

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

**INFLUÊNCIA DO pH, DA TEMPERATURA E DA VAZÃO MÁSSICA
DE ALIMENTAÇÃO DE URÉIA NO CULTIVO DE *Spirulina platensis***

LUIS DANTE SÁNCHEZ LUNA

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientador:

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

São Paulo
2003

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

**INFLUÊNCIA DO pH, DA TEMPERATURA E DA VAZÃO MÁSSICA
DE ALIMENTAÇÃO DE URÉIA NO CULTIVO DE *Spirulina platensis***

LUIS DANTE SÁNCHEZ LUNA

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientador:

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

**São Paulo
2003**

17910

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005991

Ficha Catalográfica

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

S211i Sánchez Luna, Luis Dante
Influência do pH da temperatura e da vazão mássica
de alimentação de uréia no cultivo de *Spirulina plantensis* /
Luis Dante Sánchez Luna. -- São Paulo, 2003.
114p.

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

1. Biotecnologia 2. Biomassa microbiana : Bioquímica
industrial I. T. II. Carvalho, João Carlos Monteiro de,
orientador.

620.8 CDD

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

LUIS DANTE SÁNCHEZ LUNA

**INFLUÊNCIA DO pH, DA TEMPERATURA E DA VAZÃO MÁSSICA
DE ALIMENTAÇÃO DE URÉIA NO CULTIVO DE *Spirulina platensis***

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

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

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, 2003.

Atreverse

Atreverse es arriesgarse en la vida por alcanzar lo que deseamos.

Atreverse significa desarrollar apasionadamente todas las potencialidades que poseemos.

Atreverse es tener el valor de seguir nuestro llamado interior para realizar plenamente nuestra vocación.

Atreverse es ser optimista, formar parte de la resistencia que forman los seres extraordinarios, quienes logran construir y avanzar.

Atreverse es soñar con los ojos abiertos y luchar hasta convertir nuestras fantasías en realidad.

Atreverse es trabajar incansablemente para alcanzar las recompensas que deseamos.

Atreverse es hacer uso de nuestra propia libertad, asumiendo dignamente las consecuencias.

Atreverse es amar sin condiciones, ofreciendo lo más valioso que poseemos a los seres que amamos.

Atreverse es tener el valor de decir sinceramente "TE AMO" y humildemente pedir perdón cuando ofendemos.

Atreverse es lanzarse a triunfar con tal perseverancia hasta llegar a la cima.

Atreverse es la búsqueda del bien, dejando una estela de generosidad a nuestro paso.

Atreverse es vivir buscando la belleza, enriqueciendo a los demás, a nosotros mismos y a la creación.

Atreverse es vivir en la verdad, agregando valor a nuestras acciones y a nuestra propia existencia, combatiendo la mentira y la corrupción.

Atreverse es cumplir una misión, apostando nuestra existencia por servir a nuestros ideales, luchando día a día por lograr un mundo más humano y maravilloso.

Miguel Ángel Cornejo

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

*Dedico este trabalho
a meu irmão Gilmer Sánchez (in memoriam)*

*Aos meus pais, Glória e Constante,
por todo o esforço dedicado na minha formação*

*A minha avó Casilda, a meus irmãos,
Nadya, Carlos e Líliana
A meus tios, Dora e Gilmer
e as minhas sobrinhas Grécia e Anel*

*A minha princesa, Cíntia
pelo carinho e estímulo sempre presentes*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre me ilumina e dá forças para continuar nesta luta de formação.

Ao Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho, pelos ensinamentos transmitidos, a amizade, confiança, compreensão, conselho e sugestões.

Ao Prof. Tit. Sunao Sato, pela contribuição na elaboração deste trabalho, e pela experiência transmitida nesta área de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Orlando Zancanaro Jr., pelas facilidades prestadas no laboratório.

Aos funcionários e amigos Kleber e Mauro pela ajuda na parte experimental, ao Dante Augusto pelas sugestões, empréstimo de material bibliográfico, a cãndida, dona Irene, Marielene e a Graça, ao Juarez, Elza, Miriam, Maristela, Nilton Evani.

Aos pós-graduandos e estagiários, Rachel, Ângelo, Carlos Sassano, Eliane, Pedro Ângela, Vanderson, Virgilio, Oscar, Gabriela, Karen, Fernanda, Denise e Letícia.

Ao pessoal da Biblioteca Conjunto das Químicas, pela ajuda nas referências bibliográficas

Agradecimento especial a Arturo Cabanillas, pela oportunidade de estar em São Paulo.

À CAPES – Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de estudos concedida.

RESUMO

Spirulina platensis foi cultivada em tanques abertos de capacidade de 5,0 L de meio a 6 klux utilizando-se uréia como fonte de nitrogênio, com adição diária (intermitente). Esta forma de adição evitou que níveis tóxicos de amônia fossem atingidos, e permitindo a obtenção de concentrações celulares finais (X_m) e produtividade em células (P_x) maiores do que aquelas obtidas em cultivos por batelada com KNO_3 . Nas mais baixas adições obteve-se, também os maiores valores de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$). Os resultados foram avaliados através de um planejamento experimental do tipo, composto central com três fatores em cinco níveis, combinado com a metodologia de superfície de resposta. Foram selecionados pH, temperatura (T) e vazão mássica de uréia (K) como variáveis independentes e X_m , P_x and $Y_{X/N}$ como variáveis resposta. Esta metodologia permitiu verificar, através da otimização simultânea das variáveis independentes, pH = 9.5, T = 30 °C e K = 140 mg d⁻¹ como a melhor condição para o crescimento da *S. platensis*. Nestas condições, os seguintes valores médios foram obtidos: $X_m = 713 \text{ mg L}^{-1}$, $P_x = 66 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ and $Y_{X/N} = 4.3 \text{ g g}^{-1}$.

ABSTRACT

Spirulina platensis was cultivated at 6 klux in 5.0-L open tanks by daily supplying urea as nitrogen source. This intermittent addition prevented the system of reaching inhibitory levels of ammonia and allowed final cell concentrations (X_m) and cell productivities (P_x) higher than those obtained in batch runs using KNO_3 . Moreover, the lower nitrogen levels using urea rather than KNO_3 ensured a higher nitrogen-to-cell conversion ($Y_{X/N}$). These results were evaluated using three-factor, five-level central composite experimental planning, combined with the response surface methodology (RSM), selecting pH, temperature (T) and massic flow rate of the urea (K) as the independent variables and X_m , P_x and $Y_{X/N}$ as the response variables. This approach allowed us to identify, through the simultaneous optimization of the variables, pH = 9.5, T = 30 °C and $K = 140 \text{ mg d}^{-1}$ as the best conditions for *S. platensis* growth. Under these conditions, the following average values were obtained: $X_m = 713 \text{ mg L}^{-1}$, $P_x = 66 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ and $Y_{X/N} = 4.3 \text{ g g}^{-1}$.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	vi
NOMENCLATURA E ABREVIATURAS	ix
I – INTRODUÇÃO	01
II - OBJETIVOS	04
III – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	05
III.1 – Produção de biomassa microbiana	05
III.2 – Histórico	07
III.3 - Classificação e morfologia	08
III.4 - Composição química da biomassa de <i>Spirulina</i>	9
III.5 - Propriedades nutricionais	11
III.6 - Propriedades terapêuticas	12
III.7 – Fatores que influenciam no crescimento da <i>Spirulina</i>	12
IV – MATERIAL E MÉTODOS	21
IV.1 – Microrganismo	21
IV.2 – Meio de cultivo	21
IV.2.1 – Meio padrão para cultivo de <i>Spirulina</i> <i>platensis</i>	22
IV.2.2 – Meio modificado	22
IV.3 – Preparo do inóculo	23
IV.4 – Dispositivo para cultura	23
IV.5 – Descrição de um experimento típico	24
IV.6 – Processo de cultivo	25
IV.7 – Técnicas analíticas	26
IV.7.1 – Acompanhamento do cultivo	26
IV.7.1.1 – Determinação da concentração celular	26
IV.7.1.2 – Determinação da concentração de amônia	27
IV.7.1.3 – Determinação do pH	28
IV.7.1.4 – Determinação de carbonato total	28
IV.7.2 – Avaliação da biomassa obtida	28
IV.7.2.1 – Determinação e proteínas totais	28
IV.7.2.2 – Determinação de lipídeos totais	29
IV.8 – Formulas e métodos utilizados nos cálculos dos parâmetros cinéticos	29
IV.9 – Experimentos realizados	30
IV.9.1 – Planejamento experimental	30

IV.9.2 – Ensaio adicionais	33
V – RESULTADOS	34
VI – DISCUSSÃO	81
VI.1 – Considerações gerais	81
VI.2 – Análise de regressão multivariável	87
VII – CONCLUSÕES	105
VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Foto dos minitanques para o cultivo dae <i>Spirulina platensis</i> .	24
Figura 2	Curva de calibração para determinação da concentração da <i>Spirulina platensis</i> .	26
Figura 3	Curva de calibração para determinação de amônia no meio de cultivo de <i>Spirulina platensis</i> .	27
Figura 4	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio A.	35
Figura 5	Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio A.	36
Figura 6	Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio A.	36
Figura 7	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio B.	37
Figura 8	Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio B.	38
Figura 9	Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio B.	38
Figura 10	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio C.	39
Figura 11	Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio C.	40
Figura 12	Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio C.	40
Figura 13	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio D.	41
Figura 14	Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio D.	42
Figura 15	Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio D.	42
Figura 16	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio E.	43
Figura 17	Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio E.	44

Figura 18	Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio E.	44
Figura 19	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio F.	45
Figura 20	Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio F.	46
Figura 21	Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio F.	46
Figura 22	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio G.	47
Figura 23	Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio G.	48
Figura 24	Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio G.	48
Figura 25	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio H.	49
Figura 26	Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio H.	50
Figura 27	Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio H.	50
Figura 28	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio I.	51
Figura 29	Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio I.	51
Figura 30	Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio I.	52
Figura 31	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio J.	53
Figura 32	Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio J.	54
Figura 33	Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio J.	54
Figura 34	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio K.	55
Figura 35	Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio K.	56
Figura 36	Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo	56

	para o ensaio K.	
Figura 37	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio L.	57
Figura 38	Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio L.	58
Figura 39	Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio L.	58
Figura 40	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio M.	59
Figura 41	Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio M.	60
Figura 42	Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio M.	60
Figura 43	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio N.	61
Figura 44	Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio N.	62
Figura 45	Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio N.	62
Figura 46	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio O.	63
Figura 47	Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio O.	64
Figura 48	Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio O.	64
Figura 49	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio P.	65
Figura 50	Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio P.	66
Figura 51	Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio P.	66
Figura 52	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio Q.	67
Figura 53	Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio Q.	68
Figura 54	Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio Q.	68

Figura 55	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio R.	69
Figura 56	Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio R.	70
Figura 57	Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio R.	70
Figura 58	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio S.	71
Figura 59	Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio S.	72
Figura 60	Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio S.	72
Figura 61	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio T.	73
Figura 62	Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio T.	74
Figura 63	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio U.	75
Figura 64	Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio U.	76
Figura 65	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio V.	77
Figura 66	Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio V.	78
Figura 67	Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio V.	78
Figura 68	Superfície de resposta para concentração celular máxima (X_m) em função de X_1 e X_2	92
Figura 69	Superfície de contorno para concentração celular máxima (X_m) em função de X_1 e X_2	92
Figura 70	Superfície de resposta para concentração celular máxima (X_m) em função de X_1 e X_3	93
Figura 71	Superfície de contorno para concentração celular máxima (X_m) em função de X_1 e X_3	93
Figura 72	Superfície de resposta para concentração celular máxima (X_m) em função de X_2 e X_3	94

Figura 73	Superfície de contorno para concentração celular máxima (X_m) em função de X_2 e X_3	94
Figura 74	Superfície de resposta para produtividade em células (P_x) em função de X_1 e X_2	97
Figura 75	Superfície de contorno para produtividade em células (P_x) em função de X_1 e X_2	97
Figura 76	Superfície de resposta para produtividade em células (P_x) em função de X_1 e X_3	98
Figura 77	Superfície de contorno para produtividade em células (P_x) em função de X_1 e X_3	98
Figura 78	Superfície de resposta para produtividade em células (P_x) em função de X_2 e X_3	99
Figura 79	Superfície de contorno para produtividade em células (P_x) em função de X_2 e X_3	99
Figura 80	Superfície de resposta para fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função de X_1 e X_2	102
Figura 81	Superfície de contorno para fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função de X_1 e X_2	102
Figura 82	Superfície de resposta para fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função de X_1 e X_3	103
Figura 83	Superfície de contorno para fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função de X_1 e X_3	103
Figura 84	Superfície de resposta para fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função de X_2 e X_3	104
Figura 85	Superfície de contorno para fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função de X_2 e X_3	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição química da biomassa de <i>Spirulina sp.</i>	10
Tabela 2	Composição de aminoácidos na biomassa de <i>Spirulina sp.</i> (mg/g proteína bruta) em comparação com o sugerido pela FAO para crianças em idade pré-escolar.	11
Tabela 3	Matriz de ensaio do planejamento experimental das variáveis pH, temperatura (T) e vazão mássica de uréia (K).	32
Tabela 4	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio A (pH= 9,0; T=26°C; K=90mg.d ⁻¹).	35
Tabela 5	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio B (pH= 10; T=26°C; K=90mg.d ⁻¹).	37
Tabela 6	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio C (pH= 9,0; T=34°C; K=90mg.d ⁻¹).	39
Tabela 7	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio D (pH= 10; T=34°C; K=90mg.d ⁻¹).	41
Tabela 8	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio E (pH= 9; T=26°C; K=190mg.d ⁻¹).	43
Tabela 9	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio F (pH= 10; T=26°C; K=190mg.d ⁻¹).	45
Tabela 10	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio G (pH= 9; T=34°C; K=190mg.d ⁻¹).	47
Tabela 11	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e	49

	concentração de amônia total referentes ao ensaio H (pH= 10; T=34 ^o C; K=190mg.d ⁻¹).	
Tabela 12	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio I (pH= 8,66; T=30 ^o C; K=140mg.d ⁻¹).	51
Tabela 13	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio J (pH= 10,34; T=30 ^o C; K=140mg.d ⁻¹).	53
Tabela 14	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio K (pH= 9,5; T=23,25; K=140mg.d ⁻¹).	55
Tabela 15	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio L (pH= 9,5; T=36,75; K=140mg.d ⁻¹).	57
Tabela 16	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio M (pH= 9,5; T=30; K=55,65mg.d ⁻¹).	59
Tabela 17	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio N (pH= 9,5; T=30; K=224,35mg.d ⁻¹).	61
Tabela 18	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio O (pH= 9,5; T=30 ^o C; K=140mg.d ⁻¹).	63
Tabela 19	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio P (pH= 9,5; T=30 ^o C; K=140mg.d ⁻¹).	65
Tabela 20	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio Q (pH= 9,5; T=30 ^o C; K=140mg.d ⁻¹).	67
Tabela 21	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio R (pH= 9,5; T=30 ^o C;	69

	K=140mg.d ⁻¹).	
Tabela 22	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio S (pH= 9,5; T=30°C; K=140mg.d ⁻¹).	71
Tabela 23	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total referentes ao ensaio com KNO ₃ como fonte de nitrogênio.	73
Tabela 24	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total referentes ao ensaio com KNO ₃ como fonte de nitrogênio.	75
Tabela 25	Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio T sem controle de pH (T=30°C; K=140mg.d ⁻¹).	77
Tabela 26	Conteúdo de proteínas e lipídeos na biomassa de <i>Spirulina platensis</i> obtida nos ensaios realizados.	79
Tabela 27	Parâmetros cinéticos: concentração celular máxima (X _m), produtividade em células (P _x), fator de conversão de nitrogênio em células (Y _{X/N}) e velocidade máxima específica de crescimento (μ _m) dos ensaios realizados.	80
Tabela 28	Concentração celular máxima (X _m), produtividade em células (P _x) e fator de conversão de nitrogênio em células (Y _{X/N}).	88
Tabela 29	Análise de regressão multivariável para concentração celular máxima (X _m) em função das variáveis estudadas.	89
Tabela 30	Análise de variância do modelo de regressão multivariável para concentração celular máxima (X _m).	90
Tabela 31	Análise de regressão multivariável para produtividade em células (P _x) em função das variáveis estudadas.	95
Tabela 32	Análise de variância do modelo de regressão multivariável para produtividade em células (P _x).	96
Tabela 33	Análise de regressão multivariável para fator de conversão de nitrogênio em células (Y _{X/N}) em função das variáveis estudadas.	100
Tabela 34	Análise de variância do modelo de regressão multivariável para fator de conversão de nitrogênio em células (Y _{X/N}).	100

NOMENCLATURA E ABREVIATURAS

CO ₂	Gás carbônico ou anidrido carbônico
CO ₃ ⁻²	Ânion carbonato
dX/dt	Variação instantânea da concentração celular em relação ao tempo.
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FAO	Food and Agriculture Organization
HCO ₃ ⁻	Ânion bicarbonato
K	Vazão mássica de alimentação de uréia
klux	Kilolux (iluminancia)
lux	Unidade de medida de iluminação no Sistema internacional, igual ao iluminação de uma superfície plana cuja área é de 1 m ² . e que recebe, perpendicularmente, um fluxo luminoso de um lúmen uniformemente distribuído.
M _o	Massa inicial de uréia (mg.L ⁻¹).
M _u	Massa total de uréia adicionada (mg.L ⁻¹).
N _t	Quantidade total de nitrogênio adicionado (g)
p	Nível descritivo
pH	Medida potenciométrica do potencial hidrogeniônico de soluções aquosas.
P _c	Valor real referente ao ponto central
P _x	Produtividade em células (mg.L ⁻¹ d ⁻¹)
rpm	Rotações por minuto.

T	Temperatura (°C).
T _c	Tempo de cultivo
t _a	Tempo de alimentação (dias).
V _c	Valor codificado para a variável em estudo.
V _r	Valor real da variável em estudo.
X	Concentração celular (mg.L ⁻¹).
X _i	Concentração celular inicial (mg.L ⁻¹).
X _m	Concentração celular máxima (mg.L ⁻¹).
X ₁	Valor codificado da variável pH
X ₂	Valor codificado da variável temperatura
X ₃	Valor codificado da variável vazão mássica de uréia
Y _{X/N}	Fator de conversão de nitrogênio em células (g.g ⁻¹).
μ	Velocidade específica de crescimento (d ⁻¹).
μ _m	Velocidade máxima específica de crescimento (d ⁻¹).

I. INTRODUÇÃO

A necessidade protéica é uma constante na alimentação humana e animal, com a produção de maior quantidade de proteínas por área em função do tempo e satisfazendo-se poderá solucionar o problema da fome (CIFERRI & TIBONI, 1985). Portanto, a produção de proteínas de microrganismos é uma via alternativa de disponibilidade de fonte protéica para alimentação. Esse tipo de proteína é conhecido como proteína unicelular (*single cell protein* - SCP), e abrangem fungos, leveduras e bactérias, particularmente as cianobactérias (LITCHFIELD, 1977).

A cianobactéria ou microalga *Spirulina platensis* vem sendo cultivada fotoautotroficamente para a produção de biomassa com alto conteúdo protéico, da ordem de 70% em massa seca (PELIZER *et al.*, 2002), colocando-se acima das carnes e da soja (DILLON, PHUC, DUBACQ, 1995 ; STANCA & POPOVIC, 1996).

A *Spirulina* cresce em meios líquidos específicos ricos em sais minerais, compostos principalmente por bicarbonato e carbonato de sódio, com pH de 8 a 11. As regiões propícias são as tropicais e subtropicais quentes e ensolaradas. Assim como México, Tchad, Etiopia, Quênia, Zaire, Zâmbia, etc., as espécies do gênero *Spirulina* constituem um dos raros exemplos de cianobactérias continentais utilizadas naturalmente, como alimento humano e animal (ABDIN EL SHERIF & CLEMENT, 1982).

Quanto aos aspectos tecnológicos de cultivo da *Spirulina*, esta é geralmente realizada em tanques abertos com iluminação artificial ou natural, onde se utiliza meio de cultura mineral (PAOLETTI, PUSHPARAJ, TOMASELLI, 1975), o qual contem os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento. Em relação a outros microrganismos fotoautotróficos,

apresenta algumas vantagens do ponto de vista tecnológico. Dentre estas, podem ser citadas o crescimento em pH alcalino e altamente salino, fatores importantes na prevenção de contaminação no reator por microrganismos estranhos (WALACH *et al.*, 1987, BOROWITZKA, 1999). Cresce bem em temperaturas da ordem de 30 °C e utiliza a energia luminosa para seu desenvolvimento. A sua separação do meio de cultivo é fácil, devido à sua forma espiralada e maiores dimensões (RICHMOND, 1983; PIORRECK *et al.*, 1984).

A fonte convencional de nitrogênio utilizada para a produção de *Spirulina* é o nitrato de potássio. No entanto, a utilização de uréia como fonte de nitrogênio por processo descontínuo alimentado para o cultivo de *Spirulina platensis* permitiu a obtenção de resultados bastante satisfatórios, acarretando numa diminuição do custo de produção (DANESI *et al.*, 2002).

A forma de carbono preferencialmente assimilada por cianobactérias é o bicarbonato, sendo o pH ideal de cultivo aquele que assegure o maior deslocamento do equilíbrio químico no sentido de sua formação.

Com relação à fonte de nitrogênio, quando a uréia é adicionada num meio alcalino, no estudo em questão, é hidrolisada a amônia (DANESI *et al.*, 2002). Esta, em valores de pH 9,3, apresenta-se em equilíbrio químico, com presença equimolar dos íons amônia e amônio; abaixo do valor de pH 7,0, predomina o íon amônio e acima do pH 12,0 somente o íon amônia está presente no meio.

O pH é uma variável muito importante de estudo, pois interfere na forma com que a reserva de carbono se apresenta, além de influenciar na velocidade de decomposição da uréia, bem como na apresentação da forma amoniacal no meio de cultivo (protonada ou não protonada).

Quanto à temperatura, sabe-se que é de extrema importância no crescimento microbiano, sendo relatado que a *Spirulina platensis* cresce bem na faixa de 24-32 °C (VONSHAK, 1997), embora apresente crescimento satisfatório a partir de 20 °C (RICHMOND, 1983). Ademais, a disponibilidade da fonte de nitrogênio no cultivo de *Spirulina platensis* é função da temperatura, uma vez que a uréia em meio básico, que é o caso do meio de cultivo de *Spirulina*, sofre hidrólise e libera amônia no meio, que é volátil e pode se perder por evaporação limitando o crescimento.

Portanto, em virtude das características biológicas, tecnológicas e comerciais comentadas anteriormente, e complementando estudos anteriores (SASSANO, 1999; RANGEL, 2000, DANESI, 2001) teve a microalga *Spirulina platensis* como objeto de estudo.

II. OBJETIVO

O presente trabalho objetivou o estudo da influência dos parâmetros pH, temperatura e vazão mássica de alimentação de uréia, no crescimento e conteúdo de proteínas e lipídeos da biomassa de *Spirulina platensis*.

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

III.1. Produção de biomassa microbiana

Os seres humanos vêm usando microrganismos desde a Antiguidade para os mais diversos fins, principalmente no preparo de alimentos e bebidas. Como exemplos clássicos encontram-se os pães, vinhos e cervejas. Posteriormente foram descobrindo que os microrganismos poderiam ser fontes de outros produtos. Por exemplo, na produção de antibióticos e vitaminas que muito tem contribuído para a saúde.

A idéia do uso de biomassa microbiana na dieta humana e animal, em função de suas características nutricionais, inicia-se no fim da primeira guerra mundial. No entanto, a intensificação do interesse de produção de biomassa microbiana ocorreu em 1977, quando surgiu o termo *single cell protein (SCP)* (BOZE, MOULIN, GALZY, 1995).

Dentre os fatores que contribuíram para a propagação do uso de biomassa microbiana na dieta humana e animal, podem ser citadas as seguintes características de microrganismos utilizados para esse fim:

- apresentar em sua constituição alto teor de proteína, também como de vitaminas e minerais;
- apresentar em sua constituição lipídios de efeito benéfico ao organismo humano;
- alta velocidade de crescimento, tornando a velocidade de formação protéica muito maior que aquelas obtidas em seres superiores, como plantas e animais;
- utilizar diversas matérias-primas, muitas consideradas como resíduos em outros processos, normalmente agroindustriais;

➤ necessitam de áreas muito menores para que possam ser cultivados, comparando-se com a produção de plantas e/ou animais.

Por outro lado, além das características desejáveis acima, deve-se considerar que esses microrganismos (BOZE, MOULIN, GALZY, 1995):

- não sejam patogênicos;
- apresentem baixos teores de ácidos nucléicos;
- apresentem boa digestibilidade;
- não produzam substâncias tóxicas;
- apresentem composição balanceada de aminoácidos;
- apresentem estabilidade genética.

Os microrganismos utilizados para fins de biomassa microbiana são bactérias, leveduras, bolores e algas (ZHANG, ZHANG, CHEN, 1999). Cada tipo tem suas vantagens e desvantagens em relação aos demais. As bactérias representam microrganismos com altos teores protéicos (chegando a valores da ordem de 80%) e altas velocidades de crescimento. Apesar dessas características desejáveis, apresentam maiores teores de ácidos nucléicos do que as outras biomassas e, por sua reduzida dimensão, a etapa de separação celular do meio fermentado torna-se mais onerosa. As leveduras apresentam-se como de fáceis cultivo e de separação, com excelente conteúdo de vitaminas do complexo B, contudo também apresentam alto teor de ácidos nucléicos. A biomassa fúngica tem por característica crescer nos mais variados substratos; seu conteúdo protéico, no entanto, é da ordem de 50%. As algas apresentam como fatores vantajosos para sua utilização como biomassa microbiana, a capacidade de crescer em meios minerais, utilizando o CO₂ como fonte de carbono, além de alguns gêneros crescerem bem com reduzidos níveis de contaminação em tanque abertos, com sua separação facilitada, devido às suas dimensões. Adicionalmente, possuem teores protéicos bastante

satisfatórios. Contudo, como desvantagem, apresentam o menor tempo de geração dentre todas as biomassas microbianas.

Cultura microalgal é uma das técnicas de biotecnologia moderna (BOROWITZKA, 1999). A primeira cultura unialgal relatada data de 1890, com *Chlorella vulgaris*, As pesquisas sobre biomassa de algas começam a ser intensificadas somente por volta de 1950. Bactérias fotossintéticas, cianobactérias e algas verdes têm atraído interesse recentemente, tanto para a produção da biomassa propriamente dita, como para produção de substâncias específicas como pigmentos, ácidos graxos, entre outros. As culturas mais comuns são de *Chlorella*, *Dunaliella* e *Spirulina* (RICHMOND, 1983).

III.2. Histórico

O gênero *Spirulina* passou a receber atenção dos pesquisadores, após os resultados de uma expedição belga ao Saara (1964-1965), quando foram observadas densas formações de *Spirulina sp.* em lagos salinos tropicais, localizados em sua maioria na Republica do Chad, na África Central (FERRAZ, AQUARONE, KRAUTER, 1986).

Existem evidências nos anais espanhóis da conquista do México, no século XVI, de que os astecas colhiam *Spirulina sp.* no lago Texcoco e preparavam alimentos que consumiam regularmente (DILLON, PHUC, DUBACQ, 1995).

Nos anos 60, as pesquisas com microalgas se concentraram no tratamento de águas residuárias e na potencial aplicação de microalgas nos programas espaciais para renovação da atmosfera, fonte de alimento e tratamento de resíduos (BENEMANN, 1990). Atualmente seu uso também vem sendo proposto para o tratamento terciário de efluentes orgânicos industriais (TRAVERSO *et al.*, 1996).

Em 1972, foi construída uma planta em escala industrial em Sosa Texcoco, capaz de produzir 1 tonelada de *S. máxima* por dia. O processo adotado incluía filtração, fluidização, pasteurização, homogeneização e secagem (CIFERRI & TIBONI, 1985; DILLON, PHUC, DUBACQ, 1995).

No início dos anos 80, a fazenda Earthrise tornou-se a primeira planta de produção de *Spirulina maxima* em larga escala nos Estados Unidos, sob o controle de uma associação comercial japonesa (BENEMANN, 1990).

Na última década, a produção anual tem sido da ordem de 1,5 toneladas por ano, com produção em diversos países, como México, Estados Unidos, Tailândia, China, entre outros (BELAY, 1997).

III.3. Classificação e morfologia do gênero *spirulina*

O gênero *Spirulina* pertence à família *Oscillatoriaceae* e compreende o grupo das cianobactérias filamentosas multicelulares (microalgas verde-azuladas), formadas por células cilíndricas arranjadas em tricomas helicoidais. O diâmetro celular varia de 1 a 12 μm (HENRIKSON, 1989; CIFERRI e TIBONI, 1985; CIFERRI 1983).

A ultraestrutura da *Spirulina* é similar a das outras algas verde-azuladas. A ultraestrutura e morfologia da *Spirulina platensis* é significativamente afetada pelas condições ambientais e fatores nutricionais. A temperatura influencia no tamanho das células e na ocorrência de diferentes organelas. O aumento da intensidade luminosa causa um aumento na concentração de vesículas de gás, no tamanho do tricoma, e um decréscimo nos ficobilossomos (CARR & WHITTON, 1973).

A forma helicoidal, as dimensões celulares, o grau de enrolamento e o comprimento dos filamentos variam de acordo com as espécies e condições ambientais. A forma espiral dos tricomas somente é observada em meio

sólido, os filamentos adquirem a forma hélice em meio líquido. A forma espiralada da alga parece sofrer uma alteração espontânea dependendo do pH e dos nutrientes (CIFERRI & TIBONI, 1985; DILLON, PHUC, DUBACQ, 1995; RICHMOND, 1988).

A *Spirulina platensis* também, é chamada de *Spirulina janneri* var. *platensis* ou *Arthrospira platensis*. Suas principais características são cor verde-brilhante, tricomas azul-esverdeados, levemente constrictos na parede celular, formando espirais regulares. Estes aparecem como filamentos verde-azulados devido à presença dos pigmentos clorofila e ficocianina.(DILLON, PHUC, DUBACQ, 1995; RICHMOND, 1988).

A reprodução da *Spirulina sp.* ocorre por divisão binária; se dá com a quebra do tricoma em uma célula intercalaria que perde seu citoplasma e é denominada necrídio. O tricoma é quebrado no necrídio dando origem a cadeias curtas de células denominadas hormogônias, que diferem dos tricomas maduros devido à falta de motilidade, tamanho celular reduzido e morfologia diferenciada (CIFERRI & TIBONI, 1985).

III.4. Composição química da biomassa de *spirulina*

A composição química da biomassa de *Spirulina platensis* indica um alto conteúdo protéico, da ordem de 70% em massa seca (PELIZER et al., 2002), como se observa na Tabela 1. Apresenta a vantagem de não conter o colesterol das carnes, ser pouco calórica, além de conter todos os aminoácidos essenciais recomendados pela FAO (Tabela 2). Possui baixo teor de ácidos nucléicos, não ultrapassando 5% da massa seca (CIFERRI & TIBONI, 1985; BALLONI *et al.*,1981; DURAND-CHASTEL,1980). Adicionalmente, tem em sua constituição vitaminas A, B, C, E, e K, (BECKER, 1981), ácidos graxos polinsaturados (MAHAJAN & KAMAT, 1995), bem como polissacarídeos

com propriedade imunomodulatória, pigmentos e antioxidantes (PULZ & SCHEIBENBOGEN, 1998).

Tabela 1- Composição química da biomassa de *Spirulina* (massa seca), segundo CIFERRI & TIBONI (1985).

	<i>Spirulina platensis</i>	<i>Spirulina maxima</i>
Proteína	67,0	67,0
Lipídeos	11,5	13,1
Carboidratos	15,3	14,5
Ácidos nucléicos	4,2	4,5
Cinzas	6,0	7,6

Tabela 2- Composição de aminoácidos na biomassa de *Spirulina* (mg/g proteína bruta) em comparação com o sugerido pela FAO para crianças em idade pré-escolar segundo DILLON, PHUC, DUBACQ. (1995)

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

III.5. Propriedades nutricionais da *spirulina*

Foram realizados estudos nutricionais em animais, submetidos a dietas alimentares com *Spirulina*, resultando, em geral, ganhos de peso e deposição corporal de nitrogênio comparável, senão melhores, àqueles obtidos com a maioria das fontes protéicas vegetais (CIFERRI, 1983). Testes com humanos têm sido conduzidos em vários países, como na cidade de México, onde foram realizados experimentos em crianças com desnutrição de terceiro grau. Após 320 dias de administração de *S.maxima*, resultados revelaram que a absorção de nitrogênio foi mais baixa em comparação com o leite e a soja, mas o nitrogênio retido da quantidade ingerida foi levemente inferior ao leite e melhor do que a soja (DURAND-CHASTEL, 1980; CIFERRI & TIBONI, 1985). Adicionalmente, estes autores relatam que não foi observado efeito toxicológico dessa microalga em animais de laboratório.

III.6. Propriedades terapêuticas da *spirulina*

As propriedades terapêuticas da *Spirulina sp.* têm sido relatadas: aceleram a cicatrização de ferimentos; a ficocianina presente na alga pode estimular o sistema imunológico, protegendo contra uma variedade de doenças; o ácido γ -linolênico presente na *Spirulina* em grandes quantidades estimula a síntese de prostaglandinas, as quais estão envolvidas na regulação da pressão sanguínea, síntese de colesterol e resposta inflamatória. (HENRICKSON, 1989; RICHMOND, 1988).

III.7. Fatores que influenciam no crescimento da *spirulina*

Dentre as variáveis que interferem no crescimento desses microrganismos, podem ser citados como variáveis ambientais: iluminância, pH, temperatura, salinidade, agitação (BECKER, 1981; SANTILLAN, 1982;

RICHMOND, 1988). Outros fatores relacionados às células, como concentração e fase de crescimento das células utilizadas no inoculo (PELIZER *et al.*, 2003). Especial atenção também deve ser dada a variáveis ligadas ao fornecimento de nutrientes às células como o processo de cultivo (DANESI *et al.*, 2002) e, evidentemente, o tipo de nutriente a ser adicionado.

Em culturas fotoautotróficas a disponibilidade de luz para cada célula é função da intensidade e duração da irradiação, com o aumento da luminosidade ocorre um correspondente aumento do crescimento celular, até atingir a região de saturação luminosa, da ordem de 5-10 Klux para algas verdes e cianobactérias (FERRAZ, 1986). No cultivo, inicialmente, há poucas células por unidade de volume, e conseqüentemente cada célula recebe uma intensidade de luz superior àquela necessária para a fotossíntese, resultando um crescimento exponencial e constante. O aumento populacional microbiano traz como conseqüência o efeito do sombreamento; neste, a luz disponível para cada célula é atenuada, passando a não ser mais homogênea sua distribuição na cultura, tendo como conseqüência diminuição do crescimento microbiano (BECKER, 1981; RICHMOND, 1988). Quando o efeito do sombreamento passa a ser significativo, isto é, limita a luz disponível, o crescimento celular passa para uma fase linear, na qual a quantidade de biomassa produzida por unidade de tempo depende principalmente da quantidade de luz que a célula recebe (RICHMOND, 1983).

O cultivo de microalgas sob fortes iluminações é responsável por dois fenômenos prejudiciais: a fotoinibição, que acarreta num decréscimo no rendimento máximo de crescimento, e a foto-oxidação, que tem efeitos letais nas células, podendo levar à perda total da cultura (JENSEN & KNUTSEN, 1993).

A agitação, também, é um fator importante no crescimento da *Spirulina*, pois com esta agitação as células são mantidas em suspensão no meio líquido, prevenindo também a sedimentação de nutrientes e fornecendo às células igual distribuição de luz, garantindo assim a homogeneização da cultura (BECKER & VENKATARAMAN, 1980). Tanto o sódio quanto o potássio são indispensáveis no meio de cultura. Quando a razão $K^+ : Na^+$ é o maior de que 5, ocorre inibição do crescimento celular (RICHMOND, 1988).

A *Spirulina sp.* não fixa nitrogênio atmosférico. Os nitratos são a principal fonte de nitrogênio assimilada pela alga, o que confirma a ampla utilização dos meios de Paoletti (PAOLETTI, PUSHPARAJ, TOMASELLI, 1975) e Zarouk (STANCA & POPOVIC, 1996), que utilizam KNO_3 e $NaNO_3$ como fonte de nitrogênio, respectivamente.

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

FAINTUCH (1989), estudou diferentes fontes de nitrogênio para cultivo de *Spirulina máxima* por processo descontínuo de cultivo, verificou que a utilização de fontes alternativas de nitrogênio em vez de nitrato, como cloreto de amônio e uréia, foi limitada a baixos níveis de concentração do nutriente e pequena quantidade de biomassa produzida.

SAXENA, AHMAD, SHYAM. (1983), trabalhando com produção de *S. platensis* a partir de águas residuárias domésticas adicionadas de sais,

conseguiram bons resultados com uréia a 0,01% como complementação, embora os teores protéicos maiores tenham sido obtidos para a fonte nitrato de sódio 0,1%. Isso poderia ser esperado em função do planejamento executado, que levou ao fornecimento de 3,53 vezes mais nitrogênio (considerando em número de átomos) na complementação realizada com nitrato.

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

A fonte convencional de nitrogênio utilizada para o cultivo de *Spirulina* é o nitrato de potássio. A utilização de uréia como fonte de nitrogênio, em substituição ao nitrato de potássio apresenta-se como uma alternativa bastante interessante, pois acarretaria em uma diminuição significativa de custos, dado que o preço do nitrato de potássio grau analítico é cerca de vinte vezes maior do que o da uréia. O nitrato de potássio também apresenta o inconveniente de ser um produto controlado pelo Ministério de Defesa, devido à sua utilização na fabricação de explosivos, e portanto de difícil acesso. Em contrapartida a uréia é bastante difundida para utilização em agricultura e em cultivo de microrganismos, e portanto facilmente adquirida (RANGEL, 2000).

Parâmetros ambientais, como assinalado anteriormente, têm se mostrados importantes no aumento da produtividade e na composição química da *Spirulina* (OLGUÏM, *et al.*, 1997). O pH e a temperatura são variáveis

ambientais de destacada influência no crescimento microbiano e, em se tratando da utilização de uma nova fonte de nitrogênio (uréia) no cultivo dessa cianobactéria, um estudo do efeito dessas variáveis no seu crescimento se faz necessário pelas considerações apresentadas a seguir.

O meio padrão para *Spirulina* (PAOLETTI, PUSHPARAJ, TOMASELLI, 1975) é rico em bicarbonato e carbonato. Este meio é alcalino devido à presença destes íons. Em valores de pH abaixo de 6,0, predomina a forma CO_2 . Já em valores de pH entre 6,0 e 10,0, predomina a forma HCO_3^- , sendo CO_3^{2-} a forma predominante acima de pH 10,0. A partir do pH 13,0 o íon CO_3^{2-} torna-se exclusivo do equilíbrio. Por outro lado, MILLER & COLMAN (1980) relatam que a forma de carbono preferencialmente assimilada por cianobactérias é o bicarbonato, sendo o pH ideal de cultivo aquele que assegure o maior deslocamento do equilíbrio químico no sentido de sua formação.

Por outro lado, quando a uréia é adicionada num meio alcalino, estudo em questão, é hidrolisada a amônia (DANESI *et al.*, 2002). A captação de amônia por *S. platensis* parece ser pH dependente. Em pH alcalino, a entrada de amônia na célula ocorre por um processo de simples difusão, direcionado pelo gradiente de pH e pela assimilação de amônia intracelular, realizada pela ação da enzima glutamina sintetase (BOUSSIBA, 1989). No entanto, deve-se lembrar também que a amônia, dependendo de sua concentração e do pH do meio, é tóxica para grande parte dos microrganismos (ABELIOVICH & AZOV, 1976), incluindo a *S. platensis* (BELKIN & BOUSSIBA, 1991). Estes autores verificaram que em pH 7,0 a *S. platensis* LB1475/a e a *Anabaena sp* não foram afetadas pela NH_3 . Porém, em pH 10,0, com concentrações de amônia de 10mM, somente 50% de atividade fotossintética permaneceu para a *S. platensis* LB1475/a, enquanto que para a *Anabaena sp* a atividade cessou.

Assim, conclui-se que o pH é uma variável muito importante a ser estudada, pois interfere na forma com que a reserva de carbono se apresenta, além de influenciar na velocidade de decomposição da uréia, bem como na apresentação da forma amoniacal no meio de cultivo (protonada ou não protonada).

A temperatura, é de extrema importância no crescimento microbiano, sendo relatado que a *Spirulina platensis* cresce bem na faixa de 24-32 °C (VONSHAK, 1997). Ademais, a disponibilidade da fonte de nitrogênio no cultivo de *Spirulina platensis* é função da temperatura, uma vez que a uréia em meio básico, que é o caso do meio de cultivo de *Spirulina*, sofre hidrólise e libera amônia no meio, que é volátil e pode se perder por evaporação. A temperatura teria então dupla influência no cultivo: se por um lado temperaturas maiores podem favorecer o crescimento microbiano, por outro podem aumentar a taxa de perda da amônia para o meio externo, podendo levar a uma carência de nitrogênio no meio, limitando o crescimento.

A produção desta microalga, é geralmente realizada em tanques abertos com iluminação artificial ou natural, onde se utiliza meio de cultura mineral, o qual contém os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento. Este tipo de tanque, apresenta custo inferior e processo de operação mais simples que reatores fechados e normalmente tubulares. A minimização da perda de substâncias voláteis, como a amônia que é importante ao desenvolvimento microbiano. Essas perdas podem ser determinantes para a viabilização econômica do uso de fontes de nitrogênio amoniacais, como os sais de amônio, e fontes que levem a sua formação no meio de cultivo, como é o caso da uréia.

Vários processos fermentativos têm sido desenvolvidos em função de diferentes aplicações. Um desses, que tem importância tanto em escala

industrial como em pesquisa, é o processo descontínuo alimentado, também conhecido como processo por batelada alimentada ou, simplesmente, fermentação descontínua alimentada.

Embora a utilização deste processo venha desde cerca de 1900 para regular o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, os primeiros a utilizarem o termo “cultura por processo descontínuo alimentado” a título de catalogação foram YOSHIDA, YAMANE, NAKAMOTO. (1973) para se referirem a uma fermentação descontínua continuamente alimentada com meio nutriente.

Basicamente, o processo descontínuo alimentado é definido como uma técnica 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 (DUNN & MOR, 1975). Em alguns casos, todos os nutrientes são gradualmente alimentados à dorna. Adicionalmente, outros autores estendem esse conceito para o acréscimo de aditivos, tais como precursores de produtos. A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo e a adição de mosto pode ser de forma contínua ou intermitente. Mudança de volume pode ou não ocorrer, dependendo da concentração de substrato e da taxa de evaporação do sistema (CARVALHO & SATO, 2001).

Deve-se salientar que parte do desenvolvimento do processo descontínuo alimentado tem se dado empiricamente em escala industrial, e essas informações, quase sempre determinantes da viabilidade da produção industrial, constituem segredo industrial e dificilmente são divulgadas (YAMANE & SHIMIZU, 1984).

Algumas das finalidades ao se empregar as fermentações descontínuas alimentadas são:

- Minimizar efeitos do controle do metabolismo celular

Procuram-se contornar fenômenos de controle do metabolismo celular que evitam a produção excessiva de produtos, de tal forma que estes sejam acumulados no meio em fermentação. YOON & KANG., (1994), trabalharam com *E. coli* recombinante na produção de somatotropina bovina e conseguiram evitar que esta fosse degradada por proteases, por meio da adição de extrato de levedura como fonte de nitrogênio orgânica, que evitou a indução (desrepressão) dos genes que controlam a formação de proteases.

➤ Adequar processo fermentativo a condições operacionais

No Brasil, o aumento da capacidade de produção de etanol das unidades industriais forçou o aumento da capacidade volumétrica e do número de fermentadores. Apesar de grande parte das instalações industriais anteriormente virem trabalhando com o processo descontínuo clássico, não foi mais possível mantê-lo. Houve o problema de intensa formação de espuma, que era menos intensa quando se operava com dornas de pequena capacidade volumétrica, sem levar em conta efeitos de inibição pelo substrato, que pode ocorrer quando a concentração de substrato atinge maiores valores no meio em fermentação (CARVALHO *et al.*, 2003). Surgiu, então a aplicação do processo descontínuo alimentado para contornar esses problemas. No caso também, de se ter um nutriente que seja instável nas condições de fermentação e que seu custo justifique sua utilização, ele pode ser usado, desde que seja adicionado aos poucos, ajustando-se a velocidade de adição à velocidade de consumo pelo microrganismo. Esta seria uma aplicação do processo descontínuo alimentado neste trabalho, devido à labilidade da uréia em pH alcalino.

➤ Minimizar a formação de produtos de metabolismo tóxicos

O controle de alimentação na dorna pode evitar a formação de produtos do metabolismo tóxicos para a célula que se está cultivando, como ácidos por exemplo (YEE & BLANCH, 1993).

- Evitar inibição por substrato ou precursores

O controle da vazão de alimentação permite que se evite o trabalho em condições inibitórias, melhorando a produtividade e/ou rendimento desses processos fermentativos (CARVALHO & SATO, 2001). Este caso, também encontra aplicação neste trabalho, evitando a toxicidade da amônia decorrente da hidrólise da uréia nas condições estudadas.

Assim, a fermentação descontínua alimentada apresenta-se como um processo fermentativo de extrema importância na área de tecnologia de fermentações.

A aplicação do processo descontínuo alimentado foi utilizado na produção de leveduras (LEE & KIM, 2001), antibióticos (CRUZ *et al.*, 1999), aminoácidos (SASSI *et al.*, 1998), etanol (CARVALHO *et al.*, 2003), enzimas (FECHEGARAY *et al.*, 2000), e até mesmo em cultivo de células animais (XIE & WANG, 1994).

Finalmente, a utilização do processo descontínuo alimentado para o cultivo de *Spirulina platensis* permitiu a obtenção de resultados bastante satisfatórios com o uso de uréia como fonte de nitrogênio (SASSANO, 1999; RANGEL, 2000, DANESI, 2001).

IV. 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.

IV.1. Microrganismo

O microrganismo *Spirulina platensis*, foi fornecida pelo Laboratório de Microbiologia Zootécnica da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - Campus de Pirassununga.

IV.2. Meio de cultivo

Nos experimentos foram utilizados dois tipos de meio. O meio padrão para o cultivo de *Spirulina platensis* (PAOLETTI, PUSHPARAJ, TOMASELLI, 1975) apresentado a seguir no item IV.2.1, com KNO_3 como fonte de nitrogênio. Esse foi utilizado para o preparo do inóculo e na realização do cultivo padrão. O outro denominado meio modificado (item IV.2.2), onde utilizou-se uréia como fonte de nitrogênio.

IV.2.1. Meio padrão para cultivo de *S. platensis*

O meio mineral padrão utilizado foi o de Paoletti (PAOLETTI, PUSHPARAJ, TOMASELLI, 1975), cuja composição é a seguinte:

Componentes	g.L ⁻¹
NaCl	0,92
Na ₂ SO ₄	1,88
K ₂ HPO ₄	0,50
Na ₂ CO ₃	8,89
NaHCO ₃	15,15
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05
KNO ₃	2,57
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25
Solução de Fe-EDTA*	1mL
Solução de microelementos**	1mL

*Solução de Fe-EDTA (g.L⁻¹): EDTA-Na₂, 29,8; FeSO₄.7H₂O, 24,9. qsp. 1000 mL de H₂O destilada.

**Solução de microelementos (mg.L⁻¹): SnCl₂.2H₂O, 304; MnCl₂.4H₂O, 173; CoCl₂.6H₂O, 194; SeCl₂.2H₂O, 146; BaCl₂.2H₂O, 2846; LiCl, 293; CuSO₄.5H₂O, 186; NiSO₄.5H₂O, 717; Na₂MoO₄.2H₂O, 121. qsp. 1000 mL de H₂O destilada.

IV.2.2. Meio modificado

Foi o meio de Paoletti (PAOLETTI, PUSHPARAJ, TOMASELLI, 1975), com substituição do nitrato de potássio por uréia. A massa total adicionada foi uma função da vazão mássica (item IV.6).

IV.3. Preparo do inóculo

A manutenção do microrganismo foi feita no meio líquido de PAOLETTI, PUSHPARAJ, TOMASELLI. (1975) com repiques periódicos utilizando frascos de Erlenmeyer de 500,0mL com tampões de algodão, previamente descontaminados em estufa à 105 °C durante 2 horas. Adicionou-se 10,0 mL de inóculo e completou-se o volume com o meio de cultura esterilizado até atingir 200,0 mL. O cultivo foi reralizado em “shaker”, a 30 °C e 6,0 klux.

O crescimento celular foi acompanhado, utilizando para o inóculo uma suspensão de *S. platensis* após de 6 a 8 dias de cultivo (PELIZER *et al.*, 2003), em crescimento exponencial. Essa suspensão foi centrifugada e lavada duas vezes com solução fisiológica para retirada do KNO₃ e ressuspensa em meio de cultivo isento de KNO₃ para os ensaios com uréia como fonte de nitrogênio (item IV.2.2). Esta suspensão foi o inóculo para o cultivo em minitanques, onde foram realizados os estudos da adição de uréia como fonte de nitrogênio, em diferentes valores de pH e temperatura (item IV.9). No caso dos ensaios com KNO₃ o sedimento da centrifugação foi ressuspenso em meio padrão (item IV.2.1) A concentração celular inicial (em massa seca) foi fixada em 50,0 mg/L (PELIZER *et al.*, 2003).

IV.4. Dispositivo para cultura

Dentre os inúmeros sistemas de algacultura descritos na literatura, adotamos os minitanques de forma alongada (BELAY, 1997). Estes tanques foram construídos de lâminas de PVC (cloreto de polivinila) de cor branca, moldadas de forma a propiciar um circuito hídrico de forma geométrica elíptica. A movimentação da cultura foi executada por pás rotativas na

freqüência de 23 rotações por minuto. Na Figura 1 pode-se observar a foto dos minitanques.

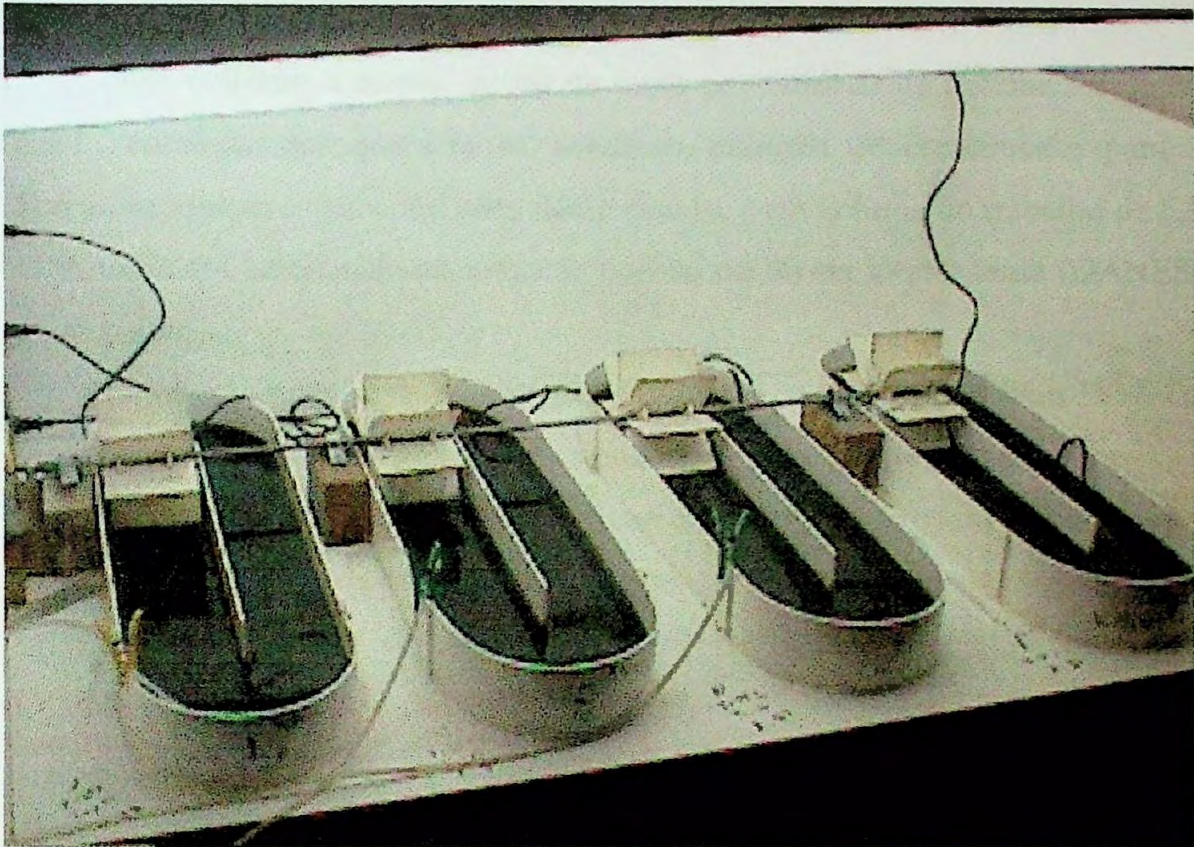


Figura 1- Foto dos minitanques

IV.5. Descrição de um experimento típico

As condições experimentais foram fixadas: concentração de inoculo para 50mg/L (em massa seca); intensidade luminosa: 6,0 klux; freqüência de rotação das pás rotativas de 18 rpm; geometria dos minitanques; volume de líquido nos minitanques de 5,0 L.

A suspensão de *Spirulina* (inóculo - item IV.3) foi adicionada ao minitanque e o volume de meio completado até 5,0 L, ou utilizando o meio padrão de Paoletti (item IV.2.1) nos ensaios com KNO_3 como fonte de

nitrogênio, ou utilizando o meio de cultivo isento de KNO_3 (item IV.2.2), nos ensaios com uréia. Neste caso, as adições de uréia obedecem ao indicado na equação 1 (item IV. 6).

Nos cultivos, a massa inicial de uréia por unidade de volume foi de 80 mg/L, condição em que não se verificou inibição de crescimento para a *Spirulina platensis* nas condições deste estudo, com volume de trabalho de 5,0 L. A uréia foi adicionada no meio de cultivo de forma intermitente (DANESI *et. al.*, 2002).

A temperatura, teve seus níveis fixados de acordo com o item IV.9, foi mantida por meio de resistências elétricas controladas por termostatos.

O pH foi mantido em níveis fixos ao longo do processo nos ensaios apresentados na tabela 3 (item IV.9.1) com adição contínua de HCl 0,0125 a 0,1N. Foram também realizados experimentos sem controle de pH (item IV.9.2).

IV.6. Processo de cultivo

Para alimentação da uréia, o processo utilizado foi o descontínuo alimentado com vazão de alimentação constante, de acordo com a Equação 1:

$$M_u = M_o + K \cdot t_a \quad (\text{Equação 1})$$

Onde “ M_u ” representa a massa de uréia adicionada até instante t e “ M_o ” representa sua massa inicial. O tempo total de alimentação (t_a) foi de 9 dias. Assim, a massa de uréia total a ser adicionada é uma função da vazão mássica, K (mg/dia), de acordo com a equação 1. Os valores de K estudados são apresentados na matriz de ensaios (Tabela 3), selecionou-se um amplo intervalo de taxa de fluxo de adição de fonte de nitrogênio, pois desejava-se avaliar o efeito da temperatura e pH nessas condições. Isto se tornou possível pelo planejamento experimental escolhido e pela avaliação por metodologia

de superfície de resposta. Essas avaliações estatísticas permitem a verificação simultânea do efeito de diversas variáveis, avaliando suas interações em relação às variáveis dependentes.

Nos cultivos com KNO_3 como fonte de nitrogênio, utilizou-se o processo descontínuo, onde todos os nutrientes foram adicionados no instante inicial, incluindo a fonte de nitrogênio.

IV.7. Técnicas Analíticas

Os experimentos foram acompanhados por técnicas analíticas descritas a seguir:

IV.7.1. Acompanhamento do cultivo

IV.7.1.1. Determinação da concentração celular

O acompanhamento do crescimento microbiano no decorrer dos cultivos foi determinado por turbidimetria, através de uma curva de calibração obtida a 560nm (LEDUY & THERIEN, 1977), apresentada na Figura 2.

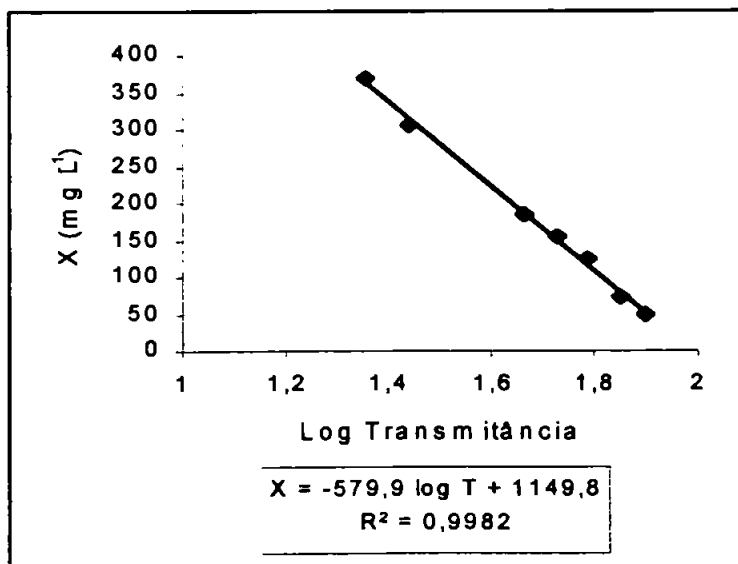


Figura 2- Curva de calibração para determinação da concentração da *Spirulina platensis*.

IV.7.1.2. Determinação da concentração de amônia

Nos cultivos utilizando uréia como fonte de nitrogênio foram realizados acompanhamentos periódicos dos níveis de amônia no processo com o objetivo de observar e prevenir possíveis níveis tóxicos para o microrganismo. A concentração de amônia foi quantificada de 2 em 2 dias pelo método do fenol hipoclorito (SOLORZANO, 1969), no meio isento de células, separado por filtração à vácuo, utilizando membrana com diâmetro dos poros igual a 8 μm . Na Figura 3 é apresentada uma curva de calibração utilizada na determinação de amônia. Para cada solução reagente preparada era feita uma nova curva.

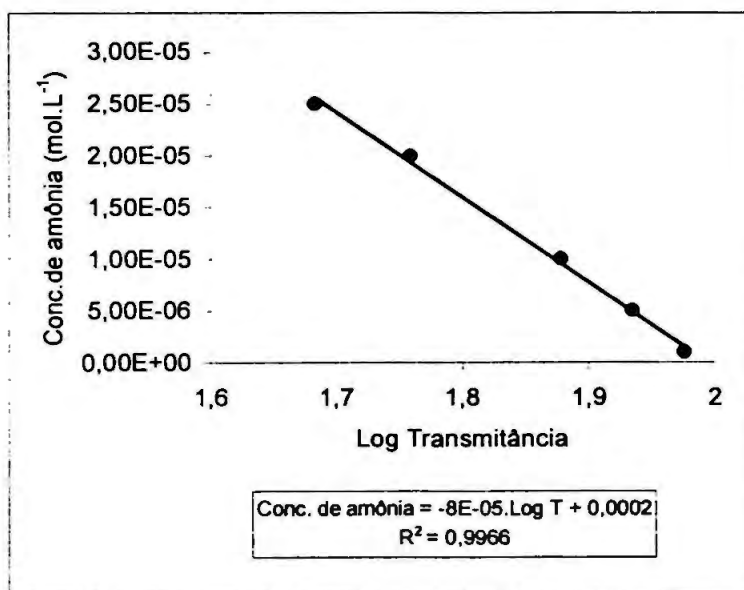


Figura 3- Curva de calibração para determinação de amônia no meio de cultivo de *Spirulina platensis*.

IV.7.1.3. Determinação do pH.

O pH dos cultivos foi determinado num potenciômetro ORION, modelo 710^A.

IV.7.1.4. Determinação de carbonato total

O acompanhamento da concentração de fonte de carbono (carbonato e bicarbonato de sódio) no meio de cultura foi realizado de 2 em 2 dias, através de titulometria. Inicialmente, adicionou-se hidróxido de sódio à amostra a ser titulada para a conversão de todo o bicarbonato em carbonato, por deslocamento de equilíbrio. Titulou-se o carbonato total com ácido clorídrico, sendo observados dois intervalos de viragem (ALEXEYEV, s.d.).

IV.7.2. Avaliação da biomassa obtida

Ao final do cultivo, todo o volume de meio de cultura contendo a *Spirulina platensis* foi centrifugado, com três lavagens sucessivas com água destilada para retirada do sal adsorvido às células, e, após secagem em estufa com ar circulante a 55 °C por 12 horas (PELIZER *et al.*, 1999), foi avaliado o teor de proteína e de lipídio da biomassa.

IV.7.2.1. Proteínas totais

O teor protéico total na biomassa seca foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl, que caracteriza-se pela destruição da matéria orgânica com ácido sulfúrico concentrado, em presença de um catalisador e aquecimento, com posterior destilação e titulação do nitrogênio proveniente da amostra em sal de sulfato de amônio em solução. Na segunda etapa após adição de hidróxido de sódio para alcalinização do meio, destilou-se a solução com o

objetivo de transferir a amônia para uma solução saturada de ácido bórico, titulou-se, então com solução de HCl 0,02N fatorada para se quantificar a concentração de nitrogênio FERRAZ (1985). Foi utilizado o fator de 6,25 para a conversão em porcentagem de proteínas, a partir dos teores de nitrogênio total (OFFICIAL METHODS OF FOOD ANALYSIS, 1984).

IV.7.2.2. Lipídeos totais

A biomassa seca de *Spirulina* teve sua fração lipídica extraída em extrator contínuo de Soxhlet com refluxo de hexano, por 4 horas. Seguido da retirada do solvente em extrator rotativo à vácuo. O resíduo foi então, submetido a nova extração, com solvente mais polar, no caso a mistura clorofórmio-metanol (2:1 v/v) por mais 4 horas. Novamente o solvente foi levado a secar em extrator rotativo a vácuo. O material obtido reúne ácidos graxos, triglicerídeos, fosfolipídeos, carotenóides, pigmentos fotosintéticos, esteróides e hidrocarbonetos, sendo por tanto denominada fração lipídica total (FERRAZ, AQUARONE, KRAUTER, 1986).

IV.8. Fórmulas e métodos utilizados nos cálculos dos parâmetros cinéticos

Produtividade em células:

$$P_X = (X_m - X_i) / T_c \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: P_X = produtividade em células ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)

X_m = concentração celular máxima (mg.L^{-1})

X_i = concentração celular inicial (mg.L^{-1})

T_c = tempo de cultivo, relativo à concentração celular máxima (dias)

Fator de conversão de nitrogênio em células:

$$Y_{X/N} = (X_m - X_i) \cdot V / N_t \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

$Y_{X/N}$ = Fator de conversão de nitrogênio em células ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

X_m = concentração celular máxima obtida ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

X_i = concentração celular inicial ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

V = volume do meio (L)

N_t = quantidade total de nitrogênio adicionado (mg)

Velocidade específica de crescimento

$$\mu = 1/X (dX/dt) \quad (\text{Equação 4})$$

Onde :

X é o correspondente valor da concentração celular e dX/dt representa a velocidade de crescimento microbiano, calculada pelo método de LEDUY & ZAJIC (1973), através de programa computacional. O máximo valor de μ encontrado no decorrer do cultivo é a velocidade máxima específica de crescimento.

IV.9. Experimentos realizados

IV.9.1. Planejamento Experimental

O estudo da influência do pH, da temperatura e da vazão mássica de uréia no crescimento de *Spirulina platensis* foi realizado através de um planejamento estatístico do tipo composto central rotacional ortogonal (BOX,

HUNTER, HUNTER, 1978), com três variáveis independentes, em 5 níveis, com 5 repetições do ponto central, resultando num total de 19 experimentos (Tabela 3), que apresenta as variáveis com seus níveis tanto em valores codificados como reais. Os valores codificados foram obtidos a partir da equação:

$$V_c = V_r - P_c / i \quad (\text{Equação 5})$$

Onde:

V_c = valor codificado da variável

V_r = valor real da variável

P_c = valor real referente ao ponto central

i = intervalo entre os valores reais correspondentes aos níveis codificados “zero” e “+1” da variável independente considerada.

Os valores das variáveis em estudo: pH e temperatura apresentados na Tabela 3 foram mantidos constantes no decorrer do cultivo, como comentado anteriormente (item IV.5).

Tabela 3. Matriz de ensaio do planejamento experimental das variáveis pH , temperatura (T) e vazão mássica de uréia (K).

ENSAIO	VALORES CODIFICADOS			VALORES REAIS		
	X ₁	X ₂	X ₃	pH	T(°C)	K(mg/dia)
A	-1	-1	-1	9,0	26,0	90,0
B	1	-1	-1	10,0	26,0	90,0
C	-1	1	-1	9,0	34,0	90,0
D	1	1	-1	10,0	34,0	90,0
E	-1	-1	1	9,0	26,0	190,0
F	1	-1	1	10,0	26,0	190,0
G	-1	1	1	9,0	34,0	190,0
H	1	1	1	10,0	34,0	190,0
I	-1,687	0	0	8,7	30,0	140,0
J	1,687	0	0	10,3	30,0	140,0
K	0	-1,687	0	9,5	23,3	140,0
L	0	1,687	0	9,5	36,8	140,0
M	0	0	-1,687	9,5	30,0	55,7
N	0	0	1,687	9,5	30,0	224,4
O	0	0	0	9,5	30,0	140,0
P	0	0	0	9,5	30,0	140,0
Q	0	0	0	9,5	30,0	140,0
R	0	0	0	9,5	30,0	140,0
S	0	0	0	9,5	30,0	140,0

IV.9.2. Experimentos adicionais

Foram realizados ensaios controle, onde o pH não foi controlado durante o cultivo, quais sejam: experimento T e U, que tiveram KNO_3 como fonte de nitrogênio; experimento V, com uréia como fonte de nitrogênio, com vazão mássica de alimentação (K) de 140 mg. d^{-1} . em todos os experimentos adicionais o pH inicial foi de 9,5 e a temperatura foi de 30°C .

V. RESULTADOS

Os resultados referentes aos acompanhamentos dos ensaios são apresentados nas Tabelas 4 a 25. Foram expostas para cada experimento depois da respectiva tabela as correspondentes figuras. Na Tabela 26 são apresentados os conteúdos de proteínas e lipídeos dos ensaios. Na Tabela 27 são apresentados os parâmetros cinéticos, calculados de acordo com o apresentado em matérias e métodos (item IV.8).

ENSAIO A

Tabela 4- Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio A (pH= 9,0; T=26°C; K=90mg.d⁻¹).

Tempo (dias)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato total (g.L ⁻¹)	Amônia total (molL ⁻¹)
0	50,00	9,00	26,50	-
1	100,36	9,20	-	-
2	148,87	9,16	21,73	4,78823E-05
3	218,82	9,10	-	-
4	264,77	9,00	16,43	2,41355E-05
5	296,42	9,19	-	-
6	333,40	8,80	10,60	2,69767E-05
7	395,84	9,20	-	-
8	444,34	9,20	4,24	3,80252E-05
9	492,85	9,00	-	-
10	535,84	9,08	0,53	3,29281E-05

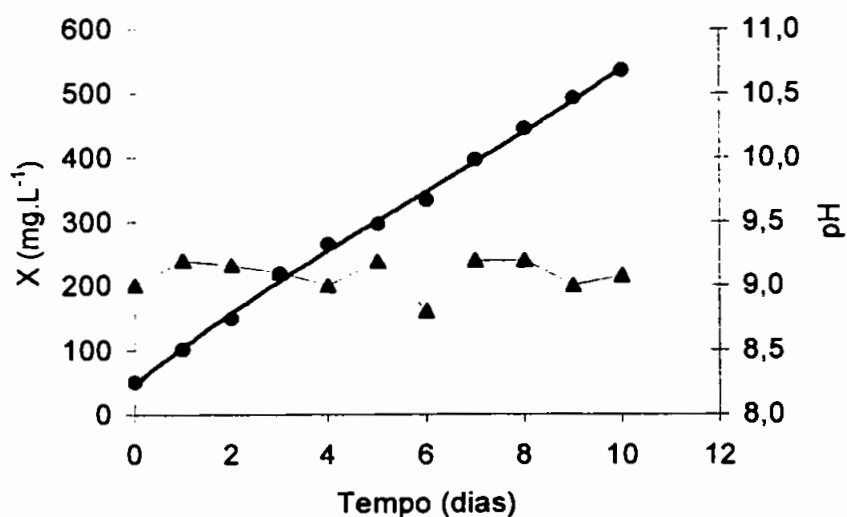


Figura 4- Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio A.

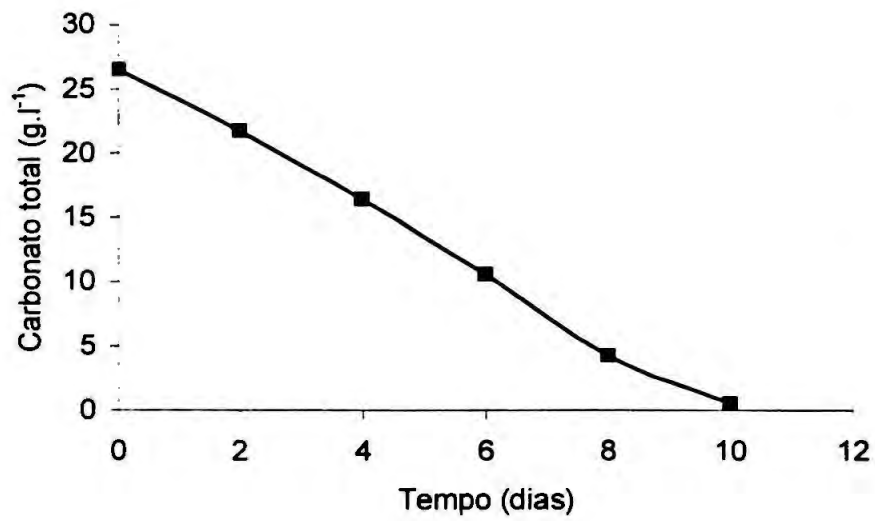


Figura 5- Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio A.

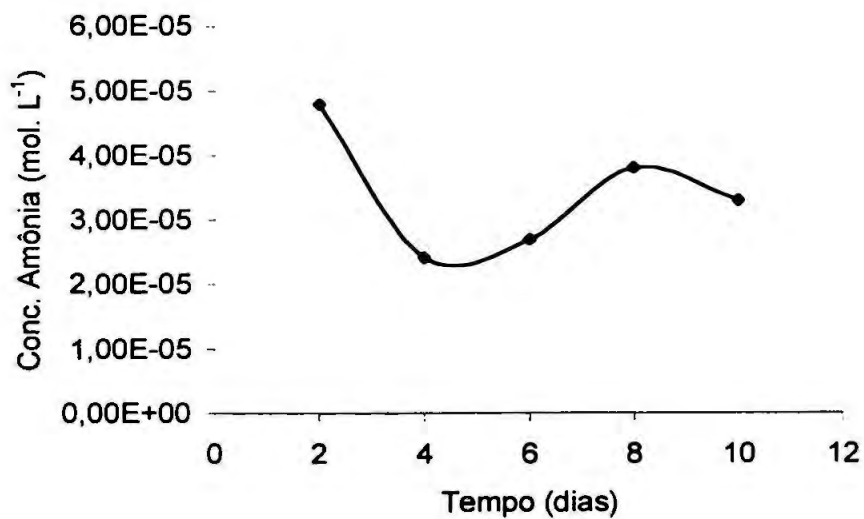


Figura 6- Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio A.

ENSAIO B

Tabela 5- Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio B (pH= 10; T=26°C; K=90mg.d⁻¹).

Tempo (dias)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato total (g.L ⁻¹)	Amônia total (molL ⁻¹)
0	50,00	10,00	26,50	-
1	104,70	9,93	-	-
2	151,25	9,97	30,21	1,76E-04
3	216,95	9,90	-	-
4	269,22	10,00	24,38	5,63E-05
5	304,61	10,12	-	-
6	368,44	9,86	23,32	5,80E-05
7	435,35	9,84	-	-
8	459,52	10,20	19,45	1,10E-04
9	493,50	9,87	-	-
10	540,25	9,95	19,87	8,79E-05

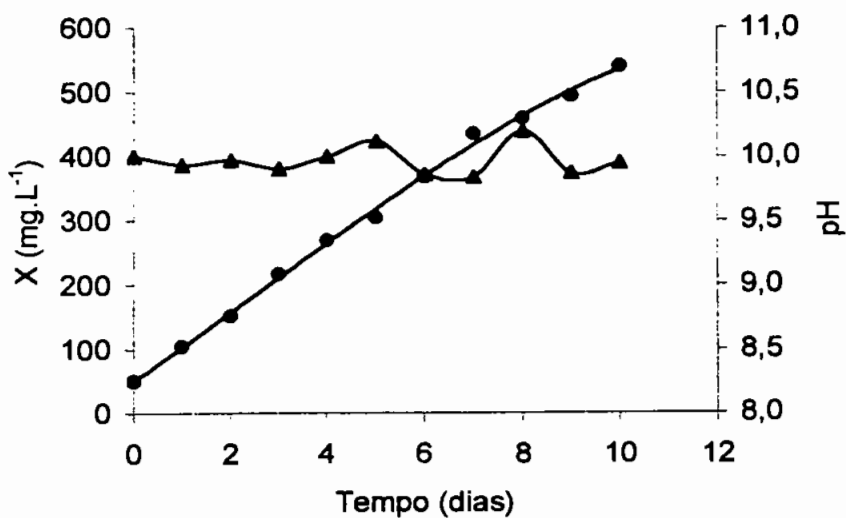


Figura 7- Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio B.

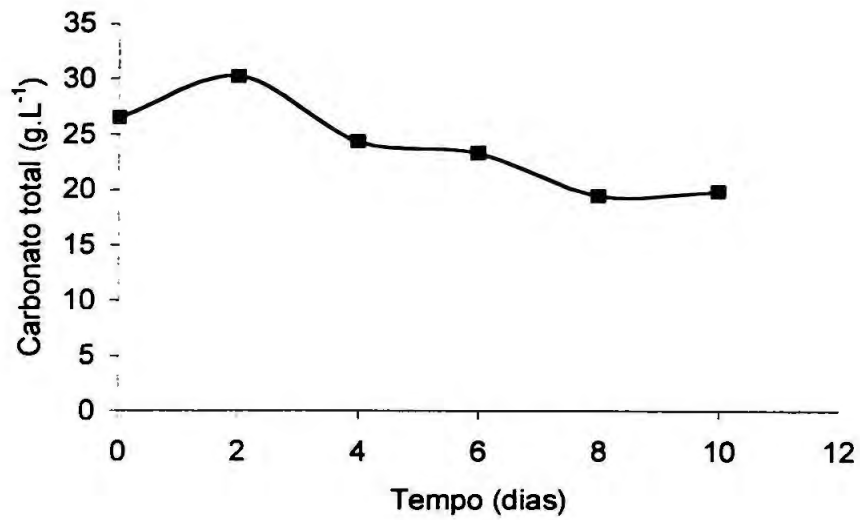


Figura 8- Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio B.

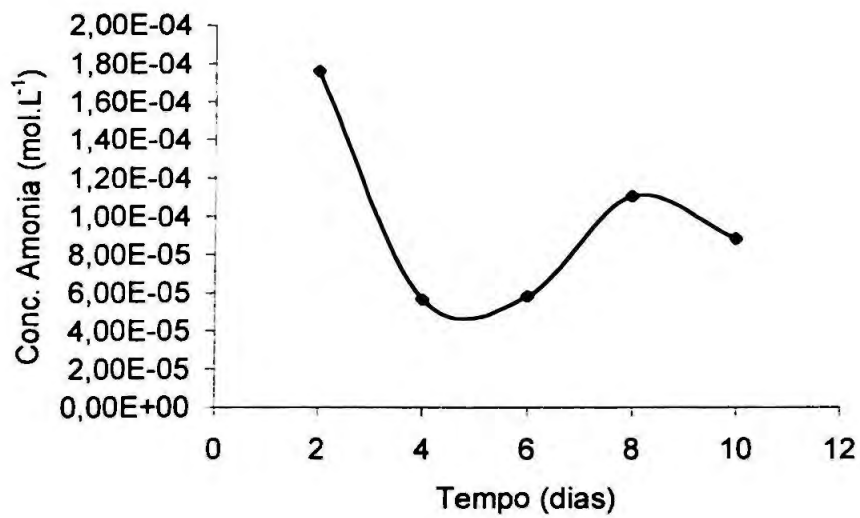


Figura 9- Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio B.

ENSAIO C

Tabela 6- Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio C (pH= 9,0; T=34°C; K=90mg.d⁻¹).

Tempo (dias)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	50,00	9,00	26,50	-
1	140,49	9,15	-	-
2	191,04	9,08	23,12	2,31E-05
3	254,33	9,20	-	-
4	304,42	8,80	15,16	2,94E-05
5	354,84	9,23	-	-
6	410,86	8,76	11,23	3,35E-05
7	448,05	9,03	-	-
8	498,05	9,20	7,42	4,73E-05
9	537,04	9,00	-	-
10	530,67	9,20	2,13	9,81E-05

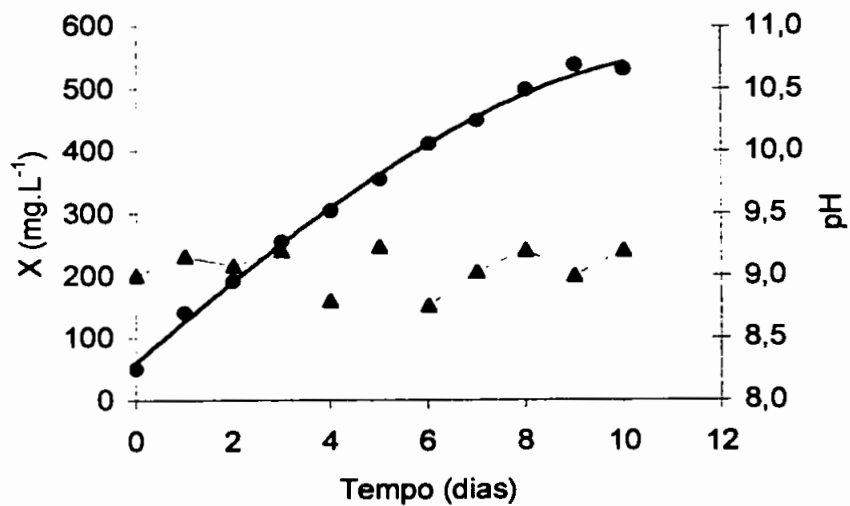


Figura 10- Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio C.

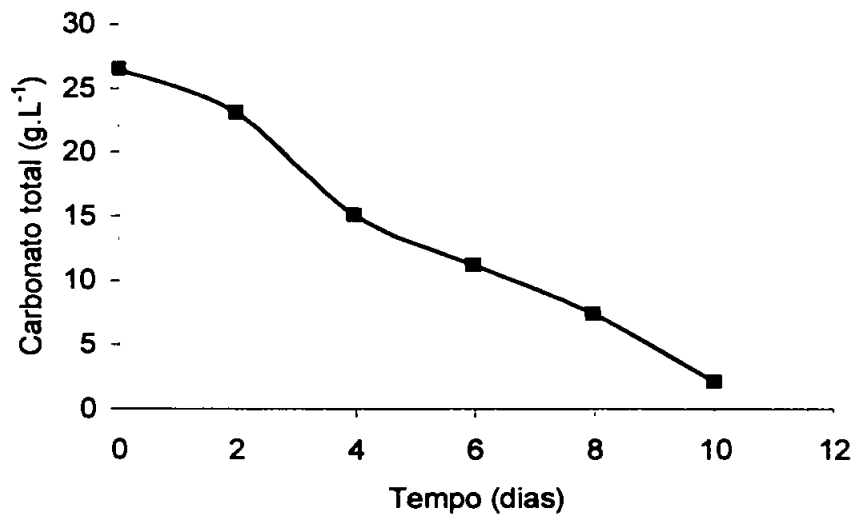


Figura 11- Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio C.

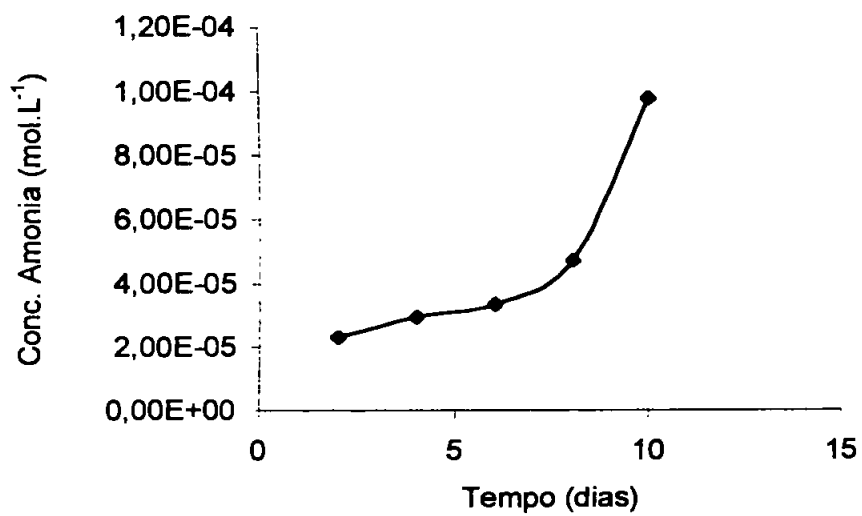


Figura 12- Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio C.

ENSAIO D

Tabela 7- Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio D (pH= 10; T=34°C; K=90mg.d⁻¹).

Tempo (dias)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	50,00	10,00	26,50	-
1	111,13	9,97	-	-
2	164,50	9,87	27,56	1,76E-04
3	234,95	10,19	-	-
4	293,04	10,15	25,44	5,66E-05
5	333,40	9,90	-	-
6	390,53	9,90	31,27	1,10E-04
7	401,15	9,90	-	-
8	482,99	9,90	21,73	1,17E-04
9	524,34	9,90	-	-
10	573,11	10,00	21,20	1,18E-04

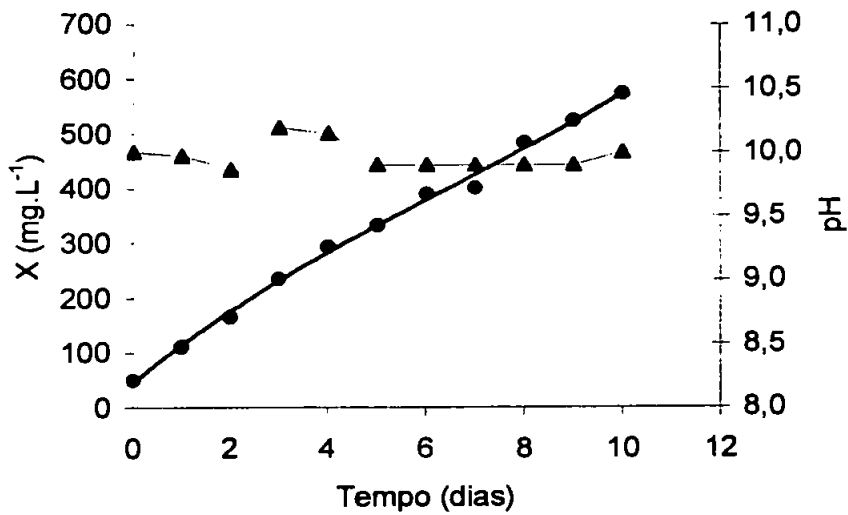


Figura 13- Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio D.

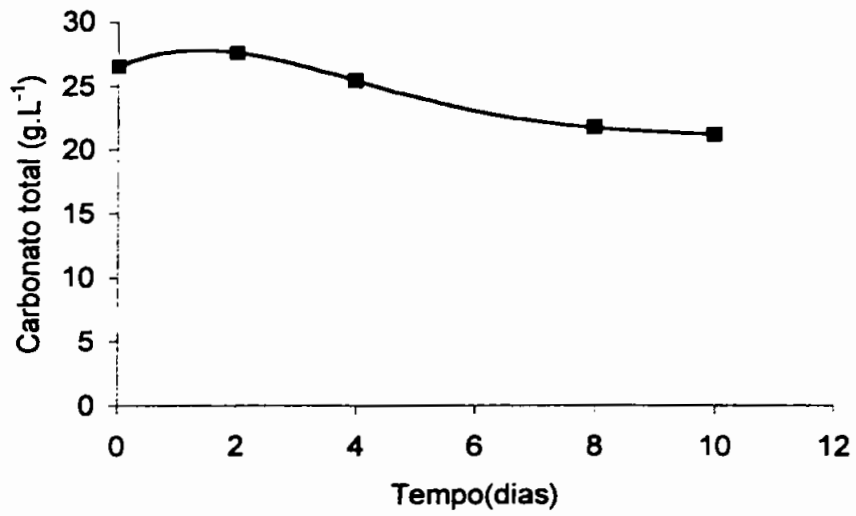


Figura 14- Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio D.

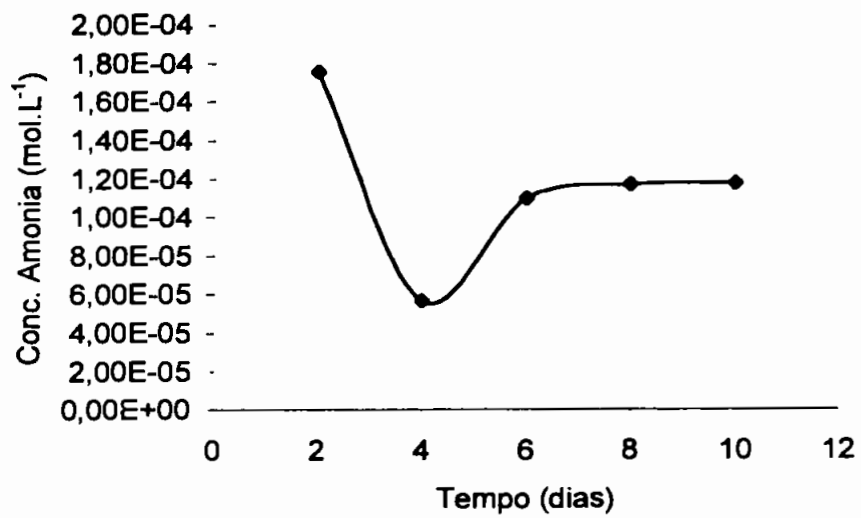


Figura 15- Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio D.

ENSAIO E

Tabela 8- Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio E (pH= 9; T=26°C; K=190mg.d⁻¹).

Tempo (dias)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato total (g.L ⁻¹)	Amônia total (molL ⁻¹)
0	50,00	9,00	26,50	-
1	103,51	9,30	-	-
2	146,67	9,20	19,61	1,80E-04
3	226,30	9,10	-	-
4	292,35	9,09	18,02	1,24E-04
5	371,18	9,13	-	-
6	423,54	9,23	15,37	2,59E-05
7	493,66	8,87	-	-
8	549,56	9,20	8,75	1,42E-04
9	628,46	8,92	-	-
10	664,00	9,04	6,36	1,69E-05

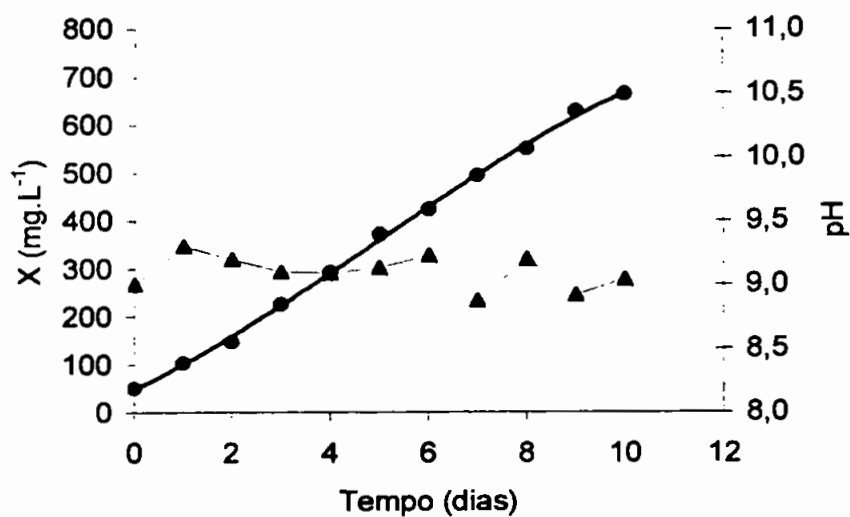


Figura 16- Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio E.

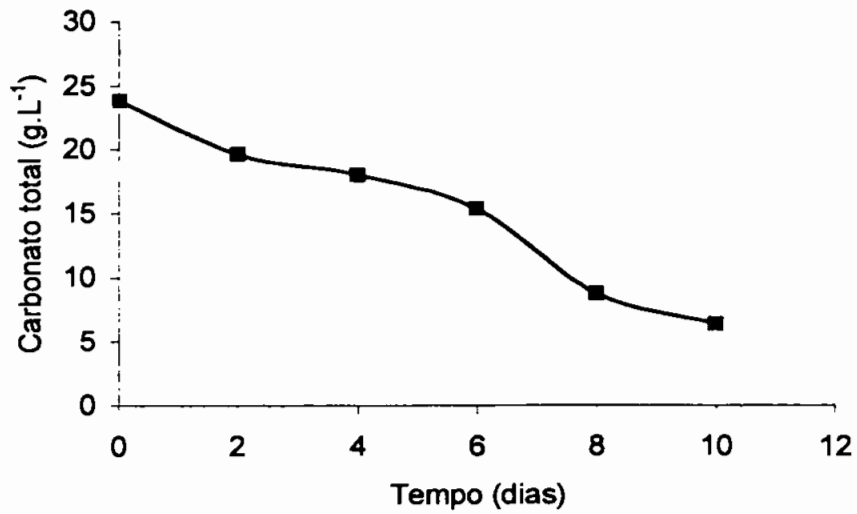


Figura 17- Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio E.

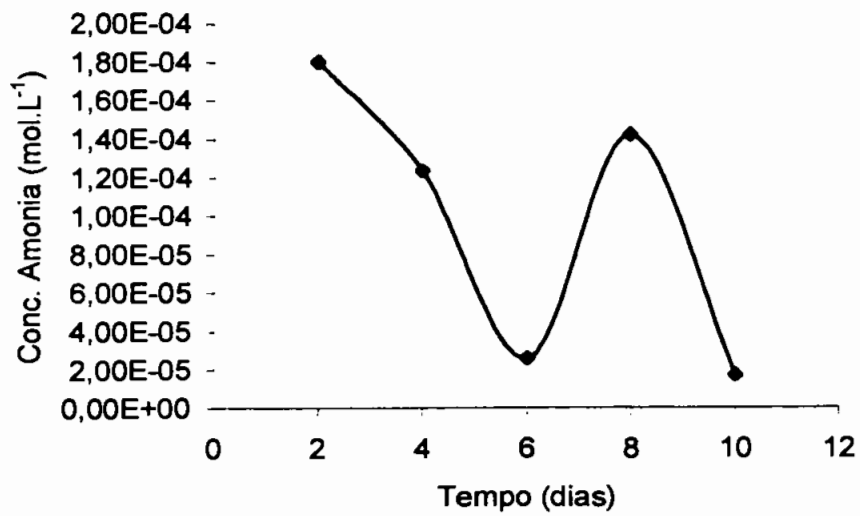


Figura 18- Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio E.

ENSAIO F

Tabela 9- Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio F (pH= 10; T=26°C; K=190mg.d⁻¹).

Tempo (dias)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	50,00	10,00	26,50	-
1	113,59	9,98	-	-
2	164,62	9,96	27,03	1,59E-04
3	241,02	9,91	-	-
4	305,10	10,20	25,60	5,75E-05
5	382,07	9,90	-	-
6	423,51	10,14	24,65	3,45E-05
7	496,84	9,89	-	-
8	561,05	9,88	19,61	1,33E-04
9	625,27	9,90	-	-
10	678,05	9,95	20,67	2,74E-05

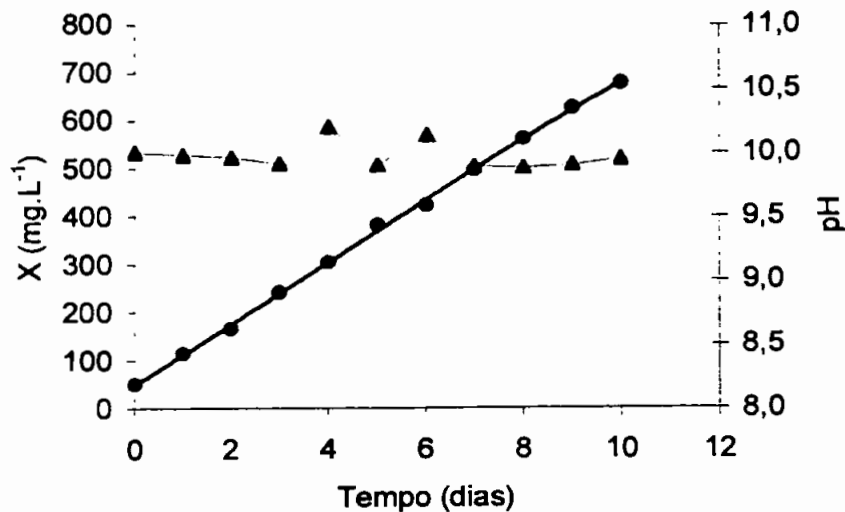


Figura 19- Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio F.

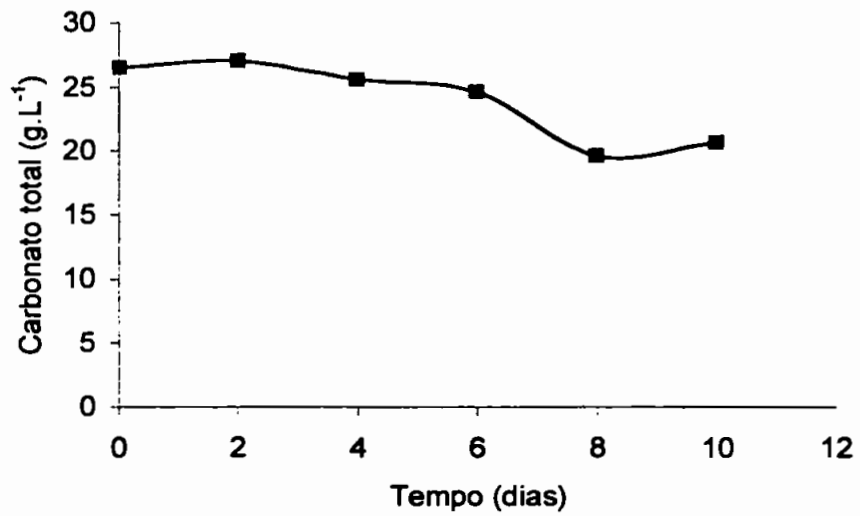


Figura 20- Concentração de carbato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio F.

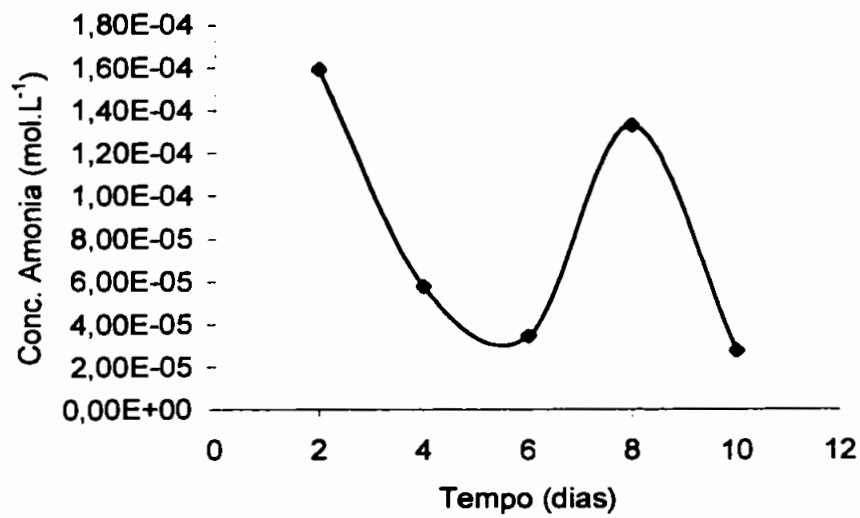


Figura 21- Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio F.

ENSAIO G

Tabela 10- Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio G (pH= 9; T=34°C; K=190mg.d⁻¹).

Tempo (dias)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	50,00	9,00	26,50	-
1	111,95	8,93	-	-
2	175,52	9,15	20,14	4,19E-05
3	286,53	9,40	-	-
4	313,71	9,12	16,17	2,73E-05
5	319,78	8,94	-	-
6	416,10	9,19	7,42	5,37E-05
7	446,50	9,00	-	-
8	496,78	9,15	20,14	1,14E-04
9	532,30	9,02	-	-
10	561,94	9,20	0,53	1,72E-04

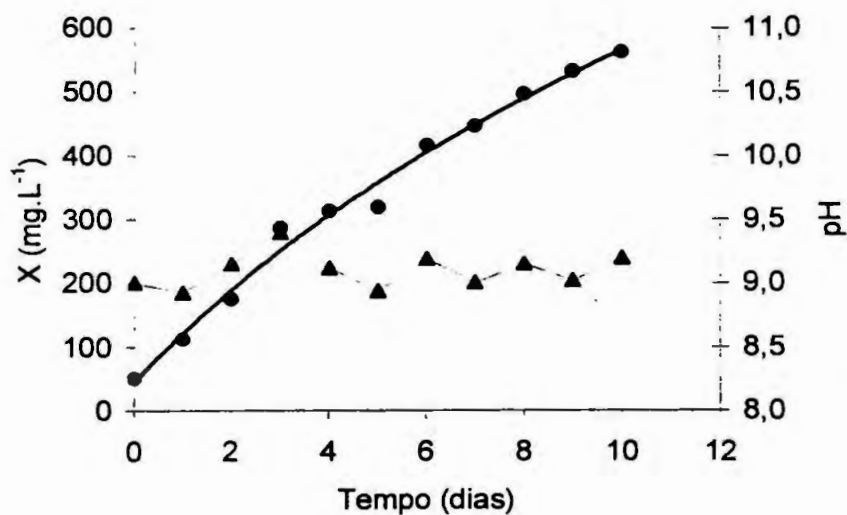


Figura 22- Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio G.

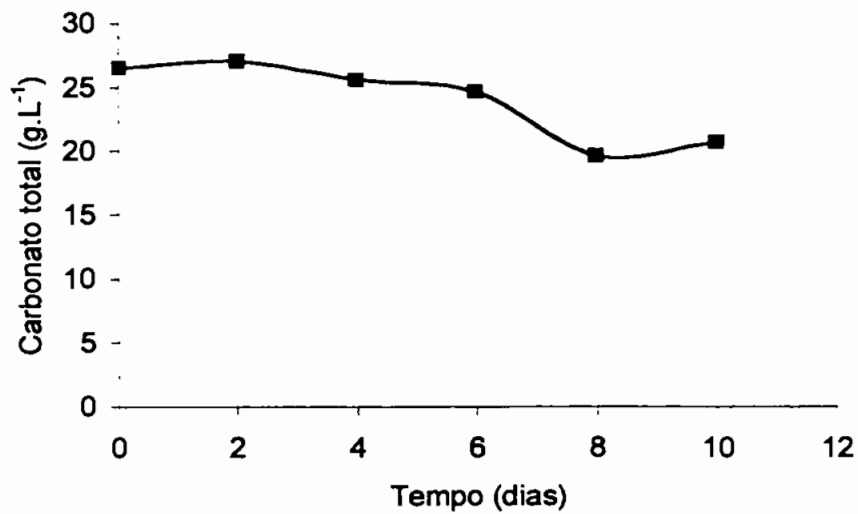


Figura 23- Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio G.

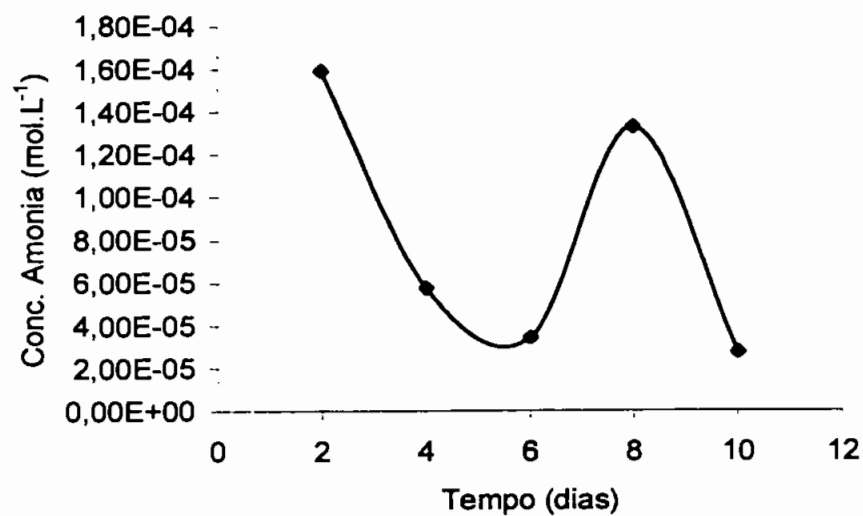


Figura 24- Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio G.

ENSAIO H

Tabela 11- Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio H (pH= 10; T=34°C; K=190mg.d⁻¹).

Tempo (dias)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	50,00	10,00	26,50	-
1	142,79	9,98	-	-
2	201,32	10,06	22,79	5,63E-05
3	274,55	9,97	-	-
4	339,18	10,18	25,28	1,90E-05
5	384,32	9,89	-	-
6	471,23	10,00	20,14	3,46E-05
7	524,34	9,90	-	-
8	576,47	9,90	20,67	2,90E-05
9	616,30	9,80	-	-
10	692,95	9,98	18,71	5,36E-05

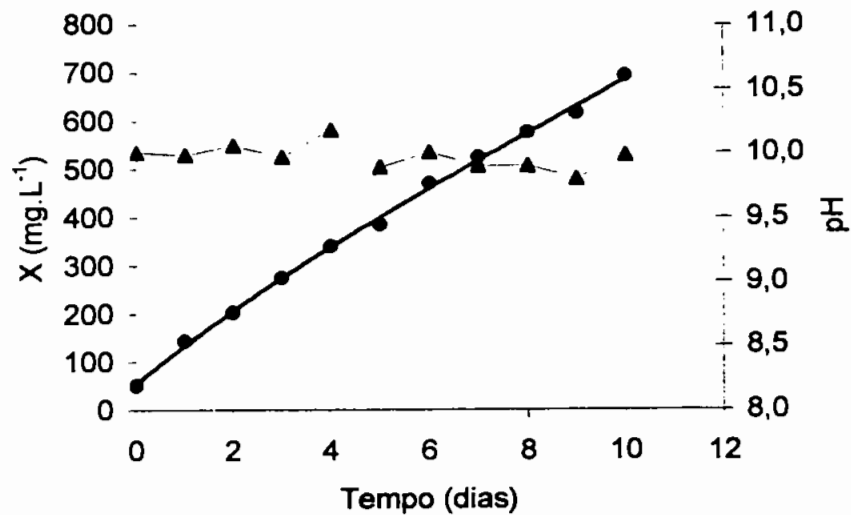


Figura 25- Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio

H.

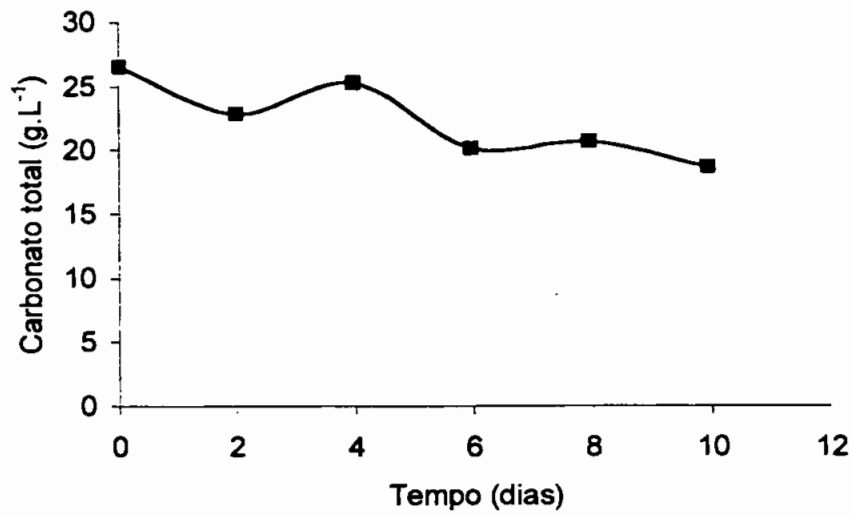


Figura 26- Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio H.

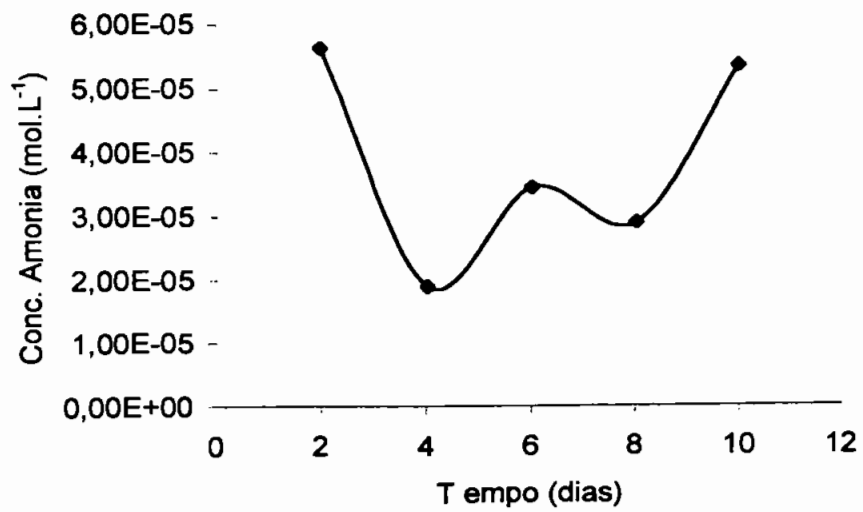


Figura 27- Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio H.

ENSAIO I

Tabela 12- Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio I (pH= 8,66; T=30°C; K=140mg.d⁻¹).

Tempo (dias)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	50,00	8,70	26,50	-
1	128,86	8,90	-	-
2	182,78	8,65	19,13	2,05E-05
3	218,20	8,86	-	-
4	275,52	8,80	13,56	2,66E-05
5	340,20	8,60	-	-
6	404,97	8,74	7,42	3,79E-05
7	446,62	8,92	-	-
8	478,54	8,75	3,24	4,10E-05
9	538,64	8,87	-	-
10	556,50	8,72	0,31	8,96E-05

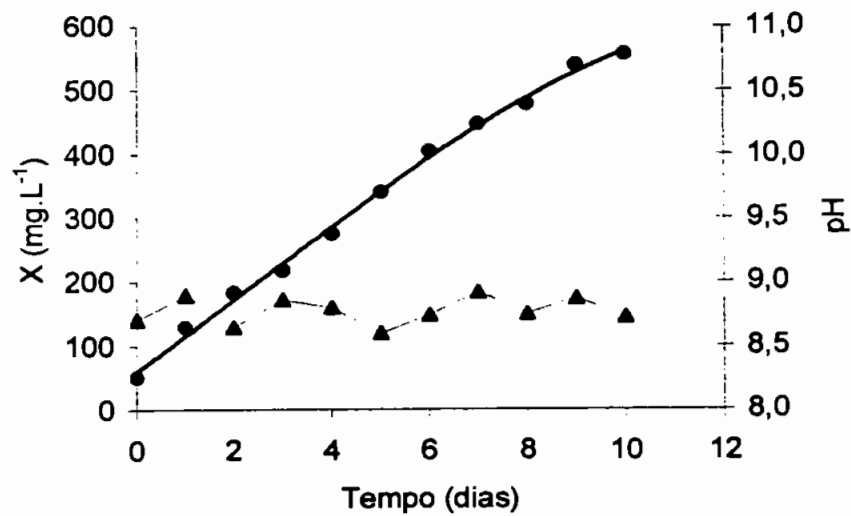


Figura 28- Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio

I.

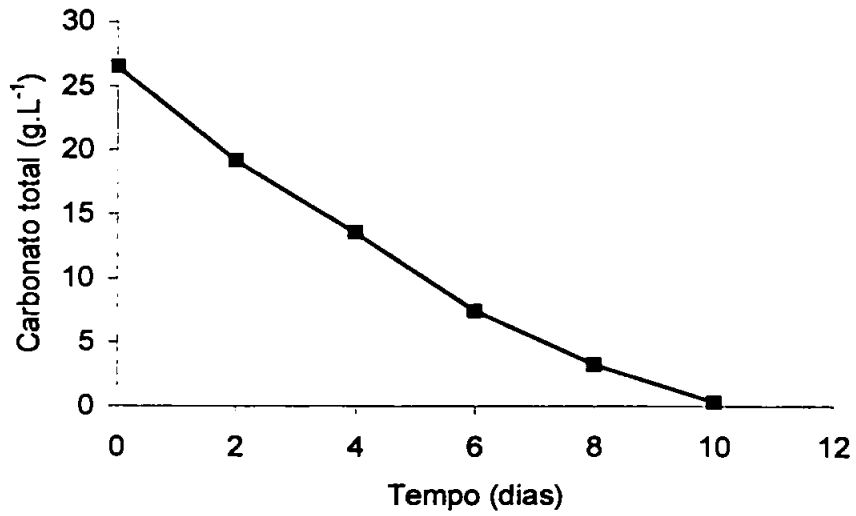


Figura 29- Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio I.

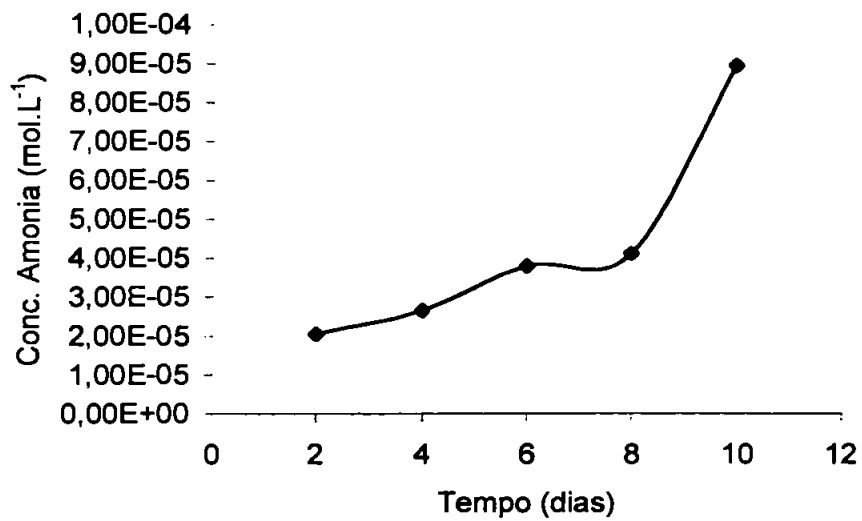


Figura 30- Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio I.

ENSAIO J

Tabela 13- Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio J (pH= 10,34; T=30°C; K=140mg.d⁻¹).

Tempo (dias)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	50,00	10,30	26,50	-
1	97,65	10,12	-	-
2	104,30	10,20	27,03	2,06E-04
3	131,94	10,30	-	-
4	142,53	10,10	25,31	1,91E-04
5	171,09	9,99	-	-
6	181,11	10,00	24,41	1,98E-04
7	208,15	10,35	-	-
8	196,25	10,15	23,14	1,91E-04
9	214,83	10,20	-	-
10	226,36	10,30	21,95	1,98E-04

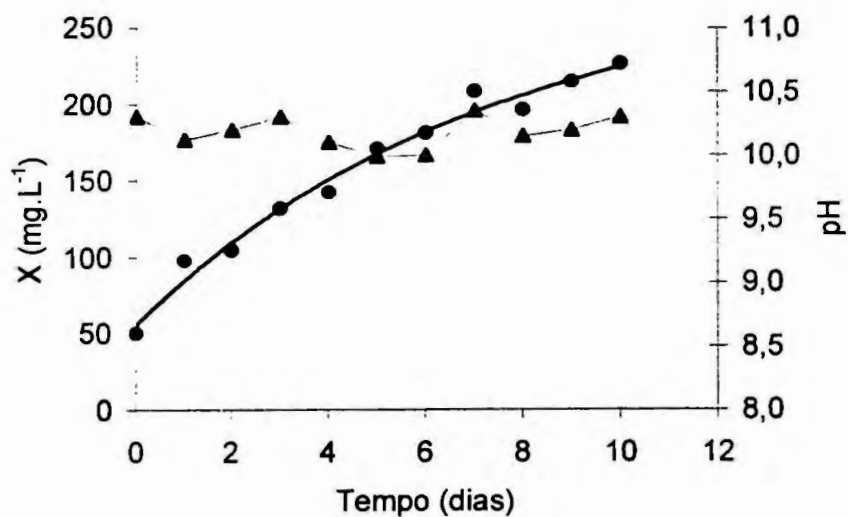


Figura 31- Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio J.

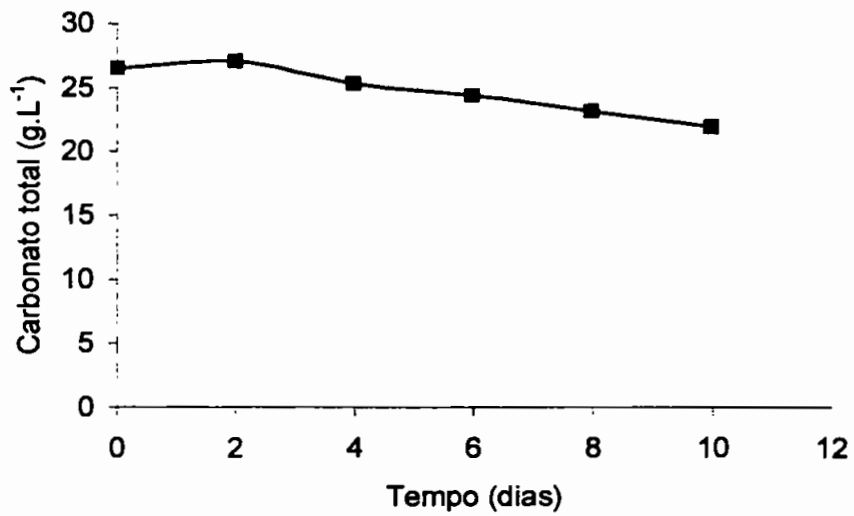


Figura 32- Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio J.

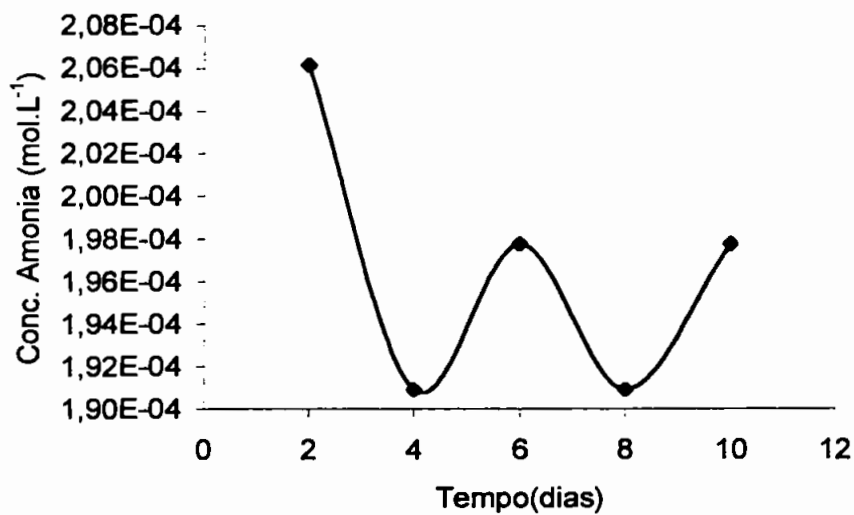


Figura 33- Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio J.

ENSAIO K

Tabela 14- Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio K (pH= 9,5; T=23,25;K=140mg.d⁻¹).

Tempo (dias)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato total (g.L ⁻¹)	Amônia total (molL ⁻¹)
0	50,00	9,50	26,50	-
1	87,43	9,75	-	-
2	131,50	9,60	23,14	1,91E-04
3	169,59	9,40	-	-
4	196,84	9,50	24,05	1,91E-04
5	249,04	9,45	-	-
6	292,94	9,50	19,58	1,91E-04
7	343,25	9,35	-	-
8	386,58	9,56	16,23	1,94E-04
9	463,86	9,45	-	-
10	508,76	9,53	12,31	1,76E-04

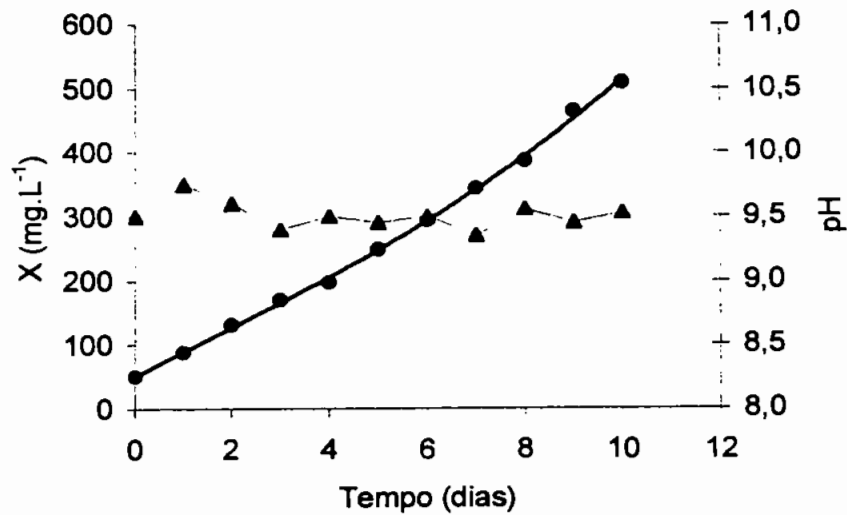


Figura 34- Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio K

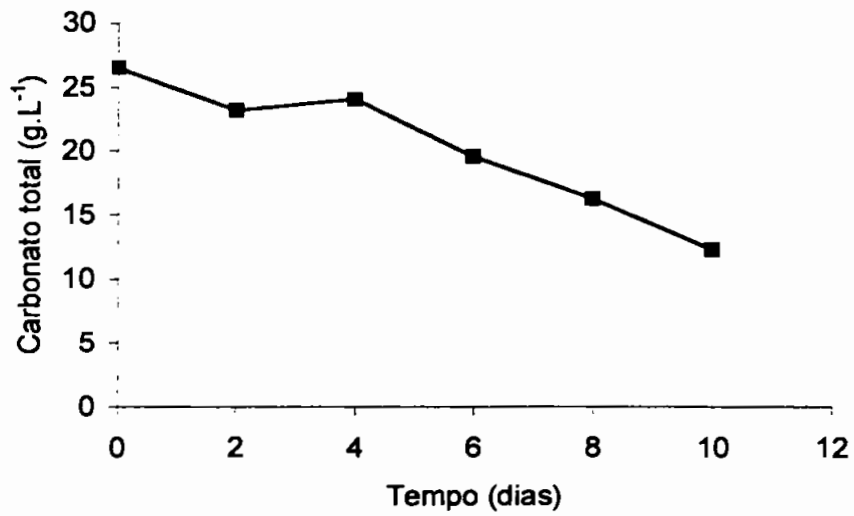


Figura 35- Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio K

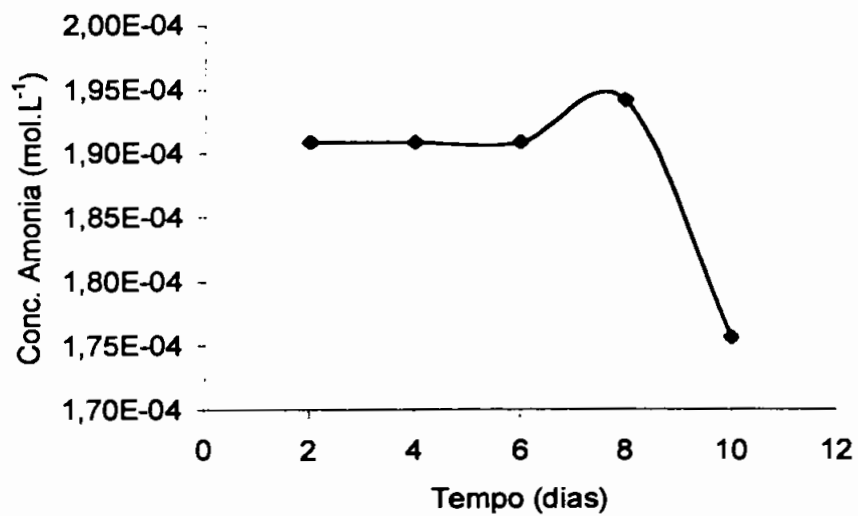


Figura 36- Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio K

ENSAIO L

Tabela 15- Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio L (pH= 9,5; T=36,75; K=140mg.d⁻¹).

Tempo (dias)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	50,00	9,50	26,50	-
1	99,20	9,70	-	-
2	150,21	9,45	22,36	1,21E-04
3	197,84	9,60	-	-
4	230,49	9,55	20,17	9,27E-05
5	239,26	9,50	-	-
6	301,09	9,60	16,89	1,15E-04
7	295,26	9,44	-	-
8	352,00	9,52	14,23	1,91E-04
9	398,56	9,40	-	-
10	421,48	9,57	11,03	1,85E-04

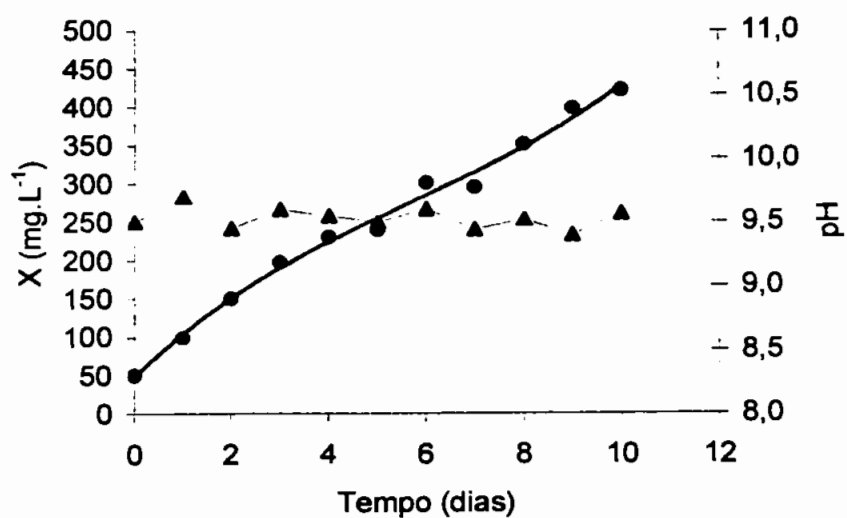


Figura 37- Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio

L

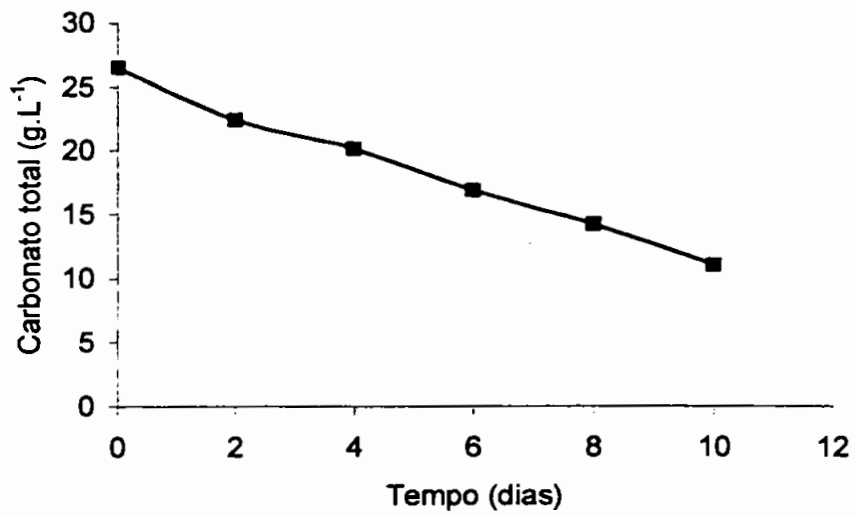


Figura 38- Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio L.

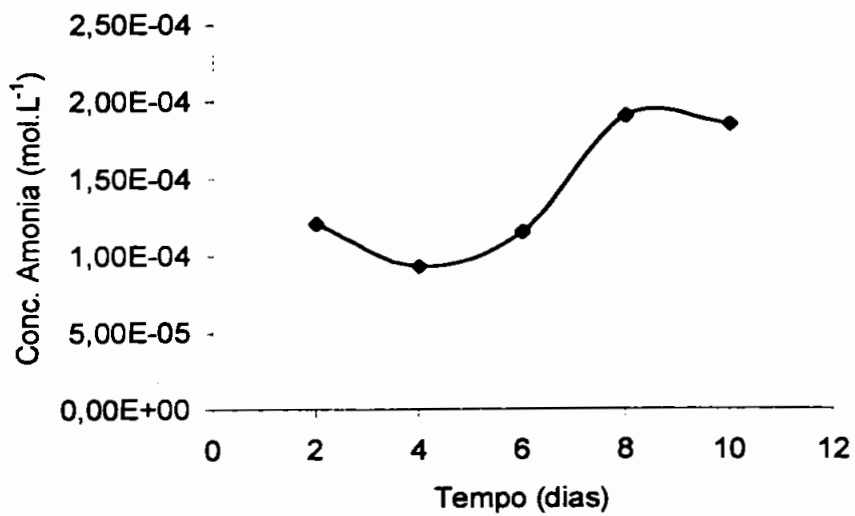


Figura 39- Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio L

ENSAIO M

Tabela 16- Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio M(pH= 9,5; T=30;K=55,65mg.d⁻¹).

Tempo (dias)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato total (g.L ⁻¹)	Amônia total (molL ⁻¹)
0	50,00	9,50	26,50	-
1	110,73	9,43	-	-
2	162,49	9,66	21,85	4,44E-05
3	240,34	9,47	-	-
4	290,23	9,39	24,32	2,94E-05
5	287,16	9,51	-	-
6	376,16	9,65	16,27	3,45E-05
7	407,87	9,43	-	-
8	475,58	9,39	14,51	6,37E-05
9	508,76	9,58	-	-
10	561,98	9,53	10,34	5,20E-05

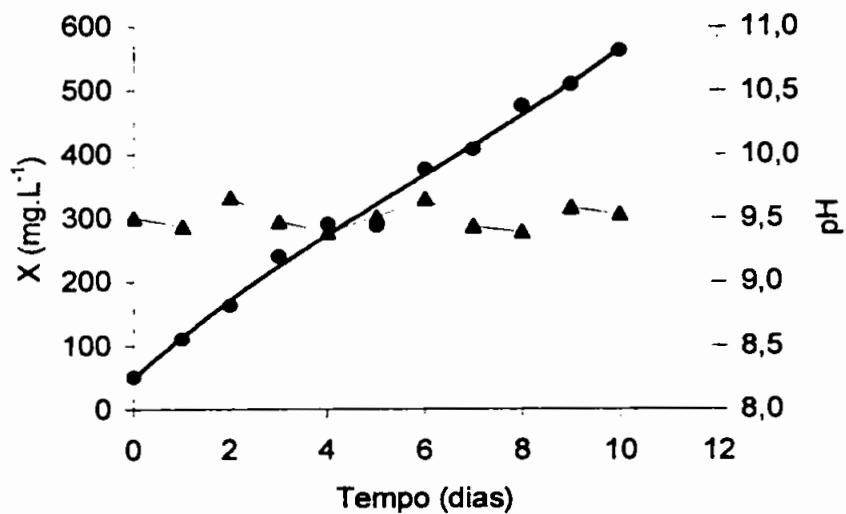


Figura 40- Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio M.

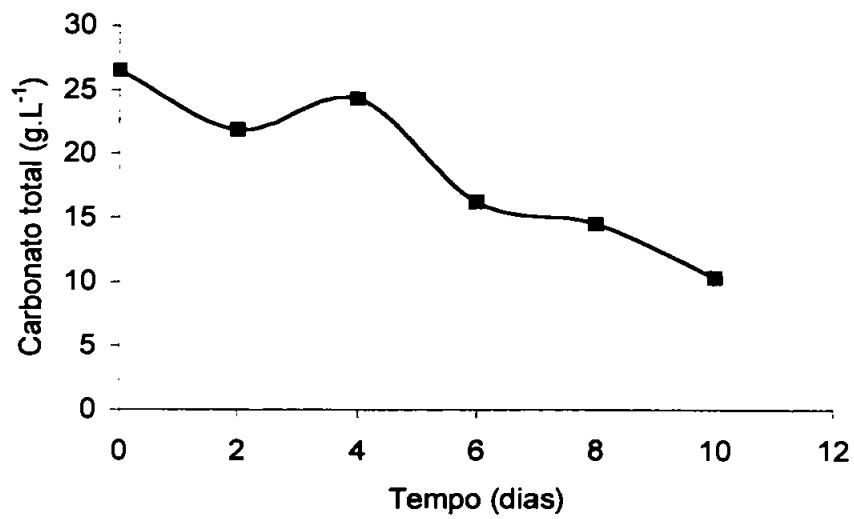


Figura 41- Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio M.

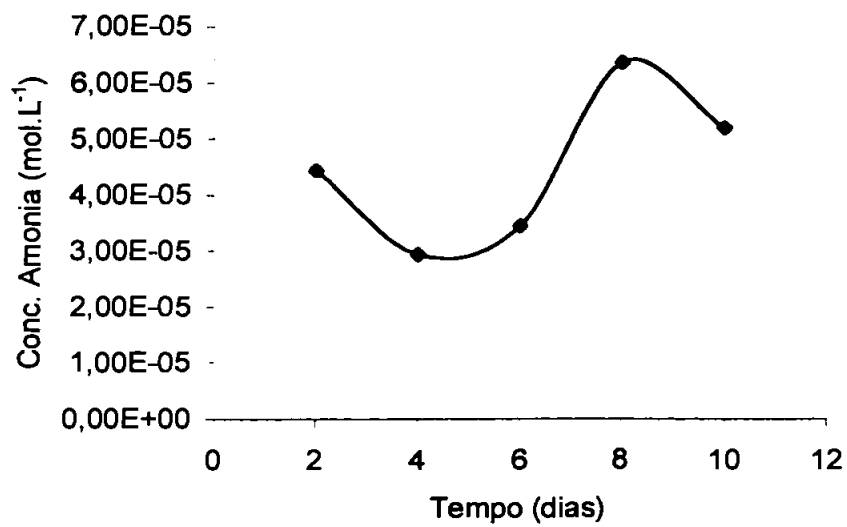


Figura 42- Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio M.

ENSAIO N

Tabela 17- Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio N (pH= 9,5; T=30; K=224,35mg.d⁻¹).

Tempo (dias)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	50,00	9,50	26,50	-
1	110,32	9,69	-	-
2	152,69	9,57	23,72	1,24E-04
3	231,64	9,37	-	-
4	303,46	9,50	20,63	1,36E-05
5	340,77	9,32	-	-
6	427,00	9,64	21,38	3,65E-05
7	450,90	9,40	-	-
8	508,76	9,61	14,71	5,86E-05
9	580,46	9,50	-	-
10	612,69	9,48	10,09	9,65E-05

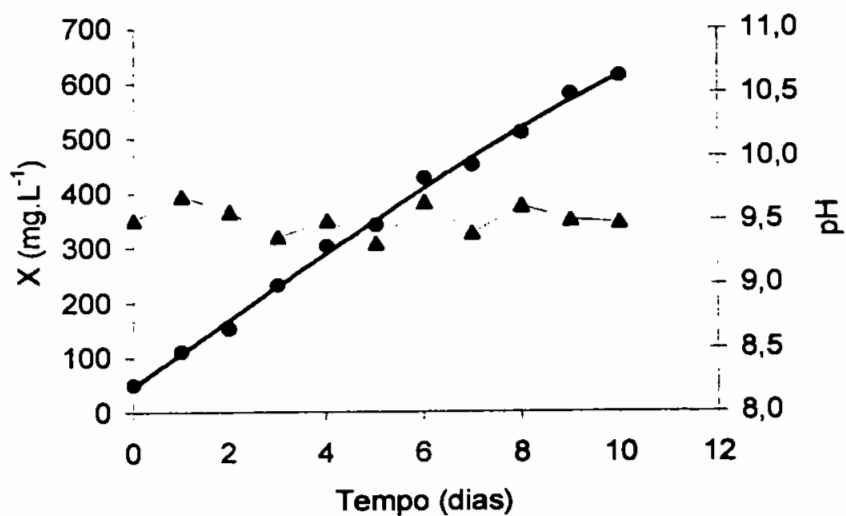


Figura 43- Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio N.

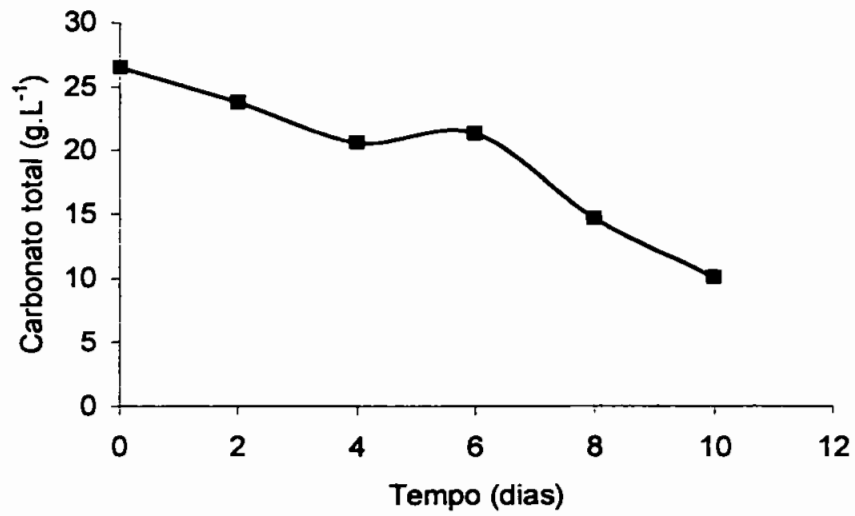


Figura 44- Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio N.

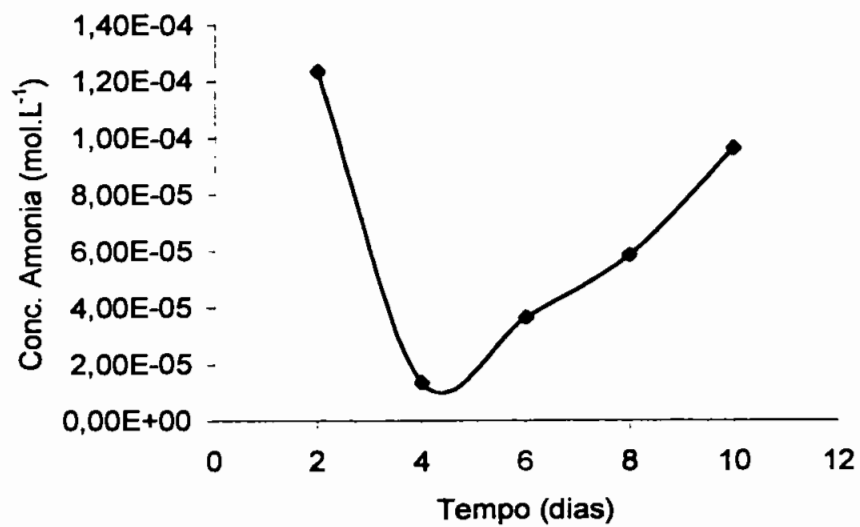


Figura 45- Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio N.

ENSAIO O

Tabela 18- Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio O (pH= 9,5; T=30°C; K=140mg.d⁻¹).

Tempo (dias)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato total (g.L ⁻¹)	Amônia total (molL ⁻¹)
0	50,00	9,50	26,50	-
1	132,38	9,46	-	-
2	196,70	9,65	20,97	4,76E-05
3	247,24	9,34	-	-
4	319,02	9,51	24,53	1,67E-05
5	380,95	9,42	-	-
6	479,31	9,52	18,34	1,49E-05
7	496,53	9,61	-	-
8	556,50	9,64	15,18	1,91E-05
9	600,46	9,52	-	-
10	698,88	9,45	11,21	1,82E-05

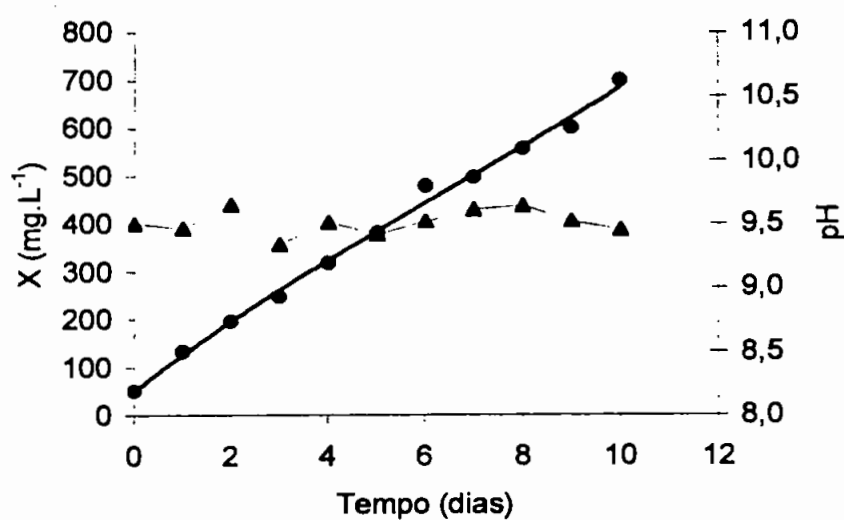


Figura 46- Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio O.

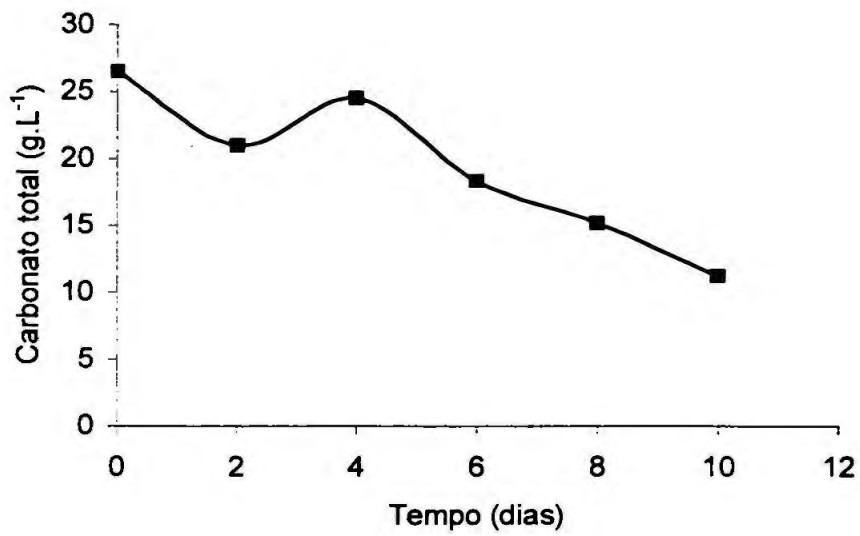


Figura 47- Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio O.

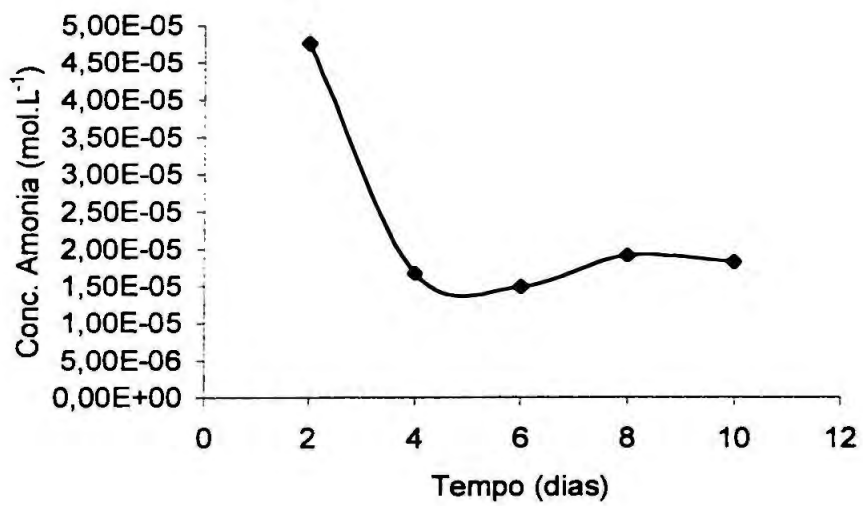


Figura 48- Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio O.

ENSAIO P

Tabela 19- Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio P (pH= 9,5; T=30°C; K=140mg.d⁻¹).

Tempo (dias)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	50,00	9,50	26,50	-
1	134,16	9,61	-	-
2	191,04	9,44	24,13	3,16E-05
3	252,18	9,58	-	-
4	313,13	9,49	19,54	2,44E-05
5	387,70	9,56	-	-
6	500,10	9,31	21,47	2,07E-05
7	527,50	9,67	-	-
8	573,11	9,50	13,16	2,62E-05
9	662,10	9,62	-	-
10	714,91	9,48	10,32	1,51E-05

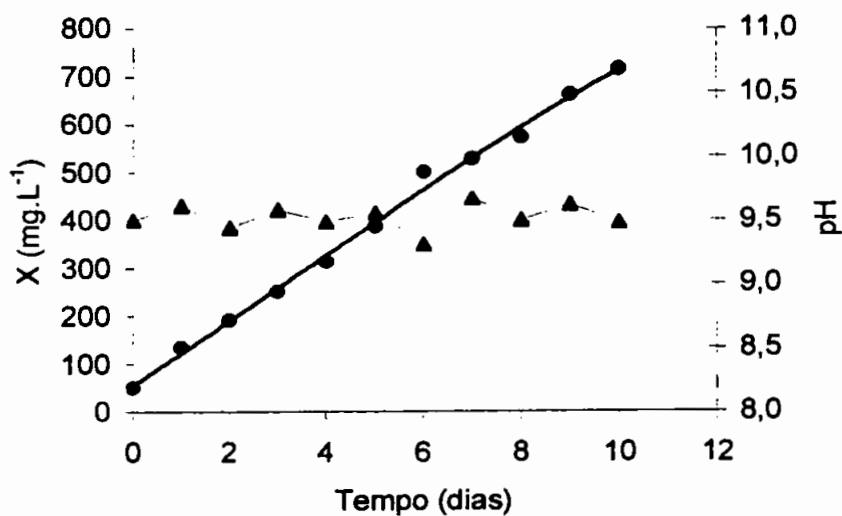


Figura 49- Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio P.

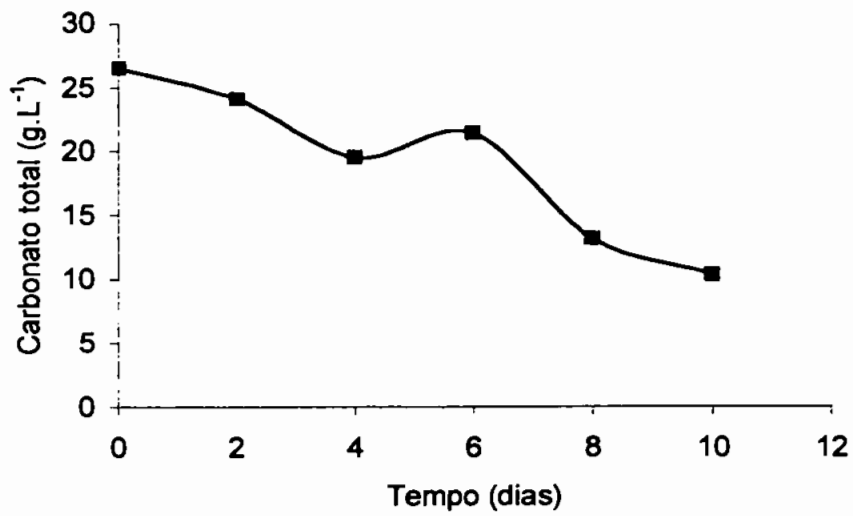


Figura 50- Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio P.

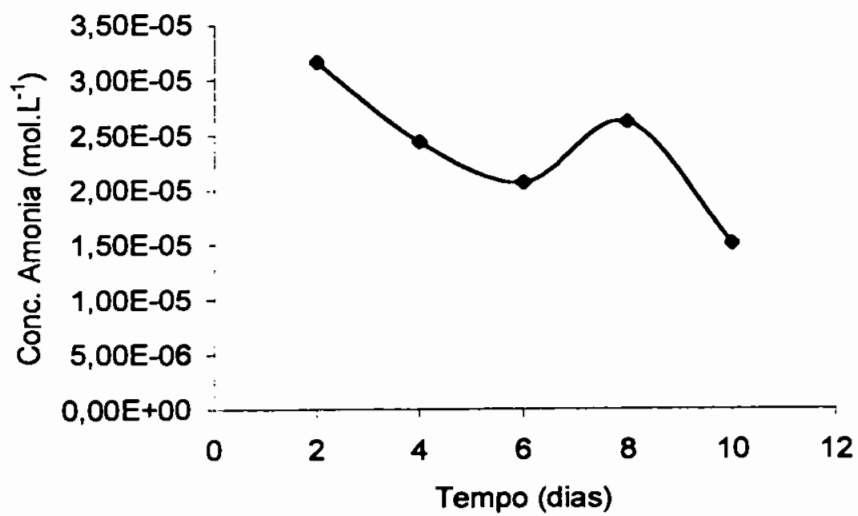


Figura 51- Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio P.

ENSAIO Q

Tabela 20- Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio Q (pH= 9,5; T=30°C; K=140mg.d⁻¹).

Tempo (dias)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato total (g.L ⁻¹)	Amônia total (molL ⁻¹)
0	50,00	9,50	26,50	-
1	127,12	9,74	-	-
2	196,70	9,47	23,34	2,05E-05
3	276,90	9,63	-	-
4	321,00	9,38	20,82	1,31E-05
5	415,63	9,57	-	-
6	538,31	9,39	18,56	2,69E-05
7	564,76	9,71	-	-
8	623,44	9,54	12,47	1,81E-05
9	705,44	9,43	-	-
10	721,01	9,65	8,96	1,58E-05

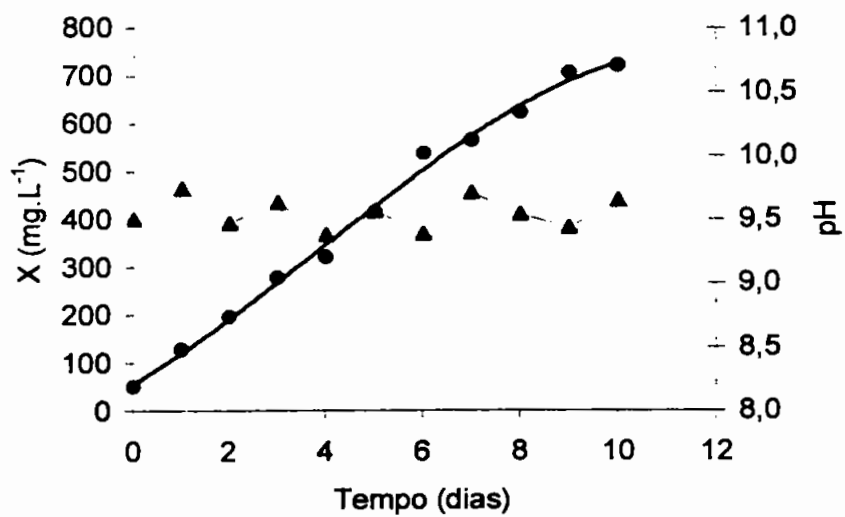


Figura 52- Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio

Q.

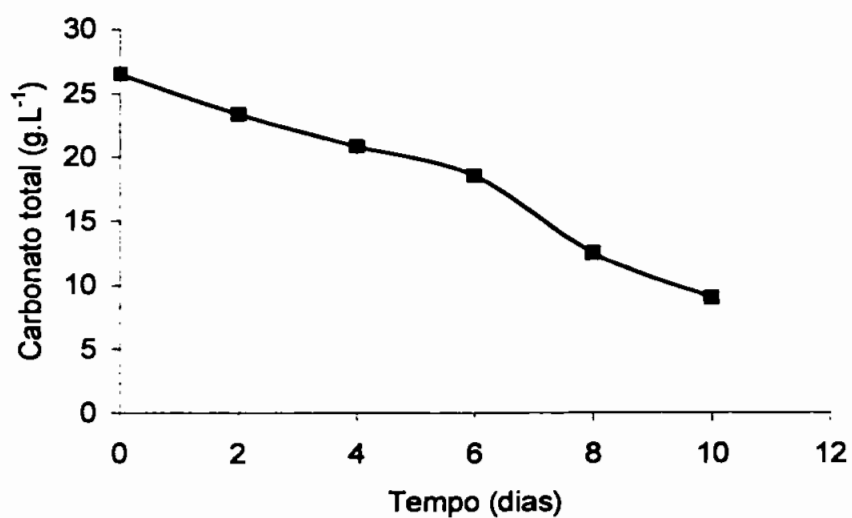


Figura 53- Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio Q.

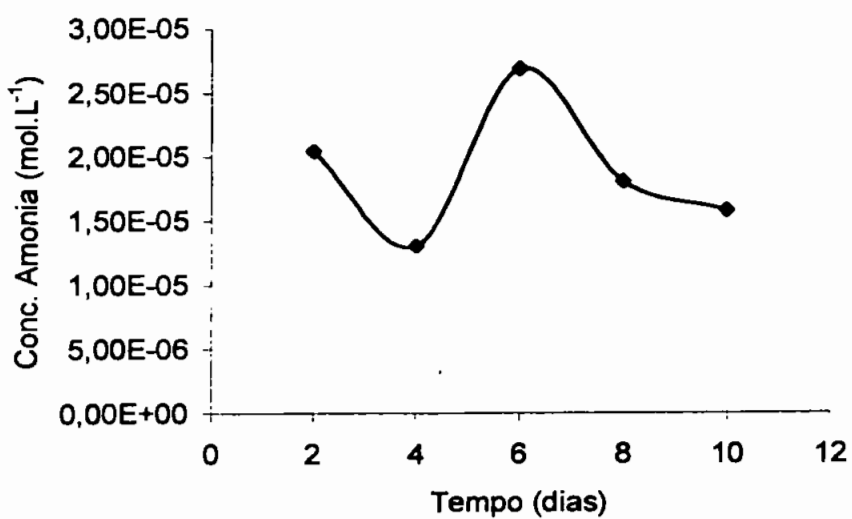


Figura 54- Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio Q.

ENSAIO R

Tabela 21- Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio R (pH= 9,5; T=30;K=140mg.d⁻¹).

Tempo (dias)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	50,00	9,50	26,50	-
1	106,29	9,69	-	-
2	154,62	9,51	21,46	1,13E-04
3	241,70	9,68	-	-
4	290,23	9,53	23,82	2,57E-05
5	330,96	9,62	-	-
6	394,49	9,47	19,34	2,69E-05
7	493,50	9,71	-	-
8	524,34	9,39	12,76	2,09E-05
9	608,84	9,61	-	-
10	693,34	9,52	10,03	8,87E-05

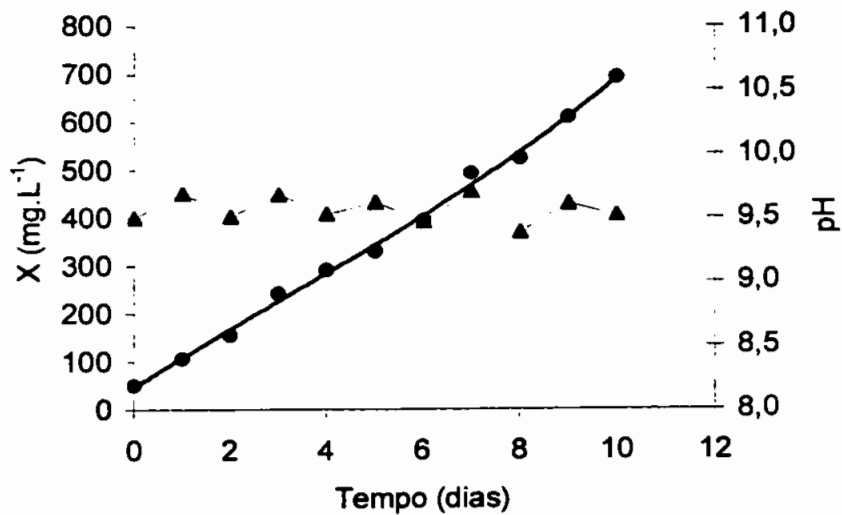


Figura 55- Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio R.

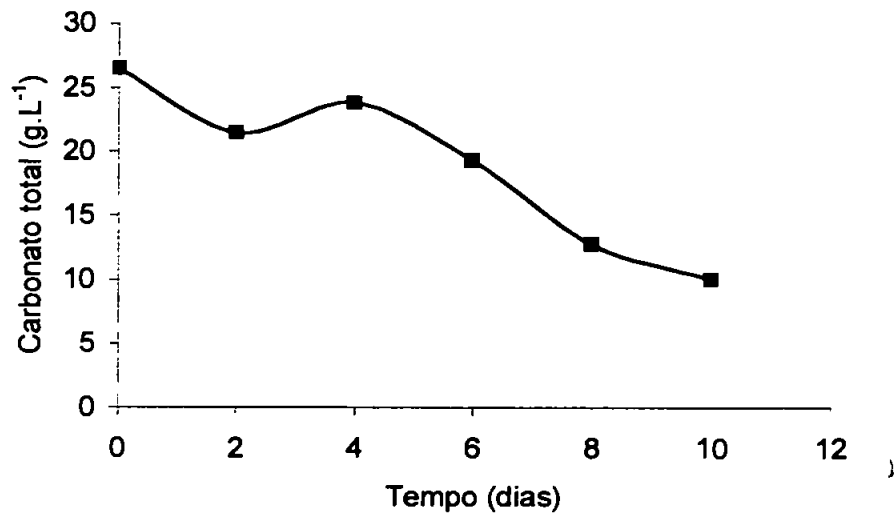


Figura 56- Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio R.

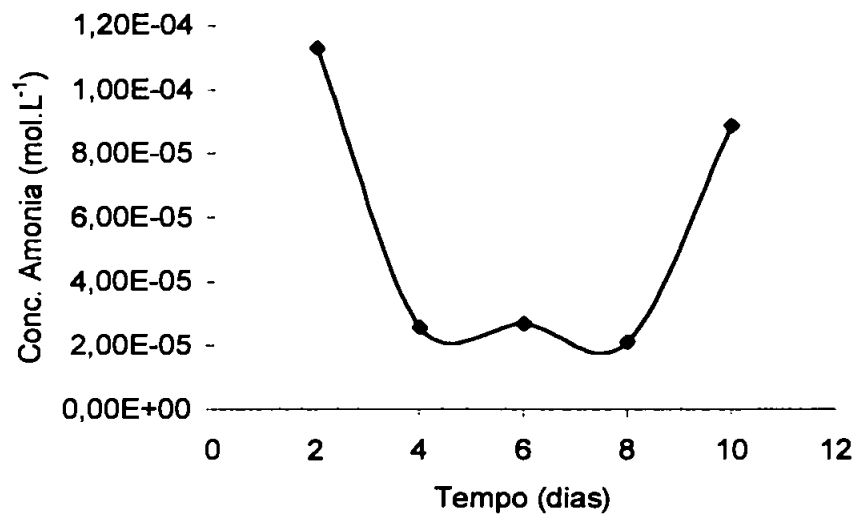


Figura 57- Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio R.

ENSAIO S

Tabela 22- Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio S (pH= 9,5; T=30°C; K=140mg.d⁻¹).

Tempo (dias)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	50,00	9,50	26,5	-
1	111,54	9,63	-	-
2	156,08	9,49	22,26	5,82E-05
3	243,34	9,41	-	-
4	331,64	9,60	21,36	4,66E-06
5	337,54	9,40	-	-
6	423,55	9,54	17,49	9,75E-06
7	568,18	9,61	-	-
8	620,18	9,38	13,515	2,03E-06
9	697,61	9,48	-	-
10	735,25	9,56	9,54	6,17E-07

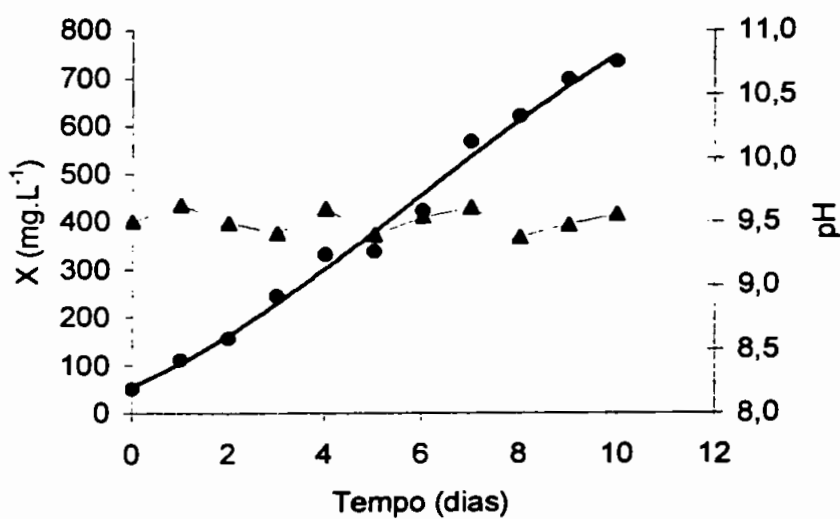


Figura 58- Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio S.

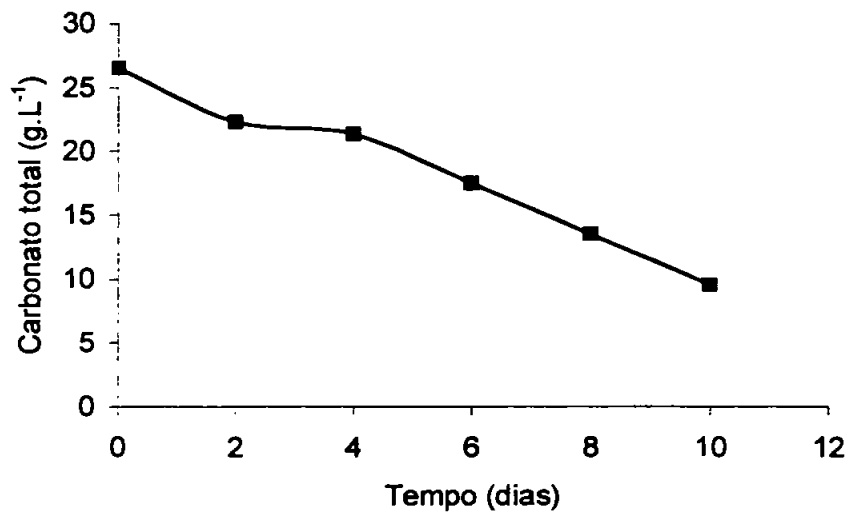


Figura 59- Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio S

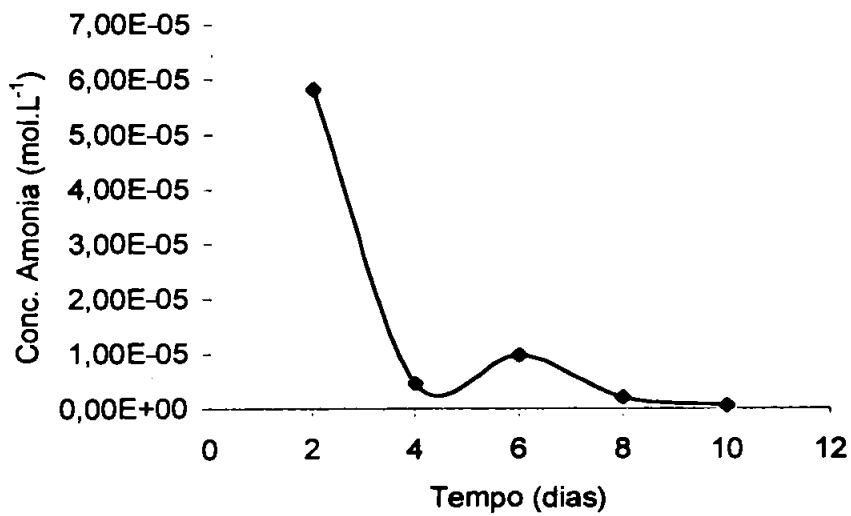


Figura 60- Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio S.

ENSAIO T

Tabela 23- Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total referentes ao ensaio com KNO_3 como fonte de nitrogênio.

Tempo (dias)	X (mg.L^{-1})	pH	Carbonato total (g.L^{-1})
0	50,00	9,50	26,50
1	130,18	9,69	-
2	176,89	9,78	24,40
3	248,64	9,85	-
4	315,09	9,97	22,60
5	376,51	9,98	-
6	471,23	10,08	21,20
7	493,50	10,12	-
8	558,15	10,29	20,95
9	628,85	10,21	-
10	665,89	10,26	20,01

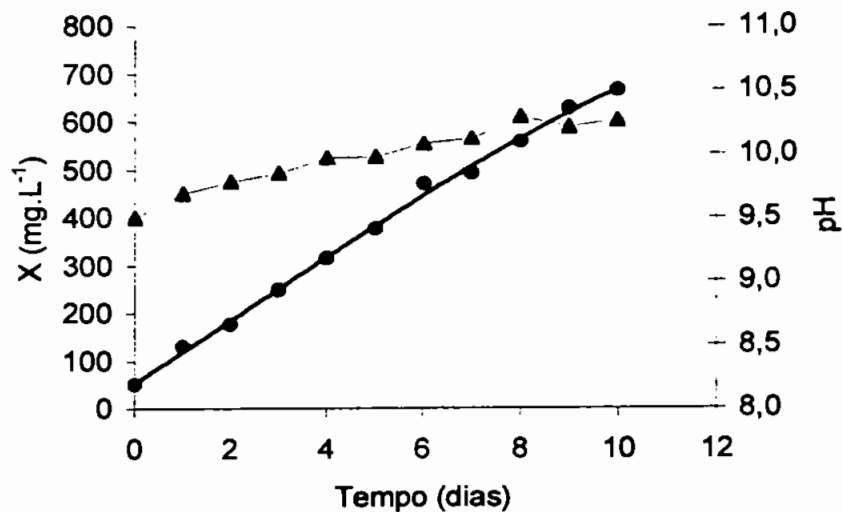


Figura 61- Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio T.

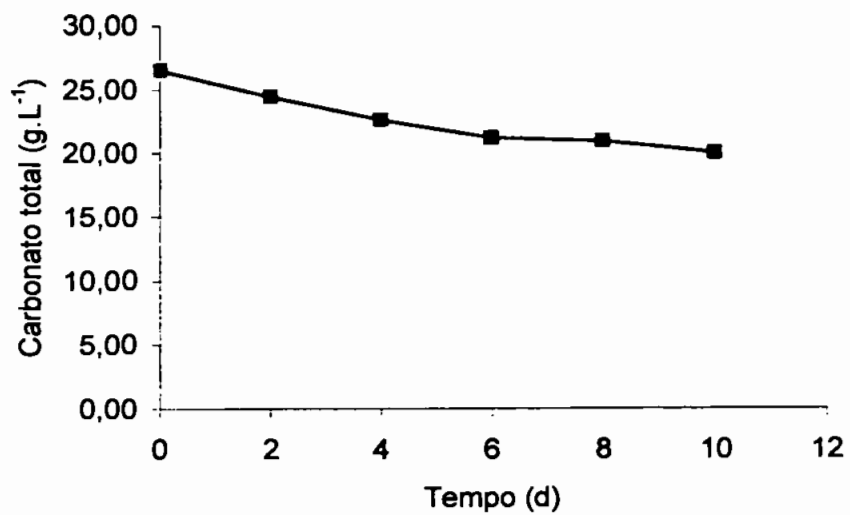


Figura 62- Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio T.

ENSAIO U

Tabela 24- Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total referentes ao ensaio com KNO_3 como fonte de nitrogênio.

Tempo (dias)	X (mg.L^{-1})	pH	Carbonato total (g.L^{-1})
0	50,00	9,50	26,50
1	81,56	9,64	-
2	147,46	9,71	23,14
3	190,46	9,83	-
4	239,19	9,94	21,49
5	330,01	9,99	-
6	377,61	10,16	20,94
7	464,60	10,08	-
8	517,38	10,34	19,20
9	596,99	10,28	-
10	639,91	10,41	18,97

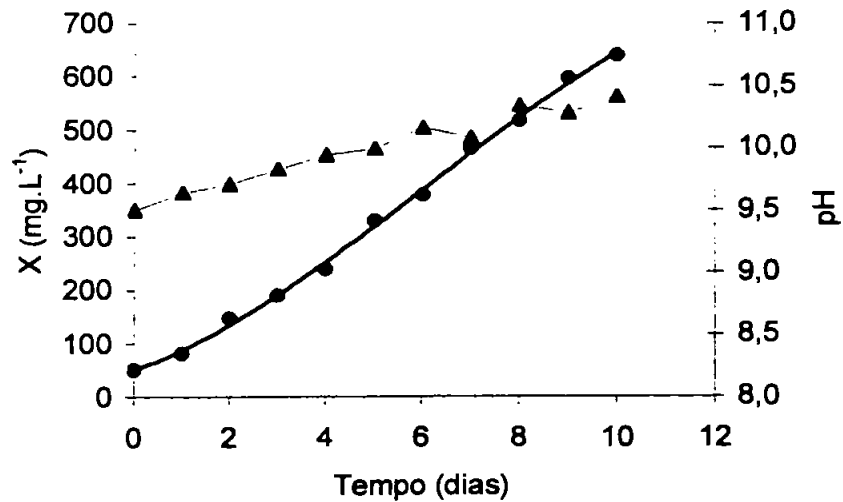


Figura 63- Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio U.

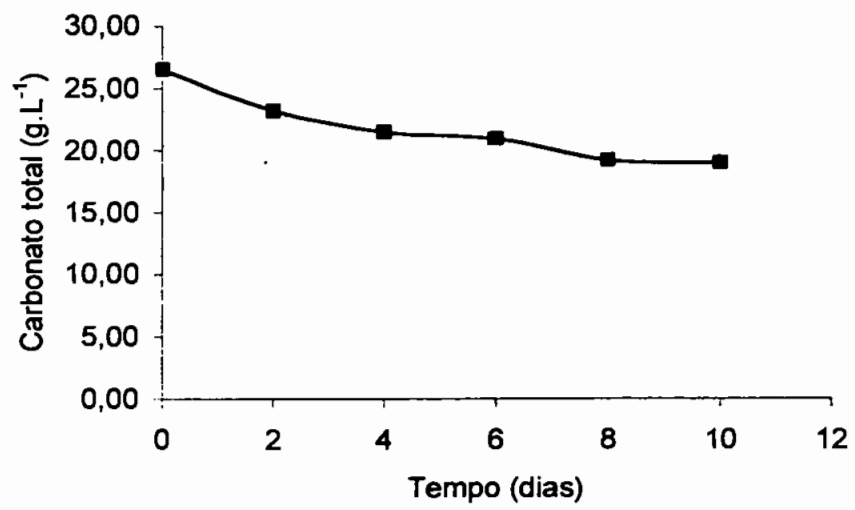


Figura 64- Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio U.

ENSAIO V

Tabela 25- Concentração celular (X), valor de pH, concentração de carbonato total e concentração de amônia total referentes ao ensaio sem controle de pH (T=30°C; K=140mg.d⁻¹).

Tempo (dias)	X (mg.L ⁻¹)	pH	Carbonato total (g.L ⁻¹)	Amônia total (mol.L ⁻¹)
0	50,00	9,50	26,50	-
1	111,95	9,69	-	-
2	159,02	9,78	23,00	4,40E-05
3	243,76	9,85	-	-
4	297,75	9,97	22,40	2,96E-05
5	355,74	9,98	-	-
6	449,47	10,08	20,03	4,01E-05
7	501,09	10,12	-	-
8	540,25	10,29	19,3	5,42E-05
9	653,98	10,21	-	-
10	678,35	10,26	17,6	6,53E-05

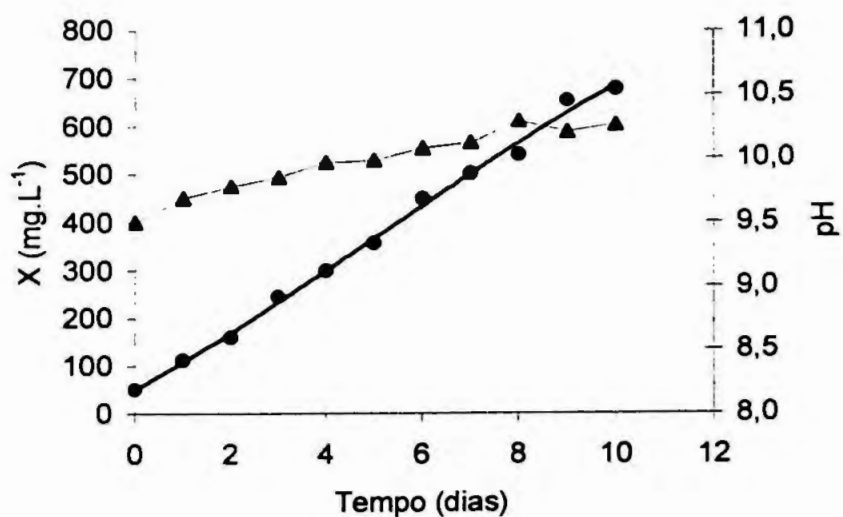


Figura 65- Concentração celular (X) e pH em função do tempo para o ensaio V.

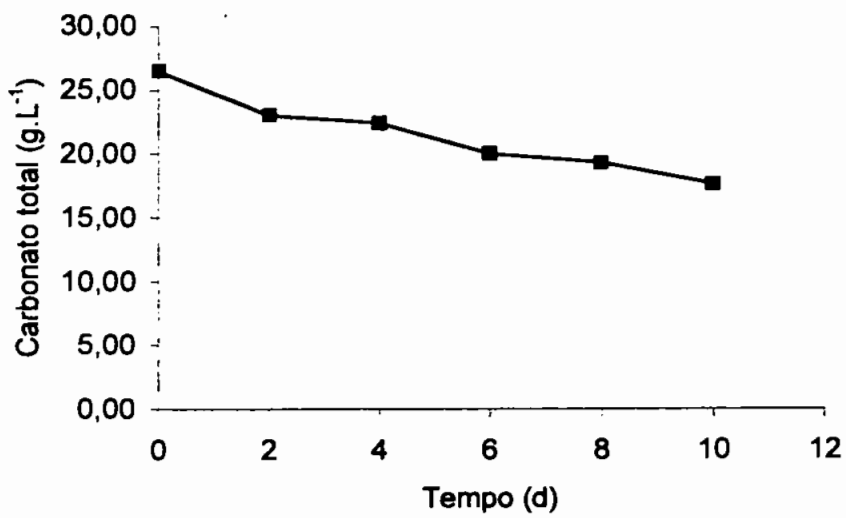


Figura 66- Concentração de carbonato total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio V.

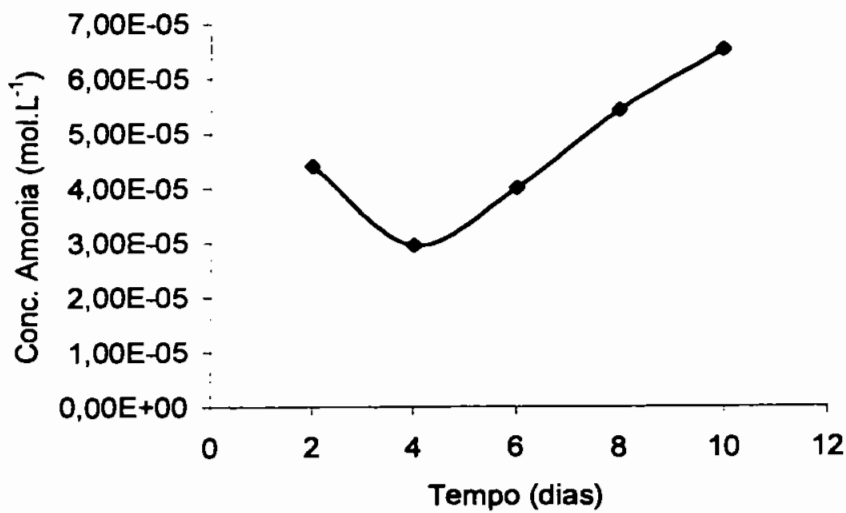


Figura 67- Concentração de amônia total no meio de cultivo em função do tempo para o ensaio V.

Tabela 26- Conteúdo de proteínas e lipídeos na biomassa de *Spirulina platensis* obtida nos ensaios realizados.

Ensaio	pH	T (°C)	K (mg.d-1)	%Proteínas	%Lipídios
A	9,00	26,00	90,00	13,23	71,56
B	10,00	26,00	90,00	14,12	69,69
C	9,00	34,00	90,00	13,59	70,60
D	10,00	34,00	90,00	15,72	70,31
E	9,00	26,00	190,00	14,75	72,81
F	10,00	26,00	190,00	12,57	74,80
G	9,00	34,00	190,00	13,10	67,50
H	10,00	34,00	190,00	14,17	70,23
I	8,66	30,00	140,00	15,01	69,40
J	10,34	30,00	140,00	11,14	70,94
K	9,50	23,25	140,00	12,16	72,50
L	9,50	36,75	140,00	13,68	72,50
M	9,50	30,00	55,65	11,50	45,60
N	9,50	30,00	224,35	14,38	72,50
O	9,50	30,00	140,00	15,02	67,50
P	9,50	30,00	140,00	12,47	70,60
Q	9,50	30,00	140,00	14,79	68,75
R	9,50	30,00	140,00	12,22	71,56
S	9,50	30,00	140,00	12,99	68,44
T*	-	30,00	-	14,10	72,81
U*	-	30,00	-	12,78	70,27
V**	-	30,00	140,00	12,89	69,35

* Experimentos realizados com KNO₃ sem controle de pH, com pH inicial de 9,5.

** Experimentos com uréia sem controle de pH com pH inicial de 9,5.

Tabela 27- Parâmetros cinéticos: concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_x), fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) e velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) dos ensaios realizados.

Ensaio	pH	T (°C)	K (mg. d ⁻¹)	X_m (mg.L ⁻¹)	P_x (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	$Y_{X/N}$ (g.g ⁻¹)	μ_m (d ⁻¹)
A	9,00	26,00	90,00	535,84	48,58	4,30	0,505
B	10,00	26,00	90,00	540,25	49,03	4,34	0,516
C	9,00	34,00	90,00	530,67	48,07	4,26	0,533
D	10,00	34,00	90,00	573,11	52,31	4,63	0,563
E	9,00	26,00	190,00	664,00	61,40	3,12	0,549
F	10,00	26,00	190,00	678,05	62,81	3,19	0,562
G	9,00	34,00	190,00	561,94	51,19	2,60	0,622
H	10,00	34,00	190,00	541,86	49,19	2,50	0,569
I	8,66	30,00	140,00	556,50	50,65	3,27	0,502
J	10,34	30,00	140,00	226,36	17,64	1,14	0,328
K	9,50	23,25	140,00	508,76	45,88	2,96	0,434
L	9,50	36,75	140,00	421,48	37,15	2,40	0,518
M	9,50	30,00	55,65	561,98	51,20	6,09	0,543
N	9,50	30,00	224,35	612,69	56,27	2,49	0,556
O	9,50	30,00	140,00	698,88	64,89	4,19	0,563
P	9,50	30,00	140,00	714,91	66,49	4,29	0,547
Q	9,50	30,00	140,00	721,01	67,10	4,33	0,572
R	9,50	30,00	140,00	693,34	64,33	4,15	0,552
S	9,50	30,00	140,00	735,25	68,53	4,42	0,536
T*	-	30,00	-	665,89	61,59	1,75	0,570
U*	-	30,00	-	639,91	58,99	1,67	0,480
V**	-	30,00	140,00	678,35	62,84	4,06	0,554

* Experimentos realizados com KNO₃ sem controle de pH, com pH inicial de 9,5.

** Experimentos com uréia sem controle de pH com pH inicial de 9,5.

VI. DISCUSSÃO

VI.1. Considerações gerais

No cultivo de *Spirulina platensis* o processo descontínuo se aplica melhor quando as fontes de nitrogênio são os nitratos (PAOLETTI, PUSHPARAJ, TOMASELLI, 1975), Zarouk (XUE *et al.*, 2002) e Schlösser (RICHMOND, 1983), que utilizam KNO_3 ou NaNO_3 , com resultados insatisfatórios quando do uso de fontes amoniacais e/ou uréia. Isto porque em pH alcalino as fontes amoniacais apresentam-se deslocadas para a forma de amônia e, no caso da uréia, esta é hidrolisada liberando amônia no meio de cultivo. Dessa forma, se toda a uréia necessária para atingir maiores concentrações celulares no sistema for colocada no início, poderá ocorrer morte celular devido à toxicidade de amônia (ABELIOVICH *et al.*, 1976).

A utilização do processo descontínuo alimentado para o cultivo de *Spirulina platensis* permitiu a obtenção de resultados bastante satisfatórios com o uso de uréia como fonte de nitrogênio (CEZARE, 1998; SASSANO, 1999; RANGEL, 2000; DANESI, 2001), reduzindo os níveis da concentração de amônia no decorrer do cultivo e adequando-os aos níveis indicados como ótimos para o crescimento celular (BOUSSIBA, 1989).

A forma de adição de um nutriente em processo descontínuo alimentado pode ser de forma contínua ou intermitente (CARVALHO & SATO, 2001). Em trabalho prévio DANESI *et al.*, (2002), compararam os regimes de alimentação de uréia no cultivo de *Spirulina platensis*, obtendo resultados similares na forma de alimentação contínua e intermitente (cada 24 horas). Assim, neste trabalho optou-se por utilizar a forma de adição de 24 em 24 horas, facilitando as operações por não precisar de uma bomba peristáltica para a alimentação. Este tipo de avaliação em processo descontínuo

alimentado é comum também em outras áreas, como fermentação alcoólica por exemplo (BORZANI *et al*, 1988).

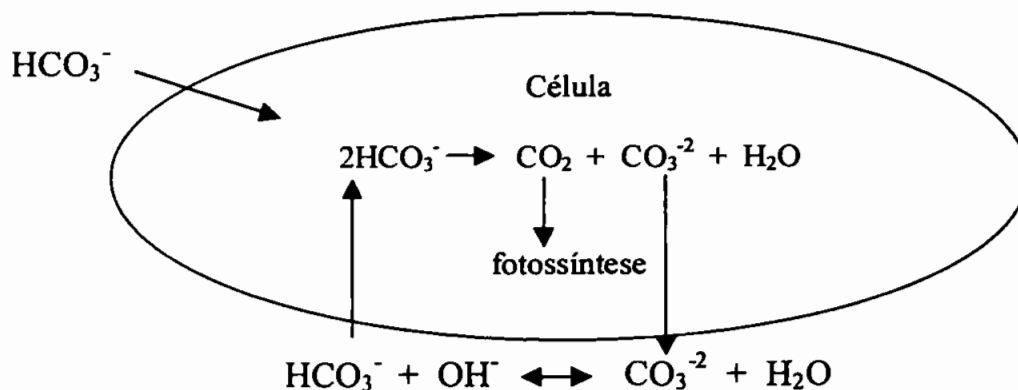
Embora o inóculo tenha sido cultivado e mantido nas condições próximas das utilizadas nos experimentos, nos ensaios com uréia como fonte de nitrogênio seria esperado uma fase de adaptação (lag) da *Spirulina*. No entanto, isso não ocorreu, mostrando uma rápida adaptação do microrganismo. Isto pode ter sido decorrente da hidrólise espontânea da uréia em meio alcalino liberando amônia. Como em pH alcalino a amônia entra por difusão na célula e já estaria na forma pronta para ser incorporada à biossíntese de aminoácidos, é forma de nitrogênio preferencial de captação pela *Spirulina* (BOUSSIBA, 1989).

Observa-se nas figuras apresentadas, no capítulo anterior, que as curvas de crescimento da *Spirulina* são lineares, concordando com os resultados obtidos por FERRAZ (1986). Considerando o fato de que a alga apresenta uma velocidade de crescimento aproximadamente constante durante o cultivo, optou-se pela utilização da vazão mássica de alimentação constante. Ademais, esta vazão é mais fácil de aplicar em escala industrial (DANESI, 2001).

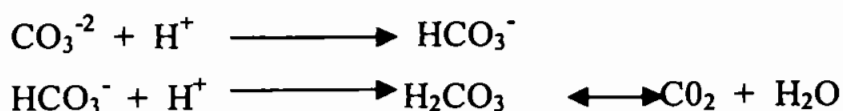
O tempo de cultivo para todos os experimentos foi de 10 dias, porque depois deste tempo o crescimento se vê afetado drasticamente pelo fenômeno do sombreamento. Este fenômeno é explicado pelo aumento da densidade populacional levando a uma diminuição de luz disponível para cada célula, passando a não ser mais homogênea sua distribuição na cultura, reduzindo o crescimento microbiano. Este é um fator preponderante no surgimento da fase estacionária (BECKER, 1981; RICHMOND, 1988), visto que em culturas fotoautotróficas a disponibilidade de luz para cada célula é função da intensidade e duração da irradiação luminosa.

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

A assimilação fotossintética do carbono é realizada pela passagem ativa de bicarbonato no meio de cultura para o interior das células, onde no sistema fotossintético ocorre a captura do anidrido carbônico com conseqüente liberação do carbonato remanescente, segundo a equação (FERRAZ, 1986):

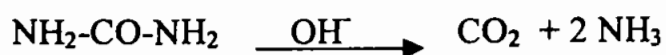


Com o crescimento celular temos portanto um simultâneo aumento do valor de pH, pelo acúmulo de carbonato no meio. Por isso é necessária a reposição da reserva de íons bicarbonato, o que pode ser feito pelo borbulhamento de anidrido carbônico (CO₂) ou pode-se repor parte da reserva de bicarbonato por acréscimo de ácido mineral, deslocando o equilíbrio no sentido de formação de bicarbonato. Em nosso estudo optou-se pelo uso de ácido mineral (HCl diluído) para o controle de pH



Nota-se que para o ensaio I com pH 8,7 (menor pH estudado) a queda é maior devido a maior perda de CO₂ em relação aos demais valores de pH estudados. De fato GOLDMAN, DENNETT, RILEY, (1982) relatam que quanto menor o valor de pH mantido no meio de cultura maior é a perda de CO₂, levando a uma diminuição da quantidade de biomassa produzida. Por outro lado o experimento J que teve o maior valor de pH (10,3), a queda da concentração de carbonato total foi a menor encontrada, ficando com uma reserva de carbonato final de 22 g.L⁻¹. Apesar disto, neste ensaio foi observado o menor crescimento celular, pois neste valor de pH a forma de carbono se apresenta como carbonato, que não é assimilável pela *Spirulina* (GOLDMAN, DENNETT, RILEY, 1982). Já nos ensaios com pH de 9,5 (ensaio S por exemplo) obtiveram-se os melhores resultados de crescimento microbiano (735,25mg.L⁻¹), concordando com trabalhos prévios (FOX, 1983; FERRAZ 1985). Neste pH a forma predominante de carbono é o bicarbonato que é preferencialmente utilizado pelo microrganismo (BOUSSIBA, 1989). Ademais, neste pH não houve perda excessiva da fonte de carbono como observado no ensaio com pH 8,7 (ensaio I).

Com relação à fonte de nitrogênio, quando a uréia é adicionada num meio alcalino, estudo em questão, é hidrolisada formando CO₂ e amônia. O anidrido carbônico é utilizado na fotossíntese e a amônia no metabolismo do nitrogênio (CARVAJAL *et al*, 1980).



Como se pode observar nos gráficos da concentração de amônia total em função do tempo (capítulo V), os cultivos não apresentam concentrações inibitórias de amônia os valores de concentração inibitória estão entre 2 mM (ABELIOBICH & AZOV, 1976) e 10 mM (BELKIN & BOUSSIBA, 1991).

Nos experimentos onde se adotaram o pH 9.5 (pontos centrais), foram obtidos os melhores crescimentos, como observado anteriormente, quando se comenta da fonte de carbono. Este valor de pH também pode ter influenciado na disponibilidade de nitrogênio para a célula, visto que o pH do meio determina a hidrólise da uréia (DANESI *et al.*, 2002), a forma em que a amônia se apresenta, protonada ou não protonada (BELKIN & BOUSSIBA, 1991) e, portanto, determina a taxa de perda de amônia formada decorrente da hidrólise da uréia, bem como a captação de amônia (BOUSSIBA, 1989). Verificou-se que o controle do pH em 9,5 (ensaio S) levou a resultado melhor que no ensaio iniciado com pH 9,5, porém sem controle (ensaio V, tabela 27).

A melhor temperatura de crescimento ocorreu no experimento S, conduzida a 30 °C, concordando com os resultados obtidos por outros autores que utilizaram nitrato como fonte de nitrogênio (JENSEN & KNUTSEN, 1993; RICHMOND & QIANG, 1997; VONSHAK *et al.*, 1996). A temperatura afeta a concentração celular, a natureza do metabolismo, as necessidades nutricionais e a composição da biomassa os efeitos da temperatura no crescimento é explicado em termos de dois fatores: pela ação da temperatura na estrutura dos componentes celulares (especialmente proteínas e lipídeos) e outro relacionando os coeficientes de temperatura com a taxa de reação os quais por sua vez dependem das energias de ativação das reações (FAINTUCH, 1989).

No ensaio L com temperatura de 36,75 °C ocorreu uma queda no crescimento celular. Este fenômeno pode ter ocorrido porque a altas temperaturas a taxa de perda de amônia é maior e pode ocorrer carência de fonte de nitrogênio. Além disso, a evaporação da água neste cultivo foi maior que nas demais temperaturas. Esta ocorrência pode ter provocado mudanças

na pressão osmótica do meio de cultura com algum dano às células (VONSHAK, 1996).

Na menor temperatura empregada (ensaio K), ao contrario de ensaios com KNO_3 , não se nota uma diminuição do crescimento celular em relação a temperaturas maiores que $30\text{ }^\circ\text{C}$ (VONSHAK, 1997).

No experimento M, com vazão mássica de alimentação de uréia (K) de $55,56\text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ obteve-se uma concentração celular máxima de $561,98\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, mas o fator de conversão de nitrogênio em células foi o maior (6 g de células formadas a partir de um grama de nitrogênio). No ensaio N, com (K) de $224,35\text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$, o crescimento foi maior que o anterior atingindo um valor máximo de $612,69\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e um $Y_{X/N}$ de $2,5\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$. Nesta condição fica evidente o menor aproveitamento da fonte de nitrogênio adicionada.

Embora o fator de conversão de nitrogênio em células tenha sido maior no experimento M não levou ao maior crescimento celular. Pode-se dizer que as melhores condições de crescimento de *Spirulina platensis* foram obtidas com pH 9,5, temperatura de 30°C e vazão mássica de alimentação de uréia de $140\text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$.

Os fatores estudados não influenciaram na composição da biomassa, como se observa na Tabela 26, estando os teores de lipídeos e proteínas dentro da faixa característica da biomassa da *Spirulina platensis* (CIFERRI & TIBONI, 1985).

Comparando a melhor condição utilizando uréia como fonte de nitrogênio (ensaios do ponto central), com os ensaios conduzidos com KNO_3 , no cultivo clássico, verifica-se uma nítida superioridade daqueles cultivos em relação a concentração celular máxima, produtividade em células. por tanto a máxima velocidade específica de crescimento não pode ser considerada diferente.

VI.2. Análise de regressão multivariável

A partir dos resultados obtidos para os ensaios referentes ao planejamento estatístico, foram realizadas análises de regressão multivariável, com o objetivo de facilitar a avaliação da influência das variáveis independentes em estudo (X_1 , X_2 e X_3), nas respostas de interesse (variáveis dependentes), como nos parâmetros concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_x) e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$).

Para cada resposta foi feita uma análise de regressão multivariável, onde foram considerados todos os fatores, representando as três variáveis independentes e suas possíveis interações duplas e, ainda, os fatores quadráticos (variáveis independentes ao quadrado).

Junto às análises que foram realizadas, encontram-se os chamados níveis descritivos (p), que indicam os erros. Na análise de regressão, os valores de p indicam o menor erro em que se incorre ao afirmar que um determinado coeficiente tem influência na determinação do parâmetro estimado. Em outras palavras, testando o coeficiente correspondente a uma variável independente é possível verificar se esta tem importância na determinação do parâmetro estimado. Na análise de variância da regressão, por sua vez, o valor de p indica se houve um bom ajuste da equação obtida através da regressão, ou seja, se a regressão realizada foi satisfatória (RODRIGUES, 1998).

As análises dos parâmetros cinéticos foram realizadas com os níveis codificados das variáveis independentes (Tabela 28). Em todas as análises, o maior valor de p (valor de significância) aceito nas análises de variância das regressões foi de 0,05.

Tabela 28- Concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_x) e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$).

Ensaio	^a X ₁	^b X ₂	^c X ₃	X _m (mg.L ⁻¹)	P _x (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	Y _{X/N} (g.g ⁻¹)
A	-1	-1	-1	535,84	48,58	4,30
B	1	-1	-1	540,25	49,03	4,34
C	-1	1	-1	530,67	48,07	4,26
D	1	1	-1	573,11	52,31	4,63
E	-1	-1	1	664,00	61,40	3,12
F	1	-1	1	678,05	62,81	3,19
G	-1	1	1	561,94	51,19	2,60
H	1	1	1	541,86	49,19	2,50
I	-1,687	0	0	556,50	50,65	3,27
J	1,687	0	0	226,36	17,64	1,14
K	0	-1,687	0	508,76	45,88	2,96
L	0	1,687	0	421,48	37,15	2,40
M	0	0	-1,687	561,98	51,20	6,09
N	0	0	1,687	612,69	56,27	2,49
O	0	0	0	698,88	64,89	4,19
P	0	0	0	714,91	66,49	4,29
Q	0	0	0	721,01	67,10	4,33
R	0	0	0	693,34	64,33	4,15
S	0	0	0	735,25	68,53	4,42

^aX₁ = valor codificado da variável pH

^bX₂ = valor codificado da variável temperatura

^cX₃ = valor codificado da variável vazão mássica de uréia

VI.2.1. Concentração celular máxima

Nas tabelas 29 e 30 estão expostos os resultados da análise de regressão quadrática multivariável para concentração celular máxima (X_m) em função dos fatores estudados, bem como os resultados da análise de variância dessa regressão, respectivamente.

Tabela 29- Análise de regressão multivariável para concentração celular máxima (X_m) em função das variáveis estudadas.

Fator	Coefficiente de regressão	Erro padrão	Valor de t	<i>p</i>
Constante	721,126	26,635	27,074	0,000
X_1	-38,716	15,309	-2,530	0,028
X_2	-24,070	15,309	-1,570	0,144
X_3	22,963	15,309	1,499	0,162
X_1^2	-77,144	12,584	-6,130	0,000
X_2^2	-58,721	12,584	-4,666	0,001
X_3^2	-28,167	12,584	-2,238	0,047
$X_2 * X_3$	-33,243	21,650	-1,535	0,153

$R^2 = 0,75$

Tabela 30- Análise de variância do modelo de regressão multivariável para concentração celular máxima (Xm).

Fonte de variacao	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado medio	F- calculado	<i>P</i>
Modelo	229420,00	7	32774,300	8,740	0,001
erro	41247,80	11	3749,800		
Total	270668,00	18			

$$R^2 = 0,75$$

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

$$X_m = 721,13 - 38,72.X_1 - 24.X_2 + 22,90.X_3 - 77,14.X_1^2 - 58,72.X_2^2 - 28,16.X_3^2 - 33,24.X_2 * X_3$$

Para a resposta concentração celular máxima, verifica-se que as variáveis independentes que interferem sobre ela de forma significativa são o pH, temperatura e a vazão mássica de alimentação de uréia.

Há uma indicação de que Xm é uma função quadrática das variáveis X₁, X₂ e X₃, visto que estas são significativas para a resposta em questão (Tabela 29). Além disso, os coeficientes das variáveis ao quadrado são negativos, indicando que ocorre um aumento de Xm a medida que se eleva o valor das três variáveis até um determinado ponto, a partir do qual Xm começa a

diminuir a cada incremento das variáveis em estudo. Este comportamento pode-se observar através das superfícies de resposta de X_m em função de X_1 e X_2 (Figura 68), em função de X_1 e X_3 (Figura 70) e em função de X_2 e X_3 (Figura 72).

Os gráficos de contorno representando o efeito das variáveis independentes sobre X_m (Figura 69, Figura 71 e Figura 73) permitem concluir que a região de otimização do crescimento microbiano ocorreu nos níveis próximos ao ponto central das variáveis estudadas.

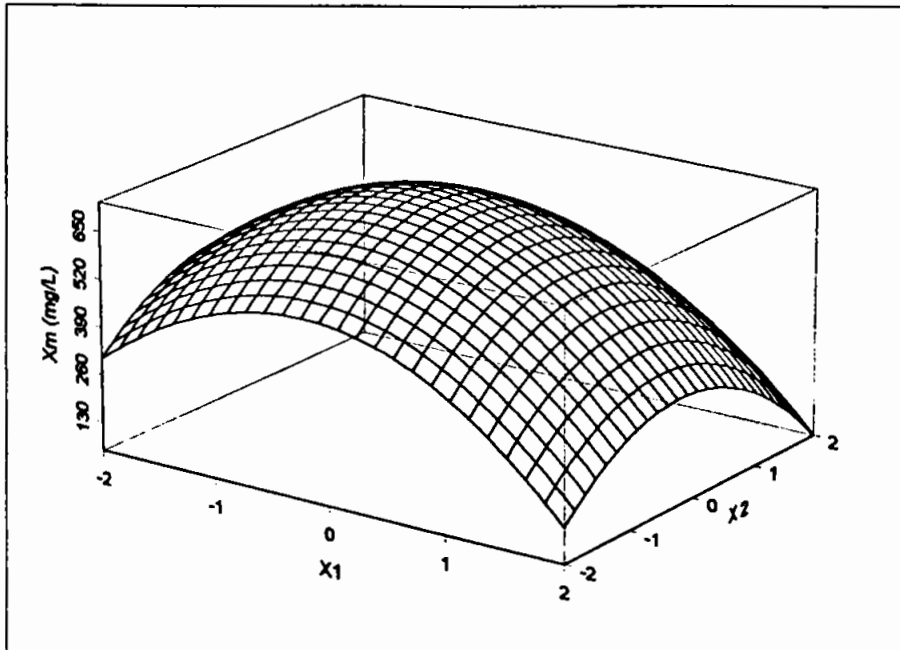


Figura 68-Superfície de resposta para concentração celular máxima (X_m) em função de X_1 e X_2 , para o nível central da variável X_3 .

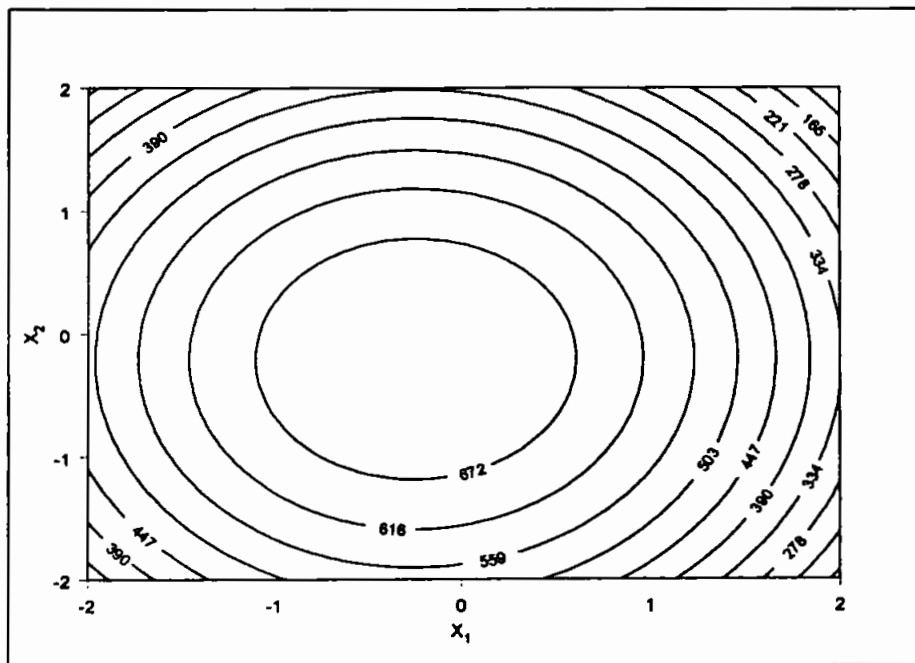


Figura 69-Gráficos de contorno para concentração celular máxima (X_m) em função de X_1 e X_2 , para o nível central da variável X_3 .

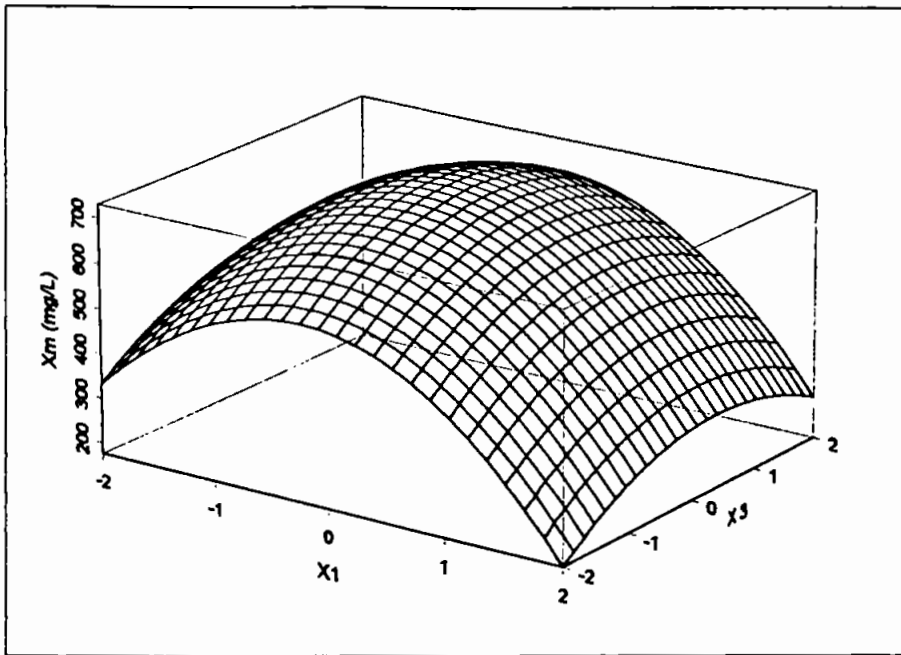


Figura 70-Superfície de resposta para concentração celular máxima (X_m) em função de X_1 e X_3 , para o nível central da variável X_2 .

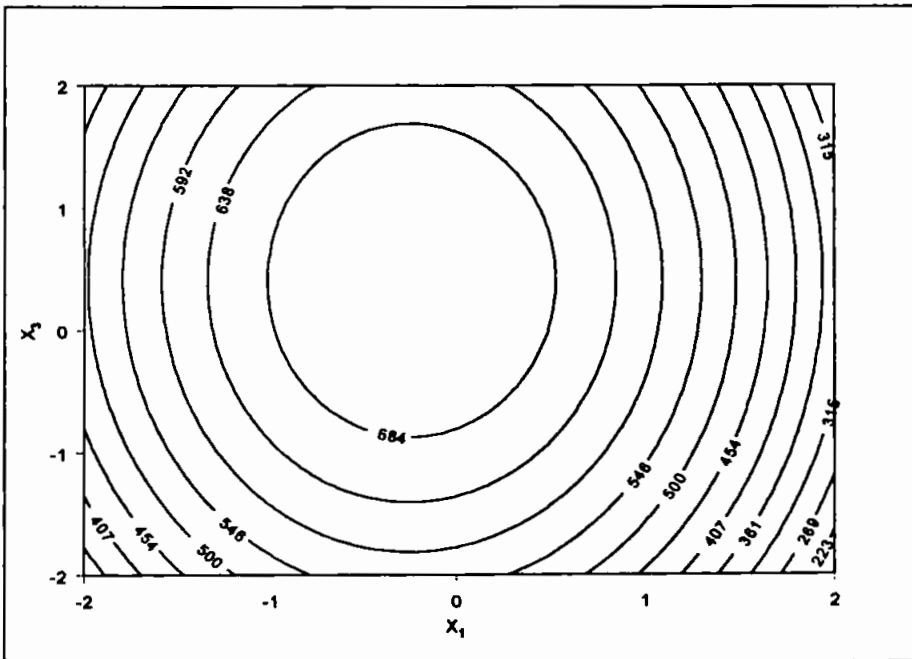


Figura 71-Gráficos de contorno para concentração celular máxima (X_m) em função de X_1 e X_3 , para o nível central da variável X_2 .

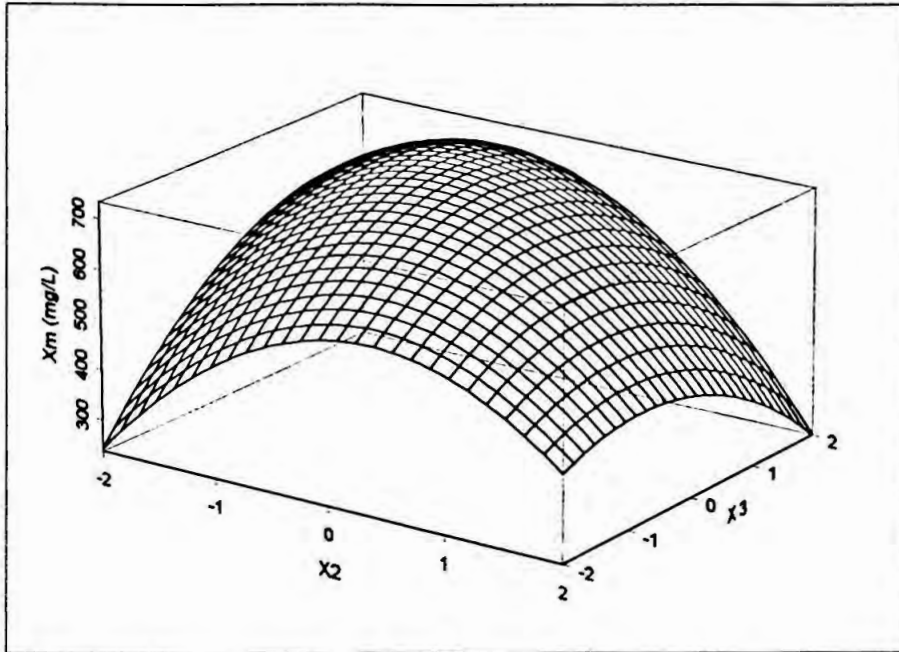


Figura 72-Superfície de resposta para concentração celular máxima (X_m) em função de X_2 e X_3 , para o nível central da variável X_1 .

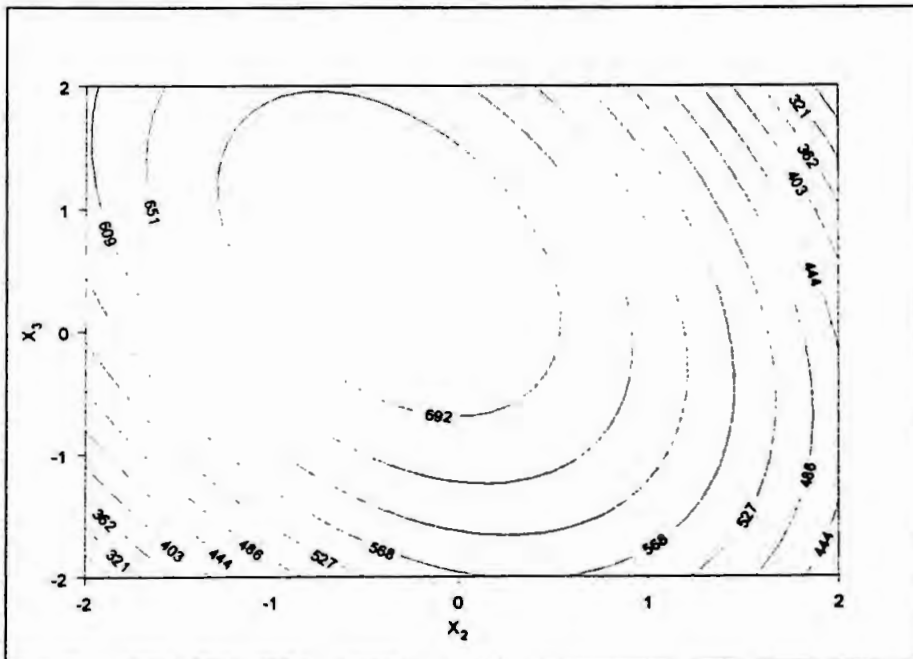


Figura 73-Gráficos de contorno para concentração celular máxima (X_m) em função de X_2 e X_3 , para o nível central da variável X_1 .

VI.2.2. Produtividade em células

Nas Tabelas 31 e 32 estão expostos os resultados da análise de regressão quadrática multivariável para produtividade em células (Px) em função das variáveis independentes, bem como os resultados da análise de variância dessa regressão, respectivamente.

Tabela 31- Análise de regressão multivariável para produtividade em células (Px) em função das variáveis estudadas.

Fator	Coefficiente de regressão	Erro padrão	Valor de t	<i>p</i>
Constante	67,113	2,664	25,195	0,0000
X ₁	-3,8716	1,531	-2,530	0,0280
X ₂	-2,407	1,531	-1,570	0,1440
X ₃	2,2963	1,531	1,499	0,1618
X ₁ ²	-7,7144	1,258	-6,130	0,0001
X ₂ ²	-5,87213	1,258	-4,666	0,0007
X ₃ ²	-2,8167	1,258	-2,238	0,0468
X ₂ *X ₃	-3,3243	2,165	-1,535	0,1529

$R^2 = 0,75$

Tabela 32- Análise de variância do modelo de regressão multivariável para produtividade em células (Px).

Fonte de variacao	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado medio	F- calculado	<i>p</i>
Modelo	2293,82	7	327,689	8,740	0,001
erro	412,54	11	37,504		
Total	270668,00	18			

$$R^2 = 0,75$$

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

$$Px = 67,11 - 3,87.X_1 - 2,4.X_2 + 2,290.X_3 - 7,7.X_1^2 - 5,87.X_2^2 - 2,82.X_3 - 3,32.X_2 * X_3$$

Tendo em vista que o tempo de cultivo foi estabelecido em dez dias para todos os ensaios, Px foi somente função da concentração celular final. Assim, como se observa pelos valores dos níveis descritivos das Tabelas 29 e 31, Px tem relação com as variáveis independentes idêntica à variável Xm. As correspondentes figuras de Px em função das possíveis combinações das variáveis são apresentadas a seguir (Figura 74 a 79).

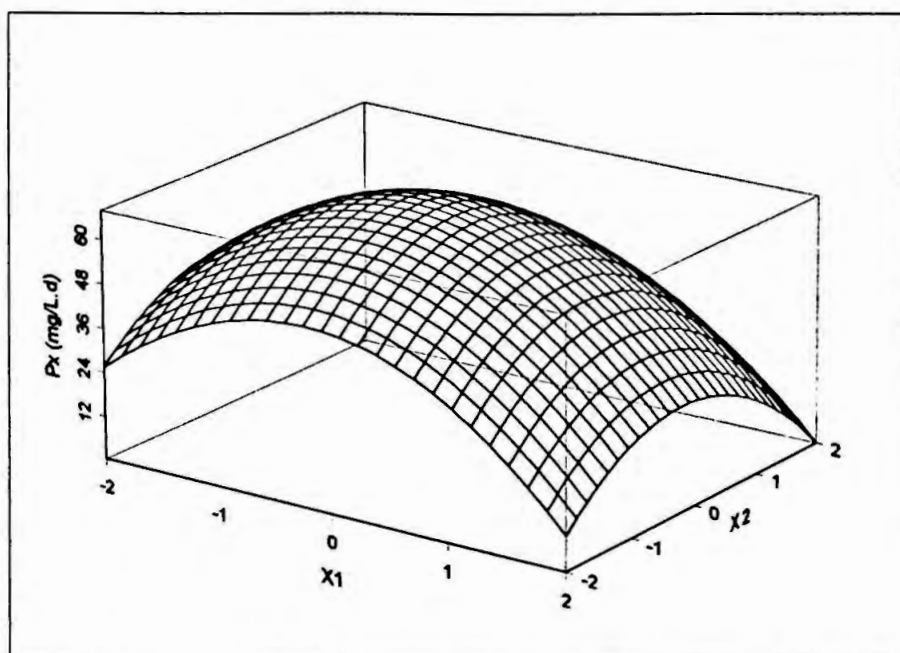


Figura 74-Superfície de resposta para produtividade em células (Px) em função de X_1 e X_2 , para o nível central da variável X_3 .

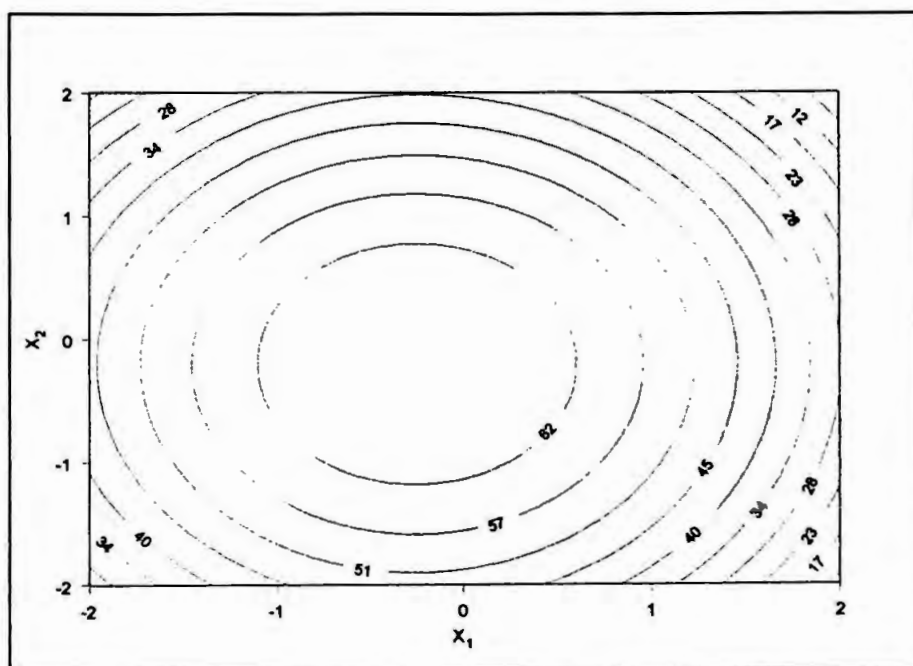


Figura 75-Gráficos de contorno para produtividade em células (Px) em função de X_1 e X_2 , para o nível central da variável X_3 .

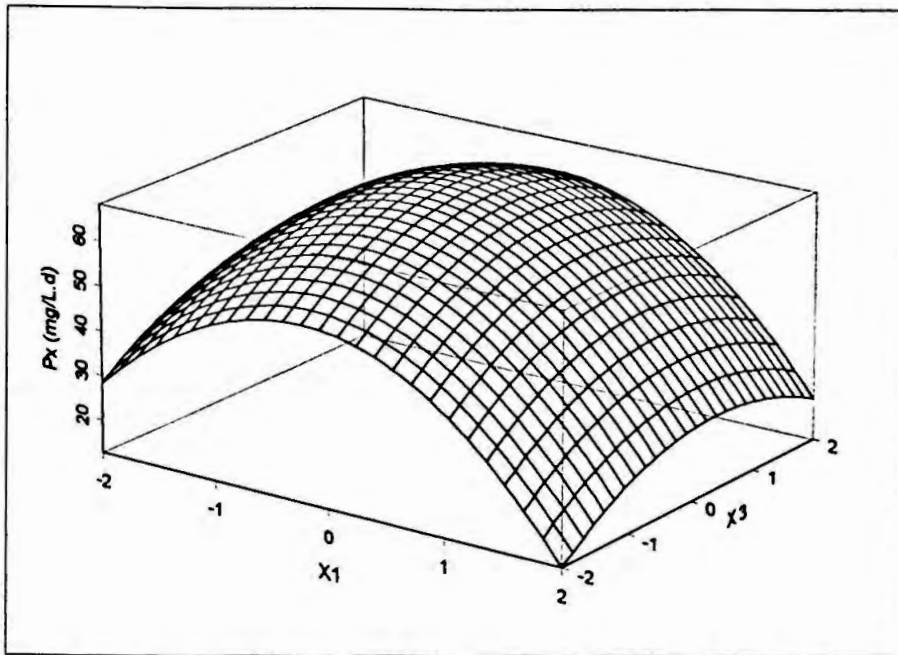


Figura 76-Superfície de resposta para produtividade em células (Px) em função de X_1 e X_3 , para o nível central da variável X_2 .

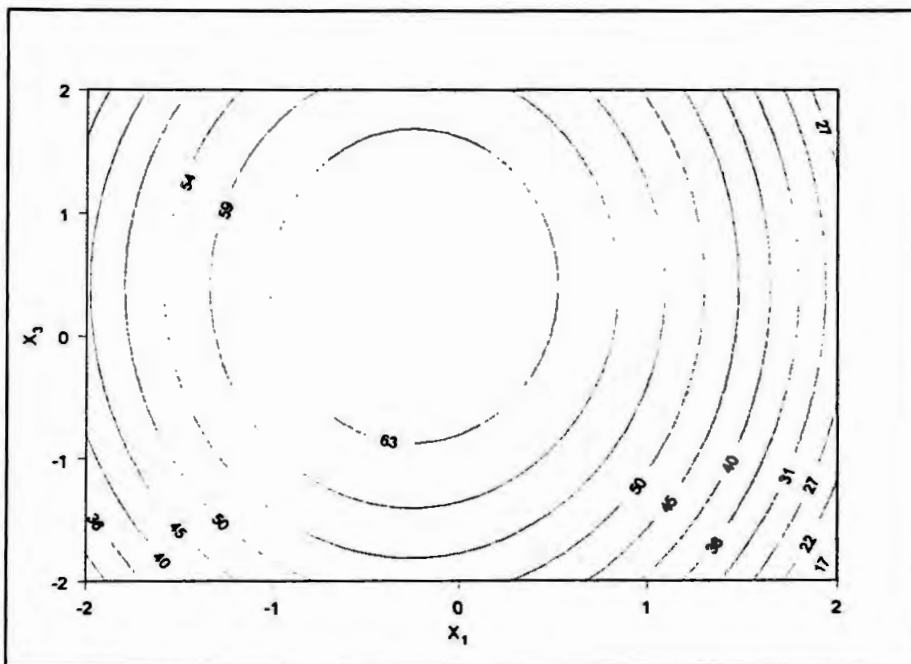


Figura 77-Gráficos de contorno para produtividade em células (Px) em função de X_1 e X_3 , para o nível central da variável X_2 .

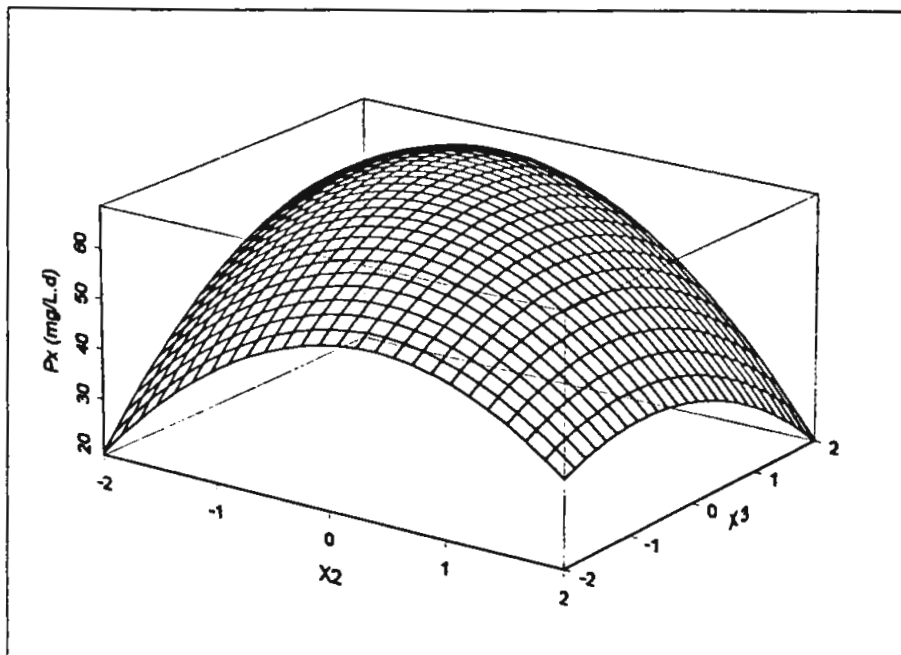


Figura 78-Superfície de resposta para produtividade em células (P_x) em função de X_2 e X_3 , para o nível central da variável X_1 .

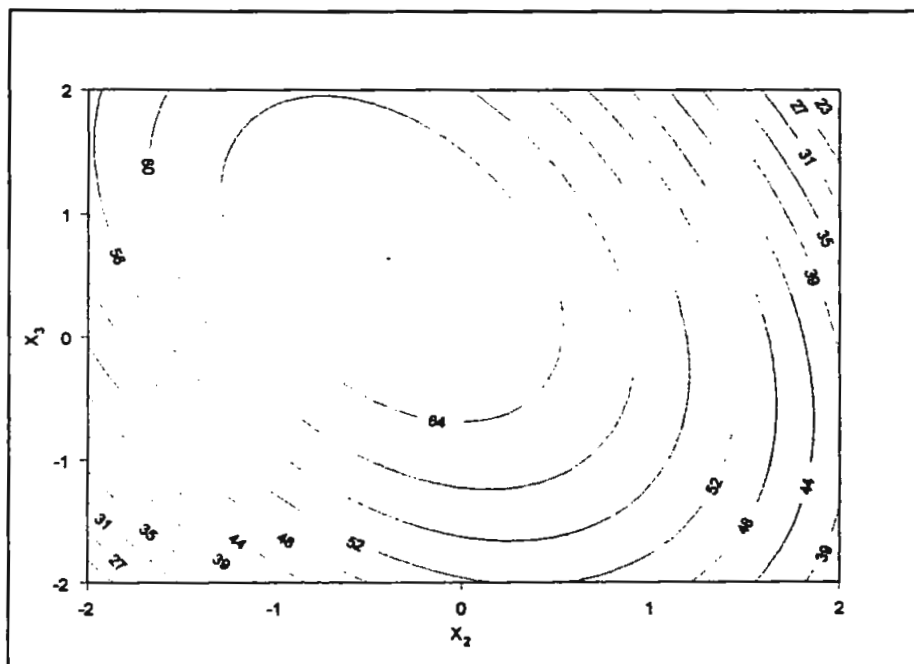


Figura 79-Gráficos de contorno para produtividade em células (P_x) em função de X_2 e X_3 , para o nível central da variável X_1 .

VI.2.3. Fator de conversão de nitrogênio em células

Nas tabelas 33 e 34 estão expostos os resultados da análise de regressão quadrática multivariável para fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função dos fatores acima citados, bem como os resultados da análise de variância dessa regressão, respectivamente.

Tabela 33- Análise de regressão multivariável para fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função das variáveis estudadas.

Fator	Coefficiente de regressão	Erro padrão	Valor de t	<i>p</i>
Constante	4,362	0,142	30,688	0,0000
X_1	-0,2425	0,103	-2,364	0,0331
X_3	-0,8325	0,103	-8,115	0,0000
X_1^2	-0,5033	0,081	-6,182	0,0000
X_3^2	-0,3846	0,081	-4,724	0,0003

$$R^2 = 0,87$$

Tabela 34- Análise de variância do modelo de regressão multivariável para fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$).

Fonte de variacao	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado medio	F- calculado	<i>P</i>
Modelo	20,56	4	5,139	30,522	0,000
erro	2,36	14	0,168		
Total	22,91	18			

$$R^2 = 0,87$$

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

$$Y_{X/N} = 4,36 - 0,243.X_1 - 0,833.X_3 - 0,503.X_1^2 - 0,385.X_2^2$$

As Figuras 80 a 85 representam a variação de $Y_{X/N}$ em função de X_1 , X_2 e X_3 conforme as possibilidades gráficas disponíveis.

Nas Figuras 80 e 81 verifica-se que as variáveis, pH e temperatura atingem o ponto máximo de $Y_{X/N}$ em valores intermediários de X_1 e X_2 . As Figuras 82 e 83 confirmam as relações quadráticas com $Y_{X/N}$ observadas para o efeito do pH e da temperatura. Por outro lado, estas figuras permitem concluir que $Y_{X/N}$ é função linear decrescente da variável X_3 (vazão mássica de uréia) isso confirma os resultados obtidos (Tabela 28), onde se verifica que o maior valor encontrado para $Y_{X/N}$ se deu no ensaio M. no entanto, deve ser ressaltado que nesta condição o crescimento celular não foi satisfatório, como visto anteriormente.

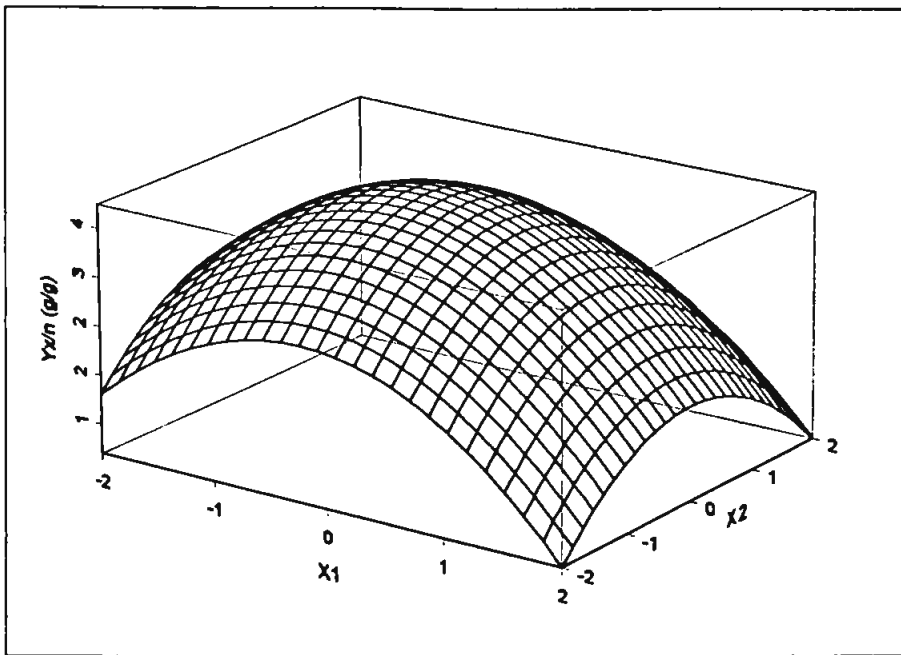


Figura 80-Superfície de resposta para fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função de X_1 e X_2 , para o nível central da variável X_3 .

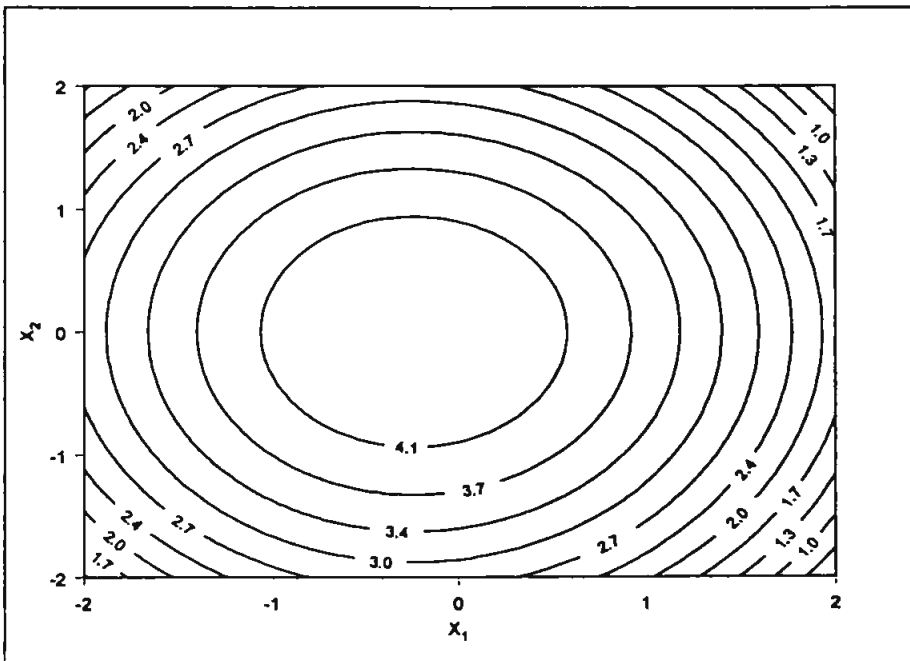


Figura 81-Gráficos de contorno para fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função de X_1 e X_2 , para o nível central da variável X_3 .

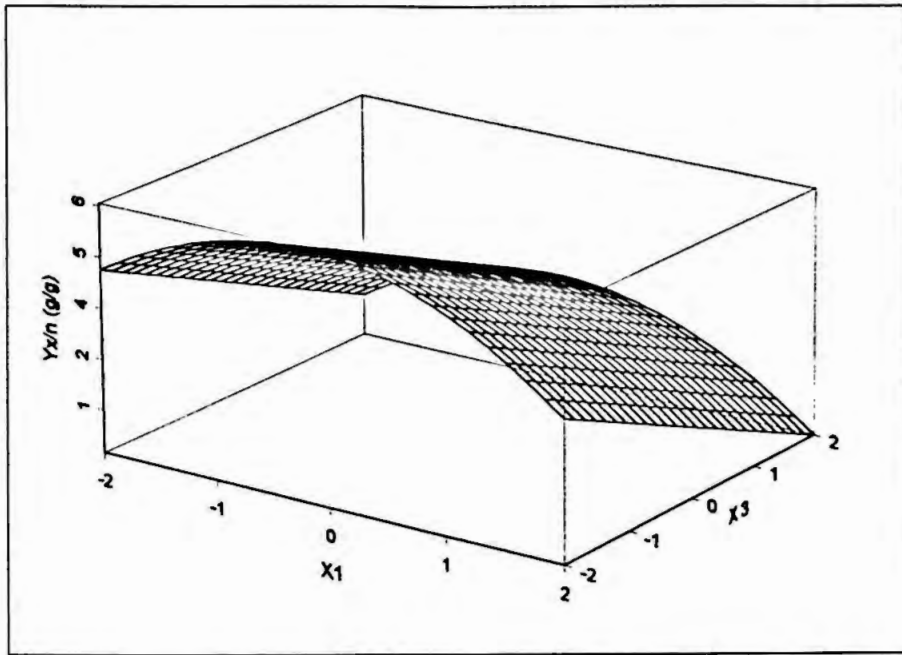


Figura 82-Superfície de resposta para fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função de X_1 e X_3 , para o nível central da variável X_2 .

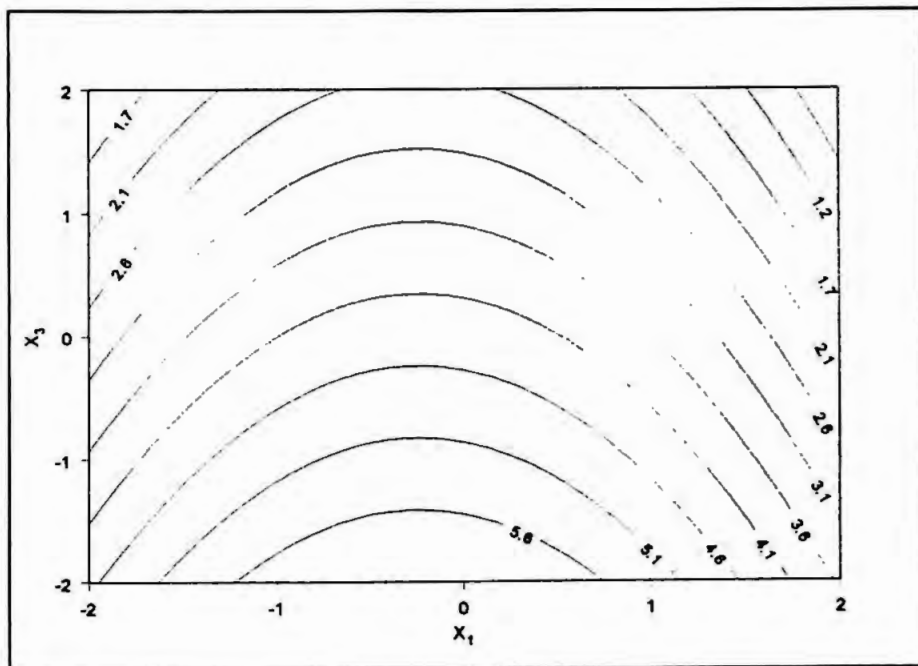


Figura 83-Gráficos de contorno para fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função de X_1 e X_3 , para o nível central da variável X_2 .

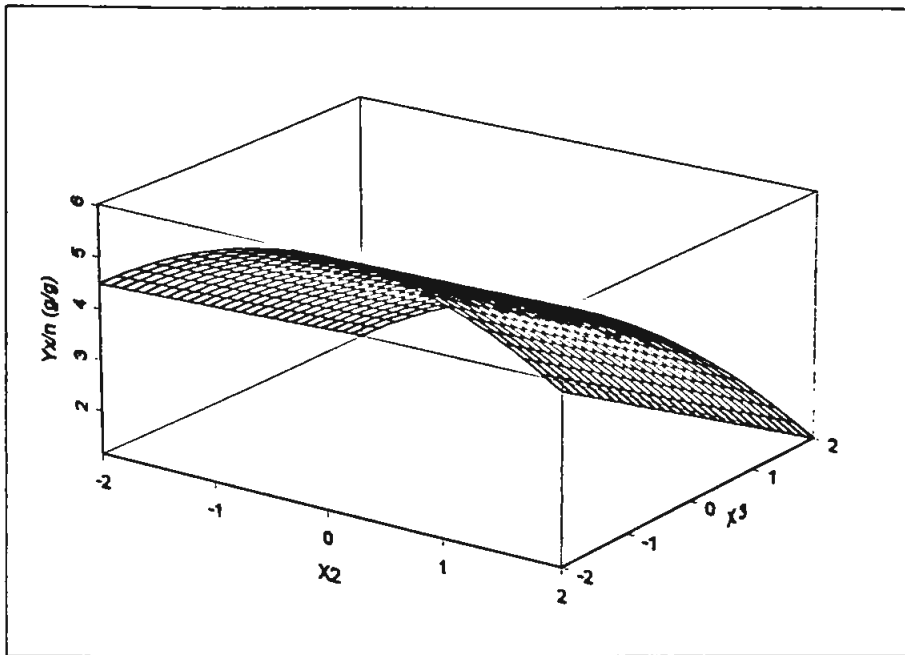


Figura 84-Superfície de resposta para fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função de X_2 e X_3 , para o nível central da variável X_1 .

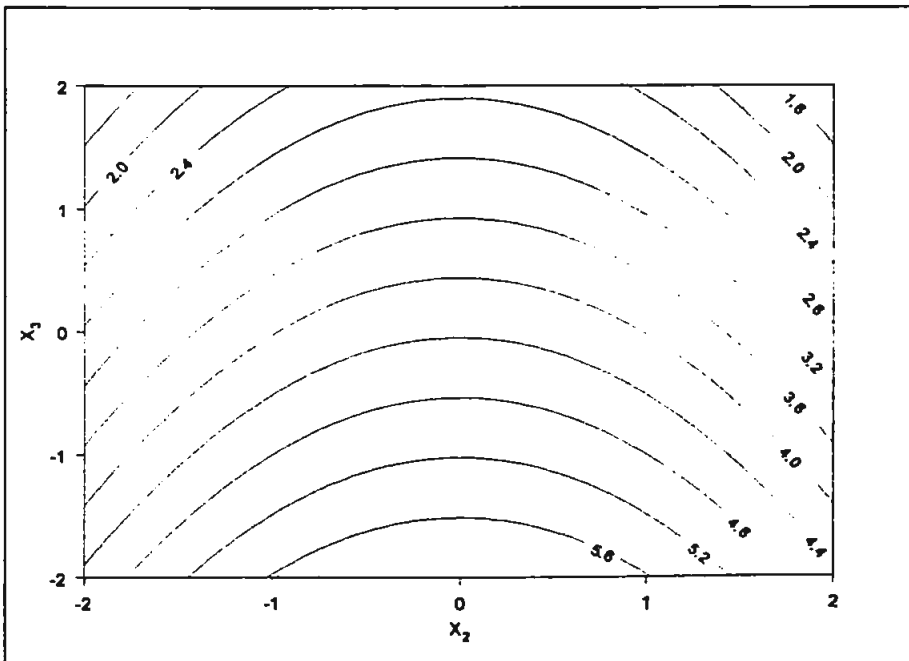


Figura 85-Gráficos de contorno para fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) em função de X_2 e X_3 , para o nível central da variável X_1 .

VII. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos experimentos realizados permitiram, nas condições estudadas concluir que:

1 – foram obtidos os seguintes modelos matemáticos para relacionar as variáveis dependentes concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_x) e fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$), com as variáveis independentes X_1 (valor codificado da variável pH), X_2 (valor codificado da variável temperatura) e X_3 (valor codificado da variável vazão mássica de uréia):

$$X_m = 721,13 - 38,72.X_1 - 24.X_2 + 22,90.X_3 - 77,14.X_1^2 - 58,72.X_2^2 - 28,16.X_3^2 - 33,24.X_2 \cdot X_3$$

$$P_x = 67,11 - 3,87.X_1 - 2,4.X_2 + 2,290.X_3 - 7,7.X_1^2 - 5,87.X_2^2 - 2,82.X_3 - 3,32.X_2 \cdot X_3$$

$$Y_{X/N} = 4,36 - 0,243.X_1 - 0,833.X_3 - 0,503.X_1^2 - 0,385.X_2^2$$

2 - O crescimento da *Spirulina platensis* realizado a pH controlado em 9,5, levou a resultados melhores ($X_m = 735 \text{ mg.L}^{-1}$; $P_x = 69 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) quando comparado com cultivo sem controle de pH ($X_m = 678 \text{ mg.L}^{-1}$; $P_x = 63 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$).

3 - Cultivos com uréia como fonte de nitrogênio em pH 9,5 e 30 °C, com adição de 140 mg de uréia por dia, levou a melhores resultados cinéticos ($X_m = 735 \text{ mg.L}^{-1}$; $P_x = 69 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$; $Y_{X/N} = 4,42 \text{ g.g}^{-1}$) que os cultivos controle com KNO_3 ($X_m = 653 \text{ mg.L}^{-1}$; $P_x = 60 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$; $Y_{X/N} = 1,71 \text{ g.g}^{-1}$).

4 – A melhor condição de cultivo da *Spirulina platensis* utilizando uréia como fonte de nitrogênio ocorreu a pH, 9,5; temperatura, 30 °C, vazão mássica de uréia, 140 mg.d^{-1} .

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDIN EL SHERIF, S.A.; CLEMENT, G. *Spirulina sp.* food algae: discovery of natural lakes at wadi el natrun in the Arab Republica of Egypt. **Rev. Inst. Fr. Pet. Ann. Combust. Liq.**, Paris, v.37, p.123-130, 1982.
- ABELIOVICH, A.; AZOV, Y. Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.31, p.801-806, 1976.
- ALEXEYEV, V.N. **Quantitative analysis**. Moscow: Mir Publishers, s.d. 524p.
- BALLONI, W.; MATERASSI, R.; PELOSI, E.; PUSHPARAJ, B.; FLORENZANO, G.; STENGEL, E.; SOEDER, C.J. Comparison of two different culture devices for mass production of microalgae. I. Yields of *Scenedesmus obliquos* and *Coelastrum sphaericum*. **Arch. Hydrobiol., Suppl.**, Stuttgart, v.60, n.3, p.324-331, 1981.
- BECKER, E.W.; VENKATARAMAN, L.V. **Production and processing of algae in pilot plant scale experiences of the Indo-German project**. North-Holland Biomedical Press, 1980.
- BECKER, E.W. Algae mass cultivation-production and utilization. **Process Biochem.**, Oxford, v.16, n.5, p.10-14, 1981.
- BELAY, A. Mass culture of *Spirulina* outdoors-the earthrise farms experience. In: VONSHAK, A., ed. *Spirulina platensis (Arthrospira)*: physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor and Francis, 1997. p.131-158.
- BELKIN, S.; BOUSSIBA, S. High internal pH conveys ammonia resistance in *S. platensis*. **Bioresour. Technol.**, Oxford, v.32, p.167-169, 1991.
- BENEMANN, J.R. Microalgae products and production: an overview: development industrial microbiology. **J. Ind. Microbiol.**, Amsterdam, v.31, suppl.5, p.247-256, 1990.

- BOROWITZKA, M.A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **J. Biotechnol.**, Oxford, v.70, p.313-321, 1999.
- BORZANI, W., KRAUTER, M., AQUARONE, E., SATO, S., PEREGO, L. Comparison of results obtained in fed-batch ethanol fermentation tests carried out with constant feeding rates and with periodic additions of the feeding mash. **Arq. Biol. Tecnol.**, Curitiba, v.31, n.4 p. 571-573,1988.
- BOUSSIBA, S. Ammonia uptake in the alkalophilic cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Plant Cell Physiol.**, Kyoto, v.30, p.303-308, 1989.
- BOUSSIBA, S.; RICHMOND, A.C. Phycocyanin as a storage protein in blue-green algae. **Arch. Microbiol.**, Berlin, v.125, p.143-147, 1980.
- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building**. New York: John Wiley, 1978. p.510. (Wiley series in probability and mathematical statistics).
- BOZE, H.; MOULIN, G.; GALZY, P. Production of microbial biomass. In: REHM, H.-J.; REDD, G.; PÜHLER, A.; STADLER, P., eds. **Biotechnology**. 2.ed. Weinheim:VCH, 1995. v.9, p.167-220.
- CARR, N.G.; WHITTON, B.A. **The biology of the blue-green algae**. Oxford: Blackwell Scientific, 1973. p.676. (Botanical monographs, v.9).
- CARVAJAL, N.; FERNÁNDEZ, M.; RODRÍGUEZ, J.P.; DONOSO, M. Urease of *Spirulina maxima*. **Phytochemistry**, Oxford, v.21, p.2821-2823, 1980.
- CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Fermentação descontínua alimentada. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgar Blucher, 2001. p.205-218.
- CARVALHO, J.C.M.; VITOLO, M.; SATO, S.; AQUARONE, E. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* grown in sugarcane blackstrap molasses

through a fed-batch process. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Totowa, v.104, 2003.
[No prelo].

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

CIFERRI, O. *Spirulina*: the edible microorganism. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.47, n.4, p.551-578, 1983.

CIFERRI, O.; TIBONI, O. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v.39, p.503-526, 1985.

CRUZ, A.J.G.; SILVA, A.S.; ARAUJO, M.L.G.C.; GIORDANO, R.C.; HOKKA, C.O. Modelling and optimization of the cephalosporin C production bioprocess in a fed-batch bioreactor with invert sugar as substrate. **Chem. Eng. Sci.**, Oxford, v.54, p.3137-3142, 1999.

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

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

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

DUNN, I.J.; MOR, J.R. Variable-volume continuous cultivation. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.17, n.12, p.1805-1822, 1975.

DURAND-CHASTEL, H. Production and use of *Spirulina* in Mexico. In: SHELEF, G.; SOEDER, C.J., eds. **Algae biomass**. Amsterdam: Elsevier; New York: North

- Holland, Biomedical Press, 1980. p.851. (International Symposium on the Production and Use of Micro-algae Biomass, 1, Acre, Israel, 1978).
- ECHEGARAY, O.F.; CARVALHO, J.C.M.; FERNANDES, A.N.R.; SATO, S.; AQUARONE, E.; VITOLO, M. Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugar-cane blackstrap molasses: invertase activity of intact cells in ethanol fermentation. **Biomass Bioenergy**, Oxford, v.19, p.39-50, 2000.
- FAINTUCH, B.L. **Análise comparativa da produção de biomassa a partir de três cianobactérias empregando distintas fontes nitrogenadas**. São Paulo, 1989. 192p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- FERRAZ C.A.M. Effects of lux and pH on *Spirulina platensis* growth. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.16, n.2, p.132-137, 1985.
- FERRAZ, C.A.M. Produção de *Spirulina máxima*: influência de ecofatores e uso de um sub produto da indústria alcooleira. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.17, n.1, p.70-74, 1986.
- FERRAZ, C.A.M.; AQUARONE, E.; KRAUTER, M. Utilização de sub-produtos da indústria alcooleira na obtenção de biomassa de *Spirulina máxima*. Parte II. Emprego do resíduo da destilação do mosto fermentado (vinhaça). **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.17, n.1, p.15-21, 1986.
- FOX, R.D. The microalgae *Spirulina*(Cyanophyceae)-A study of the conditions necessary for their growth: development of original production systems, particularity with reference to a village ecosystem. Strasbourg, 1983. 336p. Tese de Doutorado – University Louis Pasteur.
- GOLDMAN, J.C.; DENNETT, M.R.; RILEY, C.B. Effect of nitrogen-mediated changes in alkalinity on pH control and CO₂ supply in intensive microalgal cultures. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.24, p.619-631, 1982.

- HENRIKSON, R. **Earth food Spirulina**. California: Ronore Enterprises, 1989. p.180.
- JENSEN, S.; KNUTSEN, G. Influence of light and temperature on photoinhibition of photosynthesis in *Spirulina platensis*. **J. Appl. Phycol.**, Dordrecht, v.5, p.495-504, 1993.
- LEDUY, A.; ZAJIC, J.E. A geometrical approach for differentiation of an experimental function at a point applied to growth and product formation. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.25, p.805-810, 1973.
- LEDUY, A.; THERIEN, N. An improved method for optical density measurement of the semimicroscopic blue algae *Spirulina maxima*. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.19, p.1219-1224, 1977.
- LEE, B.; KIM, J.K. Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. **Aquacult. Eng.**, London, v.25, p.11-124, 2001.
- LICHFIELD, J.H. Single cell proteins. **Food Technol.**, Chicago, v.31, p.175-179, 1977.
- MAHAJAN, G.; KAMAT, M. γ -Linolenic acid production from *S. platensis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v.43, n.3, p.466-469, 1995.
- MILLER, A.G.; COLMAN, G. Evidence for HCO_3^- transport by the blue-green alga (cyanobacterium) *Coccochloris penicostis*. **Plant Physiol.**, Rockville, v.65, p.397-402, 1980.
- NAES, H.; POST, A.F. Transient states of geosmin, pigments, carbohydrates and proteins in continuous cultures of *Oscillatoria brevis* induced by changes in nitrogen supply. **Arch. Microbiol.**, Berlin, v.150, p.333-337, 1988.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 14.ed. Arlington, 1984. p.1141.

- OLGUIN, E.J.; GALICIA, S.; CAMACHO, R.; MERCADO, G. Production of *Spirulina* sp. in sea water supplemented with anaerobic effluents in outdoor raceways under temperate climatic conditions. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Berlin, v.48, p.242-247, 1997.
- PAOLETTI, C.; PUSHPARAJ, B.; TOMASELLI, L. Ricerche sulla nutrizione minerale di *Spirulina platensis*. In: CONGRESSO NAZIONALE DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI MICROBIOLOGIA, 17, Padua, 1975. **Atti**. Padua: Italian Society of Microbiology, 1975. p.833-839.
- PELIZER, L.H.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S.; MORAES, I.O. *Spirulina platensis* growth estimation by pH determination at different cultivations conditions. **Electronic J. Biotechnol.**, Valparaiso, v.5, n.3, p.251-257, 2002. Disponível em: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol5/issue3/full/8/8.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2003.
- PELIZER, L.H.; DANESI, E.D.G.; RANGEL, C.O.; SASSANO, C.E.N.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S.; MORAES, I.O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **J. Food Eng.**, Oxford, v.56, p.371-375, 2003.
- PELIZER, L.H.; SASSANO, C.E.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S.; GIOIELLI, L.A.; MORAES, I.O. Padronização do método de secagem da biomassa de *Spirulina platensis*. **Farm. Quim.**, São Paulo, v.32, n.1, p.37-40, 1999.
- 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**, Oxford, v.23, n.2, p.207-216, 1984.
- PULZ, O.; SCHEIBENBOGEN, K. Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. **Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.**, Berlin, v.41, p.124-48, 1998.

- RANGEL, C.O. **Influência da luz e uréia no crescimento e conteúdo de clorofila da biomassa de *Spirulina platensis***. São Paulo, 2000. 132p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- RICHMOND, A. Phototrophic microalgae. In: REHM, H.J.; REED, G., eds. **Biotechnology**. Weinheim:, 1983. v.3.
- RICHMOND, A.; QUIANG, H. Principles for efficient utilization of light for mass production of photoautotrophic microorganisms. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Chifton, v.63-65, p.649-658, 1997.
- RICHMOND, A. *Spirulina*. In: BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZA, L.J. *Microalgal Biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p.85-119.
- RODRIGUES, A. **Contribuição ao estudo do processo descontínuo alimentado de fermentação alcoólica**. São Paulo, 1998. 171p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- SANTILLAN, C. Mass production of *Spirulina*. **Experientia**, Basel, v.38, p.40-43, 1982.
- SASSANO, C.E.N. **Influência da uréia no crescimento e no teor do ácido graxo γ -linolênico na biomassa de *Spirulina platensis***. São Paulo, 1999. 144p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- SASSI, A.H.; FAUVART, L.; DESCHAMPS, A.M.; LEBEAULT, J.M. Fed-batch production of L-lisine by *Corynebacterium glutamicum*. **Biochem. Eng. J.**, Lausanne, v.1, p.85-90, 1998.
- SAXENA, P.N.; AHMAD, M.R.; SHYAM, R. Cultivation of *Spirulina* in sewage for poultry feed. **Experientia**, Basel, v.39, p.1077-1083, 1983.
- SOLORZANO, L. Determination of ammonia in natural waters by the phenol hypochlorite method. **Limnol. Oceanogr.**, Waco, v.14, p.799-801, 1969.

- STANCA, D.; POPOVIC, E. Urea as nitrogen source in modified zarrouk medium. **Rev. Roum. Biol. Ser. Biol.Veg.**, Bucharest, v.41, n.1, p.25-31, 1996.
- TRAVERSO, L.; BENITEZ, F.; WEILAND, P.; SANCHEZ, E.; DUPEYRON, R.; DOMINGUEZ, A.R. Experiments on immobilization of microalgae for nutrient removal in wastewater treatments. **Bioresour. Technol.**, Oxford, v.55, p.181-186, 1996.
- VONSHAK, A.; KANCHARAKSA, N.; BUNNAG, B.; TANTICHAROEN, M. Role of light and photosynthesis on the acclimation process of the cyanobacterium *Spirulina platensis* to salinity stress. **J. Appl. Phycol.**, Dordrecht, v.8, p.119-124, 1996.
- VONSHAK, A. Outdoor mass production of *Spirulina*: the basic concept. In: VONSHAK, A., ed. *Spirulina platensis (Arthrospira)*: physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor and Francis, 1997. p.79-99.
- WALACH, M.R.; BAZIN, M.J.; PIRT, S.J.; BALYUZI, H.H.M. Computer control of carbon-nitrogen ratio in *Spirulina platensis*. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.29, p.520-528, 1987.
- XIE, L.; WANG, D.L.C. Fed-batch cultivation of animal cell using different medium design concepts and feeding strategies. **Biotechnol Bioeng.**, New York, v.10, n.11, p.1175-1189, 1994.
- XUE, C., HU, Y., SAITO, H., ZHANG, Z., LI, Z., CAI, Y., OU, C., LIN, H., IMBS, A.B. Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*. **Food Chem.**, Oxford, v.77, n.1, p.9-13, 2002.
- YAMANE, T.; SHIMIZU, S. Fed-batch techniques in microbial processes. **Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.**, Berlin, v.30, p.148-194, 1984.
- YEE, L., BLANCH, H.W. Recombinant trypsin production in high cell density fed-batch cultures in *Escherichia coli*. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.41, p.781-790, 1993.

YOON, S.K.; KANG, W.K. Fed-batch operation of recombinant *E. coli* containing trp promoter with controlled specific growth rate. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v.43, p.995-999, 1994.

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

ZHANG, X.W.; ZHANG, Y.M.; CHEN, F. Application of mathematical models to the determination optimal glucose concentration and light intensity for mixotrophic culture of *Spirulina platensis*. **Process Biochem.**, Oxford, v.34, p.477-481, 1999.