

**Miguel Ângelo Pinho**

**MEIO DE CULTIVO A BASE DE  
CONCENTRADO DE DESSALINIZAÇÃO  
OBTIDO POR OSMOSE INVERSA PARA  
*Arthrospira (Spirulina) platensis***

**Florianópolis**

**2009**



**MIGUEL ÂNGELO PINHO**

**MEIO DE CULTIVO A BASE DE CONCENTRADO DE  
DESSALINIZAÇÃO OBTIDO POR OSMOSE INVERSA PARA  
*Arthrospira (Spirulina) platensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

**Orientador: Prof Ernani Sebastião Sant'anna, Dr.  
FLORIANÓPOLIS**

**2009**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da  
Universidade Federal de Santa Catarina

P654 Pinho, Miguel Ângelo  
Meio de cultivo a base de concentrado de dessalinização  
obtido por osmose inversa para Arthrospira (Spirulina)  
platensis [dissertação] / Miguel Ângelo Pinho ; orientador,  
Ernani Sebastião Sant'Anna. - Florianópolis, SC, 2009.  
87 f.: il., tabs., grafs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de  
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui bibliografia

1. Ciência dos alimentos. 2. Spirulina. 3. Osmose  
inversa. 4. Meio de cultura. 5. Concentrado de  
dessalinização. 6. Abrandamento. I. Sant'Anna, Ernani  
Sebastião. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.  
III. Título.

CDU 663

**Desenvolvimento de meio de cultura a base de concentrado de  
dessalinização para *Arthrospira (Spirulina) platensis***

Por

**Miguel Ângelo Pinho**

Dissertação aprovada como requisito final para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da UFSC, pela comissão formada por:

Presidente: \_\_\_\_\_

Prof. Ernani Sebastião Sant'Anna, Dr., UFSC

Membro: \_\_\_\_\_

Regina Coeli de Oliveira Torres, Dra., UFSC

Membro: \_\_\_\_\_

Prof. Kepler Borges França, Ph.D., UFCG

Membro: \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Elaine Schwinden Prudêncio, Dra., UFSC

Coordenadora: \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Renata Dias de Mello Castanho Amboni, Dra.

Florianópolis, maio de 2009.



## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Ernani S. Sant’Anna, pela orientação deste trabalho e o grande esforço exercido em várias tarefas para o funcionamento do projeto água;

À Dra. Regina Coeli de Oliveira Torres, pela grande colaboração com sua experiência em pesquisa de microalgas em todas as etapas deste trabalho;

Ao Programa Petrobras Ambiental pelo suporte financeiro ao Projeto “Água: fonte de alimento e renda uma alternativa sustentável para o semiárido” e as equipes da Fundação Certi, UFCG/Labdes e UFSC;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundo Setorial de Recursos Hídricos – CT-HIDRO por conceder a bolsa de estudo;

À banca examinadora, por aceitarem o convite e pelas contribuições no trabalho final;

À minha família, Emiliano, Marlene, Cy, Cris, Juliano, Gugo e Vó Zeni; e minha namorada Dani, por sempre estarem presentes de alguma forma;

Aos meus amigos, Fábio, pelo grande apoio no laboratório, revisões de inglês, professor Paulo Ogliari, por me ajudar com a estatística e os gráficos; à Carla, não fosse por ela eu ainda estaria tentando formatar esses gráficos; à Carol, pela contribuição no cultivo de microalgas em laboratório; à Deise, Willian, Aline, Andréa, Jefferson, Fernanda, Tiago e demais grandes amigos que fiz no departamento.

Ao Rogério Coelho, pela grande amizade, ajuda e prestabilidade na Paraíba;

Aos moradores do Sítio Uruçu, São João do Cariri, Paraíba; pessoas motivadas e disciplinadas que sempre contribuíram ativamente no projeto, além da sua grande simpatia e atenção com todos do projeto;

## Resumo

PINHO, Miguel Ângelo. **Desenvolvimento de meio de cultura a base de concentrado de dessalinização para *Arthrospira* (Spirulina) *platensis***. 2009. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um meio de cultura para *Arthrospira* (Spirulina) *platensis* à base de concentrado de dessalinização, estabelecendo um protocolo para tratamento prévio de abrandamento do resíduo e analisar o efeito de diferentes concentrações e fontes de nutrientes adicionados ao meio de cultivo no crescimento dessa microalga. Um estudo prévio demonstrou que sob dureza total de 1.000 mg de  $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ , após abrandamento realizado através da adição de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), não ocorreu precipitação dos nutrientes adicionados posteriormente, sendo este valor adotado para a base do meio de cultura. Uma vez que o concentrado de dessalinização utilizado apresentou teor demasiadamente alto de dureza total ( $\text{CaCO}_3$  acima de  $5.000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), necessitando de concentrações muito altas de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para seu abrandamento, optou-se por reduzi-la primeiramente a  $2.000 \text{ mg}$  de  $\text{CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ , utilizando-se  $6,09 \text{ g}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ , seguida de uma diluição a 50 %. O efeito da variação de nutrientes na produção de *Arthrospira platensis* foi estudado em ensaios realizados em uma base composta de concentrado de dessalinização previamente tratado segundo o método acima descrito, suplementada com ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ):  $\text{NaHCO}_3$ , 15,15;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 8,89;  $\text{KNO}_3$ , 1,00; solução de micronutrientes, 1 mL; e solução Fe-EDTA, 1 mL. Os nutrientes avaliados foram fosfato de potássio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e uréia ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ). Seu efeito foi avaliado na biomassa produzida após 12 dias de cultivo em ensaios que aplicaram 5 concentrações diferentes desses três nutrientes. Através de metodologia de superfície de resposta determinou-se que as maiores concentrações de biomassa foram obtidas adicionando-se ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,752;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 2,20; e  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ , 0,57  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ .

**Palavras-chave:** *Arthrospira* (Spirulina) *platensis*, meio de cultura, concentrado de dessalinização, abrandamento.

## Abstract

PINHO, Miguel Ângelo. **Development of a growth medium for *Arthrospira (Spirulina) platensis* based on concentrated brackish water from desalination plant.** 2009. 79 p. Dissertation (Master in Food Science). Federal University of Santa Catarina. Florianópolis – SC.

The aim of this study was to develop a culture medium for *Arthrospira (Spirulina) platensis*, obtained from the concentrated brackish water from a desalination plant, defining a previous treatment for the softening of the concentrated, and determining the effect of different nutrient concentrations and sources of nutrients in the growth of this microalga. A previous study determined that at the total hardness of 1,000 mg  $\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ , obtained by means of addition of sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), the nutrients that were added after this softening process didn't precipitate, thus this total hardness value was adopted to the culture medium. Once the concentrated brine showed an extremely high hardness value ( $\text{CaCO}_3$  above 5.000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), being necessary high concentrations of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , first it was softened until 2.000 mg of  $\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$  by adding 6,09 g of  $\text{Na}_2\text{CO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ , and then a dilution at 50 %. The effect of the different concentrations of nutrients in the *Arthrospira platensis* production was assessed in a culture basis previously softened following the process described bellow, supplemented with ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{NaHCO}_3$ , 15,15;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 8,89;  $\text{KNO}_3$ , 1,00; micronutrients solution, 1 mL; and Fe-EDTA solution, 1 mL. The nutrients evaluated were potassium phosphate dibasic ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), sodium sulphate ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) and urea ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ). The effect was analyzed by measuring the biomass obtained after 12 days in experiments that applied 5 different concentrations of those 3 nutrients. A surface response methodology showed that the highest concentrations of biomass were obtained applying ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,752;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 2,20; e  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ , 0,57  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

**Key-words:** *Arthrospira (Spirulina) platensis*, culture medium, desalination brackish concentrated, softening.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

- Figura 1. Esquema das etapas da dessalinização por osmose inversa 17
- Figura 2. Representação do ciclo de vida do gênero *Arthrospira* (Spirulina) 23
- Figura 3. Esquema de produção de *Arthrospira* (Spirulina) 34

### Capítulo 2

- Figura 1. Relação entre concentração de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e dureza total do concentrado de dessalinização 68
- Figura 2. Análise de superfície de resposta da produção de biomassa de *A. platensis* em função da concentração de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  74
- Figura 3. Análise de superfície de resposta da produção de biomassa de *A. platensis* em função da concentração de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  76
- Figura 4. Análise de superfície de resposta da produção de biomassa de *A. platensis* em função da concentração de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  78

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1.	Tecnologias de dessalinização de acordo com o método de separação de sais.	16
Tabela 2.	Exemplos de condições ambientais e suplementação de nutrientes para o cultivo de <i>Arthrospira</i> sp. Em resíduos da produção animal	38
Tabela 3.	Padrão de qualidade para produtos a base de <i>Spirulina</i> segundo a <i>Food and Drug Administration</i> (USA)	42
Tabela 4.	Padrão de qualidade para produtos a base de <i>Spirulina</i> , baseado em critérios da JHFA ( <i>Japan Health Food Association</i> ).	42
Tabela 5.	Propriedades químicas e físicas da biomassa seca de <i>Arthrospira</i>	44
Tabela 6.	Propriedades físicas da biomassa seca de <i>Arthrospira</i> sp.	46

### Capítulo 2

Tabela 1.	Matriz de delineamento central composto, constituída de 3 fatores em 5 níveis	65
Tabela 2.	Protocolo para adição de uréia.	66
Tabela 3.	Biomassa estimada de <i>A. platensis</i> após 12 dias de cultivo no meio à base de concentrado de dessalinização* adicionados dos fatores (nutrientes) referentes aos tratamentos aplicados.	70
Tabela 4.	Análise de variância dos valores de biomassa obtidos após os tratamentos aplicados	72

# SUMÁRIO

<b>Introdução</b>	12
<b>Capítulo 1 Revisão Bibliográfica</b>	14
1.1 Tecnologia de dessalinização como fonte de água potável	15
1.2 Implicações ambientais das tecnologias de dessalinização	18
1.3 Microalgas: biologia e aplicações comerciais	20
1.4 O gênero <i>Arthrospira</i>	21
1.4.1 Estrutura e organização celular	21
1.4.2 Ciclo de vida	22
1.4.3 Taxonomia	23
1.4.4 Ecologia e fisiologia do crescimento	24
1.4.5 Efeitos da temperatura	25
1.4.6 Efeitos da luminosidade	25
1.4.7 Efeitos da salinidade	26
1.4.8 Efeitos do pH	27
1.4.9 Efeitos dos nutrientes	27
1.4.9.1 Efeitos do carbono	28
1.4.9.2 Efeitos do nitrogênio	30
1.4.9.3 Efeitos do fósforo	32
1.5 O cultivo em massa	32
1.5.1 Tanque de cultura	34
1.5.2 Meios de cultura	35
1.5.2.1 Meios de cultura à base de água do mar	35
1.5.2.2 Meios de cultura à base de água doce	36
1.5.2.3 Meios de cultura à base de efluentes de produção de animais	37
1.5.2.4 Meios de cultura à base de resíduos de plantas industriais	39
1.5.3 Sistema de coleta e secagem	40
1.5.4 Atividades operacionais	40
1.5.5 Contaminação	41
1.5.6 Padrões de qualidade	41

1.5.7	Composição química	43
1.6	<i>Arthrospira</i> como fonte de produtos farmacêuticos e nutracêuticos	43
1.7	Referências	47
<b>Capítulo 2</b>	<b>Otimização de um meio de cultura a base concentrado de dessalinização para o cultivo de <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i></b>	<b>59</b>
<b>Apêndice</b>		<b>83</b>

## INTRODUÇÃO

As tecnologias de dessalinização são métodos alternativos para obtenção de água potável que surgiram para suprir o fornecimento às regiões que se encontram em escassez deste recurso, devido à inviabilidade de implantação dos métodos tradicionais para este fim (BREMERE et al., 2001). Esta modalidade de produção de água potável aumentou significativamente nas últimas duas décadas com o aperfeiçoamento de suas técnicas, e representará uma das principais fontes de recursos hídricos em um futuro próximo. Além de aplicada à água dos oceanos, é crescente a prática de dessalinização de águas subterrâneas continentais (MILLER, 2006).

Beltrão et al. (2005) registraram no município de São João do Cariri a existência de 13 pontos de água, todos tubulares, sendo 5 pontos de água em terrenos públicos e 8 em terrenos particulares, através do Projeto Cadastro de Fontes de Abastecimento de água Subterrânea – Diagnóstico do Município de São João do Cariri Estado da Paraíba. Quanto ao destino da água captada dos poços, 3 dos pontos cadastrados destinam-se ao atendimento comunitário, 1 ao atendimento particular e 9 não tiveram o destino definido. Em relação ao uso da água, 18% dos pontos cadastrados são destinados ao uso doméstico primário (água de consumo humano para beber); 41% são utilizados para o uso doméstico secundário (água de consumo humano para uso geral); e 41% para criação animal. Há também dois poços particulares e um público, não instalados ou paralisados e, portanto, passíveis de entrar em funcionamento, podendo vir a somar seus recursos aos nove poços que estão em operação.

Entretanto as atividades de dessalinização estão associadas a várias implicações ambientais, sendo o lançamento inadequado do concentrado da dessalinização no meio ambiente a principal causa de degradação das áreas adjacentes às plantas de dessalinização via osmose inversa (ALAMEDDINE; FADEL, 2007). Quando despejada ao solo, as propriedades deste são alteradas, principalmente em relação à sua permeabilidade e aeração, afetando sua produtividade. Uma vez absorvido pelo solo, este resíduo pode acessar fontes de água subterrânea, aumentando ainda mais sua concentração de sais e dureza, e contaminado-as com a alta concentração de reagentes químicos utilizados na fase de pré-tratamento da dessalinização (MOHAMED; MARAQA; AL HANDHALY, 2005). Portanto torna-se necessário a introdução de sistemas de tratamento ou reutilização deste concentrado

de modo a evitar impactos ambientais, para que a aplicação desta tecnologia de obtenção de água potável permaneça sustentável (QADIR et al., 2007).

Mohamed; Maraqa; Al Handhaly (2005) citam várias alternativas para a reutilização deste concentrado, dentre elas aplicações biotecnológicas, onde este funcionaria como base para meio de cultura para microalgas do gênero *Arthrospira* (Spirulina). Esta possibilidade fundamenta-se na boa adaptação destes micro-organismos tanto à alta salinidade e pH do concentrado, quanto às condições ambientais das regiões onde a dessalinização é empregada: geralmente zonas tropicais ou subtropicais, com elevadas temperaturas e irradiação solar.

O interesse no desenvolvimento de tecnologias de produção em massa deste gênero de microalga em especial é consequência do alto valor agregado da sua biomassa, cuja composição química é constituída de vários elementos com aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica (RAOOF; KAUSHIK; REINHER 2006). A produção em larga escala atual é baseada principalmente em tanques abertos do tipo “raceway”, devido o baixo investimento necessário com energia através uso da energia solar (JIMÉNEZ et al., 2003).

Raof; Kaushik; Reinher (2006) destacam que o meio de cultura também constitui uma parte significativa dos gastos de produção, ressaltando a viabilidade econômica da implantação de meios de cultura a partir de águas residuais enriquecidas com fertilizantes comerciais ou compostos químicos de baixo custo. Vários estudos demonstraram o potencial desses meios de cultura em produzir biomassa de *Arthrospira* com eficiência similar à dos meios sintéticos (CAÑIZARES-VILLANUEVA et al., 1995; OLGUÍN et al., 2001; REINHER; COSTA, 2006).

Portanto o desenvolvimento de um meio de cultura para *Arthrospira* a base de concentrado de dessalinização torna-se válido para o estabelecimento de um protocolo de produção de baixo custo, aliado aos benefícios ambientais decorrentes da diminuição do lançamento do concentrado ao meio ambiente.

## **CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

\* Parte deste capítulo foi submetido para publicação no Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos (CEPPA) como artigo de revisão intitulado: “Fontes alternativas de nutrientes para o cultivo de *Arthrospira* (Spirulina)”.

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 A tecnologia de dessalinização como fonte de água potável

A escassez de água potável atinge atualmente 18 países cujos recursos estão abaixo de 1000 m<sup>3</sup> per capita por ano. Mais de 1 bilhão de pessoas não dispõem de água potável, e aproximadamente 2,3 bilhões de pessoas (41% da população mundial) vivem em regiões onde este recurso é escasso. Estima-se que em 2025, aproximadamente 29 países estarão enquadrados neste perfil, principalmente devido ao aumento da população, a sua concentração em áreas urbanas e às atividades de agricultura, que consomem 70% da produção mundial de água potável (BREMERE et al., 2001; GREENLEE et al., 2009). A dessalinização surge como um método alternativo para obtenção deste recurso devido à inviabilidade de implantação dos métodos tradicionais para este fim (FRITZMANN et al., 2007).

A origem das metodologias de dessalinização se deu como uma estratégia para aumentar a autonomia dos navios, com registros que datam do século XVII. Uma vez que poderiam dessalinizar a água do mar por um processo simples de destilação, não necessitavam levar toda água potável necessária para suas incursões (GREENLEE et al., 2009). Atualmente são realizadas em regiões áridas, semiáridas, ou delimitadas por oceanos ou lagos salinos. Os países maiores produtores de água potável por dessalinização são Arábia Saudita (que produz um décimo da produção mundial), Estados Unidos, Emirados Árabes, Kuwait, Bahrain, Qatar e Oman. Atualmente há plantas de dessalinização operando em mais de 120 países, produzindo cerca de 30 milhões de m<sup>3</sup> de água potável por ano, dos quais cerca de 20 milhões de m<sup>3</sup> são provenientes de dessalinização de água do mar e o restante de águas continentais subterrâneas (QADIR et al., 2007).

As tecnologias de dessalinização são segregadas pelo mecanismo de separação de sais empregado, classificando-se em dessalinização térmica e por membrana (FRITZMANN et al., 2007). A Tabela 1 relaciona os processos de dessalinização disponíveis atualmente classificadas segundo método de separação de sais.

Tabela 1. Tecnologias de dessalinização de acordo com o método de separação de sais.

<b>Tecnologias de dessalinização</b>	
<b>Térmica</b>	<b>Membrana</b>
Destilação multi-estágios (MSF)	Osmose inversa (RO)
Destilação multi-efeitos (MED)	Nanofiltração (NF)
Destilação via compressão a vapor (VCD)	Eletrodiálise
Dessalinização por congelamento	

Fonte: Fritzmann et al. (2007); Johnson; Lott; Sliepcevich (1976).

O mecanismo de separação térmico por destilação é a técnica mais antiga, no qual se induz um ciclo de evaporação e condensação da água similar ao que ocorre naturalmente. A água salinizada das fontes é aquecida, e o vapor resultante é resfriado até sua condensação, precipitando-se em forma de água dessalinizada. A energia térmica requerida por esse método é produzida em geradores a vapor ou caldeiras (RALUY; SERRA; UCHE, 2006), um dos fatores que fazem o oriente médio liderar a produção de água dessalinizada, devido a grande disponibilidade de combustível fóssil. Mas também é possível utilizar fontes alternativas de energia, como a solar, que é convertida para energia elétrica e pode ser aplicada tanto na dessalinização térmica quanto por membranas. A Espanha, maior produtor europeu de água dessalinizada, possui parte da demanda de energia para este fim obtida através da energia eólica (GREENLEE et al, 2009).

Na década de 1960 surgiu a técnica da osmose inversa. Neste método a fonte de água é submetida, por meio de alta pressão, a passar por módulos de membranas semipermeáveis que permitem praticamente apenas a passagem de moléculas de água, que são menores que a maioria das impurezas encontradas nas águas do mar ou subterrâneas (VILLAFILA; MUJTABA, 2003). Esse método é aplicado tanto na dessalinização de água do mar quanto de água salobra subterrânea. A principal diferença nessas duas aplicações são os custos envolvidos com energia e substituição de membranas. No caso da água salobra subterrânea, aplica-se menos pressão hidrostática para produzir o permeado, já que o conteúdo de sais geralmente é menor que o da água do mar, reduzindo conseqüentemente a demanda de energia. Os custos com energia representam 11% das despesas totais da dessalinização de água continental subterrânea, enquanto que na dessalinização de água do

mar esse custo sobe para 44%. Menor salinidade também resulta em menos trocas de membrana (GREENLEE et al., 2009). A Figura 1 apresenta um esquema resumindo as etapas da dessalinização por osmose inversa (OI).

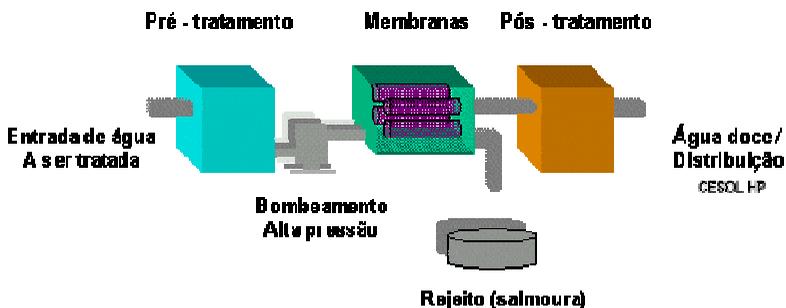


Figura 1. Esquema das etapas da dessalinização por osmose inversa.

Fonte: <http://www.geocities.com/cesol999/OsmoseReversa.htm>.

A extração da água salobra de sua fonte natural (água de alimentação) é realizada por sistemas de captação e bombeamento que a levam até o pré-tratamento. Esta etapa inclui a adição de agentes químicos que controlam seu pH, tratamento específico para determinados compostos químicos presentes na água de alimentação utilizada, e impedir o acúmulo de sais em crostas que se formam no equipamento. Também se aplicam coagulantes que agregam partículas de impureza a fim de facilitar sua posterior filtração. Em seguida um sistema de bombeamento aplica pressão na água pré-tratada contra a membrana do módulo de osmose inversa. Essa membrana é capaz de conter a passagem de 98 a 99,5% dos sais, dependendo da membrana utilizada e da qualidade da água de alimentação, que se acumulam no denominado concentrado de dessalinização (apontado como “Rejeito” na Figura 1). A água que atravessa a membrana do módulo de osmose inversa é denominada permeado, que finalmente é ajustada aos padrões de qualidade segundo os parâmetros de potabilidade de água vigentes na região, na etapa definida de pós-tratamento na Figura 1. Para ser classificada como dessalinizada, a água deve conter menos de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de sais ou de conteúdo total de sólidos dissolvidos (TDS); porém a osmose inversa permite que essas determinações cheguem a zero. A relação entre o volume de permeado e o volume total de água de

alimentação define a taxa de recuperação do método de dessalinização empregado (BRASIL, 2004; FRITZMANN, 2007; GREENLEE et al, 2009).

Os métodos de dessalinização térmica produzem água de melhor qualidade. Também exigem menos manutenção, limpeza e troca de peças do equipamento. O pré-tratamento é mais simples do que na osmose inversa, sem aplicação de coagulantes e de tratamento químico específico para determinados compostos químicos presentes na água de alimentação. Entretanto, a tecnologia de osmose inversa oferece menos problemas com corrosão de equipamentos e a demanda de energia é menor. Sua taxa de recuperação é maior, e oferece a vantagem de eliminar contaminantes que possuem ponto de evaporação menor que o da água, como pesticidas, que na dessalinização térmica evaporam e condensam junto ao produto final. As instalações são mais compactas, de implantação mais rápida e simples. Além disso, o não aquecimento da água faz com que o impacto dos resíduos lançados no meio-ambiente seja menor (VILLAFILA; MUJTABA, 2003; QADIR et al., 2007).

## **1.2 Implicações ambientais da tecnologia de dessalinização**

A introdução de unidades de dessalinização está associada a sérios impactos ambientais nas áreas adjacentes às plantas de produção, sendo o principal deles o lançamento do concentrado no meio ambiente (ALAMEDDINE; FADEL, 2006).

O perfil químico do concentrado de dessalinização varia conforme a composição da água de alimentação, a metodologia de dessalinização empregada, sua respectiva taxa de recuperação e agentes químicos utilizados na fase pré-tratamento. Alguns exemplos de agentes químicos utilizados são o ácido sulfúrico e os polifosfatos, que impedem a formação de crostas nas paredes dos reservatórios de pré-tratamento, e o cloro, aplicado para evitar a proliferação de microrganismos, macroalgas e plantas nos mesmos. Estudos demonstraram que o concentrado lançado ao solo é absorvido, e o próprio aquífero de onde provém a água de alimentação pode ser contaminado por esses agentes químicos, além de aumentar sua dureza devido à alta concentração de sais. As altas concentrações de sódio, cloro e boro reduzem a produtividade do solo e suas plantas. Também alteram sua condutividade elétrica e sua Taxa de Adsorção de Sódio (SAR). Este índice define a influência do sódio nas propriedades do solo, através da

determinação das concentrações relativas de sódio, cálcio e magnésio. Altas concentrações de sódio causam queda na sua permeabilidade. Embora o sódio não afete a absorção de água pelas plantas ele muda a estrutura do solo, dificultando o acesso da água e nutrientes para as raízes. A baixa permeabilidade também leva a uma queda na aeração e ao acúmulo da água da chuva na superfície (MOHAMED; MARAQA; AL HANDHALY, 2005; LATTEMANN; HÖPNER, 2008).

A implantação de um sistema que evite um impacto negativo nas áreas adjacentes a dessalinização é de grande importância para a sustentabilidade desta tecnologia de obtenção de água potável (QADIR et al., 2007). Mohamed; Maraqa; Al Handhaly (2005) e Jordan et al. (2009) citam a necessidade da aplicação de regulamentações quanto à qualidade dos rejeitos lançados no meio ambiente e apontam as seguintes alternativas para este problema:

- a. ajustes nos mecanismos de evaporação na dessalinização térmica: o tamanho do tanque de evaporação influi na taxa de produção do concentrado;
- b. conversões químicas: há possibilidade de produzir compostos químicos a partir do resíduo, por exemplo:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$  e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  obtidos a partir do  $\text{NaCl}$  do concentrado;
- c. tratamento de extração de minerais do rejeito;
- d. aplicações em biotecnologia: o resíduo pode ser utilizado na irrigação de *Atriplex lentiformis*, uma planta que ocorre naturalmente em solos alcalinos e é adaptada a alta salinidade. Possui aplicações na gastronomia, além de efeitos terapêuticos;
- e. a alta salinidade e alcalinidade, aliado a disponibilidade de altas temperaturas e radiação solar típicas das áreas onde a dessalinização é realizada, pode constituir uma forma de produção de tilápias e *Spirulina*; ambos produtos de alto valor comercial.

### 1.3 Microalgas: biologia e aplicações comerciais

O termo microalgas aplica-se a uma ampla variedade de microrganismos fotossintéticos, produtores de clorofila *a*, apresentando dessa forma metabolismo análogo ao das plantas. Sob esta denominação incluem-se organismos com dois tipos de estrutura celular: os procarióticos, com representantes na divisão Cyanophyta (cianobactérias) e os eucarióticos, com representantes das divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta (Prymnesiophyta), Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Chrysophyceae e Xanthophyceae), Cryptophyta e Dinophyta. Portanto este termo não possui valor taxonômico, sendo sua caracterização sistemática baseada em uma série de critérios tais como a ocorrência e estrutura de flagelos, aspectos da divisão celular, presença e caracterização de envoltório dos cloroplastos, bem como características evidenciadas por técnicas de biologia molecular (OLAIZOLA, 2003; PULZ; GROSS, 2004; DERNER et al. 2006).

Dentre as cianobactérias são reconhecidas quatro ordens: Chroococcales, que incluem todas as espécies unicelulares; Nostocales, com habilidade de desenvolver heterocistos e Stigonematales, filamentosos ramificados e com habilidade de desenvolver heterocistos e Oscillatoriales, integrada por organismos filamentosos não-ramificados. Colonizam ampla variedade de habitats incluindo ambientes marinhos, água doce, solos e geleiras. Geralmente dominam as comunidades de algas, sendo um dos motivos desse fato a rapidez com que consomem e acumulam nutrientes. O fosfato é armazenado em grânulos de polifosfato; o nitrogênio é armazenado na forma de cianoficina (polímero constituído de ácido aspártico e arginina); carbono e energia são armazenados em uma forma de amido das cianobactérias, o  $\alpha$ -1,4-poliglicano. A reprodução é essencialmente assexuada, por fissão celular. Produzem grande número de compostos bioativos, sendo alguns destes hepatotoxinas e neurotoxinas que causam sérios problemas de saúde pública quando contaminam fontes e reservatórios de água potável. Porém outros metabólitos secundários têm aplicações terapêuticas como agentes antivirais, imunomoduladores, bacteriostáticos. As espécies de cianobactérias de maior relevância na biotecnologia são *Nostoc commune*, *Aphanizomenon flos-aque* e *Arthorospira platensis* (SKULBERG, 2000; PULZ; GROSS, 2004).

Considerando a enorme biodiversidade de microalgas, este grupo representa uma fonte promissora de novos produtos com aplicações nas

indústrias alimentícia e farmacêutica, podendo atender às altas demandas desses setores através do desenvolvimento de técnicas de cultivo em massa (PULZ; GROSS, 2004).

## **1.4 O gênero *Arthrospira***

### **1.4.1 Estrutura e organização celular**

O gênero *Arthrospira* possui células cilíndricas com diâmetro de 3 – 12  $\mu\text{m}$ , organizadas em uma cadeia de células não diferenciadas em forma de hélice, os tricomas. O formato deste filamento pode variar consideravelmente em função das condições ambientais, podendo ocorrer inclusive na forma linear. Os tricomas lineares ocorrem tanto em cultivos de laboratório quanto em plantas de produção em massa, embora seja razoável supor sua ocorrência naturalmente. Após a linearização dos filamentos, o conteúdo de clorofila é similar ao dos tricomas espiralados, porém a concentração de carotenóides e ficobilinas são maiores. A indução dessa forma está relacionada a condições adversas ao crescimento, como a falta de nutrientes ou variações na intensidade luminosa, e é reversível (HU, 2004; WANG; ZHAO, 2005). Os tricomas também podem comprimir-se, como medida de autossombreamento em ambientes com alta incidência de radiação ultravioleta (UV) (WU et al., 2005).

A estrutura do envoltório celular é típica das cianobactérias: gram-negativa, composta pela membrana citoplasmática e uma parede celular constituída de peptidoglicano. A parede celular contém poros, cujo padrão de disposição é útil em estudos de sistemática. No gênero *Arthrospira* esses poros têm diâmetro de 15 nm, e são arrançados em uma fileira próxima às paredes transversas (PALINSKA; KRUMBEIN, 2000).

A região nucleoplásmica central contém carboxissomos, ribossomos, e corpos lipídicos. Nas membranas dos tilacóides, nos cloroplastos, estão associados os ficobilissomos, agregados de alto peso molecular contendo o pigmento fotossintético ficobiliproteína. Estas por sua vez estão divididas em três classes de acordo com a sua estrutura: ficoeritrinas, aloficocianinas e ficocianinas. Desempenham papel importante na fotossíntese absorvendo energia luminosa da luz solar e

transferindo-a para o centro de reação do fotossistema II (PS II) em conjunto com os demais pigmentos fotossintéticos. Possuem forma hemidiscoidal, constituído de um núcleo com 3 cilindros, rodeados por 6 séries de bastões. (GÓMEZ-LOJERO et al., 1997; HU, 2004; SILVEIRA et al., 2007).

A ficocianina é o pigmento fotossintético de maior concentração, constituindo até 20 % do peso seco da proteína celular (SILVEIRA et al., 2007). A clorofila também é produzida por esta microalga, constituindo 1,15% da sua biomassa, sendo que apenas a clorofila *a* é produzida (DANESI et al., 2004). Os carotenóides estão também presentes desempenhando a função de proteção em situações de alta intensidade luminosa (KERFELD, 2004).

Suas células também possuem vesículas de gás que auxiliam na sua flotabilidade, permitindo que a biomassa se mova verticalmente nos corpos de água a fim de alcançar a intensidade ideal de luz para fotossíntese e acessar nutrientes, uma vez que a distribuição destes nos corpos d'água é heterogênea (MA; GAO, 2009).

#### 1.4.2 Ciclo de vida

O ciclo de vida de *Arthrospira* está representado na Figura 2. Um tricoma quebra-se em várias partes nos locais onde células especializadas, denominadas necrídias, perdem o seu citoplasma. Desses fragmentos surgem cadeias curtas (de 2 a 4 células), chamadas de hormogônia. Elas diferem dos tricomas maduros na morfologia celular, no menor tamanho das células e na ausência de motilidade. O número de células desta estrutura aumenta por divisões celulares intercaladas, à medida que o citoplasma das células fica granulado e assumindo coloração verde azulada. Assim cada hormogônia gera um novo tricoma, que cresce em comprimento e assume a típica forma espiralada (CIFERRI; TIBONI, 1985).

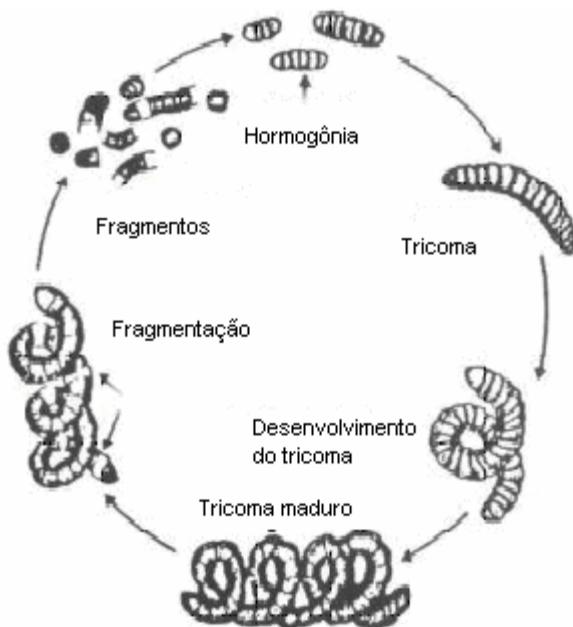


Figura 2. Representação do ciclo de vida do gênero *Arthrospira* (*Spirulina*).

Fonte: (CIFERRI, 1983)

### 1.4.3 Taxonomia

O sistema utilizado para distinguir as cianobactérias é fundamentado em características fenotípicas, recentemente embasadas por dados ultra-estruturais e moleculares. Reconhecem-se 3 ordens de cianobactérias filamentosas: Oscillatoriales, Nostocales e Stigonematales. A ordem Oscillatoriales diferencia-se por não produzir heterocistos nem aquinetos. É relevante salientar que dentro desta ordem estão incluídas as famílias Phormidiaceae, que contém o gênero *Arthrospira* e a Pseudanabaenaceae, que contém o gênero *Spirulina*. A família Phormidiaceae caracteriza-se por possuir células cujo comprimento não é menor do que a metade da sua largura, tendendo a ser isodiamétrica. O conteúdo celular é homogêneo ou levemente estriado ou reticulado (tilacóides organizados radialmente);

com tricomas de 4 a 14 µm (KOMARÉK; KOMÁRKOVÁ; KLING, 2003).

O gênero *Arthrospira* possui tricomas espiralados e livres, raramente ocorre um envoltório de mucilagem, fino e incolor. As células não são constringidas nas paredes transversas (ou constringidas muito suavemente), que são bem evidentes neste gênero. No gênero *Spirulina* as paredes transversas só são visualizadas através de determinadas técnicas de coloração de microscopia ótica. Em seu formato, seu comprimento é menor que a largura (em *Spirulina* são mais longas que largas). Raramente móveis por rotação (*Spirulina* é intensamente móvel, por rotação horária e anti-horária). Possui aerótopos; grupos de vesículas de gás, ausentes em *Spirulina*. Possui um padrão especial de poros em sua membrana, organizados em uma única fileira ao redor da célula (o gênero *Spirulina* possui várias fileiras). As células apicais dos tricomas são arredondadas ou cônicas. A divisão ocorre por células necridiais, que não ocorrem em *Spirulina*, em sentido perpendicular ao eixo horizontal do tricoma. As hormogônias resultantes dessa divisão são destituídas de motilidade, enquanto que no gênero *Spirulina*, as hormogônias são móveis, e formadas através do surgimento de uma fina lamela entre células vizinhas (KOMARÉK; KOMÁRKOVÁ; KLING, 2003).

Atualmente, a classificação de *Arthrospira* e *Spirulina* em dois gêneros é adotada por diversos autores e confirmada com base em características morfológicas e genéticas, embora a biomassa de *Arthrospira* produzida comercialmente ainda receba a denominação de *Spirulina* (ARAÚJO; FACCHINETTI; SANTOS, 2003; KOMARÉK; KOMÁRKOVÁ; KLING, 2003).

#### **1.4.4 Ecologia e fisiologia do crescimento**

O gênero *Arthrospira*, do qual as espécies de maior relevância são *A. platensis* e *A. máxima*, é um grupo de cianobactérias ubíquas, encontradas em uma variedade de ambientes, principalmente em lagos alcalinos e salobros, onde frequentemente tornam-se as espécies predominantes. São fotoautotróficos; dessa forma todos os fatores que afetam a fotossíntese influenciarão o crescimento destes microorganismos, sendo os principais fatores a temperatura, luminosidade, salinidade e pH (HU, 2004).

### 1.4.5 Efeitos da temperatura

A faixa de temperatura de 30 °C a 35 °C é apontada como ótima para o desenvolvimento desta microalga (OLIVEIRA et al., 1999). A composição bioquímica da biomassa de *Arthrospira* é influenciada pela temperatura do cultivo, e pode ser controlada segundo a destinação da biomassa produzida, mantendo o cultivo em determinadas faixas de temperatura para aumentar a concentração das substâncias de interesse. Ronda e Lele (2008) demonstraram que a manutenção do cultivo a 25 °C, associado com a alta intensidade de luz e utilização de óleo de prímula, resultou em acúmulo de ácido  $\gamma$ -linolênico. Santos; de Macedo; Alegre (2003) detectaram que a 35 °C ocorre redução de 28,84 % no teor de proteínas, porém acompanhado de um aumento de 30,34 % no teor de carboidratos e de 287,90 % nos lipídios totais, associando-se a utilização de 0,2 g.L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub>. Já quando a temperatura de cultivo foi reduzida para 25 °C, ocorreu redução de 40,28 % no teor de proteínas, aumento de 88,90 % no teor de carboidratos e aumento de 321,25 % no teor de lipídios totais. A redução no conteúdo de proteínas sob temperatura de 35 °C também foi observado por Oliveira e colaboradores (1999).

A temperatura também influencia os padrões de expressão genética desta microalga. Estudos sobre o mecanismo de regulação da expressão de genes associados à síntese de ficocianinas em *Arthrospira* revelaram que a expressão do gene estudado (*cpcB*) foi 6 vezes maior à temperatura de 37 °C do que a 25 °C (YONGZHONG; XUECHENG, 2007).

Dependendo dos componentes do meio de cultura, a temperatura também pode determinar a disponibilidade de certos nutrientes. Temperaturas relativamente altas (acima de 33 °C) resultam em maior crescimento, porém podem causar perda de nutrientes se sua fonte for um composto volátil como a amônia, diminuindo a concentração de nitrogênio no meio de cultura (DANESI et al. 2002).

### 1.4.6 Efeitos da luminosidade

Como procariotos fotossintéticos, o gênero *Arthrospira* é dependente da radiação solar, dependendo principalmente da região do

espectro eletromagnético correspondente à luz absorvida pelos pigmentos fotossintéticos (Radiação Fotossinteticamente Ativa – RFA) como uma de suas principais fontes de energia. Estudos demonstraram que a radiação ultravioleta, especialmente as radiações UV-A e UV-B, afeta o crescimento e a sobrevivência deste gênero, influenciando sua pigmentação, mobilidade, fixação do nitrogênio, assimilação de carbono e a permeabilidade da membrana num fenômeno chamado fotoinibição (SINHA; HÄDER, 2008). Segundo Gao e Ma (2008), a fotoinibição é maior em *A. platensis* sob temperaturas abaixo da ótima de crescimento. Conseqüentemente, este fenômeno pode ocorrer de forma mais intensa em cultivos abertos quando se combinam as temperaturas relativamente baixas do período matinal com o rápido aumento de incidência luminosa deste mesmo período.

Como resposta a este fenômeno as cianobactérias possuem estratégias para prevenir esses danos, tais como a biossíntese de substâncias que absorvem a radiação UVB, como os aminoácidos tipo micosporinas e citoneminas. Porém essas substâncias mantiveram-se sob concentrações baixas em *A. platensis* sob 3 diferentes intensidades luminosas, concluindo-se que o principal mecanismo de prevenção à fotoinibição deste gênero são mudanças morfológicas que promovem o auto-sombreamento por compressão dos tricomas. Observou-se que sob incidência de RFA mais radiação UV-A, o comprimento dos tricomas reduziu-se de 1,2 mm para 0,3 mm (WU et al., 2005).

Outro mecanismo é a administração da flotabilidade através das vesículas de gás intracelulares, que são altamente influenciadas pela luz solar. Além de auxiliar a evitar a irradiação nociva ao meio-dia, constitui uma estratégia para otimizar a fotossíntese em situações de baixa incidência de luz (ao amanhecer e anoitecer) (MA; GAO, 2009).

#### **1.4.7 Efeitos da salinidade**

O gênero *Arthrospira* tolera concentrações de NaCl relativamente altas. Entretanto a exposição a concentrações maiores do que 0,75 M de NaCl reduz significativamente seu potencial de crescimento (HU, 2004). A concentração ótima de NaCl para o crescimento destas microalgas é de 1,5 g.L<sup>-1</sup>. Altas concentrações de sal danificaram o fotossistema I e II (ÇELEKLI; YAVUZATMACA, 2009). Sua resistência característica a meios com alta concentração de sal deve-se a um mecanismo de regulação osmótica que consiste no acúmulo intracelular do carboidrato

de baixo peso molecular glicosil-glicerol em resposta a aumento na pressão osmótica externa (WARR et al., 1985). Também há um mecanismo de osmorregulação via bomba de sódio ATP-dependente, em contraste com a maioria das cianobactérias, que regulam sua pressão osmótica através do seqüestro de  $\text{Na}^+$  extracelular por um mecanismo antiporte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (CARRIERI et al., 2007).

#### **1.4.8 Efeitos do pH**

São alcalófilas obrigatórias. Çelekli; Yavuzatmaca; Bozkurt (2009) registraram um aumento de biomassa produzida quando o pH do cultivo aumenta de 9,5 para 10,0; e uma queda conseguinte quando o pH é aumentado para 10,5. A variação da produção de biomassa em relação ao pH do cultivo deve-se à influência deste fator físico na disponibilidade de nutrientes, na atividade de estruturas celulares e de suas enzimas. A condição alcalófila dificulta a sobrevivência de outros micro-organismos encontrados no meio ambiente, constituindo um fator chave para assegurar a qualidade de um cultivo aberto em larga escala (HU, 2004).

#### **1.4.9 Efeitos das fontes de nutrientes**

Os ensaios de adição de nutrientes, onde se detecta o efeito de mudanças sutis nas concentrações dos elementos de um meio de cultura no crescimento da microalga em estudo, fornecem informações importantes sobre o efeito de cada nutriente na cinética de crescimento e na composição bioquímica da biomassa produzida. Também possibilita identificar os componentes efetivamente desnecessários para determinada espécie, podendo ser removido do meio de cultura sem qualquer prejuízo à microalga, acarretando economia ao cultivador (CAMACHO; WIT, 2003; LOURENÇO, 2006).

### 1.4.9.1 Efeitos do carbono

O carbono é o elemento necessário em maiores concentrações para as algas por ser constituinte de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células (proteínas, carboidratos, ácidos nucléicos, vitaminas, lipídeos, entre outros) (LOURENÇO, 2006). A fotossíntese é a principal rota de fixação do carbono, entretanto algumas espécies (incluindo o gênero *Arthrospira*) permitem a combinação entre a fotossíntese e a assimilação heterotrófica de compostos orgânicos, num processo chamado mixotrofia. Tal processo possibilita que o crescimento das microalgas não seja estritamente dependente da intensidade de luz nos cultivos (CHOJNACKA; NOWORYTA, 2004) permitindo o uso de variadas fontes desse nutriente, dependendo da aplicação da biomassa produzida e dos recursos disponíveis.

O bicarbonato é a fonte de carbono mais frequentemente empregada em meios de cultura. É incorporado ativamente, gerando um gasto energético neste processo, sendo convertido em  $\text{CO}_2$  que é empregado na fotossíntese, e em carbonato, que é liberado para o meio extracelular aumentando o pH do cultivo (MATSUDO, 2006). O gênero *Arthrospira* necessita de grandes quantidades de bicarbonato, que além de fonte de carbono, auxilia na manutenção da condição alcalina do meio de cultura, vital para o cultivo deste gênero, e constitui uma barreira para o desenvolvimento de outros microrganismos. Sua substituição por bicarbonato de sódio de grau comercial não alterou significativamente a produção de biomassa, o conteúdo de clorofila e de proteínas quando comparado com a biomassa produzida com bicarbonato de grau analítico (RAOOF; KAUSHIK; REINHER, 2006) constituindo uma estratégia viável para produções em larga escala. Segundo Laliberté; Olguín; de La Noue (1997), a suplementação de carbono é um dos fatores que constituem a maior parte dos gastos operacionais e embora tradicionalmente sejam aplicadas concentrações entre 9 e 17  $\text{g.L}^{-1}$ , alguns trabalhos demonstram que a utilização de 3 a 4  $\text{g.L}^{-1}$  é suficiente.

O dióxido de carbono é a fonte preferida de carbono pelas microalgas, uma vez que se difunde passivamente da água ao interior das células e é utilizado diretamente no processo de fotossíntese (DERNER, 2006). Sua utilização na aquicultura é de grande interesse uma vez que o  $\text{CO}_2$  utilizado pode ser proveniente de atividades industriais, produzido a partir da queima de combustíveis fósseis, sendo uma alternativa para a redução das emissões deste gás associado ao

efeito estufa. A taxa de alimentação de  $\text{CO}_2$  de  $0,44 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$  conferiu valores máximos de produção de *A. platensis*. (SOLETTO et al., 2008).

O melaço, resíduo da produção da cana-de-açúcar, é utilizado na produção de álcool e vinagre, como alimento animal e para adubação do solo. Mais de 50 % de sua composição são açúcares, o que lhe confere grande potencial como fonte alternativa de carbono para a suplementação de meios de cultivo para microalgas (ANDRADE; COSTA, 2008). Seu efeito no crescimento de *A. platensis* foi mais evidente após 11 dias de cultivo, sendo que antes deste período a intensidade de luz mostrou-se mais influente no desenvolvimento da microalga (ANDRADE; COSTA, 2007).

Pesquisas envolvendo a glicose, açúcar em maior concentração na biomassa de *Arthrospira*, demonstraram a alta eficiência deste composto, que proporcionou uma velocidade específica de crescimento de  $0,096 \text{ d}^{-1}$  (LODI et al., 2005). Segundo Muliterno e colaboradores (2005), a concentração de  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose adicionada no meio Zarrouk diluído a 75 % em água destilada, sob modo de cultivo em batelada alimentada, gerou  $5,38 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa. Chen e colaboradores (2006) afirmam que o uso desta fonte de carbono aumentou a concentração de ficocianinas de  $0,119 \text{ g.L}^{-1}$  no tratamento controle, para  $0,279 \text{ g.L}^{-1}$  no meio suplementado com  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose. As aloficocianinas aumentaram de  $0,042 \text{ g.L}^{-1}$  para  $0,126 \text{ g.L}^{-1}$ . A biomassa obtida foi de  $2,57 \text{ g.L}^{-1}$  sendo que o tratamento aplicado como controle produziu  $1,08 \text{ g.L}^{-1}$ . Chen e Zang (1997) registraram o aumento de mais de 5 vezes na produção de biomassa cultivada com glicose, quando comparada com a produção fotoautotrófica de *A. platensis*.

O acetato é estudado como potencial fonte de carbono, uma vez que pesquisas demonstraram seu efeito em aumentar tanto a biomassa de espécies de microalgas (*Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina*) e fungos (*Phaffia rhodozyma*), quanto o seu conteúdo de carotenos. Isso pode ser explicado pelo fato de o ácido acético ser um precursor dos carotenóides (MOJAAT et al., 2008). Segundo Chen e colaboradores (2006), o acetato também aumentou a produção de biomassa de *A. platensis*. A aplicação de  $4,0 \text{ g.L}^{-1}$  aumentou a biomassa produzida de  $1,08 \text{ g.L}^{-1}$  para  $1,65 \text{ g.L}^{-1}$ . Lodi e colaboradores (2005) obtiveram velocidade específica de crescimento de  $0,074 \text{ d}^{-1}$  utilizando esta mesma fonte de carbono. O mesmo trabalho também cita a utilização de proprionato, resultando em  $0,068 \text{ d}^{-1}$  de biomassa de *A. platensis*.

### 1.4.9.2 Efeitos do nitrogênio

O nitrogênio é componente fundamental de três classes de substâncias estruturais e do metabolismo primário das células: proteínas, ácidos nucléicos e pigmentos fotossintetizantes (clorofilas e ficobilinas). Se o suprimento de nitrogênio é abundante em cultivos, verifica-se tendência de aumento nas concentrações de proteína e clorofila nas células. Já baixas concentrações diminuem o teor dessas duas substâncias, diminuindo drasticamente também a taxa de divisão celular. A concentração de ácido linolênico aumenta, e o conteúdo de ácidos graxos permanece constante. As ficocianinas são degradadas e utilizadas como fonte de nitrogênio. Mais carotenóides e menos clorofilas são produzidas, gerando mudanças de cor que tendem ao amarelado (COLLA; BERTOLIN; COSTA, 2004; LOURENÇO, 2006; FERREIRA, 2008). Apesar da ampla utilização dos sais de nitrato, estudos mostram uma variedade de fontes alternativas de nitrogênio.

Os sais de nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ), são as fontes de nitrogênio que resultam em maior produção, justificando a sua aplicação nos meios Paoletti, Zarrouk e Schlosser (SASSANO et al., 2007). Segundo Colla e colaboradores (2007), mantendo-se o cultivo a  $30^\circ\text{C}$ , a produtividade de *A. platensis* permanece inalterada sob variação da concentração de nitrato de sódio dentro do intervalo de  $0,625 \text{ g.L}^{-1}$  e  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ ; resultado também relatado por El-Baky e colaboradores (2008). Esses resultados demonstram que a quantidade deste composto pode ser reduzida para aproximadamente 25 % da concentração aplicada pelo meio Zarrouk ( $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ ), sem perdas de produção. Entretanto, Çelekli e Yavuzatmaca (2009) demonstraram que a concentração de  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$  de nitrato de sódio gerou melhores resultados de produção frente à utilização de  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ . El-Baky; El-Baz; El-Baroty (2008) acrescentam que a aplicação de  $1,875 \text{ g.L}^{-1}$  de nitrato de sódio, mantendo a cultura a  $35^\circ\text{C}$  diminui a produtividade, mas confere maiores concentrações de proteínas, lipídeos e compostos fenólicos à biomassa produzida.

Com o intuito de verificar a eficiência de fontes de nitrogênio de menor custo, os sais de amônio foram avaliados quanto ao seu efeito na biomassa de *A. platensis*. O cloreto de amônio, segundo Sassano e colaboradores (2007), gerou resultados ainda melhores que os obtidos com nitratos na produção em tanques abertos, salientando a possibilidade da utilização desta microalga no tratamento de resíduos pela remoção de compostos nitrogenados. O uso desta fonte de nitrogênio também causou um aumento no conteúdo total de ácidos

graxos (MANABE et al., 1992). Converte e colaboradores (2006) afirmam que a concentração de 1,7 mM deste composto resulta na produtividade máxima de biomassa e de assimilação de nitrogênio. Valores acima e abaixo desta concentração causaram queda de produção. Os autores enfatizam a rapidez com que a biomassa de *A. platensis* assimila o cloreto de amônio. Esse composto é assimilado ainda mais facilmente do que a uréia, outro nutriente de difusão celular facilitada, mas que precisa ser previamente hidrolisado em amônia. Já o cloreto de amônio é diretamente metabolizado pela enzima glutamina sintetase.

Soletto e colaboradores (2005) estudaram o efeito de diferentes concentrações de sulfato de amônio, e constataram que à concentração de 1,1 mM, uma cepa de *A. platensis* apresentou crescimento satisfatório após 5 dias ( $640 \text{ mg.L}^{-1}$ ). A concentração de 1,7 mM causou inibição de crescimento após 2 dias de cultivo. Neste estudo a uréia também foi empregada sob essas mesmas concentrações, e a biomassa produzida foi praticamente o dobro da produzida com sulfato de amônio. Segundo Ferreira (2008) a assimilação de nitrogênio é facilitada com a utilização de sulfato de amônio, uma vez que este se dissocia no meio de cultura, formando amônia, a forma de nitrogênio preferencial de *A. platensis*.

Assim como os sais de amônio, a uréia também é utilizada com intuito de baixar os custos da produção. Porém a sua utilização possui os mesmos pontos negativos, uma vez que sua hidrólise em amônia sob condições alcalinas gera perda de nutriente por volatilização, sendo a produção também afetada pelo efeito tóxico deste composto. Por isso a aplicação desses nutrientes na produção em massa exige um controle de suprimento (MATSUDO et al., 2009). Segundo Danesi e colaboradores (2002), o melhor protocolo para adição de uréia é a adição inicial de 0,4 g; seguida de adição contínua por 14 dias até alcançar massa total adicionada de 2,5 g; sendo que essa massa foi adicionada em um tanque de 5 litros. Devem-se evitar protocolos de adição com intervalos de 48 horas, que geraram os piores resultados, e a temperatura do cultivo deve ser levada em consideração, uma vez que a  $33 \text{ }^\circ\text{C}$  observou-se queda na produção devida alta evaporação de amônia, e à perda de água, também por evaporação, causando danos às células decorrentes da alteração da pressão osmótica do meio de cultura. Rangel-Yagui e colaboradores (2004) demonstraram através de metodologia de superfície de resposta que a concentração de  $500 \text{ mg.L}^{-1}$  de uréia resultou em maior produção. A massa inicial adicionada foi de  $0,08 \text{ g.L}^{-1}$ .

### 1.4.9.3 Efeitos do fósforo

A utilização deste macronutriente por *Arthrospira* e demais microalgas está associada à síntese de moléculas orgânicas como ácidos nucléicos e fosfolipídeos (ÇELEKLI; YAVUZATMACA; BOZKURT, 2009). É armazenado sob a forma de grânulos de polifosfato; esses grânulos são compostos, além de fósforo, de cobre, ferro, magnésio, sódio e potássio. Possuem carga negativa em sua superfície, desempenhando também a função de absorção de metais (RANGSAYATORN et al., 2002). Çelekli; Yavuzatmaca; Bozkurt (2009) definiram que a concentração ótima de fosfato para o crescimento de *Arthrospira* é de 0,5 g.L<sup>-1</sup>. Associou-se esse valor ótimo a relação nitrogênio:fósforo. Diferentes proporções desses dois nutrientes determinam a predominância de determinadas microalgas em ambientes aquáticos. Quando mantida na proporção 5-10:1 favorece a predominância de cianobactérias (BULGAKOV; LEVICH, 1999).

## 1.5 O cultivo em massa

As espécies do gênero *Arthrospira* são provavelmente as mais cultivadas em larga escala mundialmente. Como além de longos períodos de exposição à luz natural essas microalgas requerem temperaturas relativamente altas para o seu crescimento ótimo, a produção comercial restringe-se a regiões tropicais e subtropicais (JIMÉNEZ et al., 2003). As primeiras atividades de produção em massa deste gênero foram realizadas pela empresa Sosa Texcoco Co., no México, com apoio e suporte técnico do “Institut Francais du Petrole” (IFP). Desde então vários outros produtores aderiram a essas atividades sendo que atualmente a produção mundial de *Arthrospira* excede a 3.000 toneladas por ano (SHIMAMATSU, 2004).

Grande parte da produção mundial de *Arthrospira* se dá na China e na Índia. A maior produtora mundial, a Hainan Simai Enterprising, está localizada na província de Hainan, na China. Sua produção anual de 200 toneladas representa cerca de 25 % da produção chinesa e 10 % da produção mundial. A planta de produção de maior extensão pertence à Earthrise Farms, abrangendo uma área de 440.000 m<sup>2</sup> em Calipatria, nos Estados Unidos (SPOLAORE et al., 2006).

A produção comercial é baseada principalmente em tanques abertos do tipo “raceway”, embora algumas empresas usem biorreatores tubulares fechados. As duas principais vantagens do sistema aberto são o baixo investimento e o uso da energia solar. Entretanto, há restrição dos locais de produção, das espécies produzidas e a produção é relativamente menor do que a obtida nos sistemas fechados, onde as condições ótimas de crescimento de cada espécie podem ser administradas mais facilmente (JIMÉNEZ et al., 2003).

A Figura 3 apresenta um esquema simplificado da produção de *Arthrospira*, sendo os principais fatores a serem observados durante sua produção, revisados por Shimamatsu (2004), os citados a seguir:

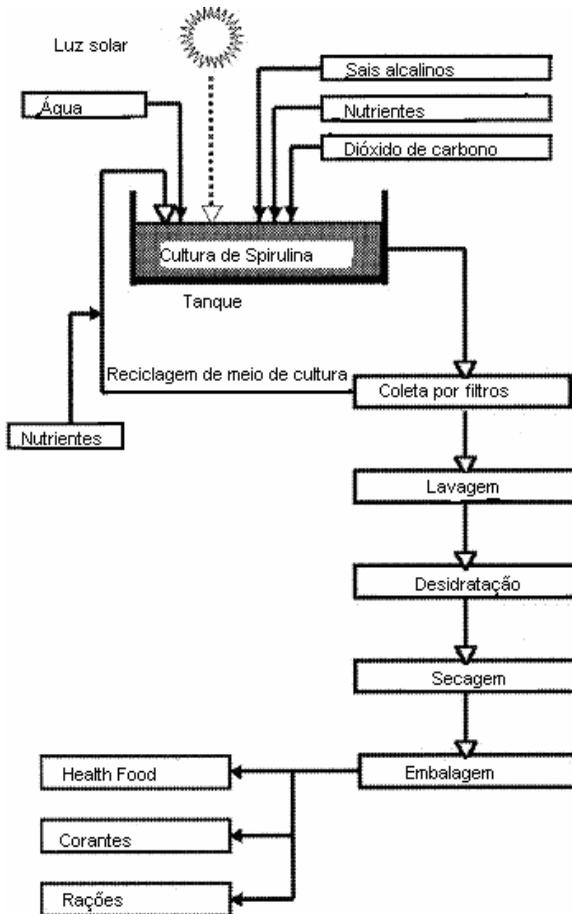


Figura 3. Esquema de produção de *Arthrospira (Spirulina)*

Fonte: Shimamatsu, 2004.

### 1.5.1 Tanque de cultura:

É um canal aberto e retangular, com pás giratórias. Estas pás devem gerar um fluxo de circulação do cultivo em velocidade uniforme e sem pontos de estagnação. Olguín e colaboradores (2003) salientam a importância do nível de profundidade do meio cultivo: profundidades maiores geram melhores produções no verão enquanto que menores são mais eficientes durante o inverno. Segundo Shimamatsu (2004) a

profundidade não deve exceder 30 centímetros, a fim de evitar o sombreamento da cultura quando esta se encontra a altas concentrações.

### **1.5.2 Meios de cultura:**

Os principais constituintes de um meio para cultura de *Arthrospira*, segundo meio de Paoletti são ( $\text{g.L}^{-1}$ ): 0,92 NaCl; 1,88  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ; 0,50  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 8,89  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 15,15  $\text{NaHCO}_3$ ; 0,05  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 2,57  $\text{KNO}_3$ ; 0,25  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,0  $\text{mL.L}^{-1}$  de solução de micronutrientes contendo: 2,86  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 1,54  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0,22  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,39  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,079  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e 0,038  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e 1,0  $\text{mL.L}^{-1}$  de solução Fe-EDTA (29,8 EDTA- $\text{Na}_2$ ; 24,9  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (FERRAZ; AQUARONE; KRAUTER, 1985). Os micronutrientes são ajustados conforme a qualidade da água utilizada. O pH pode ser mantido entre 9,5 e 10,5 usando-se dióxido de carbono. O custo da produção e a velocidade de crescimento podem ser administrados através da escolha dos nutrientes. Uma produção que utiliza meios de cultura de baixo custo pode ser o fator chave para a produção competitiva deste produto de alto valor agregado (OLGUÍN et al., 2001), dessa forma várias pesquisas demonstram a viabilidade da utilização de vários tipos de resíduos, como listados a seguir.

#### **1.5.2.1 Meios de cultura à base de água do mar**

Embora as concentrações de nutrientes dissolvidos na água do mar sejam presumivelmente baixas, elas não são determinadas. Como as concentrações adicionadas são muito maiores (centenas ou milhares de vezes, dependendo do elemento químico e das características da água do mar), assume-se que as concentrações finais de nutrientes no meio de cultura correspondem essencialmente aos componentes adicionados (LOURENÇO, 2006).

Faucher; Coupal; Leduy (1979) demonstraram que a água do mar, abrandada com  $19,2 \text{ g.L}^{-1}$  de bicarbonato e suplementada com  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $3,0 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$  e  $0,01 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{FeSO}_4$  resultou em produtividade de biomassa similar a do meio de cultura sintético. Os mesmos resultados foram obtidos substituindo-se o nitrato por  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$

de uréia. A performance deste meio de cultura também foi bem sucedida em tanque aberto de 130 L.

Olguín e colaboradores (2001), utilizaram água do mar como base, adicionada de 2 % (v/v) de resíduo sólido oriundo da criação de suínos, previamente tratado por digestão anaeróbica. A concentração de biomassa após 12 dias de cultivo foi similar a obtida utilizando-se o meio de cultura definido de Zarrouk. O conteúdo de lipídeos, polissacarídeos e ácido  $\gamma$ -linolênico (GLA) foi mais alto do que na biomassa obtida no meio controle, enquanto o conteúdo de proteína foi significativamente menor. Ronda e Lele (2008) obtiveram aumento na concentração de GLA aplicando alta intensidade luminosa (6 klux) e baixa temperatura (25 °C), então é possível que o aumento na concentração de GLA obtido por Olguín e colaboradores (2001) tenha sido decorrente da utilização do meio de cultura complexo, uma vez que neste trabalho foi utilizada baixa intensidade luminosa e temperatura relativamente alta (32 °C).

A maior velocidade de crescimento aplicando-se meio de cultura a base de água do mar foi obtido por Olguín e colaboradores (2003) adicionando-se 2 % de resíduo de tratamento de suínos, previamente tratado por digestão anaeróbica, em água do mar sem abrandamento. Houve suplementação de 2 g.L<sup>-1</sup> de bicarbonato de sódio nos dias 0, 3 e 5. Os autores adotaram uma estratégia de produção anual na qual no inverno o cultivo era realizado com profundidade de 0,10 metros, e no restante do ano sob profundidade entre 0,15 e 0,25 metros, obtendo-se dessa forma uma produtividade de biomassa de 11,8 g.m<sup>-2</sup>.d<sup>-1</sup>.

### 1.5.2.2 Meios de cultura a base de água doce

Reinehr e Costa (2006) utilizaram água da Laguna Mangueira, Rio Grande do Sul, suplementada com 10 % do meio Zarrouk. Tanto a velocidade específica de crescimento quanto a produtividade de biomassa foram similares as obtidas no meio Zarrouk integral. O modo de cultivo em bateladas repetidas mostrou-se de duas a três vezes mais produtivo que o contínuo, sob as condições estudadas.

Costa e colaboradores (2002), utilizando água da mesma procedência, concluíram que a concentração de 0,00585 M de uréia mostrou-se ótima para o crescimento da microalga nessas condições. Também avaliaram que não era necessária adição de bicarbonato de

sódio, obtendo dessa forma  $1,4 \text{ g.L}^{-1}$  de biomassa após 780 horas de cultivo.

### 1.5.2.3 Meios de cultura a base de efluentes de produção de animais

Laliberté; Olgúin; de la Noue (1997) afirmam que para a utilização de efluentes da produção animal no cultivo do gênero *Arthrospira*, geralmente é necessário tratamento prévio por digestão anaeróbica, alta diluição do resíduo, temperatura em torno de  $30^{\circ}\text{C}$  e suplementação com bicarbonato de sódio. A tabela 2 mostra exemplos das condições ambientais e suplementação de nutrientes para o cultivo desta microalga em resíduos de produção animal.

Segundo Cañizares-Villanueva e colaboradores (1995), a utilização de efluentes da produção animal no cultivo de microalgas permite que os mesmos adquiram qualidades aceitáveis para o seu lançamento no meio ambiente após o cultivo, devido a retirada de nitratos e fosfatos da sua composição pela microalga. O meio de cultura testado em seu trabalho consistiu de 1,0 kg de esterco suíno diluído em 20 L de água, tratado por decantação e estabilização do sobrenadante por aeração intensa. O conteúdo de cinzas da biomassa foi elevado, apontado como consequência da alta concentração de minerais do meio de cultura, que a lavagem prévia à liofilização da biomassa não teria removido. Para possibilitar a utilização de esterco suíno nesta atividade é necessário diluir novamente o meio a 50 % em água destilada, devido a alta concentração de amônia, e como medida para clarificar o meio de cultura favorecendo a fotossíntese. A mesma medida foi adotada por Cañizares e Domínguez (1993). Bertolin e colaboradores (2005) otimizaram a diluição utilizando este resíduo, concluindo que a diluição de 80 % gerou os melhores resultados.

Mitchell e Richmond (1988) testaram a viabilidade da utilização de resíduo sólido proveniente da criação de gado, diluído em água contendo  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de NaCl. O crescimento da microalga foi lento, porém a suplementação com carbono, nitrogênio e fósforo, trouxe resultados similares aos obtidos com meio sintético padrão. A aeração foi essencial para o desenvolvimento da microalga sob essas condições.

Tabela 2. Exemplos de condições ambientais e suplementação de nutrientes para o cultivo de *Arthrospira* sp. em resíduos da produção animal (Continua).

	Espécie	Resíduo (diluição)	Volume (L)	Temp. (°C)	Luz
1	<i>A. platensis</i>	Suíno (10%)	174	33	500 fc.
2	<i>A. maxima</i>	Bovino (1%)	200	30	Ambiente
3	<i>A. platensis</i>	Suíno	10	30	Ambiente
4	<i>A. máxima</i>	Suíno (2%)	1	30	80 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$
5	<i>A. platensis</i>	Aves (2%)	200	30	Ambiente
6	<i>A. fusiformis</i>	Bovino	-	30	Ambiente
7	<i>A. maxima</i>	Bovino- suíno (3-4,5%)	300	22	3-30Lux
8	<i>A. sp.</i>	Suíno (0,8%)	12.500	-	Ambiente
9	<i>A. platensis</i>	Suíno (2%)	1	25	-
10	<i>A. maxima</i>	Suíno (2%)	2	Ambie nte	1.500 lux
11	<i>A. maxima</i>	Suíno (2%)	20	30	70 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$
12	<i>A. platensis</i>	Bovino	0,5	36	34 lux

Fonte: Laliberté; Olguín; de la Noue (1997).

Tabela 2. Exemplos de condições ambientais e suplementação de nutrientes para o cultivo de *Arthrospira* sp. em resíduos da produção animal (Conclusão).

	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (g.L <sup>-1</sup> )	NaCl (g.L <sup>-1</sup> )	PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	N-NH <sub>3</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )
1	1,7 – 16,8	0,5	425	185
2	16	-	127	-
3	1-3	3-7	-	100
4	2	-	-	-
5	4	0,5	128	30
6	8	1	250	-
7	1-2	5-7	100-250	100-1200
8	8,4	0,5	250	-
9	10	-	1,7	465
10	8,4	0,5	4	83
11	4	Água do mar	13,6	25,2
12	2-4	0,3	49	17

Fonte: Laliberté; Olguín; de la Noue (1997).

#### 1.5.2.4 Meios de cultura a base de resíduos de plantas industriais

Segundo Anaga e Abu (1996), o efluente de uma produtora de fertilizantes tipo NPK é uma alternativa como base de meio de cultura devido suas altas concentrações de nitrogênio, fósforo e enxofre. *Arthrospira* cultivada nessas condições foi capaz de utilizar mais de 50 % dos nitratos, fosfatos e sulfatos do efluente em 21 dias de cultivo.

As condições ambientais típicas das áreas onde a dessalinização de água do mar ou continental é realizada, aliada a alta salinidade do resíduo proveniente desta mesma técnica, confere um grande potencial de utilização do concentrado de dessalinização no cultivo de *A. platensis* (FRITZMANN et al., 2007). Volkmann e colaboradores (2008) demonstraram que a produtividade desta microalga foi ainda mais alta do que no meio sintético padrão utilizado (4,954 g.L<sup>-1</sup> em meio a base de concentrado contra 2,587 g.L<sup>-1</sup> em meio de Paoletti), bem como a concentração de proteínas.

### **1.5.3 Sistema de coleta e secagem**

São sistemas que recuperam a massa de alga produzida através de uma série de filtrações realizadas por gravidade em telas inclinadas e telas vibratórias. Posteriormente são concentradas em uma massa de alga úmida em um filtro horizontal a vácuo. A massa é então seca, por variadas metodologias, a fim de manter sua qualidade por períodos longos. Para uma maior eficiência na coleta deve-se dar atenção a densidade das algas no momento da coleta, a contaminação, os materiais em suspensão e a natureza da maquinaria utilizada (SHIMAMATSU, 2004). As metodologias de secagem variam de acordo com a escala de produção e a finalidade da biomassa produzida. Atualmente, produções em pequena escala utilizam secagem ao sol, ou em prateleiras em estufas de secagem, enquanto que em larga-escalas utilizam o método de “spray-drying”. Este método resulta em produtos de composição química de melhor qualidade, pois expõe menos a biomassa ao calor e à oxidação, porém chega a constituir 30% do custo da produção (TIBURCIO et al., 2007).

### **1.5.4 Atividades operacionais**

Altas velocidades favorecem a fotossíntese das algas cultivadas, porém podem causar a fragmentação dos tricomas, comprometendo a eficiência da coleta por filtração. Isso aumenta o risco de contaminação e pode causar a formação de espuma no meio de cultura. Tal acúmulo de matéria orgânica pode inibir a fotossíntese e o crescimento. A densidade das algas é mantida entre 400 e 600mg de peso seco por litro principalmente para garantir a eficiência da coleta. Densidades abaixo de 100 mg de peso seco por litro podem causar fotoinibição e fotoxidação por excesso de exposição à luz. Portanto, na transferência de culturas de estoque para os tanques de produção, a densidade inicial da cultura deve sempre ser levada em consideração (SHIMAMATSU, 2004).

### **1.5.5 Contaminação**

Manter uma cultura contendo apenas uma espécie de microalga em um tanque aberto é o maior desafio desta atividade. A chuva dilui a concentração de nutrientes e favorece a contaminação por outros microorganismos, exigindo técnicas rápidas de restauração do meio de cultura. A reciclagem contínua do meio de cultura também favorece a contaminação decorrente do acúmulo de matéria orgânica causado pela morte e decomposição das algas produzidas. Isso exige que atividades operacionais sejam realizadas causando o menor dano possível às algas produzidas (SHIMAMATSU, 2004).

### **1.5.6 Padrões de qualidade**

Há padrões nacionais e internacionais de qualidade para produtos a base de *Arthrospira*. As Tabelas 3 e 4 apresentam respectivamente as determinações requeridas pela *Food and Drug Administration* (USA) e *Japan Health Food Association* (SHIMAMATSU, 2004).

Tabela 3. Padrão de qualidade para produtos a base de *Spirulina* segundo a *Food and Drug Administration (USA)*.

<b>1. <i>Spirulina</i></b>	<b>Valor padrão</b>
Não utilização de cepas não endêmicas	
Ausência de contaminantes	
<b>2. Fragmentos de insetos</b>	< 30 em 10 g
<b>3. Pêlos de roedores</b>	< 1,5 em 150 g

Fonte: Shimamatsu, 2004.

Tabela 4. Padrão de qualidade para produtos a base de *Spirulina*, baseado em critérios da *Japan Health Food Association (JHFA)*.

<b>1. Aparência e características</b>	<b>Valor padrão</b>
Coloração verde escura, odor suave de alga marinha, Ausência de sabor e odor desagradável	
<b>2. Componentes essenciais (mg %)</b>	
Proteína	> 50
Carotenóides totais	> 100
Clorofila – a	> 500
Ficocianina – c	> 2000
<b>3. Feoforbídeo (mg %)</b>	
Feoforbídeo existente	< 50
Feoforbídeo total	< 100
<b>4. Arsênio (ppm)</b>	< 2
<b>Metais pesados (ppm Pb)</b>	< 20
<b>Contagem total de microrganismos aeróbios (U.F.C)</b>	< 5 x 10 <sup>4</sup>
<b>Coliformes</b>	Negativo
<b>Umidade (%)</b>	< 7

Fonte: Shimamatsu, 2004.

### 1.5.7 Composição Química

Uma abordagem geral sobre a ecologia e fisiologia do crescimento apresentada anteriormente leva à conclusão de que a composição química da biomassa das microalgas varia com as condições ambientais e a disponibilidade de nutrientes, portanto é previsível que sua composição apresente variações sazonais.

A biomassa obtida pelo cultivo em biorreatores fechados tende a apresentar melhor qualidade que a obtida em tanques abertos. Uma boa administração das condições de cultivo é pré-requisito para obter uma produção de biomassa de composição química uniforme e de qualidade (BELAY, 1997). A Tabela 5 apresenta uma composição típica de uma biomassa produzida pela Earthrise Farms bem como algumas características físicas.

### 1.6 *Arthrospira* como fonte de produtos farmacêuticos e nutracêuticos

A utilização deste gênero na dieta humana data por ao menos 700 anos nos continentes americano e africano. Por volta de 1300 a.C. as populações indígenas do Vale do México coletavam *Spirulina* (*Arthrospira*) do lago Texcoco atribuindo-lhe o nome “tecuitlatl”. No mesmo período, africanos das proximidades do Lago Chade consumiam *Spirulina* de maneira similar, denominando-a de “dihe” (ARAÚJO, K. G. L.; FACCHINETTI, A. D.; SANTOS, 2003). Certamente seu caráter de fonte alimentar deve-se ao seu alto teor de proteínas, seguido de quantidades de ácidos graxos essenciais, polissacarídeos, ficobiliproteínas, carotenóides, vitaminas (especialmente B<sub>12</sub>) e minerais. Quanto à nutrição animal suas aplicações mais frequentes estão na aquicultura e na criação de aves (HU, 2004). Os nutrientes da biomassa desta cianobactéria, principalmente no que se refere à proteína, vitaminas e lipídeos, têm recebido considerável atenção quanto aos seus efeitos benéficos à saúde humana (ARAÚJO, K. G. L.; FACCHINETTI, A. D.; SANTOS, 2003).

Tabela 5. Propriedades químicas da biomassa seca de *Arthrospira* (Continua).

<b>Composição geral</b>	<b>(%)</b>	<b>Aminoácidos</b>	<b>g.kg<sup>-1</sup></b>
Umidade	3-7	Alanina	47
Proteínas	55-70	Arginina	43
Lipídeos	6-8	Ácido aspártico	61
Carboidratos	15-25	Cistina	6
Minerais (cinzas)	7-13	Ácido glutâmico	91
Fibras	8-10	Glicina	32
		Histidina	10
<b>Vitaminas</b>	<b>Mg.kg<sup>-1</sup></b>	Isoleucina	35
	2,33. 10 <sup>6</sup>		
Provitamina A	IU kg <sup>-1</sup>	Leucina	54
B-caroteno	1400	Lisina	29
Vitamina E	100	Metionina	14
Tiamina B-1	35	Fenilalanina	28
Riboflavina B-2	40	Prolina	27
Niacina B-3	140	Serina	32
Bitamina B-6	8	Treonina	32

Fonte: Belay, 1997.

Tabela 5. Propriedades químicas da biomassa seca de *Arthrospira* (Conclusão).

<b>Vitaminas</b>	<b>Mg.kg<sup>-1</sup></b>	<b>Aminoácidos</b>	<b>g.kg<sup>-1</sup></b>
Vitamina B-12	3.2	Triptofano	9
Inositol	640	Tirosina	30
Ácido fólico	0.1	Valina	40
Biotina	0.05		
		<b>Ácidos graxos essenciais</b>	<b>g.Kg<sup>-1</sup></b>
Ácido pantotênico	1.0	Ácido linolênico	8
Vitamina K-1	22	Ácido $\gamma$ -linolênico	10
<b>Minerais</b>	<b>Mg.kg<sup>-1</sup></b>	<b>Pigmentos</b>	<b>g.Kg<sup>-1</sup></b>
Cálcio	7000	Carotenóides	3.7
Cromo	2.8	Clorofila	10
Cobre	12	Ficocianina	140
Ferro	1000		
Magnésio	4000		
			<b>Unidade.kg<sup>-1</sup></b>
Manganês	50	<b>Enzimas</b>	
		Superóxido dismutase	1500000
Fósforo	8000		
Potássio	14000		
Sódio	9000		
Zinco	30		

Fonte: Belay, 1997.

Tabela 6. Propriedades físicas da biomassa seca de *Arthrospira* sp.

<b>Propriedades físicas</b>	<b>Descrição</b>
Aparência	Pó fino
Cor	verde-azulado escuro
Odor e sabor	suave de alga marinha
Densidade da biomassa	0.35-0.55 kg.L <sup>-1</sup>

Fonte: Belay, 1997.

As propriedades farmacológicas de substâncias como o ácido  $\lambda$ -linolênico e polissacarídeos também foram citadas em vários estudos cujos resultados indicam um grande potencial. São citados efeitos de estimulação do sistema imunológico e da microbiota intestinal; redução do colesterol e de nefrites; efeito inibitório na replicação de vários vírus, além de propriedades terapêuticas no tratamento de hiperlipidemia, tumor bucal, hipertensão, efeitos tóxicos de radiações, obesidade e diabetes; atribuindo a esta cianobactéria um conjunto de propriedades que dificilmente podem ser encontradas concomitantemente em um único produto natural. Apesar de ser indicada como auxiliar em dietas que requerem diminuição da ingestão calórica, por conter substâncias que parecem prolongar o tempo de trânsito gástrico e produzir sensação de saciedade, estudos apontaram apenas uma discreta redução no peso corporal de indivíduos que consumiram tabletes de *Arthrospira*, as curvas de peso corporal dos grupos experimental e controle não apresentaram diferença estatisticamente significativa (ARAÚJO, K. G. L.; FACCHINETTI, A. D.; SANTOS, 2003). As ficobiliproteínas, além de utilizadas como pigmentos naturais em alimentos e cosméticos, também possuem propriedades terapêuticas, devido sua propriedade anti-oxidante. São utilizadas como marcadores fluorescentes em superfícies celulares. É a fonte de ácido  $\gamma$ -linolênico, que demonstrou reduzir a quantidade de lipoproteínas em pacientes com hipercolesteromia e reduzir os sintomas da síndrome pré-menstrual (ANTELO; COSTA; KALIL, 2008).

## 1.7 Referências Bibliográficas

ALAMEDDINE, I.; FADEL, M. Brine discharge from desalination plants: a modeling approach to an optimized outfall design. **Desalination**, v. 214, p. 241-260, 2007.

ANAGA, A.; ABU, G. O.; A laboratory-scale cultivation of *Chlorella* and *Spirulina* using waste effluent from a fertilizer company in Nigeria. **Bioresource Technology**, v. 58, n. 1, p. 93-95, 1996.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, v. 264 n. 1-4, p. 130-134, 2007.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Culture of microalga *Spirulina platensis* in alternative sources of nutrients. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 5, p. 1551-1556, 2008.

ANTELO, F. S.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, n. 1, p. 43-47, 2008.

ARAÚJO, K. G. L.; FACCHINETTI, A. D.; SANTOS, C. P. Influência da ingestão de biomassa de *Spirulina* (*Arthrospira* sp.) sobre o peso corporal e consumo de ração em ratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 1, p. 6-9, 2003.

BELAY, A. Mass culture of *Spirulina* in outdoors: The Earthrise Farms experience. In: VONSHAK, A. **Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997, p: 131-158.

BELTRÃO, B. A.; de MORAIS, F.; MASCARENHAS, J. C.; MIRANDA, J. L. F.; SOUZA JUNIOR, L. C.; MENDES, V. A. Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea, Estado de Paraíba. Diagnóstico do município de São João do Cariri. Ministério de Minas e Energia. Secretaria de Planejamento e Desenvolvimento Energético. Secretaria de Geologia, Mineração e Transformação

Mineral. Programa Luz Para Todos. Programa de Desenvolvimento Energético dos Estados e Municípios – PRODEEM Serviço Geológico do Brasil – CPRM. Diretoria de Hidrologia e Gestão Territorial, 2005. Disponível em <http://www.cprm.gov.br/rehi/atlas/paraiba/relatorios/SAOJ178.pdf>. Acesso em 16/04/2008.

BERTOLIN, T. B. P.; COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M.; HEMKEMEIER, M. Cultivo da cianobactéria *Spirulina platensis* a partir de efluente sintético de suíno. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 118-125, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Portaria n. 518, de 25 de março de 2004. Disponível em: < <http://e-legis.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 6 abril 2009.

BREMERE, I.; KENNEDY, M.; STIKKER, A. SCHIPPERS, J. How water scarcity will effect the growth in the desalination market in the coming 25 years. **Desalination**, v. 138, p. 7-15, 2001.

BULGAKOV, N. G.; LEVICH, A. P. The nitrogen: phosphorus ratio as a factor regulating phytoplankton community structure. **Archiv für Hydrobiologie**, v. 146, p. 3–22, 1999.

CAMACHO, A.; WIT, R. Effect of nitrogen and phosphorus additions on a benthic microbial mat from a hypersaline lake. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 32, p. 261-273, 2003.

CAÑIZARES, R. O.; DOMÍNGUEZ, A. R. Growth of *Spirulina maxima* on swine waste. **Bioresource Technology**, v. 45, n.1, p. 73-75, 1993.

CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O.; DOMINGUEZ, A. R.; CRUZ, M. S.; RIOS-LEAL, E. Chemical composition of cyanobacteria grown in diluted, aerated swine wastewater. **Bioresource Technology**, v. 51, n. 2-3, p. 111-116, 1995.

CARRIERI, D. C.; ANANYEV, G.; BROWN, T.; DISMUKES, C. G. In vivo bicarbonate requirement for water oxidation by Photosystem II

in the hypercarbonate-requiring cyanobacterium *Arthrospira maxima*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, n. 11-12, p. 1865-1874, 2007.

ÇELEKLI, A.; YAVUZATMACA, M.; BOZKURT, H. Modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of phosphate concentrations and pH regimes. **Bioresource Technology**, in press, 2009.

ÇELEKLI, A.; YAVUZATMACA, M. Predictive modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of nitrate and NaCl concentrations. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 5, p. 1847-1851, 2009.

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**, v. 20, n. 3, p. 221-224, 1997.

CHEN, T.; ZHENG, W.; YUM-SHING, W.; YANG, F.; BAI, Y. Accumulation of selenium in mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 18, p. 2260-2265, 2006.

CHOJNACKA, K.; NOWORYTA, A. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 5, p. 461-465, 2004.

CIFERRI, O. *Spirulina*, the edible microorganism. **Microbiological Reviews**, v. 47, n. 4, p. 551-578, 1983.

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

COLLA, L. M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 59c, p. 55-59, 2004.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina*

*platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 7, p. 1489-1493, 2007.

CONVERTI, A.; SCAPAZZONI, S.; LODI, A.; CARVALHO, J. C. M. Ammonium and urea removal by *Spirulina platensis*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 33, n.1, p. 8-16, 2006.

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 and Biotechnology**, v. 18, n.7, p. 603-607, 2002.

DANESI, E. D. G.; RANGEL-YAGUI, C. O.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 26, n. 4, p. 329-335, 2004.

DANESI, E. D. G.; RANGEL-YAGUI, C. O.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, n. 4, p. 261-269, 2002.

DERNER, R. B. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados**. 2006. 140 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; de CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

EL-BAKY, H. H. A.; EL-BAZ, F. K.; EL-BAROTY, G. S. Characterization of nutraceutical compounds in blue green alga *Spirulina maxima*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 2, n. 10, p. 292-300, 2008.

FAUCHER, O.; COUPAL, B.; LEDUY, A. Utilization of seawater-urea as a culture medium for *Spirulina maxima*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 752-759, 1979.

FERRAZ, C. A. M.; AQUARONE, E.; KRAUTER, M. Efeito da luz e do pH no crescimento de *Spirulina maxima*. **Revista de Microbiologia**, v.16, n.2, p. 132-137, 1985.

FERREIRA, L. S. **Estudo da intensidade luminosa no cultivo de *Arthrospira (Spirulina) platensis* em reator tubular utilizando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio por processo descontínuo alimentado**. 2008. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

FRITZMANN, C. *et al.* T. State-of-the-art of reverse osmosis desalination. **Desalination**, v. 216, n. 1-3, p. 1-76, 2007.

GAO, K.; MA, Z. Photosynthesis and growth of *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Cyanophyta) in response to solar UV radiation, with special reference to its minor variant. **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, n. 1-3, p. 123-129, 2008.

GÓMEZ-LOJERO, C.; PÉREZ-GÓMEZ, B.; PRADO-FLORES, G.; KROGMANN, D. W.; CÁRABEZ-TREJO, A.; PEÑA-DIAZ, A. The phycobilisomes of the cyanobacterium *Arthrospira (Spirulina) maxima*. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 29, n. 10, p. 1191-1205, 1997.

GREENLEE, L. F.; LAWLER, D. F.; FREEMAN, B. D.; MARROT, B.; MOULIN, P. Reverse Osmosis Desalination: Water Sources, Technology, and Today's Challenges. **Water Research**, *in press*, 2009.

HU, Q. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products: major industrial species: *Arthrospira (Spirulina) platensis*. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. p. 264-272.

JIMÉNEZ, C.; COSSÍO, B. R.; LABELLA, D.; NIELL, F. X. The feasibility of industrial production of *Spirulina (Arthrospira)* in Southern Spain. **Aquaculture**, v. 217, n. 1-4, p. 179-190, 2003.

JOHNSON, D. W.; LOTT, J. L.; SLIEPCEVICH, C. M. The exchange crystallization freeze desalination process. **Desalination**, v.18, n. 3, p. 231-240, 1976.

JORDAN, F. L.; YOKLIC, M.; MARINO, K.; BROWN, P.; SEAMAN, R.; GLENN, E. P. Consumptive water use and stomatal conductance of *Atriplex lentiformis* irrigated with industrial brine in a desert irrigation district. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 149, n. 5-7, p. 899-912, 2009.

KERFELD, C. A. Water-soluble carotenoid proteins of cyanobacteria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 430, n. 1, p. 2-9 2004.

KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ, J.; KLING, H. Filamentous Cyanobacteria. In: WEHR, J. D.; SHEATH, R. G. **Freshwater algae of north america: ecology and classification**. Londres. Academic Press, 2003. p. 117-196.

LALIBERTÉ, G.; OLGUÍN, E. J.; DE LA NOUE, J. Mass cultivation and wastewater treatment using *Spirulina*. In: Vonshak, A. **Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997. p. 159-173.

LATTEMANN, S.; HÖPNER, T. Environmental impact and impact assessment of seawater desalination. **Desalination**, v. 220, n. 1-3, p. 1-15, 2008.

LODI, A.; BINAGHI, L.; FAVERI, D.; CARVALHO, J. C. M.; CONVERTI, A.; BORGHI, M. Fed-batch mixotrophic cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Cyanophyceae) with carbon source pulse feeding. **Annals of Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 181-185, 2005.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. 606p. ISBN 85-7656-113-1.

MA, Z.; GAO, K. Photosynthetically active and UV radiation act in an antagonistic way in regulating buoyancy of *Arthrospira (Spirulina) platensis* (cyanobacterium) **Environmental and Experimental Botany**, in press, 2009.

MANABE, E.; HIRANO, M.; TAKANO, H.; ISHIKAWA-DOI, N.; SODE, K.; MATSUNAGA, T. Influence of ammonium chloride on growth and fatty acid production by *Spirulina platensis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 34-35, n. 1, p. 273-281, 1992.

MATSUDO, M. C. **Cultivo de *Spirulina platensis* por processo descontínuo alimentado repetitivo utilizando uréia como fonte de nitrogênio**. 2006. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MATSUDO, M. C.; BEZERRA, R. P.; SATO, S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J. C. M. Repeated fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* using urea as nitrogen source. **Biochemical Engineering Journal**, v.43, n. 1, p. 52-57, 2009.

MILLER, G. W. Integrated concepts in water reuse: managing global water needs. **Desalination**, v. 187, n. 1-3, p. 65-75, 2006.

MITCHELL, S. A.; RICHMOND, A. Optimization of a growth medium for *Spirulina* based on cattle waste. **Biological Wastes**, v. 25, n.1, p. 41-50, 1988.

MOHAMED, A. M. O.; MARAQA, M.; AL HANDHALY, J. Impact of land disposal of reject brine from desalination plants on soil and groundwater. **Desalination**, v. 182, p. 411-433, 2005.

MOJAAT, M.; PRUVOST, J.; FOUCAULT, A.; LEGRAND, J. Effect of organic carbon sources and  $Fe^{2+}$  ions on growth and  $\beta$ -carotene accumulation by *Dunaliella salina*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n.1, p. 177-184, 2008.

MULITERNO, A.; MOSELE, P. C.; COSTA, J. A. V.; HEMKEMEIER, M.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M. Cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* em batelada alimentada. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 6, p. 1132-1138, 2005.

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

OLGUÍN, E. J.; GALICIA, S.; MERCADO, G.; PÉREZ, T. Annual productivity of *Spirulina* (*Arthrospira*) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, n. 2-3, p. 249-257, 2003.

OLGUÍN, E. J. GALICIA, S.; ANGULO-GUERRERO, O.; HERNANDEZ, E. E. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 1, p. 19-24, 2001.

OLIVEIRA, M. A. C.; MONTEIRO, L M. P. C.; ROBBS, P. G.; LEITE, S. G. F. Growth and chemical composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* biomass at different temperatures. **Aquaculture International**, v. 7, n. 4, p. 261-275. 1999.

PALINSKA, K. A.; KRUMBEIN, W. E. Perforation patterns in the peptidoglycan wall of filamentous cyanobacteria, **Journal of Phycology**, v. 36, n. 1, p. 139-145, 2000.

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

QADIR, M.; SHARMA, B. R.; BRUGGEMAN, A.; CHOUKR-ALLAH, R.; KARAJEH, F. Non-conventional water resources and opportunities for water augmentation to achieve food security in water scarce countries. **Agricultural Water Management**, v. 87, p. 2-22, 2007.

RALUY, G.; SERRA, L.; UCHE, J. Life cycle assessment of MSF, MED and RO desalination technologies. **Energy**, v. 31, p. 2361-2372, 2006.

RANGEL-YAGUI, C. O.; DANESI, E. D. G.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 2, p. 133-141, 2004.

RANGSAYATORN, N.; UPATHAM, E. S.; KRUATRACHUE, M.; POKETHITIYOOK, P.; LANZA, G. R. Phytoremediation potential of

*Spirulina (Arthrospira) platensis*: biosorption and toxicity studies of cadmium. **Environmental Pollution**, v. 119, n. 1, p. 45-53, 2002.

RAOOF, B.; KAUSHIK, B. D.; REINHER, R. P. Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, n.6, p. 537-542, 2006.

REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Repeated batch cultivation of the microalga *Spirulina platensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 937-943, 2006.

RONDA, S. R.; LELE, S. S. Culture conditions stimulating high  $\gamma$ -linolenic acid accumulation by *Spirulina platensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 693-697, 2008.

SANTOS, G. M.; de MACEDO, R. V. T.; ALEGRE, R. M. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina maxima* em duas temperaturas – Parte I: Alteração da composição da biomassa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p. 17-21, 2003.

SASSANO, C. E. N.; GIOIELLI, L. A.; ALMEIDA, K. A.; SATO, S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J. C. M. Cultivation of *Spirulina platensis* by continuous process using ammonium chloride as nitrogen source. **Biomass and Bioenergy**, v. 31, n.8, p. 593-598, 2007.

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

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

SINHA, R. P.; HÄDER, D. P. UV-protectants in cyanobacteria. **Plant Science**, v. 174, n. 3, p. 278-289, 2008.

SKULBERG, O. M.; Microalgae as a source of bioactive molecules – experience from cyanophyte research. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, p. 341-348, 2000.

SOLETTO, D.; BINAGHI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J. C. M.; CONVERTI, A. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. **Aquaculture**, v. 243, n. 1-4, p. 217-224, 2005.

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

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

TIBURCIO, P. C. F.; GALVEZ, C. F.; CRUZ, L. J.; GAVINO, V. C. Optimization of low-cost drying methods to minimize lipid peroxidation in *Spirulina platensis* grown in the Philippines. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, n. 6, p. 719-726, 2007.

VILLAFILA, A.; MUJTABA, I. M. Fresh water by reverse osmosis based desalination: simulation and optimisation. **Desalination**, v. 155, p. 1-13, 2003.

VOLKMANN, H.; IMIANOVSKY, U.; OLIVEIRA, J. L. B.; SANT'ANNA, E. S. Cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: protein content and amino-acid profile. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 98-101, 2008.

WANG, Z. R.; ZHAO, Y. Morphological reversion of *Spirulina* (*Arthrospira*) *Platensis* (Cyanophyta) : From linear to helical. **Journal of phycology**, v. 41, n. 3, p. 622-628, 2005.

WARR, S. R. C.; REED, R. H.; CHUDEK, J. A.; FOSTER, R.; STEWART, W. D. P. Osmotic adjustment in *Spirulina platensis*. **Planta**, v. 163, p. 424-429, 1985.

WU, H.; GAO, K.; VILLAFANE, V. E.; WATANABE, T.; HELBLING, E. W. Effects of solar UV radiation on morphology and

photosynthesis of the filamentous cyanobacterium *Arthrospira platensis*, **Applied Environmental Microbiology**, v.71, n.9, p. 5004–5013, 2005.

YONGZHONG, L.; XUECHENG, Z. Temperature influences on the expression of GFP promoted by the upstream sequence of *cpcB* from *Arthrospira platensis*. **Journal of Ocean University of China**, v. 6, n. 3, p. 244-248, 2007.

## **2. Otimização de um meio de cultura à base de concentrado de dessalinização para *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*.**

\*Parte deste capítulo foi submetido para publicação na revista *Bioresource Technology* como artigo científico intitulado: Culture medium optimization for *Arthrospira platensis* based on concentrated brackish water from a desalination plant.

## Otimização de um meio de cultura, à base de concentrado de dessalinização, para *Arthrospira platensis*.

### Resumo

A dessalinização é um método de obtenção de água potável limitado pelos problemas ambientais causados pelo resíduo gerado em seu processo. O objetivo deste trabalho foi aplicá-lo como base para um meio de cultura para *Arthrospira platensis*. Foram avaliados os efeitos da variação da concentração e da fonte de nutrientes adicionados ao meio de cultura no crescimento desta microalga. Foi necessário abrandamento do resíduo por adição de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ( $6,09 \text{ g.L}^{-1}$ ) e posterior diluição a 50 % do resíduo a fim de evitar a precipitação de minerais no meio de cultura. As maiores concentrações de biomassa foram obtidas adicionando-se ( $\text{g.L}^{-1}$ ):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,752;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 1,8  $\text{g.L}^{-1}$  e  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ , 0,57  $\text{g.L}^{-1}$ , segundo análise de superfície de resposta, à uma base composta de ( $\text{g.L}^{-1}$ ):  $\text{NaHCO}_3$ , 15,15;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 8,89;  $\text{KNO}_3$ , 1,00, solução de micronutrientes (1  $\text{mL.L}^{-1}$ ) e solução de Fe-EDTA (1  $\text{mL.L}^{-1}$ ).

### 1 Introdução

As tecnologias de dessalinização são métodos de obtenção de água potável que surgiram para disponibilizá-la às populações estabelecidas em regiões áridas e semi-áridas, devido às dificuldades para implantar métodos convencionais. Surgida na década de 1980, a osmose inversa firmou-se como um dos principais métodos de dessalinização de água salobra subterrânea (MOHAMED; MARAQA, AL-HANDHALY, 2005).

Todo método de dessalinização é limitado pelos resíduos produzidos deste processo, devido tanto aos custos envolvidos no tratamento e final adequado, quanto aos impactos causados quando lançados no meio ambiente, principalmente em plantas de larga escala. Na dessalinização de água subterrânea realizada em regiões continentais, o concentrado é geralmente canalizado para tanques de evaporação, injetado em poços profundos, ou despejado no solo. Essas medidas causam contaminação do solo, e possivelmente da própria fonte

subterrânea, pelos vários agentes químicos utilizados no pré-tratamento e produtos utilizados na limpeza das membranas. Uma estratégia para evitar esses problemas é a diversificação da produção dessas estações de tratamento, a fim de evitar o lançamento do concentrado no solo e obter outros produtos de valor agregado a partir do concentrado de dessalinização (AL-HANDHALY; MOHAMED; MARAQA., 2005; MOHAMED; MARAQA, AL-HANDHALY, 2005; NICOT; CHOWDHURY, 2005; RAVIZKY; NADAV, 2007).

Dentre essas estratégias há possibilidade de empregá-lo como base para um meio de cultura para produção de microalgas do gênero *Arthrospira*. Combinando-se a alta alcalinidade e salinidade do concentrado com as altas temperaturas e irradiação solar típicas das regiões onde a dessalinização de água salobra subterrânea é realizada, obtêm-se as características físicas básicas para o desenvolvimento desta microalga (FRITZMANN et al., 2007). Seu alto valor comercial deve-se aos diversos usos de sua biomassa, desde sua aplicação na ração animal (principalmente em aquíicultura) e nutrição humana, até aplicações em tecnologias de biorremediação, na indústria de cosméticos e farmacêutica (VONSHAK; RICHMOND, 1988; OLAIZOLA, 2003; CHEN et al., 2006; FRITZMANN et al., 2007).

Vários fatores devem ser observados para obter custo-efetividade em uma produção em larga escala de microalgas, tais como o custo do terreno, da mão de obra, da energia, o clima da região e a biologia da alga (BOROWITZKA, 1999). *Arthrospira* sp. geralmente é produzida como uma monocultura em sistemas abertos de cultivo em massa, no qual o meio de cultura empregado constitui uma parcela significativa dos custos envolvidos em sua produção (RAOOF; KAUSHIK; PRASANNA 2006). Portanto o desenvolvimento de meios de cultura de baixo custo tornou-se uma importante área de estudo, resultando em um grande número de meios de cultura obtidos a partir de vários tipos de resíduos e fontes alternativas de nutrientes (MITCHELL; RICHMOND, 1988; ANAGA; ABU, 1996; OLGUÍN et al., 2001; ANDRADE; COSTA, 2007; BERTOLDI; SANT'ANNA; OLIVEIRA, 2008).

Dentre os macronutrientes necessários para o cultivo em massa desta microalga está o nitrogênio. As fontes convencionais deste nutriente são os nitratos, entretanto demonstrou-se que a substituição dessas fontes por uréia ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ) leva a um aumento na produção de biomassa e do seu conteúdo de clorofila. Sua assimilação é facilitada provavelmente devido sua hidrólise espontânea para amônia em meio alcalino (DANESI et al., 2002) ou pela ação da urease. Quando ambos nutrientes, amônia e nitratos, estão presentes no meio de cultura, a

amônia é preferencialmente assimilada. Porém, a amônia pode ser tóxica para *A. platensis* quando presente a altas concentrações. Portanto sua adição deve ser realizada através de uma determinada taxa de adição, adequada à taxa de utilização de uréia por este microrganismo (RANGEL-YAGUI et al., 2004).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um meio de cultura para produção de *A. platensis* à base de concentrado de dessalinização, a fim de obter uma produção de baixo custo e evitar os impactos ambientais decorrentes do lançamento do concentrado de dessalinização no meio ambiente.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Microrganismo e condições de cultivo

A cepa utilizada de *Arthrospira platensis* foi cedida pela Universidade de São Paulo/USP, Brasil.

O cultivo inicial foi mantido a 30 °C, sob iluminação de 7,0 Klux fornecida por lâmpadas fluorescentes (Osram Universal, 40 W) com fotoperíodo de 12 horas em fotobiorreator de 2000 mL em meio Paoletti (FERRAZ; AQUARONE; KRAUTER, 1985) contendo (g.L<sup>-1</sup>): NaCl, 0,92; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,88; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,50; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 8,89; NaHCO<sub>3</sub>, 15,15; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,05; KNO<sub>3</sub>, 2,57; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,25; 1,0 mL.L<sup>-1</sup> de solução de micronutrientes contendo (g.L<sup>-1</sup>): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2,86; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 1,54; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,22; NaMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,39; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,079 e CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0,038) e 1,0 mL.L<sup>-1</sup> de solução Fe-EDTA (EDTA-Na<sub>2</sub>, 29,8; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 24,9), com pH final a 9,5. A agitação dos cultivos foi realizada por injeção contínua de ar.

### 2.2 Planejamento experimental

O planejamento experimental foi realizado através da metodologia de delineamento central composto com três fatores (MONTGOMERY, 1991). Foi avaliado o efeito da concentração de 3 nutrientes: sulfato de sódio, uréia e fosfato de potássio dibásico ( $X_1$ ,  $X_2$

e  $X_3$ ; respectivamente, Tabela 1) adicionados ao meio de cultura na produção de biomassa de *A. platensis*. Empregou-se uma região experimental de 5 níveis (concentrações dos nutrientes; valores codificados -1,68179; -1; 0; +1 e +1,68179; Tabela 1). O ponto central (0) foi replicado 4 vezes para estimativa do erro experimental, totalizando os 18 ensaios expressos na Tabela 1. Os experimentos foram realizados aleatoriamente. Os valores codificados foram transformados para os valores reais segundo a Equação 1.

$$x_j = (X_j - X_{cp}) / \Delta x_j \quad \text{Equação (1)}$$

Onde  $x_j$  é o nível codificado,  $X_j$  é o valor real da concentração do nutriente,  $X_{cp}$  é o valor real da concentração ao ponto central, e  $\Delta x_j$  é o valor do intervalo entre o ponto central e os níveis +1 e -1 (NAWANI; KAPADNIS, 2005).

A região experimental estudada de fosfato de potássio dibásico ( $K_2HPO_4$ ) e de sulfato de sódio ( $Na_2SO_4$ ) foi determinada fixando-se as concentrações utilizadas no meio Paoletti como pontos centrais (nível 0), e empregando  $\Delta x_i$  de 0,15 para  $K_2HPO_4$  e de 0,20 para  $Na_2SO_4$ .

Os níveis de  $CO(NH_2)_2$ , bem como sua forma de adição, foram determinados segundo protocolo descrito por Matsudo (2006) e Danesi e colaboradores (2002). Estipulou-se como ponto central a concentração total de  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ , concentração que resultou nos melhores produções de *A. platensis* segundo Danesi e colaboradores (2002). Os demais níveis foram determinados aplicando-se  $\Delta x_i$  de  $0,045 \text{ g.L}^{-1}$  à Equação 1.

Para evitar o acúmulo de amônia no meio de cultura, os valores da concentração total foram adicionados de maneira fracionada, onde a massa inicial para todos os ensaios foi de  $0,08 \text{ g.L}^{-1}$  (DANESI et al., 2002). A partir do segundo dia de cultivo seguiu-se uma taxa diária de adição até a concentração total calculada para cada nível até o décimo dia, como expresso na Tabela 2:

Tabela 1. Matriz de delineamento central composto, constituída de 3 fatores em 5 níveis.

<i>Experimento</i>	<b>Valores codificados (<i>I</i>)</b>			<b>Valores naturais (<i>x</i>, em g.L<sup>-1</sup>)</b>		
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$Na_2SO_4$	$CO(NH_2)_2$	$K_2HPO_4$
<b>1</b>	- 1	- 1	- 1	1,680	0,455	0,350
<b>2</b>	- 1	+ 1	- 1	1,680	0,545	0,350
<b>3</b>	+ 1	- 1	- 1	2,080	0,455	0,350
<b>4</b>	+ 1	+ 1	- 1	2,080	0,545	0,350
<b>5</b>	- 1	- 1	+ 1	1,680	0,455	0,650
<b>6</b>	- 1	+ 1	+ 1	1,680	0,545	0,650
<b>7</b>	+ 1	- 1	+ 1	2,080	0,455	0,650
<b>8</b>	+ 1	+ 1	+ 1	2,080	0,545	0,650
<b>9</b>	0	0	- 1,68179	1,880	0,500	0,248
<b>10</b>	0	0	+ 1,68179	1,880	0,500	0,752
<b>11</b>	- 1,68179	0	0	1,544	0,500	0,500
<b>12</b>	+ 1,68179	0	0	2,216	0,500	0,500
<b>13</b>	0	- 1,68179	0	1,880	0,424	0,500
<b>14</b>	0	+ 1,68179	0	1,880	0,575	0,500
<b>15</b>	0	0	0	1,880	0,500	0,500
<b>16</b>	0	0	0	1,880	0,500	0,500
<b>17</b>	0	0	0	1,880	0,500	0,500
<b>18</b>	0	0	0	1,880	0,500	0,500

Combinações dos diferentes níveis de concentração de nutrientes. Delineamento obtido através do software *STATISTICA 7.0* (STATSOFT, 2004), aplicando-se 3 fatores ( $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$ ) e 5 níveis (pontos centrais: 0; pontos axiais: -1,68179; +1, 68179; +1 e -1, que distancia-se a um valor  $\alpha$  (Eq. 2) do ponto central).

Tabela 2. Protocolo para adição de uréia.

Massa inicial (g.L <sup>-1</sup> )	Massa adicionada diariamente (g.L <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup> *)	Massa total (g.L <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup> )	Nível codificado (g.L <sup>-1</sup> ) <sup>1</sup> )
0,08	0,0550	0,575	+1,68179
0,08	0,0516	0,545	+1
0,08	0,0466	0,500	0
0,08	0,0416	0,455	-1
0,08	0,0382	0,424	-1,68179

\* Massa adicionada a partir do segundo dia, durante 10 dias.

## 2.3 Procedimento experimental

As amostras de concentrado de dessalinização utilizadas no presente trabalho são provenientes de uma planta de dessalinização de água salobra subterrânea situada no município de São João do Cariri, localizado na Microrregião São João do Cariri e na Mesorregião Borborema do Estado da Paraíba. Sua área é de 702 km<sup>2</sup> e sua sede tem uma altitude aproximada de 458 metros, à 186,6 Km da capital do estado, João Pessoa. (BELTRÃO et al., 2005). O perfil químico desta amostra consta no Apêndice A.

Devido a dureza do resíduo utilizado foi necessário o abrandamento prévio a adição de nutrientes. O método de abrandamento utilizado foi por adição de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Para definir a concentração necessária para reduzir a dureza do resíduo até o valor de 1000 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>/L (valor máximo de dureza total do resíduo no qual não ocorreu precipitação de nutrientes), uma curva relacionando concentrações de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e de dureza do resíduo foi construída, expressa na Figura 1. As análises de dureza foram realizadas segundo metodologia LANARA, XXIII – 2.

Segundo a função obtida desta curva, aplicou-se a concentração de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> relativa a dureza de 2.000 mg.L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>. Em seguida separou-se o sobrenadante, o qual foi diluído a 50 % em água destilada, chegando a dureza final de 1000 mg de CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>. A diluição após o abrandamento foi adotada a fim de reduzir a quantidade de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> necessária para o processo.

Esta solução foi suplementada com bicarbonato de sódio (15,15 g.L<sup>-1</sup>), carbonato de sódio (8,89 g.L<sup>-1</sup>); nitrato de potássio (1 g.L<sup>-1</sup>), solução de micronutrientes (1 mL.L<sup>-1</sup>) e solução de Fe-EDTA (1 mL.L<sup>-1</sup>) descritas no item anterior.

Volumes de 300 mL foram distribuídos em erlenmeyers de 1 L. Em seguida, adicionaram-se os nutrientes avaliados: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> nas concentrações estabelecidas pelo planejamento experimental (Tabela 1).

Os experimentos foram realizados sob as mesmas condições de temperatura e iluminação do cultivo inicial, com 15 % de inóculo e tempo de cultivo de 12 dias.

A concentração celular foi determinada diariamente por medida de absorbância a 560 nm (espectrofotômetro Spectrum SP-2000 UV). Os valores de absorbância obtidos foram convertidos em biomassa seca

( $\text{g.L}^{-1}$ ) através de uma curva de calibração de um cultivo com a formulação do ponto central. O valor da variável dependente foi a biomassa seca ( $\text{g.L}^{-1}$ ) produzida após 12 dias de cultivo.

### 3 Resultados e discussão

A Figura 1 mostra a relação entre diferentes concentrações de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e dureza total do concentrado de dessalinização, obtido através do programa STATISTICA 7.0 (STATSOFT, 2004).

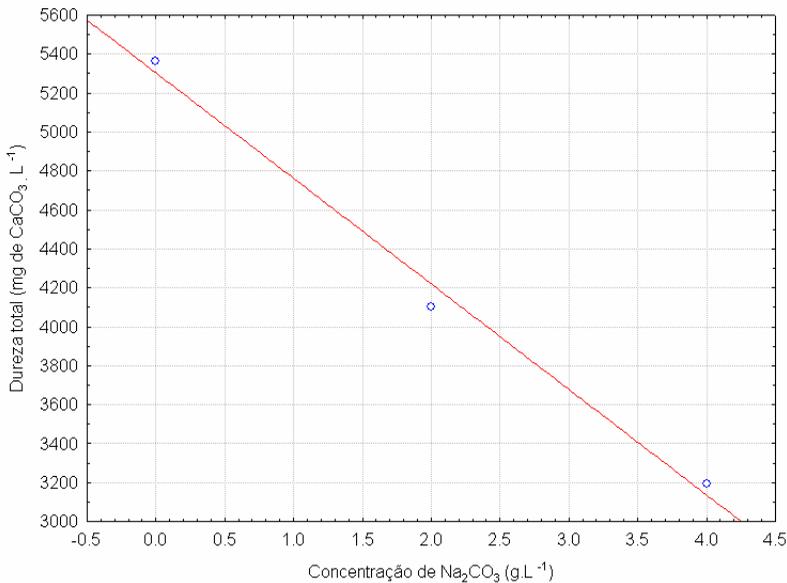


Figura 1: Relação entre concentração de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e dureza total do concentrado de dessalinização.

Segundo a curva da Figura 1, a relação entre diferentes concentrações de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e dureza total do concentrado segue a seguinte função:

$$\hat{y} = 5303,6 - 541,9.x \quad \text{Equação (2)}$$

Onde  $\hat{y}$  é a dureza total estimada do concentrado e  $x$  é a concentração de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Assumindo-se  $Y = 2000$ , obtemos  $x = 6,09 \text{ g.L}^{-1}$ .

Propôs-se que o efeito das diferentes combinações de níveis dos nutrientes fosfato de potássio dibásico, sulfato de sódio e uréia, adicionados ao meio base para produção de biomassa de *A. platensis* segue o modelo de regressão de segunda ordem segundo a Equação 3:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 \quad \text{Equação (3)}$$

Onde  $Y$  é a variável dependente (biomassa de *A. platensis* produzida em 12 dias),  $b_0$  é a constante do modelo,  $b_j$  corresponde ao coeficiente dos efeitos lineares,  $b_{jk}$  são os coeficientes das interações entre os fatores e  $b_{ij}$  corresponde ao coeficiente dos efeitos quadráticos. Os coeficientes foram calculados por análise de regressão e a sua significância foi verificada pela análise de variância (ANOVA).

A Tabela 3 mostra os valores estimados da biomassa produzida após 12 dias em cada experimento.

Tabela 3. Biomassa estimada de *A. platensis* após 12 dias de cultivo no meio à base de concentrado de dessalinização\* adicionados dos fatores (nutrientes) referentes aos tratamentos aplicados.

<i>Experimento</i>	<b>Fatores</b>			<b>Resposta</b>
	<i>CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub></i>	<i>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></i>	<i>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>	<b>Biomassa (g.L<sup>-1</sup>)</b>
<b>1</b>	0,455	0,35	1,68	0,885
<b>2</b>	0,545	0,65	1,68	1,028
<b>3</b>	0,455	0,35	1,68	1,119
<b>4</b>	0,545	0,65	1,68	1,103
<b>5</b>	0,455	0,35	2,08	1,104
<b>6</b>	0,545	0,65	2,08	1,188
<b>7</b>	0,455	0,35	2,08	1,165
<b>8</b>	0,545	0,65	2,08	1,308
<b>9</b>	0,500	0,50	1,544	1,117
<b>10</b>	0,500	0,50	2,216	1,247
<b>11</b>	0,500	0,50	1,88	0,919
<b>12</b>	0,500	0,50	1,88	1,150
<b>13</b>	0,424	0,248	1,88	0,891
<b>14</b>	0,575	0,752	1,88	1,114
<b>15</b>	0,500	0,50	1,88	1,185
<b>16</b>	0,500	0,50	1,88	1,141
<b>17</b>	0,500	0,50	1,88	1,183
<b>18</b>	0,500	0,50	1,88	1,173

\* meio base: água do concentrado de dessalinização abrandada (6,09 g.L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) diluída em água destilada (1:1), adicionada de (g.L<sup>-1</sup>): NaHCO<sub>3</sub>, 15,15; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 8,89; KNO<sub>3</sub>, 1,00; solução de micronutrientes (1 mL.L<sup>-1</sup>) e solução de Fe-EDTA (1 mL.L<sup>-1</sup>).

A Tabela 4 mostra a análise de variância dos coeficientes obtidos pela análise de regressão. Observa-se efeito significativo ( $p < 0,05$ ) dos 3 nutrientes avaliados, sendo que a concentração de  $K_2HPO_4$  apresentou apenas efeito linear, enquanto as concentrações de  $CO(NH_2)_2$  e  $Na_2SO_4$  apresentaram efeitos lineares e quadráticos na produção de biomassa de *A. platensis* cultivadas sob as condições estabelecidas. Não houve interação significativa entre os fatores. O modelo ajustado para a biomassa produzida ( $\hat{y}$ ) em função dos fatores significativos da Análise de Variância (ANOVA) está expresso na Equação 4:

$$\hat{y} = 1,18 + 0,13X_{1L} - 0,08X_{1Q} + 0,11X_{2L} - 0,10X_{2Q} + 0,12X_{3L} \text{ Equação (4)}$$

Onde  $\hat{y}$  é a biomassa produzida estimada de *A. platensis*;  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  são respectivamente as concentrações de  $Na_2SO_4$ ,  $CO(NH_2)_2$  e  $K_2HPO_4$ , L representa o efeito linear e Q representa o efeito quadrático.

A partir deste modelo, as concentrações ótimas dos nutrientes necessárias para a maior produção de biomassa de *A. platensis* na região experimental estudada, foram representadas em gráficos de superfície de resposta. Esse estudo auxilia na determinação dos valores de concentração de nutrientes onde ocorre a melhor resposta desejada: produção máxima de biomassa.

Tabela 4. Análise de variância dos valores de biomassa obtidos após os tratamentos aplicados

Fator	Soma de quadrados	GL	Quadrado médio	F	p
(1) Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (L)	0,056507	1	0,056507	21,77974	0,001609*
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Q)	0,018504	1	0,018504	7,13218	0,028335*
(2) CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (L)	0,038293	1	0,038293	14,75963	0,004934*
CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (Q)	0,030942	1	0,030942	11,92611	0,008651*
(3) K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (L)	0,052751	1	0,052751	20,33227	0,001978*
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Q)	0,002459	1	0,002459	0,94770	0,358817
(1) (L) / (2) (L)	0,001250	1	0,001250	0,48179	0,507262
(1) (L) / (3) (L)	0,002048	1	0,002048	0,78937	0,400214
(2) (L) / (3) (L)	0,001250	1	0,001250	0,48179	0,507262
Erro	0,020756	8	0,002594		
Total SS	0,226499	17			

Sendo: L = efeito linear; Q = efeito quadrático; GL = grau de liberdade.

\* = diferença significativa ( $p < 0,05$ )

A Figura 2 apresenta uma análise de superfície de resposta da produção de biomassa em função da concentração de  $K_2HPO_4$  e  $CO(NH_2)_2$ . Os gráficos A, B, C, D e E demonstram o efeito destes dois nutrientes sob quantidades crescentes de  $Na_2SO_4$ . Dessa forma houve um aumento da biomassa de 1,2 para 1,3  $g.L^{-1}$  de biomassa ao aumentar a concentração de  $Na_2SO_4$  de 1,544 (Figura 1A) para 1,68  $g.L^{-1}$  (Figura 1B). Concentrações acima de 1,68  $g.L^{-1}$  não causaram aumento de produção, uma vez que os valores máximos de biomassa se mantiveram em 1,3  $g.L^{-1}$  nos 3 níveis seguintes estudados (Figura 1 C – E).

A produção de biomassa foi diretamente proporcional a concentração de  $K_2HPO_4$ , evidenciando o efeito linear deste nutriente. Desta forma as maiores produções ocorreram sob a maior concentração de  $K_2HPO_4$  aplicada (0,752  $g.L^{-1}$ ).

A concentração ótima de  $CO(NH_2)_2$  para a resposta estudada situou-se próxima a 0,5  $g.L^{-1}$ , estando de acordo com os resultados obtidos por Danesi e colaboradores (2002). A queda na produção de biomassa observada a concentrações acima da ótima para este nutriente pode ser explicada devido a hidrólise em amônia quando  $CO(NH_2)_2$  encontra-se em meio alcalino. Apesar de ser a fonte preferencial de nitrogênio para esta microalga, a amônia apresenta efeito tóxico quando em concentrações acima de 0,6  $g.L^{-1}$  (DANESI et al., 2002; RANGEL-YAGUI et al., 2004).

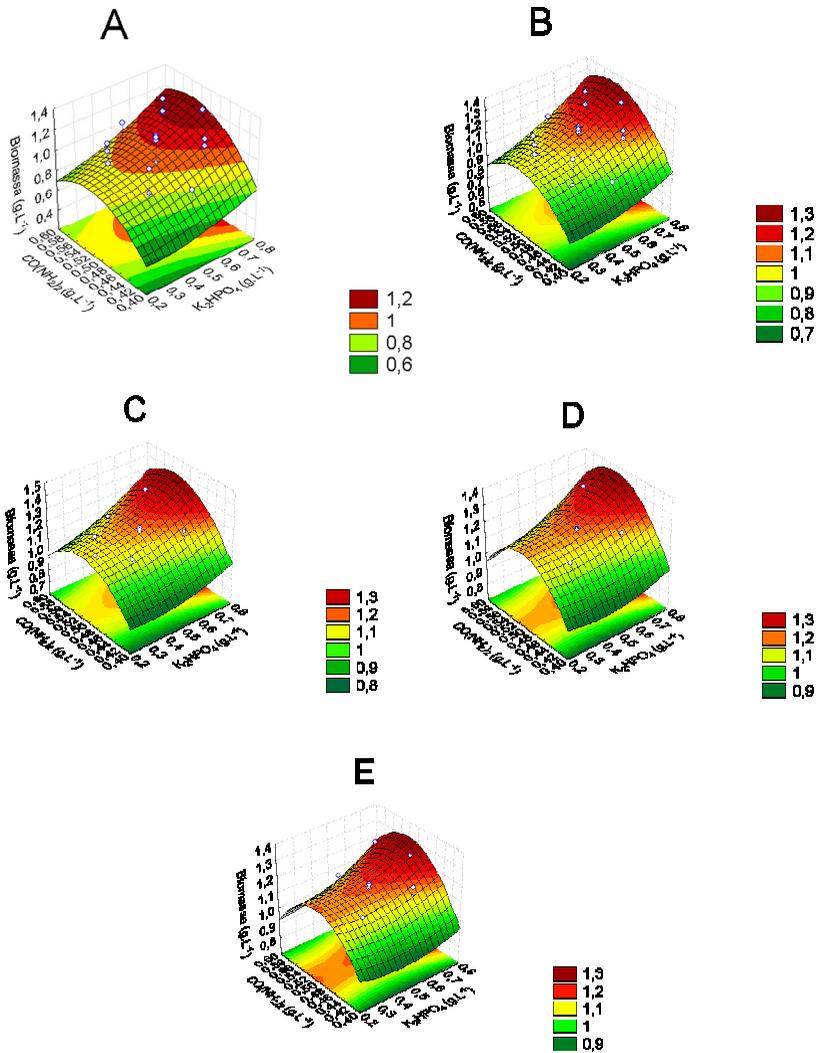


Figura 2: Análise de superfície de resposta da produção de biomassa de *A. platensis* em função da concentração de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (A = 1,544 g.L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; B = 1,68 g.L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; C = 1,88 g.L<sup>-1</sup>; D = 2,08 g.L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; E = 2,216 g.L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

A figura 3 apresenta os resultados da análise de superfície de resposta da produção de biomassa de *A. platensis* em função da concentração de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  no meio de cultura. A curva observada nos gráficos, em relação ao aumento da concentração de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , demonstrou a mesma situação observada na Figura 2. A produção aumenta nos primeiros níveis de concentração estudados (aproximadamente  $1,8 \text{ g.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$ ), permanecendo estacionada nos níveis conseguintes, evidenciado pela região plana dos gráficos da Figura 2.

Os diferentes níveis de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  estão representados nos gráficos da Figura 3 A – E. A cada nível de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  adicionado ao meio de cultura ocorre um aumento nos valores máximos de biomassa, apontadas na legenda de cada gráfico. Esse comportamento está de acordo com as curvas obtidas em relação ao aumento da concentração deste nutriente (Figuras 2 e 4), a produção de biomassa foi diretamente proporcional a concentração de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , caracterizando seu efeito linear.

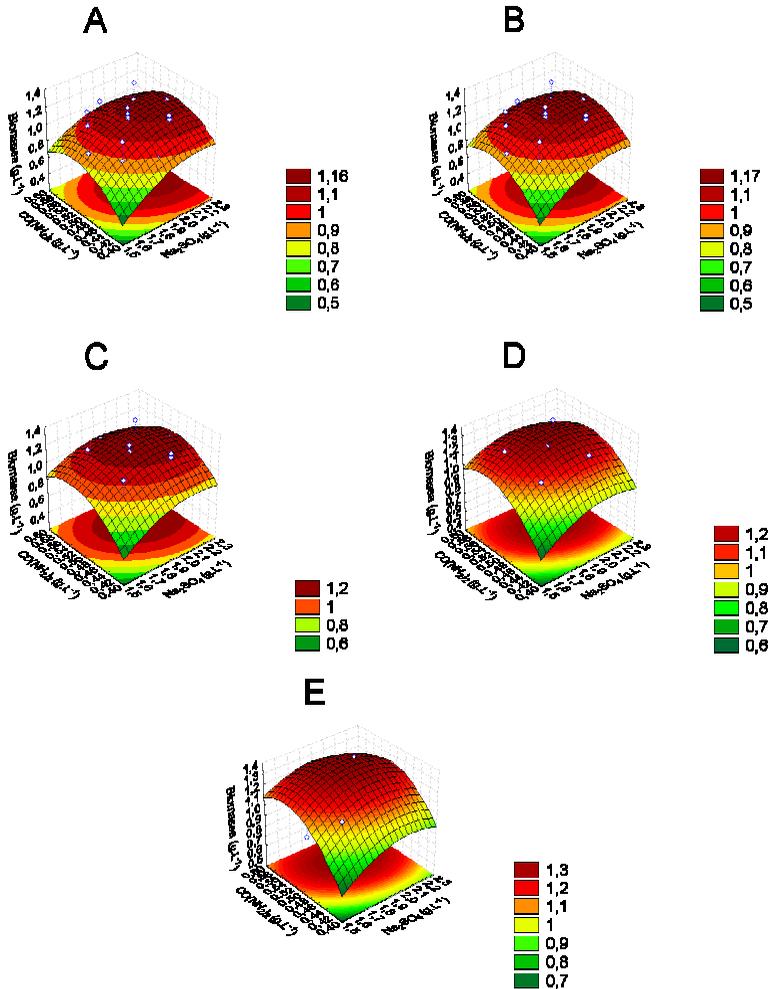


Figura 3: Análise de superfície de resposta da produção de biomassa de *A. platensis* em função da concentração de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  (A = 0,248 g.L<sup>-1</sup>  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; B = 0,350 g.L<sup>-1</sup>  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; C = 0,500 g.L<sup>-1</sup>  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , D = 0,650 g.L<sup>-1</sup>  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; E = 0,752 g.L<sup>-1</sup>  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).

A Figura 4 demonstra a análise de superfície de resposta da produção de biomassa de *A. platensis* em função da concentração de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  no meio de cultura. Os diferentes níveis de  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  estão representados pelos gráficos da Figura 3 A – E. Assim como a concentração ótima de  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  nas Figuras 1 e 2 manteve-se próxima a  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ , a Figura 3 também demonstra que até esta concentração os valores máximos de biomassa, representados na legenda de cada gráfico, aumentam (Figura 3 A – C). A partir desta concentração esses valores permanecem em  $1,3 \text{ g.L}^{-1}$  (Figura 3 C – E).

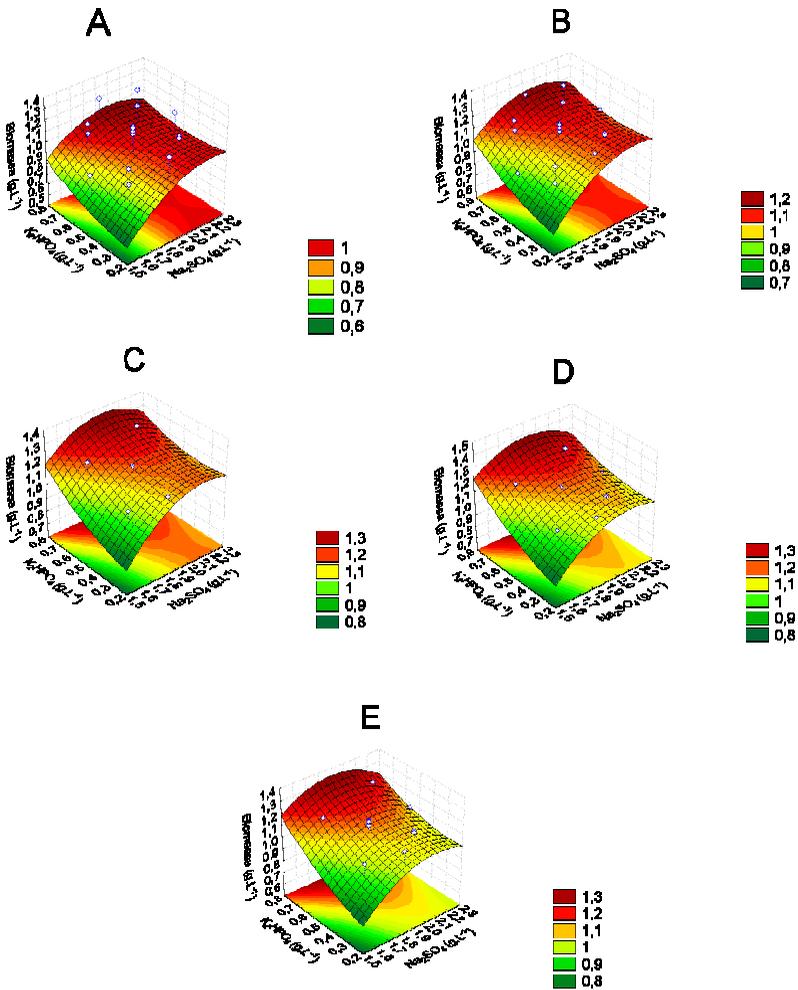


Figura 4: Análise de superfície de resposta da produção de biomassa de *A. platensis* em função da concentração de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (A = 0,424 g.L<sup>-1</sup> CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>; B = 0,455 g.L<sup>-1</sup> CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>; C = 0,5 g.L<sup>-1</sup> CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, D = 0,545 g.L<sup>-1</sup> CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>; E = 0,575 g.L<sup>-1</sup> CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>)

O estudo demonstrou que em relação ao  $K_2HPO_4$ , a região de produção máxima de biomassa ocorreu próxima a  $0,752 \text{ g.L}^{-1}$  em todas as situações avaliadas. Isso é devido ao efeito linear apresentado por esse nutriente na biomassa produzida. Como consequência deste efeito, as maiores concentrações de  $K_2HPO_4$  utilizadas estão relacionadas aos melhores resultados de obtenção de biomassa, supondo-se que resultados melhores sejam obtidos com concentrações ainda mais altas deste nutriente.

A concentração de  $CO(NH_2)_2$  que representou maior produção foi  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ . Esses resultados estão de acordo com os obtidos por DANESI e colaboradores (2002) e RANGEL-YAGUI e colaboradores (2004). Quedas bruscas de produção ocorreram a concentrações abaixo desta devido a escassez deste nutriente, e concentrações maiores mostraram-se situadas em uma região de menor curvatura dos gráficos onde se observa uma tendência a queda nos valores de biomassa produzida. A necessidade de manter esta concentração de  $CO(NH_2)_2$  está relacionada à toxicidade da amônia produzida por hidrólise da uréia no processo de cultivo. Seguindo RANGEL-YAGUI e colaboradores (2004), concentrações de  $CO(NH_2)_2$  acima de  $0,6 \text{ g.L}^{-1}$  causam o acúmulo de amônia a níveis tóxicos. No presente estudo detectou-se uma tendência de queda na produção de biomassa a valores abaixo deste, que pode ser decorrente do conteúdo de amônia existente no concentrado de dessalinização.

Quanto ao  $Na_2SO_4$ , as concentrações situadas na região de produtividade máxima foram próximas a  $1,8 \text{ g.L}^{-1}$ . Esta concentração é próxima à utilizada no meio Paoletti ( $1,88 \text{ g.L}^{-1}$ ), sendo que este estudo demonstrou que o aumento da concentração deste nutriente não resultou em maior produção de biomassa.

A análise de variância mostrou que os fatores estudados são independentes, por isso as concentrações ótimas estipuladas para cada nutriente permaneceram as mesmas independente da concentração dos demais nutrientes estudados.

#### 4. Conclusões

Para viabilizar a utilização do concentrado de dessalinização como base para um meio de cultura para *Arthrospira platensis* foi necessário o abrandamento do mesmo. O método de abrandamento

selecionado foi a adição de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), onde uma curva relacionando diferentes concentrações de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e de dureza total do resíduo definiu que a concentração de  $6,05 \text{ g.L}^{-1}$  deste composto reduziu a dureza total até o nível onde não ocorreu a precipitação dos nutrientes posteriormente adicionados.

As concentrações ótimas ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $0,752 \text{ g.L}^{-1}$ ;  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $1,8 \text{ g.L}^{-1}$  e  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ,  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) adicionadas ao meio de cultura a base de concentrado de dessalinização, obtêm-se a maior produção de biomassa de *A. platensis*, a partir de sob as condições estudadas. Estudos posteriores são necessários a fim de quantificar os nutrientes presentes no meio residual, para que seja possível reduzir as concentrações utilizadas, visando uma produção mais custo efetiva.

## 5. Referências bibliográficas

AGROPECUARIA, BRASILIA. Secretaria Nacional de Defesa; Lanara - métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes – XXIII: Água. Brasília: SNDA, 1981.

AL-HANDHALY, J. K.; MOHAMED A. M. O., MARAQA, M. Impact of land disposal of reject brine from desalination plants on soil and groundwater. **Desalination**, v. 182, n. 1-3, p. 411–433, 2005.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20ª ed. Washington, 1998

ANAGA, A.; ABU, G. O. A laboratory-scale cultivation of *Chlorella* and *Spirulina* using waste effluent from a fertilizer company in Nigeria. **Bioresource Technology**, v. 58, n. 1, p. 93–95, 1996.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, v. 264, n. 1–4, p. 130–134, 2007.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E. S.; OLIVEIRA, J. L. B. Revisão: Biotecnologia de microalgas. **Boletim CEPPA**, v. 26, n. 1, p. 9-20, 2008.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, n. 1-3, p. 313-321, 1999.

CHEN, T.; ZHENG, W.; WONG, Y.; YANG, F.; BAI, Y.  
Accumulation of selenium in mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 18, p. 2260–2265, 2006.

DANESI, E. D. J.; RANGEL-YAGUI, C. O.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, n.4, p. 261-269, 2002.

FERRAZ, C. A. M.; AQUARONE, E.; KRAUTER, M.,. Efeito da luz e do pH no crescimento de *Spirulina maxima*. **Revista de Microbiologia**, v. 16, p. 132-137, 1985.

FRITZMANN, C.; LÖWENBERG, J.; WINTGENS, T.; MELIN, T.  
State-of-the-art of reverse osmosis desalination. **Desalination**, v. 216, n. 1-3, p. 1–76, 2007.

MATSUDO, M. C. **Cultivo de *Spirulina platensis* por processo descontínuo alimentado repetitivo utilizando uréia como fonte de nitrogênio**. 2006. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MITCHELL, S. A.; RICHMOND, A. Optimization of a growth medium for *Spirulina* based on cattle waste. **Biological Wastes**, v. 25, n. 1, p. 41–50, 1988.

MOHAMED, A. M. O.; MARAQA, M.; AL-HANDHALY, J. Impact of land disposal of reject brine from desalination plants on soil and groundwater. **Desalination**, v. 182, n. 1-3, p. 411-433, 2005.

MONTGOMERY, D. **Design and analysis of experiments**. 3<sup>rd</sup> ed. New York: J. Wiley & Sons, 1991. 645 p.

NAWANI, N. N.; KAPADNIS, B. P. Optimization of chitinase production using statistics based experimental designs. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 651-660, 2005.

NICOT, J.; CHOWDHURY, A. H. Disposal of brackish water concentrate into depleted oil and gas fields: a texas study. **Desalination**, v. 181, n. 1-5, p. 61-74, 2005.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, p. 20, n. 4-6, p. 459-466, 2003

OLGUÍN, E. J.; GALICIA, S.; ANGULO-GUERRERO, O.; HERNÁNDEZ, E. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. (*Arthrospira*) grown on digested pig waste. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 1, p. 19-24. 2001

RANGEL-YAGUI, C. O.; DANESI, E. D. G.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92 n. 2, p. 133-141, 2004.

RAOOF, B.; KAUSHIK, B. D.; PRASANNA, R. Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, n. 6, p. 537-542, 2006.

RAVIZKY, A.; NADAV, N. Salt production by the evaporation of SWRO brine in Eilat: a success story. **Desalination**, v. 205, n. 1-3, p. 374-379, 2007.

STATSOFT, Inc., 2004. STATISTICA 7.0, Tulsa, OK, USA.

VOLKMANN, H.; IMIANOVSKY, U.; OLIVEIRA, J. L. B.; SANT'ANNA, E. S. Cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: protein content and amino-acid profile. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 98-101, 2008.

VONSHAK, A.; RICHMOND, A. Mass production of the blue-green alga *Spirulina*: An overview. **Biomass**, v. 15, n. 4, p. 233-247, 1988.



## APÊNDICE

APÊNDICE A – Perfil químico da amostra de concentrado de dessalinização utilizada como base para o meio de cultura ( $\text{mg.L}^{-1}$ ).

Determinação	Concentração
Bóro	1,95
Cloro	7742,0
Cobre	0,022
Dureza Total (mg CaCO <sub>3</sub> .L <sup>-1</sup> )	5361,0
Enxofre	< 0,02
Ferro	< 0,05
Fósforo	0,150
Magnésio	578,50
Manganês	0,028
Molibdênio	0,01
Nitratos	12,7
Nitritos	< 0,03
Potássio	8,4
Sulfatos	680,0
Sódio	3300,0
Zinco	0,02

Método analítico: APHA, 1998.