

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

Estudo da intensidade luminosa no cultivo de *Arthrospira*
(*Spirulina*) *platensis* em reator tubular utilizando sulfato de
amônio como fonte de nitrogênio por processo descontínuo
alimentado

Light intensity study of *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation in tubular reactor
using ammonium sulfate as a nitrogen source by fed-batch

Lívia Seno Ferreira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

São Paulo
2008

Lívia Seno Ferreira

Estudo da intensidade luminosa no cultivo de *Arthrospira (Spirulina)*
platensis em reator tubular utilizando sulfato de amônio como fonte de
nitrogênio por processo descontínuo alimentado

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

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

Prof. Dr. Sunao Sato
1º. examinador

Profa. Dra. Eliane Dalva Godoy Danesi
2º. examinador

São Paulo, 25 de Abril de 2008.

Com carinho dedico este trabalho:

Aos meus pais, José e Midori, pelos exemplos de vida que são e prioridade que sempre deram à minha educação.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, querida, grande mulher, por seu amor sem fronteiras, por sempre estar presente nos momentos mais importantes da minha vida;

Ao meu pai, querido, meu exemplo de caráter e honestidade, pelos ensinamentos, amor e preocupação;

À minha irmã, Letícia pelo carinho e incentivo;

Ao Victor, por ser o meu amigo de todos os momentos, por tudo que passamos juntos e pelo apoio que me fazem ter a certeza de que “*You are my sunshine*”;

Ao Professor Doutor João Carlos Monteiro de Carvalho pela confiança, estímulo, conselhos, amizade e valiosa orientação;

Ao Professor Titular Sunao Sato, pela recepção, confiança, amizade e ensinamentos;

Às Professoras Doutoras Telma Mary Kaneko e Eliane Dalva Godoy Danesi pelas sugestões no trabalho;

Aos professores do curso da pós-graduação em Tecnologia Bioquímico Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP por fazerem parte da minha formação;

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Tecnologia Bioquímico - Farmacêutica Miriam, Juarez e Elza, e aos funcionários da Secretaria de pós-graduação, Elaine e Jorge, pela dedicação e por estarem sempre prontos a ajudar;

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

Aos amigos, Raquel, Marcelo, Valéria, Cíntia, Débora, que fizeram dos meus dias em São Paulo mais alegres, pelo estímulo, companheirismo de trabalho, conversas, risadas ou comemorações. E à Mayla, pelo aprendizado juntas, por estar sempre disposta a ajudar e pelo incentivo;

À aluna de iniciação científica, Renata, pela amizade, sempre agradável companhia no dia-a-dia de trabalho. Aos técnicos Kleber e Dante e a todas as pessoas que também contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho;

Aos amigos de Campinas: do Laboratório de Bioaromas, CD, Jana, Fábio, Rô, Ana, Mário; da pensão da dona Pia: Verena, Thaís, Paula, Nancy, Sarah,

Marcelle, Amábile e da faculdade: Helena, Amandita, Fer, Thierry, Veri, Jú, e Alexandre. Todos contribuíram para que eu chegasse até aqui, sejam pelas gargalhadas juntos, pelos momentos sérios de aprendizado, pela convivência e amizade;

À minha família: avós, tios e primos. Todos muito queridos, que sempre me deram um exemplo de união, pelos conselhos, amizades, histórias, viagens e muito aprendizado;

À família do Victor, Ednilsa, Carlos, Elizandra, Silvio e Roberta, para com a qual tenho muita consideração, pelo apoio e companhia desde que cheguei em São Paulo.

“Propriedades podem ser destruídas e o dinheiro pode perder o seu poder de compra; mas o caráter, a saúde, o conhecimento e o bom senso serão sempre procurados sob quaisquer circunstâncias.”

(Roger Babso)

RESUMO

A *Arthrospira (Spirulina) platensis*, cianobactéria fotoautotrófica, tem sido cultivada para a produção de biomassa, apresentando em sua constituição proteínas, ácidos graxos poliinsaturados, pigmentos, minerais, vitaminas e aminoácidos. O uso de fontes de nitrogênio de baixo custo, como o sulfato de amônio, pode contribuir para a viabilização da produção de *A. platensis*. Neste trabalho foram verificadas a influência de diferentes intensidades luminosas e protocolos de alimentação utilizando o sulfato de amônio, em cultivos realizados com reatores tubulares por processo descontínuo alimentado. As variáveis dependentes selecionadas foram concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_x), fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$), bem como teores de proteínas e lipídios da biomassa. Foram obtidos excelentes resultados em cultivos realizados aplicando-se um protocolo de alimentação de sulfato de amônio, considerando biomassa seca de *A. platensis* com teor de 7 % de nitrogênio, com valor médio de X_m igual a 11414 mg.L⁻¹. Este protocolo de adição de sulfato de amônio com intensidade luminosa de 240 $\mu\text{mol f\acute{o}tons. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ levou à melhor combinação de obtenção de X_m e P_x , com valores finais de 12200 mg.L⁻¹ e 1686 mg.L⁻¹.d⁻¹, respectivamente. Adicionalmente, nesse protocolo de adição de sulfato de amônio, os valores de concentração celular máxima foram da mesma ordem de grandeza que aqueles onde se utilizou nitrato de sódio, evidenciando, assim, a possibilidade do uso do sulfato de amônio como uma fonte de nitrogênio alternativa para o cultivo da *A. platensis*.

Palavras-chave: *Arthrospira (Spirulina) platensis*. Processo descontínuo alimentado. Sulfato de amônio. Intensidade luminosa.

ABSTRACT

Arthrospira (Spirulina) platensis, a photoautotrophic cyanobacterium, has been cultivated for the production of biomass, and it is constituted by proteins, polyunsaturated fatty acids, chlorophyll, minerals, vitamins and amino acids. The use of low cost nitrogen sources, such as ammonium sulphate, can contribute to the *A. platensis* production viability. It was verified in this work the influence of different light intensities and nutrient feeding protocols in fed-batch cultures developed in tubular reactors, where ammonium sulphate was used as a nitrogen source. The dependent variables were the maximum cell concentration (X_m), cell productivity (P_x), nitrogen-to-cell conversion factor ($Y_{X/N}$), as well as proteins and lipids contents of the biomass. Excellent results were obtained when ammonium sulphate protocols were studied, considering *A. platensis* dry-weight with nitrogen levels of 7%, obtaining an average value of X_m corresponding to 11414 mg.L⁻¹. It was also obtained with this protocol, with light intensity of 240 $\mu\text{mol photons. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, the best combination to high values of X_m and P_x , corresponding to 12200 mg.L⁻¹ e 1686 mg.L⁻¹.d⁻¹, respectively. Moreover, in this protocol of ammonium sulphate addition, it was obtained values of the maximum cell concentration as high as the ones obtained with sodium nitrate as the nitrogen source. This fact highlighted the possibility of using this alternative nitrogen source for *A. platensis* cultivation.

Keywords: *Arthrospira (Spirulina) platensis*. Fed-batch process. Ammonium sulphate. Light intensity.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> (UTEX 1926)	27
Figura 2 Concentrações relativas de gás carbônico, bicarbonato e carbonato (%) em função do pH	32
Figura 3 Porcentagem de Amônia e Amônio em função do pH	33
Figura 4 Curva de calibração da <i>Spirulina platensis</i> – correlação da concentração de biomassa (mg.L^{-1}) e do logaritmo a transmitância	41
Figura 5 Curva de calibração para determinação da concentração de amônia total	44
Figura 6 Concentração celular em função do tempo no ensaio 1 (Nitrato de sódio e $60 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	52
Figura 7 Concentração de carbonato total em função do tempo no ensaio 1 (Nitrato de sódio e $60 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	52
Figura 8 Curva parabólica de adição de nitrogênio em função do tempo referente ao ensaio 2 ($60 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de amônio e adição parabólica I ($Y = 3,664 + 1,726x - 0,192x^2$))	54
Figura 9 Concentração celular e concentração de amônia em função do tempo no ensaio 2 ($60 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de amônio e adição parabólica I ($Y = 3,664 + 1,726x - 0,192x^2$))	55
Figura 10 Concentração de carbonato total em função do tempo referente ao ensaio 2 ($60 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de amônio e adição parabólica I ($Y = 3,664 + 1,726x - 0,192x^2$))	56
Figura 11 Curva parabólica de adição de nitrogênio em função do tempo referente ao ensaio 3 ($60 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de amônio e adição parabólica II ($Y = 2,565 + 1,208x - 0,134x^2$))	58
Figura 12 Concentração celular e concentração de amônia, em função do tempo, referentes ao ensaio 3 ($60 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de amônio e adição parabólica II ($Y = 2,565 + 1,208x - 0,134x^2$))	60
Figura 13 Concentração de carbonato total, em função do tempo, referente ao ensaio 3 ($60 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de amônio e adição parabólica II ($Y = 2,565 + 1,208x - 0,134x^2$))	60

Figura 14	Concentração celular e concentração de amônia, em função do tempo, referentes ao ensaio 4 ($60 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o di\u00e1ria de 3mM)	62
Figura 15	Concentra\u00e7\u00e3o de carbonato total, em fun\u00e7\u00e3o do tempo, referente ao ensaio 4 ($60 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o di\u00e1ria de 3mM)	62
Figura 16	Concentra\u00e7\u00e3o celular, em fun\u00e7\u00e3o do tempo no ensaio 5 (nitrato de s\u00f3dio e $120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	64
Figura 17	Concentra\u00e7\u00e3o de carbonato total, em fun\u00e7\u00e3o do tempo no ensaio 5 (nitrato de s\u00f3dio e $120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	64
Figura 18	Curva parab\u00f3lica de adi\u00e7\u00e3o de nitrog\u00eanio em fun\u00e7\u00e3o do tempo referente ao ensaio 6 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica I ($Y = 4,982 + 3,132x - 0,325x^2$))	66
Figura 19	Concentra\u00e7\u00e3o celular e concentra\u00e7\u00e3o de am\u00f4nio, em fun\u00e7\u00e3o do tempo, referentes ao ensaio 6 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica I ($Y = 4,982 + 3,132x - 0,325x^2$))	67
Figura 20	Concentra\u00e7\u00e3o de carbonato total, em fun\u00e7\u00e3o do tempo, referente ao ensaio 6 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica I ($Y = 4,982 + 3,132x - 0,325x^2$))	67
Figura 21	Curva parab\u00f3lica de adi\u00e7\u00e3o de nitrog\u00eanio referente ao ensaio 7 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica II ($Y = 3,487 + 2,193x - 0,227x^2$))	69
Figura 22	Concentra\u00e7\u00e3o celular e concentra\u00e7\u00e3o de am\u00f4nio, em fun\u00e7\u00e3o do tempo, referentes ao ensaio 7 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica II ($Y = 3,487 + 2,193x - 0,227x^2$))	71
Figura 23	Concentra\u00e7\u00e3o de carbonato total, em fun\u00e7\u00e3o do tempo, referente ao ensaio 7 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica II ($Y = 3,487 + 2,193x - 0,227x^2$))	71
Figura 24	Concentra\u00e7\u00e3o celular e concentra\u00e7\u00e3o de am\u00f4nio, em fun\u00e7\u00e3o do tempo, referentes ao ensaio 8 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o di\u00e1ria de 3mM)	73
Figura 25	Concentra\u00e7\u00e3o de carbonato total, em fun\u00e7\u00e3o do tempo, referente ao ensaio 8 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o di\u00e1ria de 3mM)	73
Figura 26	Concentra\u00e7\u00e3o celular, em fun\u00e7\u00e3o do tempo, no ensaio 9 (240	75

	$\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e nitrato de s\acute{o}dio)	
Figura 27	Concentra\c{c}\~ao de carbonato total, em fun\c{c}\~ao do tempo, no ensaio 9 ($240 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e nitrato de s\acute{o}dio)	75
Figura 28	Curva parab\^olica de adi\c{c}\~ao de nitrog\^enio em fun\c{c}\~ao do tempo referente ao ensaio 10 ($240 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\^onio e adi\c{c}\~ao parab\^olica I ($Y = 3,169 + 6,557x - 0,793x^2$))	77
Figura 29	Concentra\c{c}\~ao celular e concentra\c{c}\~ao de am\^onia, em fun\c{c}\~ao do tempo, referentes ao ensaio 10 ($240 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\^onio e adi\c{c}\~ao parab\^olica I ($Y = 3,169 + 6,557x - 0,793x^2$))	79
Figura 30	Concentra\c{c}\~ao de carbonato total, em fun\c{c}\~ao do tempo, referente ao ensaio 10 ($240 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\^onio e adi\c{c}\~ao parab\^olica I ($Y = 3,169 + 6,557x - 0,793x^2$))	79
Figura 31	Curva parab\^olica de adi\c{c}\~ao de nitrog\^enio em fun\c{c}\~ao do tempo referente ao ensaio 11 ($240 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\^onio e adi\c{c}\~ao parab\^olica II ($Y = 2,218 + 4,59x - 0,555x^2$))	81
Figura 32	Concentra\c{c}\~ao celular e concentra\c{c}\~ao de am\^onia, em fun\c{c}\~ao do tempo, referentes ao ensaio 11 ($240 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\^onio e adi\c{c}\~ao parab\^olica II ($Y = 2,218 + 4,59x - 0,555x^2$))	83
Figura 33	Concentra\c{c}\~ao de carbonato total, em fun\c{c}\~ao do tempo, referente ao ensaio 11 ($240 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\^onio e adi\c{c}\~ao parab\^olica II ($Y = 2,218 + 4,59x - 0,555x^2$))	83
Figura 34	Concentra\c{c}\~ao celular e concentra\c{c}\~ao de am\^onia, em fun\c{c}\~ao do tempo, referentes ao ensaio 12 ($240 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\^onio e adi\c{c}\~ao di\`aria de 3mM)	85
Figura 35	Concentra\c{c}\~ao de carbonato total, em fun\c{c}\~ao do tempo, referente ao ensaio 12 ($240 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\^onio e adi\c{c}\~ao di\`aria de 3mM)	85
Figura 36	Esquema para representar a assimila\c{c}\~ao de bicarbonato por <i>Spirulina platensis</i>	88
Figura 37	Esquema da assimila\c{c}\~ao da am\^onia proveniente do sulfato de am\^onio e nitrato de s\acute{o}dio	92

Figura 38

Concentração celular em função do tempo para os ensaios com nitrato (símbolos vazios – ensaios padrão) e sulfato de amônio (símbolos preenchidos – ensaios parabólica II) como fonte de nitrogênio. Os símbolos losango, círculo e triângulo representam, respectivamente, os ensaios com 240, 120 e 60 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$

94

LISTA DE TABELAS

	Pág	
Tabela 1	Composição do meio mineral padrão de Schlösser	38
Tabela 2	Experimentos realizados	48
Tabela 3	Concentração celular (mg.L^{-1}) e carbonato total (g.L^{-1}) em função do tempo no ensaio 1 (Nitrato de sódio e $60 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	51
Tabela 4	Concentração de nitrogênio adicionada diariamente no ensaio 2 ($60 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de amônio e adição parabólica I ($Y = 3,664 + 1,726x - 0,192x^2$))	53
Tabela 5	Concentração celular, concentração de carbonato total e concentração de amônia em função do tempo no ensaio 2 ($60 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de amônio e adição parabólica I ($Y = 3,664 + 1,726x - 0,192x^2$))	55
Tabela 6	Concentração de nitrogênio adicionada diariamente no ensaio 3 ($60 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de amônio e adição parabólica II ($Y = 2,565 + 1,208x - 0,134x^2$))	57
Tabela 7	Concentração celular, carbonato total e amônia em função do tempo no ensaio 3 ($60 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de amônio e adição parabólica II ($Y = 2,565 + 1,208x - 0,134x^2$))	59
Tabela 8	Concentração celular, carbonato total e amônia em função do tempo no ensaio 4 ($60 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de amônio e adição diária de 3mM)	61
Tabela 9	Concentração celular e concentração de carbonato total em função do tempo no ensaio 5 (nitrato de sódio e $120 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	63
Tabela 10	Concentração de nitrogênio adicionada diariamente no ensaio 6 ($120 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de amônio e adição parabólica I ($Y = 4,982 + 3,132x - 0,325x^2$))	65
Tabela 11	Concentração celular, concentração de carbonato total e concentração de amônia em função do tempo no ensaio 6 ($120 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de amônio e adição parabólica I ($Y = 4,982 + 3,132x - 0,325x^2$))	66
Tabela 12	Concentração de nitrogênio a ser adicionada diariamente no ensaio 7 ($120 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de amônio e adição parabólica II ($Y = 3,487 + 2,193x - 0,227x^2$))	68
Tabela 13	Concentração celular, carbonato total e amônia em função do	70

	tempo no ensaio 7 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica II ($Y = 3,487 + 2,193x - 0,227x^2$))	
Tabela 14	Concentra\u00e7\u00e3o celular, carbonato total e am\u00f4nia em fun\u00e7\u00e3o do tempo no ensaio 8 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o di\u00e1ria de 3mM)	72
Tabela 15	Concentra\u00e7\u00e3o celular e carbonato total em fun\u00e7\u00e3o do tempo no ensaio 9 ($240 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e nitrato de s\u00f3dio)	74
Tabela 16	Concentra\u00e7\u00e3o de nitrog\u00eanio adicionada diariamente no ensaio 10 ($240 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica I ($Y = 3,169 + 6,557x - 0,793x^2$))	76
Tabela 17	Concentra\u00e7\u00e3o celular, carbonato total e concentra\u00e7\u00e3o de am\u00f4nia em fun\u00e7\u00e3o do tempo no ensaio 10 ($240 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica I ($Y = 3,169 + 6,557x - 0,793x^2$))	78
Tabela 18	Concentra\u00e7\u00e3o de nitrog\u00eanio a ser adicionada diariamente no ensaio 11 ($240 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica II ($Y = 2,218 + 4,59x - 0,555x^2$))	80
Tabela 19	Concentra\u00e7\u00e3o celular, carbonato total e am\u00f4nia em fun\u00e7\u00e3o do tempo no ensaio 11 ($240 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica II ($Y = 2,218 + 4,59x - 0,555x^2$))	82
Tabela 20	Concentra\u00e7\u00e3o celular, carbonato total e am\u00f4nia em fun\u00e7\u00e3o do tempo no ensaio 12 ($240 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o di\u00e1ria de 3mM)	84
Tabela 21	Concentra\u00e7\u00e3o celular m\u00e1xima, produtividade em c\u00e9lulas e fator de convers\u00e3o de nitrog\u00eanio em c\u00e9lulas para os ensaios 1 a 12	86
Tabela 22	Custo do nitrog\u00eanio das fontes utilizadas: nitrato de s\u00f3dio e sulfato de am\u00f4nio	89
Tabela 23	An\u00e1lise de vari\u00e2ncia para o par\u00e2metro X_m em fun\u00e7\u00e3o dos protocolos de adi\u00e7\u00e3o de nitrog\u00eanio e intensidades luminosas, com exce\u00e7\u00e3o dos ensaios realizados com lei de adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica I	91
Tabela 24	M\u00e9dias de concentra\u00e7\u00e3o celular m\u00e1xima para os ensaios realizados com nitrato de s\u00f3dio e sulfato de am\u00f4nio, exceto aqueles realizados com lei de adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica I	91
Tabela 25	M\u00e9dias de concentra\u00e7\u00e3o celular m\u00e1xima para os ensaios realizados com diferentes intensidades luminosas, exceto aqueles realizados com protocolo de adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica I	94

Tabela 26	Porcentagem de lipídios e proteínas obtidas na biomassa seca	97
Tabela 27	Análise de variância para teor de proteínas na biomassa seca em função dos protocolos de adição de nitrogênio e intensidades luminosas, com exceção dos ensaios realizados com lei de adição parabólica I	97
Tabela 28	Médias dos teores de proteínas na biomassa seca para os ensaios realizados com diferentes protocolos de adição de nitrogênio, exceto aqueles realizados com protocolo de adição parabólica I	98
Tabela 29	Análise de variância para teor de lipídios na biomassa seca em função dos protocolos de adição de nitrogênio e intensidades luminosas, com exceção dos ensaios com lei de adição parabólica I	99
Tabela 30	Análise de variância para o parâmetro P_x em função dos protocolos de adição de nitrogênio e intensidades luminosas, com exceção dos ensaios com lei de adição parabólica I	101
Tabela 31	Análise de Variância do parâmetro $Y_{X/N}$ em função dos protocolos de adição de nitrogênio e intensidades luminosas, com exceção dos ensaios com lei de adição parabólica I	102
Tabela 32	Médias do parâmetro $Y_{X/N}$ para os ensaios realizados com diferentes protocolos de adição de nitrogênio, exceto aqueles realizados com protocolo de adição parabólica I	103

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

X_m	concentração celular máxima (mg.L^{-1})
P_x	produtividade em células ($\text{mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)
$Y_{X/N}$	fator de conversão de nitrogênio em células (mg.mg^{-1})
X_i	concentração celular inicial (mg.L^{-1})
T_c	tempo de cultivo (dias)
N_t	quantidade total de nitrogênio adicionado (mg)
V	volume do meio (L)
p	valor de nível descritivo

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	14
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVOS.....	22
3 REVISO BIBLIOGRÁFICA.....	23
3.1 Propriedades e Aplicações.....	24
3.2 Célula.....	26
3.2.1 Caractersticas do gnero <i>Spirulina</i> e Morfologia.....	26
3.2.2 Conteúdo celular.....	27
3.3 Condições de Cultivo.....	28
3.3.1 Fontes de Carbono.....	29
3.3.2 Luz.....	30
3.3.3 pH.....	31
3.3.4 Fontes de Nitrogênio.....	33
3.4 Fotobiorreatores abertos e fechados.....	34
3.5 Processo de cultivo descontínuo alimentado.....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 Microrganismo: <i>Arthrospira platensis</i>	37
4.2 Manutenção da <i>Arthrospira platensis</i>	37
4.3 Meio de cultivo.....	37
4.3.1 Preparo do meio de cultura.....	38
4.3.2 Preparo de Inóculo.....	39
4.3.3 Meio modificado.....	40
4.4 Descrição do reator utilizado para realização dos ensaios.....	40
4.5 Descrição de um experimento tpico.....	40
4.6 Técnicas Analíticas.....	41

4.6.1 Acompanhamento do cultivo.....	41
4.6.1.1 Determinação da concentração celular.....	41
4.6.1.1.1 Construção da curva de calibração para determinação da concentração.....	42
4.6.1.2 Determinação da concentração de carbonato total.....	42
4.6.1.3 Determinação da concentração de amônia total.....	43
4.6.1.4 Determinação do pH.....	44
4.6.1.5 Determinação da concentração de nitrato.....	44
4.6.1.6 Avaliação da biomassa seca.....	44
4.6.1.6.1 Determinação de proteínas totais.....	45
4.6.1.6.2 Determinação de lipídios totais.....	45
4.7 Experimentos realizados.....	46
4.8 Análise dos resultados.....	48
4.8.1 Produtividade em células.....	49
4.8.2 Fator de conversão de nitrogênio em células.....	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
6 CONCLUSÕES.....	104
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

1 INTRODUÇÃO

A *Arthrospira platensis* é um microrganismo procarionte capaz de realizar fotossíntese e pertencente ao grupo *Cyanobacteria* de acordo com *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. É utilizado, principalmente, como suplemento alimentar pelo ser humano e animais, e é de grande interesse comercial, pois apresenta em sua composição química proteínas, vitaminas, lipídios, minerais, carboidratos e pigmentos (SANCHEZ *et al.*, 2003).

O cultivo de cianobactérias, assim como a de *A. platensis*, depende de condições de cultivo como: temperatura, intensidade luminosa, fonte de nitrogênio, fonte de carbono e pH. O sucesso de cultivos para obtenção de biomassa de *A. platensis* depende da manutenção de temperatura de crescimento próxima da ótima e uso eficiente da luz solar ou artificial a fim de evitar fotoinibição (VONSHAK e RICHMOND, 1988).

Esta cianobactéria que tem origem em lagos salgados e alcalinos é cultivada com a utilização de meios de cultura compostos somente de sais inorgânicos. Estes meios apresentam em sua composição sais de nitrato, como fontes de nitrogênio, como por exemplo, nitrato de sódio e potássio (SCHLOSSER, 1982; PAOLETTI *et al.*, 1975), que são os convencionais; ou, uma fonte alternativa, como, sais de amônio, utilizados com a finalidade de reduzir os custos de produção (SOLETTO *et al.*, 2005).

Fontes de carbono, presentes no meio de cultivo, geralmente não estão em destaque; no entanto, também são consideradas fatores limitantes para cultivos de cianobactérias. Esta importância é atribuída ao equilíbrio de carbonato, bicarbonato e CO₂ que mantêm um pH ideal para o crescimento do microrganismo (AZOV, 1982).

Existem, atualmente, grandes indústrias produtoras de biomassa de *Arthrospira* sp., tais como, *Murugappa Chettir Research Center* (Índia); *Genix* (Cuba); *Solarium Biotechnology* (Chile) e a *DIC Corporation*, que tem uma produção de 900 toneladas/ano e opera três fazendas de *Arthrospira* no mundo: *Earthrise*, localizada no deserto de Sonora (sudeste da Califórnia – EUA); *Cyanotech*, localizada no Havaí (EUA); e *Hainan-DIC Microalgae Co., Ltda*, localizada na China (*DIC – Spirulina*, 2008) (SANCHEZ *et al.*, 2003).

Apesar da expansão do mercado há uma limitação da tecnologia de produção utilizada. O preço de custo dos produtos é geralmente elevado e há, também, sérios problemas na produção de cianobactérias em larga escala.

Para o desenvolvimento desses processos industriais vários aspectos devem ser considerados, como, produção de grande quantidade de biomassa, preferencialmente em instalações pequenas em um fotobiorreator eficiente, e o pré-requisito para o desenvolvimento de fotobiorreatores adequados é a eficiência do uso da luz; obtenção de altas concentrações do produto desejado, ou, em caso de obtenção de biomassa, elevadas concentrações do próprio microrganismo, o que poderia ser obtido através do conhecimento de vias metabólicas envolvidas e pelo controle dessas vias (WIJFFELS, 2008).

Neste trabalho é avaliado o cultivo de *A. platensis* visando utilização de uma fonte alternativa de nitrogênio, o sulfato de amônio. E para que fosse possível o uso deste sal adotaram-se o processo descontínuo alimentado e diferentes protocolos de alimentação. Além disso, também foi verificada a influência de diferentes intensidades luminosas neste tipo de cultivo, utilizando um fotobiorreator tubular.

2 OBJETIVOS

Verificar a influência da intensidade luminosa e da forma de alimentação de sulfato de amônio no cultivo de *Arthrospira (Spirulina) platensis* em fotobiorreator tubular por processo descontínuo alimentado, tendo como variáveis dependentes a concentração celular máxima, a produtividade em células, e o fator de conversão de nitrogênio em células, bem como os teores de lipídios e proteínas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Por volta do ano de 1520, durante a colonização espanhola, em *Tenochtitlán* (atual cidade do México), na superfície do lago *Texcoco* crescia um tipo de microrganismo de coloração verde – hoje denominado *Spirulina* - que era consumido pelos Astecas na forma seca. Esta cianobactéria era recolhida do lago com auxílio de uma malha de tecido, seca ao sol sobre pedras, e vendida nos mercados da cidade com o nome de “*tecuítlatl*” (LAGAZ - RUIZ, 2003).

No México, os Astecas consumiam *Spirulina* como um dos principais alimentos protéicos de sua dieta. Na África Central, a tribo *Kanembu*, que vivia nas margens do Lago *Chad*, também utilizaram *Arthrospira* como alimento. Esta cianobactéria era obtida naturalmente em águas quentes e alcalinas, e, de forma semelhante ao México, as células eram retiradas dos lagos, estendidas sobre pedras e secas ao sol. Assim, era obtido o alimento denominado “*Dihe*”, matéria seca de *Spirulina* em forma de biscoitos (PANIAGUA-MICHEL *et al.*, 1993). A *Spirulina maxima* era certamente o mais abundante ou único componente do fitoplâncton do Lago *Texcoco* e a *Spirulina platensis* mais abundante no Lago *Chad* (CIFERRI e TIBONI, 1985).

A produção comercial de microalgas em larga escala iniciou na década de 60 com cultivos de *Chlorella*, no Japão. Cultivos de *Spirulina* foram desenvolvidos no México, cerca de uma década depois; por volta de 1972, foi construída a planta industrial *Sosa Texcoco*, que produzia *Spirulina maxima*. A cianobactéria era facilmente coletada e cultivada no Lago *Texcoco* onde crescia naturalmente (SPOLAORE *et al.*, 2006).

Segundo Borowitzka (1999), a produção mundial de *Spirulina* aumentou de algumas centenas de quilos em 1975 para 2500 toneladas em 1998. Este aumento,

que foi decorrente do grande interesse em relação aos benefícios desta cianobactéria para uso humano e animal, também foi relatado por Belay (1997) que apresentou um quadro geral com diversas indústrias produtoras de biomassa de *Arthrospira* sp., na década de 90, e suas respectivas produções anuais estimadas.

Ultimamente, a produção de biomassa de cianobactérias no mercado tem sido de aproximadamente 5000 toneladas de matéria seca por ano, o que movimenta mais de um bilhão de dólares (PULZ e GROSS, 2004). A *Arthrospira* é produzida em grandes quantidades na Índia e na China. Neste último país, está localizada uma das maiores empresas produtoras desta cianobactéria, na província de *Hainan*; a qual tem a capacidade de produzir, anualmente, 200 toneladas de pó de *Arthrospira*. Entretanto, sabe-se que a maior planta de produção deste microrganismo é a Fazenda *Earthrise* (Califórnia – EUA) que distribui seus produtos para até 20 países no mundo (SPOLAORE *et al.*, 2006).

A tecnologia de cultivo e alta qualidade e quantidade de proteínas bem como ausência de efeitos tóxicos favorecem a produção desta cianobactéria em larga escala (LI *et al.*, 2003). Além disso, esta possui a vantagem de ser recolhida do meio de cultivo mais facilmente por apresentar morfologia filamentosa (PIORRECK *et al.*, 1984), o que diminui o custo de produção quando comparada a cultivos de *Chlorella* sp. e *Oscillatoria* sp.

3.1 PROPRIEDADES E APLICAÇÕES

A *Arthrospira platensis* apresenta substâncias bioativas em sua composição celular (ácidos graxos, pigmentos, além de proteínas e vitaminas). Estes compostos são responsáveis pelo estímulo do crescimento de bactérias probióticas que

colonizam o trato intestinal e, conseqüentemente, trazem benefícios à saúde humana (VARGA *et al.*, 2002).

O desenvolvimento da bactéria probiótica *Lactococcus lactis* por *A. platensis* foi observado em testes *in vitro* por Parada *et al.* em 1998. Em 2002, Varga *et al.* constataram que esta cianobactéria pode ser utilizada para a fabricação de produtos lácteos funcionais devido ao efeito benéfico na sobrevivência de bactérias probióticas (*L. acidophilus* - *L. bifidus* - *S. termophilus*) independente da temperatura de estocagem.

Morist *et al.* (2001) cultivaram *S. platensis* em fotobiorreator contínuo com o objetivo de utilizar a biomassa como suporte para a sobrevivência dos humanos em viagens espaciais. As biomassas recuperadas e tratadas para obtenção de um produto a base de *A. platensis* com segurança microbiológica e manutenção da composição química e nutricional, foi considerada com potencial para ser utilizada como alimento.

Nas últimas décadas, carragena, ágar e alginato têm sido utilizados em produtos alimentícios e farmacêuticos como emulsificantes e agentes gelatinizantes. De acordo com Chronakis *et al.* (2000), as proteínas provenientes de cianobactérias poderiam ser utilizadas para o mesmo fim, pois, ao avaliarem o comportamento de proteínas de *A. platensis*, observaram a capacidade destas proteínas em reduzir a tensão superficial da interfase líquido/ar.

A *A. platensis* tem recebido uma atenção particular devido às suas propriedades nutricionais e terapêuticas. Esta cianobactéria pode ser utilizada para produção de alimentos saudáveis por apresentar algumas substâncias, como ácido graxo gama-linolênico, ficocianina, xantofila (DILLON *et al.*, 1995; HIRATA *et al.*, 2000).

3.2 CÉLULA

3.2.1 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO *Arthrospira* E MORFOLOGIA

O gênero *Arthrospira* pertence à família *Oscillatoriaceae* e ao grupo de cianobactérias filamentosas. É reconhecido por características morfológicas como arranjos de tricomas (Figura 1). Os tricomas são filamentos na forma de espiral formados de células cilíndricas, curtas e largas, revestidas por uma fina membrana. Seu diâmetro pode variar de 6 a 12 μm . As dimensões celulares, o grau de ondulação e o comprimento dos filamentos variam de espécie para espécie e podem ser afetados por fatores ambientais como temperatura ou condições físicas e químicas (CIFERRI e TIBONI, 1985; TOMASELLI, 1997).

As principais características da *A. platensis* são: cor verde-brilhante, e tricoma azul-esverdeado, levemente constrictos na parede celular, formando espirais regulares. Em análise microscópica, os espirais aparecem como filamentos verde-azulados devido à presença de dois pigmentos, a clorofila, verde e a ficocianina, azul (TOMASELLI, 1997).

A reprodução de *Spirulina* sp. ocorre com a quebra do tricoma em uma célula intercalária a qual perde seu citoplasma e é convertida em necrídeo. Os tricomas quebrados em necrídeos originam cadeias menores, denominadas hormogônios, que diferem dos tricomas maduros pela falta de mobilidade, tamanho celular reduzido e morfologia diferenciada (CIFERRI e TIBONI, 1985).

Segundo Tomaselli (1997), esta espécie foi classificada novamente, agora com o nome de *Arthrospira* sp., e aceita oficialmente em *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.



Figura 1. *Spirulina platensis* (UTEX 1926).
Fonte: Universidade do Texas, 2007.

3.2.2 CONTEÚDO CELULAR

A *Spirulina* sp. possui um alto valor nutricional devido a ampla variedade de nutrientes essenciais, como vitaminas, minerais e proteínas. O conteúdo de proteínas varia de 50 a 70 % de sua massa seca (DILLON *et al.*, 1995).

As proteínas de *Spirulina* contêm todos os aminoácidos essenciais, que representam 47 % do peso total das proteínas (DILLON *et al.*, 1995). Dentre os aminoácidos encontram-se os oito aminoácidos estritamente essenciais (Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Treonina, Triptofano e Valina) (COHEN, 1997).

Spirulina apresenta em sua composição vitaminas como cianocobalamina (B12), pirodoxina (B6), tiamina (B1), tocoferol (E) e filoquinona ou fitonadiona (K) (BRANGER *et al.*, 2003). Problemas no sistema nervoso e anemias provocadas por uma dieta vegetariana desbalanceada ou carencial podem ser evitados pela presença da vitamina B12.

Os ácidos graxos predominantes nas espécies de *Spirulina* são os ácidos palmítico, linolênico, γ -linolênico e oléico. O ácido γ -linolênico é encontrado em

quantidades significativas somente no leite materno, fruto de groselhas pretas e borragem, sendo possível encontrá-lo em fungos e cianófitas (COHEN, 1993). A carência de ácido γ -linolênico no organismo humano, devido a uma deficiência enzimática, está associada a diversas disfunções metabólicas, tais como dermatite, diabetes, esquizofrenia, artrite reumatóide e síndrome pré-menstrual (KENNEDY *et al.*, 1993).

S. platensis contém altos níveis de carotenóides (ANNAPURNA *et al.*, 1991), especialmente β -caroteno (CARERI *et al.*, 2001); clorofila (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004); ficobilinas, que constituem 20% de proteína celular e são quantitativamente os pigmentos dominantes em *Spirulina* sp. (RICHMOND, 1988).

Dentre as ficobilinas encontra-se um dos mais importantes pigmentos, a ficocianina, um complexo protéico solúvel em água que auxilia na atividade fotossintética de microalgas e pode ser encontrada em até 20% da massa seca de *Spirulina* (VONSHAK, 1997). É utilizada como corante alimentar (SILVEIRA *et al.*, 2007); e também em técnicas fluorescentes de imunoenensaio (SUN *et al.*, 2006). Além disso, estudos mostram que a ficocianina apresenta atividade antioxidante e efeito hepatoprotetor (BHAT e MADYASTHA, 2000).

3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

A *Spirulina* apresenta vantagens em relação aos demais microrganismos fotoautotróficos. Dentre estas, podem ser citadas o crescimento em pH alcalino e meio altamente salino, fatores importantes na prevenção de contaminação no reator (WALACH *et al.*, 1987, BOROWITZKA, 1999), e a separação fácil do meio de cultivo, devido à forma espiralada e maiores dimensões (RICHMOND, 1988; PIORRECK *et al.*, 1984). Desenvolve-se em meios em que os constituintes

principais são as fontes minerais de carbono (carbonatos, bicarbonatos), fósforo e nitrogênio (normalmente, nitratos) e cresce bem em temperaturas da ordem de 30 °C (VONSHAK, 1997).

Spirulina é geralmente cultivada de maneira autotrófica, com suplemento de luz e nutrientes, principalmente fontes de nitrogênio e carbono. A concentração de nitrogênio no meio é um dos fatores determinantes de cultivos, uma vez que este nutriente está na constituição de proteínas e ácidos nucleicos, fundamentais para a manutenção e crescimento celular (WATANABE e HALL, 1996).

3.3.1 Fontes de Carbono

A *Arthrospira* sp. é cultivada em meios de cultivo que apresentam elevadas concentrações de carbonato e bicarbonato como fontes de carbono. Estes íons, em proporções pré-estabelecidas (Figura 2), são responsáveis pela manutenção de pH elevado do meio de cultivo, ideal para o desenvolvimento deste microrganismo. A principal fonte de carbono é o íon bicarbonato que entra na célula por transporte ativo e posteriormente a enzima anidrase carbônica presente no meio intracelular e/ou na membrana periplasmática age sobre o bicarbonato liberando o dióxido de carbono. Este é incorporado no ciclo de Calvin produzindo moléculas orgânicas, tais como carboidratos, proteínas e lipídeos (KAPLAN e REINHOLD, 1999).

As cianobactérias possuem a capacidade de acumular bicarbonato no meio intracelular, quando este está em falta no meio extracelular (CORNET *et al.*, 1998), e também utilizam o dióxido de carbono como fonte de carbono para o seu metabolismo. Para deixar clara a importância do bicarbonato no metabolismo das cianobactérias, Binagui *et al.* (2003) observaram que em meios de cultivo contendo apenas carbonato o pH mantém-se estável e não ocorre aumento de biomassa.

3.3.2 Luz

A taxa de crescimento e o rendimento da produção sofrem influência da intensidade luminosa e, também, da duração da irradiação até um limite que é denominado ponto de saturação luminosa. De acordo com Balloni *et al.* (1980), este ponto está por volta de 60 a 120 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Vonshak *et al.* (1983) mostraram que um fator importante, que influencia a taxa de crescimento e a eficiência fotossint\u00e9tica, \u00e9 o ciclo claridade/escurid\u00e3o ao qual a c\u00e9lula \u00e9 exposta durante o dia. O regime claridade/escurid\u00e3o \u00e9 afetado pela intensidade de agita\u00e7\u00e3o do tanque, da turbul\u00eancia e da densidade populacional (RICHMOND, 1988; RANGEL, 2000).

Ao utilizar baixas intensidades luminosas, a velocidade de crescimento \u00e9 diminuída, e conseq\u00fcentemente, ocorre pequena produ\u00e7\u00e3o de biomassa (BALLONI *et al.*, 1980). No entanto, a ilumina\u00e7\u00e3o muito forte dos cultivos de algas gera dois efeitos principais: fotoinibi\u00e7\u00e3o, que leva a um decr\u00e9scimo no rendimento m\u00e1ximo do crescimento e fotoxida\u00e7\u00e3o, que tem efeitos letais nas c\u00e9lulas, podendo levar \u00e0 perda total da cultura (JENSEN e KNUTSEN, 1993).

A fotoinibi\u00e7\u00e3o \u00e9 definida como uma redu\u00e7\u00e3o na efici\u00eancia fotossint\u00e9tica, devido aos danos causados pelo fluxo de f\u00f3tons; \u00e9, em geral, fisiol\u00f3gica e envolve um processo complexo. Muitos dos efeitos do excesso de luz parecem estar localizados no fotossistema II (PSII). O local principal deste dano \u00e9 a prote\u00edna D1 que faz parte do centro de rea\u00e7\u00e3o PS-II e \u00e9 facilmente danificada (SAMUELSON, *et al.*, 1985). Jensen e Knutsen (1993) observaram que a fotoinibi\u00e7\u00e3o tamb\u00e9m depende da temperatura. Avaliaram a taxa fotossint\u00e9tica de *Spirulina platensis* de ensaios em diferentes temperaturas, com intensidade luminosa fixa de 1780

$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e observaram que à 25 °C a taxa fotossintética é reduzida em 50 %, enquanto que à 35 °C não houve nenhum efeito negativo.

Altos valores de intensidades luminosas favorecem os parâmetros de crescimento, enquanto que valores mais baixos (da ordem de $24 \mu\text{mol f\acute{o}tons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) favorecem a obtenção de biomassa rica em clorofila (DANESI *et al.*, 2004). Também foi possível observar que as condições de iluminação de um cultivo podem interferir na fração lipídica da biomassa (MAHAJAN e KAMAT, 1995).

3.3.3 pH

O pH é outra variável que interfere no crescimento microbiano. Em cultivos de *Arthrospira*, há uma importância maior, pois a forma como a fonte de carbono se apresenta é determinada por esta variável. Schlösser (1982) apresenta um meio padrão utilizado para cultivos de *Arthrospira* o qual é rico em bicarbonato e carbonato, e a proporção destes sais determinam o pH alcalino deste meio de cultivo.

Na Figura 2 observa-se que em valores de pH abaixo de 6,0, predomina a forma CO_2 ; em valores de pH entre aproximadamente 6 e 10, predomina a forma HCO_3^- e a forma CO_3^{2-} é predominante em pH acima de 10 e exclusiva em pH acima de 13. Portanto, para obtenção de um determinado pH basta equilibrar as concentrações destes íons; além disso, Miller e Colman (1980) relataram que as cianobactérias assimilam preferencialmente a forma bicarbonato, portanto, o pH ideal de cultivo é aquele em que haja deslocamento do equilíbrio químico no sentido de sua formação.

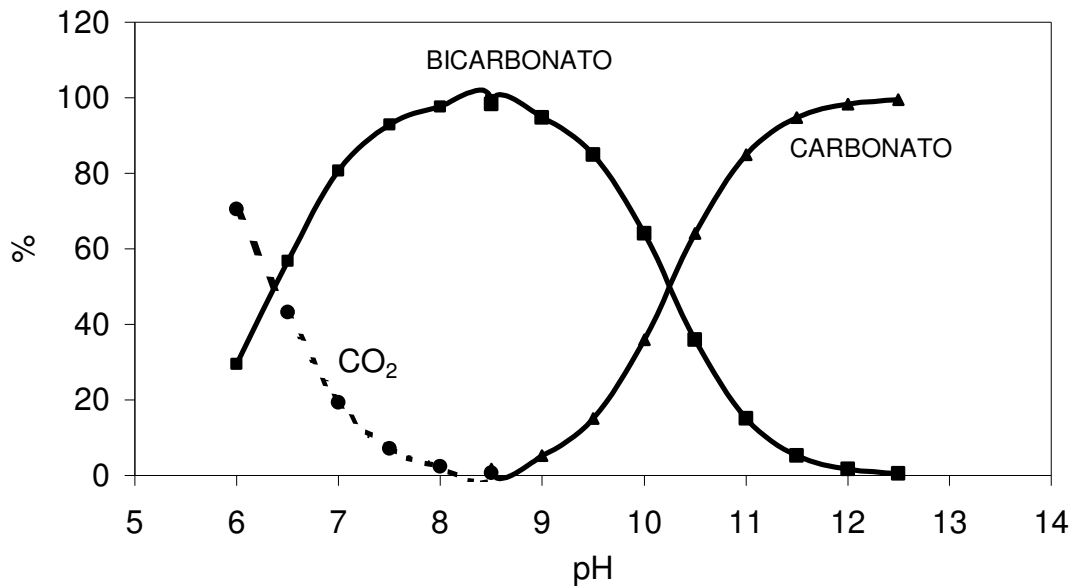


Figura 2. Concentrações relativas de gás carbônico, bicarbonato e carbonato (%) em função do pH.
Fonte: SASSANO (2004).

O pH também influencia na disponibilidade de nitrogênio para a célula, pois em pH abaixo de 8,0 há uma predominância do íon amônio. Em pH acima de 11, o nitrogênio encontra-se na forma não protonada de amônia que é a forma facilmente assimilada pelas células (BOUSSIBA, 1989).

Em pH baixo, há uma redução na formação de amônia e a maior parte do nitrogênio existirá na forma de íons amônio, na qual é menos tóxica para a cianobactéria (TAM e WONG, 1996). No entanto, em pH abaixo de 8,7 ocorre uma diminuição na formação de biomassa produzida (SANCHEZ-LUNA, 2004). Quanto mais alcalino se torna o meio de cultivo, maior é a quantidade de amônia em relação ao amônio, e, portanto, maior é a perda de amônia por volatilização (Figura 3, baseada na equação de Henderson-Hasselbach).

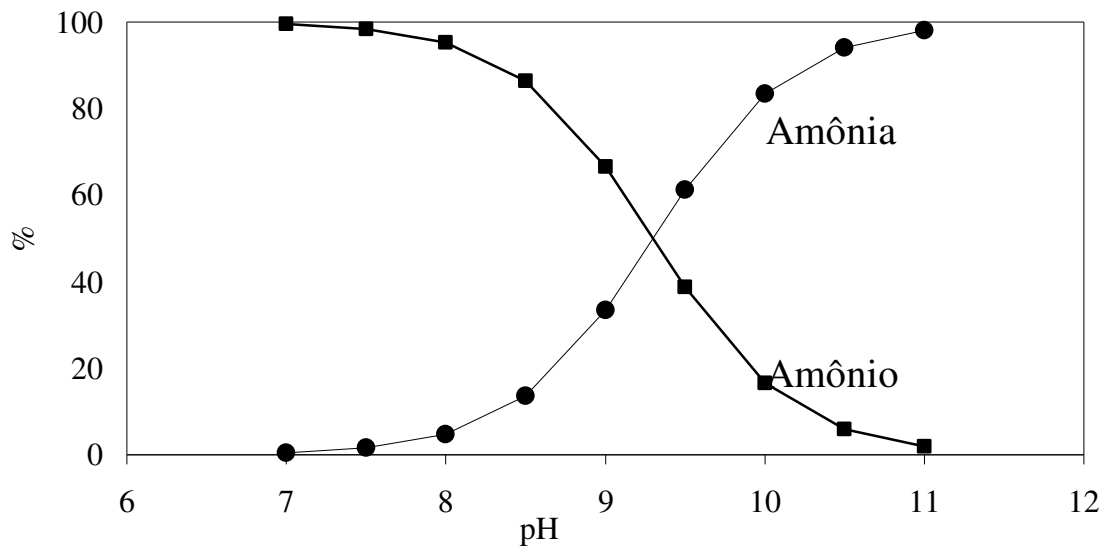


Figura 3. Porcentagem de Amônia e Amônio em Função do pH.

3.3.4 Fontes de Nitrogênio

Sabe-se que a quantidade e qualidade da fonte de nitrogênio usada no meio de cultura podem influenciar no conteúdo de proteína, bem como em outros constituintes da *Spirulina sp.*, tais como lipídeos e suas frações e pigmentos (BOUSSIBA e RICHMOND, 1980; PIORRECK *et al.*, 1984; STANCA e POPOVIC, 1996; RANGEL, 1999; SASSANO, 1999). Neste sentido, muitos trabalhos foram realizados visando a utilização de diversas fontes de nitrogênio para o cultivo de *A. platensis*, e os melhores resultados são atribuídos aos nitratos em termos de biomassa produzida (FAINTUCH, 1989; CORNET *et al.*, 1998), o que confirma a ampla utilização dos meios de Paoletti (PAOLETTI *et al.*, 1975) e Zarrouk (ZARROUK, 1966), que utilizam KNO_3 e NaNO_3 como fonte de nitrogênio, respectivamente.

A fim de diminuir os custos dos cultivos e, conseqüentemente os custos de produção, pesquisadores têm utilizado fontes alternativas de nitrogênio, como sais de amônio e uréia (SOLETTI *et al.*, 2005; DANESI *et al.*, 2002) que podem também

proporcionar um aumento na produção da biomassa e também na concentração de clorofila.

3.4 FOTOBIORREADORES ABERTOS E FECHADOS

A escolha do biorreator é um importante fator que influencia a produtividade do cultivo da cianobactéria (WATANABE e HALL, 1996). Há uma grande variedade de biorreatores utilizados para o cultivo de microalga, dentre os quais alguns são utilizados atualmente para produção industrial (LEE e KIM, 2001). Os fotobiorreatores abertos são os convencionais, no entanto possuem certas desvantagens sobre os fotobiorreatores fechados, dentre elas destacam-se a menor eficiência fotossintética e a menor qualidade do produto da cianobactéria (VONSHAK e RICHMOND, 1988). A baixa eficiência fotossintética ocorre, principalmente, devido ao efeito de sombreamento quando a densidade celular alcança um determinado valor.

Com respeito ao uso de reatores tubulares, poderia ser de extrema valia no cultivo de *Spirulina* em grande escala, pois como são reatores fechados possuem algumas vantagens em relação aos reatores abertos. Essas vantagens incluem a diminuição de perda por evaporação, a possibilidade de obtenção de maiores densidades celulares finais, a diminuição de contaminantes, bem como a menor perda de nutrientes voláteis, entre outras (TREDICI e ZITTELLI, 1998).

No entanto, deve ser levado em conta que ainda não há muitos estudos na literatura com esse tipo de reator, de forma que para um uso mais seguro em escalas maiores, ainda há necessidade de estudos. Considerando o emprego de CO₂ como fonte de carbono, o emprego de reator tubular facilitaria a incorporação deste nutriente no meio de cultivo. Nesse sentido, o CO₂ teria duas contribuições:

manteria o valor de pH do meio de cultivo em um valor ótimo de crescimento celular e promoveria a movimentação da cultura (WATANABE e HALL, 1996)

Entre os diferentes tipos de fotobiorreatores, aqueles do tipo *air lift* são interessantes por apresentarem uma maior transferência de massa líquido-gás com menor gasto de energia, podem ter o escoamento do líquido facilmente controlado e a contaminação pode ser prevenida. Estes tipos de reatores são especialmente recomendados para as culturas de cianobactérias por causa da sua sensibilidade ao estresse de cisalhamento mecânico (SIEGEL e ROBINSON, 1992).

3.5 PROCESSO DE CULTIVO DESCONTÍNUO ALIMENTADO

A forma de alimentação de substrato numa dorna de fermentação pode interferir na qualidade da biomassa (SASSANO,1999).

No processo descontínuo, todo substrato é adicionado no início do cultivo, enquanto no processo descontínuo alimentado o substrato é adicionado em determinados intervalos de tempo durante todo processo. FAINTUCH (1989), estudando diferentes fontes de nitrogênio para cultivo de *Spirulina maxima* por processo descontínuo, verificou que a utilização de fontes alternativas de nitrogênio como cloreto de amônio e uréia, só foi viável com reduzidos níveis de concentração do nutriente, com conseqüente diminuição da quantidade de biomassa produzida.

A utilização do processo descontínuo alimentado para o cultivo de *A. platensis* permitiu a obtenção de resultados bastante satisfatórios com o uso de cloreto de amônio como fonte de nitrogênio (CARVALHO *et al.*, 2004), acarretando uma diminuição do custo de produção. Resultados igualmente promissores com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio foram encontrados em trabalho recente (SOLETTO *et al.*, 2005).

A utilização do processo descontínuo alimentado pode resolver alguns problemas do processo descontínuo. Este tipo de processo é geralmente utilizado a fim de evitar fenômenos de inibição por substrato e de adequar condições operacionais em processos fermentativos. Pode ser utilizado em produção de leveduras (LEE e KIM, 2001), aminoácidos (SASSI *et al.*, 1998), etanol (CARVALHO *et al.*, 2003), enzimas (ECHEGARAY *et al.*, 2000), e até mesmo em cultivo de células animais (XIE e WANG, 1994).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Tecnologia de Fermentações do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

4.1 Microrganismo: *Arthrospira platensis*.

4.2 Manutenção da *A. platensis*:

A cianobactéria foi mantida em tubos de ensaio em meio líquido Schlösser (item 4.3).

4.3 Meio de cultivo

Para a manutenção do microrganismo foi utilizado o meio padrão de Schlösser (SCHLÖSSER, 1982) com nitrato de sódio como fonte de nitrogênio e para os cultivos de *A. platensis* em reator tubular, o meio de Schlösser padrão e modificado (item 4.3.3).

Tabela 1 – Composição do meio mineral padrão de Schlösser (SCHLÖSSER, 1982).

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO
NaHCO ₃	13,61 g.L ⁻¹
Na ₂ CO ₃	4,03 g.L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,50 g.L ⁻¹
NaNO ₃	2,50 g.L ⁻¹
K ₂ SO ₄	1,00 g.L ⁻¹
NaCl	1,00 g.L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20 g.L ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,04 g.L ⁻¹
Vitamina B12	5.10 ⁻⁶ g.L ⁻¹
Solução PIV – metal *	6 mL.L ⁻¹
Solução CHU **	1 mL.L ⁻¹

*Solução de metais - PIV (mg.L⁻¹): Na₂EDTA, 750; FeCl₃.6H₂O, 97; MnCl₂.4H₂O, 41; ZnCl₂, 5; CoCl₂.6H₂O, 2; Na₂MoO₄.2H₂O, 4.

**Solução de micronutrientes - CHU (mg.L⁻¹): Na₂EDTA, 50; H₃BO₃, 618; CuSO₄.5H₂O, 19,6; ZnSO₄.7H₂O, 44; CoCl₂.6H₂O, 20; MnCl₂.4H₂O, 12,6; Na₂MoO₄.2H₂O, 12,6.

4.3.1 Preparo do meio de cultura

O preparo do meio de cultura para os processos fermentativos em reator tubular foi feito pela dissolução dos sais em água destilada em duas soluções diferentes. Os três primeiros sais da tabela foram dissolvidos na ordem descrita e separados em um recipiente (solução A), e as soluções e sais restantes foram

dissolvidos também na ordem descrita na tabela em outro recipiente (solução B). As duas soluções foram misturadas quando os sais respectivos estavam totalmente dissolvidos.

Para o preparo de repiques com a finalidade de manutenção das células, o meio de cultura foi feito a cada 15 dias de forma estéril e para isso as soluções A e B citadas acima foram autoclavadas em frascos diferentes e misturadas após autoclavagem.

4.3.2. Preparo de Inóculo

A partir de tubos de ensaio utilizados para manutenção de *A. platensis*, em fluxo laminar, foram retiradas alçadas do microrganismo e inoculadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio Schlösser esterilizado. Os frascos Erlenmeyer e seus respectivos tampões foram previamente esterilizados em autoclave a 121 °C, 1 atm, durante 20 minutos. Estes erlenmeyers foram mantidos em shaker a 100 rpm, temperatura de 30 °C e intensidade luminosa de 6 klux (72 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (DANESI, 2001). O fornecimento de luz foi feito por lâmpadas fluorescentes SYLVANIA de 40Watts com distância de 30 cm dos frascos e durante 15 dias quando foram feitos novos repiques, que após 6 a 8 dias de cultivo (PELIZER *et al.*, 2003) foram utilizados para os ensaios no reator tubular. Esta última suspensão celular foi então filtrada e lavada com solução fisiológica para retirada do NaNO_3 e ressuspensa em meio de cultivo padrão isento de nitrato de sódio. Esta suspensão foi o inóculo para o cultivo em reator tubular, onde foram realizados os ensaios. A concentração celular inicial foi fixada em 400 mg.L^{-1} (SOLETTO *et al.*, 2007).

4.3.3. Meio modificado

Foi o meio de Schlösser (SCHLÖSSER, 1982), com substituição do nitrato de sódio por sulfato de amônio. A massa diária de sulfato de amônio adicionada por unidade de volume foi uma variável deste trabalho, como explicado no item 4.7 – Experimentos realizados.

4. 4. Descrição do reator utilizado para realização dos ensaios

O fotobiorreator tubular utilizado foi do tipo “*air-lift*”, desenvolvido no Laboratório de Tecnologia de Fermentações do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. É constituído de tubos transparentes de diâmetro interno de 1,0 cm (CARLOZZI e PINZANI, 2005). O volume total do sistema foi de 3,2 L e o volume iluminado correspondeu a 2,12 L, com fluxo da cultura de $29 \pm 1 \text{ L.h}^{-1}$.

4.5 Descrição de um experimento típico

A suspensão de *Spirulina* (inóculo - item 4.3.2) foi adicionada ao biorreator, na concentração inicial de 400 mg.L^{-1} e o volume de trabalho foi de 3,2 L.

Nos ensaios com nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, a concentração inicial deste sal foi de $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ e ocorreram adições diárias, de modo que no meio de cultivo as concentrações de nitrato de sódio não fossem menores que 1 g.L^{-1} (FAINTUCH, 1989). Nos ensaios com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, foram feitas oito adições diárias (adição intermitente por pulsos).

O controle do pH do meio de cultivo foi feito diariamente adicionando-se CO_2 proveniente de cilindro, sendo mantido na faixa de $9,5 \pm 0,5$. A temperatura foi mantida em $29 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ (SANCHEZ-LUNA *et al.*, 2007).

As intensidades luminosas de 60, 120, 240 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foram obtidas utilizando-se 12 lâmpadas fluorescentes de 40 Watts ajustadas no início de cada experimento utilizando um aparelho medidor de intensidade luminosa (LI-COR[®], modelo LI-250A).

4.6. Técnicas Analíticas

Os experimentos foram acompanhados diariamente por técnicas analíticas descritas a seguir:

4.6.1. Acompanhamento do cultivo

4.6.1.1. Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada por turbidimetria, a 560nm (LEDUY e THERIEN, 1977), utilizando a curva apresentada na Figura 4, em aparelho espectrofotômetro (FEMTO, 700 μm) para valores de concentração celular até aproximadamente 6 g.L^{-1} , valor abaixo do qual há uma correspondência entre as determinações de concentração celular por turbidimetria e massa seca.

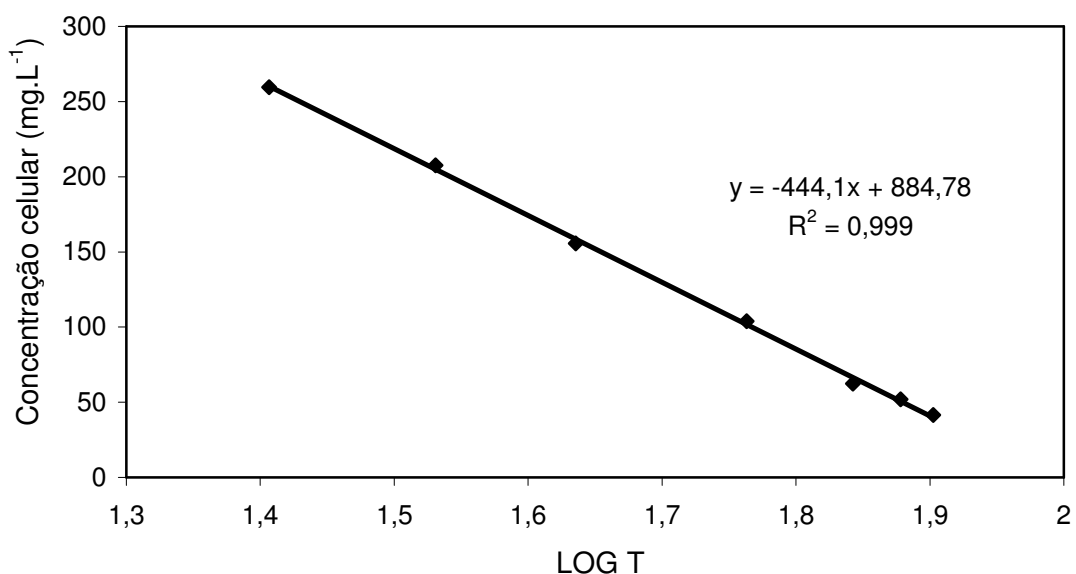


Figura 4. Curva de calibração da *A. platensis* – correlação da concentração de biomassa (mg.L^{-1}) e do logaritmo da transmitância.

Na determinação de concentração celular por massa seca, um volume adequado de amostra da cultura foi filtrado em membrana de 1,2 μm e lavado com o mesmo volume de água destilada acidificada (aproximadamente pH 4,0). Finalmente, as membranas foram colocadas em estufa a 100 – 105 $^{\circ}\text{C}$ até massa constante, o que era conseguido após aproximadamente 3 horas (CARVALHO *et al.*, 2003). A seguir, em dessecador por 50 minutos.

4.6.1.1.1. Construção da curva de calibração para determinação da concentração celular.

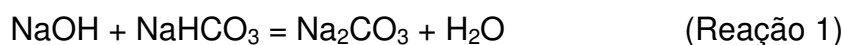
A curva de calibração foi obtida a partir de uma suspensão concentrada de células em fase de crescimento exponencial da qual foi retirado um volume de 25 mL, que foi filtrado e lavado, com água destilada acidificada (aproximadamente pH 4,0), em uma membrana de acetato de celulose de 1,2 μm , previamente seca a 70 $^{\circ}\text{C}$ por 12 h, e previamente pesada. A amostra foi levada à estufa à 100 – 105 $^{\circ}\text{C}$ por um período de 3h, suficiente para que mantivesse uma massa constante.

A partir desta mesma suspensão, foram preparadas diferentes diluições, e alíquotas dessas diluições foram levadas ao espectrofotômetro para leitura da transmitância a 560 nm de comprimento de onda. Dessa forma, foi obtida uma curva que relaciona concentração celular com o logaritmo da transmitância (exemplo na Figura 4).

4.6.1.1.2. Determinação da concentração de carbonato total

Nesta metodologia a concentração de carbonato total é determinada por titulometria em meio isento de células. De acordo com a metodologia preconizada por Pierce e Haenisch (1948), primeiramente adicionou-se uma solução de

hidróxido de sódio (reação 1) e o indicador fenolftaleína na amostra coletada, em seguida titulou-se com solução de ácido clorídrico (reação 2) para conversão de carbonato em bicarbonato. Posteriormente, adicionou-se indicador alaranjado de metila e titulou-se novamente com ácido clorídrico (reação 3) para que todo bicarbonato fosse transformado em ácido carbônico, por deslocamento de equilíbrio. O carbonato total foi calculado utilizando o intervalo dos pontos de viragem. Este acompanhamento foi executado em todos os ensaios.



4.6.1.3. Determinação da concentração de amônia total.

A amônia livre foi quantificada utilizando a metodologia de fenol-hipoclorito (SOLORZANO, 1969). O fenol e o hipoclorito de sódio reagiram com a amônia do meio na presença do catalisador nitroprussiato de sódio, resultando em indofenol. Este produto apresentou coloração azul que foi detectada em espectrofotômetro em comprimento de onda 640 nm. A seguir está apresentada, na Figura 5, um exemplo de curva de calibração utilizada na quantificação de amônia. Para cada conjunto de soluções preparadas para serem utilizadas na metodologia foi feita uma nova curva.

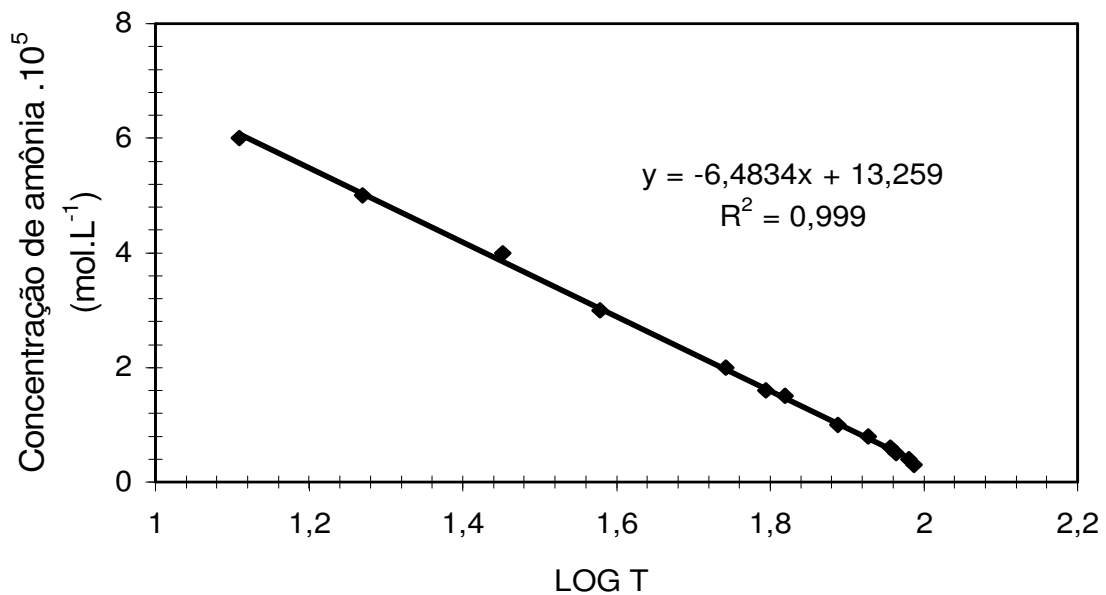


Figura 5. Curva de calibração para determinação da concentração de amônia total.

4.6.1.4. Determinação do pH.

O acompanhamento do pH foi feito por potenciometria, com um aparelho ORION, modelo 710^A.

4.6.1.5 Determinação da concentração de nitrato

A concentração de nitrato foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Vogel (1992). Nesta técnica o nitrato é reduzido à amônia pela liga de Devarda em meio alcalino (NaOH 0,5 M em excesso) e, por destilação, a amônia é recolhida em ácido clorídrico 0,1 M padronizado. Após a captura da amônia no ácido, o que sobrou de HCl é titulado com uma solução de NaOH 0,05 M padrão.

4.6.1.6 Avaliação da biomassa seca

Ao final do cultivo, os 3,2 litros de meio com *Arthrospira platensis* foram centrifugados, com 2 lavagens sucessivas com água destilada para retirada dos

sais, componentes do meio de cultivo utilizado (SCHÖLOSSER), que apresentavam-se adsorvido às células, e, após a secagem com ventilação a 55 °C por 12 horas (PELIZER *et al.*, 1999) foram avaliados os teores de lipídios e proteínas da biomassa.

4.6.1.6.1 Determinação de Proteínas Totais

Para a determinação do teor protéico total na biomassa seca desengordurada foi realizado o clássico método de KJELDHAL. Esta metodologia é caracterizada por destruir a matéria orgânica com ácido sulfúrico concentrado, em presença de um catalisador e aquecimento, com formação de nitrogênio inorgânico, na forma de sulfato de amônio. Em seguida, em aparelho destilador de nitrogênio, para a alcalinização do meio, adiciona-se hidróxido de sódio no tubo proveniente da digestão, e, desta forma, o sal de amônio é convertido à amônia, que é destilada para uma solução saturada de ácido bórico. Posteriormente, titula-se essa solução com HCl 0,02 N padronizada para se quantificar a concentração de nitrogênio. Foi adotado o fator de conversão de 6,25 a partir de teores de nitrogênio total (OFFICIAL METHODS OF FOOD ANALYSIS, 1984).

4.6.1.6.2 Determinação de Lipídios Totais

A extração da fração lipídica total foi realizada por extração com solvente orgânico. A amostra foi triturada e transferida para um extrator contínuo de Soxhlet com refluxo da mistura de solventes clorofórmio-metanol (2:1 v/v) até o líquido ficar límpido (PIORRECK, 1984). A fração lipídica total juntamente com os solventes passou por um sistema evaporador rotativo a vácuo.

4.7. Experimentos realizados

Os cultivos foram realizados conforme mostra a Tabela 2. Os valores de iluminância foram escolhidos em função do trabalho de Torzillo e Vonshak (1994). O valor de pH foi fixado em $9,5 \pm 0,5$, de acordo com trabalho de Sanchez-Luna *et al.* (2007), pela adição de CO_2 (CONVERTI *et al.*, 2006). Foram estudados diferentes protocolos de adição diária de sulfato de amônio sob diferentes intensidades luminosas (Tabela 2).

Os cultivos padrão foram realizados com adição de nitrato de sódio como fonte de nitrogênio de forma que não houvesse limitação deste nutriente (FAINTUCH, 1989). Assim, os ensaios com adição de sulfato de amônio, como fonte de nitrogênio alternativa, nas três intensidades luminosas estudadas, tiveram os seus respectivos cultivos padrão (usando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio) como um objetivo a ser alcançado.

Para se chegar aos protocolos I e II de adição de sulfato de amônio (Tabela 2), para cada intensidade luminosa foi feito um ensaio padrão, utilizando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, que foi utilizado como base para o cálculo das respectivas equações de adição da fonte de nitrogênio amoniacal. A partir da curva de concentração celular pelo tempo do respectivo ensaio padrão, foi elaborada uma curva interpolada, que representaria o comportamento médio do crescimento microbiano na correspondente intensidade luminosa. Em seguida, foram calculadas as produtividades em células diárias, e a partir desses valores foi possível calcular a quantidade de nitrogênio que deveria ser adicionada, a fim de que o aumento da concentração celular de um dia para o outro, nos ensaios parabólica I e parabólica II, pudesse ser equivalente aos respectivos ensaios padrão.

Nos ensaios 2, 6 e 10 (parabólica I) adotou-se, uma lei de adição em que foi considerada biomassa seca de *S. platensis* com 10% de nitrogênio, pois, de acordo com Cornet *et al.* (1992), a fórmula mínima da biomassa seca é $\text{CH}_{1,650} \text{O}_{0,531} \text{N}_{0,170} \text{S}_{0,007} \text{P}_{0,006}$. Assim, em trabalho desenvolvido por estes autores, a biomassa de *S. platensis* apresentou massa molar de 24,936 g, com porcentagem de nitrogênio da ordem de 10 %.

Nos ensaios 3, 7 e 11 (parabólica II) foi considerada biomassa seca de *A. platensis* com teor de nitrogênio de 7 %, pois como observado em Bezerra (2006) as biomassas secas de *A. platensis* apresentaram composição de proteína de até 42%, o que corresponde a teores de nitrogênio da ordem de 7%.

Após a obtenção dos valores de adição para os ensaios parabólica I e parabólica II foram feitas curvas parabólicas de adição diária de nitrogênio. Nos ensaios 4, 8 e 12 foi feita adição de solução de sulfato de amônio de 3 mM de nitrogênio diariamente.

Deve-se ressaltar ainda que em todos os ensaios em que foi utilizado o sal sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, a adição foi realizada em oito pulsos por dia, visando evitar o efeito inibitório por amônia.

Tabela 2 - Experimentos realizados

Ensaio	Intensidade luminosa ($\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Protocolo de adi\u00e7\u00e3o da fonte de nitrog\u00eanio
1	60	Nitrato (padr\u00e3o) ^a
2	60	Parab\u00f3lica I ^b , $Y = 3,664 + 1,726x - 0,192x^2$
3	60	Parab\u00f3lica II ^b , $Y = 2,565 + 1,208x - 0,134x^2$
4	60	Constante ^c
5	120	Nitrato (padr\u00e3o) ^a
6	120	Parab\u00f3lica I ^b , $Y = 4,982 + 3,132x - 0,325x^2$
7	120	Parab\u00f3lica II ^b , $Y = 3,487 + 2,193x - 0,227x^2$
8	120	Constante ^c
9	240	Nitrato (padr\u00e3o) ^a
10	240	Parab\u00f3lica I ^b , $Y = 3,169 + 6,557x - 0,793x^2$
11	240	Parab\u00f3lica II ^b , $Y = 2,218 + 4,59x - 0,555x^2$
12	240	Constante ^c

^a cultivo padr\u00e3o realizado com nitrato de s\u00f3dio, com adi\u00e7\u00e3o di\u00e1ria, mantendo sempre a concentra\u00e7\u00e3o acima de $1,0 \text{ g L}^{-1}$.

^b sulfato de am\u00f4nio, com lei de adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica, onde Y representa a vaz\u00e3o molar di\u00e1ria de nitrog\u00eanio ($\text{mmol.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), considerando uma expectativa de demanda di\u00e1ria deste nutriente ao longo do crescimento na correspondente intensidade luminosa com biomassas secas com teores de nitrog\u00eanio de 10 % (Parab\u00f3lica I) e 7 % (Parab\u00f3lica II).

^c sulfato de am\u00f4nio, com lei de adi\u00e7\u00e3o constante de sulfato de am\u00f4nio ($F = 3 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), onde F representa a vaz\u00e3o molar di\u00e1ria de nitrog\u00eanio.

4.8. An\u00e1lise dos resultados

A partir dos cultivos, foram calculados os fatores de convers\u00e3o de nitrog\u00eanio em c\u00e9lulas ($Y_{X/N}$) e produtividades em c\u00e9lulas, como apresentados a seguir. As compara\u00e7\u00f5es dos resultados foram feitas com aux\u00edlio de an\u00e1lise de vari\u00e2ncia –

ANOVA *two-way*, com nível de significância de 0,05 (NETER e WASSERMAN, 1974), realizada no programa MINITAB 15.

4.8.1. Produtividade em células:

$$P_X = (X_m - X_i) / T_c \quad (\text{Equação 1})$$

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

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

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

T_c = tempo de cultivo (dias)

4. 8. 2. Fator de conversão de nitrogênio em células:

$$Y_{X/N} = (X_m - X_i) \cdot V / N_t \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: $Y_{X/N}$ = Fator de conversão de nitrogênio em células (mg.mg^{-1})

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

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

V = volume do meio (L)

N_t = quantidade total de nitrogênio adicionado (mg)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As determinações de concentração celular e carbonato total foram realizadas para todos os ensaios. Para os ensaios realizados com sulfato de amônio apresentou-se também a concentração de amônia. Estes resultados estão apresentados nas Tabelas 3 a 20 e Figuras de 6 a 35.

A partir dos cultivos, foram calculados os fatores de conversão da fonte de nitrogênio em células e as produtividades em células. Para a melhor observação dos valores de concentração celular máxima, estes e seus respectivos dias estão indicados em negrito nas tabelas.

Para cada intensidade luminosa utilizada existe um ensaio padrão, realizado com nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, como já visto na Tabela 2. Assim, pode-se dizer que a forma de adição de fonte de nitrogênio nos ensaios 1, 5 e 9 é a mesma, e estes são os únicos ensaios a utilizarem nitrato de sódio como fonte de nitrogênio.

Ensaio 1

Tabela 3 – Concentração celular (mg.L^{-1}) e carbonato total (g.L^{-1}) em função do tempo no ensaio 1 (Nitrato de sódio e $60 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Tempo (dias)	Concentração celular (mg.L^{-1})	Carbonato total (g.L^{-1})
0	400	11,6
1	844	-
2	1591	11,0
3	2386	-
4	3069	10,4
5	3673	-
6	4444	9,1
7	5632	-
8	6290	9,7
9	7360	-
10	8540	11,0
11	9160	-
12	8600	9,7

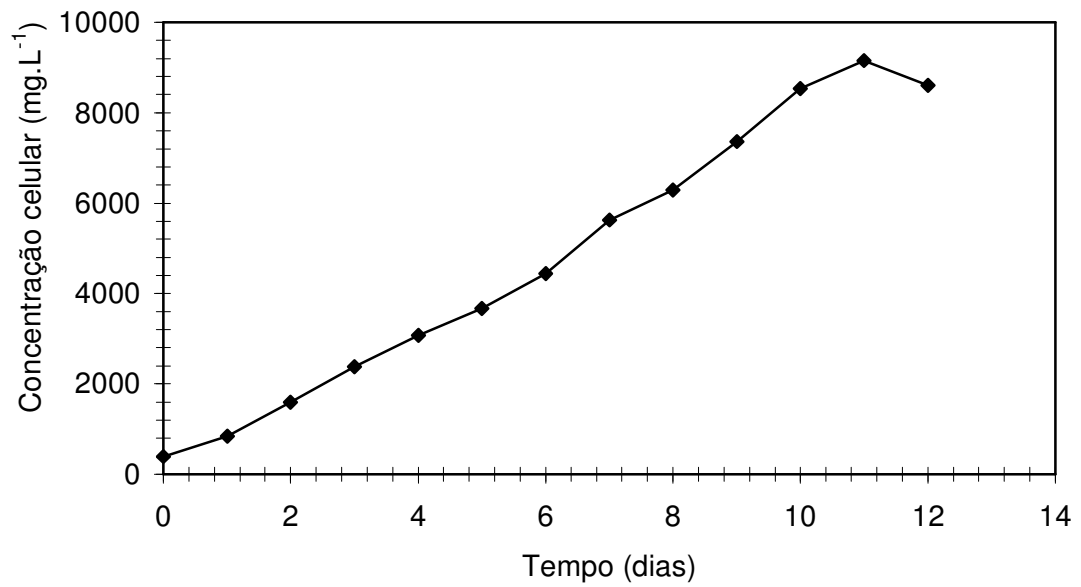


Figura 6. Concentração celular em função do tempo no ensaio 1 (Nitrato de sódio e $60 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

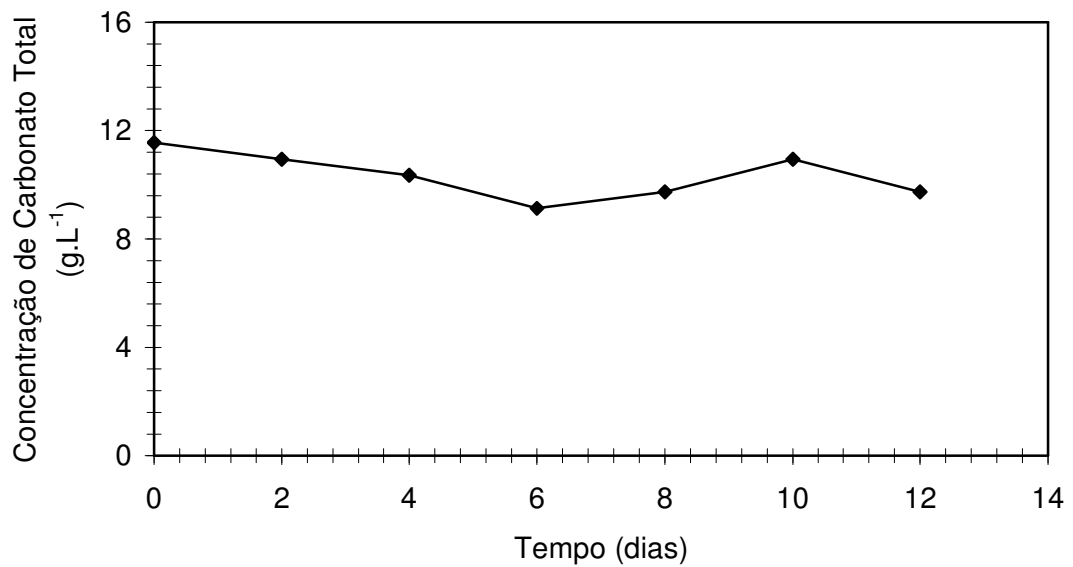


Figura 7. Concentração de carbonato total em função do tempo no ensaio 1 (Nitrato de sódio e $60 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Ensaio 2

Tabela 4 - Concentração de nitrogênio adicionada diariamente no ensaio 2 (60 μmol fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de amônio e adição parabólica I ($Y = 3,664 + 1,726x - 0,192x^2$)).

Tempo (dias)	Adição diária de nitrogênio (mM dia⁻¹)
0	3,70
1	5,20
2	6,30
3	7,10
4	7,50
5	7,50
6	7,10
7	6,30
8	5,20
9	3,60
10	1,70

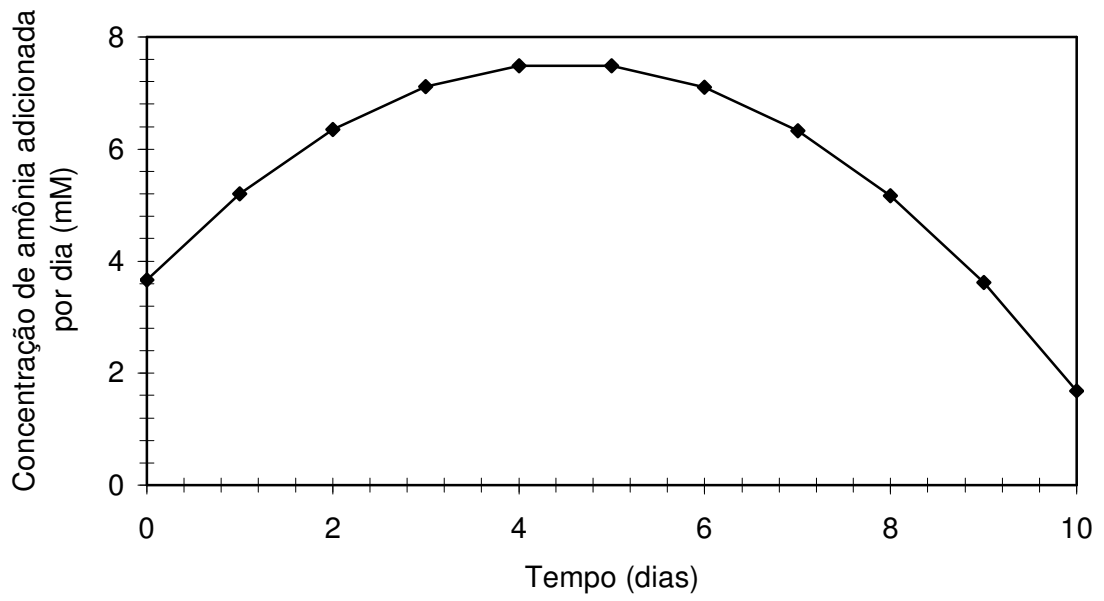


Figura 8. Curva parabólica de adição de nitrogênio em função do tempo referente ao ensaio 2 ($60 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica I ($Y = 3,664 + 1,726x - 0,192x^2$)).

Tabela 5 – Concentração celular, concentração de carbonato total e concentração de amônia em função do tempo no ensaio 2 ($60 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica I ($Y = 3,664 + 1,726x - 0,192x^2$)).

Tempo (dias)	Concentra\u00e7\u00e3o celular (mg.L^{-1})	Carbonato total (g.L^{-1})	Concentra\u00e7\u00e3o de am\u00f4nia (mol.L^{-1})
0	400	11,6	0
1	693	-	$1,4 \cdot 10^{-3}$
2	1293	10,3	$1,0 \cdot 10^{-3}$
3	1849	-	$2,7 \cdot 10^{-3}$
4	2541	9,7	$6,8 \cdot 10^{-3}$
5	2782	-	$7,8 \cdot 10^{-3}$
6	2712	10,3	$9,5 \cdot 10^{-3}$
7	2839	-	$1,2 \cdot 10^{-2}$
8	2315	10,0	*

*Acima de 60 mM.

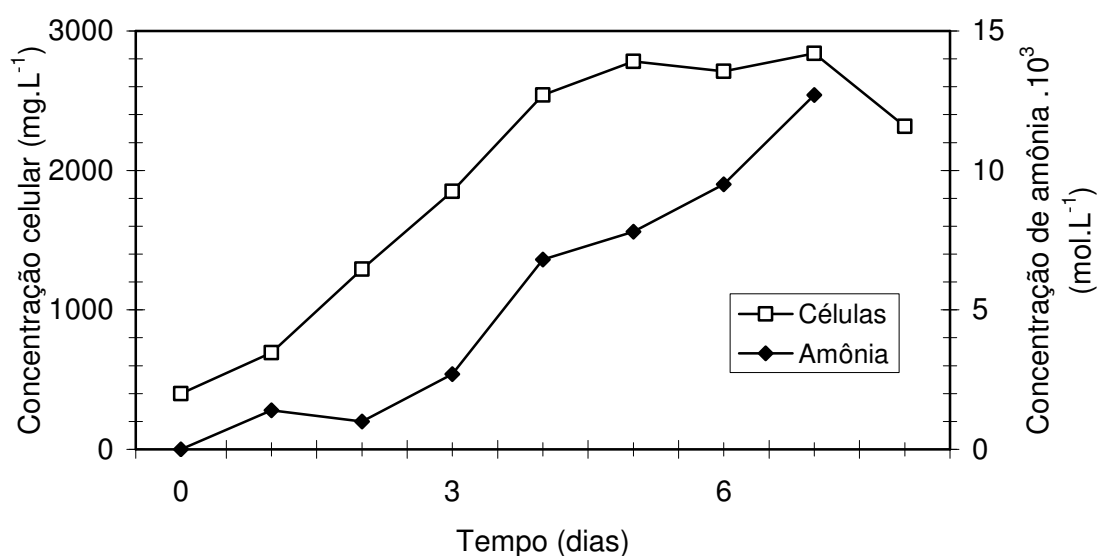


Figura 9. Concentra\u00e7\u00e3o celular e concentra\u00e7\u00e3o de am\u00f4nia em fun\u00e7\u00e3o do tempo no ensaio 2 ($60 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica I ($Y = 3,664 + 1,726x - 0,192x^2$)).

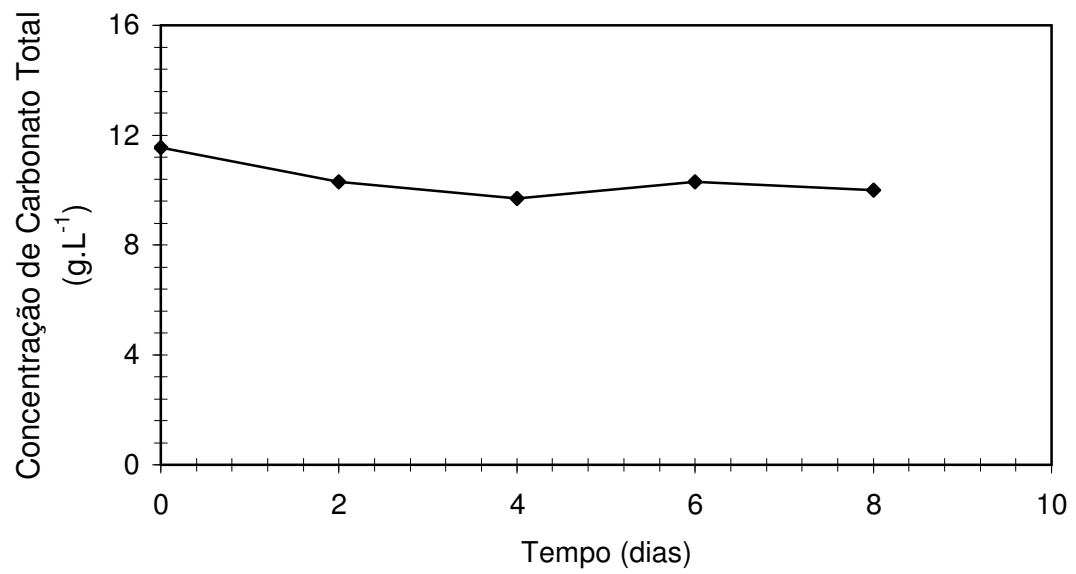


Figura 10. Concentração de carbonato total em função do tempo referente ao ensaio 2 ($60 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica I ($Y = 3,664 + 1,726x - 0,192x^2$)).

Ensaio 3

Tabela 6 - Concentração de nitrogênio adicionada diariamente no ensaio 3 ($60 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, sulfato de am\^oio e adi\^ao parab\^olica II ($Y = 2,565 + 1,208x - 0,134x^2$)).

Tempo (dias)	Adi\^ao di\^aria de nitrog\^enio (mM.dia^{-1})
0	2,60
1	3,60
2	4,40
3	5,00
4	5,20
5	5,20
6	5,00
7	4,40
8	3,60
9	2,50
10	1,20

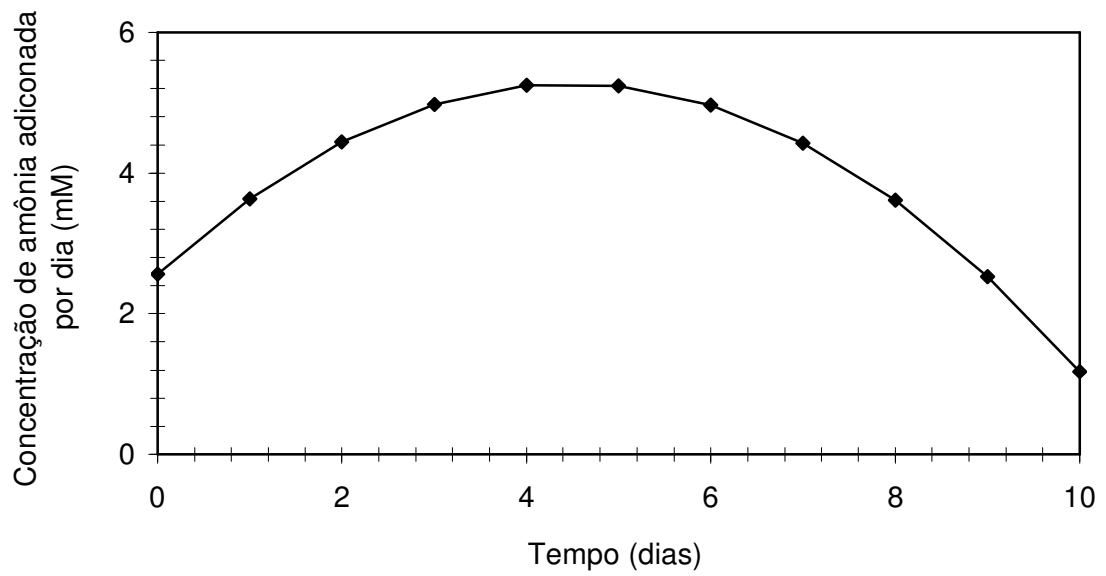


Figura 11. Curva parabólica de adição de nitrogênio em função do tempo referente ao ensaio 3 ($60 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adição parab\u00f3lica II ($Y = 2,565 + 1,208x - 0,134x^2$)).

Tabela 7 – Concentração celular, carbonato total e amônia em função do tempo no ensaio 3 ($60 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica II ($Y = 2,565 + 1,208x - 0,134x^2$)).

Tempo (dias)	Concentra\u00e7\u00e3o celular (mg.L^{-1})	Carbonato total (g.L^{-1})	Concentra\u00e7\u00e3o de am\u00f4nia (mol.L^{-1})
0	400	11,6	0
1	846	-	$1,5.10^{-5}$
2	1517	10,0	$6,3.10^{-6}$
3	2552	-	$9,2.10^{-6}$
4	3645	9,1	$2,4.10^{-5}$
5	4433	-	$1,7.10^{-5}$
6	5737	9,1	$1,0.10^{-5}$
7	6704	-	$6,5.10^{-5}$
8	7410	8,8	$4,9.10^{-4}$
9	7942	-	$1,8.10^{-3}$
10	7862	9,4	$1,9.10^{-3}$
11	7790	-	$1,9.10^{-3}$
12	7602	9,7	$6,5.10^{-4}$

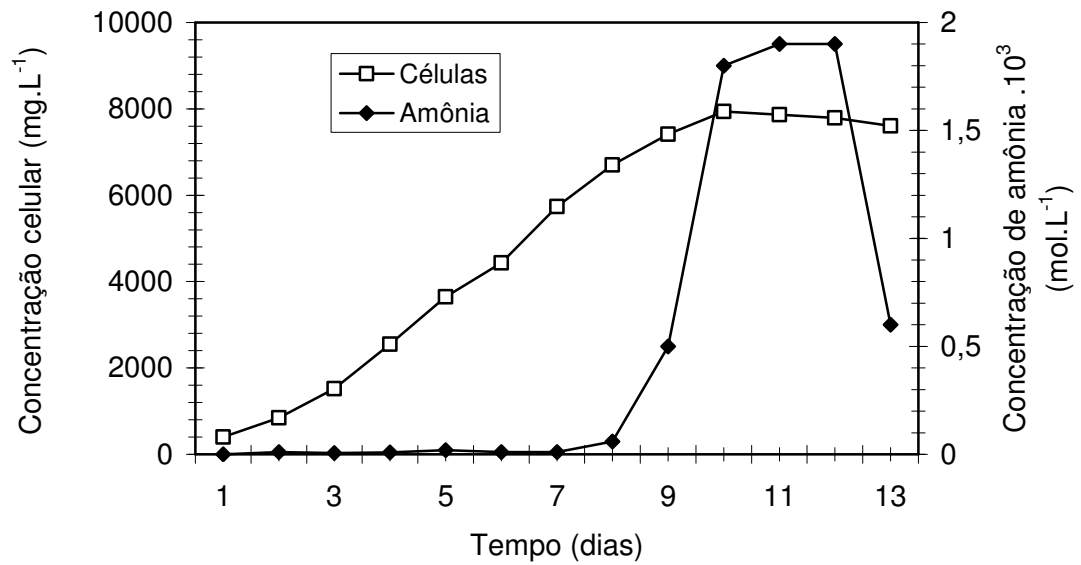


Figura 12. Concentração celular e concentração de amônia, em função do tempo, referentes ao ensaio 3 ($60 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica II ($Y = 2,565 + 1,208x - 0,134x^2$)).

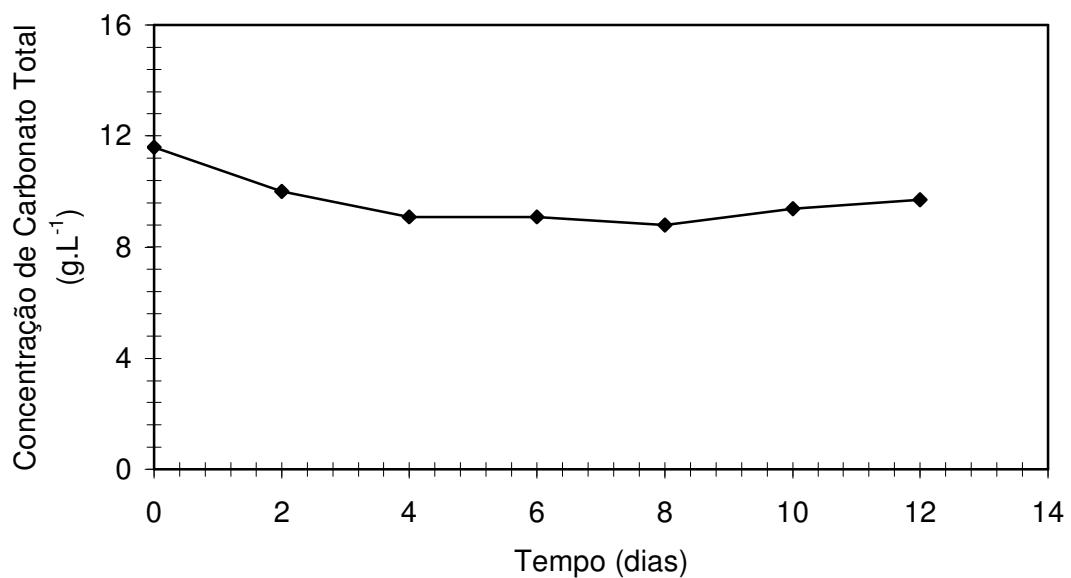


Figura 13. Concentração de carbonato total, em função do tempo, referente ao ensaio 3 ($60 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica II ($Y = 2,565 + 1,208x - 0,134x^2$)).

Ensaio 4

Tabela 8 – Concentração celular, carbonato total e amônia em função do tempo no ensaio 4 ($60 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o di\u00e1ria de 3mM).

Tempo (dias)	Concentra\u00e7\u00e3o celular (mg.L^{-1})	Carbonato total (g.L^{-1})	Concentra\u00e7\u00e3o de am\u00f4nia (mol.L^{-1})
0	400	11,6	0
1	863	-	$8,7.10^{-6}$
2	1586	10,0	$1,2.10^{-5}$
3	2476	-	$1,9.10^{-5}$
4	2993	10,4	$1,6.10^{-5}$
5	3721	-	$1,2.10^{-5}$
6	4371	8,8	$1,2.10^{-5}$
7	5058	-	$7,3.10^{-6}$
8	5478	9,1	*
9	6693	-	$1,1.10^{-5}$
10	7156	10,0	$9,8.10^{-6}$
11	7812	-	*
12	7520	9,7	$3,3.10^{-5}$

* Abaixo do n\u00edvel detectado detectado pela metodologia anal\u00edtica.

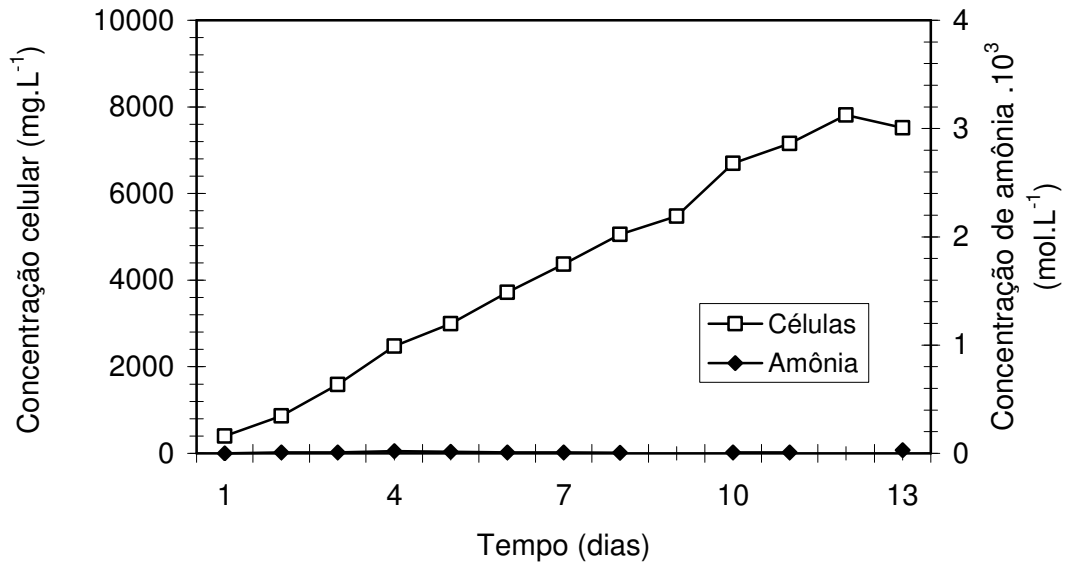


Figura 14. Concentração celular e concentração de amônia, em função do tempo, referentes ao ensaio 4 ($60 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o di\u00e1ria de 3mM).

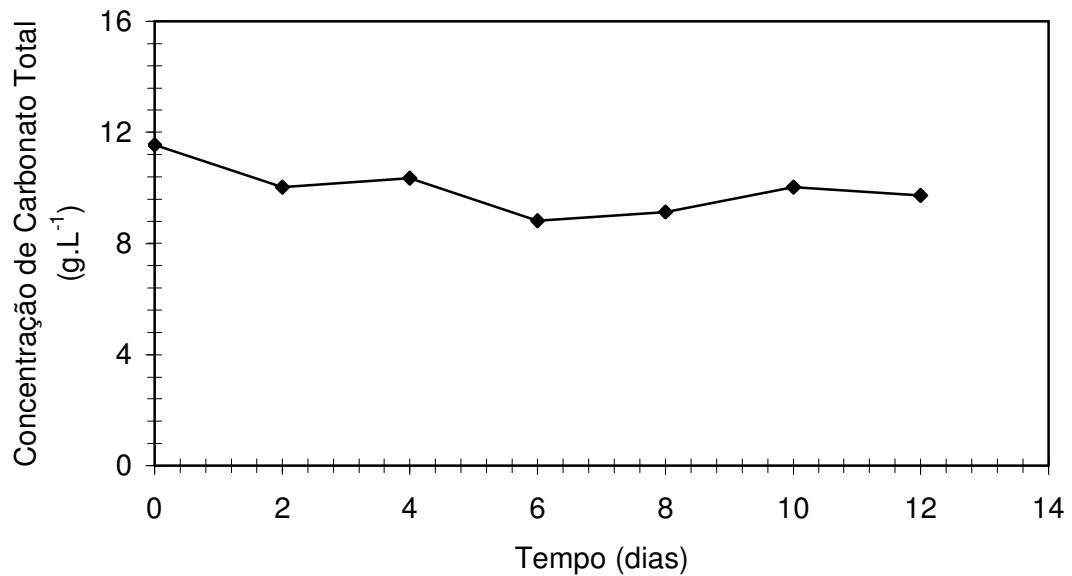


Figura 15. Concentração de carbonato total, em função do tempo, referente ao ensaio 4 ($60 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o di\u00e1ria de 3mM).

Ensaio 5

Tabela 9 – Concentração celular e concentração de carbonato total em função do tempo no ensaio 5 (nitrato de sódio e $120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Tempo (dias)	Concentração celular (mg.L^{-1})	Carbonato total (g.L^{-1})
0	400	11,6
1	892	-
2	1445	10,3
3	3391	-
4	6294	9,6
5	7713	-
6	9120	10,8
7	10250	-
8	11050	10,2
9	12175	-
10	13525	10,3
11	14650	-
12	14300	11,4

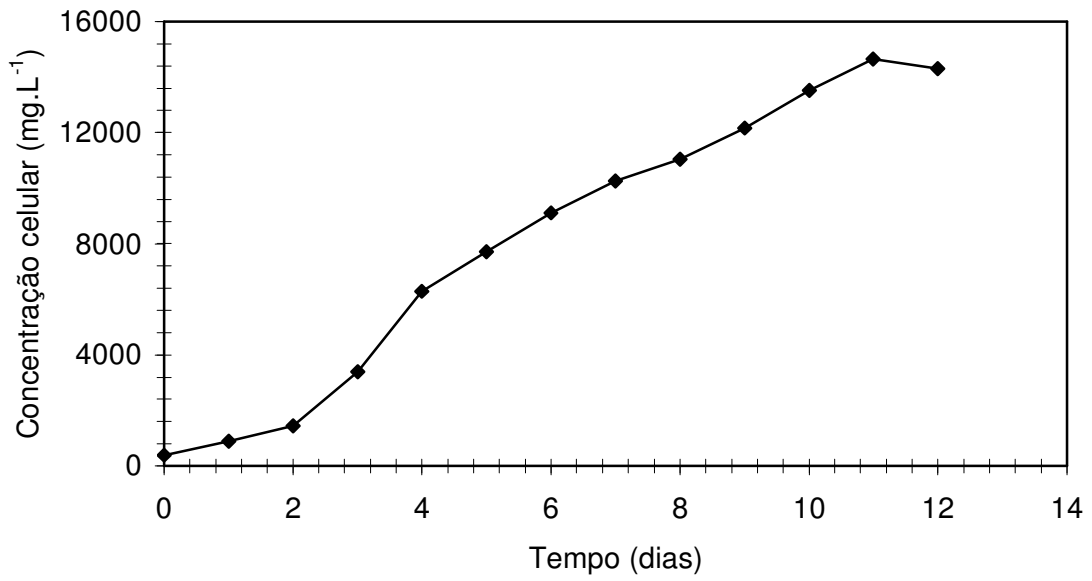


Figura 16. Concentração celular, em função do tempo no ensaio 5 (nitrato de sódio e $120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

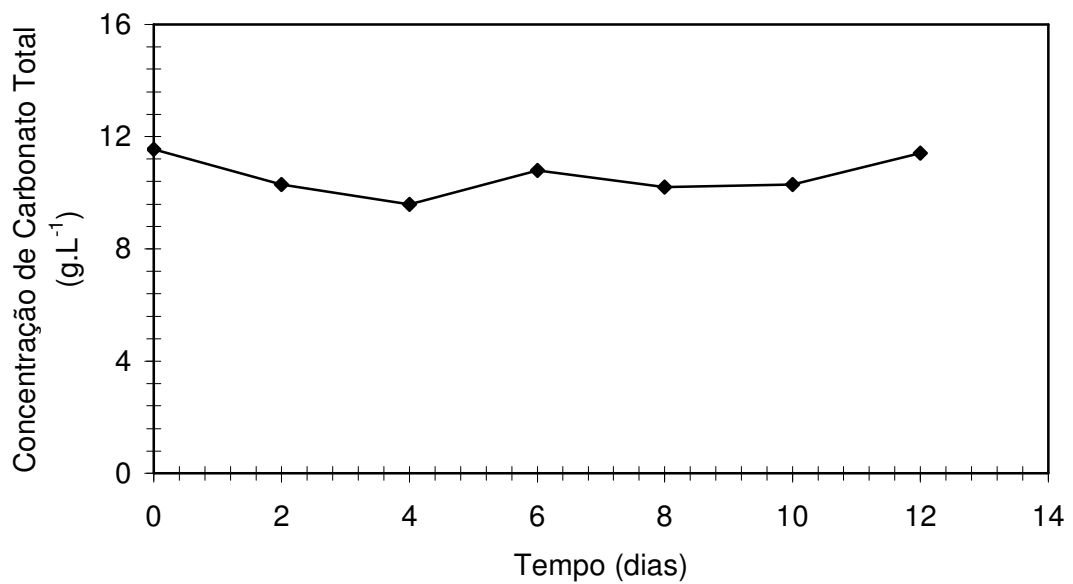


Figura 17. Concentração de carbonato total, em função do tempo no ensaio 5 (nitrato de sódio e $120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Ensaio 6

Tabela 10 – Concentração de nitrogênio adicionada diariamente no ensaio 6 ($120 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de amônio e adição parabólica I ($Y = 4,982 + 3,132x - 0,325x^2$)).

Tempo (dias)	Adição diária de nitrogênio (mM.dia⁻¹)
0	4,98
1	7,79
2	9,95
3	11,45
4	12,31
5	12,51
6	12,07
7	10,97
8	9,22
9	6,82
10	3,78

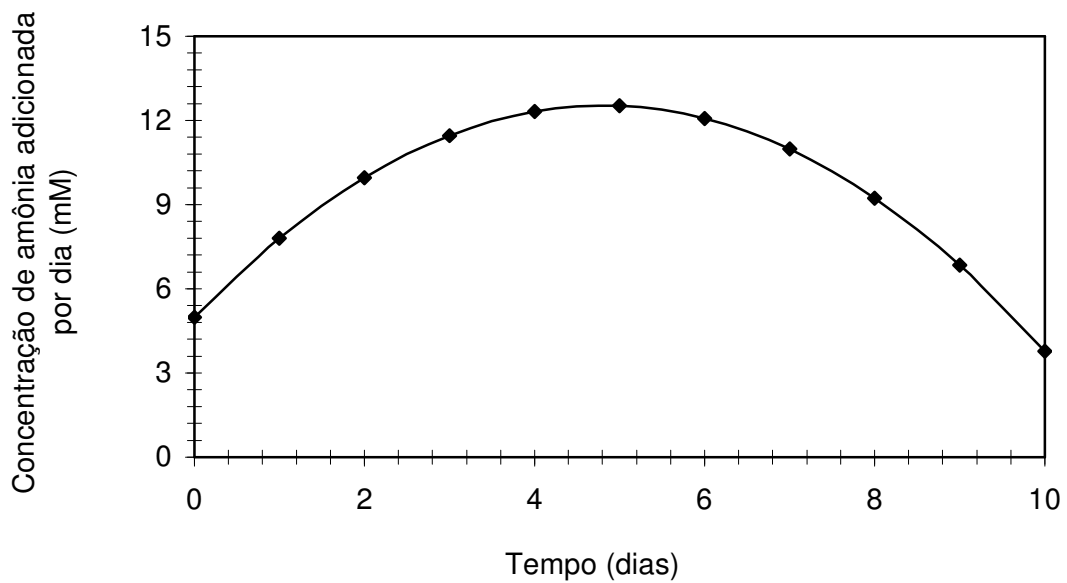


Figura 18. Curva parabólica de adição de nitrogênio em função do tempo referente ao ensaio 6 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica I ($Y = 4,982 + 3,132x - 0,325x^2$)).

Tabela 11 – Concentra\u00e7\u00e3o celular, concentra\u00e7\u00e3o de carbonato total e concentra\u00e7\u00e3o de am\u00f4nia em fun\u00e7\u00e3o do tempo no ensaio 6 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica I ($Y = 4,982 + 3,132x - 0,325x^2$)).

Tempo (dias)	Concentra\u00e7\u00e3o celular (mg.L^{-1})	Carbonato total (g.L^{-1})	Concentra\u00e7\u00e3o de am\u00f4nia (mol.L^{-1})
0	400	11,2	0
1	625	-	$1,9.10^{-3}$
2	920	10,3	$5,8.10^{-3}$
3	1227	-	$9,3.10^{-3}$
4	1205	10,5	$1,5.10^{-2}$
5	Morte celular	-	-

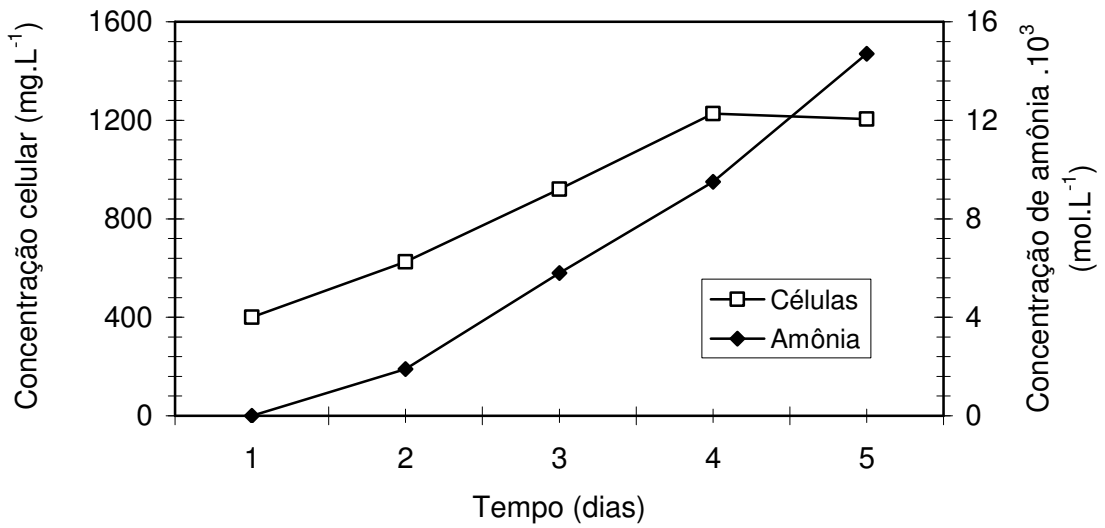


Figura 19. Concentração celular e concentração de amônia, em função do tempo, referentes ao ensaio 6 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica I ($Y = 4,982 + 3,132x - 0,325x^2$)).

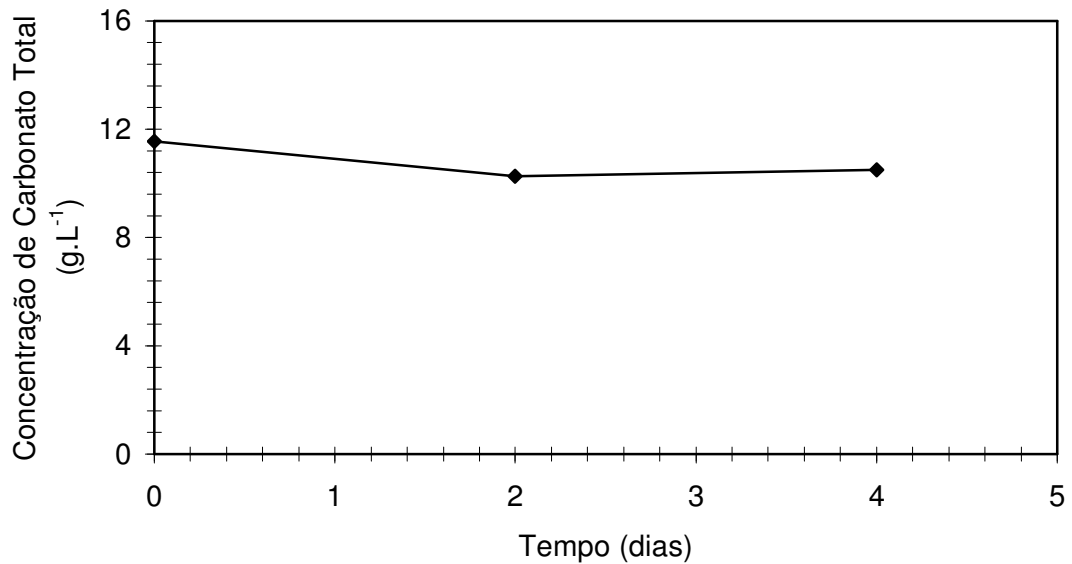


Figura 20. Concentração de carbonato total, em função do tempo, referente ao ensaio 6 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica I ($Y = 4,982 + 3,132x - 0,325x^2$)).

Ensaio 7

Tabela 12 – Concentração de nitrogênio a ser adicionada diariamente no ensaio 7 (120 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica II ($Y = 3,487 + 2,193x - 0,227x^2$)).

Tempo (dias)	Adi\u00e7\u00e3o di\u00e1ria de nitrog\u00eanio (mM.dia^{-1})
0	3,49
1	5,45
2	6,97
3	8,02
4	8,62
5	8,76
6	8,45
7	7,68
8	6,45
9	4,77
10	2,65

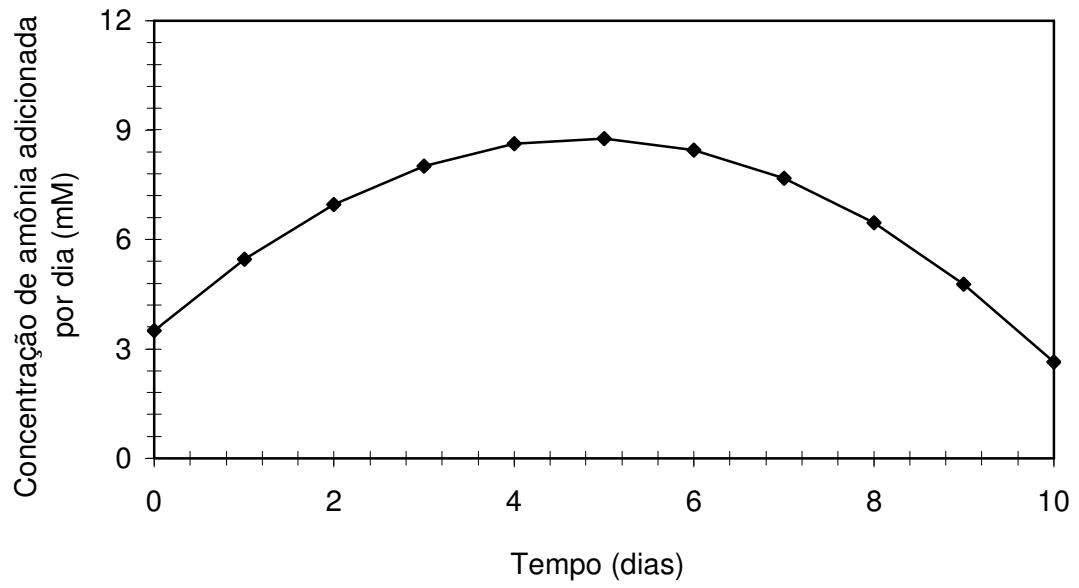


Figura 21. Curva parabólica de adição de nitrogênio referente ao ensaio 7 ($120 \mu\text{mol} \text{fótons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, sulfato de amônio e adição parabólica II ($Y = 3,487 + 2,193x - 0,227x^2$)).

Tabela 13 – Concentração celular, carbonato total e amônia em função do tempo no ensaio 7 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica II ($Y = 3,487 + 2,193x - 0,227x^2$)).

Tempo (dias)	Concentra\u00e7\u00e3o celular (mg.L⁻¹)	Carbonato total (g.L⁻¹)	Concentra\u00e7\u00e3o de am\u00f4nia (mol.L⁻¹)
0	400	11,6	0
1	654	-	$6,2.10^{-4}$
2	1301	9,4	$3,2.10^{-4}$
3	2914	-	$2,8.10^{-4}$
4	4599	10,9	$1,4.10^{-5}$
5	6172	-	$1,6.10^{-5}$
6	7962	10,0	$1,9.10^{-5}$
7	10340	-	$2,0.10^{-5}$
8	11900	9,7	$7,2.10^{-6}$
9	12450	-	$3,0.10^{-5}$
10	13600	10,6	$2,4.10^{-5}$
11	14100	-	$4,0.10^{-5}$
12	13700	10,9	$4,9.10^{-5}$

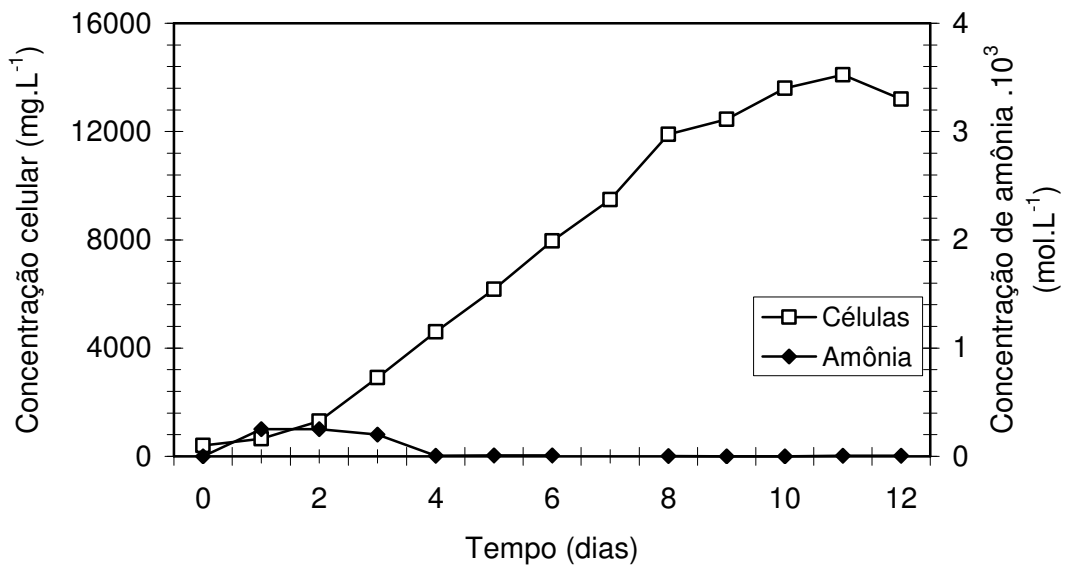


Figura 22. Concentração celular e concentração de amônia, em função do tempo, referentes ao ensaio 7 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica II ($Y = 3,487 + 2,193x - 0,227x^2$)).

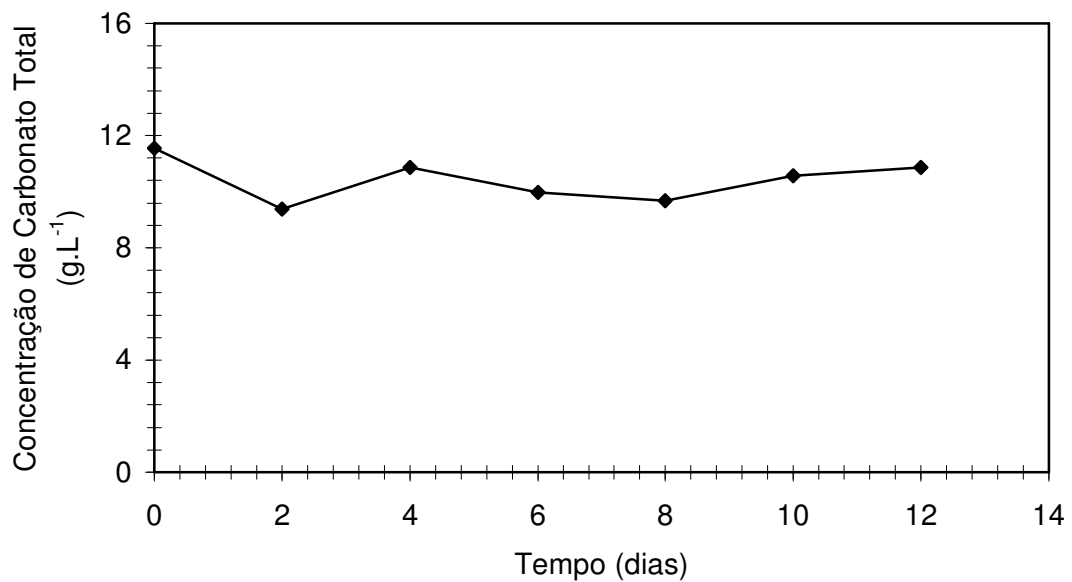


Figura 23. Concentração de carbonato total, em função do tempo, referente ao ensaio 7 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica II ($Y = 3,487 + 2,193x - 0,227x^2$)).

Ensaio 8

Tabela 14 – Concentração celular, carbonato total e amônia em função do tempo no ensaio 8 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o di\u00e1ria de 3mM).

Tempo (dias)	Concentra\u00e7\u00e3o celular (mg.L^{-1})	Carbonato total (g.L^{-1})	Concentra\u00e7\u00e3o de am\u00f4nia (mol.L^{-1})
0	400	11,6	0
1	950	-	$4,2.10^{-06}$
2	1931	11,2	$5,7.10^{-06}$
3	3437	-	$4,5.10^{-06}$
4	4852	10,0	$3,6.10^{-06}$
5	6630	-	$4,6.10^{-06}$
6	8040	9,6	$6,4.10^{-06}$
7	10500	-	$7,1.10^{-06}$
8	10900	9,6	$8,9.10^{-06}$
9	11875	-	$5,1.10^{-06}$
10	12100	9,6	$7,6.10^{-06}$
11	12600	-	$7,0.10^{-06}$
12	12400	10,2	$9,5.10^{-06}$

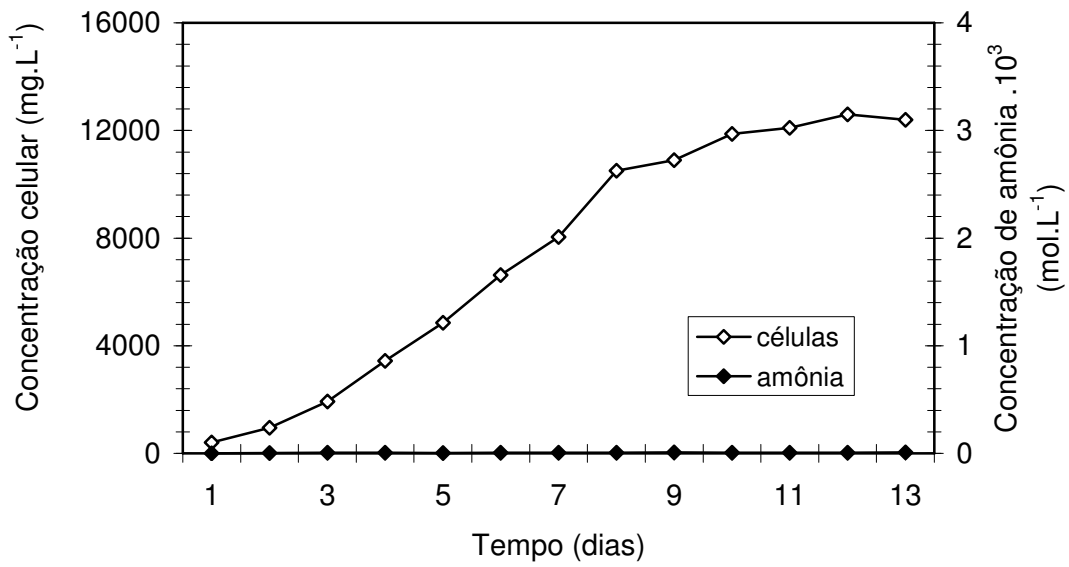


Figura 24. Concentração celular e concentração de amônia, em função do tempo, referentes ao ensaio 8 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o di\u00e1ria de 3mM).

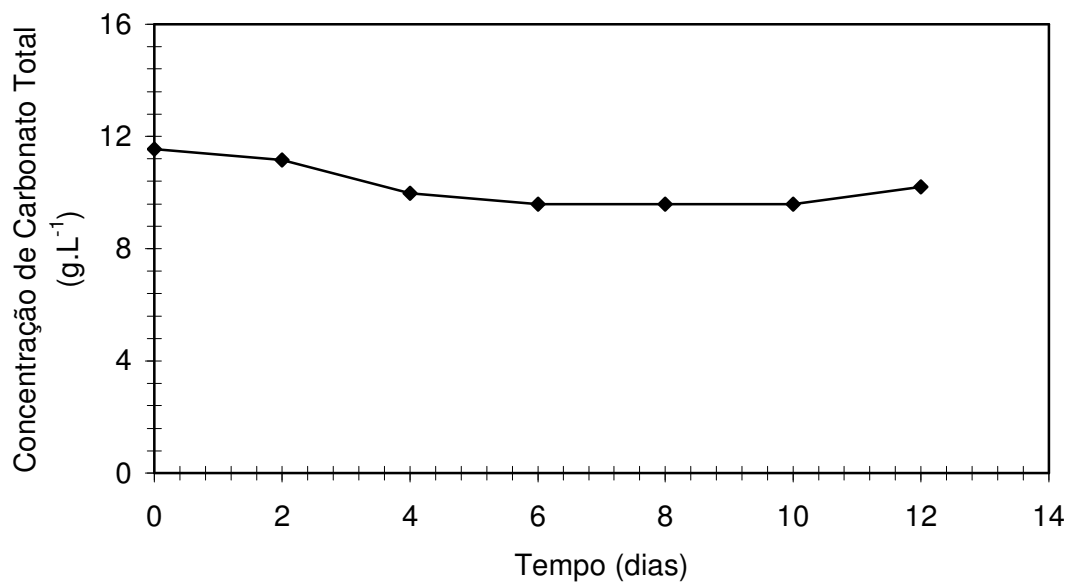


Figura 25. Concentração de carbonato total, em função do tempo, referente ao ensaio 8 ($120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o di\u00e1ria de 3mM).

Ensaio 9

Tabela 15 - Concentração celular e carbonato total em função do tempo no ensaio 9 (240 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$ e nitrato de s\acute{o}dio).

Tempo (dias)	Concentração celular (mg.L^{-1})	Carbonato total (g.L^{-1})
0	400	11,6
1	880	-
2	2183	11,4
3	4079	-
4	7470	10,5
5	10430	-
6	12275	11,4
7	13080	-
8	14065	11,2
9	14230	-
10	13670	10,8

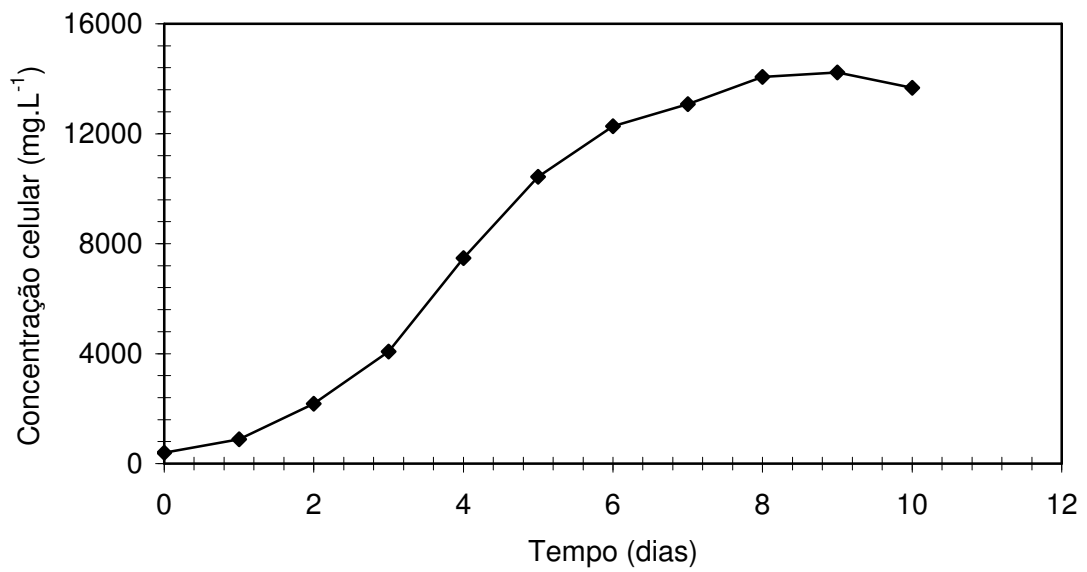


Figura 26. Concentração celular, em função do tempo, no ensaio 9 ($240 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e nitrato de s\u00f3dio).

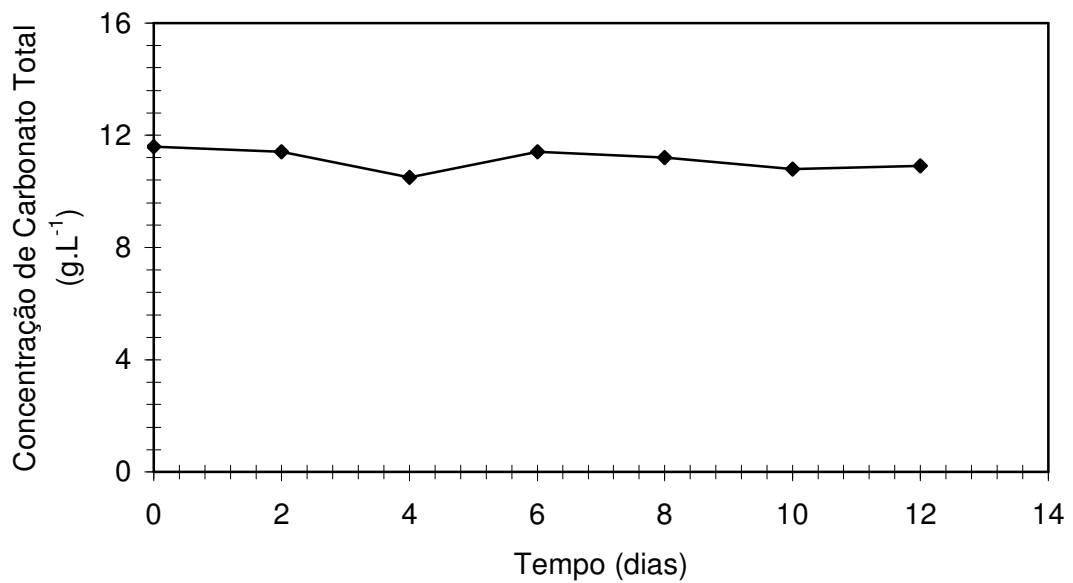


Figura 27. Concentração de carbonato total, em função do tempo, no ensaio 9 ($240 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e nitrato de s\u00f3dio).

Ensaio 10

Tabela 16 – Concentração de nitrogênio adicionada diariamente no ensaio 10 (240 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica I ($Y = 3,169 + 6,557x - 0,793x^2$)).

Tempo (dias)	Adi\u00e7\u00e3o di\u00e1ria de nitrog\u00eanio (mM dia⁻¹)
0	3,20
1	8,90
2	13,10
3	15,70
4	16,70
5	16,10
6	14,00
7	10,20
8	4,90

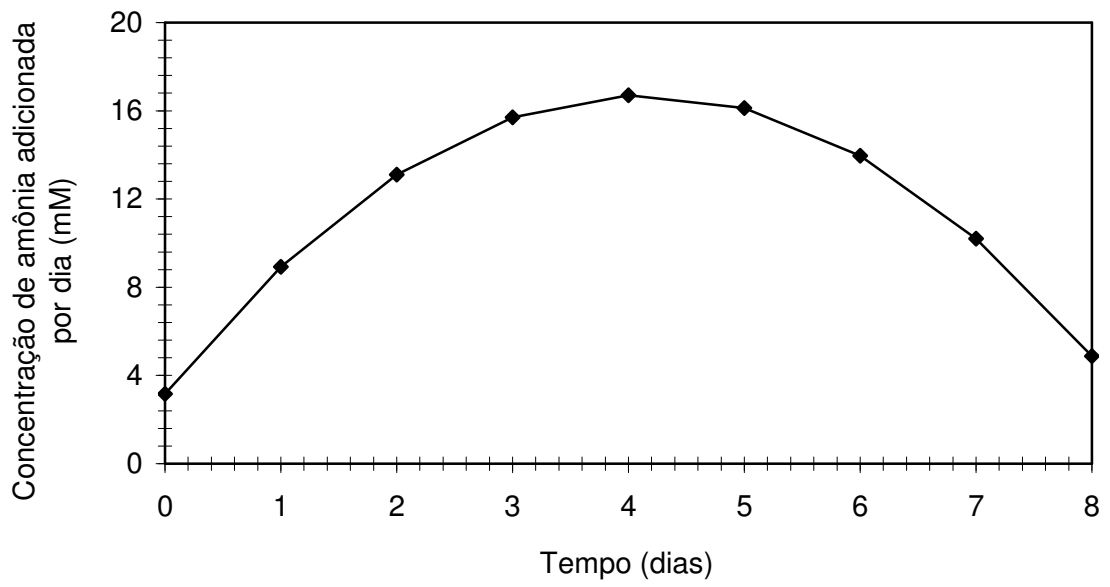


Figura 28. Curva parabólica de adição de nitrogênio em função do tempo referente ao ensaio 10 ($240 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica I ($Y = 3,169 + 6,557x - 0,793x^2$)).

Tabela 17 – Concentração celular, carbonato total e concentração de amônia em função do tempo no ensaio 10 ($240 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica I ($Y = 3,169 + 6,557x - 0,793x^2$)).

Tempo (dias)	Concentra\u00e7\u00e3o celular (mg.L^{-1})	Carbonato total (g.L^{-1})	Concentra\u00e7\u00e3o de am\u00f4nia (mol.L^{-1})
0	400	11,6	0
1	891	-	$8,6.10^{-6}$
2	2165	8,8	$7,4.10^{-6}$
3	3677	-	$3,4.10^{-5}$
4	6361	8,5	$9,0.10^{-6}$
5	8709	-	$1,1.10^{-5}$
6	10000	9,4	$2,8.10^{-3}$
7	10300	-	$3,4.10^{-3}$
8	9950	8,5	$9,2.10^{-3}$
9	8015	-	$1,6.10^{-2}$

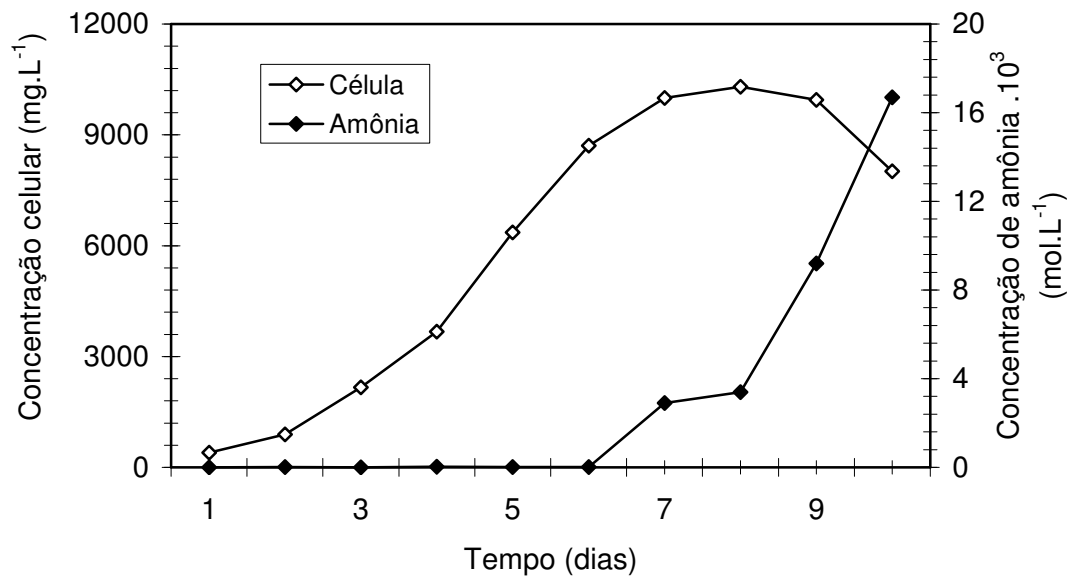


Figura 29. Concentração celular e concentração de amônia, em função do tempo, referentes ao ensaio 10 ($240 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de amônio e adição parabólica I ($Y = 3,169 + 6,557x - 0,793x^2$)).

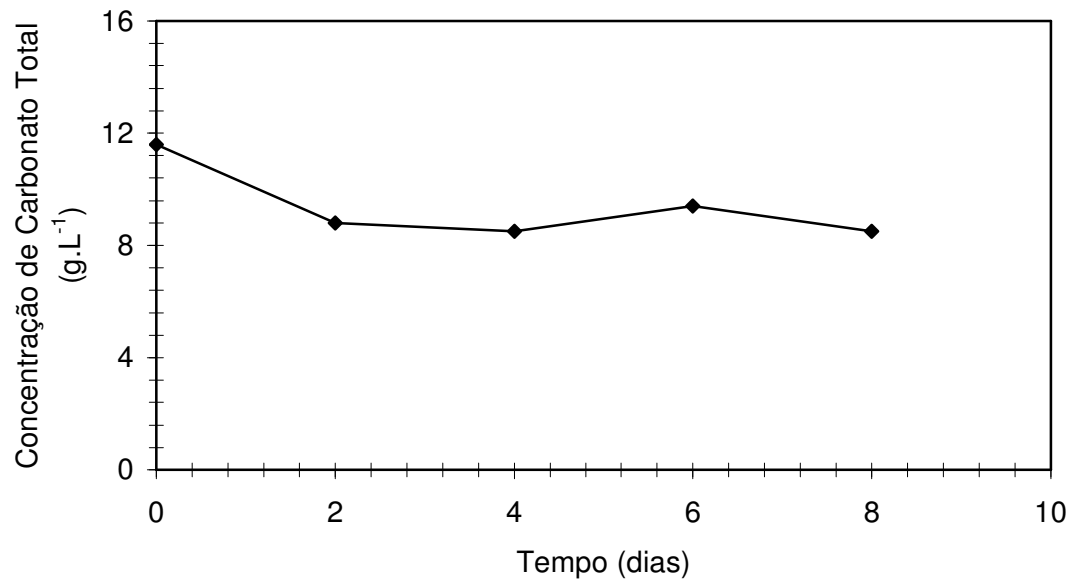


Figura 30. Concentração de carbonato total, em função do tempo, referente ao ensaio 10 ($240 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de amônio e adição parabólica I ($Y = 3,169 + 6,557x - 0,793x^2$)).

Ensaio 11

Tabela 18 – Concentração de nitrogênio a ser adicionada diariamente no ensaio 11 (240 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, sulfato de am\^oquio e adi\c3\c7\~ao parab\^oica II ($Y = 2,218 + 4,59x - 0,555x^2$)).

Tempo (dias)	Adi\c3\c7\~ao di\~aria de nitrog\^enio (mM.dia^{-1})
0	2,20
1	6,30
2	9,20
3	11,00
4	11,70
5	11,30
6	9,80
7	7,10
8	3,40

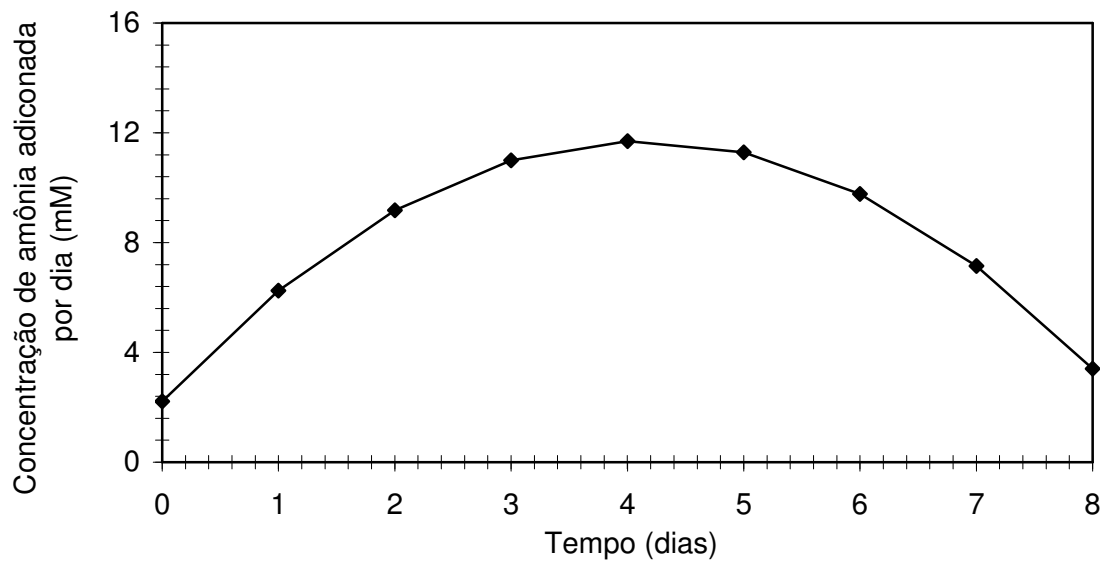


Figura 31. Curva parabólica de adição de nitrogênio em função do tempo referente ao ensaio 11 ($240 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adição parab\u00f3lica II ($Y = 2,218 + 4,59x - 0,555x^2$)).

Tabela 19 – Concentração celular, carbonato total e amônia em função do tempo no ensaio 11 ($240 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o parab\u00f3lica II ($Y = 2,218 + 4,59x - 0,555x^2$)).

Tempo (dias)	Concentra\u00e7\u00e3o celular (mg.L^{-1})	Carbonato total (g.L^{-1})	Concentra\u00e7\u00e3o de am\u00f4nia (mol.L^{-1})
0	400	11,6	0
1	936	-	$2,9.10^{-6}$
2	2177	8,8	$5,7.10^{-6}$
3	3806	-	$5,3.10^{-6}$
4	5741	8,5	$5,2.10^{-6}$
5	8100	-	$1,4.10^{-5}$
6	11050	8,2	$1,7.10^{-5}$
7	12200	-	$1,6.10^{-5}$
8	12010	8,8	$1,6.10^{-5}$
9	11550	-	$1,2.10^{-3}$

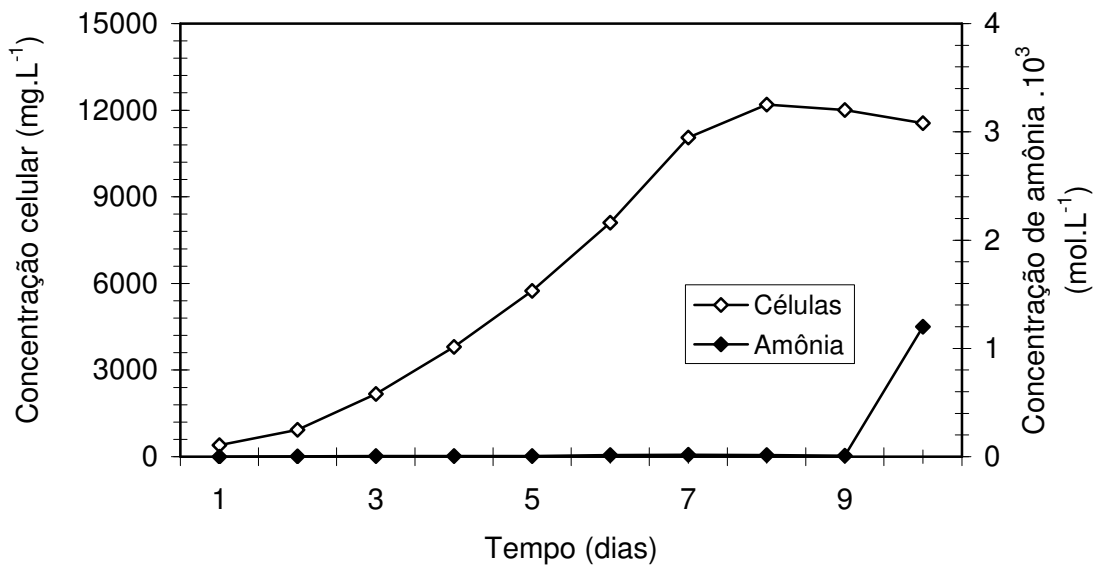


Figura 32. Concentração celular e concentração de amônia, em função do tempo, referentes ao ensaio 11 ($240 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de amônio e adição parabólica II ($Y = 2,218 + 4,59x - 0,555x^2$)).

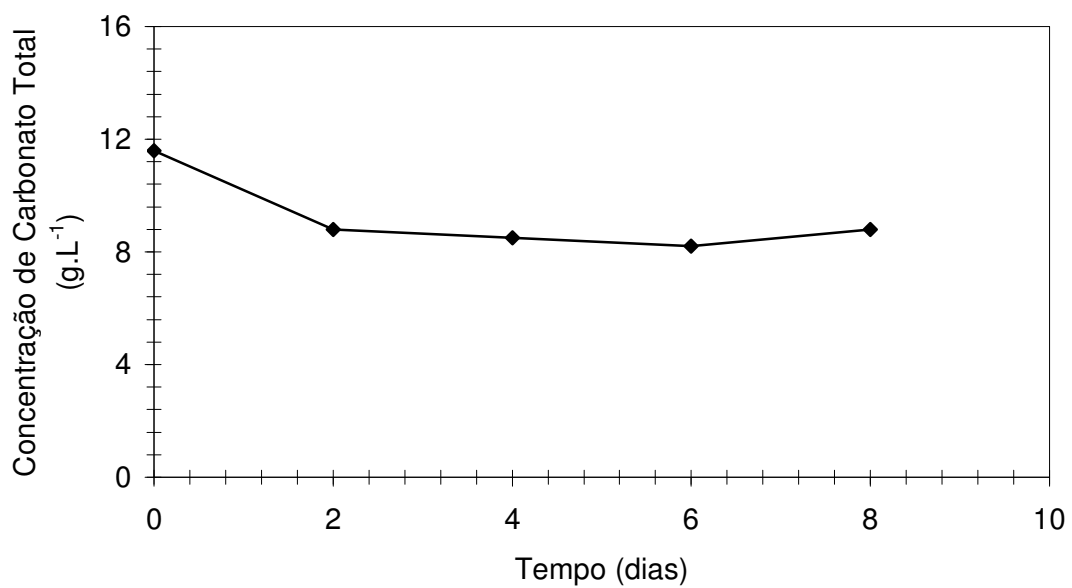


Figura 33. Concentração de carbonato total, em função do tempo, referente ao ensaio 11 ($240 \mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de amônio e adição parabólica II ($Y = 2,218 + 4,59x - 0,555x^2$)).

Ensaio 12

Tabela 20 – Concentração celular, carbonato total e amônia em função do tempo no ensaio 12 ($240 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o di\u00e1ria de 3mM).

Tempo (dias)	Concentra\u00e7\u00e3o celular (mg.L^{-1})	Carbonato total (g.L^{-1})	Concentra\u00e7\u00e3o de am\u00f4nia (mol.L^{-1})
0	400	11,6	0
1	865	-	$1,6.10^{-3}$
2	1867	8,2	$1,2.10^{-6}$
3	3359	-	$1,1.10^{-5}$
4	4305	9,4	$6,1.10^{-6}$
5	5800	-	$1,2.10^{-6}$
6	7104	9,4	$5,6.10^{-7}$
7	7386	-	$6,9.10^{-5}$
8	7825	8,5	$1,6.10^{-5}$
9	7315	-	$1,7.10^{-4}$

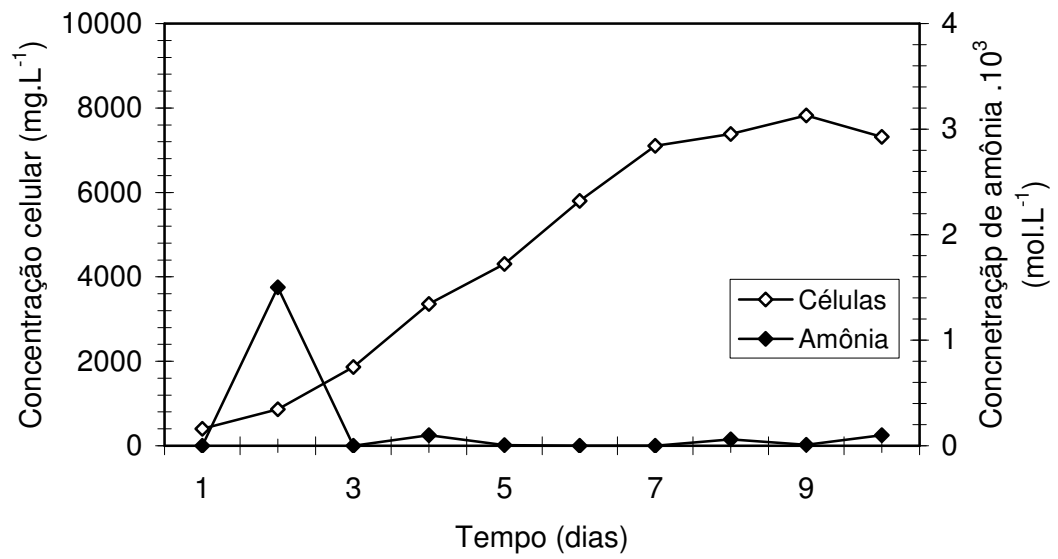


Figura 34. Concentração celular e concentração de amônia, em função do tempo, referentes ao ensaio 12 ($240 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o di\u00e1ria de 3mM).

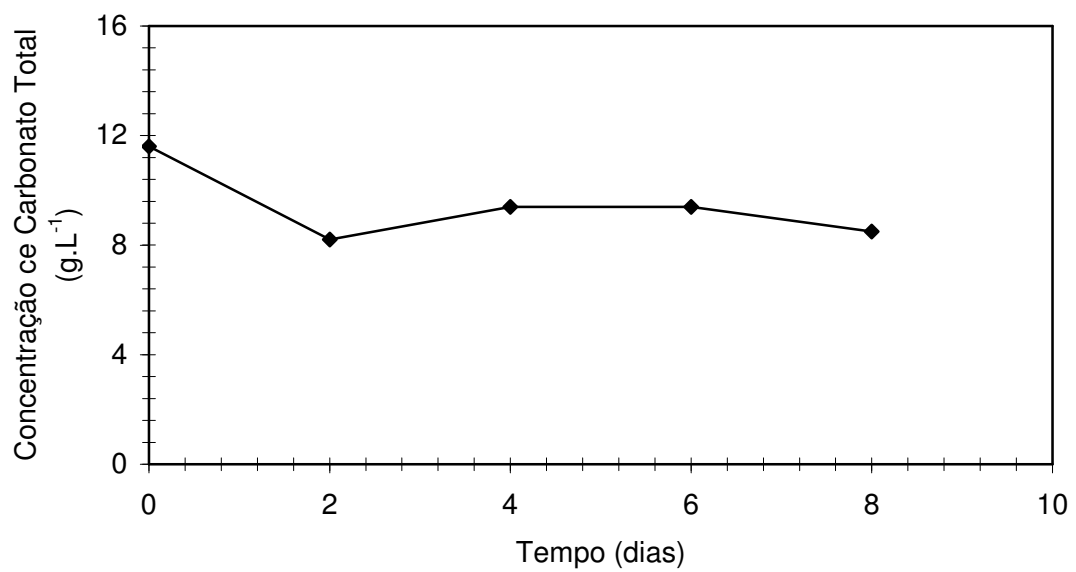


Figura 35. Concentração de carbonato total, em função do tempo, referente ao ensaio 12 ($240 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sulfato de am\u00f4nio e adi\u00e7\u00e3o di\u00e1ria de 3mM).

As concentrações celulares máximas, as respectivas produtividades e os fatores de conversão de nitrogênio em células estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 – Concentração celular máxima, produtividades e fatores de conversão de nitrogênio em células para os ensaios 1 a 12.

Ensaio	X_m (mg.L ⁻¹)	P_x (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)	$Y_{X/N}$ (mg.mg ⁻¹)
1	9160	796	7,3
2	2839	348	2,9
3	7942	838	13,0
4	7812	674	19,6
5	14650	1295	9,0
6	1227	276	1,3
7	14100	1245	13,7
8	12600	1109	26,4
9	14230	1537	9,2
10	10300	1414	6,9
11	12200	1686	11,7
12	7825	928	19,6

A curva de crescimento de *A. platensis* se apresentou de forma semelhante nos ensaios realizados. A fase lag (fase de adaptação) não foi observada, pois a composição do meio de cultura do fotobiorreator tubular é semelhante a do preparo de inóculo. Além disso, o crescimento do inóculo tem duração de 6 a 8 dias (PELIZER *et al.*, 2003), a fim de que sejam obtidas células jovens e ativas para servir como inóculo nos ensaios, propiciando o crescimento de forma exponencial desde o início destes. Mesmo nos cultivos utilizando sulfato de amônio como fonte

de nitrogênio não ocorreu fase lag, mostrando que não foi necessário nenhum tempo para que ocorresse adaptação devido a mudança de nutriente. A ausência de fase lag nos cultivos com sulfato de amônio já era esperada, pois, como verificou BOUSSIBA (1989), a amônia é a fonte de nitrogênio preferencial da *A. platensis*.

A fase estacionária pode ter sido atingida por diversos motivos, como esgotamento de algum nutriente, excreção de metabólitos tóxicos, acúmulo de matéria orgânica devido a decomposição e morte celular (BELAY, 1997), além de limitação da intensidade luminosa devido ao efeito de sombreamento causado pela elevada concentração celular (RICHMOND e QIANG, 1997).

Em todos os ensaios, o valor inicial de pH foi 9,5, e diariamente seu valor, que aumentou devido ao crescimento celular, foi controlado com CO₂ para que o crescimento celular não sofresse interferência deste parâmetro (CONVERTI *et al.*, 2006).

O aumento do pH com o crescimento celular de cianobactéria pode ser explicado pelo consumo da fonte de carbono. Este nutriente é assimilado preferencialmente na forma de bicarbonato (MILLER e COLMAN, 1980), e o pH ideal de cultivo é aquele em que favoreça a formação do nutriente citado.

Os íons bicarbonato são transportados de forma ativa para o interior das células onde são convertidos em carbonato e gás carbônico. O primeiro é eliminado para o meio extracelular e o segundo é utilizado na fotossíntese (Figura 36). Ao se adicionar CO₂ no meio de cultivo, a proporção entre bicarbonato e carbonato pode ser controlada, de forma a reduzir seu pH.

Figura 36. Esquema para representar a assimilação de bicarbonato por cianobactéria.

Fonte: MILLER e COLMAN, 1980, adaptado por RANGEL-YAGUI, *et al.* (2004).

Segundo Azov (1982), quando o pH atinge aproximadamente 11,0 a concentração celular tende a se estabilizar ou decrescer, devido provavelmente à pequena concentração de bicarbonato no meio de cultivo que é a forma preferencial de absorção pelas células.

A faixa de pH adequada para o crescimento desta cianobactéria é de 9,0 a 10,0 (SANCHEZ-LUNA *et al.*, 2007), e assim é possível explicar a necessidade de controle de pH em todos os ensaios realizados neste trabalho.

Como esperado, a concentração de carbonato total foi praticamente constante em todos os ensaios, em decorrência da correção diária do pH com uso de CO₂.

O nitrogênio é um nutriente fundamental para o metabolismo do microrganismo por ser constituinte de proteínas celulares, alguns lipídios e ácidos nucléicos.

A utilização de nitratos como fonte de nitrogênio é convencional (SCHOLÖSSER, 1982; PAOLLETI *et al.*, 1975). No entanto, vários trabalhos têm demonstrado a substituição destas fontes convencionais por fontes alternativas como cloreto de amônio, uréia e sulfato de amônio (SASSANO *et al.*, 2007; DANESI *et al.*, 2002; SOLETTTO *et al.*, 2005), devido à procura por fontes de nitrogênio de menor custo. Na Tabela 22 pode ser visto o custo do nitrogênio a partir das fontes avaliadas neste trabalho. Isto explica a importância de um estudo utilizando sulfato de amônio em meios de cultivo de *A. platensis*.

Tabela 22 – Custo do nitrogênio das fontes utilizadas: nitrato de sódio e sulfato de amônio

Fonte de nitrogênio	grau	Preço por Quilograma	Preço por Quilograma de nitrogênio (R\$)*
NaNO ₃	analítico	42,00	255,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	analítico	21,00	99,05

* 1 dólar = 1,68 reais

A fonte de nitrogênio alternativa utilizada neste trabalho, em solução alcalina, forma amônia, a qual apresenta desvantagens como ser tóxica e volátil. Este último problema é resolvido neste projeto pelo uso de um reator tubular fechado, o que dificulta a evaporação da amônia e melhora o aproveitamento desta fonte de nitrogênio. E a toxicidade pode ser evitada se a concentração e forma de adição estiverem adequadas (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004), sendo neste trabalho utilizadas adições oito vezes ao dia, a fim de que não fossem atingidos valores inibitórios.

Os protocolos de adição das fontes de nitrogênio, de um modo geral, levaram a resultados distintos de crescimento celular. De fato, considerando os ensaios correspondentes à lei de adição de sulfato de amônio parabólica I, ocorreu uma antecipação da curva de crescimento, devido provavelmente à inibição por amônia,

pois a concentração deste nutriente chegou a níveis inibitórios (maiores que 10 mM) (BELKIN e BOUSSIBA, 1991; CARVALHO *et al.*, 2004) durante o cultivo. Isso decorreu, provavelmente, de um desacoplamento entre o fornecimento de nitrogênio e a demanda celular. Além disso, o nível inibitório foi atingido mais precocemente nos cultivos realizados com as menores intensidades luminosas (60 e 120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$), acentuando o desacoplamento entre o fornecimento e consumo de nitrogênio. Como consequência disso, o nível de amônia chegou a níveis tóxicos (>60 mM, ensaio 2) (CARVALHO *et al.*, 2004), levando à morte celular, verificada pela coloração amarela do meio de cultivo e quase ausência de células inteiras. De fato, nestes cultivos, os valores de X_m foram muito inferiores aos resultados dos demais protocolos de adição de nitrogênio. Desta forma, a lei de adição da fonte de nitrogênio parabólica I não foi considerada nas análises de variância.

Com relação à concentração celular máxima (X_m), pela análise de variância sem a inclusão da lei de adição parabólica I, conclui-se que esta variável foi dependente da intensidade luminosa ($p = 0,025$, Tabela 23). O efeito dos protocolos de adição foi menos evidente ($p = 0,118$, Tabela 23). De fato, a concentração celular máxima (X_m) dos ensaios com lei de adição parabólica II (Tabela 2) atingiu valores praticamente equivalentes aos seus respectivos ensaios padrão (Tabela 2), como se observa na Tabela 24. Por outro lado, esta mesma tabela a fim de que fosse possível melhor visualização de uma diferença das médias, foi feita análise estatística considerando intervalo de confiança de 85% para que fosse evidenciada a diferença do protocolo de adição constante de sulfato de amônio o qual não levou a resultados de X_m correspondentes aos ensaios padrão. Essas comparações das médias de X_m explicam o valor do nível descritivo obtido na análise de variância para a variável independente protocolo de adição de nitrogênio ($p = 0,118$). Assim, a lei

de adição de sulfato de amônio parabólica II seria a mais adequada para o cultivo de *A. platensis* nas condições experimentais estudadas neste trabalho, pois levou a resultados de X_m equivalentes aos cultivos padrão, em que se utilizou nitrato de sódio como fonte de nitrogênio.

Tabela 23 – Análise de variância para o parâmetro X_m em função dos protocolos de adição de nitrogênio e intensidades luminosas, com exceção dos ensaios realizados com lei de adição parabólica I.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	p
Protocolos de adição de nitrogênio	2	16287071	8143535	3,83	0,118
Intensidades luminosas	2	45303934	22651967	10,66	0,025
Erro	4	8498955	2124739		
Total	8	70089960			

Tabela 24 – Médias de concentração celular máxima para os ensaios realizados com nitrato de sódio e sulfato de amônio, exceto aqueles realizados com lei de adição parabólica I.

Protocolo de adição de nitrogênio	X_m média (mg.L ⁻¹)*
Nitrato (padrão)	12680 ^a
Parabólica II	11414 ^{a,b}
Constante	9412 ^b

*Médias com letras iguais não diferem entre si estatisticamente, considerando um intervalo de confiança de 85 %.

A utilização do sulfato de amônio pode levar a um ganho do ponto de vista energético quando comparada ao uso de sais de nitrato. O sulfato de amônio é

dissociado no meio de cultivo, dando origem à amônia que é a forma pronta para ser absorvida e aproveitada pelas células. Já os sais de nitrato são metabolizados pelos microrganismos, os quais reduzem o íon a nitrito, em uma reação catalisada pela enzima nitrato redutase e, em seguida à amônia, em uma reação catalisada pela enzima nitrito redutase para posteriormente ser absorvida. Esta reação de redução de nitrito a amônia envolve gastos energéticos (HATTORI e MYERS, 1966) (Figura 37).

Figura 37. Esquema da assimilação da amônia proveniente do sulfato de amônio e nitrato de sódio.

Fonte: HATTORI e MYERS (1966).

Ao avaliar o valor de concentração celular máxima é possível observar na literatura valores próximos aos obtidos neste trabalho, como $12,8 \text{ g.L}^{-1}$, com intensidade luminosa de $166 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, em reator tubular (SOLETTO *et al.*, 2007). Porém também são relatados valores de X_m inferiores a estes, como valores de $2,2 \text{ g.L}^{-1}$ em cultivos “*outdoor*” (MASOJ\u00cdDEK *et al.*, 2003) e m\u00e9dia de $3,2 \text{ g.L}^{-1}$ em

cultivos “indoor” (TREDICI e ZITTELLI, 1998), também para fotobiorreatores tubulares.

A intensidade luminosa de $240 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ levou a uma antecipação do tempo para obtenção de X_m (Figura 38). No entanto, nos ensaios realizados com esta intensidade luminosa, independentemente da fonte de nitrogênio utilizada, foram obtidos valores de concentração celular máxima equivalentes àqueles em que foram utilizadas intensidades luminosas de $120 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Tabela 25). Isto poderia ser decorrente do fato de que quando a concentração celular atinge valores da ordem de 12 a 14 g L^{-1} , haveria um intenso efeito de sombreamento, que não seria compensado pelo aumento do fornecimento de energia luminosa quando do uso da maior intensidade luminosa. Estas elevadas concentrações não permitem que a luz, ao atravessar o tubo, atinja todas as células que necessitam desta fonte de energia para se multiplicar (QIANG *et al.*, 1998). Também não pode ser descartado o efeito do acúmulo de produtos t\u00f3xicos de metabolismo, como relatado por Belay, (1997).

Figura 38. Concentração celular em função do tempo para os ensaios com nitrato (símbolos vazios – ensaios padrão) e sulfato de amônio (símbolos preenchidos – ensaios parabólica II) como fonte de nitrogênio. Os símbolos losango, círculo e triângulo representam, respectivamente, os ensaios com 240, 120 e 60 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$.

Tabela 25 – Médias de concentração celular máxima para os ensaios realizados com diferentes intensidades luminosas, exceto aqueles realizados com protocolo de adição parabólica I.

Intensidade luminosa ($\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$)	X_m média (mg.L^{-1})*
60	8304 ^a
120	13783 ^b
240	11418 ^b

*Médias com letras iguais não diferem entre si estatisticamente, considerando um intervalo de confiança de 95 %.

Por outro lado, em vez de avaliar somente as intensidades luminosas de 120 e 240 $\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$, ao observar os resultados médios de X_m nas três intensidades luminosas utilizadas neste trabalho, verificou-se que esta variável independente influenciou na resposta de X_m (Tabela 24). Isto pode ser observado

experimentalmente, pois houve uma queda da concentração celular máxima, nos ensaios realizados com intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figura 38), levando provavelmente à limitação do crescimento celular por falta de luz. Danesi *et al.* (2004) investigaram o efeito da redução da intensidade luminosa em cultivos de *Spirulina platensis*, e, da mesma forma, concluíram que a utilização de uma intensidade luminosa menor resultava em menor valor de concentração celular final, independente da fonte de nitrogênio utilizada (uréia ou nitrato de potássio).

Diferentes intensidades luminosas podem influenciar o crescimento de microrganismos fotossintetizantes, e, como visto anteriormente, de acordo com Jensen e Knutsen (1993) intensidades luminosas muito elevadas podem até causar efeitos de fotoinibição, que leva a um decréscimo da concentração celular máxima; ou, fotoxidação que tem efeitos letais sobre as células e podem levar a perda total da cultura. De fato, a luz é um recurso essencial que freqüentemente limita a distribuição e crescimento de *A. platensis* na natureza. É também o maior fator limitante da cianobactéria para fins comerciais, tanto que a elaboração de diferentes biorreatores tem como um dos objetivos aumentar a eficiência de captação de luz (PERNER-NOCHTA e POSTEN, 2007). Assim pode-se enfatizar a importância dos estudos com diferentes intensidades luminosas, já que esta é a fonte de energia utilizada pelos microrganismos fotossintetizantes. Por este motivo, diferentes intensidades luminosas têm sido utilizadas para estudos de cultivo de *Spirulina sp.*, com valores da ordem de 20 até $2500 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ em reatores de diferentes configurações e volumes (DANESI *et al.*, 2004; SOLETTTO *et al.*, 2007; OLGUÍN *et al.*, 1997; QIANG *et al.*, 1998).

A diferença entre as médias de X_m com intervalo de confiança de 85 % não evidenciou claramente a vantagem da lei de adição parabólica II em relação à lei de

adição constante (Tabela 24). Entretanto, ao avaliar a composição da biomassa seca da *A. platensis* (Tabela 26) observou-se um valor de $p = 0,008$ (Tabela 27) para o teor de proteínas em função dos diferentes protocolos de adição, o que comprovou a real interferência destes diferentes protocolos. E como se observa na Tabela 28, realmente, a lei de adição de sulfato de amônio parabólica II, por apresentar médias mais elevadas de teor de proteínas, é considerada melhor que a adição constante. Os valores de teores de proteínas obtidos são da mesma ordem de grandeza daqueles obtidos por Bezerra (2006) em cultivos em tanques abertos. Como se observa, os valores de teores de proteínas equivalentes para os ensaios realizados com o protocolo II de alimentação de sulfato de amônio e nitrato indicam que nos primeiros não houve limitação da fonte de nitrogênio.

Tabela 26 – Porcentagem de lipídios e proteínas obtidas na biomassa seca

Ensaio	Intensidade luminosa ($\mu\text{mol f\acute{o}tons. m}^{-2}.s^{-1}$)	Protocolo de adi\c{c}o de nitrog\ênio	Lip\cdios (%)	Prote\cdnas (%)
1	60	NaNO ₃	8,5	35,8
2	60	(NH ₄) ₂ SO ₄ parab\cdlica I	-	-
3	60	(NH ₄) ₂ SO ₄ parab\cdlica II	10,7	36,4
4	60	(NH ₄) ₂ SO ₄ constante	8,3	26,5
5	120	NaNO ₃	10,1	36,1
6	120	(NH ₄) ₂ SO ₄ parab\cdlica I	-	-
7	120	(NH ₄) ₂ SO ₄ parab\cdlica II	8,6	33,7
8	120	(NH ₄) ₂ SO ₄ constante	8,2	27,7
9	240	NaNO ₃	11,4	34,5
10	240	(NH ₄) ₂ SO ₄ parab\cdlica I	14,8	38
11	240	(NH ₄) ₂ SO ₄ parab\cdlica II	8,3	36,8
12	240	(NH ₄) ₂ SO ₄ constante	6,8	28

Tabela 27 – An\cdlise de vari\cdncia para teor de prote\cdnas na biomassa seca em fun\c{c}o dos protocolos de adi\c{c}o de nitrog\ênio e intensidades luminosas, com exce\c{c}o dos ensaios realizados com lei de adi\c{c}o parab\cdlica I.

Fonte de varia\c{c}o	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado m\cddio	F	p
Protocolos de adi\c{c}o de nitrog\ênio	2	126,487	63,2433	20,54	0,008
Intensidades luminosas	2	1,68	0,84	0,27	0,774
Erro	4	12,313	3,0783		
Total	8	140,48			

Tabela 28 – Média dos teores de proteínas na biomassa seca para os ensaios realizados com diferentes protocolos de adição de nitrogênio, exceto aqueles realizados com protocolo de adição parabólica I.

Lei de adição de nitrogênio	Teor de proteína média (%)*
Nitrato (padrão)	35,5 ^a
Parabólica II	35,2 ^a
Constante	27,4 ^b

*Médias com letras iguais não diferem entre si estatisticamente, considerando um intervalo de confiança de 95 %.

As cianobactérias, geralmente, apresentam pequenas quantidades de lipídios no interior celular, de cerca de 6 a 13 %, sendo metade destas porcentagens formada de ácidos graxos (COHEN, 1997). Dentre eles está em evidência o ácido gama linolênico que é um ácido graxo poliinsaturado essencial presente em *A. platensis* numa concentração maior que em outras espécies do reino vegetal (DILLON *et al.*, 1995).

O teor de lipídios em biomassas de cianobactérias pode sofrer influência de temperatura, intensidades luminosas, concentração celular e fonte de nitrogênio (COHEN, 1997). Neste trabalho o teor de lipídios não sofreu influência de nenhuma das variáveis estudadas (Tabela 29). Resultados semelhantes foram obtidos por Danesi *et al.* (2004), que obtiveram resultados de porcentagem de lipídios em biomassas de *A. platensis* em média de 15 %, e observaram que estas porcentagens não foram influenciadas pelas variáveis intensidade luminosa (24 a 60 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e fonte de nitrogênio (ur\u00e9ia e nitrato de pot\u00e1ssio). Por outro lado, Bezerra (2006) que avaliou a porcentagem de lip\u00eddios em cultivos de *A. platensis* verificou que a intensidade luminosa e teor de lip\u00eddios s\u00e3o inversamente

proporcionais. As diferenças entre estes resultados poderiam ser decorrentes do fato que em cultivos em tanques abertos com sal amoniacal, como os realizados por Bezerra (2006), com aumento da intensidade luminosa também pode levar a uma carência acentuada da fonte de nitrogênio amoniacal com conseqüente diminuição do teor de lipídios da biomassa, como observado por Sassano (2004). No presente trabalho, somente se verificou uma tendência de diminuição do teor de lipídios da biomassa no ensaio 12 (Tabela 26), que corresponde ao ensaio com maior intensidade luminosa e menor fornecimento de nitrogênio. Estas considerações, associadas àquelas referentes ao teor de proteínas da biomassa, podem indicar que a carência de nitrogênio no decorrer do cultivo é mais importante no teor de proteínas da biomassa que no teor de lipídios.

Tabela 29 - Análise de variância para teor de lipídios na biomassa seca em função dos protocolos de adição de nitrogênio e intensidades luminosas, com exceção dos ensaios com lei de adição parabólica I.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	p
Protocolos de adição de nitrogênio	2	7,6822	3,84111	1,73	0,287
Intensidades luminosas	2	0,1689	0,08444	0,04	0,963
Erro	4	8,8778	2,21944		
Total	8	16,7289			

Anteriormente, ao comparar os ensaios com 120 e 240 $\mu\text{mol f\acute{o}tons. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (7 e 11) com seus respectivos ensaios padr\~ao n\~ao verificou-se influ\~encia de nenhuma das vari\~aveis independentes para a vari\~avel dependente X_m . Entretanto, ao avaliar o par\~ametro cin\~etico P_x foi poss\~ivel observar grande influ\~encia da intensidade

luminosa ($p = 0,033$ – Tabela 30), decorrente da antecipação para obtenção da concentração celular máxima com o aumento da intensidade luminosa. Isso pode ser observado comparando-se os ensaios 5 e 9, em que com o aumento da intensidade luminosa de 120 e 240 $\mu\text{mol f\u00f3tons. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ houve uma diminui\u00e7\u00e3o de 2 dias no tempo de cultivo, decorrente do aumento da velocidade de crescimento celular.

As produtividades dos ensaios, em que n\u00e3o foram observados efeitos t\u00f3xicos da am\u00f4nia, foram elevadas quando comparadas com aquelas em que se cultivaram *A. platensis* em reatores abertos (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004; DANESI *et al.*, 2004 ; SANCHEZ-LUNA *et al.*, 2007 ; SANCHEZ-LUNA *et al.*, 2004), confirmando os resultados de Converti *et al.* (2006).

O reator tubular, como j\u00e1 visto no item 3.4, possui diversas vantagens quando comparado com reatores abertos, e uma delas \u00e9 o aumento da produtividade em c\u00e9lulas, devido a capacidade de obten\u00e7\u00e3o de maiores concentra\u00e7\u00f5es celulares pelo maior aproveitamento da luz. Assim, Converti *et al.* (2006) confirmaram a vantagem de aumento de produtividade com resultados de produtividade di\u00e1ria de 0,29 $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ em cultivos com intensidade luminosa de 55 $\mu\text{mol f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para reator tubular, e 0,06 $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ para tanques abertos, na mesma intensidade luminosa.

Masojidek *et al.* (2003), realizaram cultivos com *Arthrospira platensis* em fotobiorreator tubular com volume de trabalho de 65 litros utilizando energia solar, e obtiveram resultados de P_x igual a 0,5 $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ enquanto que Tredici e Zittelli (1998) obtiveram valores de aproximadamente 0,9 $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. Entretanto, tamb\u00e9m s\u00e3o relatados valores maiores de P_x , chegando at\u00e9 2,3 $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ para fotobiorreatores tubulares e utiliza\u00e7\u00e3o de energia solar (CARLOZZI e PINZANI, 2005).

Neste trabalho, ao verificar o efeito da utilização de diferentes protocolos de alimentação de nitrogênio, pode-se dizer que esta variável independente praticamente não influenciou a resposta de produtividade em células ($p = 0,145$ - Tabela 30); isto mostra, novamente, a possibilidade do uso da fonte alternativa de nitrogênio.

Tabela 30 - Análise de variância para o parâmetro P_x em função dos protocolos de adição de nitrogênio e intensidades luminosas, com exceção dos ensaios com lei de adição parabólica I.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	p
Protocolos de adição de nitrogênio	2	220015	110007	3,25	0,145
Intensidades luminosas	2	605215	302607	8,93	0,033
Erro	4	135579	33895		
Total	8	960809			

O fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) para os ensaios 2 e 6, que encerraram em poucos dias devido a toxicidade da amônia, foi baixo, uma vez que este é calculado pela razão entre a concentração celular formada e quantidade de nitrogênio total adicionada. A inibição por amônia limitou o crescimento celular, com conseqüente diminuição de $Y_{X/N}$. Nos ensaios de 1 a 12, os valores da variável dependente $Y_{X/N}$, apresentados na Tabela 21, mostram que quanto maior a quantidade de nitrogênio adicionada menor o valor de $Y_{X/N}$. Isto é confirmado pela análise de variância ($p = 0,003$, Tabela 31) e pelos valores das médias de $Y_{X/N}$, apresentados na Tabela 32, referentes aos protocolos de adição de nitrogênio. Nos ensaios em que foi aplicado protocolo de adição de nitrogênio constante observou-

se médias bem maiores que os outros protocolos de alimentação. Isto ocorreu devido à adição de baixas quantidades de nitrogênio neste grupo de experimentos.

De uma forma geral, nos ensaios em que se utilizou sulfato de amônio e que não houve inibição por excesso amônia (3, 4, 7, 8, 11 e 12), o fator de conversão de nitrogênio em células foi elevado quando comparado com trabalhos realizados em reatores abertos ou frascos Erlenmeyers com diferentes fontes de nitrogênio, sejam nitratos (DANESI *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2004), sais da amônio (CARVALHO *et al.*, 2004) ou uréia (DANESI *et al.*, 2002; RANGEL - YAGUI *et al.*, 2004), com valores máximos da ordem de 3,1, 7,4 e 8,5 mg.mg⁻¹, respectivamente.

O aumento dos fatores de conversão para fonte amoniacal com o uso dos reatores tubulares já era esperado, pois esta fonte de nitrogênio leva à presença de amônia no meio de cultivo. Por se tratar de um reator considerado fechado, há uma pequena área de líquido exposta, diminuindo assim a perda de amônia por evaporação.

Tabela 31 – Análise de Variância do parâmetro $Y_{X/N}$ em função dos protocolos de adição de nitrogênio e intensidades luminosas, com exceção dos ensaios com lei de adição parabólica I.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	p
Protocolos de adição de nitrogênio	2	279,362	139,681	32,1	0,003
Intensidades luminosas	2	17,662	8,831	2,03	0,246
Erro	4	17,404	4,351		
Total	8	314,429			

Tabela 32 – Médias do parâmetro $Y_{X/N}$ para os ensaios realizados com diferentes protocolos de adição de nitrogênio, exceto aqueles realizados com protocolo de adição parabólica I.

Lei de adição de nitrogênio	$Y_{X/N}$ médio (mg.mg⁻¹)*
Nitrato (padrão)	8,5 ^a
Parabólica II	12,8 ^a
Constante	21,9 ^b

*Médias com letras iguais não diferem entre si estatisticamente, considerando um intervalo de confiança de 95 %.

6. CONCLUSÕES

De acordo com o objetivo deste trabalho que foi cultivar *A. platensis* em fotobiorreator tubular e avaliar os parâmetros concentração celular máxima, produtividade em células e fator de conversão de nitrogênio em células, em relação às variáveis intensidade luminosa e diferentes formas de alimentação de nitrogênio, pode-se concluir que:

- Adições de sulfato de amônio considerando uma demanda de nitrogênio baseada em experimento prévio com nitrato de sódio como fonte de nitrogênio e células com teores de nitrogênio de 10% levaram, de uma maneira geral, a resultados insatisfatórios, com morte celular ou inibição de crescimento devido a acúmulo de amônia no meio;
- Os cultivos em reatores fechados levaram a resultados de fatores de conversão de nitrogênio em células bastante altos, chegando a valores superiores a 10 mg.mg^{-1} ;
- O teor de proteínas na biomassa seca não foi afetado pela intensidade luminosa e apresentou valores médios da ordem de 35 % nos cultivos realizados com nitrato de sódio e sulfato de amônio com lei de adição parabólica II. Foi de 27,4 % nos ensaios com adição diária de 3 mM de sulfato de amônio;
- Nas condições estudadas, a intensidade luminosa de $240 \mu\text{mol fótons. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e lei de adição de sulfato de amônio parabólica II levaram a melhor combinação de obtenção de X_M e P_X , com valores finais de 12200 mg.L^{-1} e $1686 \text{ mg.L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente e também elevado valor de $Y_{X/N}$ de $11,7 \text{ mg.mg}^{-1}$

- A lei de adição de sulfato de amônio parabólica II levou a resultados equivalentes aos cultivos realizados com nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, evidenciando assim, a possibilidade do uso do sulfato de amônio como uma fonte alternativa para o cultivo de *Arthrospira (Spirulina) platensis* em reator tubular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

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

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

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

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

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

BEZERRA, R. P. **Influência do tempo de alimentação e da intensidade luminosa no cultivo de *Spirulina platensis* sob alimentação com cloreto de amônio**. São Paulo, 2006, 153 p. Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. C-phycoyanin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 275, n. 1, p. 20-25, 2000.

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

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

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

BOUSSIBA, S.; RICHMOND, A. C-Phycocyanin as a storage protein in blue-green algae. **Archives of Microbiology**, v.125, p.143-147, 1980.

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

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

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

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

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

CARVALHO, J. C. M.; VITOLO, M.; SATO, S.; AQUARONE, E. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* grown in sugarcane blackstrap molasses through a fed-batch process: optimization by response surface methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 110, p. 151-164, 2003.

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

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

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

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

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

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

CORNET, J. F.; DUSSAP, C. G.; GROS, J. B. Kinetics and energetics of photosynthetic micro-organisms in photobioreactors. Application to *Spirulina* growth. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, v. 59, p. 155-94, 1998.

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

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. **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.

DIC – Spirulina. **Dainippon Ink and Chemicals, Incorporated**. Disponível em: <http://www.dic.co.jp/eng/products/lina/index.html>. Acesso em 22 de Fevereiro de 2008.

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

ECHEGARAY, F. O.; CARVALHO, J.; FERNANDES, A.; SATO, S.; AQUARONE E.; VITTOLO, M. Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugarcane blackstrap molasses: invertase activity of intact cells in ethanol fermentation, **Biomass and Bioenergy**, n. 19, p. 39–50, 2000.

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

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

HIRATA, T.; TANAKA, M.; OOIKE, M.; TSUNOMURA, T.; SAKAGUCHI, M. Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, p. 435 – 439, 2000.

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

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

KENNEDY, M. J.; READER, S. L.; DAVIES, R. J. Fatty acid production characteristics of fungi with particular emphasis on gamma linolenic acid production. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, p. 625-624, 1993.

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

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

LEE, B.; KIM, J. K. Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. **Aquacultural Engineering**, v. 25, n. 2,0 p. 111-124, 2001.

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

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

MASOJÍDEK, J.; PAPÁČEK, Š.; SERGEJEVOVÁ, M.; JIRKA, V.; CERVENÝ, J.; KUNC, J.; KORECKO, J.; VERBOVIKOVA, O.; KOPECKÝ, J. ŠTYS, D.; TORZILLO, G. A closed solar photobioreactor for cultivation of microalgae under supra-high irradiance: basic design and performance. **Journal of Applied Phycology**, v.15, p. 239–248, 2003.

MILLER, A. G.; COLMAN, G. Evidence for HCO_3^- transport by the blue green alga (cyanobacterium) *Coccochloris penicocystis*. **Plant Physiology**, v. 65, p. 397-402, 1980.

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.

NETER, J.; WASSERMAN, W. **Applied Linear Statistical Models**. Illinois: Richard D. Irwin, 1974.

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

PANIAGUA-MICHEL, J.; DUJARDIN, E.; SIRONVAL, C. CRONICA AZTECA: El *tecuitlatl*, concentrado de algas espirulinas fuente de proteínas comestibles del pueblo de los Aztecas. Traduzido por Angélica López de LEROUX, **Cahiers Agricultures**, v.2, p.283-287, 1993.

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

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

PELIZER, L. H.; 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 Farmácia Química**, v.32, n. 1, p. 37-40, 1999.

PERNER-NOCHTA, I.; POSTEN, C. Simulations of light intensity variation in photobioreactors. **Journal of Biotechnology**, v. 131, p. 276 – 285, 2007.

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

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 65, p. 635–648, 2004.

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.

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

RANGEL, C. O. **Influência da luz e uréia no crescimento e conteúdo de clorofila da biomassa de *Spirulina platensis***. São Paulo, 2000, 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-bach process. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 133-141, 2004.

RICHMOND, A. *Spirulina*. In: BOROWITZKA, M.A., BOROWITZKA, L. J. **Microalgal Biotechnology**. Cambridge University Press, 1988.

RICHMOND, A.; QIANG, H. Principles for efficient utilization of light for mass production of photoautotrophic microorganisms. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 63/65, p. 649–658, 1997.

SAMUELSON, 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, M.; BERNAL-CASTILLO, J.; ROZO, C.; RODRÍGUEZ, I. *Spirulina (Athrospira)*: An edible microorganism. A Review. **Revista de la Facultad de Ciências**, v.8, n.1, 2003.

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

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.

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. **Influência da uréia no crescimento e no teor do ácido graxo γ -linolênico da biomassa de *Spirulina platensis***. São Paulo, 1999, 144p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

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

SASSI, A. H.; FAUVART, L.; DESCHAMPS, A. M.; LEBEAULT, J.M. Fed-batch production of L-lisine by *Corynebacterium glutamicum*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 1 p. 85-90, 1998.

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

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

SILVEIRA, S. T.; BURKERT, J. F. M.; COSTA, J. A. V.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bioresource Technology**, v.98, n.8, p.1629-1634, 2007.

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

SOLETTA, 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.

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

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

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

SUN, L.; WANG, S.; QIAO, Z. Chemical stabilization of the Phycocyanin from cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Biotechnology**, v. 121, p. 563-569, 2006.

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

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

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

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

VARGA, L.; SZIGETI, J.; KOVA, 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.

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

VONSHAK, A. *Spirulina*: Growth, Physiology and Biochemistry. In: VONSHAK, A., ed. **Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor and Francis, p. 43-66, 1997.

VONSHAK, A.; BOUSSIBA, S.; ABELIOVICH, A.; RICHMOND, A. Production of *Spirulina* Biomass: maintenance of monoalgal culture outdoors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 2, p. 341-9, 1983.

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

WALACH, M. R.; BAZIN, M. J.; PIRT, S. J.; BALYUZI, H. H. M. Computer control of carbon-nitrogen-ratio in *S. platensis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 29, p. 520-8, 1987.

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

WIJFFLES, R. H. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 1, 2008.

XIE, L.; WANG, D. L. C. Fed-batch cultivation of animal cell using different medium design concepts and feeding strategies. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, n. 11, p. 1175-89, 1994.

ZARROUK, C. **Contribution a l'étude d'une cyanophycee influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance e photosynthese de *Spirulina maxima***. Universite de Paris, Paris, France, p. 4–5, 1966.