máxima esperada de *Arthrospira platensis* era de 4565 mg L⁻¹, correspondente a intensidade luminosa de 148 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e concentração de NH_4NO_3 igual a 9,7 mM.

É importante citar que os cultivos correspondentes ao ponto de ótimo (experimentos 12 a 14), cujas condições experimentais foram determinadas com base na análise estatística de X_m , apresentaram altos valores de concentração celular, que se encontraram entre as maiores concentrações celulares máximas obtidas durante todos os experimentos realizados, com um valor médio de 4710 mg L⁻¹ (Tabelas 25 a 27), superando o valor estimado para X_m (4565 mg L⁻¹) em 2,9 %. Esta diferença foi considerada satisfatória para processos que envolvem cultivo microbiano (DANESI *et al.*, 2002; FRATELLI *et al.*, 2005).

Tabela 25. Valores de concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 12(NH₄NO₃ 9,7 mM; 148 μmol fótons m⁻² s⁻¹)

Tempo (dias)	X (mg L ⁻¹)	Nitrato (g L ⁻¹)	Amônia total (mol L ⁻¹)	Carbonato (g L ⁻¹)	pH
0	400	0,08	1,33.10 ⁻³	11,6	9,4
1	748	-	-	-	9,8
2	1242	0,25	1,13.10 ⁻⁴	9,6	9,8
3	2035	-	-	-	10,0
4	2613	0,32	3,13.10 ⁻⁵	9,3	10,0
5	3027	-	-	-	10,1
6	3412	0,28	2,90.10 ⁻⁵	8,3	9,9
7	3975	-	-	-	9,9
8	4141	0,04	2,33.10 ⁻⁵	8,3	9,8
9	4699	-	-	-	9,9
10	4318	**	6,73.10 ⁻⁵	8,4	9,9

(**) Valor abaixo do limite mínimo detectado pela metodologia; (-) Amostra não analisada

Tabela 26. Valores de concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 13(NH₄NO₃ 9,7 mM; 148 μmol fótons m⁻² s⁻¹)

Tempo (dias)	X (mg L ⁻¹)	Nitrato (g L ⁻¹)	Amônia total (mol L ⁻¹)	Carbonato (g L ⁻¹)	pH
0	400	0,08	1,33.10 ⁻³	11,6	9,4
1	693	-	-	-	9,7
2	1052	0,29	3,85.10 ⁻⁵	8,9	9,8
3	1804	-	-	-	10,1
4	2627	0,32	1,10.10 ⁻⁵	8,3	10,2
5	3167	-	-	-	10,4
6	3472	0,25	3,04.10 ⁻⁵	7,9	10,0
7	3807	-	-	-	10,0
8	4419	0,22	2,34.10 ⁻⁵	8,6	10,0
9	4683	-	-	-	10,2
10	4464	**	4,14.10 ⁻⁵	8,3	10,0

(**) Valor abaixo do limite mínimo detectado pela metodologia; (-) Amostra não analisada

Tabela 27. Valores de concentração celular, nitrato, amônia, carbonato e pH durante o experimento 14
(NH_4NO_3 9,7 mM; $148 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Tempo (dias)	X (mg L^{-1})	Nitrato (g L^{-1})	Am\^onia total (mol L^{-1})	Carbonato (g L^{-1})	pH
0	400	0,08	$1,33 \cdot 10^{-3}$	11,6	9,4
1	714	-	-	-	9,7
2	1168	0,29	$1,53 \cdot 10^{-5}$	10,0	9,8
3	1671	-	-	-	9,9
4	2445	0,32	$1,10 \cdot 10^{-5}$	8,3	10,0
5	3123	-	-	-	10,0
6	3629	0,19	$2,69 \cdot 10^{-5}$	10,0	9,9
7	3716	-	-	-	9,9
8	4479	0,10	$1,79 \cdot 10^{-5}$	9,0	9,9
9	4749	-	-	-	10,0
10	4555	**	$3,19 \cdot 10^{-5}$	8,4	9,9

(**) Valor abaixo do limite m\^nimo detectado pela metodologia; (-) Amostra n\^ao analisada

Os cultivos referentes ao ponto de \^otimo n\^ao apresentaram fase lag e tiveram uma dura\~ao de 9 dias, sendo que ap\^os deste dia a concentra\~ao celular diminuiu (Gr\^aficos 14 a 16). De acordo aos resultados obtidos, em termos de concentra\~ao celular m\^axima, houve uma boa assimila\~ao do nitrog\^enio adicionado ao sistema, pois as c\^elulas de *A. platensis* incorporaram o nitrog\^enio existente no meio de cultura, de modo que os valores de concentra\~ao de am\^onia total n\^ao chegaram a valores inibit\^orios, apresentando valores da mesma ordem de grandeza ($10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) (Tabelas 25 a 27).

A concentra\~ao do nitrato no decorrer do cultivo atingiu valores m\^nimos abaixo do limite detectado pela metodologia utilizada. Esses resultados indicam que a associa\~ao de diferentes fontes de nitrog\^enio existente no nitrato de am\^onio foi favor\^avel para o crescimento da cianobact\^eria *A. platensis*. Se comparado com a diferen\~ca m\^edia dos valores de X_m obtidos no ponto central, usando as condi\~oes de intensidade luminosa e de nitrato de am\^onio estabelecidas o incremento da biomassa nos cultivos de ponto de \^otimo foi de 17,9 %. Estes resultados s\~ao superiores aos reportados por RODRIGUES (2008) usando nitrato de pot\^assio associado com cloreto de am\^onio (4327 mg L^{-1}) por processo descont\^nuo alimentado, bem como os obtidos por COSTA *et al.* (2001) utilizando nitrato de am\^onio (1559 mg L^{-1}) por processo descont\^nuo.

Por outra parte, devido às concentrações celulares obtidas, pode ser dito que a intensidade luminosa teve um efeito positivo sobre o crescimento de *A. platensis*, pois as células cresceram normalmente permitindo obter altas concentrações e as células de *A. platensis* ao final do cultivo ainda conservaram sua cor característica. Deduz-se que a concentração celular foi afetada no final do cultivo possivelmente pelo efeito de sombreamento das próprias células dentro do reator.

Gráfico 14. Valores de concentração celular (◆) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento
12 (NH_4NO_3 9,7 mM; $148 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Gráfico 15. Valores de concentração celular (♦) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 13 (NH_4NO_3 9,7 mM; $148 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Gráfico 16. Valores de concentração celular (♦) e da concentração de amônia total (●) durante o experimento 14 (NH_4NO_3 9,7 mM; $148 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

5.3. CULTIVOS DE REFERÊNCIA

Em relação aos ensaios de referência usando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio (experimentos 15 e 16), as concentrações celulares máximas obtidas (média de 3878 mg L⁻¹) (Tabelas 28 e 29) foram similares às alcançadas nos experimentos do ponto central com nitrato de amônio. No entanto, os valores obtidos de X_m nos cultivos correspondentes ao ponto de ótimo foram cerca de 22 % superiores aos encontrados nestes cultivos.

Tabela 28. Valores de concentração celular, nitrato, carbonato e pH durante o experimento 15
(NaNO₃ 30 mM; 120 μmol fótons m⁻² s⁻¹)

Tempo (dias)	X (mg L⁻¹)	Nitrato (g L⁻¹)	Carbonato (g L⁻¹)	pH
0	400	2,50	11,6	9,4
1	864	1,60	-	9,9
2	1238	1,93	8,9	10,0
3	1809	2,08	-	9,8
4	2405	2,02	5,8	10,2
5	3105	1,88	-	10,1
6	3240	2,26	7,2	9,9
7	3513	2,20	-	9,9
8	3914	1,97	8,3	10,1
9	3803	1,97	-	9,9

(-) Amostra não analisada

Tabela 29. Valores de concentração celular, nitrato, carbonato e pH durante o experimento 16
(NaNO_3 30 mM; $120 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Tempo (días)	X (mg L⁻¹)	Nitrato (g L⁻¹)	Carbonato (g L⁻¹)	pH
0	400	2,50	11,6	9,4
1	660	1,56	-	9,8
2	953	2,00	8,4	9,7
3	1380	1,79	-	9,8
4	1820	2,20	7,8	9,9
5	2352	1,91	-	9,9
6	2493	2,20	6,7	10,1
7	2847	2,14	-	10,1
8	3373	2,08	8,6	10,0
9	3842	1,98	-	10,1
10	3492	1,95	8,4	9,9

(-) Amostra não analisada

As curvas de crescimento dos cultivos de referência apresentaram comportamento similar, onde não foi observada a fase lag (Gráficos 17 e 18), o que era esperado pelo fato do uso da mesma fonte de nitrogênio empregada para o preparo do inoculo. A duração destes cultivos de referência também foi similar à apresentada pelos cultivos com nitrato de amônio. A concentração do nitrato foi corrigida diariamente, desde que o valor medido fosse menor que $2,2 \text{ g L}^{-1}$, de forma que a concentração do nitrato nunca esteve abaixo de 1 g L^{-1} (FAINTUCH, 1989), havendo sempre nitrogênio disponível em forma de nitrato para o crescimento celular.

Gráfico 17. Valores de concentração celular (◆) e da concentração de nitrato (■) durante o experimento 15
(NaNO₃ 30 mM; 120 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

Gráfico 18. Valores de concentração celular (◆) e da concentração de nitrato (■) durante o experimento 16
(NaNO₃ 30 mM; 120 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

5.4. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS X_m , P_X e $Y_{X/N}$

Procurando-se correlacionar as variáveis estudadas e estabelecer seus efeitos sobre o crescimento de *Arthrospira platensis*, os valores das concentrações celulares máximas (X_m), os tempos de cultivo e as respectivas produtividades (P_X), além dos fatores de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$), estão apresentados na Tabela 30.

Tabela 30. Parâmetros de crescimento calculados nos experimentos realizados com nitrato de amônio, incluindo o ponto de ótimo e os cultivos de referência

Ensaio	X_1	X_2	T_c^1 (dias)	X_m (mg L ⁻¹)	P_X (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	$Y_{X/N}$ (mg mg ⁻¹)
1	-1	-1	8	3914	439,2	5,69
2	1	-1	10	4834	443,4	7,18
3	-1	1	5	1029	125,8	0,34
4	1	1	5	960	112,1	0,30
5	0	-1,414	7	3422	431,7	8,35
6	-1,414	0	7	2164	252,0	1,43
7	0	1,414	4	676	69,1	0,13
8	1,414	0	8	3926	440,7	2,85
9	0	0	8	4194	474,2	3,07
10	0	0	7	3854	493,4	2,80
11	0	0	8	3938	442,2	2,86
PONTO DE ÓTIMO						
12	0,47	- 0,71	9	4699	477,7	5,40
13	0,47	- 0,71	9	4683	475,9	5,38
14	0,47	- 0,71	9	4749	483,2	5,46
CULTIVOS DE REFERÊNCIA²						
15	-	-	8	3914	439,3	0,86
16	-	-	9	3842	382,4	0,73

¹ T_c Tempo de cultivo (dias); ² Cultivos realizados usando $NaNO_3$ como fonte de nitrogênio.

Para cada variável dependente (X_m , P_X e $Y_{X/N}$) foi feita uma regressão quadrática multivariável, onde foram consideradas as duas variáveis independentes codificadas (X_1 e X_2), bem como suas formas quadráticas e interações, obtendo dessa forma uma equação referente a um modelo de superfície de resposta que mais se adequou aos resultados obtidos. A partir da análise de regressão multivariável, observou-se os níveis descritivos (p) associados aos coeficientes angulares correspondentes aos fatores avaliados. Também foram avaliados os coeficientes de determinação ajustados das equações obtidas, bem como o valor de p para as análises de variância correspondentes aos modelos obtidos.

Na análise de regressão, considerou-se $p = 0,1$ como o maior erro para o teste dos coeficientes angulares, desde que a consideração destes fatores levasse a um melhor ajuste do modelo, caracterizada pelo aumento do valor do coeficiente de determinação da equação de ajuste (CARVALHO *et al.*, 2004). No entanto, na análise de variância da regressão o maior valor aceitável de p foi 0,05.

5.4.1. Concentração celular máxima (X_m)

Nas Tabelas 31 e 32 são apresentados os resultados de análise de regressão multivariável para concentração celular máxima (X_m) em função dos fatores estudados: Intensidade luminosa (X_1) e quantidade total de NH_4NO_3 adicionado (X_2), bem como os resultados da análise de variância dessa regressão, respectivamente. Essa regressão foi feita com os valores de X_m obtidos nos experimentos 1 a 11.

Tabela 31. Análise da regressão multivariável para concentração celular máxima X_m em função dos fatores avaliados

Fator	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Valor T	p
Constante	3995	308,7	12,94	0,0000
X_1	417,9	189,0	2,211	0,0691
X_2	- 1330	189,0	- 7,038	0,0004
X_1^2	- 440,9	225,0	- 1,959	0,0978
X_2^2	- 939,0	225,0	- 4,731	0,0059

X_1 : valor codificado da variável intensidade luminosa;

X_2 : valor codificado da quantidade de NH_4NO_3 adicionada no cultivo.

R^2 ajustado: 0,87

Tabela 32. Análise de variância do modelo de regressão multivariável para o parâmetro X_m

Fator de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	p
Modelo	20700051	4	5175013	181,07	0,0017
Erro	1714850	6	285808		
Total	22414901	10			

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

$$X_m = 3995 + 417,9X_1 - 1330X_2 - 440,9X_1^2 - 939,0X_2^2$$

A partir da análise de regressão quadrática múltipla, foram observados os níveis descritivos dos coeficientes e o coeficiente de determinação do modelo. No ajuste do modelo, eliminou-se o coeficiente de interação entre as variáveis independentes, pois este se mostrou não significativo ($p > 0,1$). A análise estatística (Tabela 31) mostra que o efeito principal das variáveis independentes e o efeito quadrático destas variáveis interferem na obtenção de X_m . O coeficiente quadrático das duas variáveis codificadas X_1 e X_2 é negativo, indicando que há um ponto máximo de X_m entre as diferentes intensidades luminosas e as diferentes massas de nitrato de amônio avaliadas para a obtenção dos valores de X_m . O valor de R^2 ajustado da regressão (0,87), bem como o valor do nível descritivo da análise de variância da regressão ($p = 0,0017$; Tabela 31) indica ser o ajuste do modelo adequado aos dados experimentais.

As maiores concentrações celulares finais foram obtidas quando o cultivo foi submetido a valores médios das variáveis independentes (Tabela 30). Com esses resultados, houve evidências que o ponto de ótimo do modelo poderia estar em relação com a variável X_1 em um valor próximo ao ponto central do planejamento, enquanto que o valor de X_2 poderia estar próximo ao ponto codificado como -1 (Gráfico 19). A partir da derivação da equação obtida na regressão multivariável chegou-se aos valores codificados $X_1 = 0,47$ e $X_2 = -0,71$ como os correspondentes pontos de ótimo para cada variável. Esses valores correspondem a uma intensidade luminosa de **148 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$** e **molaridade de nitrato de am\^onio adicionada de 9,7 mM**, respectivamente, com uma concentra\~ao celular esperada de 4565 mg L^{-1} .

Dessa forma, os experimentos adicionais, chamados como cultivos do ponto de \^otimo (experimentos 12 a 14), foram realizados para a confirma\~ao do modelo, usando os valores predeterminados para cada uma das vari\~aveis independentes. Nestes experimentos, como explicado anteriormente, o valor m\^edio da concentra\~ao celular obtida (4710 mg L^{-1}) foi superior \^a estimada pelo modelo (4565 mg L^{-1}). De fato, a compara\~ao entre os valores calculados pelo modelo e os valores experimentais, demonstraram uma boa rela\~ao do modelo e conseq\~uentemente sua valida\~ao para estimar as condi\~oes \^otimas para a produ\~ao de biomassa de *A. platensis*.

Gráfico 19. Superfície de resposta para a concentração celular máxima (X_m) em função dos valores codificados da intensidade luminosa (X_1) e da massa de nitrato de amônio adicionada (X_2)

5.4.2. Produtividade em células (P_X)

Nas Tabelas 33 e 34 estão apresentados os resultados da análise de regressão multivariável para produtividade em células (P_X) em função dos valores estudados, bem como os resultados da análise de variância dessa regressão.

Tabela 33. Análise da regressão multivariável para produtividade em células P_X em função dos fatores avaliados

Fator	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Valor T	<i>p</i>
Constante	469,9	32,42	14,49	0,0000
X_2	- 144,7	19,86	- 7,287	0,0002
X_1^2	- 66,36	23,64	- 2,807	0,0262
X_2^2	- 114,4	23,64	- 4,838	0,0019

X_1 : valor codificado da variável intensidade luminosa

X_2 : valor codificado da quantidade de NH_4NO_3 adicionada no cultivo.

R^2 ajustado: 0,88

Tabela 34. Análise de variância do modelo de regressão multivariável para o parâmetro P_X

Fator de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	<i>p</i>
Modelo	247916	3	82638,6	26,2004	0,0004
Erro	22078,7	7	3154,10		
Total	22414901	10			

A equação obtida na análise de regressão para a produtividade em células (P_X) foi:

$$P_X = 469,9 - 144,7X_2 - 66,36X_1^2 - 114,4X_2^2$$

De acordo com os níveis descritivos dos coeficientes das variáveis estudadas (Tabela 33), foi evidenciado o efeito principal de X_2 . Adicionalmente, P_X foi função quadrática de X_1 e X_2 . O valor de R^2 ajustado da regressão (0,88), bem como o valor do nível descritivo da análise de variância da regressão ($p = 0,0004$; Tabela 34) indicam que o ajuste do modelo foi adequado.

Como observado no Gráfico 20, valores máximos e mínimos de intensidade luminosa (X_1) e da massa de nitrato de amônio adicionada (X_2) conduziram à diminuição de P_X . No caso do experimento 6, a baixa intensidade luminosa usada ($35 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ocasionou uma queda na produtividade ($252,0 \text{ mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$; Tabela 30). Em relação à massa de nitrato de amônio adicionada, o emprego de concentrações elevadas da fonte de nitrogênio ($\geq 22,5 \text{ mM}$)

conduziu à obtenção dos piores valores de P_X durante os experimentos 3, 4 e 7 com valores de $125,8 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $112,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e $69,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente, como registrado na Tabela 30.

Gráfico 20. Superfície de resposta para a produtividade em células (P_X) em função dos valores codificados da intensidade luminosa (X_1) e da massa de nitrato de amônio adicionada (X_2)

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

Nas Tabelas 35 e 36 são apresentados os resultados correspondentes à análise de regressão quadrática multivariável para o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função dos fatores estudados, bem como os resultados da análise de variância dessa regressão, respectivamente.

Tabela 35. Análise da regressão multivariável para o fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função dos fatores avaliados

Fator	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Valor T	<i>p</i>
Constante	2,91	0,114	25,53	0,0000
X_1	0,43	0,071	6,192	0,0016
X_2	- 2,98	0,071	- 42,72	0,0000
X_1^2	- 0,34	0,083	- 4,070	0,0096
X_2^2	0,71	0,083	8,569	0,0004
$X_1 * X_2$	- 0,38	0,099	- 3,875	0,0117

X_1 : valor codificado da variável intensidade luminosa

X_2 : valor codificado da quantidade de NH_4NO_3 adicionada no cultivo.

R^2 ajustado: 0,99

Tabela 36. Análise de variância do modelo de regressão multivariável para o parâmetro $Y_{X/N}$

Fator de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	<i>p</i>
Modelo	77,9268	5	15,5854	399,797	0,0000
Erro	0,19492	5	0,03898		
Total	78,1218	10			

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

$$Y_{X/N} = 2,91 + 0,43X_1 - 2,98X_2 - 0,34X_1^2 + 0,71X_2^2 - 0,38X_1 * X_2$$

Na Tabela 35 pode-se confirmar a influência da intensidade luminosa e da massa de nitrato de amônio adicionada no $Y_{X/N}$ pelos valores dos níveis descritivos. Desta vez, todos os termos apresentaram-se como estatisticamente significativos dentro do modelo quadrático, com $p < 0,1$. O valor de R^2 ajustado da regressão (0,99), bem como o valor do nível descritivo da análise de variância da regressão ($p = 0,00001$; Tabela 36) indica ser o ajuste do modelo adequado aos dados experimentais.

O sinal negativo do coeficiente relacionado com a interação das variáveis independentes indica que existe uma relação inversa entre os valores de X_1 e X_2 empregados no valor de $Y_{X/N}$. Por exemplo, para baixo valor de X_2 , o aumento de X_1 leva a um aumento de Y ; contrariamente, para alto valor de x_2 , o aumento de X_1 leva a uma diminuição de $Y_{X/N}$ (Gráfico 21). Este gráfico também evidencia que a concentração de nitrato de amônio adicionada tem influência mais significativa sobre os valores de $Y_{X/N}$. O emprego de concentrações elevadas da fonte de nitrogênio ($\geq 22,5$ mM) gerou os valores de $Y_{X/N}$ mais baixos durante os experimentos 3, 4 e 7 com valores de $0,34 \text{ mg mg}^{-1}$, $0,30 \text{ mg mg}^{-1}$ e $0,13 \text{ mg mg}^{-1}$, respectivamente (Tabela 30). De forma contrária, em aqueles experimentos nos quais as concentrações de nitrato de amônio adicionadas aos cultivos foram consideradas como baixas ($\leq 7,5$ mM), os valores de $Y_{X/N}$ obtidos foram considerados como os melhores como aconteceu no experimento 2 ($7,18 \text{ mg mg}^{-1}$) e no experimento 5 ($8,35 \text{ mg mg}^{-1}$).

Gráfico 21. Superfície de resposta para o fator de conversão de nitrogênio em células $Y_{X/N}$ em função dos valores codificados das variáveis estudadas intensidade luminosa (X_1) e massa de nitrato de amônio adicionada (X_2)

5.5. ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA DE *Arthrospira platensis*

Na Tabela 37 são apresentados os dados correspondentes à composição da biomassa de *A. platensis* obtida em cada um dos experimentos realizados (1 a 16). A partir desses resultados, foi aplicada regressão multivariável aos teores de lipídios e proteínas das biomassas com vistas a determinar o efeito das variáveis independentes nestes componentes celulares. Os critérios estabelecidos para essas análises foram os mesmos que os estabelecidos para os parâmetros de crescimento celular (item 5.4).

Tabela 37. Composição em porcentagem da biomassa de *A. platensis* após do cultivo com nitrato de amônio

Ensaio	X ₁	X ₂	Lipídios	Proteínas	Carboidratos	Cinzas
1	-1	-1	8,3	23,8	63,3	4,5
2	1	-1	5,9	14,8	75,6	3,7
3	-1	1	**	**	**	**
4	1	1	17,3	63,2	12,5	7,0
5	0	-1,414	3,3	12,3	81,3	3,1
6	-1,414	0	12,5	41,7	39,2	6,7
7	0	1,414	**	**	**	**
8	1,414	0	8,1	25,8	62,4	3,6
9	0	0	7,6	25,5	61,1	5,8
10	0	0	7,0	22,5	65,3	5,3
11	0	0	9,9	29,3	51,1	9,7
PONTO DE ÓTIMO						
12	0,47	- 0,71	10,3	21,4	64,2	4,2
13	0,47	- 0,71	9,4	18,9	67,4	4,3
14	0,47	- 0,71	10,5	19,8	65,7	4,0
CULTIVOS DE REFERÊNCIA						
15	-	-	9,9	19,3	67,3	3,6
16	-	-	15,2	23,5	52,4	8,9

(**) Não foi possível quantificar devido à perda do cultivo por lise celular

5.5.1. Teor de lipídios

Na Tabela 38 são apresentados os resultados correspondentes à análise de regressão multivariável aplicada ao teor de lipídios na biomassa de *A. platensis*, em função dos fatores estudados, sendo os resultados da análise de variância dessa regressão apresentados na Tabela 39.

Tabela 38. Análise da regressão multivariável para o teor de lipídios na biomassa de *A. platensis* em função dos fatores avaliados.

Fator	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	Valor T	<i>p</i>
Constante	10,8	1,07	10,0	0,0000
X ₂	4,9	1,44	3,4	0,0115

X₂; valor codificado da quantidade de NH₄NO₃ adicionada no cultivo.

R² ajustado: 0,56

Tabela 39. Análise de variância do modelo de regressão multivariável para o parâmetro teor de lipídios.

Fator de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	<i>p</i>
Modelo	104,0	1	104,0	11,5	0,0115
Erro	63,2	7	9,0		
Total	167,2	8			

A equação obtida na análise de regressão para o teor de lipídio na biomassa de *Arthrospira platensis* foi:

$$\% \text{ Lipídio} = 10,8 + 4,9 X_2$$

Segundo a equação obtida, o sinal positivo no coeficiente da variável codificada X₂ indica que o teor de lipídios na biomassa se comportou como uma função linear crescente em relação à massa de nitrato de amônio adicionada (Tabela 38). De fato, no experimento 4, onde a concentração de nitrato de amônio no cultivo foi equivalente a 22,5 mM, o teor de lipídios na biomassa quantificado foi o mais alto (17,3 %) dos obtidos (Tabela 37). Embora a análise de

variância da regressão tenha sido satisfatória ($p = 0,0115$), o valor do coeficiente de determinação do modelo não pode ser considerado pequeno (R^2 ajustado: 0,56).

Como conhecido, a composição da biomassa em microrganismos fotossintetizantes como *A. platensis* é afetado por fatores nutricionais e ambientais (OLGUÍN *et al.*, 2001). A intensidade luminosa é um fator de tipo ambiental que tem uma influência importante na composição da biomassa (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004), especialmente de lipídios devido ao seu efeito no fornecimento de energia ao metabolismo fotossintético. Adicionalmente, segundo o reportado Bezerra *et al.* (2008), a intensidade luminosa e o teor de lipídios na biomassa de *A. platensis* possuem uma relação inversa. O aumento da intensidade luminosa também pode levar a uma carência acentuada da fonte de nitrogênio amoniacal com conseqüente diminuição do teor de lipídios da biomassa (BEZERRA *et al.*, 2008). No entanto, nos experimentos realizados neste trabalho, não foi possível estabelecer uma dependência do teor de lipídios da biomassa frente à intensidade luminosa (Tabela 38).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 37, o teor de lipídios na biomassa de *A. platensis* nos experimentos realizados apresentou valores entre 3 e 17 %. Nas cianobactérias, a quantidade de lipídios presente no interior celular está entre 6 – 13 %, valor que varia de acordo às condições de cultivo, sendo os ácidos graxos a metade dos constituintes da fração lipídica (COHEN, 1997; DILLON *et al.*, 1995). Os piores teores de lipídios foram obtidos nos experimentos 2 e 5 com valores de 5,9 % e 3,3 % respectivamente, devido provavelmente ao efeito de carência de nitrogênio. Esses resultados também coincidem com os resultados publicados por autores como Piorreck *et al.* (1984), que estabeleceram que nos cultivos de *A. platensis* sob limitação de nitrogênio ocorria uma diminuição do teor lipídico da biomassa.

5.5.2. Teor de proteínas

Nas Tabelas 40 e 41 são apresentados os resultados correspondentes à análise de regressão quadrática multivariável aplicada ao teor de proteínas na biomassa de *A. platensis*, em função dos fatores estudados, bem como os resultados da análise de variância dessa regressão, respectivamente.

A análise de regressão quadrática multivariável mostra que o teor de proteínas na biomassa de *A. platensis* foi uma função quadrática da intensidade luminosa e da massa de nitrato de amônio adicionada (Tabela 40). Também mostra que o modelo obtido explicou satisfatoriamente os resultados experimentais obtidos ($p = 0,0004$, Tabela 41). No Gráfico 22 é apresentado o comportamento dos valores do teor de proteínas na biomassa de *A. platensis* em função das variáveis avaliadas usando a metodologia de superfície de resposta.

Tabela 40. Análise da regressão multivariável para o teor de proteína na biomassa de *A. platensis* em função dos fatores avaliados

Fator	Coefficiente de regressão	Erro Padrão	Valor T	<i>p</i>
Constante	23,8	1,35	17,7	0,0001
X ₁	- 5,13	0,95	- 5,40	0,0057
X ₂	25,2	1,47	17,2	0,0001
X ₁ ²	5,52	1,01	5,46	0,0055
X ₂ ²	13,2	1,46	9,05	0,0008

X₁: valor codificado da variável intensidade luminosa

X₂: valor codificado da quantidade de NH₄NO₃ adicionada no cultivo

R² ajustado: 0,98

Tabela 41. Análise de variância do modelo de regressão multivariável para o parâmetro teor de proteína

Fator de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F Calculado	<i>p</i>
Modelo	1905,27	4	476,316	87,6810	0,0004
Erro	21,7295	4	5,43238		
Total	1926,99	8			

A equação obtida na análise de regressão para o teor de proteína na biomassa de *Arthrospira platensis* foi:

$$\% \text{ Proteína} = 23,8 - 5,13 X_1 + 25,2 X_2 + 5,52 X_1^2 + 13,2 X_2^2$$

Gráfico 22. Superfície de resposta para o fator de conversão de nitrogênio em células $Y_{X/N}$ em função dos valores codificados das variáveis estudadas intensidade luminosa (X_1) e massa de nitrato de amônio adicionada (X_2)

Autores como Syrett (1962) descreveram que o nitrogênio assimilado pelo microrganismo é utilizado primeiro para o crescimento celular e, posteriormente, para formação de nitrogênio orgânico como material de reserva. A carência de nitrogênio no decorrer do cultivo é mais importante no teor de proteínas da biomassa que no teor de lipídios (SASSANO, 2004). Isso pode ser evidenciado pela maior variação dos teores de proteínas em função das variáveis independentes estudadas.

Dos experimentos realizados, os maiores teores de proteínas e lipídios na biomassa foram obtidos no experimento 4 (63,2 e 17,3 %, respectivamente), ensaio no qual se apresentou um dos valores de concentração celular e de produtividade mais baixas, como já foi mencionado. Neste ensaio, caracterizado pela grande quantidade de fornecimento de nitrogênio ao cultivo e baixa concentração celular obtida, a biomassa apresentou coloração típica, isto é, verde escura, o que foi decorrente provavelmente da maior formação de pigmentos, incluindo clorofila. Apesar do crescimento celular neste ensaio ter sido bastante baixo (960 mg L^{-1}), provavelmente a maior parte do nitrogênio fornecido ao cultivo de *Arthrospira* foi empregado para a produção de nitrogênio orgânico, na forma de proteínas, como material de reserva da célula.

Em outros cultivos com nitrato de amônio, o uso de uma intensidade luminosa elevada (experimento 2) permitiu a obtenção de altas concentrações celulares. Porém a composição da biomassa em termos de teor de proteínas foi menor (14,8 %; Tabela 37) e a cianobactéria apresentou perda da sua cor característica devido provavelmente a fotoxidação e/ou carência de nitrogênio. O baixo teor de proteínas obtido no experimento 2 indica que não houve a disponibilidade de nitrogênio suficiente para a produção de nitrogênio orgânico, pois grande parte do nitrogênio adicionado foi destinado para o crescimento celular. De fato, podem-se observar na Tabela 15 os baixos valores das duas formas de nitrogênio disponíveis para as células ao longo do tempo.

No experimento 5, os valores dos teores de lipídios e de proteínas na biomassa de *A. platensis* foram os menores obtidos (3,3 e 12,3 %, respectivamente). Estes resultados coincidem com os descritos por Sassano (2004), que observou que os teores de proteínas nas biomassas decaíram significativamente até valores que chegaram a 16,5%, em cultivos realizados sob limitação de nitrogênio. No entanto, o nitrato de amônio adicionado ao cultivo permitiu uma reserva na forma de nitrato, que reduzido através das enzimas nitrato redutase e nítrito redutase, evitou a depleção de nitrogênio no meio de cultivo, permitindo, dessa forma, o crescimento celular de forma satisfatória.

Os teores de proteínas nos ensaios do ponto de ótimo apresentaram um valor médio de $20,1 \pm 1,3$ %, enquanto que o valor médio do teor de lipídios na biomassa foi de $10,0 \pm 0,6$ %, sendo similares aos apresentados pelos experimentos pertencentes ao ponto central (teor de proteínas = $25,8 \pm 3,4$ %; teor de lipídios = $8,2 \pm 1,5$ %, respectivamente).

5.5.3. Outros componentes

Também foi observado que uma elevada intensidade luminosa associada a uma deficiência de nitrogênio resultou no mais alto teor de polissacarídeos (81,3 % no experimento 5, Tabela 37), evidenciando que, como esperado, um maior fornecimento de energia luminosa associado a uma carência de nitrogênio estimula a biossíntese de moléculas de reserva de energia isentas de nitrogênio, que na *A. platensis* corresponde a polissacarídeos (OLGUÍN *et al.*, 2001). De acordo com VONSHAK (*et al.*, 1983), dependendo também da concentração de CO₂ no meio de cultura, a concentração de bicarbonato pode aumentar e em conseqüência a taxa do processo fotossintético. Como em todos os experimentos não houve praticamente variação da concentração de carbonato total, mantendo-se os valores iniciais, o processo fotossintético sempre se manteve em condições favoráveis, sem haver qualquer tipo de limitação de carbono, favorecendo o processo de formação de carboidrato.

Como já é sabido, o teor de cinzas é utilizado como indicativo das propriedades funcionais de alguns produtos alimentícios e para a verificação nutricional de alguns alimentos. É útil na determinação dos metais mais comuns que aparecem em maiores quantidades. As cinzas em alimentos referem-se ao resíduo inorgânico remanescente da queima da matéria orgânica, sem resíduo de carvão (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). Neste trabalho, os teores de cinzas das biomassas obtidas variaram de 3,6 a 9,7%, estando na faixa estabelecida por Belay (1997), que pode chegar até 13 %. Este resultado é, porém menor que aqueles obtidos por Jiménez *et al.* (2003) (19,5 – 21,1 %), que não lavaram a biomassa obtida previamente ao processo de secagem da mesma.

5.6. IMPLICAÇÕES ECONÔMICAS

Segundo Piorreck *et al.* (1984), o meio de cultura é importante no custo de produção de microrganismos fotossintetizantes. O sucesso para a produção comercial em larga escala desta cianobactéria depende do desenvolvimento de um cultivo econômico e eficaz, que esteja entre 15 e 25 % do custo total (BELAY, 1997). Tendo em vista a importância do nitrogênio no custo do meio de cultivo, uma vez que é o segundo constituinte da célula que precisa ser adicionado (GOLDMAN *et al.*, 1982; CORNET, 1992), na Tabela 42 são apresentados alguns dados em relação ao custo de produção de *A. platensis* usando nitrato de amônio como fonte de nitrogênio.

Tabela 42. Custo do cultivo gerado pelo emprego de nitrato de amônio e do nitrato de sódio como fonte de nitrogênio

Experimento	NH ₄ NO ₃ ou NaNO ₃ gasto (g)	Custo em R\$*	Massa total de células produzida (g)	Custo de N por kg de célula (R\$)**
1	2,10	0,11	12,9	8,52
2	2,10	0,11	16,0	6,86
3	6,30	0,32	3,10	103,2
4	6,30	0,32	2,87	111,5
5	1,23	0,06	11,2	5,34
6	4,20	0,21	6,96	30,2
7	7,20	0,36	1,90	189,5
8	4,20	0,21	12,9	16,2
9	4,20	0,21	13,9	15,2
10	4,20	0,21	12,7	16,5
11	4,20	0,21	13,0	16,2
PONTO DE ÓTIMO				
12	2,71	0,14	15,6	8,99
13	2,71	0,14	15,5	9,02
14	2,71	0,14	15,8	8,89
CULTIVOS DE REFERÊNCIA				
15	14,0	0,70	12,9	54,2
16	16,1	0,81	12,7	64,0

(*) Considerando que 1 kg de NH₄NO₃ grau analítico tem um valor aproximado de R\$50,00 e 1kg de NaNO₃ grau analítico tem um valor aproximado de R\$30,00; (**) US\$ 1 = R\$ 1,70.

A aplicação de nitrato de amônio como fonte de nitrogênio apresenta diversas vantagens. Além de ser uma fonte mais barata, em comparação com as fontes tradicionais (nitratos), a amônia é prontamente assimilada pelo microrganismo (BOUSSIBA, 1989), dispensando gastos de energia por parte deste. É tóxica, quando em altas concentrações (ABELIOVICH & AZOV, 1976), porém *Arthrospira* é um dos poucos microrganismos que suporta meios com amônia, e a utilização desta fonte ajuda para evitar a contaminação dos cultivos (BELKIN & BOUSSIBA, 1991).

Como apresentado na Tabela 42, o emprego de nitrato de amônio é justificado quando há uma maior produção de biomassa, como consequência de um adequado fornecimento de nitrogênio ao sistema. A presença constante de nitrato impede a deficiência de nitrogênio em cultivos com amônia, e a presença de amônia pronta para sua assimilação por parte as cianobactéria permite a redução da quantidade de nitrato usada, colaborando para a redução de custos.

Dessa forma, o emprego de nitrato de amônio no cultivo de *A. platensis* em biorreator tubular seria indicado quando se visa à redução de custos se comparado com outras fontes de nitrogênio como nitrato de sódio, nitrato de potássio ou cloreto de amônio (RODRIGUES, 2008), os quais apresentaram um custo de produção mais elevado e geram rendimentos em biomassa menores.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem inferir que:

- A partir da análise de regressão múltipla, foi possível ajustar modelos para correlacionar concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_X), e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$), com os níveis codificados das variáveis estudadas: intensidade luminosa (X_1) e massa de nitrato de amônio adicionada (X_2). Foi confirmada também a utilidade da regressão multivariável como ferramenta estatística na otimização das condições experimentais para a obtenção de valores máximos de concentração celular usando nitrato de amônio como fonte de nitrogênio.
- As variáveis avaliadas neste trabalho (nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e intensidade luminosa) influenciaram no crescimento e composição da biomassa da cianobactéria *A. platensis*. Nas condições estudadas, a intensidade luminosa de $148 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e uma molaridade de nitrato de amônio adicionada de 9,7 mM, resultaram na melhor combinação para a obtenção de altos valores de X_m e P_X , com valores médios de 4710 mg L^{-1} e $478,9 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ respectivamente.
- Foi observado que *A. platensis* apresentou uma resposta satisfatória em termos de crescimento celular com adições totais de nitrato de amônio menores que 15 mM. Os cultivos de *A. platensis* usando nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e realizados em fotobiorreator tubular levaram a resultados de fatores de conversão de nitrogênio em células considerados altos em comparação aos obtidos usando nitrato de sódio, chegando até valores de $8,1 \text{ mg mg}^{-1}$.
- Os maiores valores nos teores de proteínas e lipídios na biomassa de *A. platensis* neste trabalho foram obtidos no experimento 4 (63,2 e 17,3%, respectivamente), correspondente a uma intensidade luminosa de $180 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e molaridade de nitrato de amônio de 22,5 mM. Contrariamente, nestas condições, foi obtido o menor valor de X_m (960 mg L^{-1}).

- Em cultivos submetidos à mesma intensidade luminosa, $120 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, considerando sais de grau anal\u00edtico, os cultivos realizados com adi\u00e7\u00e3o de 15 mM de nitrato de am\u00f4nio corresponderam a um custo m\u00e9dio de R\$ 15,97 por quilograma de biomassa, enquanto que o uso de nitrato de s\u00f3dio correspondeu a um custo m\u00e9dio de R\$ 59,10 por quilograma de biomassa para o crescimento de *Arthrospira platensis*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ABBAYES, H. **Botánica: Vegetales inferiores**. Guadalajara – Mexico: Ed. Reverte S.A, p. 68 - 95, 1989.

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

ALGAEBASE. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 19 October 2009.

AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. L.; COLLA, M. **Propriedades de saúde de *Spirulina* spp.** Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas, v. 29, n. 2, p. 109 - 117, 2008.

BALLONI, W.; TOMASELLI, L.; GIOVANNETTI, L.; MARGHERI, M. C. **Biologia fondamentale del genere *Spirulina***. In: Atti del Convegno: Prospettive della coltura di *Spirulina* in Italia, p. 49 - 82, 1980.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**, Campinas-SP, Brasil: Editora da UNICAMP, 2003.

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

BECKER, E. W. ; VENKATAMARAN, L. V. Biotechnology and Exploitation of Algae - the Indian Approach. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit GmbH, Eschborn, F. D. R. 216 pp. 1982.

BELAY A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 2, p. 235-41, 1993.

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

BELAY, A. The Potential Application of *Spirulina (Arthrospira)* as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health Management. **Journal of the American nutraceutical association**, v. 5, n. 2, 2002.

¹ As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

BELKIN, S.; BOUSSIBA, S. Resistance of *Spirulina platensis* to Ammonia at high pH values. **Plant Cell Physiology**, v. 32, n. 7, p. 953 - 958, 1991.

BEZERRA, R. P.; MATSUDO, M. C.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. Influence of the ammonium chloride feeding time and the light intensity on the cultivation of *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 100, p. 297 - 305, 2008.

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

BOROWITZKA, M. A. Micro-algae as sources of fine chemicals. **Current Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 372 - 375, 1986.

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

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

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

CARLOZZI, P.; PINZANI, E. Growth characteristics of *Arthrospira platensis* cultured inside a new closed-coil photobioreactor incorporating a mandrel to control culture temperature. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, n. 6, p. 675 - 684, 2005.

CARVALHO J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua alimentada. In: Schmidell Netto, W.; Almeida-Lima, U.; Aquarone, E.; Borzani, W., coord. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher. p.205 – 218, 2001.

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

CASTELHOLZ, R. W. Subsection III, order oscillatoriales. In: WILLIAM S. T.; SHARP, E.; HOLT, J. G.; STALEY, J. T., eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: William and Wilkins, 1989. v. 3, p. 1771.

CHAMORRO, G.; SALAZAR, M.; ARAUJO, K. G.; DOS SANTOS, C. P.; CEBALLOS, G; CASTILLO, L. F. Actualización en la farmacología de *Spirulina (Arthrospira)*, un alimento no convencional. [Update on the pharmacology of *Spirulina (Arthrospira)*, an

unconventional food] **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**. v. 52, n. 3, p. 232 - 240, 2002.

CHEN, T.; ZHENG, W.; YANG, F.; BAI, Y.; WONG, Y. Mixotrophic culture of high selenium-enriched *Spirulina platensis* on acetate and the enhanced production of photosynthetic pigments. **Enzyme and Microbial Technology** v. 39, p. 103 – 107, 2006.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Research review paper Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294 – 306, 2007.

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

CIFERRI, O. “*Spirulina*, the Edible Microorganism,” **Microbiological Reviews**, vol. 47, n. 4, p. 551 - 578, 1983.

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

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

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

CONVERTI, A.; LODI, A.; DEL BORGHI, A.; SOLISIO, C. Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift tubular reactor system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 13 - 18, 2006.

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

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

COSTA, J. A. V.; COZZA, K. L.; OLIVEIRA, L.; MAGAGNIN, G. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 439-442, 2001.

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

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

DANESI, E. D. G.; RANGEL-YAGUI, C. O.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass & Bioenergy**, v. 26, p. 329 - 335, 2004.

DE ALAVA, D.; CORRÊA DE MELLO, P.; WAGENER, KLAUS. The Relevance of the CO₂ Partial Pressure of Sodium Bicarbonate - Solutions for the Mass Cultivation of the Microalga *Spirulina*. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 8, n. 5, p. 447 - 450, 1997.

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

EARTHRISE FARMS. [http:// www.earthrise.com](http://www.earthrise.com). Acesso em 19 de outubro de 2009.

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 Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

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

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

FRATELLI, F.; SIQUINI, T. J.; PRADO, S. M. A. P.; HIGASHI, H. G.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J. C. M. Effect of medium composition on the production of tetanus toxin by *Clostridium tetani*. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 3, p. 756-761, June 2005.

GIOVANNONI, S. J.; TURNER, S.; OLSEN, G. J.; BARNS, S.; LANE, D. J.; PACE, N. R. Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. **J Bacteriol**, v. 170, n. 8, p. 3584 - 3592, 1988.

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

GOMES-CORONADO, D. J.; IBÁÑEZ, E.; RUPEREZ, F. J.; BARBAS, C. Carotenoids and tocopherol measurement in edible products of vegetable origin. **Journal of Chromatography**, v. 1054, p. 227 - 233, 2004.

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

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

HANDBOOK OF CHEMISTRY & PHYSICS, 89th Edition. CRCnet BASE. London: Taylor and Francis Group, LLC, 2009.

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

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (SÃO PAULO) Normas analíticas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3^a ed. v.1. São Paulo, 1985. ISSN 1518-2932

JANSSEN, M.; TRAMPER, J.; MUR, L. R.; WIJFFELS, R. H. Enclosed Outdoor Photobioreactors: Light Regime, Photosynthetic Efficiency, Scale-Up, and Future Prospects. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n. 2, 2002.

JENSEN, S.; KNUTSEN, G. Influence of light and temperatura on photoinhibition of photosynthesis in *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, p. 495-504, 1993.

JIMÉNEZ, CARLOS.; COSSÍO, BELÉN R.; LABELLA, DIEGO; NIELL, F. XAVIER. The Feasibility of industrial production of *Spirulina* (*Arthrospira*) in Southern Spain. **Aquaculture**, v. 217, p. 179 – 190, 2003.

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

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

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

LEE, Y. K. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, p. 307 - 315, 2001.

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

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

MATSUDO, M. C.; BEZERRA, R. P.; SATO, S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J. C. M. Repeated fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* using urea as nitrogen source. **Biochem. Eng. J.**, v. 43, p. 52 - 57, 2009.

MENDES, W. S.; SILVA, I. J.; FONTES, D. O. Composição química e valor nutritivo da soja crua e submetida a diferentes processamentos térmicos para suínos em crescimento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, p. 207 - 213, 2004.

MOLINA E., FERNÁNDEZ J., ACIÉN F. G., CHISTI Y. Tubular photobioreactor design for algal cultures. **Journal of Biotechnology**, v. 92, p. 113–131, 2001.

MOLINA GRIMA, E.; SÁNCHEZ PÉREZ, J. A.; GARCÍA CAMACHO, F.; FERNÁNDEZ SEVILLA, J. M.; FERNÁNDEZ, F. G.; URDA CARDONA, J. Biomass and icosapentanoic acid productivities from an outdoor batch culture of *Phaeodactylum tricornutum* UTEX 640 in an airlift tubular photobioreactor. **Applied Microbiology Biotechnology**, vol. 42, 658 - 663, 1995.

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

MURO-PASTOR, M. I.; FLORÊNCIO, F. J. Regulation of ammonium assimilation in cyanobacteria. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 595 – 603, 2003.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em outubro 19 de 2009.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. Williams, S. **Association of official analytical chemistry Inc.**, edition 14, 1141p. , 1984.

OGBONNA, J. C., MASUI, H., TANAKA, H. Sequential heterotrophic/ autotrophic cultivation – an efficient method of producing *Chlorella* biomass for health food and animal feed. **Journal of Applied Phycology**. v. 9, p. 359 – 366, 1997.

OLGUÍN, E. J.; GALICIA, S.; CAMACHO, R.; MERCADO, G.; PEREZ, T. J. Production of *Spirulina* sp. in sea water supplemented with anaerobic effluents in outdoor raceways under temperate climatic conditions. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 48, p. 242 – 247, 1997.

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

PAOLETTI, C.; PUSHPARAJ, B.; TOMASELLI, L. Ricerche sulla nutrizione minerale di *A. platensis*. In: **Atti Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia**, v.17, Padua. Atti. Pádua: Italian Society of Microbiology, 1975, p. 833 - 839.

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

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

PELIZER, L. H.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S.; MORAES, IRACEMA DE OLIVEIRA. *Spirulina platensis* growth estimation by pH determination at different cultivations conditions. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 3, 2002.

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

PIERCE, W. C.; HAENISCH, E. L. **Quantitative Analysis**, 3ed., John Willey e Sons Inc., 1948.

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

PULZ, O.; SCHEIBENBOGEN, K. Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. **Advances Biochemistry Engineering and Biotechnology**, v. 41, p. 124 - 148, 1998.

PULZ O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 57, p. 287 – 293, 2001.

QIANG, H.; ZARMI, Y.; RICHMOND, A. Combined effects of light intensity, light-path and culture density on output rate of *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). **European Journal Phycology**, v. 33, p. 165 - 171, 1998.

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

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

REGELSBERGER, G.; ATZENHOFER, W.; RUKER, F.; PESCHEK, G. A.; JAKOPITSCH, C.; PAUMANN, M.; FURTMULLER, P. G.; OBINGER, C. Biochemical characterization of a membrane-bound manganese-containing superoxide dismutase from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 43615 – 43622, 2002.

RHEINHEIMER, G; **Microbiología de las aguas**. Zaragoza. España: Ed. Acribia S. A., p. 37 - 44, 1987.

RICHMOND, A. *Spirulina*. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZA, L. J., eds. **Microalgal biotechnology**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 85-119, 1988.

RICHMOND A. Large scale microalgae culture and applications. **Progress in Phycology Research**, v. 7, p. 1 – 62, 1990.

RODRIGUES. M. S. **Avaliação do cultivo de *Spirulina platensis* utilizando simultaneamente nitrato de potássio e cloreto de amônio como fontes de nitrogênio**. São Paulo, 2008. Dissertação de Mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

RODRIGUEZ-MAROTO, J. M.; JIMENEZ, C.; AGUILERA, J.; NIELL, F. X. Air bubbling results in carbon loss during microalgal cultivation in bicarbonate-enriched media: experimental data and process modeling. **Aquacultural Engineering**, v. 32, p. 493 – 508, 2005.

SANCHEZ, M.; BERNAL-CASTILLO, J.; ROZO, C.; RODRÍGUEZ, I. *Spirulina* (*Athrospira*): An edible microorganism. A Review. **Revista de la Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana Universitas Scientiarum**, v. 8, n. 1, p. 11 – 12, 2003.

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

SANCHEZ-LUNA, L. D.; BEZERRA, R. P.; MATSUDO, M. C.; SATO, S.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J. C. M. Influence of pH, temperature, urea molar flow rate on *Arthrospira platensis* fed-batch cultivation: a kinetic and thermodynamic approach. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 4, 2007.

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

SASSANO, C. E. N.; CARVALHO, J. C. M.; GIOIELLI, L. A.; SATO, S.; TORRE, P.; CONVERTI, A. Kinetics and bioenergetics of *Spirulina platensis* cultivation by fed-batch addition of urea as nitrogen source. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 112, p. 143 – 150, 2004.

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

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

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

SIEGEL, M. H.; ROBINSON, C. W. Applications of Airlift Gas-Liquid-Solid Reactors in Biotechnology. **Chemical Engineering Science**, v. 47, n. 13/14, p. 3215 - 3229, 1992

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

SOLETTO, D.; BINAGHI, L.; FERRARI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J. C. M.; ZILLI, M.; CONVERTI, A. Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 2, p. 369 - 375, 2008.

SOLORZANO, L. Determination of ammonia in natural waters by the phenol hypochloride method. **Limnology and Oceanography**, v. 14, p. 799 - 801, 1969.

SPILLER, S.; DENBEAUX, G.; JONES, G; Fine structure of Cyanobacteria *Spirulina platensis* and *Spirulina subsalsa*, as viewed by X – ray microscope XM-1, beamline 6.1.2. Department of Biology, Mills College, Oakland, U. S. 2001.

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

STANCA, D.; POPOVIC, E. Urea as nitrogen source in modified Zarrouk medium. **Review Roumain de Biologie Animals**, v. 41, n. 1, p. 25 - 31, 1996.

SYRETT, P.J. Nitrogen assimilation. In: LEWIN, R. A. (Ed.). **Physiology and biochemistry of algae**. New York: Academic Press, 1962. Cap. 10, p. 171-187.

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

TEDESCO, M.; DUER, E. Light, temperature and nitrogen starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of *Spirulina platensis* UTEX 1928. **J. Appl. Phycol.**, v. 1, 201 - 209, 1989.

TOMASELLI, L.; PALANDRI, M.; TREDICI, M. On the correct use of *Spirulina platensis*. **Algol. Stud.**, v. 83, p. 539 – 548, 1996.

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

TORZILLO, G.; VONSHAK, A. Effect of light and temperature on the photosynthetic activity of cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 6, p. 399 - 403, 1994.

TREDICI, M. R.; CHINI ZITTELLI, G. Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, p. 187 – 197, 1998.

VOGEL, A. I. **Análise Química Quantitativa**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Ltda; p. 250, 1992.

VON DER WEID, D.; DILLON, J. C.; FALQUET, J. *Malnutrition: a silent massacre*. Geneve: Antenna Technology; 2000. 13p.

VONSHAK, A.; BOUSSIBA, S.; ABELIOVICH, A.; RICHMOND, A. Production of *Spirulina* Biomass: maintenance of monoalgal culture outdoors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 2, p. 341 - 349, 1983.

VONSHAK, A.; RICHMOND, A. Mass production of the blue – green algae *Spirulina*. An overview. **Biomass**, v. 15, p. 233 - 247, 1988.

VONSHAK, A. (Ed.). ***Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology***. London: Taylor and Francis, 1997.

VONSHAK, A.; TOMASELLI, L. ***Arthrospira (Spirulina): systematics and ecophysiology***. In: Whitton, B.A., Potts, M. (Eds.), **Ecology of Cyanobacteria**. Kluwer Academic Publishing, The Netherlands, p. 505– 523, 2000.

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

WARD, O. **Biotecnología de la Fermentación**. Zaragoza. Editorial Acribia, 1989.

WATANABE, Y.; HALL, D. O.; Photosynthetic CO₂ fixation technologies using a helical tubular bioreactor incorporating the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Energy Conversion and Management**, v. 36, p. 721 - 724, 1995.

WATANABE, Y.; HALL, D. O. Photosynthetic CO₂ conversion technologies using a photobioreactor incorporating microalgae - energy and material balances. **Energy Conversion and Management**, v. 37, p. 1321 - 1326, 1996.

WHITTON, B. Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria. In: Mann N, Carr N, Eds. Photosy. Proka. Plenum Press; p. 1 - 37, 1992.

ZARROUK, C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch. Et. Gardner) Geitler. Paris, 1966. Tese de Doutorado – Universidade de Paris.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

A determinação da concentração celular ao longo dos cultivos foi realizada através de uma curva de calibração que correlaciona o logaritmo da transmitância com um valor de concentração celular, em miligramas por litro. Para a construção da curva de calibração, foram realizadas diversas diluições de uma suspensão de *A. platensis*, proveniente de um cultivo prévio com meio de cultura padrão Schlösser usando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. Alíquotas dessas diluições foram retiradas para leitura de transmitância em comprimento de onda de 560 nm.

Curva de calibração para determinação da concentração celular de suspensões de *A. platensis*

Equação padrão:

$$\text{Concentração celular (mg L}^{-1}\text{)} = - 503,89 \cdot \text{Log T} + 1011,8$$
$$R^2 = 0,998$$

APÊNDICE 2

CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE AMÔNIA TOTAL PELO MÉTODO DE FENOL-HIPOCLORITO

A determinação da concentração de amônia total ao longo dos cultivos de *Arthrospira platensis* foi realizada através de uma curva de calibração que correlaciona o logaritmo da transmitância com um valor de concentração de cloreto de amônio, expressados em mol L⁻¹. Para construção da curva de calibração, foram preparadas diferentes soluções de cloreto de amônio de molaridade conhecida a partir de uma solução padrão de 0,01 M. A adição dos reagentes foi realizada na ordem estabelecida de acordo ao método descrito por SOLORZANO (1969). Após o tempo de reação, alíquotas dessas diluições foram retiradas para leitura de transmitância em comprimento de onda de 640nm. Usando água destilada estéril como branco.

Curva de calibração para determinação da concentração de amônia total

Equação padrão:

$$\text{Concentração de amônia (mol L}^{-1}\text{)} = - 6,71\text{E-}05 \cdot \text{Log T} + 13,41\text{E-}05$$

$$R^2 = 0,996$$