

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS**

**CULTIVOS AUTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO DE *Spirulina platensis* EM
DIFERENTES ESCALAS E CONDIÇÕES AMBIENTAIS NO EXTREMO SUL DO
BRASIL**

MICHELE DA ROSA ANDRADE

Dissertação apresentada para
a obtenção do título de Mestre
em Engenharia e Ciência de
Alimentos na sub-área de
Bioprocessos em Alimentos

**Prof. Dr. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA
Orientador**

RIO GRANDE, RS
2005

O ponto, que ontem era invisível, é hoje o ponto de chegada. Amanhã terá sido o de partida...

Macaulay

Dedico este trabalho aos meus irmãos Willian da Rosa Andrade, Marina da Rosa Castanheira e Gabriel da Rocha Andrade.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Jorge Alberto Vieira Costa (“Óri”)

Um agradecimento especial por tudo o que me ensinou e continua ensinando, pelo exemplo de profissional e de pessoa que é para mim.

A meus pais Carlos e Julia

Agradeço por tudo, principalmente pelos princípios e valores que me ensinaram e por entenderem tantas ausências.

Aos meus muito mais que amigos Bira e Laura

Pela força que me passam e pela disposição para me ajudar sempre.

Aos bolsistas Adriano Arruda, Elisangela Radmann, Luzia Goldbeck, Marta Pinto e Vanessa Cerqueira

Agradeço pela grande contribuição ao trabalho, e pela experiência pessoal que me proporcionaram.

Aos professores do programa de pós-graduação

Pelos conhecimentos passados, e, em especial, aos professores Tabajara Lucas Almeida, Eliana Badiale Furlong e Janaína Burkert.

Ao Governo Federal representado pela CAPES

Pela bolsa de estudos.

Ao Roque e colegas do LEB

Agradeço pela convivência que torna cada dia de trabalho mais agradável, em especial à Michele Morais.

Aos funcionários e técnicos da FURG

Que não estiveram diretamente ligados ao trabalho, mas contribuem indo além no cumprimento de suas funções.

Aos amigos

Que me ouviram, perdoaram algumas ausências e continuam vibrando com minhas vitórias.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
ANEXOS.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 <i>Objetivo Geral</i>	3
2.2 <i>Objetivos Específicos</i>	3
3 JUSTIFICATIVA.....	4
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
4.1 <i>Microalgas e Cianobactérias</i>	11
4.2 <i>Cianobactéria Spirulina</i>	12
4.2.1 <i>Composição</i>	13
4.2.2 <i>Efeitos Terapêuticos da Spirulina</i>	15
4.3 <i>Fotossíntese</i>	16
4.4 <i>Nutrientes para o Crescimento da Spirulina</i>	17
4.5 <i>Aspectos Bioquímicos do Cultivo Mixotrófico</i>	19
4.6 <i>Temperatura nos Cultivos de Microalgas</i>	21
4.7 <i>Iluminância nos Cultivos de Microalgas</i>	22
4.8 <i>Fotobiorreatores para Produção de Spirulina</i>	24
4.9 <i>Agitação nos Cultivos de Microalgas</i>	25
4.10 <i>Cultivo Mixotrófico de Outras Microalgas</i>	26
5 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	28
5.1 CULTIVO DA MICROALGA <i>Spirulina platensis</i> EM PEQUENA ESCALA E DIFERENTES CONDIÇÕES AMBIENTAIS	29
RESUMO.....	30
ABSTRACT.....	30
1 INTRODUÇÃO.....	31
2 MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1 <i>Microorganismo e Meio de Cultivo</i>	32

2.2 Fotobiorreatores	32
2.3 Condições de Cultivo	32
2.4 Planejamento Experimental	33
2.5 Respostas Estudadas e Análise Estatística	33
2.6 Determinações Analíticas	34
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
3.1 Cultivos em Condições Controladas.....	34
3.2 Cultivos em Condições não Controladas (túnel).....	37
4 CONCLUSÕES.....	45
5 REFERÊNCIAS.....	45
5.2 CULTIVOS AUTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO DA MICROALGA <i>Spirulina platensis</i> EM ESCALA PILOTO NO SUL DO BRASIL.....	49
<i>RESUMO.....</i>	<i>50</i>
<i>ABSTRACT.....</i>	<i>50</i>
<i>1 INTRODUÇÃO.....</i>	<i>51</i>
<i>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</i>	<i>52</i>
2.1 Microrganismo	52
2.2 Meio de Cultivo.....	52
2.3 Condições de Cultivo	53
2.4 Planejamento Experimental	54
2.5 Respostas Estudadas e Análise Estatística	54
2.6 Determinações Analíticas	55
<i>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</i>	<i>55</i>
3.1 Cultivos sob Condições Controladas.....	55
3.2 Cultivos sob Condições não Controladas	56
<i>4 CONCLUSÕES.....</i>	<i>66</i>
<i>5 REFERÊNCIAS.....</i>	<i>66</i>
5.3 CULTIVO MIXOTRÓFICO DA MICROALGA <i>Spirulina platensis</i> UTILIZANDO MELAÇO COMO SUBSTRATO ORGÂNICO.....	70
<i>RESUMO.....</i>	<i>71</i>
<i>ABSTRACT.....</i>	<i>71</i>
<i>1 INTRODUÇÃO.....</i>	<i>73</i>
<i>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</i>	<i>74</i>
2.1 Microrganismo e Meio de Cultivo	74
2.2 Fotobiorreatores e Condições de Cultivo.....	74
2.3 Planejamento Experimental	75
2.4 Respostas Estudadas e Análise Estatística	75
2.5 Determinações Analíticas	76
<i>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</i>	<i>76</i>
<i>4 CONCLUSÕES.....</i>	<i>84</i>
<i>5 REFERÊNCIAS.....</i>	<i>85</i>

6 CONCLUSÕES GERAIS	89
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	91
8 ANEXOS.....	92
<i>ANEXO 1 Acompanhamento da concentração celular de Spirulina platensis nos cultivos....</i>	<i>93</i>
<i>ANEXO 2 Fotografias dos experimentos</i>	<i>99</i>
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Micrografia da cianobactéria <i>Spirulina</i>	12
Figura 2 Via metabólica central do metabolismo energético de microalgas.....	20

CULTIVO DA MICROALGA *Spirulina platensis* EM PEQUENA ESCALA E DIFERENTES CONDIÇÕES AMBIENTAIS

Figura 1 Crescimento da microalga <i>Spirulina platensis</i> em fotobiorreatores fechados	36
Figura 2 Produtividade da microalga <i>Spirulina platensis</i> em fotobiorreatores fechados	38
Figura 3 Crescimento da microalga <i>Spirulina platensis</i> em fotobiorreatores abertos..	40
Figura 4 Produtividade da microalga <i>Spirulina platensis</i> em fotobiorreatores abertos	42
Figura 5 Temperaturas máximas e mínimas ambientes nos cultivos sob condições não controladas (maio – junho/2004).	44

CULTIVOS AUTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO DA MICROALGA *Spirulina platensis* EM ESCALA PILOTO NO SUL DO BRASIL

Figura 1 Esquema dos fotobiorreatores tipo <i>raceway</i> utilizados para o cultivo de <i>Spirulina platensis</i>	53
Figura 2 Crescimento da microalga <i>Spirulina platensis</i> em condições controladas.	56
Figura 3 Crescimento da microalga <i>Spirulina platensis</i> em condições não controladas.	58
Figura 4 Temperaturas máximas e mínimas ambientes nos cultivos sob condições não controladas	59
Figura 5 Produtividade da microalga <i>Spirulina platensis</i>	62
Figura 6 Produtividade em função da concentração celular da microalga <i>Spirulina platensis</i>	62

CULTIVO MIXOTRÓFICO DA MICROALGA *Spirulina platensis* UTILIZANDO MELAÇO COMO SUBSTRATO ORGÂNICO

Figura 1 Crescimento da microalga <i>Spirulina platensis</i>	79
Figura 2 Produtividade da microalga <i>Spirulina platensis</i>	81
Figura 3 Velocidade específica máxima de crescimento durante a primeira tendência ($\mu_{m\acute{a}x\ 1}$) e segunda tendência do crescimento ($\mu_{m\acute{a}x\ 2}$)	82

ANEXOS

Figura A1 Cultivo em fotobiorreatores fechados em condições controladas.....	100
Figura A2 Cultivo em fotobiorreatores fechados em condições não controladas.....	100
Figura A3 Cultivo em fotobiorreatores abertos em condições controladas	101
Figura A4 Cultivo em fotobiorreatores abertos em condições não controladas.....	101
Figura A5 Cultivo em fotobiorreatores abertos de 650L (quadrados e <i>raceway</i>) em condições não controladas.....	102
Figura A6 Vista externa do túnel para cultivo sob condições não controladas.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição do meio de cultivo Zarrouk.....	18
---	----

CULTIVO DA MICROALGA *Spirulina platensis* EM PEQUENA ESCALA E DIFERENTES CONDIÇÕES AMBIENTAIS

Tabela 1 Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento experimental fatorial completo 2^3	33
Tabela 2 Planejamento experimental e parâmetros de crescimento avaliados nos cultivos em fotobiorreatores fechados (média \pm desvio padrão)	35
Tabela 3 Planejamento experimental e parâmetros de crescimento avaliados nos cultivos em fotobiorreatores abertos (média \pm desvio padrão).....	35
Tabela 4 Análise de Variância aplicada à concentração, produtividade e velocidade específica de crescimento máximas nos cultivos em fotobiorreatores fechados.....	43
Tabela 5 Análise de Variância aplicada à concentração, produtividade e velocidade específica de crescimento máximas nos cultivos em fotobiorreatores abertos	43

CULTIVOS AUTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO DA MICROALGA *Spirulina platensis* EM ESCALA PILOTO NO SUL DO BRASIL

Tabela 1 Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento fatorial completo 2×3	54
Tabela 2 Parâmetros de crescimento avaliados nos cultivos em fotobiorreatores abertos de 6L (média \pm desvio padrão).....	55
Tabela 3 Planejamento experimental e parâmetros de crescimento avaliados nos cultivos em condições não controladas.....	60
Tabela 4 Análise de Variância aplicada à concentração, produtividade e velocidade específica de crescimento máximas.....	63

CULTIVO MIXOTRÓFICO DA MICROALGA *Spirulina platensis* UTILIZANDO MELAÇO COMO SUBSTRATO ORGÂNICO

Tabela 1 Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento fatorial 3^2	75
Tabela 2 Planejamento experimental fatorial 3^2 e parâmetros de crescimento avaliados nos cultivos.	77
Tabela 3 Análise de Variância aplicada à concentração, produtividade e velocidade específica de crescimento máximas.....	78

ANEXOS

Tabela A1 Acompanhamento diário da concentração celular (g.L^{-1}). Artigo Cultivo da microalga <i>Spirulina platensis</i> em pequena escala e diferentes condições ambientais.	94
Tabela A2 Acompanhamento diário da concentração celular (g.L^{-1}). Artigo Cultivos autotrófico e mixotrófico da microalga <i>Spirulina platensis</i> em escala piloto no Sul do Brasil.....	97
Tabela A3 Acompanhamento diário da concentração celular (g.L^{-1}). Artigo Cultivo mixotrófico da microalga <i>Spirulina platensis</i> utilizando melaço como substrato orgânico	98

NOMENCLATURA

CULTIVO DA MICROALGA *Spirulina platensis* EM PEQUENA ESCALA E DIFERENTES CONDIÇÕES AMBIENTAIS

X	concentração celular (g.L^{-1})
X _{máx}	concentração celular máxima (g.L^{-1})
P	produtividade ($\text{g.L}^{-1}\text{dia}^{-1}$)
P _{máx}	produtividade máxima ($\text{g.L}^{-1}\text{dia}^{-1}$)
μ _{máx}	velocidade específica máxima de crescimento (dia^{-1})
t	tempo (dia)
% (v/v)	concentração percentual em volume
X ₁	variável condições ambientais codificada
X ₂	variável concentração de Meio Zarrouk (% v/v) codificada
X ₃	variável concentração inicial (g.L^{-1}) codificada
p	significância estatística
CC	condições ambientais controladas
CNC	condições ambientais não controladas

CULTIVOS AUTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO DA MICROALGA *Spirulina platensis* EM ESCALA PILOTO NO SUL DO BRASIL

X	concentração celular (g.L^{-1})
X _{máx}	concentração celular máxima (g.L^{-1})
P	produtividade ($\text{g.L}^{-1}\text{dia}^{-1}$)
P _{máx}	produtividade máxima ($\text{g.L}^{-1}\text{dia}^{-1}$)
μ _{máx}	velocidade específica máxima de crescimento (dia^{-1})
t	tempo (dia)
% (v/v)	concentração percentual em volume
X ₁	variável fotobiorreator codificada
X ₂	variável concentração de glicose (g.L^{-1}) codificada
p	significância estatística
L	efeito linear
Q	efeito quadrático
FBR	fotobiorreator

CULTIVO MIXOTRÓFICO DA MICROALGA *Spirulina platensis* UTILIZANDO MELAÇO COMO SUBSTRATO ORGÂNICO

X	concentração celular (g.L^{-1})
$X_{\text{máx } 1}$	concentração celular máxima na primeira fase (g.L^{-1})
$X_{\text{máx } 2}$	concentração celular máxima na segunda fase (g.L^{-1})
P	produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)
$P_{\text{máx}}$	produtividade máxima ($\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)
$\mu_{\text{máx } 1}$	velocidade específica máxima de crescimento na primeira fase (dia^{-1})
$\mu_{\text{máx } 2}$	velocidade específica máxima de crescimento na segunda fase (dia^{-1})
t	tempo (dia)
% (v/v)	concentração percentual em volume
X_1	variável iluminância (Lux) codificada
X_2	variável concentração de melaço (g.L^{-1}) codificada
p	significância estatística
L	efeito linear
Q	efeito quadrático
MEL	concentração de melaço (g.L^{-1})
I	iluminância (Lux)

RESUMO

A microalga *Spirulina* é utilizada como suplemento alimentar humano com potencial para o combate à desnutrição. Além de utilizar a fotossíntese, a microalga assimila carbono orgânico em cultivos mixotróficos, podendo apresentar melhores parâmetros de crescimento. Em grande escala a *Spirulina* é cultivada em fotobiorreatores abertos, onde os níveis naturais de temperatura e iluminância, bem como as flutuações nestes níveis podem conduzir a parâmetros de crescimento inferiores aos obtidos em condições ambientais controladas. Assim, é motivada a busca de alternativas que resultem em incremento nos parâmetros de crescimento com redução nos custos de produção da microalga. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi determinar a influência de fatores ambientais e nutricionais, do tipo de fotobiorreator e da concentração celular inicial no crescimento de *Spirulina platensis*. Foram avaliados os efeitos da concentração de substratos inorgânico (10 ou 20% v/v de meio Zarrouk) e orgânico (glicose ou melaço), da concentração celular inicial (0,15 ou 0,40 g.L⁻¹), do fotobiorreator (aberto ou fechado), da escala em fotobiorreatores abertos (6L ou 650L), da forma dos fotobiorreatores na maior escala (quadrado ou *raceway*) e das condições ambientais (30 °C e ciclos de 12h a 2500 Lux e 12h escuro; ou em condições não controladas), bem como os efeitos de interação entre estes fatores sobre a concentração celular ($X_{máx}$), produtividade ($P_{máx}$) e velocidade específica de crescimento ($\mu_{máx}$) máximas da microalga *Spirulina platensis*. As máximas concentrações e produtividades foram obtidas em cultivos mixotróficos, sendo alcançados, respectivamente, 2,94 g.L⁻¹ e 0,56 g.L⁻¹.dia⁻¹ em 0,75 g.L⁻¹ de melaço sob condições controladas, e 2,17 g.L⁻¹ e 0,62 g.L⁻¹.dia⁻¹ em 0,50 g.L⁻¹ de glicose sob condições não controladas. A velocidade específica máxima de crescimento foi desfavoravelmente influenciada pela presença de substratos orgânicos e incrementada em condições ambientais não controladas, alcançando 0,322 dia⁻¹. O cultivo sob condições não controladas apresentou melhores parâmetros de crescimento quando inoculado com 0,40 g.L⁻¹ e meio Zarrouk 20%, enquanto para cultivo sob condições controladas a melhor concentração inicial foi 0,15 g.L⁻¹ e a concentração de meio Zarrouk 10% (v/v) pode ser utilizada, uma vez que o aumento para 20% (v/v) não incrementou os resultados nestas condições. Em fotobiorreatores abertos o crescimento celular foi mantido por mais tempo que em fechados, independente das condições ambientais. Cultivos sob condições ambientais não controladas estiveram expostos a temperaturas entre 8,8 e 46 °C, apresentando parâmetros de crescimento semelhantes, sendo alguns superiores, aos obtidos em cultivos sob temperatura, iluminância e fotoperíodo controlados. Cultivos autotróficos foram mais resistentes às baixas temperaturas, enquanto mixotróficos foram mais produtivos em maiores temperaturas. O melaço demonstrou potencial para o cultivo mixotrófico da microalga. O cultivo de *Spirulina platensis* mostrou viabilidade técnica para ser explorado nas condições climáticas do Sul do Brasil e pode ser alternado nos modos autotrófico e mixotrófico a fim de garantir a produção ininterrupta da microalga durante o ano.

Palavras-chave: fotobiorreator, melaço, mixotrófico, *raceway*, *Spirulina platensis*.

ABSTRACT

Microalga *Spirulina* is useful as human alimentary supplement with potential for the fight against the malnutrition. Besides using the photosynthesis, this microalga assimilate organic carbon that would stimulate its growth in mixotrophic cultivations. Large scale cultures of *Spirulina* are carried out in open photobioreactors, where the natural levels of both temperature and illuminance, as well as the variations in this, can lead to growth parameters lower than obtained in controlled conditions. All of this motivates the search of alternatives to increase the growth parameters with reduction in the costs of production of the microalga. In this context, this work aimed to determinate the influence of environmental and nutritional factors, of photobioreactor configuration and cell concentration in *Spirulina platensis* growth. The effects of inorganic substrate concentration (10 or 20% v/v Zarrouk medium) and organic substrate concentration (glucose or molasses), initial cell concentration (0.15 or 0.40 g.L⁻¹), photobioreactor configuration (open or closed), scale in open photobioreactors (6L or 650L), configuration of the largest scale photobioreactors (square or raceway) environmental conditions (at 30°C and cycles of 12h light/dark at 2500 Lux; or in a greenhouse under not controlled environmental conditions), as well as the interaction among effects of these factors on the cellular concentration, productivity and maximum specific growth rate of the microalga *Spirulina platensis*. The maxims cellular concentrations and productivities were achieved in mixotrophic cultures, being reached 2.94 g.L⁻¹ and 0.56 g.L⁻¹.day⁻¹ in molasses 0.75 g.L⁻¹, at controlled conditions and 2.17 g.L⁻¹ and 0.62 g.L⁻¹.day⁻¹ in glucose 0.50 g.L⁻¹ at not controlled conditions. Maximum specific growth rate was negatively influenced by organic substrate and it was increased under controlled environmental conditions, reaching 0.322 day⁻¹. Cultures under not controlled conditions presented better growth parameters when inoculated with 0.40 g.L⁻¹ and Zarrouk medium 20% (v/v), while for cultures under controlled conditions the best initial concentration was 0.15 g.L⁻¹ and Zarrouk medium 10% (v/v) can be used, once the increase for 20% (v/v) didn't increase the results. Cellular growth in open photobioreactors was maintained for more time than in closed photobioreactors, independent of the environmental conditions. Cultivations under not controlled conditions were exposed to temperatures between 8.8 and 46°C, presenting satisfactory growth parameters, being some superiors, compared to the obtained in cultivations under controlled conditions. Autotrophic cultures were more resistant to low temperatures, while mixotrophic cultures were more productive in high temperatures. The molasses demonstrated potential for the mixotrophic culture of the microalga. The cultivation of *Spirulina platensis* showed technical viability to be explored under climatic conditions of the South of Brazil and it can be alternately autotrophic and mixotrophic in order to guarantee uninterrupted production of the microalga during all year.

Key Words: molasses, mixotrophic, photobioreactor, raceway, *Spirulina platensis*.

1 INTRODUÇÃO

Com o crescimento da população mundial, a escassez de alimentos e a carência de grandes áreas disponíveis para agricultura tornam-se problemas cada vez mais preocupantes. Além disso, a desnutrição nos países mais pobres vem aumentando, assim como a busca por alimentos funcionais nas classes mais altas. A biotecnologia, através do cultivo de microalgas, surge como uma possibilidade de produzir compostos nutricionalmente ricos, de alto valor agregado, com custo relativamente baixo e mínima geração de resíduos.

A *Spirulina* é uma das microalgas mais pesquisadas e cultivadas do mundo, e que se destaca das demais devido sua riqueza em proteínas, ácidos graxos poliinsaturados, vitaminas, pigmentos e minerais. É utilizada como suplemento alimentar em vários países e consumida em cápsulas ou adicionada a alimentos e bebidas.

Fatores climáticos, como temperatura, iluminância e fotoperíodo, além do tipo de fotobiorreator e a composição em nutrientes do meio de cultivo influenciam a produção de biomassa de *Spirulina*.

Condições climáticas desfavoráveis ao desenvolvimento da microalga em uma região podem limitar seu cultivo a determinados períodos do ano ou até mesmo impossibilitá-lo. O Sul do Brasil, como a maioria dos ambientes naturais, apresenta níveis de temperatura e iluminância diferentes dos ótimos para o crescimento da microalga. Apesar do grande número de trabalhos sobre *Spirulina*, poucos utilizam condições climáticas naturais, e não há dados sobre o cultivo da microalga no Sul do País.

A produção de microalgas em condições ambientais não controladas e o aumento de escala nos cultivos envolvem problemas, principalmente relacionados à agitação e à incidência luminosa, de modo que resultados obtidos em laboratório podem não ser reproduzidos em maiores escalas de cultivo e sob condições ambientais não controladas. Ainda assim são poucas as informações na literatura obtidas em escala piloto e condições ambientais naturais, onde são geralmente realizados os cultivos de *Spirulina* em grande escala.

A fonte de nutrientes, especialmente carbono, nos cultivos de *Spirulina* representa um importante componente dos custos de produção, de modo que reduzir a quantidade de meio inorgânico sem perder em produtividade pode ser um artifício para reduzir custos de produção da microalga.

Embora a *Spirulina* seja um microrganismo fotossintético, é também capaz de utilizar substratos orgânicos para o crescimento em cultivos mixotróficos, o que geralmente conduz a uma maior produção de biomassa. Os compostos orgânicos normalmente utilizados são glicose e acetatos. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, a partir da qual é gerado o melaço como subproduto na indústria açucareira, que contém, em média, 50% de açúcares em sua composição, o que lhe confere potencial para ser utilizado como substrato orgânico no cultivo de microalgas.

Este trabalho foi motivado pela possibilidade de contribuir com o preenchimento de lacunas na literatura e de explorar os cultivos de *Spirulina* no clima do Sul do Brasil, avançando para escalas maiores que a de laboratório, explorando o emprego de novos nutrientes e a manipulação de fatores que aumentem a produtividade nos cultivos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar o crescimento da microalga *Spirulina platensis* cultivada em diferentes tipos de fotobiorreatores, modos de cultivo e condições ambientais no Sul do Brasil.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar o cultivo autotrófico da microalga *Spirulina platensis* em fotobiorreatores abertos e fechados em pequena escala sob condições controladas e não controladas, avaliando a influência da disponibilidade de nutrientes no meio e da concentração celular inicial;
- Determinar os efeitos da adição de glicose em diferentes concentrações ao meio de cultivo no crescimento da microalga *Spirulina platensis* em duas estações do ano, avaliando o efeito da configuração dos fotobiorreatores em escala piloto;
- Avaliar a influência da iluminância e da concentração de substrato orgânico (melaço) no crescimento da microalga *Spirulina platensis* em cultivo mixotrófico em fotobiorreatores fechados sob condições controladas.

3 JUSTIFICATIVA

A desnutrição e a má nutrição são problemas preocupantes em países pobres e se espalham pelo mundo atingindo também os países em desenvolvimento. A má nutrição é um problema encontrado em regiões de todo o mundo e se deve ao consumo de alimentos que não atendem às necessidades nutricionais básicas do ser humano. Além disso, existe uma demanda crescente por alimentos funcionais a partir dos quais as doenças podem ser evitadas e tratadas.

Neste contexto, as microalgas surgem como uma alternativa potencialmente capaz de contribuir com o suprimento destas demandas. Estes microrganismos são fontes de nutrientes, corantes naturais e compostos farmacêuticos; além de poderem ser utilizadas na aqüicultura, na produção de biocombustíveis e no seqüestro de CO₂ da atmosfera (BENEMANN, 1997), entre outras aplicações.

A *Spirulina platensis* é uma microalga que se destaca das demais pela sua composição. Seu alto teor protéico (65 – 75%), a presença de ácidos graxos poliinsaturados, pigmentos, minerais e vitaminas, além de outros compostos como os polissacarídeos e sulfolipídeos fazem desta microalga a mais cultivada e estudada no mundo (FALQUET, 1997; VONSHAK & RICHMOND, 1988).

Microalgas utilizam a fotossíntese como metabolismo principal para a obtenção de carbono orgânico através do carbono inorgânico contido no CO₂, utilizando a energia solar e liberando oxigênio na atmosfera.

Ao contrário das fontes energéticas mais utilizadas no mundo, como o petróleo e o carvão, a energia solar é praticamente ilimitada, não provoca a emissão de resíduos em seu aproveitamento e sua geração não causa danos ao meio ambiente, além de apresentar como principal vantagem o baixo custo. Diante de previsões pessimistas sobre a disponibilidade de fontes energéticas no futuro, é de fundamental importância o aproveitamento da energia solar na chamada fotossíntese industrial, onde são empregados organismos vivos que utilizam a energia do sol para o crescimento e produção de compostos com valor comercial.

Embora os vegetais também realizem fotossíntese e se constituam em biomassa alimentícia, seu cultivo depende de fatores que podem limitar e até impossibilitar sua produção, como grandes áreas disponíveis, solo apropriado, água doce de boa qualidade e sazonalidade, entre outros. Esse tipo de cultivo não repõe os recursos naturais, podendo provocar desmineralização, salinação, desertização e erosão dos solos, bem como esgotamento das fontes de água. A produção de vegetais requer, em geral, o uso de agrotóxicos, causando um impacto ambiental ainda maior, além de poder necessitar de fungicidas para a conservação dos produtos.

Os cultivos de microalgas, em comparação ao cultivo vegetais, além de utilizar menores áreas, independem da qualidade do solo, podendo ser desenvolvidos em solos estéreis, inutilizáveis para a agricultura e até mesmo no deserto; ou em solos férteis, sem causar-lhes impacto. Microalgas necessitam de menor quantidade de água, podendo esta ser, para a maioria destes organismos, salina, alcalina, ou até mesmo residual, impróprias para a agricultura. Para produzir a mesma quantidade de proteína a *Spirulina* necessita 20 vezes menos área que a soja e 200 vezes menos área que o gado; consome 3 vezes menos água que a soja e utiliza apenas 2% da água necessária para o gado (HENRIKSON, 1994).

Quanto à utilização de energia, as microalgas utilizam um aporte energético, tanto de energia solar quanto de energia artificial, menor que vegetais como a soja e o milho por biomassa produzida. A eficiência energética da *Spirulina*, dada pela razão entre a energia alimentícia produzida e a energia fornecida às culturas é 3,5 vezes superior à da soja e mais de 100 vezes superior à do gado (HENRIKSON, 1994).

Quanto ao seqüestro de carbono da atmosfera, as microalgas se destacam ainda mais. A capacidade de fixação de CO₂ pelas árvores é a maior entre os vegetais, e estimada em cerca de 1 ton.ha⁻¹.ano⁻¹, podendo chegar a 3,5 ton.ha⁻¹.ano⁻¹ em florestas tropicais. As microalgas representam os organismos vivos mais eficientes na fixação de carbono (OTSUKI, 2001). A *Spirulina*, por exemplo, pode fixar 6,3 ton.ha⁻¹.ano⁻¹, alcançando 16,2 ton.ha⁻¹.ano⁻¹ em regiões tropicais, como é a maior parte do Brasil (HENRIKSON, 1994). Devido a esta característica, a *Spirulina* é pesquisada pela Agência Espacial Européia, com o objetivo de dar suporte à vida no espaço, sendo cultivada no interior dos veículos espaciais ou nas futuras estações espaciais,

como fonte de oxigênio e biomassa alimentícia (GROS et al., 2003; MORIST et al., 2001; BENEMANN, 1997).

Outra vantagem da *Spirulina* diz respeito à susceptibilidade de contaminação das culturas. O alto pH do meio onde se desenvolve esta microalga é impróprio para o desenvolvimento de microrganismos contaminantes, possibilitando seu cultivo em fotobiorreatores abertos, ao contrário de outras microalgas, que necessitam sistemas fechados, de mais alto custo.

A colheita da biomassa é a operação mais problemática nos cultivos de microalgas (BOROWITZKA & BOROWITZKA, 1988). A forma espiralada e o tamanho dos tricomas da *Spirulina*, que podem alcançar 1 mm de comprimento, constituem-se em vantagem na operação de filtração (TOMASELLI, 1997) para a remoção de água da biomassa (COHEN et al., 1987; Piorrek, 1984), em comparação a outras microalgas, também fontes de proteínas, como *Chlorella* e *Scenedesmus*, cujas células apresentam cerca de 4 a 10 μm .

O teor de ácidos nucléicos, que é um fator limitante para o consumo de proteína unicelular, apresenta-se na *Spirulina platensis* como um dos menores entre os microrganismos (4 - 6% em comparação a 23% nas leveduras). A ausência de parede celulósica disponibiliza, sem necessidade de cozimento, as proteínas da microalga, que apresentam em sua composição todos os aminoácidos essenciais, representando 46% do peso protéico total (FALQUET, 1997).

Propriedades terapêuticas da *Spirulina* são estudadas ao redor do mundo, como no combate a anemias, na redução da hipercolesterolemia (COLLA, 2002), na prevenção de certos tipos de cânceres (HIRAHASHI et al., 2002), proteção aos efeitos nocivos da radiação, contra a deficiência de vitamina A, inibição da transmissão do vírus HIV da mãe ao feto (FALQUET, 1997) e contra o vírus da AIDS (TEAS et al., 2004), entre outros.

A necessidade da incidência de luz no interior das culturas limita a altura dos fotobiorreatores para cultivo de microalgas, sendo, empregados extensos e rasos tanques abertos; limita também a obtenção de culturas altamente densas, de modo que a biomassa deve ser coletada antes que a alta concentração prejudique a

incidência luminosa no interior do meio líquido. As sucessivas colheitas, geralmente bombeando o meio através de um filtro, podem causar danos aos tricomas e a redução em seu tamanho, tornando as operações de separação difíceis e dispendiosas (VONSHAK, 1997). Assim é importante que se desenvolvam artifícios para manter altas taxas de crescimento em meio denso, reduzindo os volumes de meio manipulados para a colheita da biomassa.

Embora em determinadas condições a *Spirulina* possa duplicar sua biomassa em períodos tão curtos quanto 24h, a taxa de crescimento celular ainda é um fator que deixa a desejar em culturas em grande escala sem controle das condições ambientais, chegando a ser responsável pelo insucesso de algumas empresas produtoras de microalgas (BELAY, 1997; GRIMA et al., 1996).

Além de utilizar a fotossíntese, a *Spirulina platensis* tem habilidade de metabolizar substratos orgânicos. Estudos mostram que nestes tipos de cultivos, chamados mixotróficos, a microalga apresenta melhores taxas de crescimento. Além disso, a presença de um substrato orgânico pode ser complementar a baixas incidências luminosas no interior do meio líquido. Assim, o cultivo mixotrófico é uma possibilidade de alcançar maiores densidades celulares, com a manutenção dos cultivos por períodos mais longos, podendo resultar em aumento na produtividade. Por outro lado, pode permitir o aumento na altura dos fotobiorreatores, resultando em menores áreas de cultivo necessárias para a produção de biomassa, ou ainda pode possibilitar aumentar o volume dos cultivos, também resultando em maior produção de biomassa.

Entre todos os custos associados com a produção de *Spirulina*, a fonte de carbono representa um dos maiores componentes do custo operacional (VONSHAK, 1997). Assim a redução na concentração de meio inorgânico e o uso de fontes alternativas de carbono para os cultivos também merece atenção no sentido de reduzir os custos de produção.

A posição de destaque que o Brasil ocupa na indústria açucareira mundial faz com que sejam geradas grandes quantidades de melaço como subproduto na produção de açúcar. O melaço contém, em média, 50% de açúcares, o que lhe confere potencial para a aplicação como substrato orgânico no cultivo de microalgas.

Além da disponibilidade do melão, o Brasil apresenta um clima favorável ao cultivo de *Spirulina* na maior parte de sua extensão, em conjunto com a necessidade de produção de alimentos acessíveis à população de baixa renda (BELIK, 2003). Ainda assim, não existe registro de produção da microalga em grande escala no país. Até mesmo seu estudo em escala de laboratório é raro, comparando-se o Brasil a outros países, como o México, Estados Unidos, Canadá, França, Itália, Japão e Israel, sendo estes os detentores da tecnologia e exploradores comerciais dos cultivos deste microrganismo (ZHANG et al., 1999; MARQUEZ et al., 1993).

Embora a *Spirulina* seja a microalga mais estudada e cultivada comercialmente no planeta, ainda existem lacunas a serem preenchidas na literatura. A maioria dos estudos sobre o cultivo de *Spirulina* e de outras microalgas, publicados ao redor do mundo, utiliza condições ambientais controladas, e em escala de bancada. Sabe-se que temperatura e iluminância são fatores fortemente influentes no crescimento das microalgas (SANTOS, 2001; MARTÍNEZ et al., 1997; GRIMA et al., 1996).

Poucos lugares do mundo apresentam a temperatura ótima (30 – 38 °C) para o crescimento da *Spirulina* durante todo o ano, e, quanto à iluminância ótima (2500 Lux), qualquer lugar do planeta exposto ao sol apresenta, durante o dia, níveis quase duas ordens de grandeza maior. Além disso, em ambientes naturais ocorrem flutuações nos níveis destas variáveis que podem interferir no crescimento e são impossíveis de reproduzir em laboratório.

Os cultivos comerciais da microalga *Spirulina* são geralmente realizados em fotobiorreatores abertos, de até 5000 m² (BELAY, 1997). É evidente que manter as condições ótimas de temperatura e iluminância em um fotobiorreator com esta capacidade tornaria inviável economicamente o cultivo da microalga em regiões frias, como o Sul do Brasil. Assim torna-se um pré-requisito para cultivos em grande escala estudar o crescimento da *Spirulina* nas condições ambientais a que serão expostos os cultivos (JIMÉNEZ et al., 2003; OLAIZOLA, 2003; HASE et al., 2000; BOROWITZKA, 1999).

Diante do exposto, o cultivo da microalga *Spirulina* é uma alternativa de desenvolvimento sustentável, e é evidente a importância de ultrapassar os limites do

laboratório de pesquisa e estudar seu cultivo em condições semelhantes às reais para a produção em grande escala, além de pesquisar novas fontes de nutrientes e fatores que aumentem a produtividade de biomassa a baixo custo.

Desde 1996 o Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG pesquisa o cultivo de *Spirulina platensis* em trabalhos de iniciação científica, trabalhos de conclusão de curso, dissertações de mestrado e teses de doutorado. Já foram estudados cultivos descontínuos e semicontínuos, cultivos em fotobiorreatores abertos e fechados, o efeito de fatores como temperatura, iluminância, aeração, taxa de renovação, concentração de corte, o perfil em ácidos graxos na microalga, fontes de nutrientes alternativas, como a água da Lagoa Mangueira, os custos de produção, o potencial hipocolesterolêmico da *Spirulina platensis*, o isolamento de uma cepa nativa de *Spirulina* da Lagoa Mangueira, a modelagem matemática do crescimento de *Spirulina* e a formulação de produtos alimentícios adicionados de biomassa da microalga, como massas, sopas instantâneas, bebida isotônica, bolo de chocolate e cereal em barra entre outros (DURANTE et al., 2003; REINEHR, 2003; BIANCHINI et al., 2002; COLLA, 2002; DUARTE FILHO, 2002; SANTOS, 2001; COZZA, 1999).

A partir de uma parceria do Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG, com as organizações não governamentais Fundação ZERI do Brasil e Antenna Technology, a empresa Amana Key Educação e Desenvolvimento, as prefeituras de Santa Vitória do Palmar e Rio Grande, a Fundação Banco do Brasil e as empresas COPESUL e Refinaria de Petróleo Ipiranga foi construída e posta em operação uma unidade piloto de produção de *Spirulina*, no município de Santa Vitória do Palmar, às margens da Lagoa Mangueira, com o objetivo de utilizar a água da Lagoa no cultivo da microalga e tornar-se um centro de referência nacional do cultivo de *Spirulina*. Atualmente esta unidade produz cerca de 50 kg de *Spirulina* mensais que deverão ser, em breve, adicionados à merenda escolar na região. Outros projetos estão em andamento, em parceria com a ELETROBRÁS (Centrais Elétricas Brasileiras S.A.) e a CGTEE (Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica), visando a utilização de microalgas para a fixação de CO₂ originado na combustão de carvão para a geração de energia elétrica; e com a PETROBRÁS, para a produção de biodiesel de microalgas.

O aproveitamento da estrutura disponível no Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG torna possível o estudo dos cultivos de *Spirulina* nas condições ambientais do Sul do Brasil, em escala maior que a de bancada, possibilitando comparar os resultados com aqueles obtidos em cultivos sob condições controladas e em menor escala, permitindo a verificação da possibilidade de exploração dos cultivos de *Spirulina platensis* em uma região fria como o Sul do Brasil, oportunizando o aproveitamento do potencial desta microalga desde o ponto de vista nutricional, auxiliando no combate à desnutrição, até social, uma vez que, dominando a tecnologia de produção, seus cultivos podem ser uma alternativa de atividade profissional, contribuindo para diminuir as taxas de desemprego e a fome no país.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Microalgas e Cianobactérias

As microalgas formam um grupo heterogêneo de organismos que engloba todos os microrganismos fotossintetizantes, sejam eucarióticos ou procarióticos. São geralmente unicelulares, gram-negativos, coloridos devido à presença dos pigmentos fotossintéticos, e vivem, em sua maioria, em ambientes aquáticos (OLAIZOLA, 2003; TOMASELLI, 1997).

As microalgas procarióticas recebem o nome de cianobactérias, antigamente chamadas algas azul-esverdeadas. As estruturas celulares e o mecanismo para a fotossíntese nestes organismos são semelhantes àqueles dos vegetais (LEHNINGER et al., 1995).

Acredita-se que as cianobactérias surgiram há 3500 milhões de anos e foram os primeiros organismos fotossintetizantes capazes de produzir oxigênio, formando a atmosfera terrestre e possibilitando o surgimento de outras formas de vida no planeta. (LEHNINGER, et al., 1995; HENRIKSON, 1994).

Embora existam evidências do uso de microalgas como *Spirulina* na África e *Nostoc* na Ásia já no século XVI (VONSHAK, 1997), as culturas de microalgas começaram a atrair a atenção de pesquisadores após 1948 nos EUA, Alemanha e Japão. O interesse continuou, com estudos sobre o uso destes organismos como trocadores de gás para viagens espaciais e como fonte de proteína microbiana (GROS et al., 2003).

As culturas comerciais de microalgas em grande escala iniciaram por volta de 1960 no Japão, com a *Chlorella*, seguida pela cultura de *Spirulina* em 1970 no México, ambas para suplemento alimentar; *Dunaliella salina* para produção de β -caroteno na Austrália em 1986, *Haematococcus pluvialis* para produção de astaxantina e várias outras espécies para a aquicultura. Após, o cultivo de microalgas se espalhou pelo mundo, em países como Israel, EUA e Índia (BOROWITZKA, 1999).

Atualmente as microalgas são utilizadas na alimentação humana como fontes de suplemento alimentar de alto valor nutricional ou biocorantes (CHEN & ZHANG, 1997), e na alimentação animal, principalmente de frangos e animais marinhos (VONSHAK, 1997). Além disso, os cultivos têm sido empregados como fonte de biocombustíveis (MIAO et al., 2004; SCRAGG et al., 2002, SAWAYAMA et al., 1995) e como forma de fixar CO₂ originado na atividade industrial e na geração térmica de energia elétrica (BENEMANN, 1997; MICHIKI, 1995).

4.2 Cianobactéria *Spirulina*

A microalga *Spirulina* (Figura 1) é uma cianobactéria filamentosa, que forma tricomas cilíndricos multicelulares, com 1 a 12 µm de diâmetro, e se dispõem na forma espiralada, com até 1 mm de comprimento (TOMASELLI, 1997; HENRIKSON, 1994; BOROWITZKA & BOROWITZKA, 1988). A forma dos tricomas pode mudar em função de fatores ambientais e físico-químicos, como a consistência do meio de cultivo e a temperatura, e varia também entre as diferentes cepas da microalga (TOMASELLI, 1997).

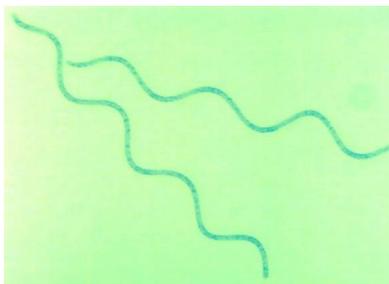


Figura 1 Micrografia da cianobactéria *Spirulina*

Ocorrências naturais da microalga *Spirulina* são registradas nos lagos Chad na África Central, Texcoco no México, Nakaru e Elementeita no Quênia, e Aranguadi na Etiópia (VONSHAK, 1997; HENRIKSON, 1994; BOROWITZKA & BOROWITZKA, 1988). No Brasil existem três locais de ocorrência de *Spirulina* registrados, todos no Rio Grande do Sul, sendo eles a Lagoa Mangueira (DURANTE et al., 2003), em um dos lagos da Praça da Redenção em Porto Alegre (ROSA et al., citado por COZZA, 1999) e na Praia do Cassino, próximo aos Molhes da Barra (YUNES et al., 1990).

4.2.1 Composição

A *Spirulina* se destaca entre as demais microalgas devido principalmente a sua composição em proteínas, além de conter ácidos graxos insaturados como o γ -linolênico, vitaminas como a B₁₂ e pigmentos como ficocianina e β -caroteno. Além disso, esta microalga possui o certificado GRAS (Generally Recognized as Safe) do FDA.

O conteúdo protéico na *Spirulina* varia entre 64 e 74% de seu peso seco e é formado por proteínas completas do ponto de vista qualitativo, uma vez que contém todos os aminoácidos essenciais, que perfazem 47% do peso protéico total (COHEN, 1997). Metionina e cistina são os aminoácidos essenciais em menor quantidade, e mesmo assim estão presentes em mais de 80% do nível ideal recomendado pela FAO. Quando comparado a outros alimentos, o conteúdo protéico da *Spirulina* é, em média 65% superior a qualquer alimento natural (FALQUET, 1997; HENRIKSON, 1994).

O NPU ("Net Protein Utilization") é determinado experimentalmente pelo cálculo da percentagem do nitrogênio retido quando a fonte de proteína investigada é o único fator nutricional limitante. O NPU para a *Spirulina* varia entre 53 e 61%, ou 85 a 92% do NPU da caseína como padrão. O PER ("Protein Efficiency Ratio") é a razão entre o ganho de massa do animal em estudo, geralmente ratos, e a massa de proteínas ingeridas. O PER para a *Spirulina* varia entre 1,80 e 2,60, contra um PER de 2,50 para a caseína (FALQUET, 1997; BECKER & VENKATARAMAN, 1984).

A *Spirulina*, ao contrário de outras microalgas, não possui parede celular celulósica, mas sim um envelope de mureína relativamente frágil. A ausência da parede celulósica é uma vantagem do ponto de vista de preservação da integridade de componentes como vitaminas e ácidos graxos poliinsaturados, uma vez que dispensa o uso de cozimento para disponibilizar os nutrientes (FALQUET, 1997).

O conteúdo de lipídios da *Spirulina* varia entre 6 a 13% em peso seco, metade dos quais são ácidos graxos (COHEN, 1997). Destes, o ácido γ -linolênico representa 20%. As condições de cultivo podem influenciar no conteúdo total de lipídios das microalgas. Um estudo realizado por PIORRECK et al. (1984) mostrou que microalgas cultivadas em baixas concentrações de nitrogênio têm seu conteúdo lipídico incrementado, sem, no entanto, alterar o perfil lipídico e de ácidos graxos. Os

ácidos graxos poliinsaturados de origem microbiana são bastante pesquisados visando seu uso em substituição à fonte tradicional, óleo de pescado, que muitas vezes é inadequado para aplicação em certos tipos de alimentos (OTERO et al., 1997).

Os carboidratos constituem cerca de 15 - 25% do peso seco da *Spirulina*. Moléculas simples como glicose, frutose e sacarose estão presentes em pequenas quantidades. Do ponto de vista nutricional, o único carboidrato de ocorrência em quantidade de interesse é o mesoinositol fosfato, uma excelente fonte de fósforo orgânico e inositol (QUILLET, 1975).

Os ácidos nucléicos são um fator limitante do uso de proteínas microbianas, devido à produção de ácido úrico na sua degradação, que causa o problema de gota. A ingestão diária de ácidos nucléicos não deve ultrapassar 4 g.dia^{-1} para um adulto. Em leveduras o conteúdo de ácidos nucléicos é cerca de 23%, enquanto na *Spirulina* os ácidos nucléicos variam em 4,2 - 6% em peso seco. Sendo necessária uma ingestão diária maior que 80g de *Spirulina* para alcançar o limite diário de ácidos nucléicos. Esta quantidade é cerca de 8 vezes maior que a dose da microalga recomendada como suplemento alimentar (FOX, 1996; SANTILLAN, 1974).

Entre as vitaminas, a que merece maior destaque na *Spirulina* é a B₁₂ ou cianocobalamina (11 mg/kg em base seca). Os vegetais alimentícios não contêm quantidades significativas desta vitamina, de modo que é difícil obtê-la em uma dieta isenta de carnes (CIFERRI, 1983).

O β -caroteno (pró-vitamina A) representa cerca de 80% dos carotenóides presentes na *Spirulina*. 1 kg de *Spirulina* contém entre 700 e 1700 mg de β -caroteno. A microalga contém tocoferóis em cerca de 50 – 190 mg/kg em base seca, nível comparável ao germe de trigo. Os tocoferóis podem ser responsáveis pela estabilidade dos ácidos graxos na biomassa desidratada, devido ao seu poder antioxidante. A *Spirulina* contém ainda pequenas quantidades de niacina, ácido fólico, ácido pantotênico e biotina (COHEN, 1997; FALQUET, 1997; FOX, 1996).

Os minerais presentes em maior quantidade na *Spirulina* são cálcio, ferro, fósforo, magnésio e potássio. Os três primeiros ocorrem em quantidades semelhantes

às do leite. Quanto ao ferro, seu teor na *Spirulina* é maior que o dos cereais, que são uma das melhores fontes alimentícias deste mineral (FALQUET, 1997).

4.2.2 Efeitos Terapêuticos da *Spirulina*

Devido à presença de ácido γ -linolênico, são atribuídas à *Spirulina* propriedades medicinais, como a redução da hipercolesterolemia (COLLA, 2002). Em pacientes hipercolesterolêmicos o ácido γ -linolênico se mostra 170 vezes mais eficiente para este propósito do que o ácido linoléico, comumente encontrado em plantas. O ácido γ -linolênico também atua contra os sintomas da tensão pré-menstrual, contra a esclerose múltipla e o mal de Parkinson (COHEN, 1997).

Alguns trabalhos relatam o uso de *Spirulina* como estimulante dos mecanismos de reparo do DNA danificado por efeitos da radiação, atribuindo esta propriedade aos polissacarídeos da microalga. Alguns destes também apresentam ação imunoestimuladora e reguladora (QISHEN, 1989; PANG et al., 1988).

Propriedades anticancerígenas da *Spirulina* são atribuídas, em parte, ao poder antioxidante dos carotenóides, como o β -caroteno, precursor da vitamina A em mamíferos. Estudo realizado por SEMBA et al. (1994) mostrou que a transmissão do vírus HIV de uma mãe infectada para o filho é fortemente dependente da deficiência de vitamina A, assim a disponibilidade de alimentos ricos em teores desta vitamina é importante em populações com alto índice de contaminação pelo HIV, como a da África. Ainda contra o HIV/AIDS, a *Spirulina* mostrou diminuir a velocidade de replicação do vírus, reduzir a carga viral e incrementar o sistema imunológico de pacientes HIV positivo. Este efeito foi atribuído aos poliânions que regulam a homeostase na microalga em ambientes alcalinos (BELAY, 2004; TEAS et al., 2004). Outro estudo *in vivo* realizado por HIRAHASHI et al. (2002) demonstrou a atividade do extrato aquoso da microalga na ativação do sistema imunológico humano.

A anemia perniciosa, causada pela deficiência da vitamina B₁₂, pode ser evitada a partir de dietas contendo a *Spirulina*, dado seu teor nesta vitamina. As anemias causadas pela deficiência de ferro, que ocorrem principalmente em mulheres grávidas e crianças são outro exemplo de problemas que a *Spirulina* pode ajudar a resolver (FALQUET, 1997; LEHNINGER et al., 1995).

Contra a desnutrição infantil os efeitos benéficos da administração de *Spirulina* foram relatados por FOX (1993) descrevendo o caso de crianças seriamente desnutridas que se recuperaram com a administração diária de 1g de *Spirulina* durante 3 meses. DEGBEY et al. (2004) avaliou a administração de 10g diárias de *Spirulina* em crianças desnutridas com 6 a 24 meses de idade, constatando que em 7 dias seus sinais clínicos haviam sido melhorados.

4.3 Fotossíntese

Os vegetais e as microalgas convertem o CO₂ em carboidratos, às expensas da energia solar, através da fotossíntese, liberando O₂. Todos os animais e a maioria dos microrganismos dependem de compostos orgânicos para viver, que são obtidos a partir dos organismos fotossintéticos. Assim, a fotossíntese é o primeiro passo na cadeia alimentar dos organismos vivos no planeta, inclusive dos seres humanos.

O carbono orgânico gerado a partir da fotossíntese fornece o esqueleto carbônico para a biossíntese de compostos mais complexos como as proteínas e lipídios, além de ser fonte de energia metabólica, que move todos os processos bioquímicos (ALBERTS et al., 1994; LEHNINGER et al., 1995).

A reação global de fotossíntese pode ser assim descrita:



Esta reação global resume um processo que ocorre em duas fases distintas, chamadas fases clara e escura. Nas reações fotossintetizantes de transferência de elétrons (reações da fase clara ou da fase luminosa) a energia derivada da luz solar energiza um elétron da clorofila capacitando-o a se mover através de uma cadeia transportadora de elétrons da membrana tilacóide de uma maneira muito semelhante ao movimento de elétrons na cadeia respiratória das mitocôndrias. A clorofila obtém seus elétrons da água com liberação de O₂. Durante o processo de transporte de elétrons, íons hidrogênio são bombeados através da membrana tilacóide e a força próton-motriz resultante direciona a síntese de ATP no estroma. Como fase final desta série de reações, os elétrons de alta energia são

carregados junto ao íon hidrogênio no NADP^+ , convertendo-o em NADPH. Todas estas reações estão confinadas ao cloroplasto (ALBERTS et al., 1994).

Além das clorofilas, as membranas tilacóides contêm os chamados pigmentos acessórios que também absorvem luz. Estes compreendem os carotenóides e as ficobilinas. Os carotenóides podem ser amarelo, vermelho ou púrpura. Os mais importantes são o β -caroteno, precursor da vitamina A nos animais, e o carotenóide xantofila. As ficobilinas são tetrapirrólícos e têm como exemplos a ficoeritrina e ficocianina (LEHNINGER et al., 1995).

Nas reações de fixação do carbono (fase escura) o ATP e o NADPH produzidos pelas reações fotossintetizantes de transferência de elétrons servem, respectivamente, como fonte de energia e potência redutora, para dirigir a reação de conversão do CO_2 em carboidratos (ALBERTS et al., 1994). As reações que promovem a fixação do carbono formam uma via cíclica na qual os intermediários-chave são constantemente regenerados, conhecida por Ciclo de Calvin. Através deste ciclo o CO_2 é transformado em gliceraldeído-3-fosfato, que parte para a via glicolítica ou para as biossínteses (LEHNINGER et al., 1995).

Na ausência de CO_2 ou da energia necessária para as reações de fixação de carbono, um composto de reserva, o α -1,4-glucano, similar ao glicogênio ou à fração amilopectina de amidos encontrados em plantas superiores, é o principal produto de reserva que suporta o metabolismo das cianobactérias (COLLA et al., 2002).

4.4 Nutrientes para o Crescimento da *Spirulina*

A *Spirulina*, assim como outras microalgas, necessita de uma fonte de carbono, nitrogênio, fósforo e outros micronutrientes (VONSHAK, 1997).

Embora a *Spirulina* possa crescer fotoautotroficamente, a captação de CO_2 do ar depende do pH do meio de cultivo. Quanto maior o pH do meio, mais facilmente o CO_2 da atmosfera migra para seu interior e se converte em CO_3^{2-} . Porém, em pH acima de 11, não foi notado crescimento de *Spirulina*, que pode ser devido ao efeito da grande alcalinidade sobre os processos metabólicos ou ainda à inabilidade da microalga em assimilar carbono na forma de CO_3^{2-} . Assim, em cultivos da microalga

Spirulina geralmente é necessária uma fonte externa de carbono, na forma de HCO_3^- , espécie participante do equilíbrio $\text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- \rightleftharpoons \text{CO}_3^{2-}$ mais provável de ser assimilada (BINAGHI et al., 2003).

O meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) é utilizado para o cultivo de *Spirulina*. Sua composição é apresentada na Tabela 1.

Na produção de microalgas, após os custos com mão-de-obra aparecem, em ordem decrescente, os custos com nutrientes para o meio de cultivo. Assim a possibilidade de reduzir a concentração do meio Zarrouk para o cultivo de *Spirulina* foi avaliada por REINEHR (2003), segundo o qual o meio padrão está excessivamente concentrado em nutrientes para a produtividade da microalga, uma vez que foram obtidos melhores resultados com o meio 20% (v/v).

Tabela 1 Composição do meio de cultivo Zarrouk

Nutriente	Concentração (g.L⁻¹)
NaHCO ₃	16,8
K ₂ HPO ₄	0,50
NaNO ₃	2,50
K ₂ SO ₄	1,00
NaCl	1,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20
CaCl ₂	0,04
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
EDTA	0,08
Solução A5*	1 mL
Solução B6**	1 mL

Fonte: ZARROUK (1966)

* Composição da Solução A5 (g.L⁻¹): H₃BO₃: 2,86; MnCl₂.4H₂O: 1,81; ZnSO₄.7H₂O: 0,222; CuSO₄.5H₂O: 0,079; NaMnO₄: 0,015.

** Composição da Solução B6 (mg.L⁻¹): NH₄VO₃: 22,96; KCr(SO₄)₂.12 H₂O: 192; NiSO₄. 6H₂O: 44,8; Na₂WO₄.2H₂O: 17,94; TiOSO₄.H₂SO₄. 8H₂O: 61,1; Co(NO₃)₂.6H₂O: 43,98.

Alguns estudos utilizam fontes alternativas de nutrientes para o cultivo de microalgas, como glicerol (GARCÍA et al., 2005), extrato solúvel de batata (FÁBREGAS et al., 1999), acetato (CHEN et al., 1997) e os resíduos da indústria açucareira (OLGUÍN et al., 1995).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana de açúcar, a partir da qual é gerado o melaço como subproduto na indústria açucareira, contendo mais de 50% de açúcares em sua composição, o que lhe confere potencial para uso como substrato orgânico no cultivo de microalgas.

Melaço foi utilizado no cultivo da levedura *Candida utilis*, para a redução nos custos de produção da levedura (LEE & KIM, 2001). Contudo, não são encontrados registros da utilização deste subproduto para o cultivo de microalgas. BECKER & VENKATARAMAN, (1984) afirmam que a *Spirulina* não possui a habilidade de utilizar o carbono orgânico do melaço por ser fotoautotrófica obrigatória.

4.5 Aspectos Bioquímicos do Cultivo Mixotrófico

Apesar de possuir a fotossíntese como modelo metabólico principal para a obtenção de carbono e energia, a *Spirulina*, a exemplo de outras microalgas, possui uma versatilidade no que se refere à manutenção de suas estruturas celulares, usufruindo de diferentes metabolismos energéticos (YANG et al., 2000; MARQUEZ et al., 1993).

Nos cultivos autotróficos as células de microalgas recebem energia luminosa e assimilam CO₂, fixando carbono na forma de gliceraldeído-3-fosfato, que entra na via glicolítica através do ciclo de Calvin (LEHNINGER et al., 1995). Nos cultivos heterotróficos algumas microalgas crescem na ausência de luz, utilizando substratos orgânicos como fonte de carbono para biossínteses e energia (CHEN et al., 1997). Nos cultivos mixotróficos as microalgas dispõem simultaneamente de compostos orgânicos, luz e CO₂ como fonte de carbono e energia (YANG et al., 2000). A Figura 2 apresenta a via metabólica central do metabolismo energético das microalgas.

A *Spirulina platensis*, em cultivo mixotrófico, exibiu concentração celular igual à soma das concentrações obtidas em cultivos autotróficos e heterotróficos,

indicando que a fotossíntese e o metabolismo oxidativo da glicose funcionam simultânea e independentemente (MARQUEZ et al., 1993). No entanto outros trabalhos mostram evidências do efeito da glicose sobre a atividade fotossintética.

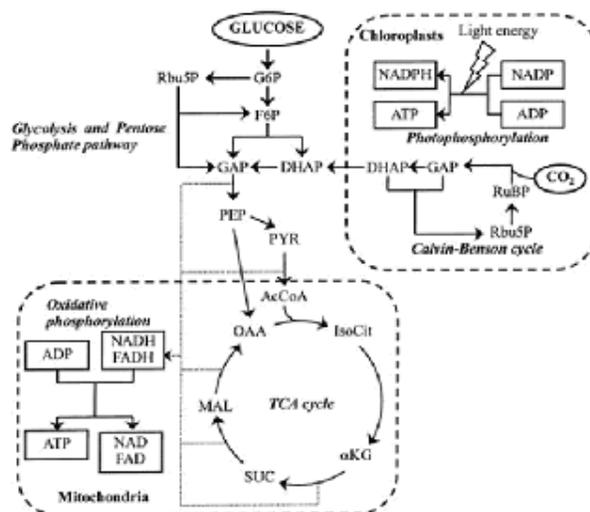


Figura 2 Via metabólica central do metabolismo energético de microalgas (HATA, 2000)

Em algas e plantas superiores a atividade fotossintética é regulada pela presença de açúcares endógenos (JANG & SHEEN, 1994). Glicose inibiu a fotossíntese em cultivos da alga vermelha *Galdieria partita*, através da inibição da síntese de clorofila-a e ficocianobilina (STADNICHUK et al., 1998). Em cultivos de *Chlorella vulgaris* a presença de glicose também afetou a fotossíntese, incrementando o teor de enzimas reguladoras da via das pentoses fosfato e diminuindo a atividade da enzima rubisco (VILLAREJO et al., 1995).

ZHANG et al. (1999) investigaram os efeitos da concentração inicial de glicose e da intensidade de luz sobre a velocidade específica de crescimento, a concentração de ficocianina e a concentração celular de *Spirulina platensis* e formularam um modelo matemático para a determinação da concentração ótima de glicose e da intensidade ótima de luz nos cultivos mixotróficos da microalga. Foi observado que existe uma relação inversa entre a concentração inicial de glicose e a intensidade de luz requerida para o crescimento. Assim, em altas incidências luminosas, pequenas concentrações iniciais de glicose inibiam o crescimento. Por

outro lado, em baixas intensidades luminosas, eram necessárias altas concentrações de glicose para a manutenção da cultura.

CHENG & ZHANG (1997), estudaram os cultivos mixotróficos de *Spirulina*, verificando que culturas mixotróficas têm o crescimento celular limitado por baixas intensidades de luz e baixas concentrações de carbono orgânico; ou por altas intensidades luminosas e altas concentrações de carbono orgânico.

Uma vantagem do cultivo mixotrófico de *Spirulina platensis* foi explorada por CHEN & ZHANG (1997) para a produção de ficocianina, sendo obtidas concentrações celulares de até 10 g.L⁻¹. Este tipo de cultivo permite potencialmente que se obtenham maiores concentrações celulares, uma vez que a dificuldade de penetração da luz nas culturas, que prejudicaria a fotossíntese e limitaria o crescimento (MARTÍNEZ et al., 1997) é compensada pela presença da fonte orgânica de carbono para a respiração e biossínteses. Neste mesmo estudo foi observada uma grande fase lag, cerca de 200 horas, no modo heterotrófico de cultivo, enquanto no mixotrófico esta fase não foi evidente, além de resultar em uma quantidade de ficocianina 2,8 vezes maior que em culturas autotróficas.

CHOJNACKA E NOWORYTA (2004) encontraram uma relação crescente entre as velocidades específicas de crescimento e a concentração inicial de glicose até 0,50 g.L⁻¹. Após este valor, aquele parâmetro cinético não foi mais uma função da concentração do substrato orgânico.

4.6 Temperatura nos Cultivos de Microalgas

A temperatura é um dos principais fatores que afetam o crescimento dos organismos vivos, interferindo principalmente na velocidade das reações bioquímicas e na composição celular (VENKATARAMANAI AH et al., 2003; VONSHAK, 1997; LEHNINGER et al., 1995).

A temperatura ótima para o crescimento de *Spirulina* está entre 30 – 38 °C (BELAY, 1997) e este valor pode variar entre diferentes cepas. TOMASELLI et al. (1993) estudaram a faixa de temperaturas que permitiam o crescimento de 32 cepas de *Spirulina*, entre as quais 10 de *S. platensis*, encontrando valores entre 12 e 43 °C. A

maioria das cepas, inclusive de *S. platensis*, não apresentou crescimento abaixo de 15°C ou acima de 40°C, com temperatura ótima de crescimento entre 30 e 35°C.

Segundo RICHMOND (1986), em cultivos sob condições ambientais não controladas, 18°C é a mínima temperatura que permite crescimento de *Spirulina*. Segundo BELAY (1997) este limite cai para 15°C. Em baixas temperaturas ocorre um decréscimo da atividade fotossintética em células de *S. platensis* (VONSHAK, 1997), que alcança ótimo em 35°C. Acima deste valor a concentração de pigmentos fotossintéticos e de proteínas em geral decresce enquanto aumentam as concentrações de carboidratos e lipídios (TOMASELLI et al., 1993).

A atividade respiratória de *Spirulina* no período noturno é incrementada com o aumento das temperaturas, alcançando máximo em 45°C. A atividade respiratória é mais sensível aos extremos de temperatura do que a atividade fotossintética sob as mesmas condições. Enquanto a respiração é completamente inibida em extremos de 15 ou 50°C, a liberação fotossintética de oxigênio foi mantida em cerca de 30% do valor máximo (TORZILLO & VONSHAK, 1994).

Devido às baixas temperaturas em determinadas regiões, a produção da microalga *Spirulina* só é possível durante alguns meses do ano, o que representa um inconveniente, uma vez que os cultivos devem ser inoculados novamente após o final do período frio. Nestas regiões a manutenção das culturas durante o inverno, representa um desafio para as empresas produtoras da biomassa microalgal (JIMÉNEZ et al., 2003B; HASE et al., 2000; BELAY, 1997).

4.7 Iluminância nos Cultivos de Microalgas

A iluminância está relacionada à atividade fotossintética e exerce pouca influência no metabolismo respiratório, envolvendo a via glicolítica, o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa mitocondrial (YANG, 2000).

Os efeitos da luz e da temperatura sobre o crescimento da *Spirulina* não são independentes, de modo que, em climas frios a temperatura é o fator limitante do crescimento e as variações na intensidade luminosa não o influenciam significativamente; enquanto em climas amenos a temperatura deixa de ser o fator

limitante e as alterações na incidência luminosa passam a exercer maior influência sobre o crescimento (VONSHAK et al., 1982).

Níveis extremos de iluminância no cultivo de microalgas podem conduzir a dois processos desfavoráveis ao crescimento. A fotoinibição ocorre quando o fluxo de fótons absorvido pelos cloroplastos é tão alto que a concentração de elétrons de alta energia na célula é excessiva para ser consumida pelo Ciclo de Calvin. Estes elétrons de alta energia reagem com água, formando peróxido de hidrogênio, tóxico às células (CHOJNACKA & NOWORYTA, 2004; GRIMA et al., 1996).

A fotolimitação é um dos principais problemas no cultivo de microalgas, que ocorre devido ao sombreamento que as células da superfície causam nas células em maiores profundidades no interior de meio de cultivo (MOHANTY et al., 1997). VONSHAK et al. (1982) encontraram 0,40 – 0,50 g.L⁻¹ como ótima concentração celular para a máxima eficiência fotossintética em cultivos de *Spirulina*, e nesta concentração é estimado que a 2 – 3 cm da superfície cerca de 80% das células seja exposta a escuridão completa durante alguns instantes.

Para a produção comercial é desejável que se mantenham altas produtividades em cultivos densos, de modo a aumentar a eficiência da operação de filtração para a colheita da microalga (RICHMOND & GROBBELAAR, 1986), porém a ocorrência da fotolimitação torna este objetivo difícil de ser alcançado. No sentido de evitar este problema pode ser mais interessante manter cultivos com pequenas profundidades e mais densos, que manter cultivos em maior profundidade, porém menos densos (VONSHAK, 1997).

A incidência de luz no interior do meio de cultura é um dos principais problemas também no aumento de escala em fotobiorreatores para o cultivo de microalgas (VERNEREY et al., 2001).

Em cultivos mixotróficos o crescimento celular não é estritamente dependente da fotossíntese, devido à presença de um substrato orgânico para a manutenção dos processos metabólicos e de crescimento e a luz deixa de ser um fator indispensável ao crescimento como é em cultivos autotróficos (YANG et al., 2000).

CORNET (1995) desenvolveu um modelo matemático que relaciona a transferência de energia radiante com a cinética do crescimento de *Spirulina platensis*. O modelo permite obter o perfil de iluminância no interior das culturas e sua relação com o crescimento de microrganismos fotossintéticos. Nos cultivos de *Spirulina* a velocidade específica de crescimento é uma função da irradiância média no interior do meio líquido, e não da irradiância total incidente (GRIMA, 1996) e diminui com o aumento na densidade celular (VONSHAK et al., 1982).

Embora a respiração no período claro não seja influenciada pela luz (YANG et al., 2000), quanto maior a intensidade luminosa durante o período claro, maior a taxa respiratória da *Spirulina* durante a noite, resultando na perda noturna de biomassa (TORZILLO et al., 1991), que pode consumir até 35% da massa celular produzida durante o dia através da respiração que mantém a atividade celular na ausência de luz.

4.8 Fotobiorreatores para Produção de *Spirulina*

O tipo de fotobiorreator empregado no cultivo de microalgas está relacionado a uma série de variáveis com influência no crescimento celular. Entre elas, a contaminação das culturas (TORZILLO, 1997), a evaporação de água do meio (VONSHAK & RICHMOND, 1988), os gradientes de intensidade luminosa no interior do meio líquido (GRIMA et al., 1996) e os níveis e variações de temperatura, intensidade luminosa e dos ciclos claro-escuro (HASE et al., 2000).

Fotobiorreatores fechados, como os tubulares (TRAVIESO et al., 2001) reduzem os problemas de contaminação das culturas e evaporação de água do meio, além de facilitar a instalação de controle de temperatura. Apresentam, porém como inconveniente, a dificuldade de liberação de O₂ dissolvido, que em concentrações de 30 mg.L⁻¹ exerce um efeito prejudicial ao crescimento e sobre a síntese de proteínas. Além disso, o superaquecimento da cultura em 10 a 15°C acima do ótimo de crescimento é comum neste tipo de fotobiorreator, e a circulação da cultura, normalmente realizada por bombas, pode causar quebra dos tricomas (TORZILLO, 1997).

O gradiente de iluminância no interior do fotobiorreator, que depende da altura das culturas e da densidade celular, pode ser reduzido em reatores do tipo flate-

plate (RICHMOND et al., 2003) com um caminho óptico reduzido, ou em cultivos mantidos em baixas densidades celulares (VONSHAK, 1982), o que nem sempre é desejável (CHEN et al., 1997).

A contaminação das culturas de *Spirulina* não é um problema restritivo ao uso de fotobiorreatores abertos para o cultivo de *Spirulina*, devido ao alto pH (acima de 9) em que se desenvolve, sendo pouco suscetível à contaminação por outros microrganismos. Embora fotobiorreatores abertos dificultem ou impossibilitem o controle de certas variáveis, como temperatura e evaporação, com influência no crescimento da microalga, sistemas abertos expostos a condições ambientais naturais são os mais utilizados para o cultivo de *Spirulina* em grande escala (JIMÉNEZ et al., 2003a; BELAY, 1997), devido principalmente ao aproveitamento da energia solar e ao baixo custo e simplicidade de construção e operação.

Os fotobiorreatores para produção comercial de *Spirulina* são geralmente na forma de tanques alongados abertos do tipo *raceway*, com área de até 5000 m², profundidade menor que 0,3m e agitados por pás rotativas. O material empregado para a construção é geralmente concreto ou PVC (JIMÉNEZ et al., 2003a; BELAY, 1997).

O crescimento de microalgas em fotobiorreatores abertos, expostos aos níveis e às variações de temperatura, das intensidades luminosas do ambiente e da duração dos ciclos claro-escuro dependerá destas condições presentes no local do cultivo. Diversos estudos avaliam o potencial de regiões para o cultivo de microalgas avaliando principalmente a relação da temperatura com os parâmetros de crescimento celular (JIMÉNEZ et al., 2003b; HASE et al. 2000). A cobertura dos cultivos por uma estufa plástica foi avaliada por HASE et al. (2000) como uma alternativa de baixo investimento para reduzir os efeitos ambientais prejudiciais, com a vantagem de permitir que a luz solar atinja os cultivos.

4.9 Agitação nos Cultivos de Microalgas

A agitação nas culturas de microalgas está relacionada a uma série de fatores influentes no crescimento celular. A agitação deve impedir a formação de aglomerados celulares, garantindo incidência luminosa suficiente às células (ZHANG et al., 1999; GRIMA et al., 1996; CORNET et al., 1995; OGBONNA et al., 1995),

permitir a captação de CO₂ da atmosfera e a liberação de O₂ do interior do meio líquido (JIMÉNEZ et al., 2003b) e diminuir os gradientes gasosos e de nutrientes no meio (TORZILLO, 1997).

O estresse hidrodinâmico causado por excesso de agitação em culturas de microalgas pode provocar a quebra dos tricomas, com redução em seu tamanho, interferindo na colheita da microalga por filtração (CAMACHO et al., 2001, VONSHAK, et al., 1982).

A exposição das células aos ciclos claro/escuro no interior do fotobiorreator é um fator favorável ao crescimento (JANSSEN et al., 2001; MITSUHASHI et al., 1994), uma vez que manter as células iluminadas constantemente é difícil devido à pequena altura contemplada pela adequada luminosidade (VONSHAK et al., 1982). O ciclo claro/escuro no interior da cultura depende da intensidade da luz, da altura do meio líquido, da agitação e da densidade celular. A agitação insuficiente pode obrigar certas células a um regime de baixa incidência luminosa e até de escuridão, prejudicando seu crescimento (HOSAKA et al., 1995).

Fotobiorreatores abertos do tipo *raceway*, onde se estabelece um fluxo através de uma divisória central são geralmente agitados por pás rotativas. O principal problema deste tipo de agitação é a turbulência insuficiente para garantir um ótimo regime de luz às células (JIMÉNEZ et al., 2004a; VONSHAK, 1997).

4.10 Cultivo Mixotrófico de Outras Microalgas

O modo mixotrófico de cultivo é uma interessante alternativa em culturas que necessitem alcançar altas concentrações celulares, como são as de *Haematococcus lacustris*, uma promissora microalga para a produção comercial de astaxantina natural. Devido à facilidade de contaminação de suas culturas, a microalga não pode ser cultivada em tanques abertos, como *Spirulina* e *Chlorella* (JIMÉNEZ et al., 2003A, HASE et al., 2000). Assim, para que a produção da microalga seja economicamente viável, grandes densidades celulares devem ser obtidas, por serem necessárias a esterilização dos meios de cultivo e a operação asséptica das culturas. Em estudo conduzido por CHEN et al. (1997) foram obtidas concentrações celulares

de *Haematococcus lacustris* aproximadamente duplicadas no modo de cultivo mixotrófico da microalga quando comparado ao heterotrófico.

Chlorella pyrenoidosa foi cultivada mixotroficamente por MARTINEZ et al. (1997), estudando a influência da intensidade luminosa sobre os parâmetros cinéticos do crescimento celular. Este estudo utilizou concentrações de glicose de 0,1 e 0,5 g.L⁻¹ e resultou em velocidade específica de crescimento independente da luz na fase de crescimento exponencial, indicando que as células desta microalga utilizaram predominantemente glicose nesta fase. A produção de astaxantina em células de *Chlorella zofingiensis* foi avaliada em meios contendo 5 – 40 g.L⁻¹ de glicose e foi incrementada pela presença de 30 g.L⁻¹ do substrato orgânico (IP et al., 2004).

Cultivos mixotróficos e autotróficos de *Porphyridium cruentum* foram realizados por FÁBREGAS et al., (1999) com objetivo de compará-los quanto à produção de ficoeritrina e exopolissacarídeos. No cultivo autotrófico foram obtidos, respectivamente, 7 µg.mL⁻¹ e 129 µg.mL⁻¹ destes metabólitos, enquanto no mixotrófico estes valores aumentaram para 10 µg.mL⁻¹ e 330 µg.mL⁻¹.

Marchantia polymorpha foi cultivada mixotroficamente com glicose como substrato orgânico, alcançando, em taxa de iluminância variável, maiores produtividades que as alcançadas quando a iluminância era constante (HATA, 2000). Este resultado é importante do ponto de vista da exploração dos cultivos da microalga em ambientes naturais, sob iluminâncias variáveis (JIMÉNEZ et al., 2003b; VONSHAK & RICHMOND, 1988).

A concentração da microalga *Nannochloropsis gaditana*, utilizada na aqüicultura, foi também incrementada em cultivo mixotrófico utilizando glicose e uréia como fontes adicionais de carbono (ROCHA et al., 2003).

Phaeodactylum tricornutum foi cultivado em acetato, amido, ácido láctico, glicose e glicerol, em diferentes concentrações. Em média o crescimento foi estimulado na presença de todos os substratos orgânicos, exceto acetato, sendo encontradas maiores concentrações celulares em meio suplementado com glicerol 0,1M (GARCÍA et al., 2005).

5 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

**5.1 CULTIVO DA MICROALGA *Spirulina platensis* EM PEQUENA ESCALA E
DIFERENTES CONDIÇÕES AMBIENTAIS**

CULTIVO DA MICROALGA *Spirulina platensis* EM PEQUENA ESCALA E DIFERENTES CONDIÇÕES AMBIENTAIS

Andrade, M. R.; Costa, J. A. V.*

Laboratório de Engenharia Bioquímica, Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rua Engenheiro Alfredo Huch, 475 - CEP 96201-900 – Rio Grande – RS – Brasil, Caixa Postal 474 – Tel: +55(53)233-8653 – *E-mail: dqmjorge@furg.br

RESUMO

Cultivos da microalga *Spirulina platensis* foram realizados em fotobiorreatores fechados de 2L e abertos de 6L, sob condições controladas (30°C, 2500Lux 12h claro/12h escuro) e a condições ambientais naturais no Sul do Brasil. Foram avaliados os efeitos da redução da concentração de nutrientes e da concentração celular inicial sobre os parâmetros de crescimento da microalga. As temperaturas em condições não controladas variaram entre 9,4 e 46,0°C. Em fotobiorreator fechado foram alcançadas concentrações celulares máximas de 1,94 g.L⁻¹, produtividades de 0,112 g.L⁻¹.dia⁻¹ e velocidades específicas de crescimento de 0,322 dia⁻¹, enquanto em fotobiorreator aberto, esses valores foram de 1,73 g.L⁻¹, 0,094 g.L⁻¹.dia⁻¹ e 0,160 dia⁻¹, respectivamente. A inoculação com 0,40 g.L⁻¹ de biomassa em condições não controladas proporcionou maiores parâmetros de crescimento, enquanto cultivos em condições controladas atingiram melhores parâmetros quando inoculados com 0,15 g.L⁻¹ de biomassa. As concentrações de inóculo e de meio Zarrouk podem ser combinadas de modo a serem obtidos parâmetros de crescimento em cultivos sem controle adicional de variáveis ambientais comparáveis ou, até mesmo, superiores àqueles obtidos em cultivos sob temperatura, iluminação e fotoperíodo controlados.

PALAVRAS-CHAVE: fotobiorreator, microalga, *Spirulina platensis*.

ABSTRACT

Spirulina platensis grew in closed (2L) or open (6L) photobioreactors, under controlled or not controlled growth conditions, in southern of Brazil. We assessed the effects of nutrient concentration and initial biomass on growth parameters. Temperatures ranged from 9.4 to 46.0°C. Cultures in closed photobioreactor reached cell concentration of 1.79 g.L⁻¹, productivity of 0.112 g.L⁻¹.day⁻¹ e specific growth rate of 0.322 day⁻¹. Cultures in open photobioreactor reached 1.73 g.L⁻¹, 0.094 g.L⁻¹.day⁻¹ and 0.160 day⁻¹, respectively. Inoculation with 0.40 g.L⁻¹ in cultures under not controlled conditions increased growth parameters, while cultures under controlled conditions reached better growth parameters when inoculate with 0.15 g.L⁻¹. Initial biomass and Zarrouk concentration can be combined to get good growth parameters in cultures without additional control of climatic variables, reaching similar, or even better to that one in cultures under controlled conditions.

KEYWORDS: microalga, photobioreactor, *Spirulina platensis*.

1 INTRODUÇÃO

O aproveitamento da energia solar nos cultivos de microalgas tem despertado o interesse de pesquisadores e investidores. A *Spirulina* é uma das microalgas mais estudadas e produzidas no mundo, devido suas propriedades nutricionais e terapêuticas. A biomassa, cultivada em meio líquido, é desidratada e utilizada na dieta humana ou animal.

O crescimento de microalgas é influenciado por fatores como temperatura, intensidade luminosa, duração dos ciclos claro-escuro (HASE et al., 2000), modo e intensidade de agitação (HOSAKA et al., 1995), e é suscetível à contaminação, evaporação (VONSHAK & RICHMOND, 1988) e aos gradientes de intensidade luminosa no interior do fotobiorreator (GRIMA et al., 1996).

Fotobiorreatores fechados facilitam os controles de temperatura e iluminância e reduzem o risco de contaminação (TRAVIESO et al., 2001; TORZILLO et al., 1986). O gradiente de iluminância no interior do fotobiorreator, que depende da altura das culturas e da densidade celular, pode ser reduzido em reatores do tipo flate-plate (RICHMOND et al., 2003) ou em cultivos mantidos em baixas densidades celulares, o que nem sempre é desejável (CHEN et al., 1997).

Apesar de todos os inconvenientes, fotobiorreatores abertos expostos a condições ambientais naturais são os mais utilizados para o cultivo de microalgas em grande escala (JIMÉNEZ et al., 2003; BELAY, 1997), devido principalmente ao aproveitamento da energia solar e ao baixo custo e simplicidade de construção e operação, embora geralmente com baixas produtividades.

Cultivos em fotobiorreatores abertos são suscetíveis às condições climáticas presentes no local de cultivo, que influenciam diretamente o crescimento de microalgas, assim é importante avaliar o potencial de regiões para a produção destes organismos (JIMÉNEZ et al., 2003; HASE et al., 2000). A cobertura dos fotobiorreatores por uma estufa plástica pode ser uma alternativa de baixo investimento para reduzir os efeitos ambientais prejudiciais (HASE et al., 2000).

Os nutrientes são importantes componentes dos custos de produção, e a redução em sua concentração, sem diminuir a produtividade, pode ser uma alternativa para tornar os cultivos mais atrativos economicamente (VONSHAK, 1997). O meio de

cultivo para a *Spirulina* foi formulado por ZARROUK (1966), e a maioria dos trabalhos encontrados na literatura utiliza este meio padrão, porém recentes estudos encontraram máxima produtividade da microalga utilizando meio Zarrouk 20% (v/v) (REINEHR, 2003).

O objetivo deste trabalho foi estudar o cultivo da microalga *Spirulina platensis* em diferentes condições ambientais e configurações de fotobiorreatores, avaliando a influência da disponibilidade de nutrientes no meio e da concentração celular inicial no crescimento da microalga.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo e Meio de Cultivo

Foi utilizada a microalga *Spirulina platensis* cepa LEB-52 (COSTA et al., 2004) em meio de cultivo Zarrouk (ZARROUK, 1966) diluído a 10 ou 20% (v/v) em água, preparado a partir de sais com grau analítico. Os inóculos foram adaptados às respectivas condições experimentais durante 3 dias antes do início dos ensaios.

2.2 Fotobiorreatores

Foram utilizados fotobiorreatores fechados de vidro do tipo erlenmeyers de 2L, com volume útil de 1,8L, com agitação contínua através da injeção de ar estéril por bombas de diafragma, e equipados com sistema de retirada asséptica de amostra; e fotobiorreatores abertos do tipo *raceway* de 6L, com volume útil de 5L, e área superficial de 0,13 m², construídos em acrílico. A agitação das culturas foi contínua realizada por pás acrílicas rotativas a 18 rpm.

2.3 Condições de Cultivo

Foram realizados cultivos sob condições controladas a 30 °C, 2500 Lux e fotoperíodo de 12 h claro/escuro, com iluminação provida por lâmpadas fluorescentes de 40 W. Simultaneamente foram realizados cultivos em condições não controladas, protegidos por um túnel plástico transparente com proteção UV (FT AUV – 150; Zanatta Florestal), exposto a condições ambientais naturais no Sul do Brasil (32,05° S; 52,11° W) durante os meses de maio e junho de 2004.

Os cultivos foram descontínuos, iniciando com concentrações celulares de 0,15 ou 0,40 g.L⁻¹, e mantidos até a fase de morte celular ou durante 50 dias, sem controle

adicional de pH. O volume das culturas em fotobiorreatores abertos foi mantido constante pela reposição diária da água perdida por evaporação.

2.4 Planejamento Experimental

Os cultivos foram realizados em duplicatas, segundo um planejamento experimental fatorial completo 2^3 (BOX et al., 1978) para cada tipo de fotobiorreator. Os fatores estudados foram as condições ambientais, a concentração de meio Zarrouk e a concentração de inóculo, cujos níveis reais e codificados são apresentados na Tabela 1. As Tabelas 2 e 3 apresentam a matriz do planejamento experimental em níveis codificados das variáveis estudadas nos cultivos em fotobiorreatores fechados e abertos, respectivamente.

Tabela 1 Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento experimental fatorial completo 2^3

Variável	Níveis codificados	
	-1	+1
Condições ambientais	Controladas	Não controladas
Meio Zarrouk (% v/v)	10	20
Inóculo (g.L⁻¹)	0,15	0,40

2.5 Respostas Estudadas e Análise Estatística

Foram avaliadas a concentração celular máxima ($X_{máx}$), a produtividade máxima ($P_{máx}$) e a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) obtidas nos cultivos. A produtividade (P em g.L⁻¹.dia⁻¹), foi obtida segundo a Equação 1, onde X_t é a concentração celular (g.L⁻¹) no tempo t (dia) e X_0 (g.L⁻¹) a concentração celular no tempo t_0 (SCHMIDELL et al., 2001).

$$P = (X_t - X_0)/t - t_0 \quad (\text{Eq. 1})$$

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) foi obtida por regressão exponencial aplicada à fase de crescimento exponencial (BAILEY & OLLIS, 1986). Os resultados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) com um nível de significância de 90% ($p < 0,10$).

2.6 Determinações Analíticas

A concentração celular de *Spirulina platensis* foi determinada a cada 24 h através da densidade ótica das culturas a 670 nm (COSTA et al., 2002) medida em espectrofotômetro (FEMTO 700-Plus). Diariamente foram registradas no interior do túnel as temperaturas máximas e mínimas do ar, por termômetro digital, e a iluminância, com luxímetro (Minipa MLM 1332). O pH das culturas foi determinado a cada três dias com pHmetro digital (Quimis Q.400H).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Cultivos em Condições Controladas

A Figuras 1 e 3 apresentam a concentração celular de *Spirulina platensis* ao longo do tempo nos cultivos. Cultivos em fotobiorreatores fechados inoculados com $0,15 \text{ g.L}^{-1}$ (Ensaio 1 e 3) apresentaram crescimento por cerca de 45 dias e alcançaram maiores concentrações celulares ($1,94 \text{ g.L}^{-1}$) comparadas àquelas em cultivos inoculados com $0,40 \text{ g.L}^{-1}$ ($1,27 \text{ g.L}^{-1}$, Ensaio 5 e 7), que atingiram máximos em torno de 27 dias. Em fotobiorreatores abertos a inoculação com $0,15 \text{ g.L}^{-1}$ também resultou em crescimento por cerca de 45 dias alcançando maiores concentrações ($1,55 \text{ g.L}^{-1}$) que cultivos inoculados com $0,40 \text{ g.L}^{-1}$, que permaneceram em crescimento por 30 dias e atingiram $1,07 \text{ g.L}^{-1}$. A maior concentração celular inicial pode ter causado o esgotamento de nutrientes, uma vez que, comparando-se cultivos com diferentes concentrações de meio Zarrouk e todas as demais variáveis constantes percebe-se que aqueles com meio Zarrouk 10% (v/v) entraram em fase de morte antes que aqueles com 20%.

A produtividade máxima (Tabelas 2 e 3) também foi reduzida com o aumento na concentração celular inicial em ambos tipos de fotobiorreatores. Em cultivos inoculados com $0,15 \text{ g.L}^{-1}$ as produtividades, após 10 dias, permaneceram constantes em torno de $0,040 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, enquanto em cultivos inoculados com $0,40 \text{ g.L}^{-1}$ as produtividades decresceram ao longo do tempo, mantendo-se em torno de $0,020 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ (Figuras 2 e 4). Manter altas produtividades com o aumento da concentração celular é importante do ponto de vista econômico (VONSHAK et al., 1982) e um desafio nos cultivos de microalgas, uma vez que o aumento da densidade celular prejudica a incidência luminosa e, em cultivos descontínuos, implica em queda

na pressão osmótica do meio, devido ao consumo de nutrientes, ambos fatores com potencial efeito sobre as produtividades.

Tabela 2 Planejamento experimental e parâmetros de crescimento avaliados nos cultivos em fotobiorreatores fechados (média \pm desvio padrão)

Ensaio	Variáveis codificadas			Parâmetros de crescimento avaliados		
	X ₁	X ₂	X ₃	X _{máx}	P _{máx}	μ _{máx}
1	-1	-1	-1	1,79 \pm 0,17	0,056 \pm 0,002	0,075 \pm 0,001
2	+1	-1	-1	0,91 \pm 0,12	0,065 \pm 0,001	0,257 \pm 0,001
3	-1	+1	-1	1,94 \pm 0,23	0,059 \pm 0,004	0,059 \pm 0,009
4	+1	+1	-1	1,10 \pm 0,08	0,094 \pm 0,006	0,322 \pm 0,002
5	-1	-1	+1	0,89 \pm 0,04	0,040 \pm 0,002	0,081 \pm 0,009
6	+1	-1	+1	1,00 \pm 0,02	0,089 \pm 0,006	0,168 \pm 0,037
7	-1	+1	+1	1,27 \pm 0,01	0,037 \pm 0,001	0,057 \pm 0,021
8	+1	+1	+1	1,16 \pm 0,04	0,112 \pm 0,001	0,215 \pm 0,005

X₁: Condições ambientais; X₂: Meio Zarrouk; X₃: Concentração de inóculo; X_{máx}: concentração celular máxima (g.L⁻¹); P_{máx}: produtividade máxima (g.L⁻¹.dia⁻¹); μ_{máx}: velocidade específica máxima de crescimento (dia⁻¹)

Tabela 3 Planejamento experimental e parâmetros de crescimento avaliados nos cultivos em fotobiorreatores abertos (média \pm desvio padrão)

Ensaio	Variáveis codificadas			Parâmetros de crescimento avaliados		
	X ₁	X ₂	X ₃	X _{máx}	P _{máx}	μ _{máx}
9	-1	-1	-1	1,21 \pm 0,07	0,047 \pm 0,004	0,102 \pm 0,001
10	+1	-1	-1	0,83 \pm 0,01	0,043 \pm 0,008	0,113 \pm 0,017
11	-1	+1	-1	1,55 \pm 0,19	0,057 \pm 0,003	0,082 \pm 0,003
12	+1	+1	-1	1,33 \pm 0,06	0,054 \pm 0,007	0,160 \pm 0,046
13	-1	-1	+1	0,85 \pm 0,01	0,039 \pm 0,000	0,053 \pm 0,004
14*	+1	-1	+1	1,32	0,077	0,153
15	-1	+1	+1	1,07 \pm 0,11	0,047 \pm 0,001	0,031 \pm 0,002
16	+1	+1	+1	1,73 \pm 0,04	0,094 \pm 0,019	0,146 \pm 0,004

X₁: Condições ambientais; X₂: Meio Zarrouk; X₃: Concentração de inóculo; X_{máx}: concentração celular máxima (g.L⁻¹); P_{máx}: produtividade máxima (g.L⁻¹.dia⁻¹); μ_{máx}: velocidade específica máxima de crescimento (dia⁻¹). *Ensaio sem réplica.

A velocidade específica máxima de crescimento diminuiu, em ambos tipos de fotobiorreator, ao compararmos cultivos com 10 e 20% (v/v) de meio Zarrouk, respectivamente (Tabelas 2 e 3). O aumento na concentração de inóculo não influenciou a velocidade específica máxima de crescimento em fotobiorreatores fechados, e a fez decrescer em abertos (Tabelas 4 e 5).

O pH nos cultivos em ambos os tipos de fotobiorreatores foi semelhante e esteve em torno de 9,5. O pH ótimo para desenvolvimento da *Spirulina* está entre 9,5 e 10,5 (RICHMOND & GROBBELAAR, 1986), de modo que este resultado permite afirmar que o crescimento não foi limitado pelo pH do meio de cultivo.

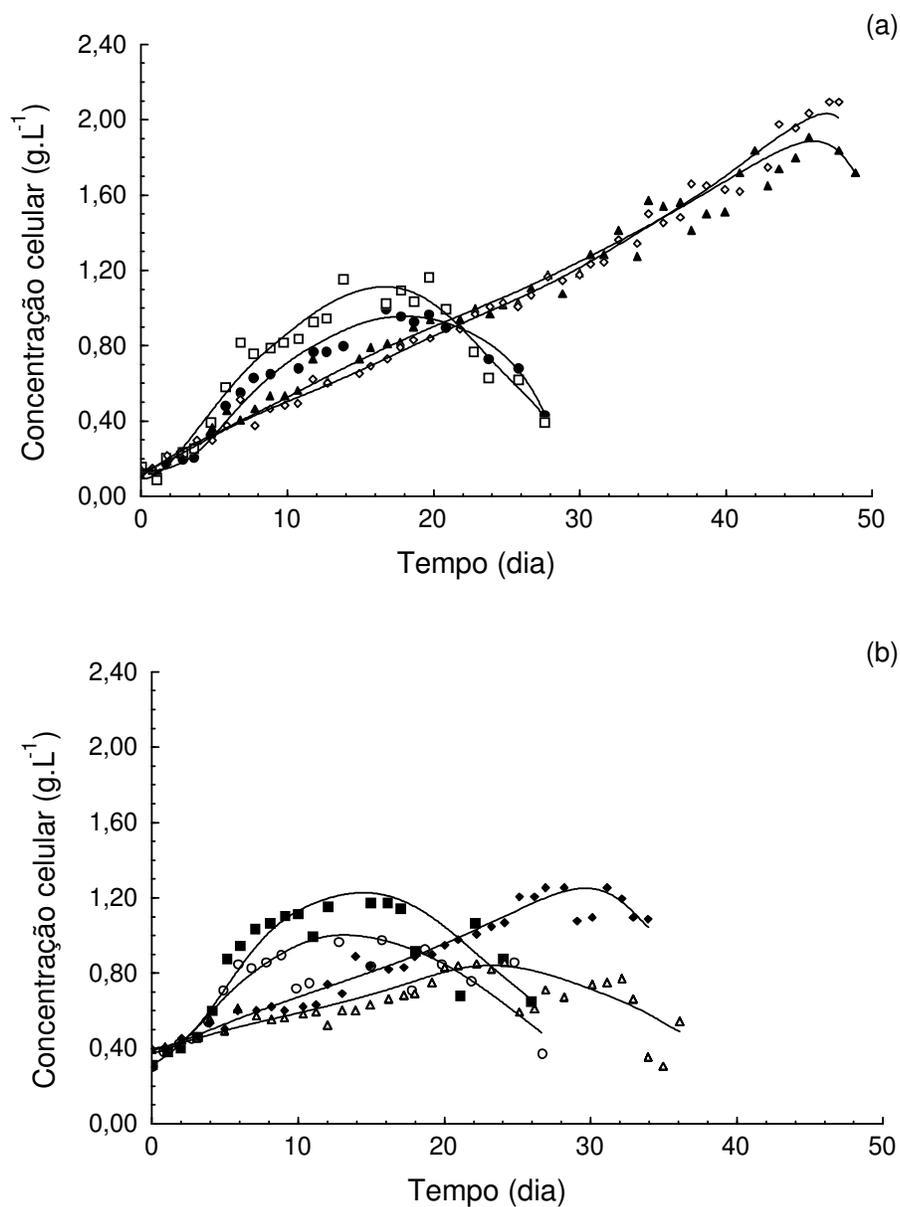


Figura 1 Crescimento da microalga *Spirulina platensis* em fotobiorreatores fechados (a) Ensaio 1(▲)CC, Z=10, $X_0=0,15$, 2(●)CNC, Z=10, $X_0=0,15$, 3(◇)CC, Z=20, $X_0=0,15$ e 4(□)CNC, Z=20, $X_0=0,15$; (b) Ensaio 5(△)CC, Z=10, $X_0=0,40$, 6(○)CNC, Z=10, $X_0=0,40$, 7(◆)CC, Z=20, $X_0=0,40$ e 8(■)CNC, Z=20, $X_0=0,40$. CC: Condições controladas; CNC: Condições não controladas; Z: Meio Zarrouk (% v/v); X_0 : Concentração de inóculo ($g.L^{-1}$)

3.2 Cultivos em Condições não Controladas (túnel)

Nos cultivos em fotobiorreatores fechados (Ensaio 2, 4, 6 e 8) as máximas concentrações celulares foram alcançadas em cerca de 17 dias (Figura 1) e em aberto (Ensaio 10, 12, 14 e 16), em cerca de 23 dias (Figura 3). A concentração decresceu rapidamente após serem atingidos os máximos. A máxima concentração celular foi pouco influenciada pela concentração de inóculo em fotobiorreatores fechados, enquanto em fotobiorreatores abertos o aumento na concentração de inóculo provocou um incremento de $0,40 \text{ g.L}^{-1}$ nas máximas concentrações celulares alcançadas.

Cultivos em ambos tipos de fotobiorreatores tiveram a produtividade incrementada pelo aumento na concentração celular inicial. Os ensaios atingiram as máximas produtividades dentro de 8 dias (Figuras 2 e 4), sendo alcançados, em média, $0,112 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ em fotobiorreatores fechados e $0,094 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ em fotobiorreatores abertos.

As máximas concentrações celulares alcançadas são um parâmetro de crescimento importante em cultivos onde a obtenção de altas densidades celulares seja imperativa para a viabilidade econômica, como são os cultivos de microalgas com elevados custos de operação, devido principalmente às necessidades de esterilização do meio e operação asséptica dos cultivos (CHEN et al., 1997). A produtividade máxima, por sua vez, considera a relação entre a concentração celular e o tempo de cultivo, indicando o desempenho de um processo, e pode definir o tempo de duração de um cultivo descontínuo para eficiente produção de biomassa.

O aumento na concentração de inóculo causou um decréscimo na velocidade específica máxima de crescimento, que pode estar relacionado à menor disponibilidade de nutrientes nos cultivos inoculados com o maior número de células devido a seu consumo no decorrer do tempo. Outro resultado que reforça esta hipótese foi o acréscimo nas velocidades específicas máximas de crescimento em ambos tipos de fotobiorreatores causado pelo aumento na concentração de meio Zarrouk. Foram alcançados $0,322 \text{ dia}^{-1}$ e $0,160 \text{ dia}^{-1}$, respectivamente em fotobiorreatores fechados e abertos, ambos com o maior nível de meio Zarrouk. Velocidades específicas na faixa de $0,300$ a $0,500 \text{ dia}^{-1}$ são típicas em cultivos autotróficos de *Spirulina* (CHOJNACKA & NOWORYTA, 2004; Zhang et al., 1999; Marquez et al., 1993), porém em meio Zarrouk padrão.

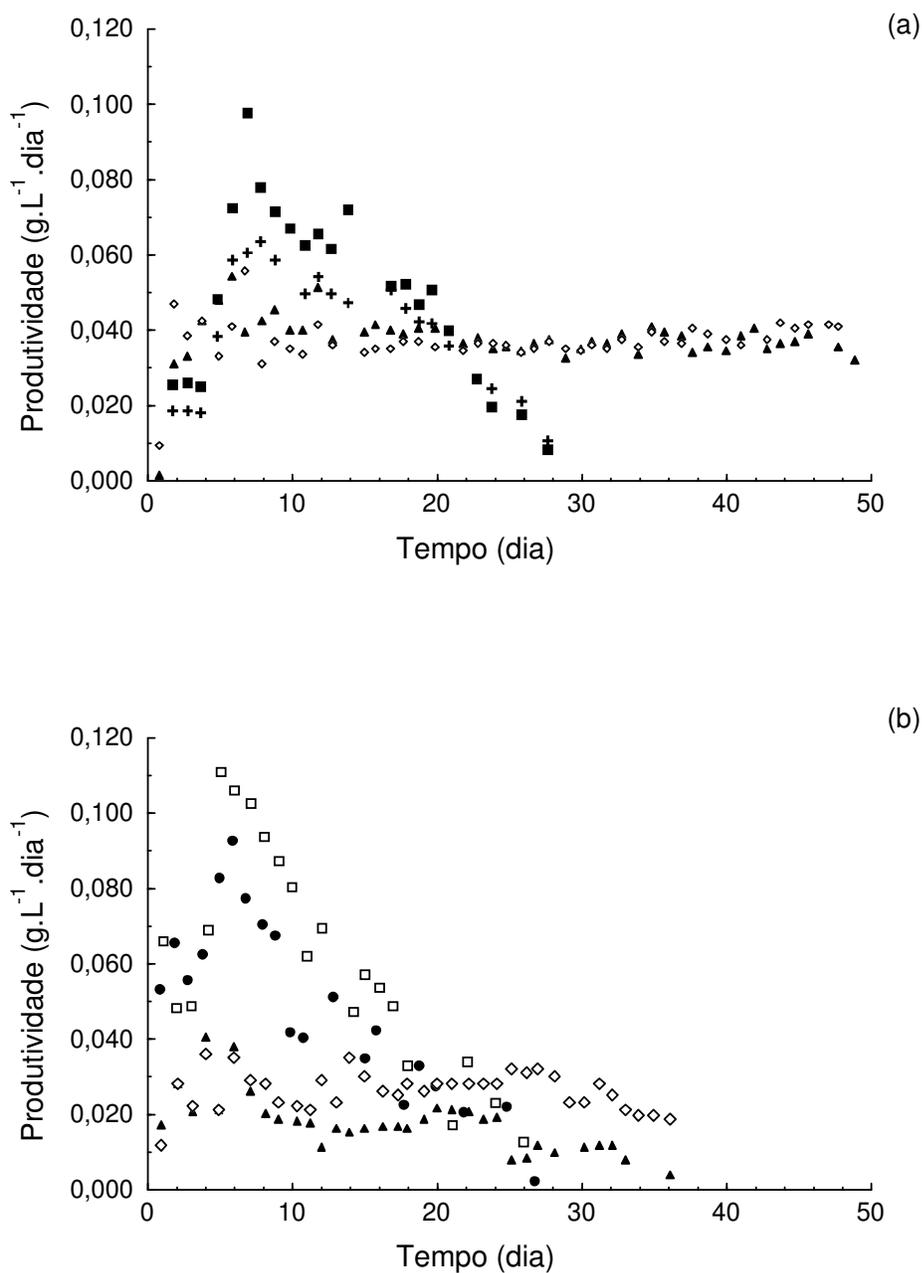


Figura 2 Produtividade da microalga *Spirulina platensis* em fotobiorreatores fechados. (a) Ensaios 1(▲)CC, Z=10, $X_0=0,15$, 2(+)CNC, Z=10, $X_0=0,15$, 3(◇)CC, Z=20, $X_0=0,15$ e 4(■)CNC, Z=20, $X_0=0,15$; (b) Ensaios 5(▲)CC, Z=10, $X_0=0,40$, 6(●)CNC, Z=10, $X_0=0,40$, 7(◇)CC, Z=20, $X_0=0,40$ e 8(□)CNC, Z=20, $X_0=0,40$. CC: Condições controladas; CNC: Condições não controladas; Z: Meio Zarrouk (% v/v); X_0 : Concentração de inóculo ($g.L^{-1}$)

A ANOVA (Tabelas 4 e 5) mostra que as condições ambientais foram o fator de maior influência sobre os parâmetros máximos de crescimento avaliados, exceto sobre a concentração máxima em fotobiorreatores abertos. Os níveis e as variações de temperatura e iluminância a que estiveram expostos os cultivos sob condições não controladas proporcionaram um acelerado crescimento celular, porém este conjunto de fatores pode propiciar uma situação de estresse às células, culminando com sua morte em curto período. Este efeito foi mais acentuado em fotobiorreatores fechados, onde a existência de uma barreira sólida faz com que as trocas térmicas entre o meio e o ambiente ocorram por condução através das paredes do fotobiorreator. Como consequência, altas temperaturas são alcançadas no interior do meio líquido aquecido pela radiação solar, gerando um microambiente desfavorável ao crescimento da microalga. Em fotobiorreatores abertos este problema é minimizado devido às trocas de calor serem facilitadas por convecção.

De acordo com o acompanhamento da produtividade ao longo do tempo em fotobiorreatores fechados (Figura 2) e abertos (Figura 4) percebe-se uma tendência de queda neste parâmetro durante os 4 primeiros dias de cultivo. No mesmo período foram registradas as maiores temperaturas do ar no interior do túnel (Figura 5). Quanto maior a intensidade de luz durante o período diurno, mais elevadas as taxas respiratórias no período escuro (TORZILLO & VONSHAK, 1994), que consomem biomassa, diminuindo a produtividade líquida, uma vez que parte das células produzidas durante o dia é consumida durante a noite (TORZILLO et al., 1991). Porém, a atividade respiratória de *Spirulina* no período noturno aumenta com o aumento das temperaturas, alcançando máximo em 45°C, assim, a queda natural de temperatura que ocorre à noite nos cultivos sob condições não controladas pode ser um fator desfavorável ao consumo respiratório de biomassa, resultando em maiores produtividades (TORZILLO & VONSHAK, 1994)

Normalmente, o pH em cultivos da microalga *Spirulina* aumenta no decorrer do tempo (PELIZER et al., 2003; HASE et al., 2000) devido ao consumo de bicarbonato (HCO_3^-) do meio Zarrouk e à formação de carbonato (CO_3^{2-}) (BINAGHI et al., 2003). Os cultivos apresentaram um aumento de pH no início, seguido de uma queda acentuada, e estabilização em torno de 9,5. Cultivos em fotobiorreatores fechados alcançaram pH 12, enquanto em fotobiorreatores abertos o máximo valor encontrado foi 11,3. O pH pode ter sido um fator limitante do crescimento celular de

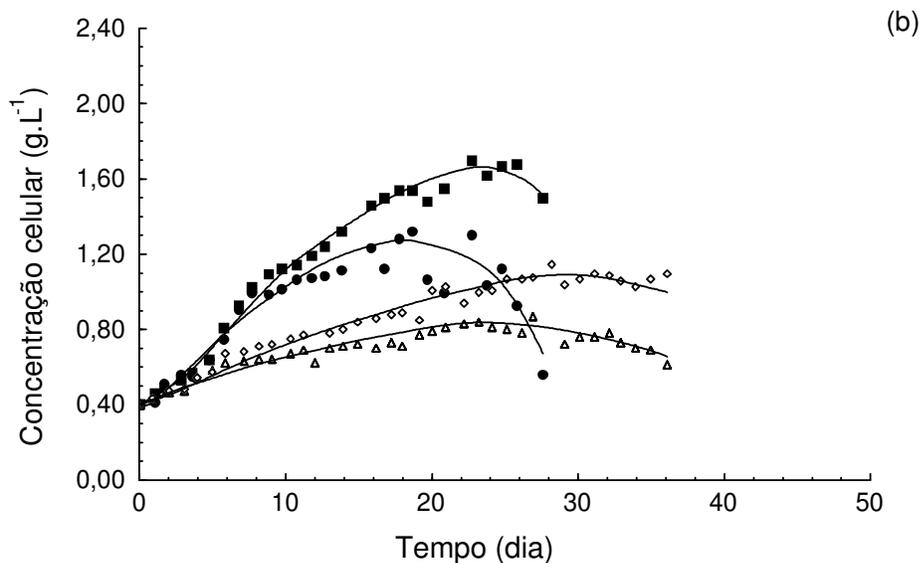
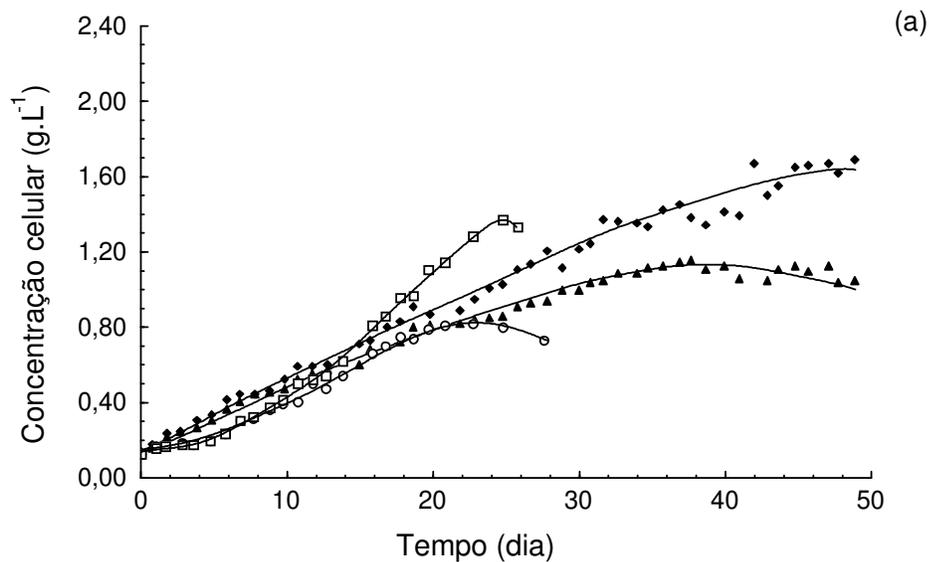


Figura 3 Crescimento da microalga *Spirulina platensis* em fotobiorreatores abertos. (a) Ensaio 9(▲)CC, Z=10, $X_0=0,15$, 10(O)CNC, Z=10, $X_0=0,15$, 11(◆)CC, Z=20, $X_0=0,15$ e 12(□)CNC, Z=20, $X_0=0,15$; (b) Ensaio 13(△)CC, Z=10, $X_0=0,40$, 14(●)CNC, Z=10, $X_0=0,40$, 15(◇)CC, Z=20, $X_0=0,40$ e 16(■)CNC, Z=20, $X_0=0,40$. CC: Condições controladas; CNC: Condições não controladas; Z: Meio Zarrouk (% v/v); X_0 : Concentração de inóculo ($g.L^{-1}$)

Spirulina, que ocorre entre pH 9,5 e 10,5, (PELIZER et al., 2003) sendo inibido rapidamente acima destes valores, enquanto abaixo deste intervalo de pH os cultivos passam a ser suscetíveis à contaminação por outras microalgas, como a *Chlorella* (RICHMOND & GROBBELAAR, 1986).

3.3 Comparação entre as duas Condições Ambientais

Os efeitos da concentração celular inicial sobre o crescimento da microalga verificados nos cultivos sugerem uma relação com a penetração de luz no interior do meio líquido. Sob condições não controladas, onde a luz solar proporcionou iluminâncias de até 150 000 Lux, o aumento da densidade celular provoca sombreamento às camadas inferiores do meio líquido (VONSHAK et al., 1982) e o gradiente de iluminância entre a superfície e o interior do meio pode ter diminuído o efeito prejudicial da alta intensidade luminosa, conhecido por fotoinibição (LU & VONSHAK, 1999; CHANAWONGSE et al., 1994); enquanto em condições controladas, onde os cultivos recebiam 2500 Lux, a maior concentração celular pode ter tornado a luz o fator limitante do crescimento, fenômeno conhecido por fotolimitação (CHOJNACKA E NOWORYTA, 2004). Ainda assim, as máximas concentrações obtidas em fotobiorreatores fechados foram maiores que aquelas alcançadas em cultivos de *Spirulina* realizados por MARQUEZ et al. (1993), porém usando meio padrão, sem diluição.

A Figura 1 possibilita visualizar o efeito da concentração de meio Zarrouk nos cultivos em fotobiorreatores fechados, que segundo a ANOVA (Tabela 4), apresentou significância estatística ($p < 0,10$) sobre as máximas concentrações celulares. Independente das condições ambientais a que estiveram expostos os fotobiorreatores, e da concentração em que foram inoculados, cultivos com meio Zarrouk 20% v/v (Ensaio 3, 4, 7 e 8) apresentaram concentrações máximas, em média $0,22 \text{ g.L}^{-1}$ (Tabela 4) maiores que aquelas alcançadas em cultivos com meio Zarrouk 10% v/v (Ensaio 1, 2, 5 e 6). Em fotobiorreatores abertos o mesmo efeito foi percebido, e cultivos com meio Zarrouk 20% v/v (Ensaio 11, 12, 15 e 16) apresentaram concentrações celulares em média $0,37 \text{ g.L}^{-1}$ mais altas que cultivos com meio 10% v/v (Ensaio 9, 10, 13 e 14).

Além de alcançar máximas concentrações celulares, cultivos com nível superior de meio inorgânico (Ensaio 3, 4, 7 e 8, Figura 1; Ensaio 11, 12, 13 e 14,

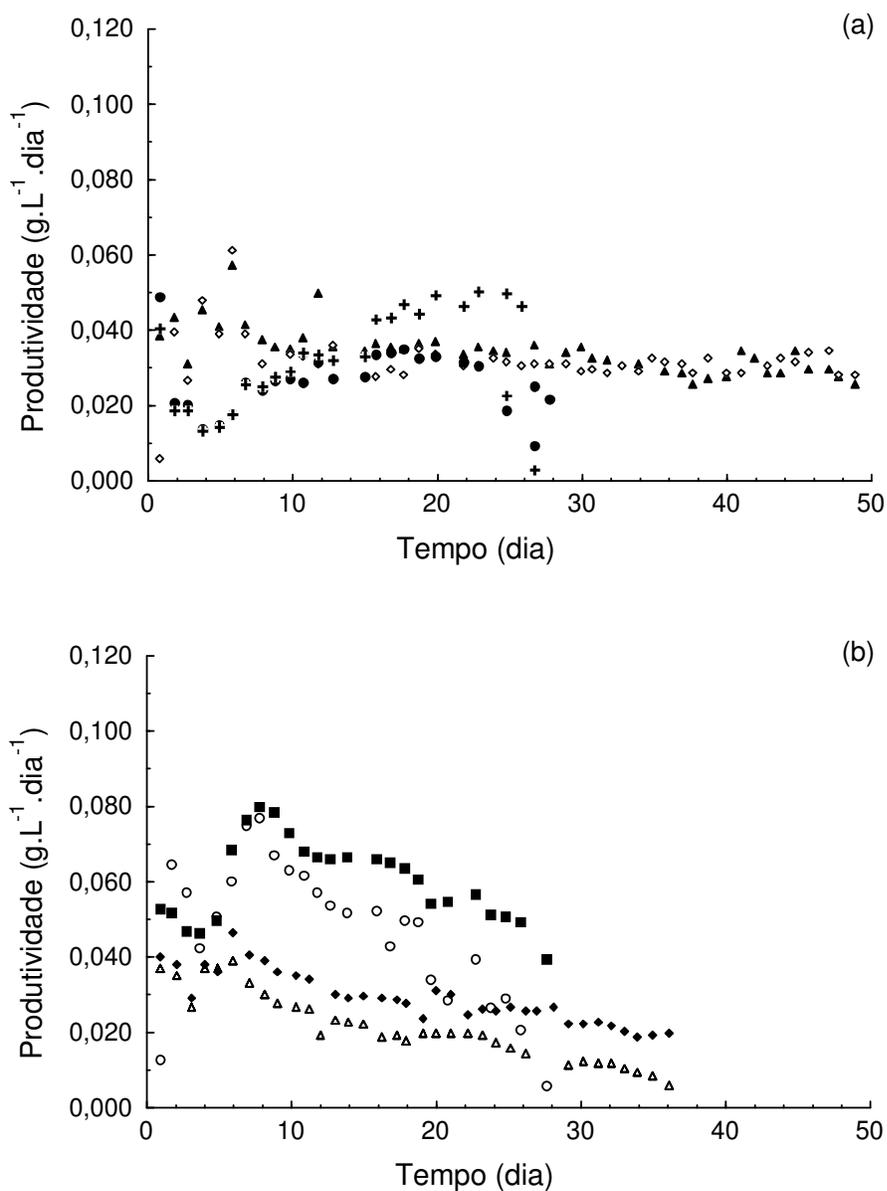


Figura 4 Produtividade da microalga *Spirulina platensis* em fotobiorreatores abertos. (a) Ensaio 9(▲)CC, Z=10, $X_0=0,15$, 10(●)CNC, Z=10, $X_0=0,15$, 11(◇)CC, Z=20, $X_0=0,15$ e 12(+)CNC, Z=20, $X_0=0,15$; (b) Ensaio 13(△)CC, Z=10, $X_0=0,40$, 14(○)CNC, Z=10, $X_0=0,40$, 15(◆)CC, Z=20, $X_0=0,40$ e 16(■)CNC, Z=20, $X_0=0,40$. CC: Condições controladas; CNC: Condições não controladas; Z: Meio Zarrouk (% v/v); X_0 : Concentração de inóculo ($g.L^{-1}$)

Figura 3) apresentaram, durante todo o experimento, concentrações celulares superiores aos correspondentes cultivos com o nível inferior deste fator.

Tabela 4 Análise de Variância aplicada à concentração, produtividade e velocidade específica de crescimento máximas nos cultivos em fotobiorreatores fechados

Variável	$X_{\text{máx}}$		$P_{\text{máx}}$		$\mu_{\text{máx}}$	
	Efeito	p	Efeito	p	Efeito	p
Média	1,26*	< 0,001	0,068*	< 0,001	0,153*	< 0,001
X₁	-0,43*	< 0,001	0,043*	< 0,001	0,172*	< 0,001
X₂	0,22*	0,005	0,012*	< 0,001	0,018*	0,055
X₃	-0,35*	< 0,001	0,003	0,144	-0,048*	< 0,001
X₁ x X₂	-0,05	0,472	0,015*	< 0,001	0,038*	0,001
X₁ x X₃	0,43*	< 0,001	0,019*	< 0,001	-0,050*	< 0,001
X₂ x X₃	0,05	0,402	-0,002	0,409	-0,006	0,458
X₁ x X₂ x X₃	-0,07	0,286	-0,002	0,248	-0,003	0,740

X₁: Condições ambientais; X₂: Meio Zarrouk; X₃: Concentração de inóculo; X_{máx}: concentração celular máxima (g.L⁻¹); P_{máx}: produtividade máxima (g.L⁻¹.dia⁻¹); $\mu_{\text{máx}}$: velocidade específica máxima de crescimento (dia⁻¹); *efeito significativo a 90% de confiança (p < 0,10)

Tabela 5 Análise de Variância aplicada à concentração, produtividade e velocidade específica de crescimento máximas nos cultivos em fotobiorreatores abertos

Variável	$X_{\text{máx}}$		$P_{\text{máx}}$		$\mu_{\text{máx}}$	
	Efeito	p	Efeito	p	Efeito	p
Média	1,23*	0,000	0,057*	0,000	0,102*	0,000
X₁	0,13*	0,030	0,019*	0,003	0,070*	<0,001
X₂	0,37*	<0,001	0,010*	0,047	-0,006	0,415
X₃	0,01	0,804	0,015*	0,012	-0,013	0,130
X₁ x X₂	0,09	0,115	0,002	0,718	0,015*	0,087
X₁ x X₃	0,43*	<0,001	0,024*	0,001	0,037*	0,001
X₂ x X₃	-0,05	0,316	0,002	0,718	-0,008	0,293
X₁ x X₂ x X₃	0,00	0,960	0,003	0,527	-0,007	0,382

X₁: Condições ambientais; X₂: Meio Zarrouk; X₃: Concentração de inóculo; X_{máx}: concentração celular máxima (g.L⁻¹); P_{máx}: produtividade máxima (g.L⁻¹.dia⁻¹); $\mu_{\text{máx}}$: velocidade específica máxima de crescimento (dia⁻¹); *efeito significativo a 90% de confiança (p < 0,10);

Nos cultivos sob condições não controladas o aumento das máximas produtividades com a concentração de meio Zarrouk foi mais acentuado que em cultivos em condições . Nas primeiras condições, onde as taxas de crescimento foram maiores, a concentração de 10% (v/v) pode ter sido um fator limitante do crescimento, enquanto em condições de temperatura, iluminância e fotoperíodo controlados, onde o crescimento ocorreu em menor intensidade, o meio Zarrouk 10% (v/v) pode ter sido suficiente para atender a demanda de nutrientes das células e por isto os efeitos do aumento na concentração de meio não influenciaram o crescimento da microalga.

As velocidades específicas máximas de crescimento (Tabelas 2 e 3) em ambos os tipos de fotobiorreatores foram maiores em condições não controladas, alcançando $0,322 \text{ dia}^{-1}$, comparadas àquelas obtidas em condições controladas ($0,102 \text{ dia}^{-1}$).

Ao comparar cultivos sob diferentes condições ambientais, com os demais fatores constantes, percebe-se que, em média, as maiores produtividades foram obtidas em condições não controladas (Figuras 2 e 4), onde as temperaturas variaram entre $9,4^\circ\text{C}$ e 46°C (Figura 5), sendo as menores temperaturas, em geral, registradas no período noturno. Embora exista uma temperatura ótima para o crescimento da *Spirulina*, as variações entre os períodos diurno e noturno podem ser favoráveis à obtenção de maiores produtividades, devido à queda na atividade respiratória noturna que ocorre em função das baixas temperaturas. A respiração noturna pode consumir até 35% da biomassa produzida durante o dia (TORZILLO et al., 1991). Nos cultivos a 30°C as taxas respiratórias no período noturno são favorecidas quando comparadas àquelas em cultivos sem controle de temperatura, conduzindo a menores produtividades líquidas.

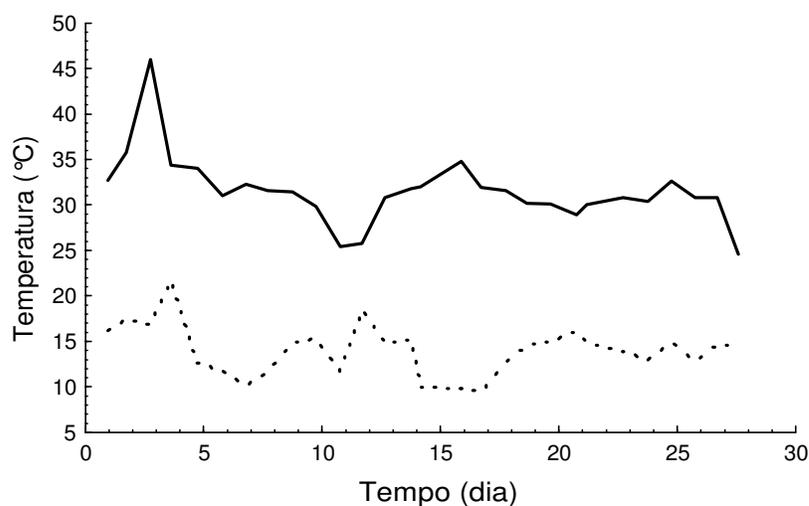


Figura 5 Temperaturas máximas (—) e mínimas (-----) ambientes nos cultivos sob condições não controladas (maio – junho/2004).

A perda noturna de biomassa, passível de ter ocorrido nos cultivos a 30°C , onde a respiração é favorecida (TORZILLO & VONSHAK, 1994), foi superada pela maior produtividade que estas condições proporcionam durante o período diurno.

4 CONCLUSÕES

A melhor concentração celular inicial esteve relacionada às condições ambientais em que foram realizados os cultivos. Sob condições não controladas os parâmetros máximos de crescimento avaliados, exceto $\mu_{\text{máx}}$ em fotobiorreator fechado, foram incrementados quando os cultivos foram inoculados com $0,40 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa. Sob condições controladas a inoculação com $0,15 \text{ g.L}^{-1}$ de biomassa conduziu a melhores resultados. Em condições não controladas fotobiorreatores abertos foram mais adequados para a manutenção do crescimento da microalga por mais tempo, porém fotobiorreatores fechados propiciaram aos cultivos atingir máximas concentrações celulares em um menor período; e a utilização de meio Zarrouk 20% (v/v) aumentou os parâmetros de crescimento avaliados, enquanto em condições controladas estes parâmetros foram menos sensíveis à variação na concentração de meio, de modo que sua diluição a 10% (v/v) não causou prejuízos ao crescimento.

Os parâmetros máximos de crescimento alcançados foram concentrações celulares de $1,94 \text{ g.L}^{-1}$, produtividades de $0,112 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e velocidades específicas de crescimento de $0,322 \text{ dia}^{-1}$ em fotobiorreator fechado, enquanto em fotobiorreator aberto, esses valores foram de $1,73 \text{ g.L}^{-1}$, $0,094 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e $0,160 \text{ dia}^{-1}$, respectivamente.

O cultivo autotrófico de *Spirulina platensis* em condições não controladas no Sul do Brasil foi tecnicamente viável e pode ser explorado, combinando fatores, como a concentração celular inicial e a concentração do meio de cultivo, de modo a alcançar parâmetros de crescimento comparáveis ou até mesmo superiores aos obtidos em cultivos sob temperatura, iluminância e fotoperíodo controlados.

5 REFERÊNCIAS

BAILEY, J. E. & OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals 2^a ed. Singapore: McGraw-Hill, 1986.

BELAY, A. Mass culture of *Spirulina* outdoors – The Earthrise farms experience. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997.

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

BOX, G. E. P., HUNTER, W. G., HUNTER, J. S. Statistics for experiments. Estados Unidos: John Willey & Sons, 1978. ISBN 0-471-09315-7.

CHANAWONGSE, L.; LEE, Y. K.; BUNNAG, B.; TANTICHAROEN, M. Productivity of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in cultures using sunlight. *Bioresource Technology*, 48, 143 – 148, 1994.

CHEN, F.; CHEN, H.; GONG, X. Mixotrophic and heterotrophic growth of *Haematococcus lacustris* and rheological behaviour of the cell suspensions *Bioresource Technology*, 62, 19 – 24, 1997.

CHOJNACKA, K. & NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 461 - 465, 2004.

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

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 18, 603 – 607, 2002.

GRIMA, E. M.; SEVILLA, J. M. F.; PÉREZ, J. A. S.; CAMACHO, F. G. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *Journal of Biotechnology*, 45, 59 - 69, 1996.

HASE, R.; OIKAWA, O.; SASAO, C.; MORITA, M.; WATANABE, Y. Photosynthetic production of microalgal biomass in a *raceway* system under greenhouse conditions in Sendai City. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89 (2), 157 – 163, 2000.

HOSAKA, K.; HIOKI, T.; FURUUNE, H.; TANISHITA, K. Augmentation of microalgae growth due to hydrodynamic activation. *Energy Conversion Management*, 36 (6 - 9), 725 – 728, 1995.

JIMÉNEZ, C.; COSSÍO, B. R.; NIELL, F. X. Relationship between physicochemical variables and productivity in open ponds for the production of *Spirulina*: a predictive model of algal yield. *Aquaculture*, 221, 331 - 345, 2003.

LU, C. & VONSHAK, A. Photoinhibition in outdoor *Spirulina platensis* cultures assessed by polyphasic chlorophyll fluorescence transients. *Journal of Applied Phycology*, 11, 355 – 359, 1999.

MARQUEZ, F. J.; SASAKI, K.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N.; NAGAI, S. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 5, 408 – 410, 1993.

PELIZER, L. H.; DANESI E. D.; 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*, 56, 371 – 375, 2003.

REINEHR, C. O. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em modo semicontínuo - Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2003.

RICHMOND, A. & GROBBELAAR, J. U. Factors affecting the output rate of *Spirulina platensis* with reference to mass cultivation. *Biomass*, 10, 253 – 264, 1986.

RICHMOND, A.; WU, Z. C.; ZARMI, Y. Efficient use of strong light for high photosynthetic productivity: interrelationships between the optical path, the optimal population density and cell growth inhibition. *Biomolecular Engineering*, 20, 229 – 236, 2003.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnology Industrial* vol.2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

TORZILLO, G. & VONSHAK, A. Effect of light and temperature on the photosynthetic activity of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, 6 (5), 399 – 403, 1994.

TORZILLO, G.; PUSHPARAJ, B.; BOCCI, F.; BALLONI, W.; MATERASSI, R.; FLORENZANO, G. Production of *Spirulina* biomass in closed photobioreactors. *Biomass*, 11, 61 - 74, 1986.

TORZILLO, G.; SACCHI, A.; MATERASI, R. Temperature as an important factor affecting productivity and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors. *Bioresource Technology*, 38, 95 – 100, 1991.

TRAVIESO, L.; HALL, D. O.; RAO, K. K.; BENÍTEZ, F.; SÁNCHEZ, E.; BORJA, R. A helical tubular photobioreactor producing *Spirulina* in a semicontinuous mode. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 47, 151 – 155, 2001.

VONSHAK, A. Outdoor mass production of *Spirulina*: The basic concept. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor & Francis, 1997.

VONSHAK, A. & RICHMOND, A. Mass production of the blue-green alga *Spirulina*: An overview. *Biomass*, 15, 233 – 247, 1988.

VONSHAK, A.; ABELIOVICH, A.; BOUSSIBA, S.; ARAD, S.; RICHMOND, A. Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass*, 2, 175 – 185, 1982.

ZARROUK, C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* Geitler. Ph.D. Thesis, University of Paris, 1966.

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

**5.2 CULTIVOS AUTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO DA MICROALGA *Spirulina*
platensis EM ESCALA PILOTO NO SUL DO BRASIL**

CULTIVOS AUTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO DA MICROALGA *Spirulina platensis* EM ESCALA PILOTO NO SUL DO BRASIL

Andrade, M. R.; Costa, J. A. V.

Laboratório de Engenharia Bioquímica, Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rua Engenheiro Alfredo Huch, 475 – CEP 96201-900 – Rio Grande – RS – Brasil, Caixa Postal 474 – Tel: +55(53)233-8653 – *E-mail: dqmjorge@furg.br

RESUMO

A microalga *Spirulina platensis* foi cultivada em fotobiorreatores abertos de 650L nas configurações *raceway* e quadrada, cobertos por um túnel plástico no Sul do Brasil em dois períodos do ano, sob diferentes condições climáticas. Foram realizados cultivos autotróficos e mixotróficos com 0,25 e 0,50 g.L⁻¹ de glicose. O crescimento celular não foi influenciado pelas diferentes geometrias de fotobiorreator. A concentração de glicose foi o fator de maior influência no crescimento da microalga, sendo que cultivos com 0,50 g.L⁻¹ de glicose alcançaram as maiores concentrações celulares (2,17 g.L⁻¹) e produtividades (0,621 g.L⁻¹.dia⁻¹). Cultivos autotróficos apresentaram as maiores velocidades específicas de crescimento (0,175 dia⁻¹). Foi verificado crescimento da microalga em temperaturas tão baixas quanto 8,8°C. Cultivos autotróficos exibiram maior resistência às mínimas temperaturas, enquanto mixotróficos apresentaram maiores produtividades em meses mais quentes. Os resultados demonstraram que cultivos autotróficos e mixotróficos podem ser alternados de acordo com as condições climáticas para a produção da microalga *Spirulina* em um clima variável entre os meses frios e quentes como ocorre no Sul do Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: cultivo mixotrófico, fotobiorreator aberto, glicose, microalga, *Spirulina*.

ABSTRACT

Spirulina platensis was grown in opened square ponds and opened *raceway* ponds both with 650L under a greenhouse in the south of Brazil at two climatic conditions. We carried out autotrophic and mixotrophic cultures. The cell growth wasn't influenced by photobioreactor configuration. Glucose was the most important factor affecting cell growth. Cultures in glucose 0.50 g.L⁻¹ reached highest cell concentration (2.17 g.L⁻¹) and overall productivity (0.621 g.L⁻¹.day⁻¹). Autotrophic cultures showed the highest specific growth rate (0.175 day⁻¹). *Spirulina* grew under temperatures as low as 8.8°C. Autotrophic cultures showed better resistance to low temperatures, while mixotrophic cultures reached larger productivity at higher temperatures. According to results, autotrophic and mixotrophic cultures can be used alternately in function of climatic conditions aiming *Spirulina* biomass production in regions with climatic variations as occurred in southern of Brazil.

KEYWORDS: glucose, microalga, mixotrophic culture, opened photobioreactor, *Spirulina*.

1 INTRODUÇÃO

Microalgas são microrganismos fotossintéticos que figuram entre as mais antigas formas de vida no planeta. Atualmente, com o desenvolvimento da biotecnologia, têm sido amplamente estudadas ao redor do mundo como fontes de nutrientes e de compostos químicos com valor comercial, a fim de desenvolver a tecnologia dos cultivos, e as tornar economicamente competitivas na produção destes compostos em grande escala.

Algumas microalgas possuem composição apropriada para ser utilizadas como biomassa alimentícia no combate à desnutrição, como a *Spirulina*, que possui o certificado GRAS (Generally Recognized As Safe) do FDA. Esta microalga se destaca entre as demais devido seu conteúdo protéico que alcança 64 - 74%, além de ser fonte de compostos biologicamente ativos como o ácido γ -linolênico, vitaminas e pigmentos (COHEN, 1997). Diversos estudos têm mostrado efeitos benéficos atribuídos à *Spirulina* na prevenção e tratamento de enfermidades, como alguns tipos de câncer (HIRAHASHI et al., 2002) e AIDS (TEAS et al., 2004). Além disso, esta microalga é utilizada na aquicultura (CHUNTAPA et al., 2003) e estudada como biomassa alimentícia e renovadora de oxigênio para longas missões espaciais tripuladas (GROS et al., 2003).

Cultivos de *Spirulina* são pouco suscetíveis à contaminação por outros microrganismos, devido ao pH acima de 9 em que a microalga se desenvolve. Assim, pode ser cultivada em fotobiorreatores abertos, expostos às condições climáticas naturais, utilizando a energia solar para o crescimento. Fotobiorreatores abertos do tipo *raceway* são utilizados para as culturas em grande escala (JIMÉNEZ et al., 2003a; Borowitzka, 1999), porém em pequena escala, fotobiorreatores quadrados são de construção mais simples, embora possam apresentar problemas de agitação, com zonas de estagnação de biomassa.

A agitação nas culturas de microalgas está relacionada a uma série de fatores influentes nos parâmetros de crescimento celular. Algumas funções da agitação são impedir a formação de aglomerados garantindo incidência luminosa suficiente às células (ZHANG et al., 1999; GRIMA et al., 1996; CORNET et al., 1995; OGBONNA et al., 1995), permitir a captação de CO₂ da atmosfera e a liberação de O₂ do interior do meio líquido (JIMÉNEZ et al., 2003b).

Embora a *Spirulina* seja capaz de crescer autotroficamente, cultivos mixotróficos, onde o meio é complementado com substrato orgânico, podem resultar em melhores parâmetros de crescimento (CHOJNACKA & NOWORYTA, 2004; MARQUEZ et al., 1993) e aumentar a produção de metabólitos celulares específicos, como a ficocianina, biocorante azul utilizado em alimentos (CHEN & ZHANG, 1997).

Mesmo sendo a *Spirulina* uma das microalgas mais produzidas e pesquisadas no mundo, são raros os estudos de seu cultivo em fotobiorreatores em escala piloto em ambientes não controlados, sob as mesmas condições ambientais em que a microalga é cultivada em grande escala. Cultivos nestas condições geralmente apresentam produtividade limitada devido à exposição a níveis extremos e variáveis de fatores como incidência luminosa e temperatura. No Sul do Brasil as temperaturas médias estão abaixo de 35°C, temperatura ótima de crescimento autotrófico da *Spirulina* (VONSHAK, 1997).

Este trabalho teve por objetivo determinar os efeitos da adição de glicose em diferentes concentrações ao meio de cultivo no crescimento da microalga *Spirulina platensis* em duas estações do ano, avaliando o efeito de duas configurações de fotobiorreatores em escala piloto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

Foi utilizada a microalga *Spirulina platensis* cepa LEB-52 (COSTA et al., 2004) mantida em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) 20% (v/v) em água, complementado com 0, 0,25 ou 0,50 g.L⁻¹ de glicose. Os inóculos foram mantidos a 30°C, 2500 Lux e fotoperíodo de 12h claro/escuro e adaptados às respectivas condições experimentais durante 3 dias antes do início dos ensaios.

2.2 Meio de Cultivo

Foi utilizado meio de cultivo Zarrouk 20% (v/v) em água. O meio para os cultivos mixotróficos foi suplementado inicialmente com 0,25 ou 0,50 g.L⁻¹ de glicose. Os sais para o meio Zarrouk e a glicose utilizados eram de grau analítico.

2.3 Condições de Cultivo

Cultivos em condições controladas: A fim de determinar a influência da concentração de glicose no crescimento celular, *Spirulina* foi cultivada em fotobiorreatores abertos de 6L na forma de mini-tanques construídos em acrílico, onde a cultura foi agitada continuamente por pás rotativas a 18 rpm. Os cultivos foram mantidos em estufa termostaticada a 30°C e 2500 Lux providos por lâmpadas fluorescentes de 40 W, com fotoperíodo de 12 h claro/escuro. As concentrações de glicose testadas foram 0,00; 0,25; e 0,50 g.L⁻¹ em meio Zarrouk 20% (v/v), em duplicatas.

Cultivos em condições não controladas: A partir dos dados obtidos em cultivos sob condições ambientais controladas foram realizados experimentos em fotobiorreatores abertos de 650L, construídos em concreto, nas formas quadrada (1,25 x 1,25 x 0,40 m) e *raceway* (2,50 x 0,70 x 0,40 m) (Figura 1), cobertos por um túnel plástico transparente com proteção UV (FT AUV – 150; Zanatta Florestal), exposto a condições ambientais naturais. A agitação das culturas foi contínua realizada por 2 bombas submersas de 650 L.h⁻¹ em cada fotobiorreator.

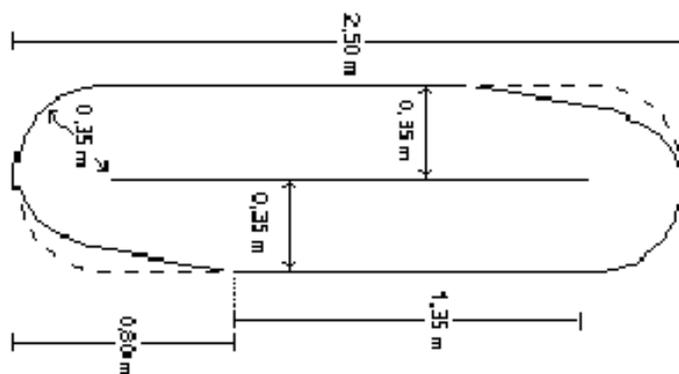


Figura 1 Esquema dos fotobiorreatores tipo *raceway* utilizados para o cultivo de *Spirulina platensis*

Os cultivos em ambas condições ambientais foram descontínuos, com concentração celular inicial de 0,15 g.L⁻¹ e mantidos por até 41 dias. A primeira batelada de ensaios em condições não controladas foi realizada nos meses de abril e maio, e a segunda durante os meses de junho e julho, no Sul do Brasil (32,05° S; 52,11° W). O volume das culturas foi mantido constante pela reposição diária da água

perdida por evaporação. Os ensaios autotróficos foram realizados nas duas bateladas, com as demais condições constantes.

2.4 Planejamento Experimental

Os cultivos em condições não controladas foram realizados segundo um planejamento experimental fatorial misto 2 x 3 (BOX et al., 1978) tendo como fatores de estudo a geometria do fotobiorreator e a concentração inicial de glicose, cujos níveis reais e codificados estão apresentados na Tabela 1. A Tabela 3 mostra a matriz do planejamento experimental.

Tabela 1 Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento fatorial completo 2 x 3

Variável	Valores codificados		
	-1	0	+1
Fotobiorreator	Quadrado	-	Raceway
Glicose (g.L ⁻¹)	0	0,25	0,50

2.5 Respostas Estudadas e Análise Estatística

Foram avaliadas a concentração celular máxima, a produtividade máxima de biomassa e a velocidade específica máxima de crescimento.

A produtividade (P em g.L⁻¹.dia⁻¹), foi obtida segundo a Equação 1, onde X_t é a concentração celular (g.L⁻¹) no tempo t (dia), e X_0 a concentração celular (g.L⁻¹) no tempo t_0 (dia) (SCHMIDELL et al., 2001).

$$P = (X_t - X_0)/t - t_0 \quad (\text{Eq. 1})$$

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) em (dia⁻¹) foi calculada por regressão exponencial aplicada à fase de crescimento exponencial (BAILEY & OLLIS, 1986).

Os efeitos das variáveis estudadas sobre a concentração celular máxima, produtividade máxima e velocidade específica máxima de crescimento obtidas nos cultivos em condições não controladas foram determinados por Análise de Variância (ANOVA) com 95% de significância ($p < 0,05$). Cada batelada de cultivos foi tratada como um bloco (VIEIRA, 1999). Os cultivos autotróficos foram realizados em ambas as bateladas, com as demais condições idênticas, somando-se, então 2 ensaios ao planejamento 2 x 3, perfazendo um total de 8 experimentos.

As temperaturas mínimas, máximas e as variações diárias de cada batelada experimental foram comparadas através de teste de Tuckey para comparação de médias.

2.6 Determinações Analíticas

A concentração celular de *Spirulina platensis* foi determinada a cada 24h através da densidade ótica das culturas a 670 nm (COSTA et al., 2002) em espectrofotômetro (FEMTO 700-Plus). As temperaturas máximas e mínimas e as iluminâncias a que estiveram expostos os cultivos no interior do túnel plástico foram registradas diariamente por termômetro digital e por luxímetro digital (Minipa MLM 1332), respectivamente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Cultivos sob Condições Controladas

Os parâmetros de crescimento obtidos nos cultivos em fotobiorreatores de 6L, sob temperatura, iluminância e fotoperíodo controlados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Parâmetros de crescimento avaliados nos cultivos em fotobiorreatores abertos de 6L (média \pm desvio padrão)

Ensaio	Glicose (g.L ⁻¹)	X _{máx} (g.L ⁻¹)	P _{máx} (g.L ⁻¹ dia ⁻¹)	μ _{máx} (dia ⁻¹)
1	0,00	2,29 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,167 \pm 0,026
2	0,25	1,95 \pm 0,06	0,11 \pm 0,00	0,110 \pm 0,011
3	0,50	2,44 \pm 0,36	0,28 \pm 0,02	0,055 \pm 0,007

X_{máx}: Concentração celular máxima; P_{máx}: Produtividade máxima; μ_{máx}: Velocidade específica máxima de crescimento

O menor valor de concentração celular máxima (1,95 g.L⁻¹) foi alcançado em cultivos com o nível central de glicose (Ensaio 2). As produtividades máximas aumentaram com o aumento na concentração do substrato orgânico, sendo obtidos até 0,28 g.L⁻¹dia⁻¹ no nível superior testado (Ensaio 3), onde foram mantidas as maiores concentrações (Figura 2), alcançando em cerca de 15 dias concentrações iguais às máximas obtidas em 39 dias nos experimentos com 0,25 g.L⁻¹ de glicose (Ensaio 2).

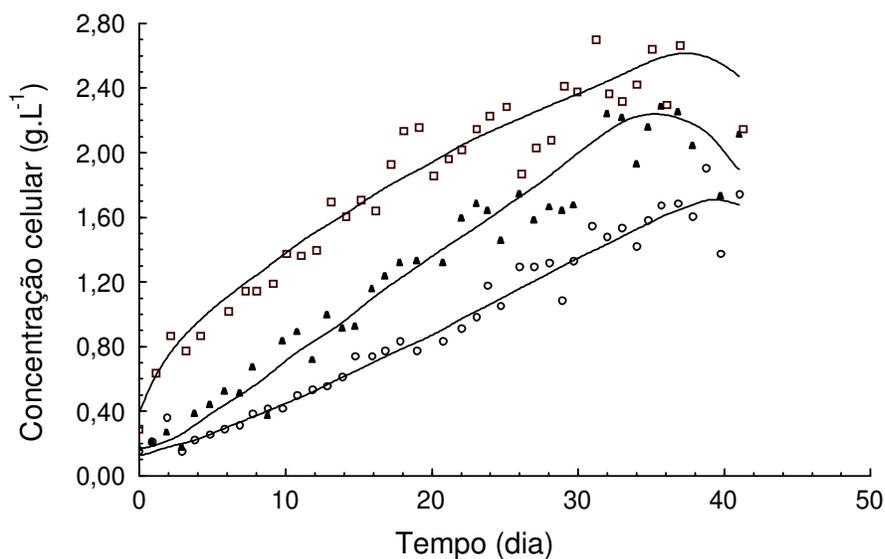


Figura 2 Crescimento da microalga *Spirulina platensis* em condições controladas. Ensaio 1 (▲) autotrófico; 2(○) glicose 0,25 g.L⁻¹ e 3(□) glicose 0,50 g.L⁻¹

As velocidades específicas máximas de crescimento diminuíram com o aumento da concentração de glicose, sendo alcançados 0,167 dia⁻¹ em cultivo autotrófico (Ensaio 1).

Os resultados obtidos nos cultivos em fotobiorreatores de 6L indicaram que, dentro dos limites estudados, não houve uma relação linear entre a concentração inicial de glicose e a concentração celular máxima, e que não existe uma relação simples entre a concentração inicial do substrato orgânico no meio e os parâmetros de crescimento avaliados. Assim, estes mesmos níveis de glicose foram utilizados no planejamento experimental para os cultivos em maior escala, em condições não controladas.

3.2 Cultivos sob Condições não Controladas

As curvas de crescimento da microalga *Spirulina* em condições não controladas (Figura 3) exibem dois comportamentos distintos. Aquelas que representam cultivos realizados durante a segunda batelada (Ensaio 4, 5, 7 e 8) mostram baixas concentrações celulares durante os dias iniciais de cultivo, enquanto as curvas que representam cultivos realizados na primeira batelada (Ensaio 6, 9, 10 e 11) mostram maiores concentrações logo no início dos cultivos. Durante a segunda

batelada as temperaturas variaram entre 8,8 e 32,4°C, mantendo-se a maior parte do tempo abaixo de 30°C, e na primeira, entre 15,8 e 41,4°C, mantendo-se a maior parte do tempo acima de 30°C (Figura 4).

Segundo RICHMOND (1986), em cultivos sob condições ambientais não controladas, 18°C é a mínima temperatura que permite crescimento de *Spirulina*, porém este limite pode variar entre diferentes cepas. TOMASELLI et al. (1993) estudaram a faixa de temperaturas que permitiam o crescimento de 32 cepas de *Spirulina*, entre as quais 10 de *Spirulina platensis*, encontrando valores entre 12 e 43°C. A maioria das cepas, inclusive de *Spirulina platensis*, não apresentou crescimento abaixo de 15°C ou acima de 40°C, com temperatura ótima de crescimento entre 30 e 35°C.

No presente trabalho foi constatado crescimento celular autotrófico (Ensaio 4 e 7) e mixotrófico (Ensaio 5 e 8) de *Spirulina platensis* em temperaturas de até 8,8°C. Cultivos autotróficos (Ensaio 4 e 7) foram menos suscetíveis às baixas temperaturas, exibindo crescimento contínuo (Figura 3) durante 16 e 27 dias de cultivo, quando foram alcançadas as menores temperaturas (Figura 4). Durante os primeiros dias deste período os cultivos mixotróficos (Ensaio 5 e 8) passaram por uma fase de adaptação às baixas temperaturas, com desaceleração do crescimento (Figura 3).

O crescimento celular de microalgas está relacionado à fixação fotossintética de CO₂ e à atividade respiratória. Ambos processos dependem da temperatura, e o primeiro depende ainda da luz. O efeito da temperatura pode ser atribuído principalmente à atividade enzimática nas células da microalga, e a alterações na composição celular. Em baixas temperaturas ocorre um decréscimo da atividade fotossintética em células de *Spirulina platensis* (VONSHAK, 1997), que alcança o ótimo em 35°C. Acima de 35°C a concentração de pigmentos fotossintéticos e de proteínas em geral decresce, enquanto aumentam as concentrações de carboidratos e lipídios (TOMASELLI et al., 1993).

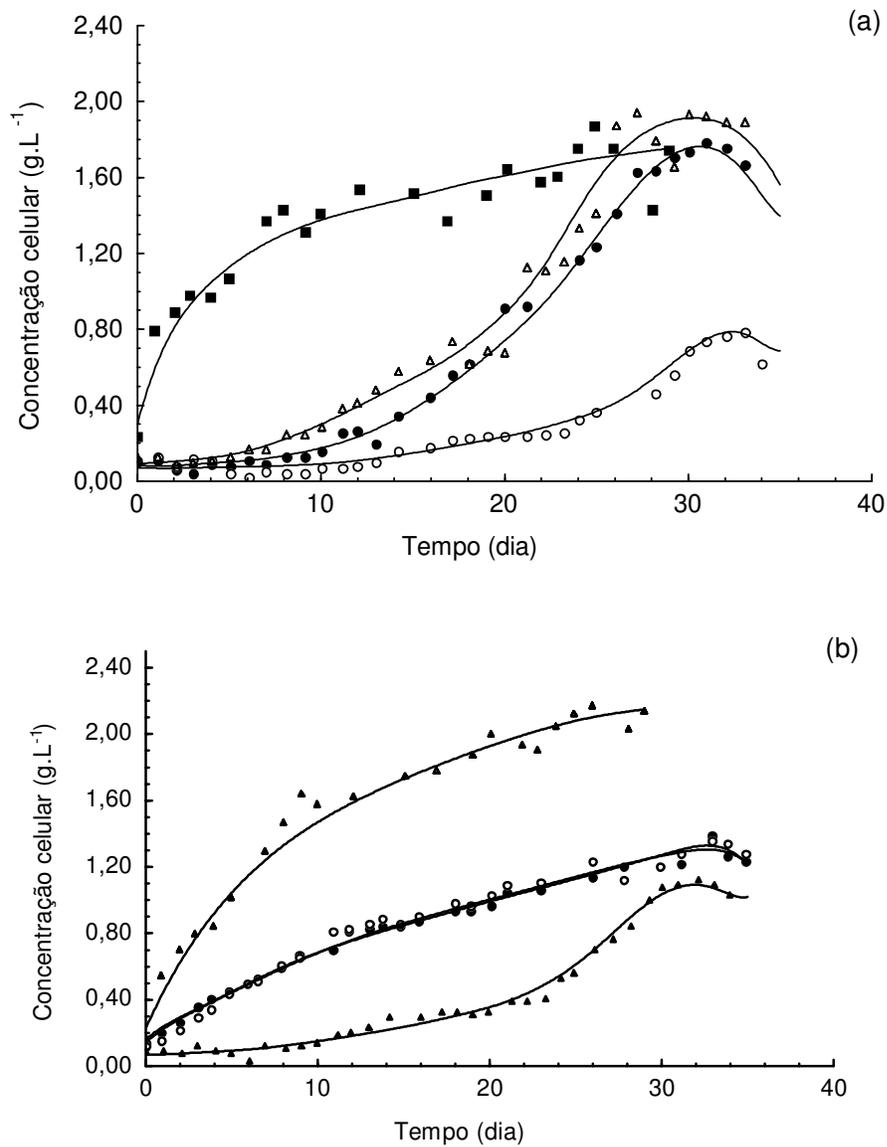


Figura 3 Crescimento da microalga *Spirulina platensis* em condições não controladas. (a) Ensaios 4(●)FBR quadrado, autotrófico; 5(O)FBR *raceway*, glicose 0,25 g.L⁻¹; 6(■)FBR quadrado, glicose 0,50 g.L⁻¹; 7(△)FBR *raceway*, autotrófico; (b) Ensaios 8(▲)FBR quadrado, glicose 0,25 g.L⁻¹; 9(△)FBR *raceway*, glicose 0,50 g.L⁻¹; 10(●)FBR quadrado, autotrófico; 11(O)FBR *raceway*, autotrófico. FBR: Fotobiorreator

As temperaturas mínimas, máximas e as variações registradas diariamente no interior do túnel durante os ensaios nas duas bateladas experimentais foram comparadas segundo teste de Tuckey, que acusou diferenças ($p < 0,001$) entre as médias de mínimas (14,1 e 21,6°C) e de máximas temperaturas (26,5 e 35,6°C), respectivamente, na segunda e primeira bateladas, porém as variações diárias (12,4 e 14°C) foram iguais ($p > 0,25$) nos dois períodos. Estes resultados confirmam, estatisticamente, que os cultivos estiveram expostos a diferentes condições de temperatura entre as duas bateladas experimentais, justificando a análise em blocos.

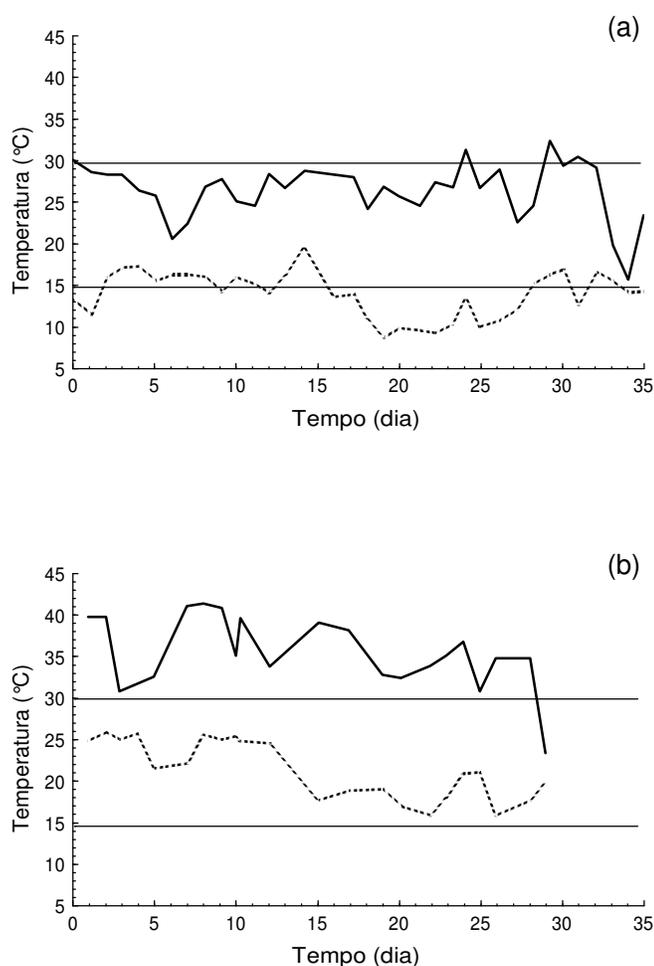


Figura 4 Temperaturas máximas (—) e mínimas (----) ambientes nos cultivos sob condições não controladas. (a) Ensaios 4, 5, 7 e 8 (junho – julho); (b) Ensaios 6, 9, 10 e 11 (abril – maio)

No entanto, apesar das diferenças percebidas na cinética de crescimento da microalga nos cultivos (Figura 3), os parâmetros máximos de crescimento avaliados (Tabela 3), segundo a análise estatística do planejamento (Tabela 4), não foram influenciados pelas diferentes condições ambientais proporcionadas pelas duas bateladas experimentais.

CHEN & ZHANG (1997) obtiveram 2,0 g.L⁻¹ de *Spirulina* em cultivos descontínuos autotróficos e 2,4 g.L⁻¹ em mixotróficos, porém em meio Zarrouk padrão. No presente trabalho, utilizando meio Zarrouk 20% (v/v), cultivos com 0,50 g.L⁻¹ de glicose alcançaram até 2,17 g.L⁻¹ (Ensaio 9), abrindo-se assim a possibilidade de complementar o meio com um substrato orgânico e reduzir a concentração de meio inorgânico de modo a obter densidades celulares equivalentes àquelas obtidas em cultivos com o meio padrão.

Tabela 3 Planejamento experimental e parâmetros de crescimento avaliados nos cultivos em condições não controladas

Ensaio	Variáveis codificadas		Parâmetros de crescimento avaliados		
	X ₁	X ₂	X _{máx}	P _{máx}	μ _{máx}
4	-1	-1	1,78	0,056	0,175
5	+1	0	0,78	0,024	0,091
6	-1	+1	1,87	0,621	0,094
7	+1	-1	1,94	0,067	0,169
8	-1	0	1,12	0,033	0,083
9	+1	+1	2,17	0,420	0,085
10	-1	-1	1,40	0,070	0,060
11	+1	-1	1,36	0,065	0,071

X₁: Fotobiorreator; X₂: Concentração de glicose; X_{máx}: Concentração celular máxima (g.L⁻¹); P_{máx}: Produtividade máxima (g.L⁻¹dia⁻¹); μ_{máx}: Velocidade específica máxima de crescimento (dia⁻¹)

A concentração celular foi semelhante durante os cultivos autotróficos (Ensaio 10 e 11) realizados durante os meses de abril e maio, independente do tipo de fotobiorreator empregado, porém nos meses de junho e julho (Ensaio 4 e 7), a biomassa em fotobiorreator do tipo *raceway* foi superior àquela em fotobiorreator quadrado durante todo o tempo. Em fotobiorreatores quadrados a agitação é dificultada, somando-se como um fator desfavorável à atividade fotossintética, já prejudicada pelas baixas temperaturas.

As curvas de acompanhamento da concentração celular (Figura 3) não evidenciam efeitos da geometria do fotobiorreator sobre a cinética de crescimento da *Spirulina*. Segundo a análise estatística do planejamento (Tabela 4) a geometria dos fotobiorreatores também não influenciou ($p > 0,05$) os parâmetros máximos de

crescimento avaliados, demonstrando que o cultivo da microalga *Spirulina* em pequena escala e nas condições presentes neste trabalho pode ser realizado em fotobiorreatores quadrados ou do tipo *raceway* sem diferenças significativas nos parâmetros máximos de crescimento. Este resultado está provavelmente relacionado ao tipo de agitação, por bombas submersas, utilizada em ambos fotobiorreatores. Em maiores escalas de cultivo a potência da bomba requerida para a agitação pode resultar em estresse hidrodinâmico (CAMACHO et al., 2001) para a microalga, causando sua quebra que prejudica o crescimento e dificulta a colheita da microalga por filtração, devido à redução no tamanho dos tricomas (TORZILLO, 1997). A configuração *raceway* permite que a agitação seja realizada por pás rotativas (VONSHAK & RICHMOND, 1988), e por isto é a forma mais utilizada em fotobiorreatores abertos para o cultivo de *Spirulina*.

Cultivos autotróficos realizados na segunda batelada (Ensaio 4 e 7) apresentaram um acréscimo nas produtividades (Figura 5) a partir de 15 dias de cultivo, quando foram registradas as mínimas temperaturas (Figura 4). Os cultivos mixotróficos realizados simultaneamente (Ensaio 5 e 8) permaneceram em baixas produtividades durante este período, até 27 dias, quando apresentaram um acréscimo na produtividade, atingindo, em seguida, suas máximas concentrações celulares. Comparando cultivos autotróficos (Ensaio 10 e 11) e mixotróficos (Ensaio 6 e 9), realizados sob maiores temperaturas, percebe-se maiores produtividades nos mixotróficos.

Do ponto de vista econômico, manter altas produtividades em altas concentrações celulares é o ótimo em cultivos de microalgas. A eficiência fotossintética máxima em culturas de *Spirulina* foi constatada em concentrações celulares na faixa de 0,4 a 0,5 g.L⁻¹ (VONSHAK et al., 1982) e decai, após este valor, em decorrência do sombreamento no interior do meio líquido, refletindo na produtividade em biomassa. A Figura 6 apresenta a relação entre a produtividade e a concentração celular de *Spirulina*, onde é possível perceber que os cultivos mixotróficos com 0,50 g.L⁻¹ de glicose (Ensaio 6 e 9) apresentaram produtividades decrescentes em função do aumento da biomassa, porém em altos valores de produtividades até que a biomassa alcançasse cerca de 1,50 g.L⁻¹.

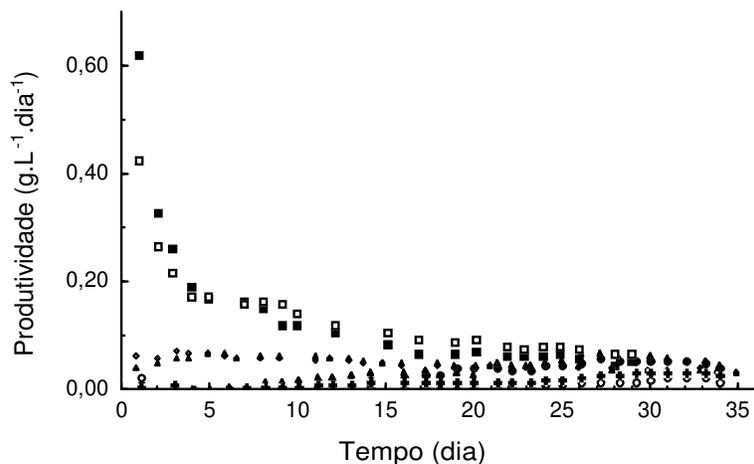


Figura 5 Produtividade da microalga *Spirulina platensis*. Ensaio 4(●)FBR quadrado, autotrófico; 5(O)FBR *raceway*, glicose 0,25 g.L⁻¹; 6(■)FBR quadrado, glicose 0,50 g.L⁻¹; 7(△)FBR *raceway*, autotrófico; 8(+)FBR quadrado, glicose 0,25 g.L⁻¹; 9(□)FBR *raceway*, glicose 0,50 g.L⁻¹; 10(◇)FBR quadrado, autotrófico; 11(▲)FBR *raceway*, autotrófico. FBR: Fotobiorreator

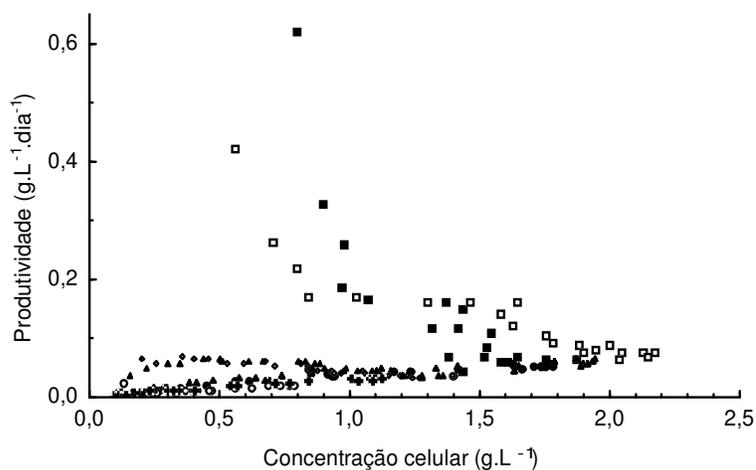


Figura 6 Produtividade em função da concentração celular da microalga *Spirulina platensis*. Ensaio 4(●)FBR quadrado, autotrófico; 5(O)FBR *raceway*, glicose 0,25 g.L⁻¹; 6(■)FBR quadrado, glicose 0,50 g.L⁻¹; 7(△)FBR *raceway*, autotrófico; 8(+)FBR quadrado, glicose 0,25 g.L⁻¹; 9(□)FBR *raceway*, glicose 0,50 g.L⁻¹; 10(◇)FBR quadrado, autotrófico; 11(▲)FBR *raceway*, autotrófico. FBR: Fotobiorreator

O efeito quadrático da concentração de glicose sobre a máxima concentração celular (Tabela 4) indica a existência de uma região de mínimo no nível intermediário de glicose estudado ($0,25 \text{ g.L}^{-1}$). Este resultado foi semelhante ao encontrado em pequena escala sob temperatura, iluminância e fotoperíodo controlados (Tabela 2).

Segundo a Análise de Variância (Tabela 4), cultivos autotróficos e mixotróficos ($0,50 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose) não apresentaram diferenças significativas ($p = 0,502$) quanto à máxima concentração celular, porém, esta análise não leva em consideração o tempo necessário para atingir estes máximos. A Figura 3 mostra que cultivos mixotróficos com $0,50 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose atingiram, em cerca de 15 dias, valores de concentrações próximos aos máximos alcançados em cultivos autotróficos em cerca de 30 dias.

Tabela 4 Análise de Variância aplicada à concentração, produtividade e velocidade específica de crescimento máximas

Variável	$X_{\text{máx}}$		$P_{\text{máx}}$		$\mu_{\text{máx}}$	
	Efeito	P	Efeito	p	Efeito	p
Média	1,682	0,003	0,21	0,006	0,113	0,001
X1 (L)	0,020	0,915	-0,05	0,243	0,001	0,884
X2 (L)	-0,270	0,502	0,42*	0,021	-0,061*	0,037
X2 (Q)	-0,775*	0,043	-0,24*	0,016	-0,055*	0,012
X1(L) x X2(L)	0,070	0,794	-0,11	0,138	-0,002	0,877

X1: Fotobiorreator; X2: Concentração de glicose; (L): efeito linear; (Q): efeito quadrático $X_{\text{máx}}$: Concentração celular máxima (g.L^{-1}); $P_{\text{máx}}$: Produtividade máxima ($\text{g.L}^{-1}\text{dia}^{-1}$); $\mu_{\text{máx}}$: Velocidade específica máxima de crescimento (dia^{-1}); *efeito significativo a 95% de confiança ($p < 0,05$)

MARQUEZ et al. (1993) obtiveram $2,52 \text{ g.L}^{-1}$ de *Spirulina* em cultivo mixotrófico e, simultaneamente, $1,77 \text{ g.L}^{-1}$ em autotrófico. A vantagem do cultivo mixotrófico em relação ao autotrófico na obtenção de maiores densidades celulares também foi verificada por CHEN & ZHANG (1997), que encontraram concentrações de biomassa em cultivo mixotrófico 5,1 vezes maior que em autotrófico, ambos em batelada alimentada. O cultivo mixotrófico de outras microalgas, como *Phaeodactylum tricornutum* (GARCÍA et al., 2005), *Chlorella zofingiensis* (IP et al., 2004) e *Porphyridium cruentum* (FÁBREGAS et al., 1999) também foi explorado como forma de atingir maiores concentrações celulares comparadas às alcançadas em cultivo autotrófico.

Cultivos com $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose (Ensaio 5 e 8) permaneceram a maior parte do tempo com baixas concentrações celulares, o que facilita a penetração de luz

no meio líquido, assim a incidência luminosa no interior da cultura pode ter favorecido o metabolismo fotossintético, e a presença do substrato orgânico no meio pode inibir o crescimento da microalga. Segundo VONSHAK et al. (1982), o crescimento celular da *Spirulina* em meses frios é dependente da temperatura, enquanto dependente da iluminância nos meses quentes, quando a temperatura deixa de ser um fator limitante, por isto a incidência luminosa proporcionada pelas baixas densidades celulares nos cultivos com $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose (Ensaio 5 e 8) não foi um fator determinante para o crescimento, uma vez que a biomassa teve seu crescimento limitado pelas baixas temperaturas presentes durante os cultivos.

Quanto maior a intensidade de luz a que as células são expostas durante o dia, maior a taxa de respiração no período escuro, que pode consumir até 35% da biomassa produzida no período claro (TORZILLO et al., 1991). Assim, a perda noturna de biomassa em cultivos pouco densos, que recebem altas intensidades luminosas, como ocorre no início dos cultivos, contribui para que as densidades celulares mantenham-se baixas e o crescimento seja retardado neste período. Neste aspecto é importante a complementação do meio com carbono orgânico, que pode ser um substrato para a respiração noturna, diminuindo o consumo da biomassa formada.

A concentração de glicose apresentou efeito linear sobre a máxima produtividade de biomassa, de modo que, comparando o cultivo autotrófico com o mixotrófico (glicose $0,50 \text{ g.L}^{-1}$), a produtividade máxima aumentou, em média, $0,42 \text{ g.L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Assim como a concentração celular máxima, a produtividade máxima também apresentou uma região de mínimo em cultivos mixotróficos com o nível central de glicose e a Figura 5 mostra que, além das menores produtividades máximas os Ensaio 5 e 8 apresentaram também as menores produtividades ao longo de todo o tempo de cultivo.

A velocidade específica máxima de crescimento em cultivos autotróficos foi, em média, $0,061 \text{ dia}^{-1}$ maior que em cultivos mixotróficos com $0,50 \text{ g.L}^{-1}$. Assim como os demais parâmetros de crescimento analisados, a velocidade específica máxima de crescimento sofreu efeito quadrático negativo da concentração de glicose, sendo mínima no nível central ($0,25 \text{ g.L}^{-1}$) do substrato orgânico. Estes resultados discordam daqueles de CHOJNACKA & NOWORYTA (2004) que obtiveram maiores velocidades específicas de crescimento em cultivo mixotrófico comparado ao autotrófico. Estes autores encontraram uma relação diretamente proporcional entre a

incidência luminosa e a velocidade específica de crescimento. Sendo assim, cultivos com baixa concentração celular, que recebem maior intensidade luminosa, como os Ensaios 5 e 8, alcançariam maiores velocidades específicas de crescimento, entre todos os ensaios realizados, e isto não foi verificado neste trabalho.

Porém, comparando entre si os cultivos autotróficos (Ensaios 4 e 7), ou mixotróficos com $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose (Ensaios 5 e 8), ou ainda mixotróficos com $0,50 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose (Ensaios 6 e 9), percebe-se que as maiores velocidades específicas de crescimento foram alcançadas em menores densidades celulares. Estes resultados mostram que a velocidade específica máxima de crescimento não apresenta uma relação simples com a incidência luminosa, mas sim que é função de um conjunto complexo de fatores responsáveis pelo estado bioquímico e nutricional da célula. Merecem atenção as diferenças entre as velocidades específicas máximas de crescimento nos cultivos autotróficos realizados nas duas bateladas experimentais. Os cultivos com menor densidade celular (Ensaios 4 e 7) que foram realizados sob as menores temperaturas apresentaram a fase exponencial de crescimento em 6 a 13 dias de cultivo, com velocidades específicas mais de duas vezes maiores que os Ensaios 10 e 11, sob as maiores temperaturas, mais densos em biomassa e que apresentaram fase exponencial de crescimento entre 8 e 12 dias de cultivo.

A partir dos resultados obtidos e da literatura é possível constatar que, embora a fotossíntese e a respiração possam acontecer simultânea e independentemente (MARQUEZ et al., 1993), a respiração é o ponto final para a obtenção da energia na célula, independente da origem da glicose, fotossintética ou externa, presente no meio. A respiração é mais sensível a extremos de temperatura que a fotossíntese (TORZILLO & VONSHAK, 1994), assim, em temperaturas desfavoráveis ao crescimento a respiração limita a obtenção de energia, de modo que um substrato orgânico pode inibir o crescimento, como ocorreu nos cultivos com $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose (Ensaios 5 e 8).

Em adequadas temperaturas, o crescimento é dependente da luz e limitado pela atividade fotossintética. Nesta situação, como nos Ensaios 6 e 9 a presença de um substrato orgânico diluído no meio é uma fonte adicional de glicose no início dos cultivos quando a intensidade de luz não limita a fotossíntese, e com o passar do tempo e aumento na densidade celular, desobriga a célula de ter a atividade fotossintética como única fonte de substrato para a respiração.

4 CONCLUSÕES

O crescimento de *Spirulina platensis* não foi influenciado pelas diferentes geometrias de fotobiorreator utilizadas, de modo que, em pequena escala, a microalga pode ser cultivada em fotobiorreatores quadrados, de mais fácil construção que os do tipo *raceway*, sem prejuízos ao crescimento.

Durante os cultivos as temperaturas no túnel variaram entre 8,8°C e 41,4°C. Cultivos autotróficos demonstraram ser mais adequados em menores temperaturas, enquanto mixotróficos foram mais produtivos nos meses mais quentes. Cultivos mixotróficos com 0,50 g.L⁻¹ de glicose se mostraram como uma possibilidade de alcançar altas produtividades em altas concentrações celulares.

A máxima concentração celular de *Spirulina* nos cultivos foi 2,17 g.L⁻¹, e a máxima produtividade, 0,621 g.L⁻¹.dia⁻¹, ambas alcançadas em meio complementado com 0,50 g.L⁻¹ de glicose, enquanto a máxima velocidade específica de crescimento foi 0,175 dia⁻¹ em cultivo autotrófico.

Os resultados mostraram que os cultivos autotróficos e mixotróficos de *Spirulina platensis* em fotobiorreatores abertos cobertos por um túnel plástico podem ser explorados alternadamente de acordo com as condições climáticas, de modo que a produção da microalga seja possível durante todo o ano no Sul do Brasil.

5 REFERÊNCIAS

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals 2^a ed. Singapore: McGraw-Hill, 1986.

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

BOX, G. E. P., HUNTER, W. G., HUNTER, J. S. Statistics for experiments. Estados Unidos: John Willey & Sons, 1978. ISBN 0-471-09315-7.

CAMACHO, F. G.; GRIMA, E. M.; MIRÓN, A. S.; PASCUAL, V. G.; CHISTI, Y. Carboxymethyl cellulose protects algal cells against hydrodynamic stress. *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 602 – 610, 2001.

CHEN, F.; ZHANG, Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. *Enzyme and Microbial Technology*, 20, 221 - 224, 1997.

CHOJNACKA, K. & NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 461 - 465, 2004.

CHUNTAPA, B.; POWTONGSOOK, S.; MENASVETA, P. Water quality control using *Spirulina platensis* in shrimp cultures tanks. *Aquaculture*, 220, 355 - 366, 2003.

COHEN, Z. The chemicals of *Spirulina*. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira)* Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997.

CORNET, J. F.; DUSSAP, C. G.; GROS, J. B. A simplified monodimensional approach for modeling coupling between radiant light transfer and growth kinetics in photobioreactors. *Chemical Engineering Science*, 50 (9), 1489 - 1500, 1995.

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

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 18, 603 - 607, 2002.

FÁBREGAS, J.; GARCIA, D.; MORALES, E.; LAMELA, T.; OTERO, A. Mixotrophic production of phycoerythrin and exopolysaccharide by the microalga *Porphyridium cruentum*. *Cryptogamie Algal*, 20, 89 - 94, 1999.

GARCÍA, M. C. C.; MIRÔN, A. S.; SEVILLA, J. M. F.; GRIMA, E. M.; CAMACHO, F. G. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricorutum* Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. *Process Biochemistry*, 40, 297 - 305, 2005.

GRIMA, E. M.; SEVILLA, J. M. F.; PÉREZ, J. A. S.; CAMACHO, F. G. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking

into account incident and averaged irradiances. *Journal of Biotechnology*, 45, 59 - 69, 1996.

GROS, J. B.; POUGHON, L.; LASSEUR, C.; TIKHOMIROV, A. A. Recycling efficiencies of C, H, O, N, S and P elements in a biological life support system based on microorganisms and higher plants. *Advanced Space Research*, 31 (1), 195 - 199, 2003.

HIRAHASHI, T.; MATSUMOTO, M.; HAZEKI, K.; SAEKI, Y.; UI, M.; SEYA, T. Activation of the human innate system by *Spirulina*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. *International Immunopharmacology*, 2, 423 - 434, 2002.

IP, P. F.; WONG, K. H.; CHEN, F. Enhanced production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in mixotrophic culture. *Process Biochemistry*, 39 (11), 1764 - 1766, 2004.

JIMÉNEZ (a), C.; COSSÍO, B. R.; NIELL, F. X. Relationship between physicochemical variables and productivity in open ponds for the production of *Spirulina*: a predictive model of algal yield. *Aquaculture*, 221, 331 - 345, 2003.

JIMÉNEZ (b), C.; COSSÍO, B. R.; NIELL, F. X. The feasibility of industrial production of *Spirulina* (*Arthrospira*) in Southern Spain. *Aquaculture* 217, 179 - 190, 2003.

MARQUEZ, F. J.; SASAKI, K.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N.; NAGAI, S. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76 (5) 408 - 410, 1993.

OGBONNA, J. C.; YADA, H.; TANAKA, H. Kinetic study on light-limited batch cultivation of photosynthetic cells. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80 (3), 259 - 264, 1995.

RICHMOND A. Outdoor mass culture of microalgae. In: Richmond, A. Handbook of Algal Mass Culture. Estados Unidos: CRC Press, 1986.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia Industrial vol.2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

TEAS, J.; HEBERT, J. R.; FITTON, J. H.; ZIMBA, P. V. Algae – a poor man's HAART? *Medical Hypotheses*, 62, 507 – 510, 2004.

TOMASELLI, L.; GIOVANNETTI, L.; TORZILLO, G. Physiology of stress response in *Spirulina spp.* *Bulletin de Institut Océanographique Monaco*, 12, 1993.

TORZILLO, G. & VONSHAK, A. Effect of light and temperature on the photosynthetic activity of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, 6 (5), 399 – 403, 1994.

TORZILLO, G. Tubular bioreactors. In: Vonshak, A. *Spirulina platensis (Arthrospira)* Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997.

TORZILLO, G.; SACCHI, A.; MATERASI, R. Temperature as an important factor affecting productivity and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors. *Bioresource Technology*, 38, 95 – 100, 1991.

VIEIRA, S. Estatística experimental, 2^a ed. São Paulo: Atlas, 1999. ISBN 85-224-2113-7.

VONSHAK, A. & RICHMOND, A. Mass production of the blue - green alga *Spirulina*: An overview. *Biomass*, 15, 233 – 247, 1988.

VONSHAK, A. Outdoor mass production of *Spirulina*: The basic concepts. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira)* Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997.

VONSHAK, A.; ABELIOVICH, A.; BOUSSIBA, S.; ARAD, S.; RICHMOND, A. Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass*, 2, 175 – 185, 1982.

ZARROUK, C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthèse de *Spirulina maxima* Geitler Ph.D. Thesis, University of Paris, 1966.

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

**5.3 CULTIVO MIXOTRÓFICO DA MICROALGA *Spirulina platensis* UTILIZANDO
MELAÇO COMO SUBSTRATO ORGÂNICO**

CULTIVO MIXOTRÓFICO DA MICROALGA *Spirulina platensis* UTILIZANDO MELAÇO COMO SUBSTRATO ORGÂNICO

Andrade, M. R.; Costa, J. A. V.

Laboratório de Engenharia Bioquímica, Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rua Engenheiro Alfredo Huch, 475 – CEP 96201-900 – Rio Grande – RS – Brasil, Caixa Postal 474 – Tel: +55(53)233-8653 – *E-mail: dqmjorge@furg.br

RESUMO

O melaço é um subproduto potencialmente utilizável como fonte de açúcares nos cultivos de microalgas, que, embora sejam microrganismos fotossintéticos, podem ter o crescimento estimulado pela presença de um substrato orgânico. A fixação fotossintética de CO₂ e o metabolismo respiratório são influenciados, respectivamente, pela intensidade luminosa e pela disponibilidade do substrato, entre outros fatores. Com o objetivo de determinar os efeitos da iluminância e da concentração de melaço no crescimento de *Spirulina platensis* foram realizados cultivos em meio complementado com 0,25; 0,50 e 0,75 g.L⁻¹ de melaço; sob iluminâncias de 2500, 3500 e 4500 Lux. Os cultivos apresentaram evidências de duas tendências de crescimento, a primeira mixotrófica com predominância do metabolismo respiratório, e a segunda autotrófica. A concentração de melaço foi o fator de maior influência sobre a máxima concentração celular alcançada e sobre a velocidade específica máxima de crescimento, em ambas as fases. A iluminância influenciou ambos parâmetros na segunda fase. A concentração celular atingiu 2,94 g.L⁻¹ e a velocidade específica de crescimento 0,147 dia⁻¹. As máximas produtividades, em média 0,32 g.L⁻¹dia⁻¹, foram registradas nos primeiros dias de cultivo e não sofreram influência significativa da concentração de melaço ou da iluminância. Os resultados demonstraram o potencial do melaço como forma de estimular o crescimento em cultivos da microalga *Spirulina*.

PALAVRAS-CHAVE: cultivo mixotrófico, iluminância, melaço, respiração, *Spirulina*.

ABSTRACT

Molasses is a by-product potentially useful as sugar source in microalgae culture, which, although are photosynthetic microorganisms, its cell growth can be stimulated by organic substrates. Photosynthetic CO₂ uptake and respiratory metabolism are influenced by illuminance and substrate availability, respectively, among others factors. In order to determinate the effects of illuminance and molasses concentration on *Spirulina platensis* growth, we carried out cultures in supplemented medium with 0.25, 0.50 or 0.75 g.L⁻¹ of molasses; under illuminances of 2500, 3500 and 4500 Lux. The results evidenced two different growth phases, one mixotrophic, with predominance of respiratory metabolism, and other predominantly autotrophic. Molasses concentration was the most important factor affecting growth in both phases. Illuminance influenced both growth parameters in the second phase. Cell concentration reached 2.94 g.L⁻¹, and specific growth rate, 0.147 day⁻¹. Maximum biomass yield, 0.32 g.L⁻¹day⁻¹ in media,

occurred in the begin of cultures, and it wasn't influenced by either molasses concentration or illuminance. Results showed the molasses potential to stimulate *Spirulina* growth.

KEYWORDS: illuminance, mixotrophic culture, molasses, respiration, *Spirulina*.

1 INTRODUÇÃO

Cultivos de microalgas têm sido explorados para a produção de compostos químicos de valor comercial, como pigmentos naturais, biocombustíveis e suplementos alimentares. Apesar dos progressos no desenvolvimento das técnicas de cultivo e de fotobiorreatores com alta eficiência, a baixa produtividade de biomassa ainda merece a atenção de pesquisadores interessados no desenvolvimento da biotecnologia microalgal para a produção em grande escala.

A *Spirulina* é uma microalga utilizada na alimentação humana e animal, com alto teor de proteínas (até 74% em peso seco), ácidos graxos insaturados, minerais e pigmentos em sua composição (COHEN, 1997).

Além de utilizar a fotossíntese como metabolismo principal para obtenção de carbono, a *Spirulina* é capaz de assimilar substratos orgânicos nos cultivos mixotróficos, onde a fotossíntese e a respiração podem ocorrer simultaneamente durante o período claro (VILLAREJO et al., 1995; MARQUEZ et al., 1993). Nestes cultivos, a fixação fotossintética de carbono inorgânico e o consumo respiratório de substratos orgânicos são influenciados, respectivamente, pela intensidade luminosa e pela disponibilidade do nutriente (ZHANG et al., 1999).

A luz desempenha um importante papel no cultivo de células fotossintéticas. O crescimento pode ser prejudicado em baixas intensidades luminosas (fotolimitação) ou em altas devido à formação de peróxido de hidrogênio no interior da célula (fotoinibição) (GRIMA et al., 1996). Em cultivos mixotróficos o crescimento celular não é estritamente dependente da fotossíntese para obtenção de carbono e, embora 60% da energia convertida em ATP seja proveniente da luz nestes cultivos (YANG et al., 2000), esta deixa de ser um fator indispensável ao crescimento como é em cultivos autotróficos.

Resultados obtidos por CHOJNACKA & NOWORYTA, (2004) e MARQUEZ et al. (1993) indicam que condições mixotróficas em meio suplementado com glicose podem estimular o crescimento de *Spirulina*. Além disso, a presença de um substrato orgânico dissolvido no meio de cultivo pode contribuir para a redução da perda noturna de biomassa, em decorrência da respiração, nos cultivos da microalga (TORZILLO et al., 1991).

Outras microalgas, como *Phaeodactylum tricornutum* em glicerol (GARCÍA et al., 2005), *Haematococcus lacustris* em acetato (CHEN et al., 1997) e *Porphyridium cruentum* em extrato solúvel de batata (FÁBREGAS et al., 1999), apresentaram melhores parâmetros de crescimento em cultivo mixotrófico comparado ao autotrófico.

O Brasil é o maior produtor mundial de cana de açúcar, a partir da qual é gerado o melaço como subproduto na indústria açucareira, contendo mais de 50% de açúcares em sua composição, o que lhe confere potencial para uso como substrato no cultivo de microalgas. Melaço foi utilizado no cultivo de *Candida utilis*, tendo sido demonstrada a redução nos custos de produção da levedura (LEE & KIM, 2001). Contudo, não são encontrados registros da utilização deste subproduto para o cultivo de microalgas. Alguns autores, inclusive, afirmam que a *Spirulina* não possui a habilidade de utilizar o carbono orgânico do melaço (BECKER & VENKATARAMAN, 1984).

O objetivo deste trabalho foi determinar a influência da iluminância e da concentração de melaço no crescimento da microalga *Spirulina platensis* em cultivo mixotrófico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo e Meio de Cultivo

Foi utilizada a microalga *Spirulina platensis* cepa LEB-52 (COSTA et al., 2004) em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) 20% (v/v) em água, complementado com 0,25; 0,50 e 0,75 g.L⁻¹ iniciais de melaço. Os componentes do meio Zarrouk utilizados foram de grau analítico. O melaço foi obtido junto à indústria açucareira brasileira. O inóculo foi mantido em meio Zarrouk 20% (v/v) e 0,25 g.L⁻¹ de melaço. O meio de cultura, exceto o substrato orgânico, foi esterilizado em autoclave durante 15 min. a 121 °C.

2.2 Fotobiorreatores e Condições de Cultivo

Os cultivos foram descontínuos, realizados em fotobiorreatores de vidro fechados, do tipo erlenmeyers de 2L, equipados com sistema de retirada asséptica de amostra, previamente esterilizados por 15 min. a 121 °C. A agitação das culturas foi realizada por injeção de ar estéril através de bombas de diafragma. A temperatura foi mantida constante em 30 °C (COSTA et al., 2000; ZHANG et al., 1999) e o fotoperíodo

de 12h claro/escuro (COSTA et al., 2000), com iluminâncias de 2500, 3500 ou 4500 Lux providas por lâmpadas fluorescentes de 40W. Os cultivos foram inoculados com 0,15 g.L⁻¹ (COLLA et al., 2004) de células e mantidos por 25 dias, sem controle adicional de pH.

2.3 Planejamento Experimental

Os ensaios foram realizados segundo um planejamento experimental fatorial completo 3² com duplicata no ponto central (BOX et al., 1978), através do qual foram testadas as concentrações de melação e iluminâncias apresentadas em níveis reais e codificados na Tabela 1. A matriz do planejamento experimental é apresentada na Tabela 2.

Tabela 1 Níveis reais e codificados das variáveis estudadas no planejamento fatorial 3²

Variável	Níveis codificados		
	-1	0	+1
Iluminância (Lux)	2500	3500	4500
Melaço (g.L ⁻¹)	0,25	0,50	0,75

2.4 Respostas Estudadas e Análise Estatística

Foram avaliadas a concentração celular máxima, a produtividade máxima de biomassa e a velocidade específica máxima de crescimento.

A produtividade (P em g.L⁻¹.dia⁻¹), foi obtida segundo a Equação 1, onde X_t é a concentração celular (g.L⁻¹) no tempo t (dia), e X_0 a concentração celular (g.L⁻¹) no tempo t_0 (dia) (SCHMIDELL et al., 2001).

$$P = (X_t - X_0)/t - t_0 \quad (\text{Eq. 1})$$

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) em (dia⁻¹) foi calculada por regressão exponencial aplicada à fase de crescimento exponencial (BAILEY & OLLIS, 1986).

Os resultados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) com 90% de significância ($p < 0,10$).

2.5 Determinações Analíticas

A concentração celular de *Spirulina platensis* foi determinada a cada 24h através da densidade ótica das culturas a 670 nm (COSTA et al., 2002) em espectrofotômetro (FEMTO 700-Plus). O pH das culturas foi registrado a cada 72h por pHmetro digital (Quimis Q.400H).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra o acompanhamento da concentração celular ao longo dos cultivos e permite identificar duas tendências de crescimento distintas, delimitadas em torno de 11 dias. Na primeira fase as maiores concentrações celulares foram alcançadas em cultivos com o nível central ou superior de melaço (Ensaio 6, 7 e 9). Na segunda fase, após 11 dias de cultivo, as maiores concentrações celulares foram atingidas em ensaios com o nível central e superior de iluminância (Ensaio 3, 8 e 9). Este comportamento sugere que as células assumiram um metabolismo predominantemente mixotrófico na primeira fase, com crescimento dependente da concentração de substrato; e autotrófico na segunda, com crescimento dependente da intensidade luminosa, após o substrato orgânico ter sido consumido. Duas fases distintas de crescimento em cultivo mixotrófico foram também constatadas por MARTÍNEZ et al. (1997) em culturas de *Chlorella*.

Embora, segundo MARQUEZ et al. (1993), a respiração e a fotossíntese possam ocorrer simultânea e independentemente em cultivos mixotróficos de *Spirulina*, a presença de um substrato orgânico alterou os metabolismos fotossintético e respiratório de *Chlorella* (VILLAREJO et al., 1995). Além disso, segundo ZHANG et al. (1999), as condições de cultivo podem favorecer um destes metabolismos em detrimento de outro. Quando isto ocorre, o substrato para o outro processo metabólico (luz para a fotossíntese ou carbono orgânico para a respiração) pode ser um inibidor do crescimento. Em cultivo mixotrófico foi relatada uma menor produção de pigmentos fotossintéticos comparado ao autotrófico (OGBONNA & TANAKA, 1998), o que dificulta a fotossíntese.

Os níveis superiores de luz e melaço (Ensaio 9) podem ter resultado em equilíbrio entre os metabolismos respiratório e fotossintético, e a simultaneidade de ambos (MARQUEZ et al., 1993) fez com que mantivesse as maiores densidades celulares até 20 dias de cultivo. Este ensaio foi o único entre todos realizados que

apresentou uma tendência contínua de crescimento, sem duas fases nitidamente distintas. Esta tendência pode ter sido devida ao nível superior de iluminância, permite a fotossíntese em altas taxas desde o início do cultivo, quando ainda existe carbono orgânico no meio, de modo que quando este é totalmente consumido e a fotossíntese torna-se o único processo para obtenção primária de energia não há grandes mudanças no modelo metabólico da célula, sem refletir em uma fase de adaptação ao novo regime.

Tabela 2 Planejamento experimental fatorial 3^2 e parâmetros de crescimento avaliados nos cultivos.

Ensaio	Variáveis codificadas		Parâmetros de crescimento avaliados				
	X_1	X_2	$X_{m\acute{a}x\ 1}$	$X_{m\acute{a}x\ 2}$	$P_{m\acute{a}x}$	$\mu_{m\acute{a}x\ 1}$	$\mu_{m\acute{a}x\ 2}$
1	-1	-1	1,03	1,57	0,26	0,093	0,089
2	0	-1	0,86	1,41	0,18	0,067	0,147
3	+1	-1	1,04	1,91	0,20	0,089	0,054
4	-1	0	1,07	2,09	0,46	0,056	0,057
5	0	0	0,96	2,32	0,34	0,058	0,042
6	+1	0	1,17	2,16	0,24	0,035	0,023
7	-1	+1	1,21	2,03	0,56	0,042	0,039
8	0	+1	1,14	2,94	0,29	0,063	0,064
9	+1	+1	1,55	2,80	0,44	0,069	0,048
10	0	0	0,96	2,05	0,13	0,070	0,062
11	0	0	1,13	2,21	0,42	0,055	0,042

X_1 : Iluminância; X_2 : Concentração de melão; $X_{m\acute{a}x}$: Concentração celular máxima ($g.L^{-1}$); $P_{m\acute{a}x}$: Produtividade máxima ($g.L^{-1}.dia^{-1}$); $\mu_{m\acute{a}x}$: Velocidade específica máxima de crescimento (dia^{-1}). Os sub-índices 1 e 2 nos parâmetros de crescimento referem-se, respectivamente, à primeira (até 11 dias) e segunda (após 11 dias) tendências de crescimento observadas.

O cultivo com o nível inferior de melão e superior de iluminância (Ensaio 3), manteve uma das menores concentrações celulares até 11 dias de cultivo, atingindo $1,04\ g.L^{-1}$. Após, houve um acréscimo em sua concentração celular, que permaneceu inferior apenas àquela nos cultivos com o nível superior de melão. O cultivo com 3500 Lux (Ensaio 2) apresentou as menores concentrações celulares durante todo o experimento, alcançando máximo de $1,41\ g.L^{-1}$ em 18 dias.

Em 5 dias de cultivo formaram-se aglomerados celulares no ensaio com o nível superior de iluminância e $0,50\ g.L^{-1}$ de melão (Ensaio 6), que logo desapareceram e teve início a fase de crescimento exponencial. Os grumos em culturas de *Spirulina* denotam uma situação de estresse, causada por fatores físico-químicos como aumento no pH, inibição pelo substrato, fotoinibição ou fotolimitação e são indesejáveis porque prejudicam a incidência de luz na cultura e privam as células aglomeradas de receber luminosidade e nutrientes, o que pode conduzir à morte

(BELAY, 1997). No cultivo com o nível superior de ambas as variáveis (Ensaio 9) também formaram-se grumos no mesmo período, porém em menor quantidade e sem um prejuízo notável ao crescimento (Figura 1).

O cultivo com $0,75 \text{ g.L}^{-1}$ de melaço e 3500 Lux (Ensaio 8) se destacou dos demais após 11 dias de cultivo, alcançando a maior concentração celular ($2,94 \text{ g.L}^{-1}$). Este valor foi superior aos encontrados por MARQUEZ et al. (1993) em cultivos autotróficos ($1,77 \text{ g.L}^{-1}$) e mixotróficos ($2,52 \text{ g.L}^{-1}$) de *Spirulina platensis* com glicose, porém utilizando meio Zarrouk padrão, enquanto os presentes resultados foram obtidos em meio 20% (v/v).

Segundo a Análise de Variância (Tabela 3), a concentração de melaço foi o fator de maior influência na máxima concentração celular atingida na primeira fase do crescimento (até 11 dias), de modo que a concentração celular máxima aumentou, em média $0,32 \text{ g.L}^{-1}$, ao comparar cultivos com o nível inferior e superior de melaço, respectivamente, e este efeito foi independente do nível de iluminância utilizado. A mesma relação foi encontrada nos trabalhos de GARCÍA et al. (2005), ao utilizar glicose como substrato orgânico. A máxima concentração celular na segunda fase (após 11 dias) foi influenciada pela concentração de melaço e pela iluminância, sendo alcançadas, em média, maiores concentrações nos níveis superiores das variáveis. O efeito de uma variável não foi influenciado pela outra ($p > 0,10$, Tabela 3).

Tabela 3 Análise de Variância aplicada à concentração, produtividade e velocidade específica de crescimento máximas.

Variável	$X_{\text{máx 1}}$		$X_{\text{máx 2}}$		$P_{\text{máx}}$		$\mu_{\text{máx 1}}$		$\mu_{\text{máx 2}}$	
	Efeito	p	Efeito	p	Efeito	p	Efeito	p	Efeito	p
X1(L)	0,15	0,202	0,40*	0,071	-0,03	0,837	0,001	0,927	-0,020	0,168
X1(Q)	-0,16	0,124	0,08	0,433	-0,05	0,619	0,003	0,609	0,029*	0,056
X2(L)	0,32*	0,056	0,96*	0,013	0,11	0,461	-0,025*	0,061	-0,046*	0,039
X2(Q)	-0,04	0,599	0,03	0,745	0,06	0,562	-0,017*	0,080	-0,036*	0,038
X1(L)xX2(L)	0,17	0,235	0,22	0,254	0,13	0,483	0,016	0,190	0,022	0,197

X1: Iluminância; X2: Concentração de melaço; (L): Efeito linear; (Q): Efeito quadrático; *efeito significativo a 90% de confiança ($p < 0,10$); $X_{\text{máx}}$: Concentração celular máxima (g.L^{-1}); $P_{\text{máx}}$: Produtividade máxima ($\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$); $\mu_{\text{máx}}$: Velocidade específica máxima de crescimento (dia^{-1}). Os Algarismos 1 e 2 referem-se, respectivamente, à primeira e segunda fases de crescimento observadas

As células apresentaram um rápido crescimento logo nos primeiros dias de cultivo, fazendo com que as máximas produtividades fossem obtidas em 3 dias (Figura 2). As máximas produtividades foram verificadas em cultivos com o nível inferior de iluminância e superior (Ensaio 7) ou central de melaço (Ensaio 4), alcançando respectivamente, 0,56 e $0,46 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$. Após, caíram ainda dentro da fase

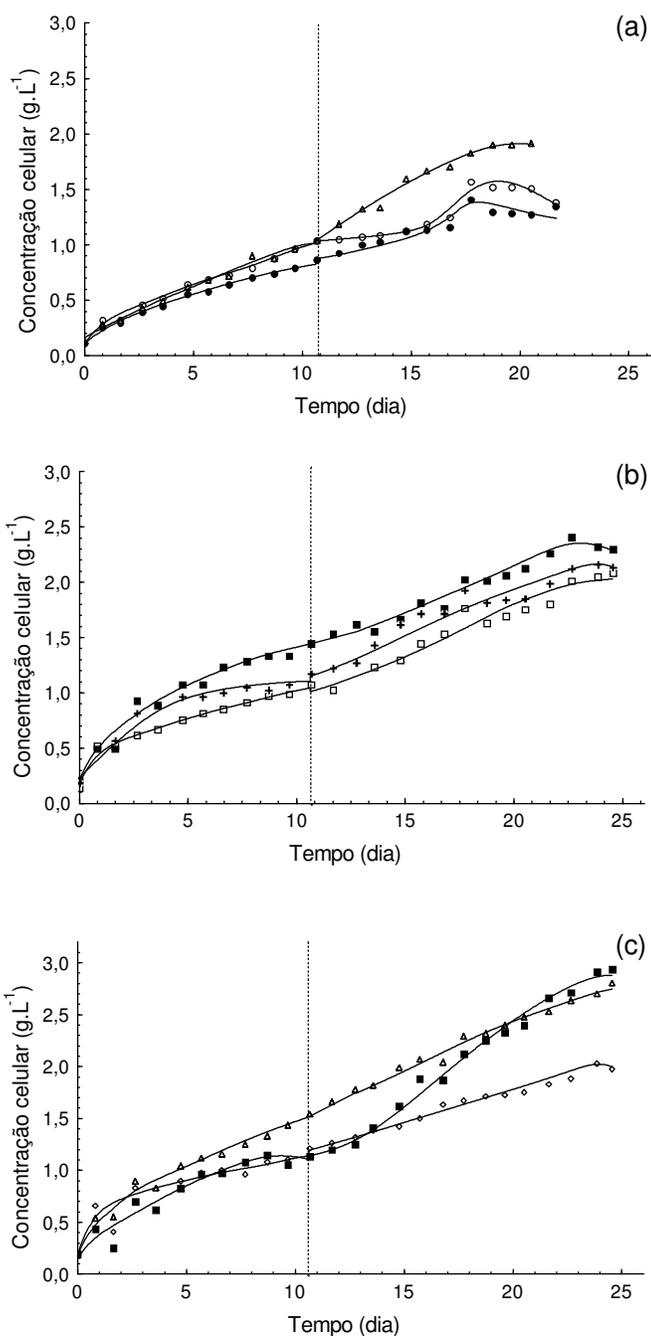


Figura 1 Crescimento da microalga *Spirulina platensis*. (a) Ensaios 1(\circ) $I=2500$, MEL=0,25, 2(\bullet) $I=3500$, MEL=0,25, 3(\triangle) $I=4500$, MEL=0,25, (b) Ensaios 4(\square) $I=2500$, MEL=0,50, 5(\blacksquare) $I=3500$, MEL=0,50, 6(+) $I=4500$, MEL=0,50, (c) Ensaios 7(\diamond) $I=2500$, MEL=0,75; 8(\blacksquare) $I=3500$, MEL=0,75, 9(\triangle) $I=4500$, MEL=0,75. I : Iluminância (Lux); MEL: Concentração de melão (g.L^{-1}). A linha pontilhada vertical delimita as duas tendências de crescimento.

predominantemente mixotrófica, mantendo-se aproximadamente constantes, entre 0,05 e 0,12 g.L⁻¹.dia⁻¹, durante a fase autotrófica. Nesta fase, o nível central de iluminância e inferior de melação (Ensaio 2) proporcionaram o menor valor para a produtividade máxima (0,08 g.L⁻¹.dia⁻¹), enquanto o cultivo nos níveis superiores de ambas variáveis (Ensaio 9) apresentou a maior produtividade (0,13 g.L⁻¹.dia⁻¹). Porém, segundo a análise do planejamento experimental (Tabela 3) o efeito das variáveis estudadas não apresentou significância estatística sobre a produtividade máxima que foi, em média, 0,32 g.L⁻¹.dia⁻¹ nos cultivos.

Segundo a Análise de Variância (Tabela 3), a concentração de melação apresentou efeitos linear e quadrático, ambos negativos sobre a velocidade específica máxima de crescimento em ambas as fases, o que significa uma queda de $\mu_{\text{máx } 1}$ e $\mu_{\text{máx } 2}$ a partir de cultivos com o nível inferior (0,25 g.L⁻¹) de melação até o nível superior (0,75 g.L⁻¹), com uma região de mínimo no nível central (0,50 g.L⁻¹) do substrato orgânico, estes resultados podem ser visualizados na Figura 3.

A velocidade específica de crescimento máxima na primeira fase ($\mu_{\text{máx } 1}$) foi independente da luz, indicando a possibilidade de ter sido alcançado o nível de saturação luminosa para este parâmetro naquelas condições de cultivo. Uma situação de fotolimitação é caracterizada por um aumento da velocidade específica máxima de crescimento com o aumento da intensidade luminosa incidente. Por outro lado, uma situação de fotoinibição é caracterizada por uma queda na velocidade específica com o aumento da intensidade de luz (CHOJNACKA & NOWORYTA, 2004).

Na segunda fase de crescimento, predominantemente autotrófica, $\mu_{\text{máx } 2}$ sofreu, além do efeito da concentração de melação, efeito quadrático positivo da intensidade luminosa. O efeito de uma variável foi independente da outra. A máxima concentração celular na segunda fase ($X_{\text{máx } 2}$) também sofreu efeito da concentração de melação, como apresentado anteriormente. Supondo que o melação tenha sido consumido durante a primeira fase, predominantemente mixotrófica, sua influência nos parâmetros de crescimento na segunda fase, predominantemente autotrófica, é explicada por alterações nas estruturas celulares, ou nas rotas metabólicas, decorrentes da sua presença durante a primeira fase do crescimento. A presença de

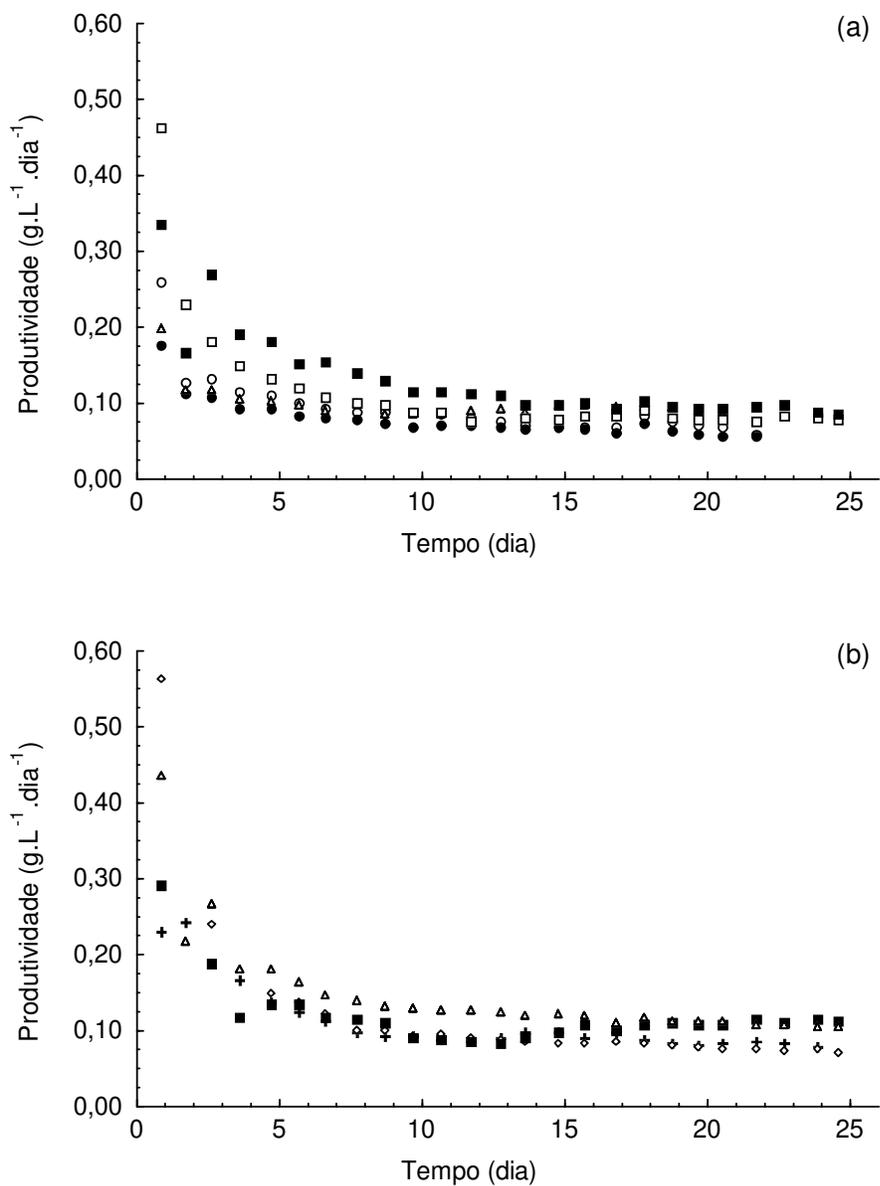


Figura 2 Produtividade da microalga *Spirulina platensis*. (a) Ensaios 1(○)I=2500, MEL=0,25, 2(●)I=3500, MEL=0,25, 3(△)I=4500, MEL=0,25, 4(□)I=2500, MEL=0,50, 5(■)I=3500, MEL=0,50, (b) Ensaios 6(+)I=4500, MEL=0,50, 7(◇)I=2500, MEL=0,75, 8(■)I=3500, MEL=0,75, 9(△)I=4500, MEL=0,75. I: Iluminância (Lux); MEL: Concentração de melão (g.L⁻¹)

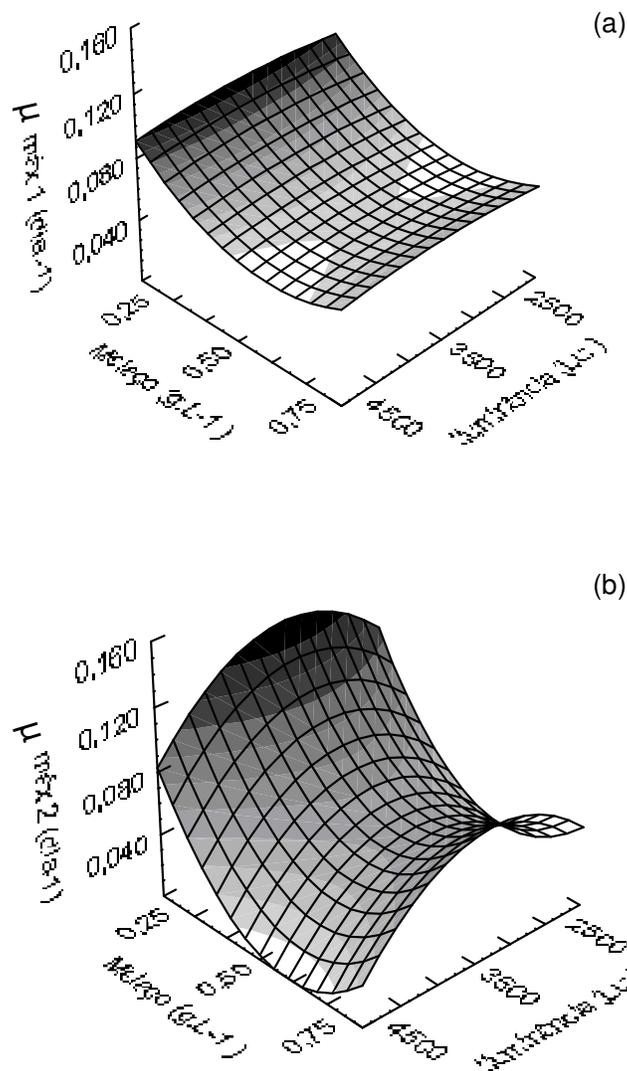


Figura 3 Velocidade específica máxima de crescimento durante (a) primeira tendência ($\mu_{\max 1}$) e (b) segunda tendência do crescimento ($\mu_{\max 2}$)

glicose influenciou os metabolismos respiratório e fotossintético em culturas mixotróficas de *Chlorella vulgaris* ocorrendo acréscimo no conteúdo de enzimas envolvidas na oxidação da glicose e redução na atividade da enzima rubisco, quando comparado aos níveis em cultivo autotrófico (VILLAREJO et al., 1995).

O pH é um dos fatores mais importantes no cultivo de *Spirulina*, e mantê-lo acima de 9,5 é indispensável para evitar a contaminação por outras microalgas (BELAY, 1997). Embora os cultivos tenham sido realizados assepticamente em fotobiorreatores fechados, que apresentam menor probabilidade de contaminação, este patamar mínimo de pH foi alcançado, mesmo com o meio de cultivo Zarrouk diluído a 20% (v/v). Segundo a Figura 4, o pH esteve durante todo o tempo dentro do intervalo ótimo para o crescimento da microalga, entre 9,5 e 10,5 (PELIZER et al., 2003; RICHMOND & GROBBELAAR, 1986).

A variação do pH em culturas de microalgas ocorre devido ao consumo de substratos, principalmente o dióxido de carbono e à degradação de metabólitos produzidos (GRIMA et al., 1999). A variação do pH afeta a solubilidade e a biodisponibilidade de nutrientes, o transporte de substâncias através da membrana citoplasmática, a atividade enzimática e o transporte de elétrons na fotossíntese (CARRIÓN et al., 2001). Além disso, as trocas de CO₂ entre a atmosfera e o meio de cultura também são influenciadas pelo pH. A migração de CO₂ da atmosfera para o meio líquido é facilitada pelo aumento do pH do meio (RICHMOND & GROBBELAAR, 1986).

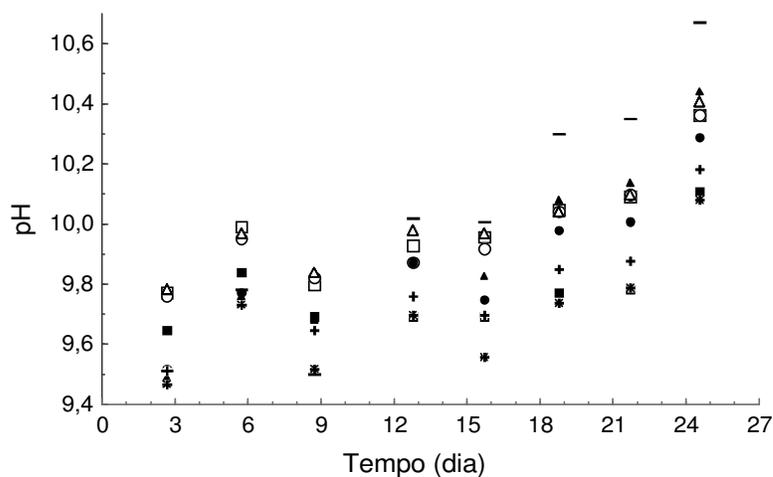


Figura 4 Acompanhamento do pH ao longo do tempo nos cultivos. Ensaio 1 (□) I=2500, MEL=0,25, 2 (○) I=3500, MEL=0,25, 3 (△) I=4500, MEL=0,25, 4 (■) I=2500, MEL=0,50, 5 (●) I=3500, MEL=0,50, 6 (▲) I=4500, MEL=0,50, 7 (+) I=2500, MEL=0,75, 8 (*) I=3500, MEL=0,75, 9 (-) I=4500, MEL=0,75. I: Iluminância (Lux); MEL: Concentração de melão (g.L⁻¹)

Durante a primeira fase de crescimento o pH nos cultivos apresentou um acréscimo seguido de queda. Os cultivos com 0,25 g.L⁻¹ de melaço (Ensaio 1, 2 e 3) apresentaram os maiores valores de pH durante a primeira fase e se mantiveram entre os maiores valores na segunda, reforçando a hipótese de que o nível inferior de substrato orgânico permite que a fotossíntese ocorra mais intensamente, mesmo durante a primeira fase do crescimento. O decréscimo de pH notado na primeira fase pode ser devido a prevalecer o metabolismo respiratório, com a conseqüente liberação de CO₂.

Na Figura 4 nota-se uma tendência de aumento de pH em todos os ensaios durante a segunda fase, predominantemente autotrófica. O aumento do pH em cultivos autotróficos de *Spirulina platensis* ocorre devido à liberação de 0,5 mol de CO₃²⁻ e à fixação de 0,5 mol de CO₂ para cada mol de HCO₃⁻ assimilado (BINAGHI et al., 2003). Cultivos com o nível superior de iluminância (Ensaio 3, 6 e 9), onde a fotossíntese pode ocorrer mais intensamente, apresentaram os maiores valores de pH durante a segunda fase do crescimento. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por HASE et al. (2000), que constataram, em cultivos de *Chlorella*, aumento de pH durante o período claro, quando a fotossíntese pode ocorrer, e decréscimo de pH durante o período noturno, quando cessa a fotossíntese e apenas a respiração ocorre.

4 CONCLUSÕES

Duas fases de crescimento foram identificadas, delimitadas em torno de 11 dias de cultivo. A primeira, com crescimento dependente da concentração de melaço e com queda de pH, sugerindo que a fase seja essencialmente mixotrófica, com predominância do metabolismo respiratório. O crescimento na segunda fase passou também a ser influenciado pela iluminância, com crescentes valores de pH, típico da fotossíntese, sugerindo que esta fase tenha sido predominantemente autotrófica.

A presença de melaço, em ambas as fases, influenciou favoravelmente as máximas concentrações celulares, sendo alcançados 2,94 g.L⁻¹ em 0,75 g.L⁻¹ de melaço e 3500 Lux; e desfavoravelmente as velocidades específicas máximas de crescimento, sendo a máxima (0,093 dia⁻¹) obtida em 0,25 g.L⁻¹ de melaço e 2500 Lux. Na segunda fase a luz também influenciou estes parâmetros de crescimento, porém com um efeito menor que o melaço, indicando que o substrato orgânico na primeira

fase provavelmente cause alterações na célula que influenciam o crescimento na segunda fase. As variáveis estudadas não influenciaram significativamente a produtividade máxima obtida nos cultivos, sendo alcançados em média $0,32 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$.

Mesmo sem controle adicional, o pH mínimo (9,5) para assegurar um cultivo unialgal para *Spirulina* foi alcançado em todos os ensaios realizados, e esteve também dentro do intervalo ótimo (9,5 a 10,5) para o crescimento da microalga.

Os resultados evidenciaram o potencial da utilização de melação como substrato orgânico no cultivo da microalga nas condições testadas e abrem a possibilidade de explorar um subproduto de baixo custo como forma de incrementar os parâmetros de crescimento em cultivos de *Spirulina platensis*.

5 REFERÊNCIAS

BAILEY, J. E. & OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals 2^a ed. Singapore: McGraw-Hill, 1986.

BECKER, E. W. & VENKATARAMAN, L. V. Production and utilization of the blue-green alga *Spirulina* in India. *Biomass*, 4, 105 – 125, 1984.

BELAY, A. Mass culture of *Spirulina* outdoors – The Earthrise farms experience. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira)* Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997.

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

BOX, G. E. P., HUNTER, W. G., HUNTER, J. S. Statistics for experiments. Estados Unidos: John Willey & Sons, 1978. ISBN 0-471-09315-7.

CARRIÓN, C. P.; VALIENTE, E. F.; PINAS, F. F.; LEGANÉS, F. Acclimation of photosynthetic pigments and photosynthesis of the cyanobacterium *Nostoc* sp. Strain UAM206 to combined fluctuations of irradiance, pH and inorganic carbon availability. *Journal of Plant Physiology*, 158, 1455 – 1461, 2001.

CHEN, F.; CHEN, H.; GONG, X. Mixotrophic and heterotrophic growth of *Haematococcus lacustris* and rheological behaviour of the cell suspensions. *Bioresource Technology*, 62, 19 - 24, 1997.

CHOJNACKA, K. & NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 461 - 465, 2004.

COHEN, Z. The chemicals of *Spirulina*. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira)* Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997.

COLLA, L. M.; BERTOLIM, T. E.; COSTA, J. A. V. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* under different temperatures and nitrogen concentrations. *Z. Naturforsch*, 59c, 55 – 59, 2004.

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

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 18, 603 – 607, 2002.

COSTA, J. A. V.; LINDE, G. A.; ATALA, D. I. P. Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 15 – 18, 2000.

FÁBREGAS, J.; GARCIA, D.; MORALES, E.; LAMELA, T.; OTERO, A. Mixotrophic production of phycoerythrin and exopolysaccharide by the microalga *Porphyridium cruentum*. *Cryptogamie Algal*, 20, 89 – 94, 1999.

GARCÍA, M. C. C.; MIRÓN, A. S.; SEVILLA, J. M. F.; GRIMA, E. M.; CAMACHO, F. G. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricorutum* Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. *Process Biochemistry*, 40, 297 – 305, 2005.

GRIMA, E. M.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; CAMACHO, F. G.; CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer and scaleup. *Journal of Biotechnology*, 70, 231 – 247, 1999.

GRIMA, E. M.; SEVILLA, J. M. F.; PÉREZ, J. A. S.; CAMACHO, F. G. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *Journal of Biotechnology*, 45, 59 - 69, 1996.

HASE, R.; OIKAWA, O.; SASAO, C.; MORITA, M.; WATANABE, Y. Photosynthetic production of microalgal biomass in a *raceway* system under greenhouse conditions in Sendai City. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89 (2), 157 – 163, 2000.

LEE, B. & KIM, J. K. Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. *Aquacultural Engineering*, 25, 111 - 124, 2001.

MARQUEZ, F. J.; SASAKI, K.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N.; NAGAI, S. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 5, 408 – 410, 1993.

MARTÍNEZ, M. E.; CAMACHO, F.; JIMÉNEZ, J. M.; ESPÍNOLA, J. B. Influence of light intensity on the kinetic and yield parameters of *Chlorella pyrenoidosa* mixotrophic growth. *Process Biochemistry*, 32 (3), 93 – 98, 1997.

OGBONNA, J. C. & TANAKA, H. C Cyclic autotrophic/heterotrophic cultivation of photosynthetic cells: a method of achieving continuous cell growth under light/dark cycles. *Bioresource Technology*, 65, 62 – 72, 1998.

PELIZER, L. H.; DANESI E. D.; 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*, 56, 371 – 375, 2003.

RICHMOND, A. & GROBBELAAR, J. U. Factors affecting the output rate of *Spirulina platensis* with reference to mass cultivation. *Biomass*, 10, 253 – 264, 1986.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial* vol.2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

TORZILLO, G.; SACCHI, A.; MATERASSI, R. Temperature as an important factor affecting productivity and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors. *Bioresource Technology*, 38, 95 - 100, 1991.

VILLAREJO, A.; ORÚS, M. I.; MARTÍNEZ, F. Coordination of photosynthetic and respiratory metabolism in *Chlorella vulgaris* UAM 101 in the light. *Physiologia Plantarum*, 94, 680 - 686, 1995.

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 6, 87 - 102, 2000.

ZARROUK, C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* Geitler Ph.D. Thesis, University of Paris, 1966.

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

6 CONCLUSÕES GERAIS

Em cultivos na menor escala (fotobiorreatores de 6 ou 2L) os melhores valores para a concentração celular inicial e para a concentração de meio Zarrouk estiveram relacionados às condições ambientais em que se realizaram os cultivos. Em cultivos sob condições ambientais não controladas, a inoculação com $0,40 \text{ g.L}^{-1}$ e a utilização de meio Zarrouk 20% conduziram a melhores resultados. Cultivos sob condições controladas inoculados com $0,15 \text{ g.L}^{-1}$ apresentaram melhores parâmetros de crescimento; e a concentração de 10% de meio Zarrouk pode ser utilizada sem prejuízos ao crescimento, uma vez que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos nas duas concentrações de meio testadas. Fotobiorreatores abertos mantiveram o crescimento da *Spirulina* por mais tempo que fechados, independente das condições ambientais serem controladas ou não. O cultivo em fotobiorreatores abertos sob condições não controladas alcançou parâmetros de crescimento semelhantes ou, até mesmo, superiores aos obtidos em condições de temperatura, iluminância e fotoperíodo controlados.

Em fotobiorreatores abertos na escala piloto (650L) o crescimento de *Spirulina* não foi influenciado pela geometria do fotobiorreator, de modo que, nas condições presentes durante este estudo, *Spirulina* pode ser cultivada em fotobiorreatores quadrados ou *raceway* sem prejuízos ao crescimento. Nestas condições os cultivos estiveram expostos a temperaturas tão baixas quanto $8,8 \text{ }^\circ\text{C}$. Cultivos autotróficos foram menos suscetíveis às baixas temperaturas, indicando adequação aos meses frios, enquanto mixotróficos sugeriram ser mais produtivos em meses quentes; assim, alternar os dois modos de cultivo pode ser uma possibilidade de produzir a microalga *Spirulina* durante todo o ano no Sul do Brasil. A complementação do meio de cultivo com $0,50 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose permitiu que fossem alcançadas concentrações de $2,17 \text{ g.L}^{-1}$ e produtividades de $0,621 \text{ g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, e, além disso, possibilitou a maior relação entre produtividade e concentração celular.

Nos cultivos mixotróficos com melaço foram observadas duas tendências de crescimento distintas: a primeira mixotrófica e a segunda autotrófica. Em ambas, a concentração do substrato orgânico foi o fator de maior influência no crescimento celular, sendo alcançados $2,94 \text{ g.L}^{-1}$ em cultivos com $0,75 \text{ g.L}^{-1}$ de melaço, e esta foi a maior concentração celular, em geral, registrada, sendo constatado o potencial do melaço como substrato orgânico para o cultivo de *Spirulina platensis*.

As velocidades específicas máximas de crescimento nos cultivos foram desfavoravelmente influenciadas pela presença de substrato orgânico (glicose e melão), sendo os maiores valores ($0,322 \text{ dia}^{-1}$) alcançados em cultivo autotrófico.

Os resultados indicam viabilidade técnica do cultivo da microalga *Spirulina* e que os demais fatores estudados podem ser combinados de forma a atingir as melhores taxas de crescimento para a produção de biomassa da microalga nas condições ambientais do Sul do Brasil.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudar os cultivos de *Spirulina* em meio complementado com melação em condições ambientais não controladas;

Testar outros substratos orgânicos para cultivo mixotrófico de *Spirulina*, como sacarose;

Realizar levantamento de custos de produção da microalga em cultivo autotrófico e mixotrófico;

Cultivar *Spirulina platensis* heterotroficamente, comparando os resultados com aqueles dos cultivos autotrófico e mixotrófico;

Realizar análise de composição da biomassa cultivada nos diferentes modos de cultivo;

Testar outros sistemas de agitação nos fotobiorreatores em escala piloto, como por pás rotativas e aspersão de ar;

Avaliar o potencial dos cultivos da microalga *Spirulina* para fixação de CO₂ e para a produção de biodiesel.

8 ANEXOS

ANEXO 1 Acompanhamento da concentração celular de *Spirulina platensis* nos cultivos

Tabela A1 Acompanhamento diário da concentração celular (g.L^{-1}). Artigo Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em pequena escala e diferentes condições ambientais. (A letra “e” numerada identifica o Ensaio com a numeração referida no Artigo)

Tempo (dia)	e1	e1	e2	e2	e3	e3	e4	e4	e5	e5	e6
0	0,12	0,14	0,14	0,15	0,14	0,14	0,16	0,15	0,39	0,40	0,31
1	0,15	0,14	0,12	0,13	0,15	0,14	0,09	0,14	0,41	0,41	0,39
2	0,20	0,19	0,18	0,19	0,21	0,22	0,21	0,20	0,45	0,48	0,43
3	0,21	0,22	0,19	0,21	0,21	0,24	0,23	0,22	0,45	0,50	0,46
4	0,29	0,30	0,21	0,22	0,32	0,30	0,25	0,23	0,55	0,50	0,55
5	0,32	0,37	0,33	0,33	0,33	0,30	0,39	0,34	0,50	0,51	0,71
6	0,46	0,45	0,48	0,50	0,50	0,38	0,58	0,55	0,62	0,61	0,85
7	0,40	0,40	0,56	0,60	0,41	0,51	0,82	0,77	0,58	0,60	0,83
8	0,42	0,47	0,63	0,63	0,38	0,38	0,76	0,76	0,55	0,57	0,86
9	0,44	0,54	0,66	0,59		0,46	0,79	0,77	0,56	0,58	0,90
10	0,47	0,53		0,68	0,47	0,48	0,82	0,80	0,58	0,63	0,72
11	0,53	0,57	0,68	0,63	0,50	0,49	0,84		0,59	0,64	0,75
12	0,70	0,73	0,77	0,67	0,51	0,62	0,93	0,78	0,53	0,44	
13	0,58	0,62	0,77	0,42	0,60	0,60	0,94	0,78	0,60	0,50	0,97
14			0,80	0,62			1,15	0,86	0,60	0,54	
15	0,64	0,73			0,63	0,65			0,63	0,53	0,84
16	0,70	0,79		0,82	0,58	0,69		0,76	0,67	0,57	0,98
17	0,72	0,81	0,99	0,64	0,64	0,73	1,03		0,68	0,59	
18	0,74	0,82	0,96	0,64	0,64	0,79	1,09	0,91	0,69	0,61	0,71
19	0,81	0,90	0,93	0,60	0,79	0,83	1,03	0,92	0,75	0,65	0,93
20	0,85	0,93	0,97	0,52	0,81	0,84	1,16	1,01	0,83	0,77	0,85
21			0,89	0,58			0,99	1,04	0,84	0,82	
22	0,86	0,94			0,81	0,89			0,85	0,85	0,76
23	0,93	1,00		0,50	0,84	0,97	0,78	0,66	0,82	0,78	
24	0,95	0,97	0,73	0,50	0,91	1,01	0,63	0,85	0,86	0,87	
25	0,97	1,01			0,93	1,03			0,60	0,92	0,86
26		1,03	0,68	0,55	0,94	1,01	0,62	0,86	0,62	0,88	
27	1,09	1,10			0,97	1,06			0,72	0,87	0,38
28	0,98	1,17	0,44	0,56	1,01	1,16	0,40	0,56	0,68	0,84	
29	1,10	1,07			1,03	1,14				0,89	
30	1,19	1,18			1,01	1,18			0,74	0,90	
31	1,12	1,28			1,05	1,24			0,75	0,82	
32	1,15	1,29			1,05	1,24			0,77	0,91	
33		1,41			1,15	1,36			0,66	0,85	
34	1,18	1,28			1,14	1,34			0,35	0,84	
35		1,57			1,27	1,50			0,31	0,85	
36	1,16	1,54			1,27	1,45			0,54	0,85	
37	1,18	1,56			1,28	1,48					
38	1,10	1,42			1,22	1,66					
39	1,18	1,50			1,40	1,65					
40	1,22	1,51			1,29	1,63					
41	1,54	1,72			1,31	1,62					
42	1,48	1,84									
43	1,35	1,65			1,45	1,75					
44	1,38	1,74			1,56	1,97					
45	1,67	1,80			1,57	1,96					
46	1,48	1,91			1,69	2,03					
47	1,51				1,77	2,10					
48	1,44	1,83			1,49	2,09					
49	1,38	1,71			1,53						

Tabela A1 Continuação Acompanhamento diário da concentração celular (g.L^{-1}). Artigo Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em pequena escala e diferentes condições ambientais. (A letra “e” numerada identifica o Ensaio com a numeração referida no Artigo)

Tempo (dia)	e6	e7	e7	e8	e8	e9	e9	e10	e10	e11	e11
0	0,34	0,39	0,39	0,32	0,35	0,14	0,15	0,13	0,13	0,14	0,13
1	0,38	0,41	0,41	0,39	0,43	0,16	0,18	0,16	0,17	0,17	0,18
2	0,45	0,45	0,46	0,41	0,47	0,22	0,24	0,17	0,17	0,23	0,22
3	0,51	0,46	0,47	0,47	0,48	0,24	0,25	0,19	0,18	0,24	0,24
4	0,55	0,54	0,61	0,60	0,59	0,26	0,26	0,21	0,18	0,31	0,25
5	0,72	0,50	0,53	0,88	0,89	0,31	0,35	0,21	0,20	0,33	0,31
6	0,83	0,60	0,75	0,95	1,00	0,37	0,43	0,25	0,23	0,41	0,37
7	0,75	0,60	0,77	1,04	1,00	0,40	0,44	0,32	0,31	0,44	0,33
8	0,76	0,62	0,85	1,07	1,08	0,44	0,47	0,34	0,32	0,45	0,37
9	0,79	0,61	0,63	1,11	0,93	0,46	0,50	0,40	0,37	0,47	0,40
10	0,87	0,62	0,66	1,12	0,94	0,48	0,55	0,45	0,40	0,53	0,45
11	0,91	0,63	0,67	1,00	0,95	0,53	0,59	0,49	0,41	0,59	0,48
12	0,87	0,74	0,87	1,16	0,96	0,55	0,59	0,51	0,50	0,59	0,49
13		0,69	0,83		1,06	0,58	0,61	0,50	0,48	0,60	0,52
14		0,88	0,76	0,99				0,57	0,54		
15		0,84	0,89	1,17	0,90	0,60	0,73			0,71	0,63
16	0,72	0,82	0,88	1,18	1,12	0,68	0,75	0,71	0,66	0,73	0,63
17	0,96	0,83	0,89	1,15	1,22	0,70	0,81	0,75	0,70	0,80	0,66
18	1,01	0,89	0,92	0,91	1,12	0,72	0,82	0,77	0,75	0,83	0,66
19		0,90	1,00		0,70	0,80	0,88	0,77	0,74	0,91	0,74
20	0,74	0,94	1,01			0,81	0,88	0,81	0,79	0,87	0,71
21		0,98	1,09	0,68				0,81	0,81		
22	0,66	1,01	0,98	1,07	0,63	0,82	0,89			0,89	0,75
23	0,83	1,05	1,07		0,99	0,84	1,04	0,82	0,82	0,94	0,85
24		1,07	1,12	0,88		0,85	0,99	1,03	1,04	1,01	0,85
25	0,80	1,21	1,21		0,91	0,86	1,02	0,83	0,80	1,03	0,86
26		1,20	1,16	0,65		0,91	1,03	0,77	0,99	1,10	0,91
27	0,60	1,25	1,18		0,42	0,92	1,09			1,13	0,93
28		1,25	1,22			0,94	1,11	0,83	0,73	1,21	0,99
29		1,08	1,07			1,00	1,03			1,12	0,91
30		1,10	1,09			0,99	1,09			1,21	0,98
31		1,26	1,28			1,04	1,05			1,24	1,04
32		1,19	1,25			1,05	1,13			1,38	1,10
33		1,09	1,09			1,09	1,20			1,36	1,15
34		1,08	1,07			1,08	1,26			1,36	1,14
35			0,85			1,11	1,17			1,34	1,14
36						1,12	1,19			1,42	1,18
37						1,14	1,21			1,45	1,21
38						1,16	1,13			1,39	1,13
39						1,10	1,15			1,35	1,20
40						1,12	1,16			1,41	1,29
41						1,06	1,21			1,40	1,20
42						0,94	0,93			1,67	1,11
43						1,05	1,05			1,50	1,29
44						1,10	1,19			1,56	1,36
45						1,13	1,19			1,64	1,37
46						1,09	1,04			1,66	1,26
47						1,13	1,13			1,67	1,33
48						1,03	1,02			1,62	1,37
49						1,05	1,06			1,68	1,41

Tabela A1 Continuação Acompanhamento diário da concentração celular (g.L^{-1}). Artigo Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em pequena escala e diferentes condições ambientais. (A letra “e” numerada identifica o Ensaio com a numeração referida no Artigo)

Tempo (dia)	e12	e12	e13	e13	e14	e15	e15	e16	e16
0	0,13	0,13	0,38	0,40	0,40	0,39	0,38	0,41	0,42
1	0,16	0,16	0,41	0,43	0,41	0,43	0,43	0,46	0,52
2	0,16	0,17	0,46	0,47	0,51	0,47	0,46	0,50	0,53
3	0,18	0,18	0,50	0,48	0,56	0,48	0,47	0,54	0,54
4	0,18	0,18	0,54	0,54	0,56	0,54	0,52	0,58	0,57
5	0,20	0,20	0,56	0,58	0,64	0,57	0,55	0,65	0,65
6	0,23	0,23	0,60	0,63	0,75	0,67	0,59	0,81	0,82
7	0,30	0,31	0,61	0,63	0,91	0,68	0,60	0,93	0,96
8	0,31	0,33	0,62	0,64	1,00	0,71	0,61	1,02	1,04
9	0,39	0,38	0,63	0,65	0,99	0,72	0,61	1,10	1,11
10	0,44	0,42	0,72	0,67	1,02	0,75	0,66	1,12	1,13
11	0,53	0,50	0,73	0,69	1,07	0,77	0,68	1,14	1,12
12	0,55	0,52	0,68	0,63	1,07	0,43	0,71	1,19	1,17
13	0,55	0,54	0,68	0,70	1,08	0,78	0,75	1,25	1,21
14	0,61	0,63	0,76	0,71	1,11	0,80	0,77	1,33	1,27
15			0,68	0,73		0,84	0,76		
16	0,81	0,81	0,67	0,70	1,24	0,86	0,77	1,46	1,46
17	0,85	0,86	0,74	0,73	1,12	0,88	0,78	1,50	1,48
18	0,97	0,96	0,75	0,71	1,29	0,89	0,79	1,54	1,54
19	0,97	0,96	0,74	0,77	1,32	0,85	0,85	1,54	1,54
20	1,11	1,11	0,77	0,79	1,07	1,01	0,88	1,48	1,52
21	1,13	1,15	0,82	0,81	1,00	1,03	0,91	1,55	1,55
22			0,83	0,83		0,94	0,93		
23	1,28	1,28	0,85	0,84	1,30	1,00	0,94	1,70	1,70
24	1,02	0,87	0,77	0,81	1,03	1,01	0,92	1,62	1,73
25	1,29	1,37	0,82	0,80	1,12	1,07	0,96	1,66	1,73
26	1,29	1,33	0,78	0,78	0,93	1,06	0,91	1,68	1,75
27			0,81	0,87		1,08	0,90		
28					0,56	1,15	0,97	1,50	1,60
29			0,73	0,72		1,04	0,92		
30			0,80	0,76		1,07	0,93		
31			0,80	0,76		1,10	0,96		
32			0,82	0,78		1,09	0,97		
33			0,78	0,73		1,06	0,99		
34			0,75	0,71		1,03	0,98		
35			0,75	0,69		1,06	0,98		
36			0,68	0,61		1,10	0,97		

Tabela A3 Acompanhamento diário da concentração celular (g.L^{-1}). Artigo Cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* utilizando melão como substrato orgânico. (A letra “e” numerada identifica o Ensaio com a numeração referida no Artigo)

Tempo (dia)	e1	e2	e3	e4	e5	e6	e7	e8	e9
0	0,11	0,11	0,12	0,13	0,21	0,18	0,20	0,19	0,19
1	0,33	0,26	0,29	0,51	0,49		0,66	0,43	0,55
2	0,33	0,30	0,32	0,52	0,49	0,57	0,41	0,25	0,55
3	0,46	0,40	0,44	0,61	0,92	0,82	0,83	0,69	0,89
4	0,52	0,45	0,50	0,66	0,89			0,62	0,83
5	0,64	0,55	0,61	0,75	1,07	0,96	0,90	0,83	1,04
6	0,69	0,58	0,68	0,81	1,08	0,97	0,98	0,96	1,12
7	0,73	0,64	0,72	0,85	1,24	1,01	1,00	0,97	1,16
8	0,79	0,71	0,90	0,91	1,28	1,04	0,97	1,07	1,25
9	0,88	0,74	0,88	0,98	1,34	1,03	1,07	1,15	1,33
10	0,96	0,79	0,96	0,99	1,33	1,08	1,11	1,06	1,43
11	1,03	0,86	1,04	1,07	1,44	1,17	1,21	1,14	1,55
12	1,05	0,93	1,18	1,02	1,53	1,22	1,27	1,19	1,67
13	1,07	1,00	1,32		1,61	1,27	1,32	1,25	1,78
14	1,09	1,02	1,33	1,24	1,56	1,43	1,38	1,41	1,82
15	1,13	1,12	1,59	1,30	1,67	1,62	1,42	1,63	1,98
16	1,18	1,14	1,67	1,44	1,81	1,71	1,50	1,88	2,07
17	1,25	1,16	1,71	1,54	1,76	1,72	1,63	1,87	2,05
18	1,57	1,41	1,82	1,76	2,03	1,92	1,67	2,13	2,29
19	1,52	1,30	1,90	1,63	2,01	1,82	1,71	2,25	2,32
20	1,52	1,28	1,91	1,69	2,06	1,84	1,73	2,33	2,40
21	1,51	1,27	1,91	1,75	2,12	1,85	1,75	2,40	2,48
22	1,39	1,34		1,80	2,26	1,98	1,83	2,66	2,53
23				2,01	2,41	2,12	1,89	2,71	2,64
24				2,05	2,32	2,16	2,03	2,91	2,70
25				2,09	2,29	2,14	1,97	2,94	2,80

ANEXO 2 Fotografias dos experimentos



Figura A1 Cultivo em fotobiorreatores fechados em condições controladas



Figura A2 Cultivo em fotobiorreatores fechados em condições não controladas



Figura A3 Cultivo em fotobiorreatores abertos em condições controladas



Figura A4 Cultivo em fotobiorreatores abertos em condições não controladas



Figura A5 Cultivo em fotobiorreatores abertos de 650L (quadrados e *raceway*) em condições não controladas



Figura A6 Vista externa do túnel para cultivo sob condições não controladas

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. *Biologia molecular da célula* 3a. ed., Porto Alegre: Artes Médicas, 1994. ISBN 85-7307-191-5.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals* 2^a ed. Singapore: McGraw-Hill, 1986.

BECKER, E. W. & VENKATARAMAN, L. V. Production and utilization of the blue-green alga *Spirulina* in India. *Biomass*, 4, 105 – 125, 1984.

BELAY, A. Mass culture of *Spirulina* outdoors – The Earthrise farms experience. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira)* Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997.

BELAY, A. When there is no HAART: Can *Spirulina (Arthorspira)* help in the fight against HIV/AIDS? In: International Symposium: CSSD Cyanobacteria for Health, Science and Development. França, 2004.

BELIK, W. *Segurança Alimentar: A Contribuição das Universidades*. São Paulo: Instituto Ethos, 2003. ISBN 85-88046-07-5.

BENEMANN, J. R. CO₂ mitigation with microalgae systems. *Energy Conversion Management*, 38, S475 – S479, 1997.

BIANCHINI, A.; SILVA, D. C. M. N.; CAVALLET, O.; GONZALES, T. A. Cultivo de *Spirulina platensis* e sua Utilização na Formulação de Diferentes Produtos Alimentícios - Trabalho de Graduação em Engenharia de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2002.

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

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

BOROWITZKA, M. & BOROWITZKA, L. *Microalgal Biotechnology*, Cambridge: Cambridge University Press, 1988.

BOX, G. E. P., HUNTER, W. G., HUNTER, J. S. *Statistics for experiments*. Estados Unidos: John Willey & Sons, 1978. ISBN 0-471-09315-7.

CAMACHO, F. G.; GRIMA, E. M.; MIRÓN, A. S.; PASCUAL, V. G.; CHISTI, Y. Carboxymethyl cellulose protects algal cells against hydrodynamic stress. *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 602 – 610, 2001.

CARRIÓN, C. P.; VALIENTE, E. F.; PINAS, F. F.; LEGANÉS, F. Acclimation of photosynthetic pigments and photosynthesis of the cyanobacterium *Nostoc* sp. Strain UAM206 to combined fluctuations of irradiance, pH and inorganic carbon availability. *Journal of Plant Physiology*, 158, 1455 – 1461, 2001.

CHANAWONGSE, L.; LEE, Y. K.; BUNNAG, B.; TANTICHAROEN, M. Productivity of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in cultures using sunlight. *Bioresource Technology*, 48, 143 – 148, 1994.

CHEN, F.; CHEN, H.; GONG, X. Mixotrophic and heterotrophic growth of *Haematococcus lacustris* and rheological behaviour of the cell suspensions. *Bioresource Technology*, 62, 19 - 24, 1997.

CHEN, F. & ZHANG, Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. *Enzyme and Microbial Technology*, 20, 221 - 224, 1997.

CHOJNACKA, K. & NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 461 - 465, 2004.

CHUNTAPA, B.; POWTONGSOOK, S.; MENASVETA, P. Water quality control using *Spirulina platensis* in shrimp cultures tanks. *Aquaculture*, 220, 355 – 366, 2003.

CIFERRI, O. *Spirulina* the edible microorganism. *Microbiol. Rev.* 47, 551, 1983.

COHEN, Z.; VONSHAK, A.; RICHMOND, A. Fatty acid composition of *Spirulina* strains grown under various environmental conditions. *Phytochemistry*, 26 (8), 2255 - 2258, 1987.

COHEN, Z. The chemicals of *Spirulina*. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997.

COLLA, L. M. Influência das condições de crescimento sobre o potencial antioxidante da microalga *Spirulina platensis* e seu potencial na redução da hipercolesterolemia. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2002.

COLLA, L. M.; BERTOLIM, T. E.; COSTA, J. A. V. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* under different temperatures and nitrogen concentrations. *Z. Naturforsch*, 59c, 55 – 59, 2004.

COLLA, L.; RUIZ, W. A.; COSTA, J. A. V. Metabolismo de carbono e nitrogênio em microalgas. *Vetor*, 12, 61 - 78, 2002.

CORNET, J. F.; DUSSAP, C. G.; GROS, J. B. A simplified monodimensional approach for modeling coupling between radiant light transfer and growth kinetics in photobioreactors. *Chemical Engineering Science*, 50 (9), 1489 – 1500, 1995.

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

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 18, 603 – 607, 2002.

COSTA, J. A. V.; LINDE, G. A.; ATALA, D. I. P. Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 15 – 18, 2000.

COZZA, K. L. *Spirulina platensis* em meios naturais e sintéticos: fatores nutricionais e custos. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos – FURG, Rio Grande, 1999.

DEGBEY, H.; HAMADOU, B.; OUMAROU, H. Evaluation of effectiveness of the supplementation in *Spirulina* of the usual alimentation of severe malnourished children. In: International Symposium: CSSD Cyanobacteria for Health, Science and Development. França, 2004.

DUARTE FILHO, P. F. M. Crescimento da cianobactéria *Spirulina platensis* em diferentes configurações de fotobiorreator e condições de cultivo. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2002.

DURANTE, A. J.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; MORAIS, M. Isolamento e cultivo de uma cepa de *Spirulina* nativa da lagoa mangueira e influência da *Spirulina platensis* no crescimento de uma cianobactéria toxigênica - Trabalho de Conclusão de Curso Graduação em Engenharia de Alimentos - FURG, Rio Grande 2003.

FÁBREGAS, J.; GARCIA, D.; MORALES, E.; LAMELA, T.; OTERO, A. Mixotrophic production of phycoerythrin and exopolysaccharide by the microalga *Porphyridium cruentum*. *Cryptogamie Algal*, 20, 89 – 94, 1999.

FALQUET, J. The Nutritional Aspects of *Spirulina* - Antenna Technology, 1997. <http://www.antenna.ch>.

FOX, R. D. Health benefits of *Spirulina* and proposal for a nutrition test on children suffering from Kwashiorkor. In: *Spirulina Algae de Vie – Bulletin de Institut Océanographique, Monaco*, 12, 1993.

FOX, R. D. *Spirulina* production & potential. França: Edisud, 1996. ISBN 2-84744-883-X.

GARCÍA, M. C. C.; MIRÓN, A. S.; SEVILLA, J. M. F.; GRIMA, E. M.; CAMACHO, F. G. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum* Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. *Process Biochemistry*, 40, 297 – 305, 2005.

GRIMA, E. M.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; CAMACHO, F. G.; CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer and scaleup. *Journal of Biotechnology*, 70, 231 – 247, 1999.

GRIMA, E. M.; SEVILLA, J. M. F.; PÉREZ, J. A. S.; CAMACHO, F. G. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *Journal of Biotechnology*, 45, 59 - 69, 1996.

GROS, J. B.; POUGHON, L.; LASSEUR, C.; TIKHOMIROV, A. A. Recycling efficiencies of C, H, O, N, S and P elements in a biological life support system based on microorganisms and higher plants. *Advanced Space Research*, 31 (1), 195 - 199, 2003.

HASE, R.; OIKAWA, O.; SASAO, C.; MORITA, M.; WATANABE, Y. Photosynthetic production of microalgal biomass in a *raceway* system under greenhouse conditions in Sendai City. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89 (2), 157 – 163, 2000.

HATA, J.; HUN, Q.; YANG, C.; SHIMIZU, K.; TAYA, M. Characterization of energy conversion based on metabolic flux analysis in mixotrophic liverwort cells *Marchantia polymorpha*. *Biochemical Engineering Journal*, 6, 65 - 74, 2000.

HENRIKSON, R. Microalga *Spirulina* – Superalimento del Futuro Barcelona: Ediciones Urano S. A., 1994. ISBN 84-7953-047-2.

HIRAHASHI, T.; MATSUMOTO, M.; HAZEKI, K.; SAEKI, Y.; UI, M.; SEYA, T. Activation of the human innate system by *Spirulina*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. *International Immunopharmacology*, 2, 423 – 434, 2002.

HOSAKA, K.; HIOKI, T.; FURUUNE, H.; TANISHITA, K.; Augmentation of microalgae growth due to hydrodynamic activation. *Energy Conversion Management*, 36 (6 - 9), 725 – 728, 1995.

IP, P. F.; WONG, K. H.; CHEN, F. Enhanced production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in mixotrophic culture. *Process Biochemistry*, 39 (11), 1764 – 1766, 2004.

JANG, J. C. & SHEEN, J. Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell*, 6, 1665 – 1679, 1994.

JANSSEN, M.; SLENDERS, P. TRAMPER, J.; MUR, L. R.; WIJFFELS, R. H. Photosynthetic efficiency of *Dunaliella tertiolecta* under short light/dark cycles. *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 298 – 305, 2001.

JIMÉNEZ, C.; COSSÍO, B. R.; NIELL, F. X. Relationship between physicochemical variables and productivity in open ponds for the production of *Spirulina*: a predictive model of algal yield. *Aquaculture*, 221, 331 - 345, 2003.

JIMÉNEZ (b), C.; COSSIO, B.; LABELLA, D.; NIELL, F. X. The feasibility of industrial production of *Spirulina* (*Arthrospira*) in Southern Spain. *Aquaculture* 217, 179 – 190, 2003.

LEE, B. & KIM, J. K. Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. *Aquacultural Engineering*, 25, 111 - 124, 2001.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 2a. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. ISBN 85-7378-026-6.

LU, C. & VONSHAK, A. Photoinhibition in outdoor *Spirulina platensis* cultures assessed by polyphasic chlorophyll fluorescence transients. *Journal of Applied Phycology*, 11, 355 – 359, 1999.

MARQUEZ, F. J.; SASAKI, K.; KAKIZONO, T.; NISHIO, N.; NAGAI, S. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 5, 408 – 410, 1993.

MARTÍNEZ, M. E.; CAMACHO, F.; JIMÉNEZ, J. M.; ESPÍNOLA, J. B. Influence of light intensity on the kinetic and yield parameters of *Chlorella pyrenoidosa* mixotrophic growth. *Process Biochemistry*, 32 (3), 93 - 98, 1997.

MIAO, X.; WU, Q.; YANG, C. Fast pyrolysis of microalgae to produce renewable fuels. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 71 (2), 855 – 863, 2004.

MICHIKI, H. Biological CO₂ fixation and utilization project. *Energy Conversion Management*, 36 (6 – 9), 701 – 705, 1995.

MITSUHASHI, S.; FUJIMOTO, M.; MURAMATSU, H.; TANISHITA, K. Effect of simple shear flow on photosynthesis rate and morphology of micro algae. *Acta Astronautica*, 33, 179 – 187, 1994.

MOHANTY, P.; SRIVASTAVA, M.; KRISHNA, K. B. The photosynthetic apparatus of *Spirulina*: electron transport and energy transfer. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira)*. Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997. ISBN 0-7484-0674-3.

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*, 37, 535 - 547, 2001.

OGBONNA, J. C. & TANAKA, H. C Cyclic autotrophic/heterotrophic cultivation of photosynthetic cells: a method of achieving continuous cell growth under light/dark cycles. *Bioresource Technology*, 65, 62 – 72, 1998.

OGBONNA, J. C.; YADA, H.; TANAKA, H. Kinetic study on light-limited batch cultivation of photosynthetic cells. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80 (3), 259 - 264, 1995.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*, 20, 459 – 466, 2003.

OLGUÍN, E.; DOELLE, H.; MERCADO, G. Resource recovery through recycling of sugar processing by-products and residuals resources. *Conservation and Recycling* 15, 85 - 94, 1995.

OTERO, A.; GARCÍA, D.; MORALES, E. D.; ARÁN, J.; FÁBREGAS, J. Manipulation of the biochemical composition of the eicosapentaenoic acid-rich microalga *Isochrysis galbana* in semicontinuous cultures. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 26, 171 - 177, 1997.

OTSUKI, T. A study for the biological CO₂ fixation and utilization system. *The Science of the Total Environment*, 277, 21 – 25, 2001.

PANG, Q. S.; GUO, B. J.; RUAN, J. H. Enhancement of endonuclease activity and repair DNA synthesis by polisaccharyde of *Spirulina platensis*. *I-Chuan-Hsueh-Pao*, 15 (5), 374 – 381, 1988.

PELIZER, L. H.; DANESI E. D.; 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*, 56, 371 – 375, 2003.

PIORRECK, M.; BAASCH, K. H.; POHL, P. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry*, 23 (2), 207 - 216, 1984.

QISHEN, P. K. Radioprotective effect of extract from *Spirulina* in mouse bone marrow cells studied by using the micronucleus test. *Toxicology Letters*, 48, 165 - 16, 1989.

QUILLET, M. Recherches sur les substances glucidiques élaborées par les *Spirulines* *Ann. Nutr. Aliment.* 29, 553 – 561, 1975.

REINEHR, C. O. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em modo semicontínuo - Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2003.

RICHMOND, A. *Outdoor* mass culture of microalga. In: RICHMOND, A. Handbook of algal mass culture. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1986.

RICHMOND, A. & GROBBELAAR, J. U. Factors affecting the output rate of *Spirulina platensis* with reference to mass cultivation. *Biomass*, 10, 253 – 264, 1986.

RICHMOND, A.; WU, Z. C.; ZARMI, Y. Efficient use of strong light for high photosynthetic productivity: interrelationships between the optical path, the optimal population density and cell growth inhibition. *Biomolecular Engineering*, 20 229 – 236, 2003.

ROCHA, J. M. S.; GARCIA, J. E. C.; HENRIQUES, M. H. F. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular Engineering*, 20, 237 – 242, 2003.

SANTILLAN, C. Cultivation of *Spirulina* for human consumption and for animal feed. *International Congress of Food Science and Technology, Madrid, Espanha, 1974.*

SANTOS, R. C. Influência da temperatura, iluminância e taxa de aeração na concentração de biomassa da cianobactéria *Spirulina platensis*. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2001.

SAWAYAMA, S.; INOUE, S.; DOTE, Y.; YOKOYAMA, S. CO₂ fixation and oil production through microalga. *Energy Conversion Management, 36 (6 – 9), 729 – 731, 1995.*

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial vol.2.* São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

SCRAGG, A. H.; ILLMAN, A. M.; CARDEN, A.; SHALES, S. W. Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. *Biomass and Bioenergy, 23, 67 – 73, 2002.*

SEMBA, R. D.; MIOTTI, P. G.; CHIPHANGWI, J. D.; SAAH, A. J.; CANNER, J. K.; DALLABETTA, G. A.; HOOVER, D. R. Maternal vitamin A deficiency and mother-to-child transmission of HIV-1. *Lancet. 343 (8913): 1593 - 7, 1994.*

STADNICHUK, I. N.; RAKHIMBERDIEVA, M. G.; BOLYCHEVTSEVA, Y. V.; YURINA, N. P.; KARAPETYAN, N. V.; SELYAKH, I. O. Inhibition by glucose of chlorophyll-a and phycocyanobilin biosynthesis in the unicellular red alga *Galdieria partita* at the stage of coproporphyrinogen III formation. *Plant Science, 136, 11 – 13, 1998.*

TEAS, J.; HEBERT, J. R.; FITTON, J. H.; ZIMBA, P. V. Algae – a poor man's HAART? *Medical Hypotheses, 62, 507 - 510, 2004.*

TOMASELLI, I. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira (Spirulina)*. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira)*. Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997. ISBN 0-7484-0674-3.

TOMASELLI, L.; GIOVANNETTI, L.; TORZILLO, G. Physiology of stress response in *Spirulina spp.* *Bulletin de Institut Océanographique Monaco, 12, 1993.*

TORZILLO, G. & VONSHAK, A. Effect of light and temperature on the photosynthetic activity of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, 6 (5), 399 – 403, 1994.

TORZILLO, G. Tubular bioreactors. In: Vonshak, A. *Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor & Francis, 1997.

TORZILLO, G.; SACCHI, A.; MATERASI, R. Temperature as an important factor affecting productivity and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors. *Bioresource Technology*, 38, 95 – 100, 1991.

TRAVIESO, L.; HALL, D. O.; RAO, K. K.; BENÍTEZ, F.; SÁNCHEZ, E.; BORJA, R. A helical tubular photobioreactor producing *Spirulina* in a semicontinuous mode. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 47, 151 – 155, 2001.

VENKATARAMANAI AH, V.; SUDHIR, P.; MURTHY, S. D. S. Effect of high temperature on photosynthetic electron transport activities of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Photosynthetica*, 41 (3), 331 – 334, 2003.

VERNEREY, A.; ALBIOL, J.; LASSEUR, C.; GODIA, F. Scale-up and design of a pilot-plant photobioreactor for the continuous culture of *Spirulina platensis*. *Biotechnology Progresses*, 17, 431 – 438, 2001.

VIEIRA, S. Estatística experimental, 2ª ed., São Paulo: Atlas, 1999. ISBN 85-224-2113-7.

VILLAREJO, A.; ORÚS, M. I.; MARTÍNEZ, F. Coordination of photosynthetic and respiratory metabolism in *Chlorella vulgaris* UAM 101 in the light. *Physiologia Plantarum*, 94, 680 - 686, 1995.

VONSHAK, A. & RICHMOND, A. Mass production of the blue - green alga *Spirulina*: An overview. *Biomass*, 15, 233 – 247, 1988.

VONSHAK, A. Outdoor mass production of *Spirulina*: The basic concepts. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor & Francis, 1997.

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

VONSHAK, A.; ABELIOVICH, A.; BOUSSIBA, S.; ARAD, S.; RICHMOND, A. Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass*, 2, 175 – 185, 1982.

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 6, 87 - 102, 2000.

YUNES, J.S.; SUZUKI, M. T.; SILVEIRA, A. G.; CAMARGO, M.; WERNER, V. R. Cianobactérias fixadoras de nitrogênio do estuário da Lagoa dos Patos, RS: *Nostoc muscorum*. *Ciência e Cultura*, 42 (5/6), 375 - 383, 1990.

ZARROUK, C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthese de *Spirulina maxima* Geitler. Ph.D. Thesis, University of Paris, 1966.

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