

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

**Cultivo de *Spirulina platensis* por processo  
descontínuo alimentado repetitivo utilizando uréia  
como fonte de nitrogênio**

**MARCELO CHUEI MATSUDO**

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

São Paulo

2006

**MARCELO CHUEI MATSUDO**

**Cultivo de *spirulina platensis* por processo descontínuo  
alimentado repetitivo utilizando uréia como fonte de nitrogênio**

**Comissão Julgadora**

**Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE**

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

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

**Prof. Dr. Carlos Eduardo Nascimento Sassano  
2º Examinador**

**São Paulo, 25 de julho de 2006**

**Aos meus pais, Chuken e Hatsuko,  
por se dedicarem à minha educação.**

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho, pela orientação, pelos ensinamentos, pela confiança, pela amizade e por dizer que “no final, tudo dá certo”.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da Bolsa de Mestrado e do “Auxílio a Pesquisa”.

Ao Prof. Tit. Sunao Sato, pelo apoio e incentivo.

À Profa. Dra. Telma Mary Kaneko pelas sugestões de correção no trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, em especial a Kleber A. de Almeida (Lab. Tecnologia de Fermentações), Elza e Miriam (Secretaria-FBT).

Aos funcionários da Biblioteca do Conjunto das Químicas.

Aos secretários da Pós-Graduação - FCF, Jorge Lima e Elaine Ishiko pela amizade e eficiência no atendimento aos pós-graduandos.

A Raquel Pedrosa Bezerra, pelas discussões, por compartilhar seus conhecimentos, pela companhia e pelo indispensável apoio nos experimentos.

Aos amigos pós-graduandos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, em especial a Cinthia (Urso), Lívia, Mayla, Denise, Lucas (Petit) e André.

À Universidade de São Paulo:

- pela possibilidade de participação no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino na Faculdade de Ciências Farmacêuticas e no Instituto de Ciências Biomédicas.
- pela disponibilização do CEPEUSP (Centro de Práticas Esportivas), onde além de praticar diversos esportes, pude também conquistar muitas amizades.
- pela concessão da vaga no CRUSP (Conjunto Residencial).

Aos amigos do Crusp e outros, principalmente Acácio, Adalberto, Jony, Patrícia, Claudinei, Rodrigo, Artemir e Leonardo.

Aos meus pais (Chuken e Hatsuko), irmãs (Rosa, Elena, Luiza, Rosária, Lúcia e Eliza) e irmão (Marcos) por sempre se preocuparem com a minha formação e ainda aos meus cunhados (Bernardo, Marcelo, César e Mauro), cunhada (Luciana) e sobrinhos (Adriana, Alessandra, Marina, Daniel, André e Lumi) pelo incentivo e apoio.

Aos amigos da graduação (Instituto de Biociências de Rio Claro / Unesp), pelos bons momentos ao longo dos cinco anos do curso de Ciências Biológicas e pelo incentivo à realização da Pós Graduação.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Industrial que junto com meu orientador de Iniciação Científica, Prof. Dr. Jonas Contiero, me ajudaram a encontrar o gosto pela ciência.

"Por que nos impressionamos e ficamos tão obcecados  
com coisas e feitos de grandes dimensões,  
quando na verdade são as coisas pequenininhas que,  
combinadas, tornam as grandes coisas possíveis?"

(Bradley Trevor Greive)

## RESUMO

A cianobactéria *Spirulina platensis* possui alto teor de proteína e vem sendo cultivada fotoautotroficamente para a produção de biomassa microbiana. Embora as fontes convencionais de nitrogênio utilizadas para a produção de *Spirulina spp.* sejam os nitratos, há a possibilidade do emprego de uréia, utilizando o processo descontínuo alimentado, com diminuição do custo de produção. O emprego do processo descontínuo alimentado repetitivo para o cultivo desta microalga utilizando a uréia como fonte de nitrogênio poderia facilitar os cultivos em escala de produção, pois não haveria a necessidade de preparo de inóculo para cada ciclo de produção, além de possibilitar o aumento da produtividade do sistema. Este trabalho tem o objetivo de verificar o comportamento do cultivo microbiano com este processo, visto que não foram encontrados na literatura tais estudos para o cultivo de *S. platensis*. Foi verificada a influência dos parâmetros fração de corte, tempo de alimentação de uréia e ciclos de cultivo neste tipo de processo, tendo como variáveis dependentes a concentração celular máxima ( $X_m$ ), a produtividade em células ( $P_x$ ) e o fator de conversão de nitrogênio em células ( $Y_{x/n}$ ), bem como a composição protéica e lipídica da biomassa obtida. Os resultados obtidos permitem concluir que, de uma forma geral, uma fração de corte de 80% associada a um tempo de alimentação de 6 dias leva a melhores condições de cultivo com bons resultados nos três parâmetros cinéticos (em média,  $2101 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $219 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  e  $10,3 \text{ mg.mg}^{-1}$  para  $X_m$ ,  $P_x$  e  $Y_{x/n}$ , respectivamente), que foram reprodutíveis ao longo de 3 ciclos.

**Palavras-chave:** *Spirulina platensis*; processo descontínuo alimentado repetitivo; uréia.

## SUMMARY

*Spirulina platensis*, with high protein content, can be cultivated photoautotrophically for the microbial biomass production. Although nitrates are the conventional source of nitrogen for the *Spirulina* spp. production, there is a possibility of the use of urea, in a fed-batch process, leading to a cost reduction. The application of repeated fed-batch process, using urea as nitrogen source, could propitiate the cultivation of this microorganism in a production scale, since it would not need to prepare the inoculum for each production cycle. Moreover, there is a possibility to improve the productivity of this process. The aim of this work was to verify the behavior of the microbial cultivation employing this process, since this kind of study for *Spirulina platensis* production was not found in literature. The influence of withdrawn rate, urea feeding time and cultivation cycles were studied, considering maximum cell concentration ( $X_m$ ), cell productivity ( $P_x$ ), nitrogen-to-cell conversion ( $Y_{x/n}$ ), and protein and total fat contents as dependent variables. The results show that in general a 80% of withdrawn rate associated with 6 days of feeding time leads to the best cultivation conditions with satisfactory results of  $X_m$ ,  $P_x$  and  $Y_{x/n}$  (2101 mg.L<sup>-1</sup>, 219 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> and 10.3 mg.mg<sup>-1</sup>, in average, respectively), that could be reproduced through the three cycles.

**Key words:** *Spirulina platensis*; repeated fed-batch process; urea.

## LISTA DE FIGURAS

		Pág.
<b>Figura 1</b>	<i>Spirulina platensis</i> (UTEX 1926).....	23
<b>Figura 2</b>	Minitanques de PVC para cultivo de <i>S. platensis</i> .....	37
<b>Figura 3</b>	Curva de calibração para determinação da concentração de <i>Spirulina platensis</i> .....	44
<b>Figura 4</b>	Curva de calibração para determinação da concentração de amônia total em meio de cultivo.....	45
<b>Figura 5</b>	Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 1 (Tempo de alimentação: 1 dia; Fração de corte: 20%).....	47
<b>Figura 6</b>	Concentração celular (X) em função do tempo para ensaio 2 (Tempo de alimentação: 3 dias; Fração de corte: 20 %).....	49
<b>Figura 7</b>	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para ensaio 3 (Tempo de alimentação: 5 dias; Fração de corte: 20 %).....	51
<b>Figura 8</b>	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para ensaio 4 (Tempo de alimentação: 4 dias; Fração de corte: 50 %).....	53
<b>Figura 9</b>	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para ensaio 5 (Tempo de alimentação: 7 dias; Fração de corte: 50 %).....	55
<b>Figura 10</b>	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para ensaio 6 (Tempo de alimentação: 10 dias; Fração de corte: 50 %).....	58
<b>Figura 11</b>	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para ensaio 7 (Tempo de alimentação: 6 dias; Fração de corte: 80 %).....	60
<b>Figura 12</b>	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para ensaio 8 (Tempo de alimentação: 10 dias; Fração de corte: 80 %).....	63
<b>Figura 13</b>	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para ensaio 9 (Tempo de alimentação: 14 dias; Fração de corte: 80 %).....	66



<b>Figura 14</b>	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para ensaio 10 (Tempo de alimentação: 8 dias; Fração de corte: 95 %)	68
<b>Figura 15</b>	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para ensaio 11 (Tempo de alimentação: 12 dias; Fração de corte: 95 %)	71
<b>Figura 16</b>	Concentração celular (X) e pH em função do tempo para ensaio 12 (Tempo de alimentação: 16 dias; Fração de corte: 95 %)	74
<b>Figura 17</b>	Representação esquemática da assimilação de bicarbonato por <i>Spirulina platensis</i>	79
<b>Figura 18</b>	Porcentagem de Amônia e Amônio em Função do pH	80
<b>Figura 19</b>	Concentrações relativas de gás carbônico, bicarbonato carbonato (%) em função do pH	81
<b>Figura 20</b>	Esquema da assimilação da amônia proveniente de uréia e nitrato de sódio	82

## LISTA DE TABELAS

	Pág.	
<b>Tabela 1</b>	Composição de aminoácidos de proteínas de <i>S. platensis</i> e <i>S. maxima</i> (mg.g <sup>-1</sup> proteína bruta Nx6,25) em comparação com o recomendado pela FAO (Food and Agriculture Organization) para crianças pré-escolares.....	20
<b>Tabela 2</b>	Comparação entre produção de proteína de <i>Spirulina</i> spp. e de outras fontes.....	24
<b>Tabela 3</b>	Matriz de ensaio.....	42
<b>Tabela 4</b>	Concentração celular (X), valor de pH e concentração de amônia total no Ensaio 1.....	46
<b>Tabela 5</b>	Concentração celular (X), valor de pH e concentração de amônia total no Ensaio 2.....	48
<b>Tabela 6</b>	Concentração celular (X), valor de pH e concentração de amônia total no Ensaio 3.....	50
<b>Tabela 7</b>	Concentração celular (X), valor de pH e concentração de amônia total no Ensaio 4.....	52
<b>Tabela 8</b>	Concentração celular (X), valor de pH e concentração de amônia total no Ensaio 5.....	54
<b>Tabela 9</b>	Concentração celular (X), valor de pH e concentração de amônia total no Ensaio 6.....	56
<b>Tabela 10</b>	Concentração celular (X), valor de pH e concentração de amônia total no Ensaio 7.....	59
<b>Tabela 11</b>	Concentração celular (X), valor de pH e concentração de amônia total no Ensaio 8.....	61
<b>Tabela 12</b>	Concentração celular (X), valor de pH e concentração de amônia total no Ensaio 9.....	64

<b>Tabela 13</b>	Concentração celular (X), valor de pH e concentração de amônia total ao longo do Ensaio 10.....	67
<b>Tabela 14</b>	Concentração celular (X), valor de pH e concentração de amônia total no Ensaio 11.....	69
<b>Tabela 15</b>	Concentração celular (X), valor de pH e concentração de amônia total no Ensaio 12.....	72
<b>Tabela 16</b>	Conteúdo de proteínas e lipídeos na biomassa de <i>Spirulina platensis</i> obtida nos ensaios realizados.....	75
<b>Tabela 17</b>	Parâmetros cinéticos: concentração celular máxima ( $X_m$ ), produtividade em células ( $P_x$ ) e fator de conversão de nitrogênio em células ( $Y_{x/N}$ ) dos ensaios realizados.....	76
<b>Tabela 18</b>	Levantamento de preços de uréia e nitrato de sódio (grau analítico e comercial).....	83
<b>Tabela 19</b>	Análise estatística de covariância (ANCOVA) aplicada aos dados experimentais de concentração celular máxima ( $X_m$ ).....	84
<b>Tabela 20</b>	Análise estatística de variância (ANOVA) aplicada aos dados experimentais de concentração celular máxima ( $X_m$ ) em cada Fração de Corte.....	86
<b>Tabela 21</b>	Análise estatística de covariância (ANCOVA) aplicada aos dados experimentais de produtividade de células ( $P_x$ ).....	87
<b>Tabela 22</b>	Análise estatística de covariância (ANCOVA) aplicada aos dados experimentais de fator de conversão de nitrogênio em células ( $Y_{x/N}$ ).....	89
<b>Tabela 23</b>	Análise estatística de covariância (ANCOVA) aplicada aos dados experimentais de teor de proteínas na biomassa obtida.....	91
<b>Tabela 24</b>	Análise estatística de covariância (ANCOVA) aplicada aos dados experimentais de teor de lipídeos na biomassa obtida.....	92

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>6</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
3.1. Aspectos nutricionais e composição da biomassa.....	19
3.2. Distribuição geográfica e histórico.....	21
3.3. Classificação e Morfologia .....	22
3.4. Produção de <i>Spirulina platensis</i> .....	23
3.5. Fonte de Nitrogênio .....	26
3.6. Processos de cultivo .....	29
3.6.1 O processo descontínuo alimentado repetitivo .....	31
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
4.1. Microrganismo: .....	34
4.2. Manutenção da <i>Spirulina platensis</i> : .....	34
4.3. Meio de cultivo:.....	34
4.3.1. Meio padrão para cultivo de <i>S. platensis</i> : .....	34
4.3.2. Meio modificado.....	35
4.4. Preparo do inóculo.....	36
4.5. Dispositivo para cultura.....	36
4.6. Descrição de um experimento típico.....	37
4.7. Técnicas Analíticas .....	38
4.7.1. Acompanhamento do cultivo.....	38
4.7.1.1. Determinação da concentração celular.....	38
4.7.1.1.1. Construção da curva de calibração para determinação da concentração celular .....	38
4.7.1.2. Determinação da concentração de amônia total .....	39
4.7.1.3. Determinação do pH .....	39
4.7.2. Avaliação da biomassa obtida .....	40
4.7.2.1. Lipídeos totais.....	40

4.7.2.2. Proteínas totais .....	40
4.8. Experimentos realizados .....	41
4.8.1. Processo de cultivo .....	41
4.8.2. Planejamento Experimental.....	41
4.9. FORMA E ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	42
4.9.1. Fórmulas e métodos utilizados nos cálculos dos parâmetros cinéticos.....	43
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
5.1. Curva de Calibração para determinação de concentração celular .....	44
5.2. Curva de Calibração para determinação da concentração de amônia total .....	44
5.3. Resultados referentes aos acompanhamentos dos ensaios 1 a 12 .....	45
5.4. CRESCIMENTO DE <i>Spirulina platensis</i> .....	77
5.5. SUBSTITUIÇÃO DO NITRATO DE SÓDIO PELA URÉIA.....	81
5.6. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS .....	83
5.6.1. Análise da concentração celular máxima ( $X_m$ ) .....	84
5.6.2. Análise da produtividade em células ( $P_x$ ) .....	86
5.6.3. Análise do fator de conversão de nitrogênio em células ( $Y_{x/n}$ ) .....	89
5.6.4. Análise do teor de proteínas e lipídeos da biomassa. ....	91
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>94</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>95</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de microrganismos fotossintéticos, como microalgas e cianobactérias, tem sido amplamente estudada na biotecnologia, pois esses microrganismos apresentam um sistema biológico muito eficiente para a utilização da energia solar para a produção de compostos orgânicos (VONSHAK, 1997). Dentre eles, destacam-se as *Spirulina* spp., cianobactérias filamentosas, capazes de formar naturalmente grandes colônias em águas superficiais tropicais e subtropicais contendo altos níveis de carbonato e bicarbonato (TOMASELLI, 1997).

*Spirulina* é um dos gêneros mais conhecidos, dentro do grupo de microrganismos fotoautotróficos, e foi produto de consumo dos Astecas, no Vale do México, e da população na região do Lago Chaad, na África (PARADA *et al.*, 1998).

Quando este microrganismo foi re-descoberto pelo chamado “mundo civilizado”, seu grande atrativo foi o fato de apresentar excelente fonte protéica e crescimento rápido em ambiente aquático rico em sais (HAYASHI *et al.*, 1996). Desde então, essa cianobactéria tem sido usada como suplemento alimentar por humanos por possuir grande quantidade de minerais e ácidos graxos poliinsaturados como, por exemplo, o ácido gama linolênico. Além disso, *Spirulina* spp. são utilizadas como fontes de vitaminas (especialmente B12),  $\beta$ -caroteno, ficocianina e clorofila. Recentemente, outras substâncias e nutrientes foram purificados dessa biomassa, alguns inclusive com grande importância para a indústria farmacêutica (BOROWITZKA, 1995).

Desde a década de 1970, *Spirulina platensis* é comercializada como um alimento seguro para o consumo humano e aprovada, para a nutrição humana, por vários órgãos governamentais, agências de saúde e outras associações em mais de 80 países. Baseados nas pesquisas sobre qualidade e segurança, realizados por décadas, muitos países e organizações têm estabelecido padrões de qualidade e segurança de *Spirulina* spp.. Atualmente, mais de 70% de *Spirulina* spp. comercializadas se destinam ao

consumo humano, principalmente para fins nutracêuticos (BELAY, 1997 e VONSHAK, 1997).

Enquanto grandes empresas de alguns países se dedicaram à produção de *Spirulina* sp. visando atender ao mercado consumidor, centros de pesquisa em todo o mundo começam a estudá-la sob diversos aspectos como perfil bromatológico em células cultivadas sob diferentes condições físico químicas; diversificação das fontes de nutrientes para o cultivo e utilização da biomassa na biopurificação de efluentes (NUNES *et al.*, 2003).

Este trabalho busca avaliar a viabilidade da aplicação do processo descontínuo alimentado repetitivo para a produção de *Spirulina platensis*, tendo uréia como fonte alternativa de nitrogênio. Neste tipo de processo, uma porção de um processo em batelada é retirada a determinados intervalos de tempo e a parte residual da cultura é usada como inóculo para a próxima batelada. Segundo BAJPAI & BAJPAI (1987), além de poder levar a um aumento da produtividade do sistema, o processo descontínuo alimentado repetitivo apresenta a vantagem de não haver necessidade de se preparar inóculo para o segundo e os subseqüentes ciclos. Então, esse pode ser considerado como um dos eficientes sistemas para produção econômica de biomassa.

## 2. OBJETIVOS

Verificar a influência dos parâmetros fração de corte, tempo de alimentação de uréia e ciclos de cultivo no processo descontínuo alimentado repetitivo para produção de *S. platensis*, tendo como variáveis dependentes a concentração celular máxima, a produtividade em células e o fator de conversão de nitrogênio em células, bem como a composição protéica e lipídica da biomassa obtida.



### 3. REVISÃO DE LITERATURA

Segundo BOROWITZKA (1999), o cultivo de microalgas é um ramo da moderna biotecnologia, embora haja registros de cultivo de *Chlorella vulgaris* já em 1890. O cultivo de microrganismos fotossintéticos é um processo vantajoso devido não só à produção de proteínas de alto valor biológico para nutrição humana e animal, mas também para obtenção de outros produtos como pigmentos, lipídeos e vitaminas (AARONSON *et al.*, 1980).

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

Ainda enfocando o uso de *Spirulina spp.* como prebiótico, VARGA *et al.* (2002) investigaram o efeito da biomassa de *Spirulina platensis* em organismos deteriorantes e na flora microbiana característica de leite fermentado por uma combinação de bactérias *starter*, *Acidophilus-Bifidus-Termophilus* (ABT), durante um armazenamento a 15 °C e 4 °C. Verificaram que a biomassa da cianobactéria exerceu influência positiva sobre a viabilidade das bactérias *starter* ABT, independentemente da temperatura em que o produto foi armazenado. Além disso, não se detectou organismos deteriorantes em nenhuma das amostras, indicando excelentes condições sanitárias durante o processamento e embalagem do produto. Por fim, a biomassa de *Spirulina platensis* aumentou o conteúdo de aminoácidos essenciais e vitaminas, além de melhorar a composição de ácidos graxos. Segundo os autores, a abundância de componentes bioativos na *Spirulina platensis* apresenta grande importância sob o ponto de vista nutricional, haja visto que essa biomassa proporciona uma nova oportunidade na produção de alimentos funcionais derivados do leite.

Estudos sobre o uso de algas como trocadores gasosos fotossintéticos para emprego em viagens espaciais também foram relatados. MORIST *et al.* (2001) cultivaram *Spirulina platensis* em fotobiorreator contínuo, para emprego em alimentos, acreditando que organismos fotossintéticos, provendo material comestível, possam sustentar a vida do homem em missões espaciais. Esses pesquisadores desenvolveram um processo de recuperação da biomassa e verificaram processos de secagem e armazenamento que pudessem manter suas características por um maior tempo. De acordo com os resultados, concluiu-se que preparações baseadas em *Spirulina platensis* podem ser consideradas como uma potencial fonte alimentar para o homem no espaço, pois a biomassa da microalga pode ser eficientemente obtida e tratada, sendo microbiologicamente segura, além de manter a composição química e nutricional.

O cultivo de microrganismos fotossintéticos apresenta alguns problemas de implementação devido ao alto custo de extração e secagem do produto, bem como à presença de membrana celulósica, de baixa digestibilidade. Esse tipo de problema, entretanto, não ocorre quando se emprega *Spirulina* sp. (DILLON *et al.*, 1995; RICHMOND, 1988). A cianobactéria *Spirulina platensis* apresenta tamanho relativamente grande dos agregados de células e parede celular mucopolissacarídica, facilmente digerível (HENRIKSON *et al.*, 1989).

A produção comercial de microalgas em grande escala iniciou-se na década de 1960, no Japão, com o emprego de *Chlorella* (BOROWITZKA, 1999). Desde então, a indústria de biotecnologia de microalgas tem se expandido e diversificado significativamente, e esse crescimento é bem ilustrado pela produção de *Spirulina* spp. que, segundo BOROWITZKA (1999), de menos de 30 toneladas em 1975, a produção global desse microrganismo aumentou para mais de 2.500 toneladas em 1998. Shimamatsu (2004) estima que a produção total anual dessa biomassa seja de 3000 toneladas.

### 3.1. Aspectos nutricionais e composição da biomassa

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

Além do ácido  $\gamma$ -linolênico, podem ser encontrados também ácido palmítico, ácido palmitoléico, ácido esteárico, ácido oléico e ácido linoléico (SASSANO, 2004). Este autor, cultivando *Spirulina platensis* em processo contínuo, utilizando cloreto de amônio como fonte de nitrogênio, verificou que a biomassa obtida em todos os experimentos realizados apresentou uma grande quantidade de ácidos graxos polinsaturados, o que indica a importância desses compostos na constituição do microrganismo. Além disso, este mesmo trabalho mostra que as diferentes condições de cultivo empregadas, em processo contínuo, não influenciou no teor do ácido  $\gamma$ -linolênico na biomassa final. Por outro lado, COHEN (1997) mostra que diferentes cepas de *Spirulina* apresentam diferentes teores de ácido  $\gamma$ -linolênico.

Esse microrganismo apresenta um satisfatório conteúdo balanceado de aminoácidos, contendo inclusive metionina, um aminoácido ausente na maioria das outras microalgas (PARADA *et al.*, 1998; McKASKLE, 2003).

*Spirulina* spp. são uma das mais ricas fontes protéicas de origem microbiana (55 a 70%), colocando-se bem acima das carnes (15 a 25%) (DILLON *et al.*, 1995) e da soja (cerca de 40%) (MAEHLER *et al.*, 2003). Além disso, o corpo humano assimila por volta de 95% das proteínas de *Spirulina* spp., ao passo que apenas cerca de 20% das proteínas provenientes da carne de boi são assimiladas (MAIER *et al.*, 2000). No seu espectro de aminoácidos, todos os aminoácidos estão próximos dos padrões estabelecidos pela FAO (Food and Agriculture Organization), como pode ser observado na Tabela 1 (DILLON *et al.*, 1995).

Tabela 1 – Composição de aminoácidos de proteínas de *S. platensis* e *S. maxima* (mg.g<sup>-1</sup> proteína bruta Nx6,25) em comparação com o recomendado pela FAO (Food and Agriculture Organization) para crianças pré-escolares.

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

Fonte: DILLON *et al.* (1995)

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

Atualmente, a maior parte da clorofila produzida e comercializada é obtida por fontes vegetais. Há, no entanto, um crescimento no interesse na área biotecnológica para obtenção de corantes de outras fontes. Nesse contexto, o emprego de processos de cultivo microbiano apresenta algumas vantagens em relação às fontes vegetais, como por exemplo, a possibilidade

de um cultivo contínuo e com rápida multiplicação dos microrganismos (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004).

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

### 3.2. Distribuição geográfica e histórico

As *Spirulina* spp. vivem 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, como México, Chade, Etiópia, Quênia, Zaire e Zâmbia (ABDIN EL SHERIF & CLÉMENT, 1982).

A biomassa de *Spirulina* sp. seca era consumida pela população asteca residente nas proximidades do Lago Texcoco na época da colonização espanhola. Tenochtitlán (atual cidade do México), densamente povoada na época da colonização espanhola, possuía praças e mercados onde a biomassa desse microrganismo era vendida com o nome de *tecuítlatl*. (LACAZ-RUIZ, 2003).

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

Sabe-se, atualmente, que a espécie *Spirulina maxima* existe em estado semi-natural no lago Texcoco, sendo industrialmente explorada pela companhia Texcoco Sosa S.A., desde 1972 (DURAND-CHASTEL, 1980)

Outro lago onde a *Spirulina* sp. tem sido muito estudada é o Chade. Neste lago, a *Spirulina platensis* pode se tornar a espécie dominante e tem

sido usada como alimento há muito tempo. Em 1940, DANGEARD relatou a presença de *Spirulina platensis* neste lago, na então África Equatorial Francesa, hoje, República do Chade. A biomassa dessa cianobactéria era vendida seca em um mercado de Massacory, a 50 km do Lago Chade, para ser então utilizada como molho acompanhante da dieta-padrão de milhete. *Spirulina platensis* está presente também nos lagos do vale Rift, a leste da África, onde representa a principal fonte alimentar de pequenos flamingos (*Phoenicoptera* sp.), habitantes dessa região. Neste lago, as cianobactérias são ingeridas pelos copépodos ou pelos cladóceros que, posteriormente, servem de alimento aos peixes e, finalmente, às aves (LACAZ-RUIZ, 2003).

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

### 3.3. Classificação e Morfologia

O gênero *Spirulina* pertence à família *Oscillatoriaceae* e compreende o grupo das cianobactérias filamentosas (microalgas verde-azuladas). É caracterizado por cadeias de células, constituindo um filamento na forma de espiral, denominado tricoma (Figura 1). Os tricomas são constituídos por células cilíndricas, curtas e largas, revestidas por uma fina membrana. Seu diâmetro pode variar de 6 a 12  $\mu\text{m}$ , e as estruturas helicoidais formadas por este filamento podem apresentar diâmetros que variam de 30 a 70  $\mu\text{m}$ . As dimensões celulares, o grau de ondulação e o comprimento dos filamentos variam de espécie para espécie. Esta última característica também pode variar conforme as condições ambientais de crescimento (HENRIKSON, 1989; CIFERRI e TIBONI, 1985; TOMASELLI, 1997; PELOSI *et al.*, 1982).



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

Fonte: UNIVERSIDADE DO TEXAS, 2006.

A reprodução de *Spirulina* spp. ocorre por divisão binária, sendo que periodicamente tem-se a quebra do tricoma em uma célula intercalária que perde seu citoplasma e é convertida em um necrídio. Esta quebra origina cadeias curtas de células, denominadas hormogônios, que diferem dos tricomas maduros devido à falta de motilidade, tamanho celular reduzido e morfologia diferenciada (CIFERRI e TIBONI, 1985).

Na verdade, segundo TOMASELLI (1997), essa espécie foi desconsiderada como membro do gênero *Spirulina* e incluída no gênero *Arthrospira* (da mesma ordem Oscillatoriales) por Castenholz (1989), oficialmente aceito em *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Mesmo assim, a designação "*Spirulina*" tem se mantido.

### 3.4. Produção de *Spirulina platensis*

As *Spirulina* spp. apresentam muitas vantagens em relação a outros produtos agrícolas, pois é um microrganismo aquático, não requer solo fértil e não causa erosão nem contaminação de terras ou águas (MAIER *et al.*, 2000). A Tabela 2 mostra a área de terra requerida por outras importantes fontes de alimentos para a produção de 1 Kg de proteína em comparação

com a requerida para produzir a mesma quantidade de proteína de *Spirulina* spp. Observa-se que o cultivo de *Spirulina* spp. produz 26,6 vezes mais por área que a soja e 316,7 vezes mais que a carne de boi, e além disso, requer um volume muito menor de água.

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

Fonte de proteína <sup>a</sup>	Área necessária (m <sup>2</sup> )	Água necessária (L)
<b><i>Spirulina</i> spp.</b>	0,6	2.100
<b>Soja</b>	16,0	9.000
<b>Milho</b>	22,0	12.500
<b>Grãos<sup>b</sup></b>	190,0	105.000

<sup>a</sup>: Valores estão indicados para produção de 1 Kg de proteína.

<sup>b</sup>: Produção de 60 Kg de grãos para alimentação de bovino que resultará em 1 Kg de proteína animal.

Fonte: MAIER *et al.* (2000)

Os principais fatores que influenciam o crescimento de microrganismos fotoautotróficos são luz e temperatura.

Observa-se a dependência do crescimento celular em função da intensidade luminosa. Existe, entretanto, um limite denominado ponto de saturação luminosa, sendo da ordem de 5 a 10 Klux para cianobactérias (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004; DANESI *et al.*, 2004; MORIST, 2001). O cultivo sob altas intensidades luminosas 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). Segundo SAMUELSSON *et al.* (1985), a fotoinibição também pode ocorrer sob intensidades luminosas moderadas se a taxa fotossintética estiver limitada por fatores estressantes, como baixas temperaturas.

A temperatura interfere no desenvolvimento do cultivo de cianobactérias e está intimamente associado à luz, principalmente em cultivos ao ar livre (*outdoor*). A taxa de fixação de CO<sub>2</sub> ou evolução de O<sub>2</sub>



(fotossíntese ) e respiração da *Spirulina* são duas atividades metabólicas altamente dependentes da temperatura (TORZILLO & VONSHAK, 1994)

Outro fator importante no cultivo em larga escala é a agitação da cultura para manter, em meio líquido , as células em suspensão, prevenir sedimentação e homogeneizar minerais, temperatura e luz (BECKER & VENKATARAMAN , 1980). É importante ajustar a velocidade de agitação do sistema ao tempo de geração do microrganismo a ser cultivado para evitar o rompimento de tricomas (LITCHFIELD, 1977). A agitação também garante a eliminação de oxigênio supersaturado (RICHMOND, 1983).

Se os níveis de luz e temperatura não são limitantes, outros fatores, como concentração de nutrientes, pH e salinidade podem ser alterados buscando o aumento da produção da biomassa.

Vários tipos de estudos são conduzidos com o intuito de aumentar a produção de metabólitos específicos ou de biomassa, bem como de redução dos custos de produção.

MACEDO & ALEGRE (2001) investigaram a influência do teor de nitrogênio e da temperatura na produção de lipídeos em cultivo de *Spirulina maxima*. Para isso, cultivaram a microalga em meios com 2,5 g/L de NaNO<sub>3</sub>, 0,2 g/L de NaNO<sub>3</sub> e em ausência de nitrogênio, nas temperaturas de 25 °C e 35 °C. Observaram que houve um aumento de aproximadamente três vezes do conteúdo de lipídeos, quando diminuiu-se o teor de nitrogênio e a temperatura, sugerindo que é viável o cultivo de *Spirulina maxima* em condições limitantes visando a produção de lipídeos ricos em ácidos graxos poliinsaturados essenciais.

DANESI *et al.* (2004) estudaram cultivo de *Spirulina platensis* utilizando, paralelamente, duas fontes de nitrogênio: KNO<sub>3</sub> e uréia. Empregou-se intensidade luminosa mais alta na fase inicial do cultivo, para promover o crescimento celular, seguida por uma redução da intensidade luminosa para promover o aumento da produção de clorofila. Observou-se que a redução da intensidade luminosa de 5 para 2 klux, a partir do 9º ou 13º dia de cultivo, usando tanto KNO<sub>3</sub> quanto uréia como fonte de nitrogênio, é eficiente para promoção do aumento da produção total de clorofila pela

microalga em até 29%, em comparação com os cultivos com intensidade luminosa fixa.

De acordo com PIORRECK *et al.* (1984), a concentração de clorofila, na biomassa de *Spirulina platensis*, aumenta com o acréscimo da concentração de nitrogênio no meio de cultivo. Sabe-se ainda que a quantidade e qualidade do nitrogênio disponível, influenciam também o conteúdo de proteínas, bem como de outros compostos da microalga.

### 3.5. Fonte de Nitrogênio

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

Na *Spirulina platensis* a deficiência de nitrogênio durante o período de crescimento leva a um decréscimo na produção de ficocianina e clorofila e a composição dos ácidos graxos pode ser afetada pela condições drásticas de falta deste nutriente (FUNTEU *et al.*, 1997).

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

Em todas as microalgas, nas condições estudadas, o aumento da quantidade de nitrogênio no meio aumenta a quantidade de biomassa produzida (PIORRECK *et al.*, 1984).

Trabalhos na literatura têm mostrado que o uso de nitrato como fonte de nitrogênio garante altas concentrações de biomassa de *Spirulina platensis*, o que justifica a ampla utilização dos meios de cultivo de ZARROUK (1966), PAOLETTI *et al.* (1975) e SCHLÖSSER (1982), que empregam  $\text{KNO}_3$  ou  $\text{NaNO}_3$ . Contudo, sob o ponto de vista econômico, a busca de fontes de nitrogênio mais baratas como uréia e sais de amônio é particularmente atrativa.

A utilização de uréia como fonte de nitrogênio promove um ganho energético devido a sua hidrólise espontânea em meio alcalino, formando

amônia, que é facilmente assimilada pela *Spirulina*. No caso do nitrato, o microrganismo precisa reduzi-lo a nitrito (em uma reação catalisada pela enzima nitrato redutase) que por conseguinte é reduzido em amônia (em uma reação catalisada pela enzima nitrito redutase). Esse processo de redução de nitrito em amônia requer gasto de energia. (HATORI & MYERS, 1966)

Outra vantagem da uréia em relação aos nitratos é que cada molécula de uréia fornece 2 átomos de nitrogênio, ao passo que cada molécula de  $\text{NaNO}_3$ , por exemplo, fornece apenas 1 átomo. (DANESI *et al.*, 2002)

Em particular, o uso de uréia sob condições alcalinas pode ser desvantajoso, em processo descontínuo, devido à hidrólise deste sal à amônia e conseqüente perda por volatilização (DANESI *et al.*, 2002) ou devido à inibição do crescimento pela toxicidade de amônia a altos níveis (SASSANO *et al.*, 2004). Por isso, há a necessidade do controle do suprimento de uréia durante o cultivo.

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

SANCHEZ-LUNA *et al.* (2004) mostraram que os cultivos de *Spirulina platensis* pelo processo descontínuo alimentado, com taxa de alimentação constante, com regime de adição intermitente e contínuo exibiram resultados estatisticamente coincidentes. Dessa forma, indicam que, quando a uréia é adicionada com taxa constante, ela pode ser adicionada de forma intermitente, sem que haja prejuízo no desenvolvimento microbiológico, o que além de ser menos trabalhoso, também é economicamente vantajoso, pois não necessita de equipamentos para bombeamento constante do nutriente.

DANESI *et al.* (2002) estudaram os efeitos da adição contínua de uréia e das diferentes temperaturas sobre o crescimento de *Spirulina platensis*, cultivado em processo descontínuo alimentado. Observaram que a adição

contínua de uréia em uma taxa exponencialmente crescente, a 30 °C, possibilitou um ganho de biomassa equivalente a 37% e conseqüentemente, uma maior quantidade de clorofila. Isso com um custo bem menor se comparado a cultivos com emprego de KNO<sub>3</sub>.

RANGEL-YAGUI *et al.* (2004) investigaram a influência da intensidade de luz e do emprego de uréia como fonte de nitrogênio sobre o conteúdo de clorofila na biomassa de *Spirulina platensis*. Para isso, realizaram processos descontínuos alimentados de cultivo empregando uréia, com aumento exponencial de alimentação, em diferentes intensidades de luz, comparando os resultados com aqueles obtidos em cultivo padrão, empregando KNO<sub>3</sub> como fonte de nitrogênio. Concluíram que a melhor produção de biomassa foi observada em cultivo com uso de uréia como fonte de nitrogênio, em comparação ao emprego de KNO<sub>3</sub>. Observaram também que a melhor produtividade de clorofila (o que reflete o balanço entre crescimento celular e concentração de clorofila na biomassa) ocorreu com uréia em uma concentração total adicionada de 500 mg/L com intensidade luminosa de 3500 lux.

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

### 3.6. Processos de cultivo

Quando se pensa em executar um processo de cultivo microbiano, normalmente se imagina preparar um certo meio de cultura que seja adequado à nutrição e desenvolvimento do microrganismo, bem como o acúmulo do produto desejado, colocar este meio de cultura em um biorreator, adicionar o microrganismo responsável pelo processo biológico (inocular) e aguardar que o processo ocorra. Após um determinado tempo de cultivo, imagina-se retirar o meio fermentado do reator e executar as operações unitárias necessárias para a recuperação do produto. Essa descrição é típica de um processo descontínuo simples ou descontínuo tradicional, também chamado de batelada clássica (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001).

Esse processo é o mais seguro quando se tem o problema de manutenção de condições de assepsia (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001). Além disso apresenta grande flexibilidade de operação, condição de controle mais estreito da estabilidade genética do microrganismo e a possibilidade de se identificar todos os materiais relacionados quando se está desenvolvendo um determinado lote de produto, o que é vital para a indústria farmacêutica. Ademais, é o mais utilizado na indústria de alimentos, para produção de iogurte, chucrute, picles, cerveja, vinho entre outros (CARVALHO & SATO, 2001).

Além do processo descontínuo, um reator biológico ainda pode ser operado em processo semicontínuo, contínuo, ou descontínuo alimentado (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001).

O processo semicontínuo é a operação em que uma vez colocados no reator o meio de fermentação e o inóculo, as operações que se seguem obedecem à seguinte ordem: 1<sup>o</sup>) aguarda-se o término do cultivo; 2<sup>o</sup>) retira-se parte do meio fermentado, mantendo-se no reator o restante; 3<sup>o</sup>) adiciona-se ao reator um volume de meio de cultivo igual ao volume de meio fermentado retirado na operação anterior. Em outras palavras, o meio fermentado não retirado na segunda operação serve de inóculo ao meio de cultivo adicionado na terceira operação. Reinicia-se, desse modo, a seqüência de operações,

que será repetida enquanto não houver queda da produtividade do processo (BORZANI, 2001).

O processo contínuo é realizado por meio de alimentação contínua de meio de cultura ao reator a uma determinada vazão constante e por uma retirada contínua de meio de caldo fermentado, de forma a se ter o volume de reação constante, a fim de que o sistema atinja a condição de estado estacionário (“steady-state”) (PAMBOUKIAN, 2003). Neste caso, o sistema pode operar por longos períodos de tempo em estado estacionário, decorrendo desta situação uma série de vantagens em relação ao processo descontínuo tradicional (FACCIOTTI, 2001). Industrialmente, esse processo é empregado no tratamento de efluentes (LI *et al.*, 2005b) e na produção de etanol (BORZANI, 2001b). Adicionalmente, seu uso tem sido testado para diversas finalidades, levando a resultados satisfatórios, seja em processos visando produção industrial ou mesmo em processos para estudos de comportamento microbiano frente a distintas condições experimentais (SASSANO, 2004; PAMBOUKIAN, 2003; DOMINGUES *et al.*, 2005).

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 do processo (CARVALHO & SATO, 2001b). Em alguns casos, todos os nutrientes são gradualmente alimentados à dorna (YAMANE & SHIMIZU, 1984). Nesse tipo de operação, mudança de volume pode ou não ocorrer, dependendo da concentração de substrato no meio de alimentação e da taxa de evaporação do sistema (CARVALHO & SATO, 2001b).

Algumas das finalidades ao se empregar o processo descontínuo alimentado são: minimização dos efeitos do controle do metabolismo celular, prevenção da inibição por substrato ou precursores, minimização da formação de produtos de metabolismo tóxicos, superação de problemas freqüentes de estabilidade em processo contínuo, adequação do processo fermentativo a condições operacionais, estudo de cinética de processos fermentativos.

Este processo, também conhecido como fermentação em batelada alimentada, tem importância tanto em escala industrial como em nível de pesquisa e permitiu a viabilização do uso de uréia (DANESI *et al*, 2002; RANGEL-YAGUI *et al*, 2004) e cloreto de amônio (CARVALHO *et al*, 2004) no cultivo de *Spirulina platensis*.

O processo descontínuo alimentado apresenta uma diversidade de aplicações, permitindo algumas variações com a finalidade de ajustá-lo à produção de diversos produtos obtidos por fermentação. Uma dessas variações é o processo descontínuo alimentado repetitivo

### **3.6.1. O processo descontínuo alimentado repetitivo**

No processo descontínuo alimentado repetitivo, uma fração constante de volume da cultura é removida a intervalos de tempos fixos, podendo ser mantido indefinidamente. Este volume retirado é destinado à separação de produto fermentado, sendo recomposto até seu valor máximo através da adição de novo meio com uma determinada vazão de alimentação. Enchimentos e esvaziamentos repetidos de volumes específicos resultam numa operação cíclica de variação de volume, podendo por isso ser designado também como processo descontínuo alimentado cíclico. Este tipo de processo tem sido utilizado industrialmente para produção de levedura e de antibióticos com o intuito de aproveitar como inóculo o microrganismo que está crescendo com alta velocidade de crescimento e de trabalhar por mais tempo com células que estão na fase produtiva, respectivamente, levando ao aumento de produtividade do sistema (CARVALHO & SATO, 2001b; WEIGAND, 1981; MORI, *et al.*, 1983; KELLER & DUNN, 1978).

KUMAR *et al.* (2000) empregaram o processo descontínuo alimentado repetitivo para produção de lovastina, um metabólito secundário produzido por *Aspergillus terreus*, de grande aplicação no tratamento de hipercolesterolemia. Utilizando maltodextrina como fonte de carbono e água de maceração de milho como fonte de nitrogênio, obtiveram um aumento de

73% na produção de lovastina, em comparação com o processo descontínuo de cultivo.

GIRIDHAR & SRIVASTAVA (2001) cultivaram *Gluconobacter oxydans* em processo descontínuo alimentado repetitivo para conversão de D-sorbitol em L-sorbose, com o objetivo de reduzir o tempo ocioso do biorreator, processar altas concentrações de sorbitol em um tempo relativamente curto e com isso otimizar a produtividade da fermentação. O processo descontínuo inicial foi convertido em processo descontínuo alimentado repetitivo através da retirada de um terço do volume do reator e adição de novo meio com a mesma concentração inicial de sorbitol. Quatro ciclos de retirada e alimentação foram implementadas, num total de 26 horas. Afirmando que com isso o tempo não produtivo, que compreende limpeza, esterilização e abastecimento do reator, pode ser eliminado, aumentando a produtividade total do reator e reduzindo o custo da produção. Outra vantagem apontada é que essa técnica pode ser facilmente adotada pelas condições industriais existentes sem nenhum gasto adicional na aquisição de novos equipamentos.

BAE *et al.* (2004) investigaram a produção de xilitol por *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, contendo gene para xilose redutase, utilizando processo descontínuo alimentado repetitivo além de cultivo com reciclo de células. *Saccharomyces cerevisiae* não consegue metabolizar xilose como única fonte de carbono, já que essa levedura não possui enzimas intrínsecas necessárias para o metabolismo desse açúcar; por isso, uma suplementação adequada de glicose, ao longo do processo, é necessária para propiciar uma boa produção de xilitol. A fermentação foi realizada em 1 Litro de meio YPD suplementado com xilose, temperatura de 30° C, pH 5,0, 1,0 vvm de aeração e 400 rpm. A concentração de xilose no meio foi controlada entre 20 e 40 g/L e a fração de corte foi de 10% com adição de igual volume de meio com 200 g/L de xilose. Neste trabalho, a introdução do gene XR, para produção de xilitol, propiciou a conversão de xilose em xilitol com um rendimento de 100 %. Além disso, a concentração final e a produtividade de xilitol no processo descontínuo alimentado repetitivo foram 2,5 e 1,5 vezes maiores que no processo descontínuo de produção, respectivamente.



Foi relatado, também, o processo descontínuo alimentado repetitivo na produção de antibióticos, visando manter constantemente no reator células que estão produzindo estes metabólitos. Como relatam LI *et al* (2005), a produção industrial de penicilina G é tipicamente produzida por este processo. Esses autores descrevem uma nova estratégia de suplementação de fósforo para melhorar a fermentação industrial deste antibiótico. Após o primeiro corte, uma apropriada quantidade de fósforo (somente de fonte inorgânica ou de fonte mista) foi adicionada ao meio de cultivo. Esse método se apresentou como um eficiente meio econômico para melhorar a produção , levando a um aumento de 16,1% na produção de penicilina G.

Levando-se em conta o cultivo de *Spirulina*, com alta resistência a contaminações devido às condições de seu cultivo (pH elevado, elevada salinidade, meio mineral), pode-se deduzir que a aplicação do processo descontínuo alimentado repetitivo venha a ser vantajosa para o processo de produção com aumento da produtividade do cultivo e com a diminuição dos tempos “mortos” do reator. Este trabalho teve a finalidade deste estudo.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Microrganismo:

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

### 4.2. Manutenção da *Spirulina platensis*:

A microalga foi mantida em ágar inclinado, com adição de 2% de ágar em meio líquido de cultivo padrão para *Spirulina* (item 4.3.1).

### 4.3. Meio de cultivo:

Foram utilizados dois tipos de meio. Um meio padrão para o cultivo de *Spirulina* (SCHLÖSSER *et al.*, 1982) - item 4.3.1, com NaNO<sub>3</sub> como fonte de nitrogênio (que foi utilizado para duas finalidades: manutenção do microrganismo e preparo do inóculo); e um meio modificado (item 4.3.2), onde se utilizou uréia como fonte de nitrogênio.

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

O meio mineral padrão foi o de Schlösser (SCHLÖSSER, 1982), cuja composição, por litro (de água destilada), é a seguinte:

• NaHCO <sub>3</sub> .....	13,61g
• Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....	4,03g
• K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,50g
• NaNO <sub>3</sub> .....	2,50g

• $K_2SO_4$ .....	1,00g
• NaCl.....	1,00g
• $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .....	0,20g
• $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ .....	0,04g
• *"PIV" solução de metais.....	6mL
• **"Chu" solução de micronutrientes..	1mL
• vitamina $B_{12}$ (15 $\mu$ g/100mL $H_2O$ ).....	1mL

\*"PIV" solução de metais (em 1 litro de água destilada):

• $Na_2EDTA$ .....	750 mg
• $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ .....	97 mg
• $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ .....	41 mg
• $ZnCl_2$ .....	5 mg
• $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ .....	2 mg
• $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ....	4 mg

\*\*"Chu" solução de micronutrientes (em 1 litro de água destilada):

• $Na_2EDTA$ .....	50,0 mg
• $H_3BO_3$ .....	618,0 mg
• $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ .....	19,6 mg
• $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ .....	44,0 mg
• $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ .....	20,0 mg
• $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ .....	12,6 mg
• $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ....	12,6 mg

#### 4.3.2. Meio modificado

Foi o meio de Schlösser (SCHLÖSSER , 1982), com substituição do nitrato de sódio por uréia. A massa total de uréia adicionada foi uma função do tempo total de alimentação (item 4.8.1).

#### 4.4. Preparo do inóculo

A *Spirulina platensis*, mantida em ágar, foi colhida com auxílio de alça de platina, em condições assépticas, em fluxo laminar, e inoculada em 10mL de meio líquido (em tubo de ensaio). Depois de 15 dias, esse material foi utilizado para inocular frascos erlenmeyers de 500mL, com 200mL de meio de cultivo padrão (item 4.3.1), previamente autoclavado a 121° C por 15 minutos.

Os frascos erlenmeyers após o repique foram imediatamente levados a agitador rotativo, a 100min<sup>-1</sup> (FERRAZ, 1986), temperatura de 30° C e iluminância de 6000 lux (DANESI, 2001), fornecida por 6 lâmpadas fluorescentes Sylvania de 40Watts, dispostas a uma distância de 30cm dos frascos.

O crescimento celular foi acompanhado, sendo utilizada para inóculo uma suspensão de *S. platensis* após 6 a 8 dias de cultivo (PELIZER *et al.*, 2003), em crescimento exponencial, isenta de contaminação. Essa suspensão foi filtrada, lavada com solução fisiológica para retirada do NaNO<sub>3</sub> e ressuspensa em meio de cultivo padrão isento de NaNO<sub>3</sub>. Esta suspensão foi o inóculo para o cultivo em minitanques, onde foram realizados os estudos da adição de uréia como fonte de nitrogênio. No primeiro cultivo, que constituiu a fase de obtenção de biomassa, a concentração celular inicial (em massa seca) foi fixada em 50mg/L (PELIZER *et al.*, 2003). Após o primeiro corte (item 4.8.2), a concentração celular inicial não foi mais fixada, sendo uma função das condições experimentais adotadas.

#### 4.5. Dispositivo para cultura

Dentre os inúmeros sistemas de algacultura descritos na literatura, adotamos os minitanques de forma alongada (BELAY, 1997). Estes tanques são construídos de lâminas de PVC de cor branca. A movimentação da cultura foi executada por pás rotativas com freqüência de 18 rotações por

minuto. Na Figura 1 pode-se observar a foto dos minitanques, de formato alongado com área de 1226,2 cm<sup>2</sup>.



Figura 2. Minitanques de PVC para cultivo de *S. platensis*.

#### 4.6. Descrição de um experimento típico

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

A suspensão de *Spirulina* (inóculo - item 4.4) foi adicionada ao minitanque e o volume de meio completado até 5,0 L. Este foi o meio de cultivo isento de NaNO<sub>3</sub> ( item 4.3.2), ao qual se deu a adição de uréia de acordo com o plano de trabalho (item 4.8.2).

Nos cultivos, a massa inicial de uréia foi de 0,4 g, 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 (DANESI *et. al.*, 2002). O volume de cultivo foi constante ao longo de todo o processo, sendo que a porção perdida por evaporação foi repostada diariamente com água destilada. A uréia foi adicionada diariamente, de acordo com a equação 1 (item 4.8.1).

A temperatura de 28 °C foi mantida por meio de resistências elétricas controladas por termostatos.

A iluminância fornecida foi realizada em intensidade de 9000 lux, com a utilização de lâmpadas fluorescentes de 20 Watts.

## **4.7. Técnicas Analíticas**

Os experimentos foram acompanhados por técnicas analíticas descritas a seguir:

### **4.7.1. Acompanhamento do cultivo**

#### **4.7.1.1. Determinação da concentração celular**

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

##### **4.7.1.1.1. Construção da curva de calibração para determinação da concentração celular**

A curva de calibração foi obtida tomando-se um volume de 25 mL de uma suspensão concentrada, de células em fase de crescimento exponencial, que foi filtrado e lavado, com água destilada, em uma membrana de acetato de celulose de 1,2 µm, previamente seca a 70° C por 12 h, e previamente pesada. A amostra foi levada à estufa à 100 - 105° C por um período de 5 h, suficiente para que mantivesse uma massa constante. O massa das células foi calculada por diferença dos valores das massas das membranas antes e depois da filtração, e dividido pelo volume filtrado para obter-se a

concentração celular na suspensão. A partir desta mesma suspensão, foram preparadas diferentes diluições, e alíquotas dessas diluições foram levadas ao espectrofotômetro para leitura da transmitância a 560nm de comprimento de onda e caminho óptico de 1cm, com água destilada como branco. Obteve-se, dessa forma, uma curva que relaciona concentração celular com o logaritmo da transmitância.

#### **4.7.1.2. Determinação da concentração de amônia total**

Para acompanhar os níveis de amônia no processo, foram realizadas medidas em dias alternados, na fase líquida do meio em cultivo, adotando-se um eletrodo seletivo para amônia conectado a um potenciômetro ORION, modelo 710A. Tendo em vista que o eletrodo só é sensível ao íon amônia, e que no pH de cultivo existe equilíbrio entre os íons amônia e amônio, para se fazer a leitura, foi necessário elevar o pH da amostra, adicionando-se solução de NaOH, para deslocamento do equilíbrio, de forma que todo íon amônio fosse convertido em amônia (LEDUY & SAMSON, 1982).

Neste procedimento foi necessária a calibração do aparelho em todos os dias em que foram realizadas as determinações. Isso era feito através da construção de uma curva que correlaciona a milivoltagem lida no potenciômetro com soluções de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , em diferentes diluições, com concentrações conhecidas. A partir da equação dessa curva, com a milivoltagem lida na amostra do cultivo, era calculada a concentração de amônia total.

#### **4.7.1 3. Determinação do pH**

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

#### **4.7.2. Avaliação da biomassa obtida**

Ao final do cultivo, o volume retirado contendo a *Spirulina platensis* foi centrifugado, com 3 lavagens sucessivas com água destilada para remoção do sal adsorvido às células, e, após secagem com ventilação a 55 °C por 12 horas (PELIZER *et al.*, 1999), foi avaliado o teor de proteína e de lipídio da biomassa.

##### **4.7.2.1. Lipídeos totais**

A fração lipídica total foi obtida por extração com solvente orgânico. A amostra foi triturada em gral e então transferida para um extrator contínuo de Soxhlet com refluxo de éter de petróleo por 4 horas, sendo o extrato recolhido em balão de fundo redondo. Após esse tempo, o solvente foi retirado do balão de fundo redondo com auxílio de evaporador rotativo. A amostra foi submetida a uma nova extração com clorofórmio-metanol (2:1 v/v) e esse processo continuou até que o solvente no copo de Soxhlet não apresentasse coloração. O segundo solvente foi evaporado também em evaporador rotativo e a fração lipídica pôde então ser determinada. O material obtido reúne ácidos graxos, triglicerídeos, fosfolipídeos, carotenóides, pigmentos fotossintetizantes, esteróides e hidrocarbonetos, sendo chamados de fração lipídica total (FERRAZ *et al.*, 1986).

##### **4.7.2.2. Proteínas totais**

O teor protéico total na biomassa seca foi determinado pelo clássico método de KJELDAHL, adotando-se o fator de 6,25 para a conversão a partir dos teores de nitrogênio total (OFFICIAL METHODS OF FOOD ANALYSIS, 1984). Para isso, empregou-se a amostra desengordurada, resultante da análise de lipídeos totais, seca e pulverizada. A amostra foi digerida em meio



ácido, com adição de catalisador, em bloco digestor a 350° C até que o material se apresentasse límpido. Em seguida, a amostra foi levada a um destilador de nitrogênio, adicionando hidróxido de sódio 60%, e recuperando o nitrogênio, na forma amoniacal, em solução saturada de ácido bórico. Esse material foi titulado com HCl 0,02 N, possibilitando o cálculo da porcentagem de proteína na biomassa seca.

## **4.8 – EXPERIMENTOS REALIZADOS**

### **4.8.1. Processo de cultivo**

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

$$Mu = 400 + 225 \cdot t$$

Onde “Mu” representa a massa de uréia adicionada até instante t e “400” representa sua massa inicial, em miligramas. A taxa de alimentação diária foi de 225 mg/dia (CARVALHO et al., 2004). O tempo total de alimentação (Ta) foi de 1 a 16 dias, de acordo com a fração de corte do processo (item 5.8.2).

### **4.8.2. Planejamento Experimental**

Os experimentos foram realizados de acordo com o apresentado na Tabela 1, sendo acompanhados por 3 cortes sucessivos, após a etapa inicial de obtenção de biomassa.

Tabela 3 - Matriz de ensaio

<b>Ensaio</b>	<b>Fração de corte (%)</b>	<b>Tempo de alimentação (dias)</b>
1	20	1
2	20	3
3	20	5
4	50	4
5	50	7
6	50	10
7	80	6
8	80	10
9	80	14
10	95	8
11	95	12
12	95	16

#### **4.9. FORMA E ANÁLISE DOS RESULTADOS**

A partir dos cultivos, foram calculados os fatores de conversão de nitrogênio em células e as produtividades em biomassa, de acordo com as fórmulas do item 4.9.1.

As melhores condições de cultivo em relação a concentração final de células, composição de biomassa e parâmetros cinéticos (fatores de conversão de nitrogênio em células e produtividade em células) foram avaliadas com auxílio de análise de covariância.

#### 4.9.1. Fórmulas e métodos utilizados nos cálculos dos parâmetros cinéticos

##### Produtividade em células:

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

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

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

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

$T_c$  = tempo de cultivo (dias)

##### Fator de conversão de nitrogênio em células:

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

Onde:  $Y_{X/N}$  = Fator de conversão de nitrogênio em celular ( $\text{g.g}^{-1}$ )

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

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

$V$  = volume do meio (L)

$N_t$  = quantidade total de nitrogênio adicionado (mg)

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Curva de Calibração para determinação de concentração celular

A determinação da concentração celular ao longo dos cultivos foi obtida através da correlação entre o logaritmo da transmitância da amostra e a correspondente concentração celular, em massa seca, apresentada na Figura 2.

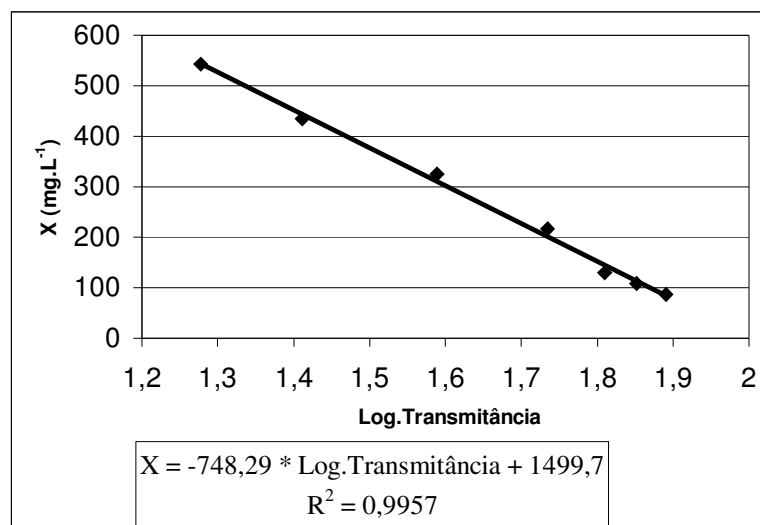


Figura 3. Curva de calibração para determinação da concentração de *Spirulina platensis*.

### 5.2. Curva de Calibração para determinação da concentração de amônia total

Uma curva de calibração foi construída em todos os dias em que houve determinação da concentração de amônia no meio de cultivo. A seguir, na Figura 3, têm-se um exemplo de curva obtida.

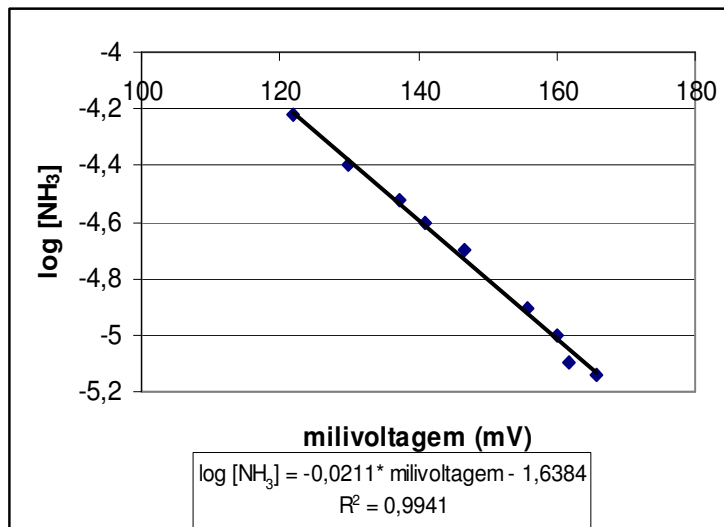


Figura 4. Curva de calibração para determinação da concentração de amônia total em meio de cultivo.

Neste caso específico, a maior diluição,  $7,2 \times 10^{-6}$  M (cujo valor de Log é igual a  $-5,1426$ ) apresentou uma leitura de  $165,85$  mV, no eletrodo seletivo de amônia. E sendo assim, nas amostras que apresentaram leitura de milivoltagem acima deste valor, não se pôde determinar a concentração de amônia total. Por isso, nas tabelas de acompanhamento do cultivo (Tabelas 5 a 15), esses valores de concentração de amônia foram substituídos por “\*\*\*”, indicando estarem abaixo do valor detectado pela metodologia analítica.

### 5.3. Resultados referentes aos acompanhamentos dos ensaios 1 a 12

Os resultados referentes aos acompanhamentos dos ensaios são apresentados nas tabelas (Tabelas 4 a 15). Para cada ensaio, após as respectivas tabelas, apresentam-se as correspondentes figuras (Figuras 5 a 16). Na Tabela 16 são apresentados os conteúdos de proteínas e lipídeos dos ensaios, e na Tabela 17 são apresentados os parâmetros cinéticos, calculados de acordo com o apresentado em “material e métodos” item 4.9.1.

Tabela 4 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de amônia total no Ensaio 1.

	Tempo (dias)	Tempo total	X (mg.L <sup>-1</sup> )	pH	Amônia Total (mol.L <sup>-1</sup> )
Fase 1		0	50	9,30	-
		1	180	9,59	-
		2	194	9,76	7,28 x 10 <sup>-5</sup>
		3	312	9,89	-
		4	503	10,01	1,02 x 10 <sup>-4</sup>
		5	751	10,24	-
		6	866	10,28	9,37 x 10 <sup>-5</sup>
		7	1.148	10,03	-
		8	1.230	10,28	6,00 x 10 <sup>-5</sup>
		9	1.240	10,20	-
		10	1.631	10,01	3,50 x 10 <sup>-5</sup>
		11	1.983	10,08	-
		12	2.186	9,95	2,68 x 10 <sup>-5</sup>
		13	2.250	10,02	-
		14	2.287	9,99	2,58 x 10 <sup>-5</sup>
		15	2.349	10,02	-
	16	2.280	9,80	5,19 x 10 <sup>-5</sup>	
1º ciclo	0	16	1.824	-	-
	1	17	2.038	9,95	-
	2	18	2.305	9,89	1,09 x 10 <sup>-5</sup>
	3	19	2.337	9,86	-
2º ciclo	0	19	1.734	9,87	-
	1	20	1.806	9,88	2,00 x 10 <sup>-5</sup>
	2	21	1.955	9,92	-
	3	22	1.977	9,92	3,31 x 10 <sup>-5</sup>
3º ciclo	0	22	1.498	9,94	-
	1	23	1.617	9,93	3,24 x 10 <sup>-5</sup>
	2	24	1.840	10,00	-
	3	25	1.811	10,05	2,99 x 10 <sup>-5</sup>

\* Fase 1: fase de obtenção de biomassa.

- : leitura não realizada.

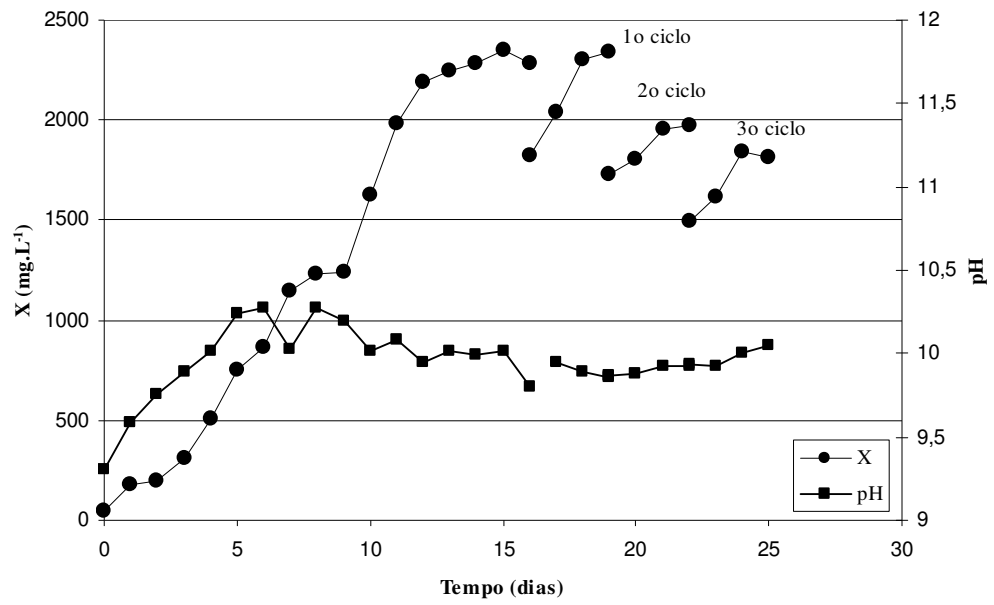


Figura 5. Concentração celular ( $X$ ) e pH em função do tempo para ensaio 1 (Tempo de alimentação: 1 dia; Fração de corte: 20%).

Tabela 5 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de amônia total no Ensaio 2.

	Tempo (dias)	Tempo Total	X (mg.L <sup>-1</sup> )	pH	Amônia Total (mol.L <sup>-1</sup> )
Fase 1		0	50	9,30	-
		1	161	9,58	-
		2	194	9,77	7,84 x 10 <sup>-5</sup>
		3	324	9,93	-
		4	497	10,05	3,57 x 10 <sup>-5</sup>
		5	776	10,10	-
		6	862	10,15	5,65 x 10 <sup>-5</sup>
		7	906	10,20	-
		8	1.009	10,16	1,08 x 10 <sup>-5</sup>
		9	999	10,10	-
		10	1.339	10,05	***
		11	1.546	10,00	-
		12	1.717	10,09	1,06 x 10 <sup>-5</sup>
		13	2.067	10,14	-
		14	2.213	10,04	1,52 x 10 <sup>-5</sup>
		15	2.219	9,99	-
	16	2.171	9,96	1,05 x 10 <sup>-5</sup>	
1ºciclo	0	16	1.737	-	-
	1	17	1.817	9,95	-
	2	18	1.906	9,89	3,08 x 10 <sup>-5</sup>
	3	19	2.028	9,90	-
	4	20	2.129	9,93	1,74 x 10 <sup>-5</sup>
	5	21	2.115	9,97	-
2ºciclo	0	21	1.711	9,88	-
	1	22	1.853	9,92	1,47 x 10 <sup>-5</sup>
	2	23	1.840	9,90	-
	3	24	1.988	9,92	2,22 x 10 <sup>-5</sup>
	4	25	1.982	9,96	-
3º ciclo	0	25	1.543	9,84	-
	1	26	1.632	9,85	6,56 x 10 <sup>-5</sup>
	2	27	1.715	9,90	-
	3	28	1.730	9,91	2,74 x 10 <sup>-5</sup>
	4	29	1.804	9,96	-
	5	30	1.906	10,01	1,95 x 10 <sup>-5</sup>
	6	31	1.885	10,02	-

\* Fase 1: fase de obtenção de biomassa.

\*\*\*: valor abaixo do detectado pela metodologia analítica.

- : leitura não realizada.



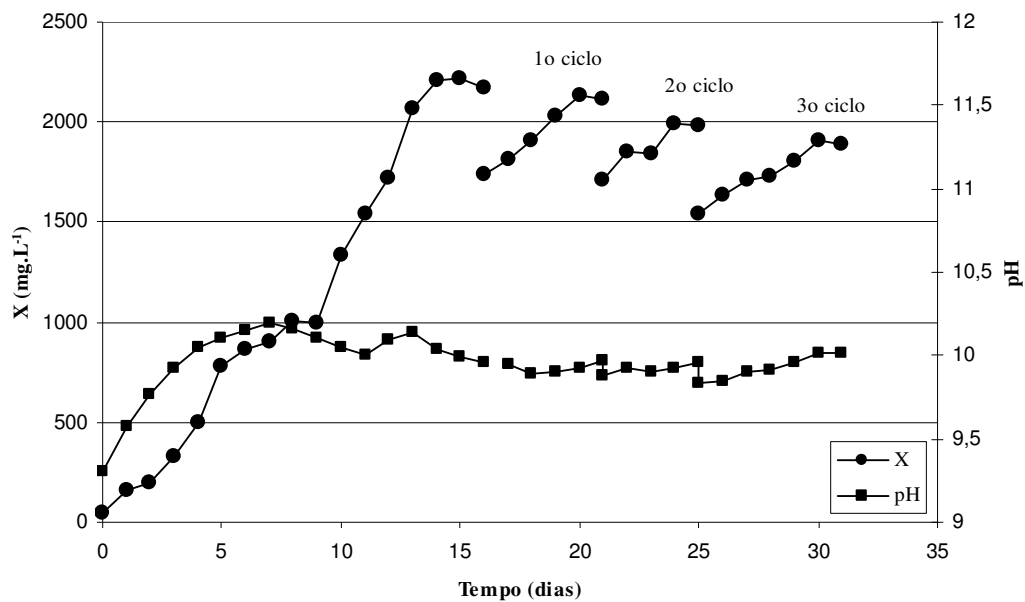


Figura 6. Concentração celular (X) e pH em função do tempo para ensaio 2 (Tempo de alimentação: 3 dias; Fração de corte: 20 %).

Tabela 6 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de amônia total no Ensaio 3.

	Tempo (dias)	Tempo Total	X (mg.L <sup>-1</sup> )	pH	Amônia Total (mol.L <sup>-1</sup> )
Fase 1		0	50	-	-
		1	176	9,45	-
		2	258	9,62	1,61 x 10 <sup>-5</sup>
		3	393	9,77	-
		4	638	9,88	3,59 x 10 <sup>-5</sup>
		5	762	10,10	-
		6	909	10,06	2,36 x 10 <sup>-5</sup>
		7	1.012	10,21	-
		8	1.342	10,24	***
		9	1.284	10,26	-
		10	1.642	10,22	***
		11	1.660	10,19	-
		12	1.738	10,29	***
		13	2.044	10,30	-
		14	2.130	10,24	***
		15	2.153	10,20	-
	16	2.162	10,20	***	
1º ciclo	0	16	1.730	-	-
	1	17	1.933	9,95	-
	2	18	2.124	9,90	2,69 x 10 <sup>-5</sup>
	3	19	2.250	9,91	-
	4	20	2.299	9,93	1,84 x 10 <sup>-5</sup>
	5	21	2.349	9,95	-
	6	22	2.433	9,94	1,08 x 10 <sup>-5</sup>
	7	23	2.463	9,95	-
2º ciclo	0	23	1.960	9,95	-
	1	24	1.988	9,90	***
	2	25	2.024	9,91	-
	3	26	2.061	9,89	3,64 x 10 <sup>-5</sup>
	4	27	2.067	9,93	-
	5	28	2.142	9,94	1,38 x 10 <sup>-5</sup>
	6	29	2.237	9,95	-
	7	30	2.250	9,99	1,11 x 10 <sup>-5</sup>
3º ciclo	0	31	1.740	9,92	-
	1	32	1.874	9,91	3,57 x 10 <sup>-5</sup>
	2	33	2.010	9,94	-
	3	34	2.078	10,00	1,12 x 10 <sup>-5</sup>
	4	35	2.067	9,94	-
	5	36	2.253	10,05	1,99 x 10 <sup>-5</sup>
	6	37	2.265	10,00	-
	7	38	2.258	10,01	7,63 x 10 <sup>-5</sup>

\* Fase 1: fase de obtenção de biomassa.

\*\*\*: valor abaixo do detectado pela metodologia analítica.

-: leitura não realizada.

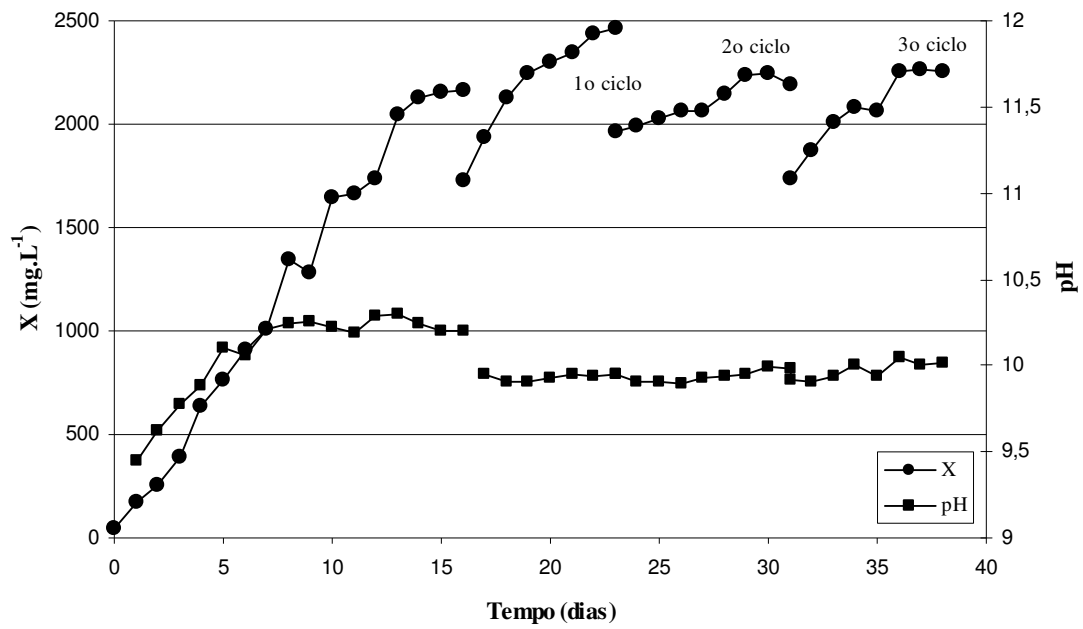


Figura 7. Concentração celular (X) e pH em função do tempo para ensaio 3 (Tempo de alimentação: 5 dias; Fração de corte: 20 %).

**Tabela 7** - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de amônia total no Ensaio 4.

	Tempo (dias)	Tempo total	X (mg.L <sup>-1</sup> )	pH	Amônia Total (mol.L <sup>-1</sup> )
Fase 1		0	50	9,30	-
		1	151	9,45	-
		2	186	9,61	3,78 x 10 <sup>-4</sup>
		3	380	9,73	-
		4	650	9,84	2,64 x 10 <sup>-5</sup>
		5	680	9,96	-
		6	900	10,03	2,67 x 10 <sup>-5</sup>
		7	1.038	10,15	-
		8	1.127	10,19	***
		9	1.442	10,18	-
		10	1.681	10,20	***
		11	1.807	10,18	-
		12	1.805	10,27	***
		13	1.939	10,27	-
		14	1.993	10,23	***
		15	2.078	10,16	-
	16	2.072	10,20	***	
1º ciclo	0	16	1.036	-	-
	1	17	1.192	9,84	-
	2	18	1.193	9,81	2,04 x 10 <sup>-5</sup>
	3	19	1.394	9,90	-
	4	20	1.438	9,95	***
	5	21	1.615	9,97	-
2º ciclo	6	22	1.658	10,00	***
	0	22	954	9,82	-
	1	23	1.105	9,83	-
	2	24	1.251	9,83	***
	3	25	1.295	9,87	-
	4	26	1.340	9,86	1,75 x 10 <sup>-5</sup>
	5	27	1.456	9,92	-
3º ciclo	6	28	1.514	9,96	1,05 x 10 <sup>-5</sup>
	7	29	1.523	9,95	-
	0	29	774	9,74	-
	1	30	940	9,86	-
	2	31	1.060	9,92	***
	3	32	1.078	9,98	-
	4	33	1.074	10,03	1,81 x 10 <sup>-5</sup>
	5	34	1.268	10,01	-
	6	35	1.279	10,05	***

\*Fase 1: fase de obtenção de biomassa.

\*\*\*: valor abaixo do detectado pela metodologia analítica.

- : leitura não realizada.

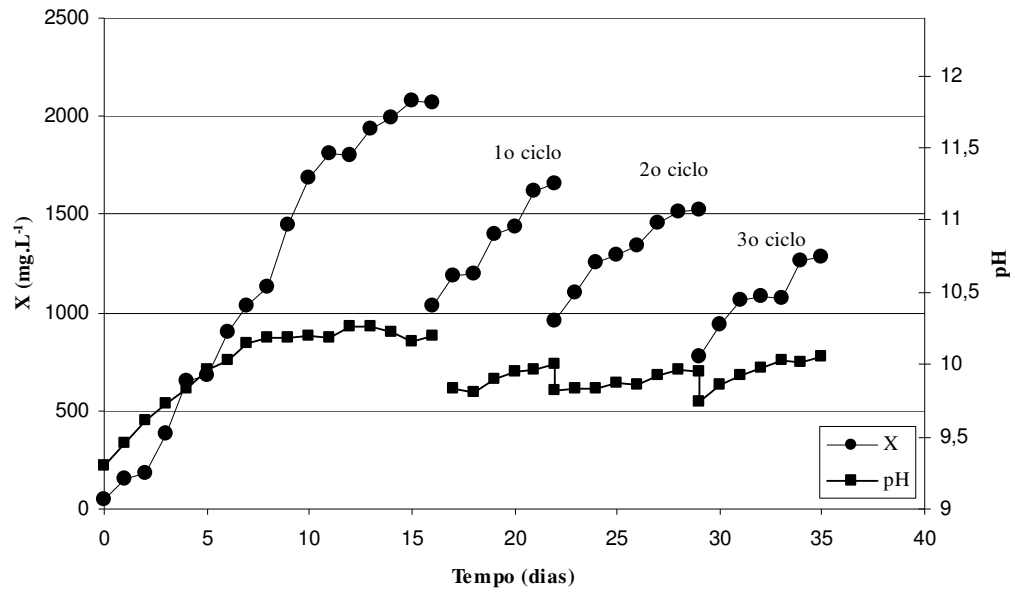


Figura 8. Concentração celular (X) e pH em função do tempo para ensaio 4 (Tempo de alimentação: 4dias; Fração de corte: 50 %).

Tabela 8 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de amônia total no Ensaio 5.

	Tempo (dias)	Tempo Total	X (mg.L <sup>-1</sup> )	pH	Amônia Total (mol.L <sup>-1</sup> )
Fase 1		0	50	9,30	-
		1	167	9,60	-
		2	242	9,74	1,03 x 10 <sup>-5</sup>
		3	405	9,94	-
		4	652	10,00	4,11 x 10 <sup>-5</sup>
		5	809	10,25	-
		6	1.116	10,28	2,41 x 10 <sup>-5</sup>
		7	1.169	10,41	-
		8	1.512	10,34	***
		9	1.399	10,29	-
		10	1.545	10,24	1,75 x 10 <sup>-5</sup>
		11	1.546	10,17	-
		12	2.016	10,28	1,02 x 10 <sup>-5</sup>
		13	1.933	10,28	-
		14	2.311	10,16	1,36 x 10 <sup>-5</sup>
		15	2.293	10,10	-
	16	2.401	10,05	***	
1º ciclo	0	16	1.200	-	-
	1	17	1.322	9,82	-
	2	18	1.454	9,83	1,32 x 10 <sup>-5</sup>
	3	19	1.539	9,89	-
	4	20	1.507	9,93	***
	5	21	1.505	9,98	-
	6	22	1.720	9,99	***
	7	23	1.800	9,96	-
	8	24	1.963	9,95	***
	9	25	1.955	10,02	-
2º ciclo	0	25	995	9,78	-
	1	26	1.127	9,83	1,32 x 10 <sup>-5</sup>
	2	27	1.129	9,90	-
	3	28	1.149	9,95	***
	4	29	1.334	10,01	-
	5	30	1.505	10,02	3,16 x 10 <sup>-5</sup>
	6	31	1.500	10,04	-
	7	32	1.537	10,07	2,21 x 10 <sup>-5</sup>
	8	33	1.629	10,05	-
	9	34	1.641	10,08	***
	10	35	1.781	10,11	-
	11	36	1.824	10,13	1,52 x 10 <sup>-5</sup>
	12	37	1.822	10,14	-

Continuação da Tabela 8

3º ciclo	0	37	851	9,58	-
	1	38	1.145	10,05	-
	2	39	1.185	9,89	$7,63 \times 10^{-5}$
	3	40	1.257	9,95	-
	4	41	1.401	9,99	$1,31 \times 10^{-5}$
	5	42	1.430	10,05	-
	6	43	1.559	10,16	$1,02 \times 10^{-5}$
	7	44	1.711	10,21	-
	8	45	1.743	10,14	$1,46 \times 10^{-5}$
	9	46	1.768	10,09	-

\* Fase 1: fase de obtenção de biomassa.

\*\*\*: valor abaixo do detectado pela metodologia analítica.

- : leitura não realizada.

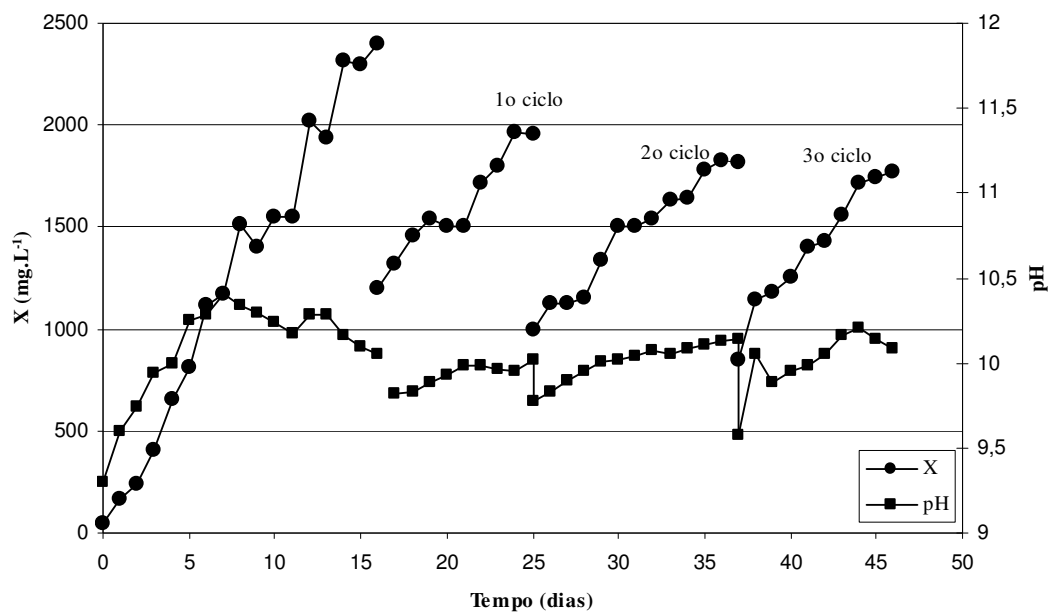


Figura 9. Concentração celular (X) e pH em função do tempo para ensaio 5 (Tempo de alimentação: 7dias; Fração de corte: 50 %).

Tabela 9 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de amônia total no Ensaio 6.

	Tempo (dias)	Tempo Total	X (mg.L <sup>-1</sup> )	pH	Amônia Total (mol.L <sup>-1</sup> )
Fase 1		0	50	9,30	-
		1	161	9,60	-
		2	193	9,78	3,12 x 10 <sup>-5</sup>
		3	324	9,94	-
		4	504	10,05	3,82 x 10 <sup>-5</sup>
		5	651	10,17	-
		6	985	10,27	1,88 x 10 <sup>-5</sup>
		7	1.125	10,39	-
		8	1.181	10,37	***
		9	1.238	10,33	-
		10	1.606	10,26	***
		11	1.847	10,17	-
		12	1.898	10,29	***
		13	1.960	10,28	-
		14	1.993	10,21	***
		15	2.095	10,11	-
	16	2.072	10,08	***	
1º ciclo	0	16	1.036	-	-
	1	17	1.260	9,84	-
	2	18	1.332	9,85	1,32 x 10 <sup>-5</sup>
	3	19	1.332	9,92	-
	4	20	1.511	10,00	***
	5	21	1.458	10,02	-
	6	22	1.580	10,03	***
	7	23	1.620	10,20	-
	8	24	1.713	10,06	***
	9	25	1.755	10,06	-
	10	26	1.906	10,00	3,44 x 10 <sup>-5</sup>
	11	27	1.936	10,05	-
12	28	1.943	10,02	***	



Continuação da Tabela 9

2º ciclo	0	28	1.056	9,78	-
	1	29	1.249	9,82	-
	2	30	1.575	9,89	$1,26 \times 10^{-5}$
	3	31	1.477	9,95	-
	4	32	1.629	10,00	$1,88 \times 10^{-5}$
	5	33	1.613	10,01	-
	6	34	1.671	10,05	***
	7	35	1.676	10,04	-
	8	36	1.610	10,38	$1,16 \times 10^{-5}$
	9	37	1.725	10,45	-
	10	38	1.750	9,98	$2,19 \times 10^{-5}$
	11	39	1.853	10,04	-
	12	40	2.103	10,03	***
	13	41	2.204	10,04	-
14	42	2.195	10,04	-	
3º ciclo	0	41	1.124	9,58	-
	1	42	1.230	9,75	***
	2	43	1.209	9,80	-
	3	44	1.280	9,98	***
	4	45	1.464	10,08	-
	5	46	1.796	10,14	$1,66 \times 10^{-5}$
	6	47	1.966	10,18	-
	7	48	2.030	10,16	$1,48 \times 10^{-5}$
	8	49	2.186	10,01	-
	9	50	2.240	10,29	$1,42 \times 10^{-5}$
	10	51	2.153	10,30	-
	11	52	2.189	10,30	$7,92 \times 10^{-5}$
12	53	2.171	10,33	-	

\* Fase 1: fase de obtenção de biomassa.

\*\*\*: valor abaixo do detectado pela metodologia analítica.

- : leitura não realizada.

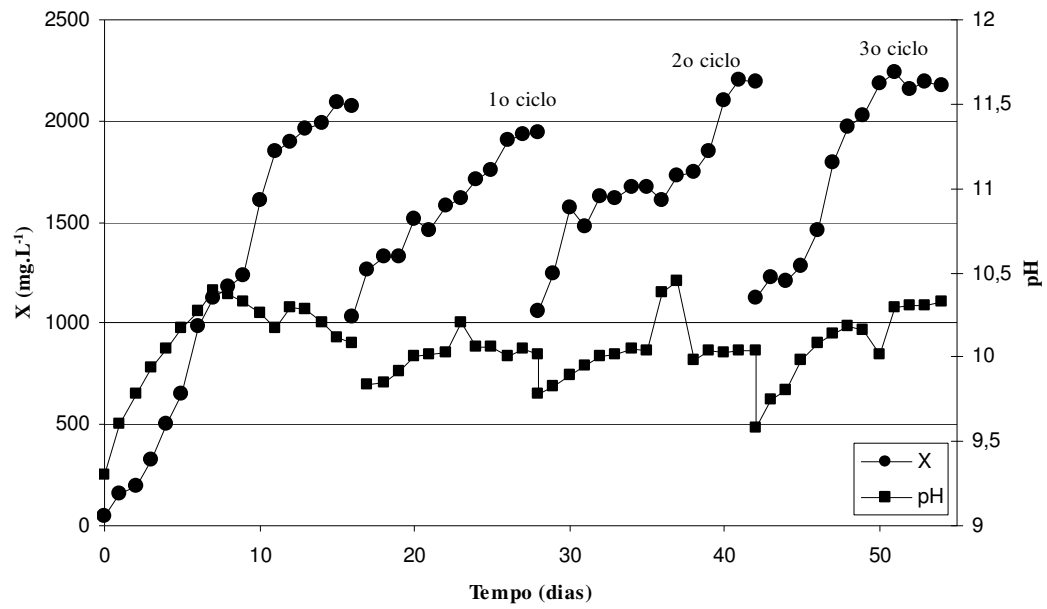


Figura 10. Concentração celular (X) e pH em função do tempo para ensaio 6 (Tempo de alimentação: 10 dias; Fração de corte: 50 %).

Tabela 10 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de amônia total no Ensaio 7.

	Tempo (dias)	Tempo Total	X (mg.L <sup>-1</sup> )	pH	Amônia Total (mol.L <sup>-1</sup> )
Fase 1		0	50	9,30	-
		1	169	9,60	-
		2	217	9,81	2,90 x 10 <sup>-5</sup>
		3	319	9,91	-
		4	516	9,98	3,20 x 10 <sup>-5</sup>
		5	592	10,04	-
		6	879	10,13	2,30 x 10 <sup>-5</sup>
		7	889	10,28	-
		8	1.120	10,26	***
		9	1.241	10,24	-
		10	1.624	10,22	***
		11	1.703	10,15	-
		12	1.929	10,21	***
		13	2.021	10,24	-
		14	2.089	10,18	***
		15	2.130	10,12	-
	16	2.159	10,07	***	
1º ciclo	0	16	432	-	-
	1	17	787	9,77	-
	2	18	1.049	9,87	1,10 x 10 <sup>-5</sup>
	3	19	1.110	10,04	-
	4	20	1.272	10,13	***
	5	21	1.634	10,19	-
	6	22	1.817	10,18	***
	7	23	1.805	10,15	-
	8	24	2.072	10,20	***
2º ciclo	0	24	429	9,69	-
	1	25	654	9,88	-
	2	26	795	10,03	1,60 x 10 <sup>-5</sup>
	3	27	1.097	10,02	-
	4	28	1.272	10,27	***
	5	29	1.591	10,35	-
	6	30	1.893	10,34	1,50 x 10 <sup>-5</sup>
	7	31	2.005	10,36	-
	8	32	2.007	10,38	1,50 x 10 <sup>-5</sup>

Continuação da Tabela 10

3º ciclo	0	32	403	9,68	-
	1	33	552	9,89	-
	2	34	768	10,03	***
	3	35	1.107	10,38	-
	4	36	1.406	10,38	***
	5	37	1.750	10,42	-
	6	38	1.791	10,39	$1,70 \times 10^{-5}$
	7	39	1.966	10,47	-
	8	40	2.225	10,34	***
	9	41	2.219	10,35	-

\* Fase 1: fase de obtenção de biomassa.

\*\*\*: valor abaixo do detectado pela metodologia analítica.

- : leitura não realizada.

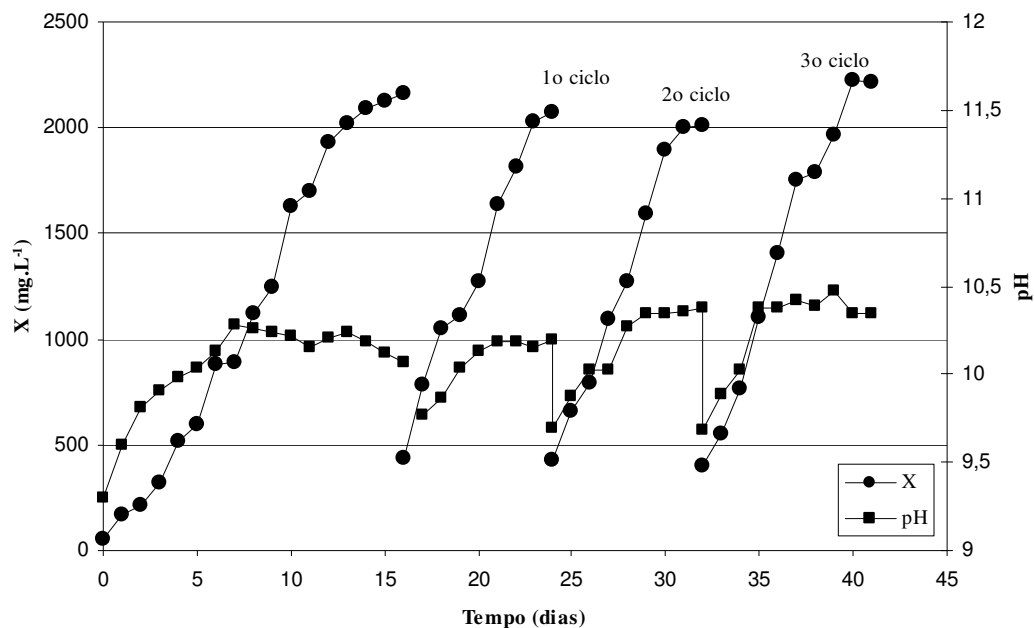


Figura 11. Concentração celular (X) e pH em função do tempo para ensaio 7 (Tempo de alimentação: 6 dias; Fração de corte: 80 %).

Tabela 11 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de amônia total no Ensaio 8.

	Tempo (dias)	Tempo Total	X (mg.L <sup>-1</sup> )	pH	Amônia Total (mol.L <sup>-1</sup> )
Fase 1		0	50	9,30	-
		1	163	9,59	-
		2	222	9,79	2,30 x 10 <sup>-5</sup>
		3	322	9,98	-
		4	489	9,98	2,00 x 10 <sup>-5</sup>
		5	601	10,01	-
		6	771	10,08	2,30 x 10 <sup>-5</sup>
		7	915	10,12	-
		8	896	10,11	***
		9	1.016	10,03	-
		10	1.377	10,06	***
		11	1.629	10,02	-
		12	1.827	10,11	***
		13	1.760	10,08	-
		14	1.988	10,10	***
		15	2.165	10,00	-
	16	2.180	10,00	***	
1º ciclo	0	16	436	-	-
	1	17	720	9,75	-
	2	18	965	9,86	7,00 x 10 <sup>-4</sup>
	3	19	1.100	10,00	-
	4	20	1.211	10,10	***
	5	21	1.248	10,14	-
	6	22	1.387	10,16	***
	7	23	1.527	10,16	-
	8	24	1.532	10,19	***
	9	25	1.627	10,12	-
	10	26	1.603	10,14	***
	11	27	1.837	10,14	-
	12	28	1.939	10,10	***
13	29	1.952	10,13	-	

Continuação da Tabela 11

2º ciclo	0	29	409	9,62	-
	1	30	498	9,90	$6,30 \times 10^{-5}$
	2	31	792	10,06	-
	3	32	980	10,18	***
	4	33	1.080	10,23	-
	5	34	1.129	10,26	***
	6	35	1.165	10,38	-
	7	36	1.486	10,38	$1,40 \times 10^{-5}$
	8	37	1.532	10,38	-
	9	38	1.730	10,37	***
	10	39	1.858	10,35	-
	11	40	1.933	10,25	***
3º ciclo	12	41	1.974	10,18	-
	0	41	455	9,43	-
	1	42	554	9,60	$3,50 \times 10^{-5}$
	2	43	551	9,71	-
	3	44	694	9,90	$1,00 \times 10^{-5}$
	4	45	865	10,02	-
	5	46	1.014	10,13	***
	6	47	1.257	10,14	-
	7	48	1.386	10,22	***
	8	49	1.448	10,25	-
	9	50	1.740	10,30	***
	10	51	1.786	10,33	-
	11	52	1.822	10,27	$1,90 \times 10^{-5}$
12	53	2.021	10,32	-	
13	54	2.002	10,36	***	

\* Fase 1: fase de obtenção de biomassa.

\*\*\*: valor abaixo do detectado pela metodologia analítica.

- : leitura não realizada.

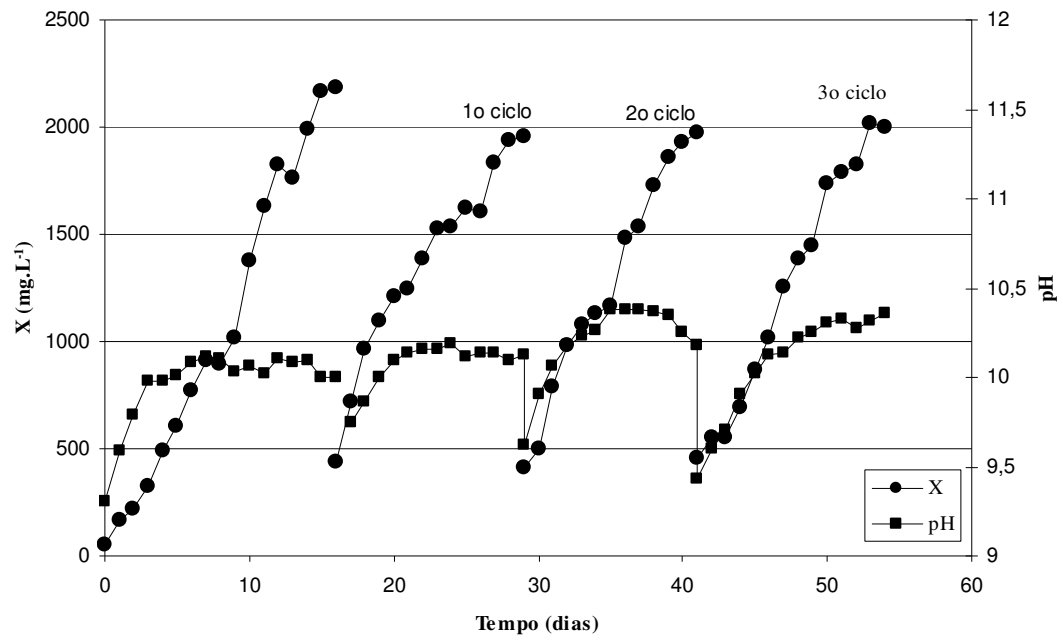


Figura 12. Concentração celular (X) e pH em função do tempo para ensaio 8 (Tempo de alimentação: 10 dias; Fração de corte: 80 %).

Tabela 12 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de amônia total no Ensaio 9.

	Tempo (dias)	Tempo Total	X (mg.L <sup>-1</sup> )	pH	Amônia Total (mol.L <sup>-1</sup> )
Fase 1		0	50	9,30	-
		1	172	9,61	-
		2	250	9,82	***
		3	371	9,98	-
		4	532	10,02	2,94 x 10 <sup>-5</sup>
		5	759	10,13	-
		6	951	10,22	2,24 x 10 <sup>-5</sup>
		7	1.029	10,29	-
		8	1.084	10,24	***
		9	1.207	10,19	-
		10	1.653	10,12	***
		11	1.921	10,08	-
		12	1.957	10,22	***
		13	2.201	10,17	-
		14	2.237	10,10	***
		15	2.324	9,99	-
	16	2.394	10,00	***	
1º ciclo	0	16	479	-	-
	1	17	787	9,75	-
	2	18	1.014	9,87	1,22 x 10 <sup>-5</sup>
	3	19	1.111	10,00	-
	4	20	1.265	10,10	***
	5	21	1.761	10,16	-
	6	22	1.870	10,17	***
	7	23	1.905	10,18	-
	8	24	1.912	10,19	***
	9	25	1.933	10,18	-
	10	26	1.988	10,16	***
	11	27	2.167	10,14	-
	12	28	2.165	10,12	1,01 x 10 <sup>-5</sup>
	13	29	2.095	10,12	-
	14	30	2.148	10,04	3,28 x 10 <sup>-5</sup>
	15	31	2.378	10,08	-
	16	32	2.327	10,13	2,72 x 10 <sup>-5</sup>
17	33	2.356	10,14	-	



Continuação da Tabela 12

2º ciclo	0	33	424	9,67	-
	1	34	577	9,87	***
	2	35	878	10,04	-
	3	36	1.151	10,22	***
	4	37	1.452	10,33	-
	5	38	1.804	10,40	***
	6	39	1.882	10,42	-
	7	40	2.171	10,29	***
	8	41	2.280	10,28	-
	9	42	2.346	10,08	***
	10	43	2.323	10,21	-
	11	44	2.391	10,15	***
	12	45	2.440	10,16	-
	13	46	2.494	10,18	$1,30 \times 10^{-5}$
	14	47	2.497	10,19	-
	15	48	2.496	10,08	***
	16	49	2.493	10,08	-
3º ciclo	0	49	483	9,42	-
	1	50	821	9,64	***
	2	51	811	9,78	-
	3	52	877	10,00	$1,43 \times 10^{-5}$
	4	53	1.117	10,04	-
	5	54	1.325	10,12	***
	6	55	1.390	10,20	-
	7	56	1.535	10,28	$1,84 \times 10^{-4}$
	8	57	1.690	10,32	-
	9	58	1.840	10,34	***
	10	59	1.971	10,35	-
	11	60	2.033	10,31	***
	12	61	2.061	10,31	-
	13	62	2.089	10,33	$1,10 \times 10^{-5}$
	14	63	2.098	10,29	-
	15	64	2.075	10,29	$1,08 \times 10^{-5}$
	16	65	2.153	10,28	-
17	66	2.061	10,29	$2,75 \times 10^{-5}$	

\* Fase 1: fase de obtenção de biomassa.

\*\*\*: valor abaixo do detectado pela metodologia analítica.

- : leitura não realizada.

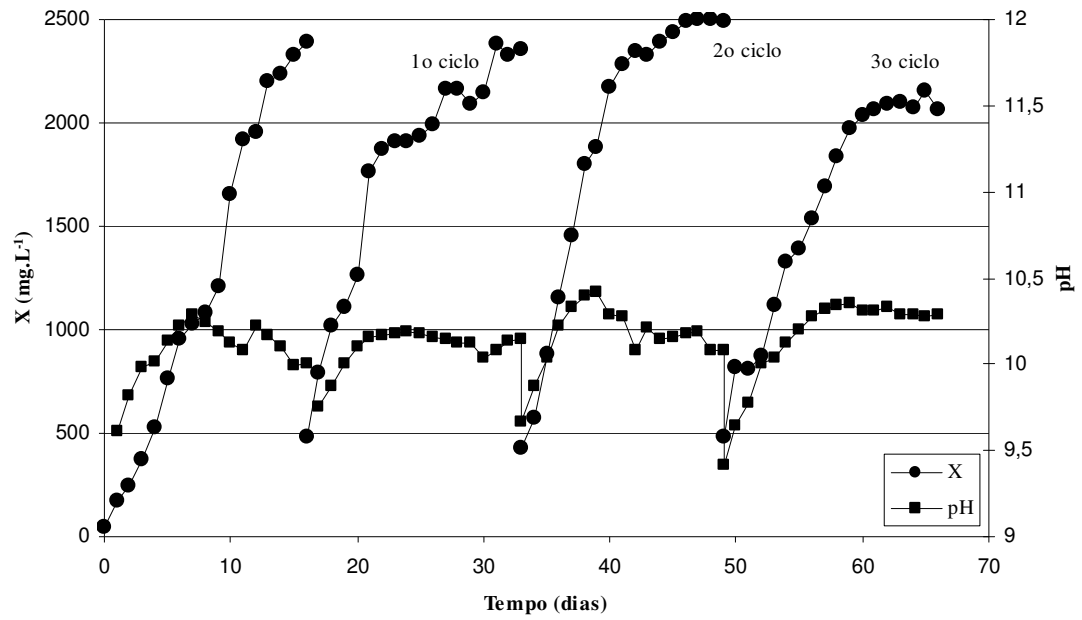


Figura 13. Concentração celular ( $X$ ) e pH em função do tempo para ensaio 9 (Tempo de alimentação: 14 dias; Fração de corte: 80 %).

Tabela 13 – Concentração celular (X), valor de pH e concentração de amônia total no Ensaio 10.

	Tempo (dias)	Tempo Total	X (mg.L <sup>-1</sup> )	pH	Amônia Total (mol.L <sup>-1</sup> )
Fase 1		0	50	9,30	-
		1	172	9,70	-
		2	223	9,82	2,61 x 10 <sup>-5</sup>
		3	333	10,01	-
		4	603	10,14	1,95 x 10 <sup>-5</sup>
		5	774	10,37	-
		6	1.122	10,40	2,48 x 10 <sup>-5</sup>
		7	1.148	10,52	-
		8	1.423	10,51	***
		9	1.450	10,45	-
		10	1.681	10,30	***
		11	2.027	10,02	-
		12	2.071	10,35	***
		13	2.299	10,30	-
		14	2.394	10,19	***
		15	2.440	10,08	-
	16	2.414	10,02	***	
1º ciclo	0	16	121	-	-
	1	17	357	9,69	-
	2	18	433	9,80	1,49 x 10 <sup>-5</sup>
	3	19	555	10,01	-
	4	20	717	10,20	***
	5	21	869	10,33	-
	6	22	1.012	10,39	***
	7	23	1.208	10,38	-
	8	24	1.303	10,43	***
	9	25	1.543	10,43	-
	10	26	1.687	10,36	2,00 x 10 <sup>-5</sup>
2º ciclo	0	26	89	9,53	-
	1	27	172	9,75	-
	2	28	307	9,87	***
	3	29	472	10,09	-
	4	30	633	10,23	3,17 x 10 <sup>-5</sup>
	5	31	834	10,32	-
	6	32	1.129	10,38	1,16 x 10 <sup>-5</sup>
	7	33	1.237	10,55	-
	8	34	1.502	10,58	***
	9	35	1.570	10,49	-
	10	36	1.613	10,44	***

Continuação da Tabela 13

3º ciclo	0	36	87	9,32	-
	1	37	169	9,51	-
	2	38	268	9,72	$7,27 \times 10^{-5}$
	3	39	445	9,84	-
	4	40	683	9,98	***
	5	41	915	10,11	-
	6	42	1.185	10,18	***
	7	43	1.272	10,23	-
	8	44	1.379	10,31	***
	9	45	1.553	10,34	-
	10	46	1.601	10,38	***
	11	47	1.678	10,34	-

\* Fase 1: fase de obtenção de biomassa.

\*\*\*: valor abaixo do detectado pela metodologia analítica.

- : leitura não realizada.

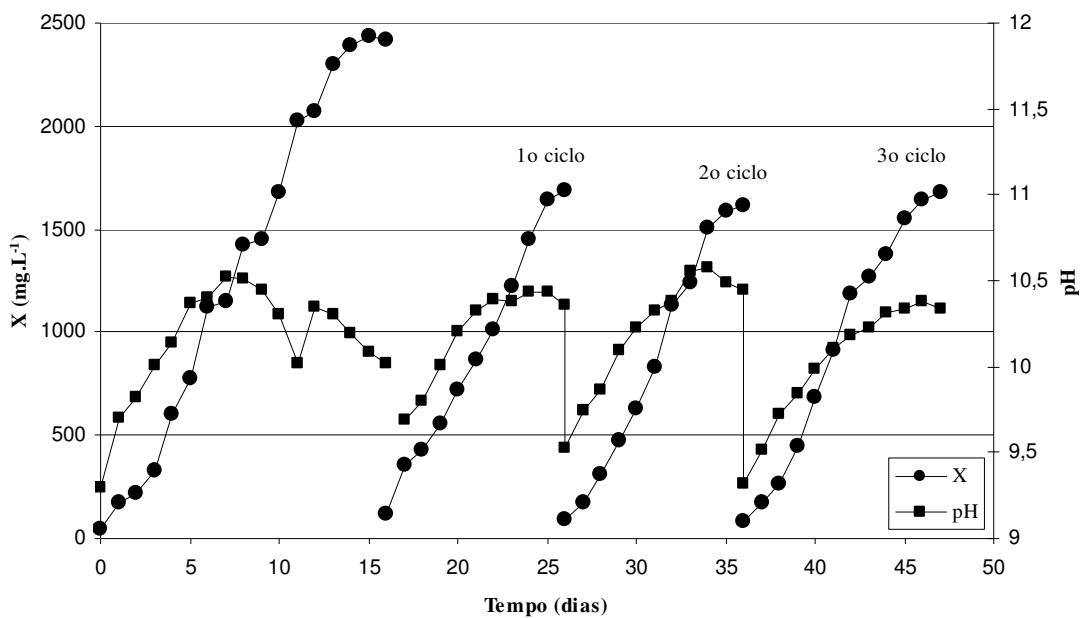


Figura 14. Concentração celular (X) e pH em função do tempo para ensaio 10 (Tempo de alimentação: 8 dias; Fração de corte: 95 %).

Tabela 14: Concentração celular (X), valor de pH e concentração de amônia total no Ensaio 11.

	Tempo (dias)	Tempo Total	X (mg.L <sup>-1</sup> )	pH	Amônia Total (mol.L <sup>-1</sup> )
Fase 1		0	50	-	-
		1	161	9,60	-
		2	293	9,85	***
		3	443	10,04	-
		4	626	10,21	2,24 x 10 <sup>-5</sup>
		5	737	10,36	-
		6	903	10,40	1,83 x 10 <sup>-5</sup>
		7	905	10,44	-
		8	1.277	10,36	***
		9	1.270	10,26	-
		10	1.323	10,22	***
		11	1.309	10,12	-
		12	1.604	10,07	1,02 x 10 <sup>-5</sup>
		13	1.837	10,12	-
		14	2.061	10,08	1,21 x 10 <sup>-5</sup>
		15	2.250	10,09	-
	16	2.257	10,01	***	
1º ciclo	0	16	113	-	-
	1	17	391	9,68	-
	2	18	422	9,80	1,16 x 10 <sup>-5</sup>
	3	19	530	9,99	-
	4	20	751	10,13	***
	5	21	836	10,24	-
	6	22	1.081	10,30	***
	7	23	1.309	10,32	-
	8	24	1.370	10,41	***
	9	25	1.460	10,31	-
	10	26	1.680	10,25	1,75 x 10 <sup>-5</sup>
	11	27	1.710	10,20	-
	12	28	1.760	10,22	1,45 x 10 <sup>-5</sup>
	13	29	1.905	10,17	-
14	30	1.914	10,19	3,88 x 10 <sup>-5</sup>	

Continuação da Tabela 14

2º ciclo	0	30	111	9,55	-
	1	31	181	9,83	-
	2	32	314	9,92	$3,91 \times 10^{-5}$
	3	33	421	10,09	-
	4	34	571	10,29	***
	5	35	892	10,41	-
	6	36	926	10,13	***
	7	37	1.230	10,44	-
	8	38	1.239	10,17	$1,28 \times 10^{-5}$
	9	39	1.331	10,33	-
	10	40	1.603	10,22	$8,19 \times 10^{-5}$
	11	41	1.676	10,21	-
	12	42	1.880	10,22	***
	13	43	1.827	10,24	-
	14	44	1.801	10,28	***
3º ciclo	0	44	91	9,38	-
	1	45	157	9,66	-
	2	46	223	9,75	$3,03 \times 10^{-5}$
	3	47	494	9,90	-
	4	48	601	9,97	***
	5	49	796	10,10	-
	6	50	1.113	10,11	$1,24 \times 10^{-5}$
	7	51	1.145	10,29	-
	8	52	1.344	10,25	***
	9	53	1.563	10,25	-
	10	54	1.627	10,30	$2,36 \times 10^{-5}$
	11	55	1.723	10,34	-
	12	56	1.663	10,34	$1,13 \times 10^{-5}$
	13	57	1.668	10,29	-
	14	58	1.666	10,30	***
	15	59	1.658	10,30	-

\* Fase 1: fase de obtenção de biomassa.

\*\*\*: valor abaixo do detectado pela metodologia analítica.

- : leitura não realizada.

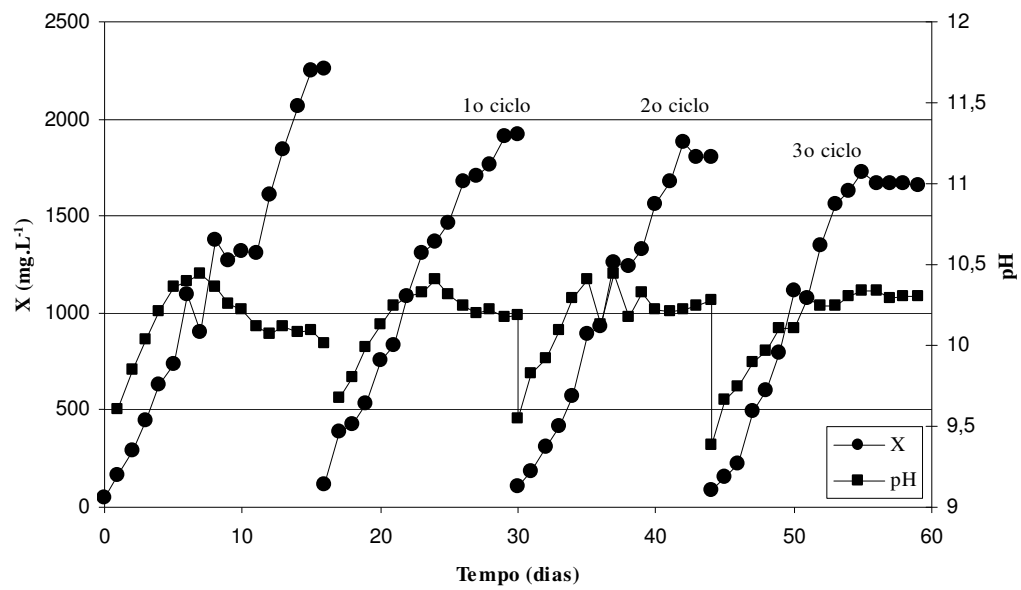


Figura 15. Concentração celular (X) e pH em função do tempo para ensaio 11 (Tempo de alimentação: 12 dias; Fração de corte: 95 %).

Tabela 15 - Concentração celular (X), valor de pH e concentração de amônia total no Ensaio 12.

	Tempo (dias)	Tempo Total	X (mg.L <sup>-1</sup> )	pH	Amônia Total (mol.L <sup>-1</sup> )
Fase 1		0	50	9,30	-
		1	90	9,60	-
		2	201	9,70	3,33 x 10 <sup>-4</sup>
		3	316	9,85	-
		4	454	9,91	2,34 x 10 <sup>-5</sup>
		5	602	9,98	-
		6	800	10,04	1,74 x 10 <sup>-5</sup>
		7	902	10,11	-
		8	1.196	10,19	***
		9	1.473	10,25	-
		10	1.502	10,32	2,94 x 10 <sup>-5</sup>
		11	1.514	10,38	-
		12	1.562	10,42	1,0 x 10 <sup>-5</sup>
		13	1.615	10,48	-
		14	1.817	10,50	1,21 x 10 <sup>-5</sup>
		15	1.945	10,51	-
	16	2.079	10,50	***	
1º ciclo	0	16	105	-	-
	1	17	279	9,60	-
	2	18	382	9,75	8,67 x 10 <sup>-6</sup>
	3	19	468	9,80	-
	4	20	660	9,95	***
	5	21	955	10,02	-
	6	22	1.042	10,10	***
	7	23	1.217	10,20	-
	8	24	1.369	10,21	***
	9	25	1.460	10,29	-
	10	26	1.504	10,35	1,70 x 10 <sup>-5</sup>
	11	27	1.667	10,40	-
	12	28	1.720	10,45	1,75 x 10 <sup>-5</sup>
	13	29	1.738	10,49	-
	14	30	1.890	10,51	3,13 x 10 <sup>-5</sup>
	15	31	1.895	10,55	-
	16	32	2.000	10,59	3,68 x 10 <sup>-5</sup>
	17	33	1.916	10,57	-
18	34	1.919	10,58	8,82 x 10 <sup>-6</sup>	



Continuação da Tabela 15

2º ciclo	0	34	114	9,60	-
	1	35	264	9,70	-
	2	36	335	9,81	$9,99 \times 10^{-6}$
	3	37	487	9,99	-
	4	38	716	10,09	***
	5	39	865	10,15	-
	6	40	987	10,18	***
	7	41	1.150	10,22	-
	8	42	1.320	10,25	***
	9	43	1.419	10,30	-
	10	44	1.584	10,35	***
	11	45	1.599	10,41	-
	12	46	1.713	10,45	$1,25 \times 10^{-5}$
	13	47	1.855	10,50	-
	14	48	1.820	10,50	$1,92 \times 10^{-5}$
	15	49	1.868	10,59	-
	16	50	1.936	10,59	$1,57 \times 10^{-5}$
	17	51	1.947	10,60	-
3º ciclo	0	51	105	9,60	$1,96 \times 10^{-5}$
	1	52	245	9,70	-
	2	53	361	9,65	-
	3	54	474	9,95	$9,83 \times 10^{-5}$
	4	55	704	10,10	-
	5	56	863	10,11	$1,70 \times 10^{-5}$
	6	57	919	10,21	-
	7	58	1.162	10,30	***
	8	59	1.311	10,39	-
	9	60	1.394	10,40	***
	10	61	1.520	10,45	-
	11	62	1.606	10,50	$1,25 \times 10^{-5}$
	12	63	1.653	10,52	-
	13	64	1.660	10,59	***
	14	65	1.762	10,60	-
	15	66	1.865	10,61	$1,21 \times 10^{-5}$
	16	67	1.923	10,60	-
	17	68	1.916	10,62	$4,03 \times 10^{-5}$
	18	69	1.921	10,61	-

\* Fase 1: fase de obtenção de biomassa.

\*\*\*: valor abaixo do detectado pela metodologia analítica.

- : leitura não realizada.

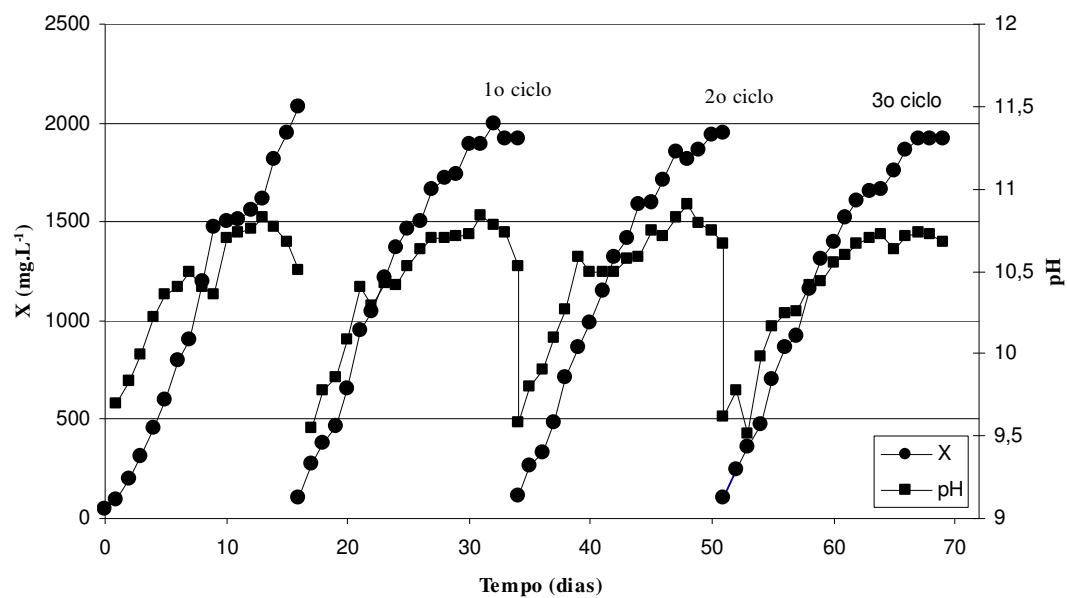


Figura 16. Concentração celular (X) e pH em função do tempo para ensaio 12 (Tempo de alimentação: 16 dias; Fração de corte: 95 %).

Tabela 16 - Conteúdo de proteínas e lipídeos na biomassa seca de *Spirulina platensis* obtida nos ensaios realizados.

<b>Ensaio</b>	<b>Fc</b>	<b>Ta</b>	<b>Ciclo</b>	<b>% Proteínas</b>	<b>%Lipídeos</b>
1	20%	1	1º	56,55	21,37
			2º	53,85	21,50
			3º	59,89	15,81
2	20%	3	1º	62,22	13,46
			2º	60,17	15,47
			3º	58,52	15,28
3	20%	5	1º	60,09	14,44
			2º	56,56	15,51
			3º	48,62	15,44
4	50%	4	1º	59,12	16,88
			2º	56,29	16,09
			3º	51,16	14,88
5	50%	7	1º	57,54	13,98
			2º	49,95	18,52
			3º	50,83	10,06
6	50%	10	1º	57,11	13,97
			2º	56,48	11,38
			3º	50,02	10,30
7	80%	6	1º	49,14	20,62
			2º	51,14	19,76
			3º	52,97	10,50
8	80%	10	1º	53,37	20,55
			2º	46,03	12,43
			3º	50,29	19,18
9	80%	14	1º	48,11	13,37
			2º	45,29	10,57
			3º	48,01	17,61
10	95%	8	1º	45,48	10,29
			2º	45,08	10,77
			3º	48,20	20,95
11	95%	12	1º	45,20	11,00
			2º	45,01	10,00
			3º	50,85	21,26
12	95%	16	1º	45,00	13,52
			2º	53,03	17,08
			3º	53,68	21,90

\*Fc= Fração de corte; Ta= Tempo de alimentação.

Tabela 17 - Parâmetros cinéticos: concentração celular máxima ( $X_m$ ), produtividade em células ( $P_x$ ) e Fator de Conversão de nitrogênio em células ( $Y_{x/N}$ ) dos ensaios realizados.

Ensaio	Fc (%)	Ta (dias)	Ciclo	$X_m$ ( $mg.L^{-1}$ )	$P_x$ ( $mg.L^{-1}.D^{-1}$ )	$Y_{x/N}$ ( $mg.mg^{-1}$ )
1	20%	1	1 <sup>o</sup>	2.305	241	8,2
			2 <sup>o</sup>	1.977	81	4,2
			3 <sup>o</sup>	1.840	171	5,9
2	20%	3	1 <sup>o</sup>	2.129	98	3,9
			2 <sup>o</sup>	1.988	92	2,8
			3 <sup>o</sup>	1.906	73	3,6
3	20%	5	1 <sup>o</sup>	2.433	117	4,9
			2 <sup>o</sup>	2.237	46	1,9
			3 <sup>o</sup>	2.253	103	3,6
4	50%	4	1 <sup>o</sup>	1.615	116	4,8
			2 <sup>o</sup>	1.514	113	5,6
			3 <sup>o</sup>	1.268	99	4,1
5	50%	7	1 <sup>o</sup>	1.963	95	4,1
			2 <sup>o</sup>	1.781	79	4,3
			3 <sup>o</sup>	1.768	102	5,0
6	50%	10	1 <sup>o</sup>	1.943	82	3,7
			2 <sup>o</sup>	2.204	88	4,6
			3 <sup>o</sup>	2.240	112	4,5
7	80%	6	1 <sup>o</sup>	2.072	205	10,0
			2 <sup>o</sup>	2.005	225	9,6
			3 <sup>o</sup>	2.225	228	11,2
8	80%	10	1 <sup>o</sup>	1.939	125	6,1
			2 <sup>o</sup>	1.933	139	6,2
			3 <sup>o</sup>	2.021	131	6,3
9	80%	14	1 <sup>o</sup>	2.378	127	5,7
			2 <sup>o</sup>	2.497	148	6,3
			3 <sup>o</sup>	2.098	115	4,9
10	95%	8	1 <sup>o</sup>	1.687	157	7,6
			2 <sup>o</sup>	1.613	152	7,4
			3 <sup>o</sup>	1.678	145	7,7
11	95%	12	1 <sup>o</sup>	1.905	138	6,2
			2 <sup>o</sup>	1.880	147	6,1
			3 <sup>o</sup>	1.663	131	5,4
12	95%	16	1 <sup>o</sup>	2.000	118	5,1
			2 <sup>o</sup>	1.936	114	4,9
			3 <sup>o</sup>	1.923	114	4,9

\*Fc= Fração de corte; Ta= Tempo de alimentação.

#### 5.4. Crescimento de *Spirulina platensis*

Todos os ensaios iniciaram-se (Fase 1) com concentrações semelhantes de biomassa, 50 mg/L, e após 16 dias de cultivo (em condições semelhantes para todos os ensaios) atingiram-se concentrações celulares máximas ( $X_m$ ) que variavam de 2079 a 2440 mg/L (Tabelas 4 a 15). O coeficiente de variação dos valores de  $X_m$  na fase 1 dos 12 ensaios foi de 5,97 %, considerado aceitável para cultivos microbianos (DANESI *et al.*, 2004 e FRATELLI *et al.*, 2005). Sendo assim, para a aplicação das frações de corte no experimento, os valores de biomassa, ao final da Fase 1, eram equivalentes.

A utilização do processo descontínuo alimentado para o cultivo de *Spirulina platensis* permitiu a obtenção de resultados bastante satisfatórios com o uso de uréia como fonte de nitrogênio (RANGEL, 2000; DANESI, 2001; SANCHEZ-LUNA *et al.*, 2003). Houve redução dos níveis da concentração de amônia no decorrer do cultivo, o que evitou que níveis tóxicos fossem alcançados.

Os ensaios de 1 a 12 (Tabelas 4 a 15) comprovam essas informações, mostrando um ótimo aproveitamento da uréia como fonte de nitrogênio para o crescimento celular. Foram mantidos, em muitos casos, valores de  $X_m$  (Concentração celular máxima) próximos ou acima de 2000 mg.L<sup>-1</sup> nos 3 ciclos de cultivos.

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

Processos descontínuos alimentados podem causar alteração de volume, com aumento deste durante o cultivo (YAMANE & SHIMIZU, 1984). Esse aspecto é particularmente importante em fermentações alcoólicas por processo descontínuo alimentado, utilizando caldo de cana-de-açúcar ou

melaço, amplamente empregado no Brasil. Neste trabalho, entretanto, apesar da alimentação com uréia, não houve aumento do volume nos tanques de cultivo. De fato, houve evaporação do meio em todos os cultivos, e o volume dos tanques foi corrigido diariamente, como mencionado no item IV.6 (Material e Métodos).

Pelo fato do microrganismo receber nitrato de sódio na fase de pré-inóculo, esperava-se uma fase de adaptação (fase lag) quando do início do cultivo com uréia. No entanto, como mostra os gráficos de acompanhamento do crescimento celular (Figuras 5 a 16), isso não foi observado, mostrando uma rápida adaptação do microrganismo à nova fonte de nitrogênio. Fenômeno semelhante foi observado por DANESI *et al.* (2002), que empregaram uréia no lugar de KNO<sub>3</sub>, de meio PAOLETTI (PAOLETTI *et al.*, 1975). Isso provavelmente ocorre devido à hidrólise espontânea da uréia em pH alcalino, ou pela ação da enzima urease (CARVAJAL *et al.*, 1980), formando amônia, que entra por difusão na célula, e é a forma preferencial de captação de nitrogênio (BOUSSIBA, 1989).

Para todos os cultivos, observa-se um aumento do pH, acompanhando o crescimento celular, o que é mais pronunciado nos ensaios 4 a 12 (Figuras 8 a 16). Nos ensaios 1, 2 e 3, o aumento do pH só é mais evidente na fase de obtenção de biomassa, sendo que a variação não é tão grande ao longo dos ciclos (1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup>, e 3<sup>o</sup>), pois a fração de corte de apenas 20% resultou em uma pequena redução dos valores de pH, pois se adicionou uma menor parcela de meio de cultivo novo (que apresenta pH em torno de 9,3) como mostram os gráficos (figuras 5 a 7).

Este fenômeno, de aumento do pH, pode ser explicado pelo consumo dos íons bicarbonato, como fonte de carbono, durante o crescimento. MILLER & COLMAN (1980) afirmaram 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.

Como se pode observar na Figura 17, Os íons bicarbonato são transportados ativamente do meio de cultivo para o interior das células, onde

são convertidos a carbonato e gás carbônico. O gás carbônico é empregado na fotossíntese e o carbonato é liberado para o meio extra-celular (FERRAZ, 1986).

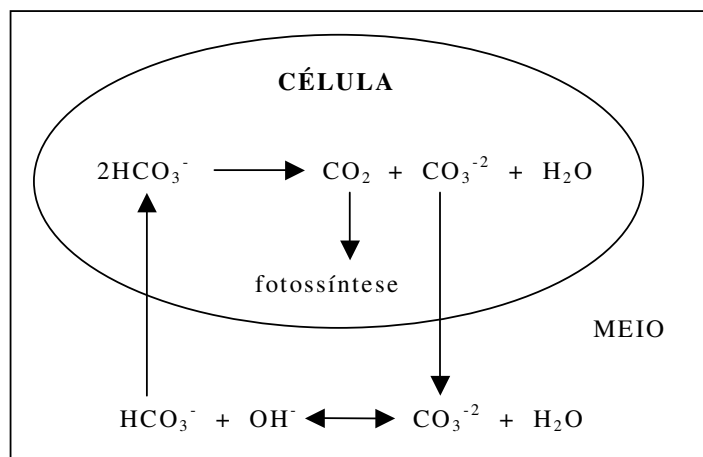


Figura 17. Representação esquemática da assimilação de bicarbonato por *Spirulina platensis*.

Fonte: RANGEL-YAGUI, *et al.* (2004)

Quando o pH atinge a faixa de 10,5, a concentração celular tende a estabilizar ou mesmo decrescer (DANESI, 2001). Isso pode ser explicado pelo fato de que, acima de pH 10,2, a fonte de carbono predominante é o carbonato (RUSSEL, 1982).

O pH, além de determinar a forma ideal de aproveitamento da fonte de carbono pela microalga, determina também o equilíbrio da fonte de nitrogênio amoniacal, que pode se apresentar na forma de amônia livre ou protonada (amônio) (DANESI, 2001). Em pH ótimo, meio alcalino, a entrada de amônia na célula é primeiramente um processo de difusão direcionado pelo gradiente de pH e pela assimilação de amônia intracelular (BOUSSIBA, 1989). Outro fator a ser considerado é que, como mostra a Figura 18, elaborada a partir da aplicação da equação de Henderson-Hasselbach (RUSSEL, 1982), quanto mais alcalino se torna o meio de cultivo, maior é a proporção de amônia em relação ao amônio, e por conseguinte, maior é a perda de amônia por volatilização.

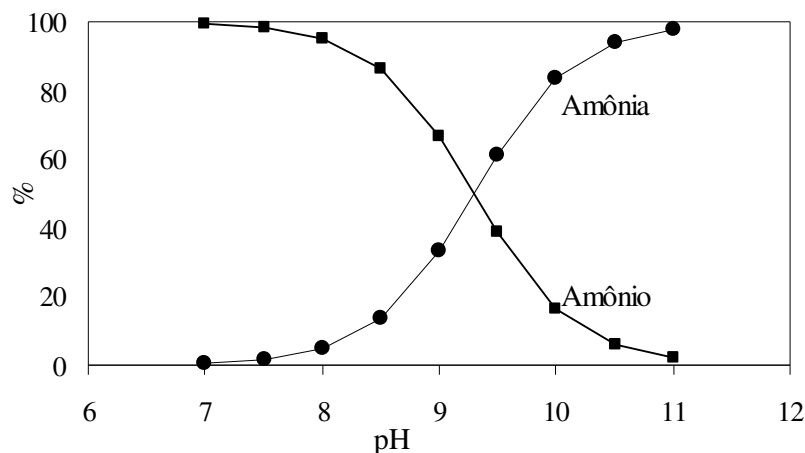


Figura 18. Porcentagem de Amônia e Amônio em Função do pH.

A concentração de amônia total foi medida ao longo dos cultivos, para verificar a ocorrência de níveis considerados tóxicos para o microrganismo. Os dados são satisfatórios porque, como se pode observar nas tabelas de acompanhamento dos cultivos (Tabelas 4 a 15), como comentado anteriormente, em nenhum momento, a concentração de amônia total atingiu valores inibitórios, estando em quase todos os casos entre  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>, abaixo, portanto, da qual BELKIN & BOUSSIBA (1991) indicam como concentração inibitória de amônia (10 mM).

Ao final do cultivo, em alguns ensaios, como no ensaio 4, a fase estacionária pode ter ocorrido devido à interrupção da adição de uréia. Em outros, porém, a fase estacionária é atingida mesmo antes de se encerrar o tempo de alimentação, como ocorre nos ensaios 3, 6 e 9, que apresentam tempos de alimentação mais longos, dentro do grupo de 3 ensaios com mesmo valor de fração de corte. Nestes casos, provavelmente o crescimento foi afetado pelo fenômeno do sombreamento. Esse sombreamento ocorre devido ao aumento da densidade populacional, a ponto de a luz não ser mais homoganeamente distribuída no meio de cultivo, dificultando a captação por cada célula. Este é um fator preponderante no surgimento da fase estacionária (RICHMOND, 1988; FERRAZ, 1986).



Um segundo fator que pode ter propiciado a interrupção do crescimento celular são os altos valores de pH (AZOV, 1982). À medida em que o valor de pH se aproxima de 11, ao final do cultivo, a absorção da fonte de carbono inorgânico é dificultada, pois acima de pH 10,2 o carbonato é a forma predominante (RUSSEL, 1982), e o bicarbonato, forma assimilada pelo microrganismo (BINAGHI *et al.*, 2003), reduz gradativamente, até que em pH 13 se extingue, como mostra a Figura 19.

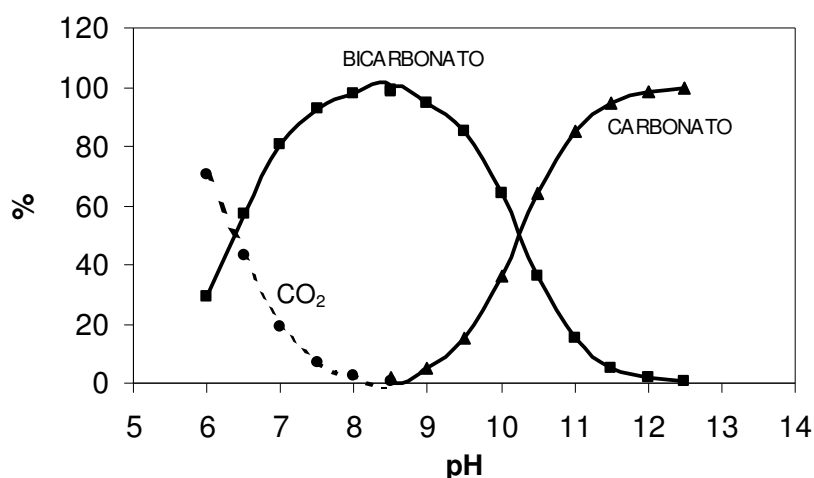


Figura 19. Concentrações relativas de gás carbônico, bicarbonato e carbonato (%) em função do pH

Fonte: SASSANO (2004).

Além disso, deve-se considerar também o estresse (fadiga física) causado pela alta densidade populacional. O aumento populacional intensifica os choques entre os tricomas, que apresentam membranas mucopolissacarídicas de relativa fragilidade (DANESI, 2001).

### 5.5. Substituição do nitrato de sódio pela uréia

Embora os meios de cultivo tradicionais para *Spirulina platensis* utilizem sais de nitrato como fonte de nitrogênio, a utilização de uréia acarreta em um ganho do ponto de vista energético. Em meio alcalino, a

uréia sofre hidrólise gerando amônia, que é facilmente aproveitada pelas células. No caso do nitrato, o microrganismo precisa reduzi-lo a nitrito e posteriormente a amônia, processos que envolvem gastos energéticos (Hatori & Myers, 1966), como é apresentado no esquema da Figura 20.

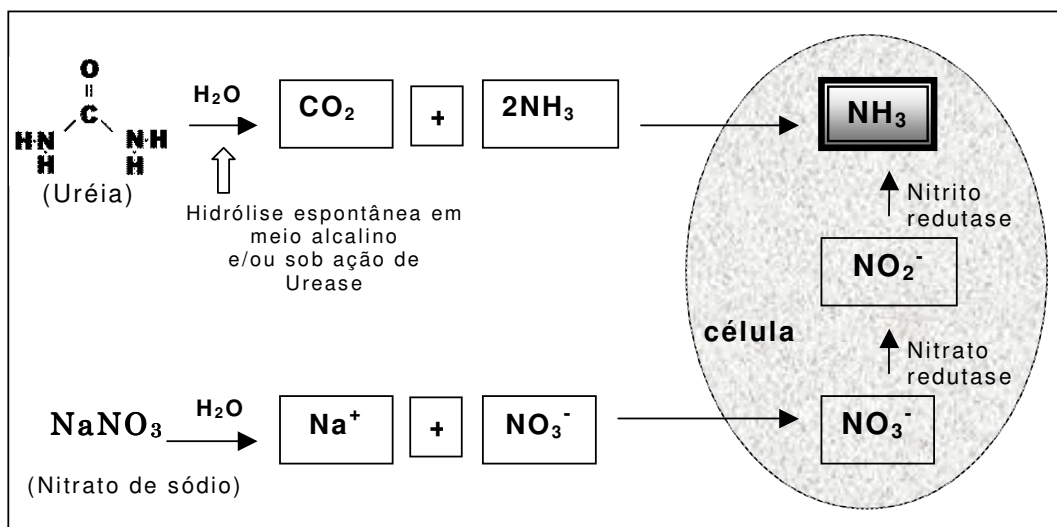


Figura 20. Esquema da assimilação da amônia proveniente de uréia e nitrato de sódio.

Segundo MAHAJAN & KAMAT (1995), a uréia tem se mostrado uma fonte de nitrogênio bastante efetiva para a produção de biomassa bem como para a produção do ácido graxo  $\gamma$ -linolênico. Os mesmos autores verificaram que dentre diversas fontes de nitrogênio estudadas, KNO<sub>3</sub>, NaNO<sub>3</sub>, uréia, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (nas concentrações de 0,01, 0,03 e 0,05M), a uréia à concentração de 0,01M suportou uma maior quantidade de  $\gamma$ -linolênico, que foi de 20,8  $\mu$ g/mL.

DAVIS *et al.* (1953) indica uréia como a melhor fonte de nitrogênio para produção de biomassa de *Chlorella*, pois não propicia contaminação bacteriana, induz a um crescimento mais rápido que com nitrato, mantém o pH constante e pode ser adicionado em altas concentrações sem prejudicar o crescimento.

Além disso, o nitrogênio proveniente da uréia é cinco vezes mais barato que o nitrogênio proveniente do nitrato de sódio. Sabendo-se que em um mol de uréia (60 g/mol) tem-se 28g de Nitrogênio, e que em um mol de

$\text{NaNO}_3$  (85 g/mol) tem-se 14g de Nitrogênio, é possível saber qual o custo do Kilograma de Nitrogênio proveniente das duas fontes (Tabela 18). Nesta tabela, foram considerados as médias dos preços de uréia e nitrato de sódio de grau analítico e comercial em diferentes empresas.

Segundo PIORRECK *et al.* (1984), o meio de cultura é o fator que mais encarece o cultivo de microalgas, justificando a utilização da uréia como forma de redução de custos.

Tabela 18 – Levantamento de preços de uréia e nitrato de sódio (grau analítico e comercial)

Fonte de Nitrogênio	Grau	R\$/Kg	R\$/Kg de Nitrogênio
Uréia	analítico	R\$ 9,41	R\$ 20,16
	comercial	R\$ 5,59	R\$ 11,98
$\text{NaNO}_3$	analítico	R\$ 17,19	R\$ 104,37
	comercial	R\$ 10,33	R\$ 62,72

\*1 real = 0,45 dólar comercial (US\$)

## 5.6. Avaliação estatística dos resultados

De acordo com ANDERSON *et al.* (1980), num estudo onde se trabalha com variáveis numéricas e categóricas, a análise de covariância é a mais indicada para ser usada, pois considera o efeito de uma variável numérica principal com a devida correção do efeito de uma outra variável numérica, intimamente relacionada à primeira. No estudo em questão, temos como variáveis principais a serem estudadas a fração de corte e os correspondentes ciclos de cultivo. No entanto, a variável numérica tempo de alimentação ( $T_a$ ) é um fator que deve ser considerado, pois para cada fração de corte pode haver um tempo ótimo para alimentação do cultivo. Em outras palavras, quando se trabalha com menores frações de corte, espera-se que as melhores condições de cultivo se dêem com tempos de alimentação mais

curtos, se comparados com cultivos onde se trabalha com maiores frações de corte. Assim, na avaliação estatística apresentada a seguir, foram consideradas como variáveis principais a fração de corte (variável numérica) e ciclo de cultivo (variável categórica), enquanto que o tempo de alimentação foi considerado como uma covariável.

### 5.6.1. Análise da concentração celular máxima ( $X_m$ )

A análise de covariância (ANCOVA) aplicada aos dados de concentração celular máxima ( $X_m$ ) da Tabela 17, está apresentada na Tabela 19.

De acordo com os valores dos níveis descritivos (p) da Tabela 19, pode ser observado que de uma forma geral, considerando os ensaios 1 a 12, as variáveis tempo de alimentação e fração de corte foram determinantes em seus resultados. De fato, para cada fração de corte há um tempo de alimentação mínimo para que seja possível o acoplamento da adição do nutriente limitante (uréia) com o crescimento celular, de forma que a concentração celular seja mantida nos três ciclos. Assim, o final do cultivo não seria determinado pela fonte de nitrogênio, mas sim pelo efeito de sombreamento e/ou aumento de pH do meio de cultivo.

Tabela 19 - Análise estatística de covariância (ANCOVA) aplicada aos dados experimentais de concentração celular máxima ( $X_m$ ).

Fonte	GL	SQ	QM	F	p
Covariável:					
Ta	1	703290	703290	24,95	0,000*
Principais efeitos:					
Fc	3	1545983	515328	18,28	0,000*
Ciclo	2	92215	46107	1,64	0,212
Erro	29	817481	28189		
Total	35	2501854			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; Ta: tempo de alimentação (dias); Fc: fração de corte (%); Ciclo: ciclo de cultivo.

\*: Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Considerando a covariável tempo de alimentação ( $T_a$ ), observando-se a Tabela 17 e o valor do coeficiente angular correspondente a  $T_a$  obtido pelo teste t-Student (coeficiente angular = 51,04 mg/L.d), nota-se que  $X_m$  foi uma função crescente desta. De fato, para a maioria dos ciclos e frações de corte, esse comportamento foi verificado.

O mesmo comportamento não foi observado para a variável fração de corte. Em média, os valores de  $X_m$  são equivalentes nos ensaios com 20% (2119 mg/L) e 80% de fração de corte (2130 mg/L) e há uma queda de 14,5 % nos valores de  $X_m$  (em média) quando a fração de corte aumenta de 20% para 50%, e 15,1% quando a fração de corte aumenta de 80% para 95%, o que refletiu fortemente na análise estatística ( $p < 0,001$ , Tabela 19).

Quando se observa os ensaios com maiores tempos de alimentação dentro de cada fração de corte, verifica-se que todos atingem valores de  $X_m$  satisfatórios. A avaliação conjunta dessas duas variáveis independentes (fração de corte e tempo de alimentação) indica que, desde que o tempo de alimentação seja adequado para suportar o crescimento microbiano durante todo o seu desenvolvimento, qualquer uma das frações de corte seriam igualmente adequadas para atingir altos valores de concentração celular máxima. De fato, ao final do terceiro ciclo de cultivo, a diferença de concentração celular máxima entre o ensaio 3, 6 e 9 é menor que 4%.

Numa segunda análise, considerando-se os ensaios 7, 8 e 9 (Tabelas 10, 11 e 12), observa-se que na fração de corte de 80%, o menor tempo de alimentação empregado, 6 dias, já foi o suficiente para atingir valores de  $X_m$  satisfatórios ao longo dos 3 ciclos, embora o ensaio 9 tenha apresentado, em média, valores de  $X_m$  um pouco maiores (9,6%). Aplicando-se análise de variância (ANOVA) para os valores de  $X_m$ , separadamente, em cada fração de corte (Tabela 20), observa-se que o tempo de alimentação é uma variável independente que só exerce influência significativa sobre os valores de  $X_m$  nos ensaios com fração de corte de 20%, 50% e 95%, mas não nos ensaios com fração de corte de 80%.

Ao se avaliar o ciclo de cultivo, considerando os ensaios com 20%, 50% e 95% de fração de corte, quando se emprega menores tempos de

alimentação, há uma tendência de queda nos valores de  $X_m$  obtidos no decorrer dos ciclos (principalmente nos ensaios 1, 4 e 11). Já nos ensaios com maiores tempos de alimentação (ensaios 3, 6 e 12) e em todos os ensaios com 80% de fração de corte (ensaios 7, 8 e 9), não se observa grandes variações de  $X_m$  ao longo dos ciclos, o que é comprovado quando se observa que o valor do nível descritivo ( $p$ ) é igual a 0,212.

Tabela 20 - Análise estatística de variância (ANOVA) aplicada aos dados experimentais de concentração celular máxima ( $X_m$ ) em cada Fração de Corte.

Fonte de variação	$p$			
	Fc=20%	Fc=50%	Fc=80%	Fc=95%
Tempo de Alimentação	0,019*	0,026*	0,132	0,025*
Ciclo de cultivo	0,025*	0,833	0,976	0,329

Fc: fração de corte (%).

\*: Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Os ensaios com 80% de fração de corte (ensaios 7, 8 e 9), apresentaram os maiores valores de  $X_m$ , reprodutíveis ao longo dos 3 ciclos (Tabela 17), com uma média de 2130 mg.L<sup>-1</sup>. Esse resultado é superior aos valores de  $X_m$  obtidos por CARVALHO *et al.* (2004) e SANCHEZ-LUNA *et al.* (2003) que obtiveram 1439 mg.L<sup>-1</sup> e 1145 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Isso pode ser explicado pelo fato de que embora CARVALHO *et al.* (2004) também tenham empregado intensidade luminosa de 9 klux, como neste trabalho, a fonte de nitrogênio foi NH<sub>4</sub>Cl (cloreto de amônio) que propicia maior perda de amônia por volatilização. SANCHEZ-LUNA *et al.* (2003), como no presente trabalho, empregaram uréia como fonte de nitrogênio, mas a intensidade luminosa empregada foi menor (6 klux), o que pode ter levado a um reduzido  $X_m$ .

### 5.6.2. Análise da produtividade em células (Px)

Considerando que a produtividade em células representa a relação entre concentração de biomassa formada e o correspondente tempo que

levou para atingir o valor máximo da concentração celular, espera-se desta variável uma relação complexa principalmente com a variável tempo de alimentação. Fixando-se uma fração de corte, espera-se que se um tempo de alimentação mais curto é empregado, um menor tempo de cultivo será obtido, o que confere a possibilidade do aumento da produtividade em células.

Esse comportamento é nitidamente visível nos ensaios com 80% de fração de corte. Nesse caso, o ensaio 7 ( $T_a=6$  dias) apresentou uma produtividade de  $219,33 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , em média, o que corresponde a quase 1,7 vezes às produtividades dos ensaios 8 ( $T_a = 10$  dias) e 9 ( $T_a = 14$  dias), com produtividades de  $131,66$  e  $130 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , em média, respectivamente. Nos ensaios com 20%, 50% e 95% de fração de corte, ainda que em menor grau, também se percebe que  $P_x$  é uma função decrescente de  $T_a$ , o que é confirmado pelo coeficiente angular associado à variável  $T_a$  em sua influência em  $P_x$  ( $-7,763 \text{ mg/L.d}^2$ ). Essa influência do tempo de alimentação do cultivo na produtividade em biomassa é confirmada pelos valores dos níveis descritivos ( $p<0,001$ ) na Análise de Covariância (Tabela 21).

Tabela 21 - Análise estatística de covariância (ANCOVA) aplicada aos dados experimentais de produtividade de células ( $P_x$ ).

Fonte	GL	SQ	QM	F	p
Covariável:					
Ta	1	16271	16271	15,67	0,000*
Principais efeitos:					
Fc	3	35657	11886	11,44	0,000*
Ciclo	2	1585	792	0,76	0,475
Erro	29	30121	1039		
Total	35	67534			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio;  $T_a$ : tempo de alimentação (dias); Fc: fração de corte (%); Ciclo: ciclo de cultivo.

\*: Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Os maiores valores de  $P_x$ , resultantes do ensaio 7 (média dos três ciclos igual a  $219 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  – Tabela 17) foram superiores aos obtidos por RANGEL-YAGUI *et al.* (2004) e DANESI *et al.* (2004) que obtiveram  $114,4 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  e  $116,6 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ , respectivamente. Ambos os trabalhos foram realizados em processo descontínuo alimentado com alimentação de uréia

exponencialmente crescente. Embora os valores de  $X_m$  não tenham sido tão baixos nesses trabalhos (1945 mg.L<sup>-1</sup> para o primeiro e 1799 mg.L<sup>-1</sup> para o segundo), as intensidades luminosas de 5,6 klux (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004) e 5 klux (DANESI *et al.*, 2004) e/ou menores valores de concentração celular inicial levaram a cultivos mais longos, de forma que a relação entre a concentração celular produzida e o correspondente tempo tenha levado a um valor menor que o obtido neste trabalho.

A Tabela 21 mostra que, estatisticamente, a fração de corte apresenta uma significativa influência sobre a produtividade de biomassa ( $p < 0,001$ ). Ao se analisar essa variável independente, verifica-se que uma fração de corte de 80% levou a maiores produtividades em biomassa, havendo uma queda de aproximadamente 29% quando se aplicou 20% de fração de corte, aproximadamente 39% quando se aplicou 50% de fração de corte, e 16% quando se aplicou 95% de fração de corte, levando-se em consideração os valores médios das produtividades em cada grupo com fração de corte específica. BAJPAI & BAJPAI (1988) mostraram que para a produção do chamado “single cell protein” (usando culturas de levedura e fungos) por processo descontínuo alimentado repetitivo, quanto menor a fração de corte, maior a produtividade de biomassa. Este resultado não foi observado no cultivo de *Spirulina platensis*, em que a maior produtividade foi obtida com a segunda maior fração de corte empregada, 80%.

Quando se aumentou a fração de corte de 80% para 95%, a baixa concentração celular no início de cada ciclo pode ter levado a uma exposição maior à luz, de forma que o fenômeno da fotoinibição (TORZILLO & VONSHAK, 1994) pôde retardar o crescimento das células. Provavelmente, esse fato, associado ao menor número de células em crescimento exponencial no início do ciclo são responsáveis pela queda da produtividade em células (Px) nos ensaios 10, 11 e 12, com 95% de fração de corte (Tabela 17).

A diminuição dos valores de produtividade em células (Px) nos ensaios com 20% e 50% de fração de corte pode ser explicada pelo fato de que com uma menor fração de corte, a concentração celular, no início de cada ciclo, é suficientemente alta para causar sombreamento no meio de cultivo.



Quanto ao ciclo de cultivo, não se pode observar estatisticamente que essa variável levou a algum efeito nos resultados da produtividade em células ( $p= 0,475$ ; Tabela 21). Isso indica que o processo descontínuo alimentado repetitivo poderia ser eficientemente empregado no cultivo de *Spirulina platensis*, mesmo utilizando uma fonte de nitrogênio diferente de nitratos, como uréia, caso deste trabalho.

### 5.6.3. Análise do fator de conversão de nitrogênio em células ( $Y_x/n$ )

Considerando os ensaios 1 a 12, verifica-se que o tempo de alimentação e a fração de corte são variáveis de grande efeito sobre o Fator de Conversão de Nitrogênio em células ( $p < 0,001$  para ambos os casos), como se observa na Tabela 22. De fato, observando-se os resultados de  $Y_x/n$  na Tabela 17, nota-se de uma maneira geral que para cada fração de corte houve uma tendência de diminuição de  $Y_x/n$  com o aumento do tempo de alimentação ( $T_a$ ) do cultivo. Esse tipo de comportamento, indicando que  $Y_x/n$  é uma função decrescente de  $T_a$  já fora observado em trabalho anterior, utilizando cloreto de amônio como fonte de nitrogênio (CARVALHO et al., 2004), em que menores tempos de alimentação levavam a um melhor aproveitamento da fonte de nitrogênio, evitando grandes perdas por volatilização da amônia.

Tabela 22 - Análise estatística de covariância (ANCOVA) aplicada aos dados experimentais de fator de conversão de nitrogênio em células ( $Y_{X/N}$ ).

Fonte	GL	SQ	QM	F	p
Covariável:					
Ta	1	42,960	42,960	33,90	0,000*
Principais efeitos					
Fc	3	98,452	32,817	25,90	0,000*
Ciclo	2	1,707	0,853	0,67	0,518
Erro	29	36,751	1,267		
Total	35	137,068			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; Ta: tempo de alimentação (dias); Fc: fração de corte (%); Ciclo: ciclo de cultivo.

\*: Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Avaliando-se a fração de corte, verifica-se que com o aumento dessa variável de 20% para 50% e posteriormente para 80%, há um aumento no fator de conversão de nitrogênio em células (Tabela 17). Aumentando-se a fração de corte, a concentração inicial de células em cada ciclo é menor, o que resulta em uma maior produção total de biomassa dentro de cada ciclo. Provavelmente esse é um fator preponderante para um melhor aproveitamento da uréia na produção de biomassa de *Spirulina platensis*, pois nesse caso grande parte do crescimento celular ocorre em condições não limitantes de luz. Entretanto, com o aumento da fração de corte de 80% para 95%, há uma queda de aproximadamente 18% nos valores de fator de conversão de nitrogênio em células (em média), o que confirma a idéia de que 80% é a fração de corte que leva a um maior aproveitamento da fonte de nitrogênio pelas células em um processo de cultivo.

No ensaio 7 ( $F_c = 80\%$  e  $T_a = 6$  dias) foi possível obter os maiores valores de  $Y_{x/n}$ , com média de  $10,3 \text{ mg.mg}^{-1}$ . RANGEL-YAGUI *et al* (2004) que empregaram uréia como fonte de nitrogênio, obtiveram  $8,1 \text{ mg.mg}^{-1}$  como maior valor de  $Y_{x/n}$ . Nesse caso, a intensidade luminosa de apenas 5,6 klux pode explicar o menor valor de  $Y_{x/n}$ . Já CARVALHO *et al.* (2004) embora tenham empregado intensidade luminosa de 9 klux, obtiveram um valor de  $Y_{x/n}$  também menor ( $7,39 \text{ mg.mg}^{-1}$ ) provavelmente decorrente do uso de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como fonte de nitrogênio. Este sal se dissocia rapidamente no meio de cultivo, possibilitando uma perda mais rápida da fonte de nitrogênio por volatilização da amônia.

O fato do fator de conversão de nitrogênio em células não ser uma função do ciclo de cultivo indica que a incorporação de nitrogênio às células se manteve estável durante os ciclos de cultivo. Assim, reforçaria a idéia de que quando o tempo de alimentação é bastante curto, caso dos experimentos 1 e 4, que utilizaram frações de corte de 20% e 50%, respectivamente, a concentração celular seria decrescente ao longo dos ciclos até que houvesse um equilíbrio entre a quantidade de nitrogênio adicionada e a quantidade de células formada. No entanto, nesses ensaios, devido aos resultados de concentração celular máxima serem pouco expressivos, não se teve a

intenção de continuá-los por mais ciclos, uma vez que não levariam a resultados interessantes do ponto de vista de aplicação.

#### V.6.4 - Análise do teor de proteínas e lipídeos da biomassa.

O conhecimento da composição de alimentos é uma informação básica para o estabelecimento de diversas ações na área da saúde, prescrição de dietética individual, realização de estudos de balanço e avaliação no suprimento e consumo alimentares de um país (SASSANO, 2004).

Ao final de cada ciclo, a biomassa resultante foi levada à estufa para obtenção da massa seca, em que se analisou o teor de proteínas e lipídeos. Como se pode observar na Tabela 16, o conteúdo de proteínas não foi afetado pelas condições experimentais. Segundo RANGEL (2000), a utilização de uréia como fonte de nitrogênio não causa mudanças significativas no conteúdo de proteínas em relação aos cultivos com  $\text{KNO}_3$ . E neste trabalho, as condições experimentais também não exerceram influência sobre este parâmetro, o que é indicado na Tabela 23, em que os valores dos níveis descritivos são todos muito maiores do que 0,05.

Tabela 23 - Análise estatística de covariância (ANCOVA) aplicada aos dados experimentais de teor de proteínas na biomassa seca obtida.

Fonte	GL	SQ	QM	F	p
Covariável:					
Ta	1	17,68	17,68	0,45	0,508
Principais efeitos					
Fc	3	214,14	71,38	1,82	0,166
Ciclo	2	34,36	17,18	0,44	0,650
Erro	29	1139,62	39,30		
Total	35	2000,50			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; Ta: tempo de alimentação (dias); Fc: fração de corte (%); Ciclo: ciclo de cultivo

Em média, o teor de proteínas foi de  $52,25\% \pm 5,16\%$ , estando dentro do valor esperado para biomassa de *Spirulina* (VONSHAK, 1997b), que varia de 50 a 60%, sendo extremamente próximo dos obtidos por MAHAJAN &

KAMAT (1995) (54%), quando da realização de experimentos em condições não limitadas de nitrogênio. Esse valor ( $52,25\% \pm 5,16\%$ ) é próximo de resultados obtidos para cultivos de *S. platensis* a  $27^{\circ}$  C utilizando nitrato como fonte de nitrogênio (60,5%) (DANESI et al., 2002) ou uréia ( $62,50\% \pm 4,67\%$ ) (DANESI et al., 2004). Essa diferença se acentua um pouco mais quando comparado com os resultados obtidos por TOKUSOGLU & ÜNAL (2003), realizados a  $20^{\circ}$  C. Estes autores encontraram teores de proteína de 63,00% para a biomassa de *S.platensis*. Por outro lado, obtiveram valores menores de teores de proteína para biomassas de *Chlorella vulgaris* (47,82%) e *Isochrysis galbana* (26,99%). Os valores encontrados neste trabalho também não se distanciam muito dos encontrados por OLIVEIRA et al. (1999), que obtiveram teor de proteínas de 64,35% em biomassa de *Spirulina platensis* e 68,67% em biomassa *Spirulina maxima*, em cultivos a  $30^{\circ}$  C. Com a redução da temperatura, estes autores encontraram um aumento do teor de proteínas para 71,56% (*S. platensis*) e 70,24% (*S. maxima*), mas, nesses casos, houve considerável diminuição na produtividade em células. As diferenças encontradas entre os trabalhos com *Spirulina* podem ser decorrentes das diferentes condições de cultivo e, como assinala VONSHAK (1997b), das metodologias analíticas adotadas para a medida do teor de proteína da biomassa.

O conteúdo de lipídeos também não foi afetado pelas condições experimentais, o que pode ser observado na Tabela 24, onde foram obtidos valores de p iguais a 0,379; 0,571 e 0,785 para Tempo de Alimentação, Fração de Corte e Ciclo de Cultivo, respectivamente.

Tabela 24 - Análise estatística de covariância (ANCOVA) aplicada aos dados experimentais de teor de lipídeos na biomassa seca obtida.

Fonte	GL	SQ	QM	F	P
Covariável:					
Ta	1	13,23	13,23	0,80	0,379
Principais efeitos					
Fc	3	33,80	11,27	0,68	0,571
Ciclo	2	8,06	4,03	0,24	0,785
Erro	29	480,13	16,56		
Total	35	534,92			

GL: graus de liberdade; SQ: soma dos quadrados; QM: quadrado médio; Ta: tempo de alimentação (dias); Fc: fração de corte (%); Ciclo: ciclo de cultivo.

Em média, o teor de lipídeos foi de  $15,44\% \pm 3,88\%$ , estando dentro da faixa considerada como típica para a *Spirulina*, que vai de 6% a 13% (COHEN, 1997). O valor encontrado está acima do obtido por OLIVEIRA et al. (1999), em cultivos de *Spirulina* spp. a 30° C, correspondentes a 6,96% e 6,20% para biomassas de *S. platensis* e *S. maxima*, respectivamente. Por outro lado, o valor encontrado neste trabalho está bastante abaixo de valores encontrados por MAHAJAN & KAMAT (1995), utilizando baixas quantidades de nitrogênio. Nestas condições, obtiveram biomassa com alta concentração de lipídeos (45% da biomassa seca). Ainda constataram que com altas quantidades de nitrogênio, o teor de lipídeos na biomassa caiu para 20 % da massa seca, e com isto a quantidade de proteína pôde subir de 8% para até 54%.

SYRETT (1962) descreve que o nitrogênio assimilado pelo microrganismo é utilizado primeiro para o crescimento celular e, posteriormente, para formação de nitrogênio orgânico como material de reserva. Neste trabalho, os teores de proteínas variaram de 45,00% a 62,22%, e os teores de lipídeos variaram de 10,00% a 21,90%. Isso indica que em todos os ensaios, houve disponibilidade de nitrogênio suficiente tanto para o crescimento celular quanto para a produção de nitrogênio orgânico, na forma de proteínas, como material de reserva da célula.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos pelos ensaios permitem concluir que:

- Para frações de corte de 20%, 50% e 95%, tempos de alimentação mais longos proporcionam maiores valores de Concentração celular máxima ( $X_m$ ), que podem apresentar reprodutibilidade ao longo dos ciclos de cultivo. Ensaio com tempos de alimentação mais reduzidos, embora tenham levado a melhores resultados em termos de Produtividade de células ( $P_x$ ) e Fator de conversão de nitrogênio em células ( $Y_{X/N}$ ), não foram adequados para manutenção da concentração celular ao longo de três ciclos de cultivo.
- O mesmo fenômeno não ocorre quando se aplica fração de corte de 80%, em que não houve grandes variações, em termos de  $X_m$ , entre os 3 tempos de alimentação aplicados, sendo que o menor tempo de alimentação (ensaio 7, com 6 dias de alimentação) apresentou as melhores condições de cultivo com valores de Concentração Celular Máxima satisfatórios ao longo dos 3 ciclos (2072, 2005 e 2225 mg.L<sup>-1</sup>), e maiores valores de Produtividade de células (205, 225 e 228 mg.L<sup>-1</sup>.D<sup>-1</sup>) e Fator de Conversão de Nitrogênio em Células (10,0; 9,6 e 11,2 mg.mg<sup>-1</sup>)
- As condições de cultivo não afetaram os teores de lipídeos e proteínas na biomassa microbiana.
- A aplicação do processo descontínuo alimentado repetitivo, empregando uréia como fonte de nitrogênio, pode ser viável na produção de biomassa de *Spirulina platensis*, com alto teor de proteínas, reduzindo custos de produção em termos de matéria-prima e processo.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

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

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

ANDERSON, S.; QUQUIER, A.; HAUCK, W. W.; OAKES, D.; VANDAELE, W.; WEISBERG, H. I. **Statistical Methods for Comparative Studies** - Techniques for Bias Reduction. New York: John Wiley & Sons, 1980. p. 140-160. (Wiley series in probability and mathematical statistics).

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

AZOV, Y. Effect of pH on inorganic carbon uptake in algal cultures. **Applied and Environmental Microbiology**. v.43, p.1300-1306. 1982.

BAE, S. M.; PARK, Y. C.; LEE, T. H.; KWEON, D. H.; CHOI, J. H.; KIM, S. K.; RYU, Y. W, SEO, J. H. Production of xyliton by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing xylose reductase gene in repeated fed-batch and cell-recycle fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**. v.35, p.545-549, 2004.

BAJPAI, P. and BAJPAI, P. K.; Repeated fed batch fermentation for single cell protein production from phrehydrolisate of a pulp mill. **Enzyme and Microbial Technology**. v.10, p.280-283, 1988.

BECKER, E.W.; VENKATARAMAN, L.V. Production and processing of algae in pilot plant scale experiences of the Indo-German project. In: SHELEF, G.; SOEDER, C.J., eds. **Algae biomass: production and use**. Amsterdam: Elsevier; New York: North Holland Biochemical Press, 1980. p.35-50. (International Symposium on the Production and Use of Micro-algae Biomass, 1978, Acre - Israel).

---

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

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 & Francis, 1997. p.131-158.

BELKIN, S.; BOUSSIBA, S. High internal pH conveys ammonia resistance in *S. platensis*. **Bioresource Technology**. v.32, p.167-169, 1991.

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

BOROWITZKA, M. A. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. **Journal of Applied Phycology**. v.7, p.3-15. 1995.

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

BORZANI, W. Fermentação Semicontínua. In: SCHMIDELL NETTO, W.; ALMEIDA-LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., coord. **Biociologia industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v.2, p.219-222.

BORZANI, W. Variation of the ethanol yield during oscillatory concentrations changes in undisturbed continuous ethanol fermentation of sugar-cane blackstrap molasses. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v.17, p.253-258, 2001b

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

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

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

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua. In: SCHMIDELL NETTO, W.; ALMEIDA-LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., coord. **Biociologia industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v.2, p.193-204.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua alimentada. In: SCHMIDELL NETTO, W.; ALMEIDA-LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.,



coord. **Biotecnologia industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001b. v.2, p.205-218.

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

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

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

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

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**. v.23, p.261-269, 2002.

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

DAVIS, E.A.; DEDRICK, J.; FRENCH, C.S.; MILNER, H.W.; MYERS, J.; SMITH, J.H.C.; SPOEHR, H.A. Laboratory experiments on *Chlorella* culture at the Carnegie Institution of Washington department of plant biology. In: BURLEW, J.S., ed. **Algal culture: from laboratory to pilot plant**. Washington: Carnegie Institution of Washington, 1953. p.105-153. (Publication, n.600).

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

DOMINGUES, L.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. A. *Aspergillus niger* – galactosidase production by yeast in a continuous high cell density reactor. **Process Biochemistry**. v.40, p.1151-1154, 2005.

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

(International Symposium on the Production and Use of Micro-algae Biomass, 1978, Acre – israel).

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação contínua. In: SCHMIDELL NETTO, W.; ALMEIDA-LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., coord. **Biotechnologia industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001b. v.2, p.223-246.

FERRAZ, C.A.M.; AQUARONE, E.; KRAUTER, M.; BALLONI, W.; FLORENZANO, G. Utilização de subprodutos da indústria alcooleira na obtenção de biomassa de *Spirulina maxima*. Parte II. Emprego do resíduo da destilação do mosto fermentado (vinhaça). **Revista de Microbiologia**, v.17, p.15-21, 1986

FERRAZ, C.A.M. Produção de *Spirulina maxima*: influência de ecofatores e uso de um sub produto da indústria alcooleira. São Paulo, 1986, 223p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

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

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

GIRIDHAR, R.; SRIVASTAVA, A.K. Repeated fed-batch sorbose fermentation by *Gluconobacter oxydans*. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**. v.15, p.127-129, 2001.

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

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

HAYASHI, W. Calcium Spirulan, an inhibitor of enveloped vírus replication, from a blue green alga *Spirulina*. **Journal of Natural Products**. v.59, p.83-87, 1996.

HENRIKSON, R. **Earth food Spirulina**: how this remarkable blue-green algaecan transform your health and your planet. Kenwood: Ronore Enterprises, 1997. 180p. Disponível em: <http://www.spirulinasource.com/earthfood.html>. Acesso em: 20 fev. 2006.

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

KELLER, R.; DUNN, I. J. Computer simulation of the biomass production rate of cyclic fed batch continuous culture. **Journal of Applied Chemistry and Biotechnology Abstracts**. V.28, p.784-790. 1978.

KUMAR, M.S.; JANA, S.K.; SENTHIL, V.; SHASHANKA, V.; KUMAR, S.V.; SADHUKHAN, A.K. Repeated fed-batch process for improving lovastin production. **Process Biochemistry**. v.36, p.363-368, 2000.

LACAZ-RUIZ, R. Espirulina e Zootecnia. In: LACAZ-RUIZ, R., coord. **Espirulina – Estudos & Trabalhos**. São Paulo: Roca. 2003, p.1-34.

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

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

LI, X. B.; ZHAO, G. R.; YUAN, Y. J. A strategy of phosphorus feeding for repeated fed-batch fermentation of penicillin G. **Biochemical Engineering Journal**. v.27, p.53-58, 2005.

LI, O.; KANG, C.; ZHANG, C. Waste water produced from a oilfield and continuous treatment with an oil-degrading bacterium. **Process Biochemistry**. v.40, p.873-877, 2005b.

LITCHFIELD, J. H. Single cell protein. **Food technology**. V. 31, p. 175-179. 1977.

MACEDO, R.V.T.; ALEGRE, R.M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina máxima* em dois níveis de temperatura. Parte II: Produção de lipídeos. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**. v.21, n.2, p.183-186, 2001.

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

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

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

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

MILLER, A. G.; COLMAN, G. Evidence for  $\text{HCO}_3^-$  transport by the blue-green alga (cyanobacterium) *Coccochloris peniocyctis*. **Plant Physiology**. v.65, p.397-402, 1980.

MORI, H.; YAMANE, T.; KOBAYASHI, T.; SHIMIZU, S. Comparison of cell productivities among fed-batch, repeated fed-batch and continuous cultures at high cell concentration. **Journal of Fermentation Technology**. v.61, p.391-401, 1983.

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

NUNES, V. A.; GOMES, G. A; SILVA, R. C. S.; LACAZ-RUIZ, R. Tópicos de biologia molecular para o estudo de cianobactérias. In: LACAZ-RUIZ, R., coord. **Espirulina – Estudos & Trabalhos**. São Paulo: Editora Roca. 2003, p.235-237.

OLIVEIRA, M. A. C. L.; MONTEIRO, M. P. C.; ROBBS, P. G.; LEITE, S. G. F. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. **Aquaculture International**, v.7, p.261-275, 1999.

PAMBOUKIAN, C. R. D. Utilização de processos contínuos para a produção do antitumoral retamicina por *Streptomyces olindensis*. In: **XIV SINAFERM: Anais**. Florianópolis, 2003.

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.

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

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

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

PELOSI, E.; MARGHERI, M. C.; TOMASELLI, L. *Spirulina* morphology. **Caryologia**. v 35, n.1, p.157-158, 1982.

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

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

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

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

RICHMOND, A. Phototropic microalgae. In: REHM, H. J.; REED, G. (eds.) **Biotechnology**. Weinheim: Verlag Chemie, 1983. v.3.

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

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

SAMUELSSON, G. ; LÖNNEBORG, A. ; ROSENQVIST, E. ; GUSTAFSSON, P. ; ÖQUIST, G. Photoinhibition and reactivation of photosynthesis in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. **Plant Physiology**. v.79, p.992-995, 1985.

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

SANCHEZ-LUNA, L.D.; TONINI, G.C.; SATO, S.; CARVALHO, J.C.M. Avaliação do crescimento de *Spirulina platensis* por processo descontínuo alimentado

utilizando metodologia de superfície de resposta. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, supl.3, p.157-159, 2003. (VIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP, São Paulo - Brasil, 13 a 17 de outubro de 2003).

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

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

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

SCHMIDELL, W. ; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e processos fermentativos. In: SCHMIDELL NETTO, W.; ALMEIDA-LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., coord. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v.2, p.179-192.

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

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

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

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

TOKUSOGLU, Ö; ÜNAL, M. K. Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrasis galbana*. **Journal of Food Science**, v.68, p.1144-1148, 2003.

TOMASELLI, L. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira (Spirulina) maxima* and *Arthrospira (Spirulina) platensis*. In: VONSHAK, A., ed. ***Spirulina platensis (Arthrospira)*: physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997, p.1-14.

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

TROTТА, P. A simple and inexpensive system for continuous monoxenic ass culture of marine microalgae. **Aquaculture**. v.22, p.383-387, 1978.

UNIVERSIDADE DO TEXAS. By genus. *Anacystis – Arthrospira*. 1926 *Spirulina platensis*. **Spirulina platensis UTEX 1926**. 2006. Disponível em: [http://www.bio.utexas.edu/research/utex/photogallery/s/Spirulina\\_platensis\\_1926.htm](http://www.bio.utexas.edu/research/utex/photogallery/s/Spirulina_platensis_1926.htm). Acesso em: 27 jul. 2006.

VARGA, L.; SZIGETI, J.; KOVÁCS, R.; FÖLDES, T.; BUTI, S. Influence of a *Spirulina platensis* biomass on the microflora of fermented ABT milks during storage (R1). **Journal of Dairy Science**. v. 85, p.1031-1038, 2002.

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.

VONSHAK, A. **Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor and Francis, 1997b. p.225.

WEIGAND, M. A. Maximum cell productivity by repeated fed-batch culture for constant yield case. **Biotechnology and Bioengineering**. v.23, p.249-266, 1981.

YAMANE, T.; SHIMIZU, S. Fed-batch techniques in microbial process. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**. v.30, p.147-194. 1984

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