

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

FERNANDO CAIXETA LISBOA

VIABILIDADE TÉCNICA E ANÁLISE DE CUSTOS DE DIFERENTES MEIOS PARA
O CULTIVO DE *Arthrospira platensis*.

UBERABA

2014

Fernando Caixeta Lisboa

VIABILIDADE TÉCNICA E ANÁLISE DE CUSTOS DE DIFERENTES MEIOS PARA
O CULTIVO DE *Arthrospira platensis*.

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica
da Universidade Federal do Triângulo Mineiro,
como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Lúcia Helena Pelizer
Pasotto

Co-orientadora: Prof^ª. Dra. Mônica Hitomi Okura

Uberaba
2014

Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Lisboa, Fernando Caixeta
L75v Viabilidade técnica e análise de custos de diferentes meios para o cultivo de *Arthrospira platensis* / Fernando Caixeta Lisboa. -- 2015.
69 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2015
Orientadora: Profª Drª Lúcia Helena Pelizer Pasotto
Coorientadora: Profª Drª Mônica Hitomi Okura

1. Cianobactéria. 2. Meios de cultivo condicionados. 3. Estudos de viabilidade. 4. Análise de custos. I. Pasotto, Lúcia Helena Pelizer. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 561.232

FERNANDO CAIXETA LISBOA

VIABILIDADE TÉCNICA E ANÁLISE DE CUSTOS DE DIFERENTES MEIOS PARA
O CULTIVO DE *Arthrospira platensis*.

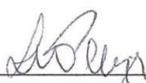
Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica
da Universidade Federal do Triângulo Mineiro,
como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Lúcia Helena Pelizer
Pasotto

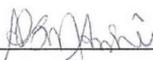
Co-orientador: Prof^ª. Dra. Mônica Hitomi Okura

Uberaba, 28 de Janeiro de 2014.

Banca Examinadora:



Prof^ª. Dra. Lúcia Helena Pelizer Pasotto- Orientadora
Universidade Federal do Triângulo Mineiro



Prof^ª. Dra. Ana Carolina Borella Marfil Anhô
Universidade Federal do Triângulo Mineiro



Prof^ª. Dr. Eloizio Júlio Ribeiro
Universidade Federal de Uberlândia

Dedico à minha mãe Maria de Fátima Caixeta e ao meu irmão
Fábio Caixeta Lisboa.

AGRADECIMENTOS.

À Deus pelo dom da vida e oportunidades. À minha mãe Maria de Fatima Caixeta, guerreira e pessoa pronta para ajudar. Ao meu irmão Fabio Caixeta Lisboa, pelo apoio. Ao restante da família pelo apoio incondicional aos desafios.

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro e ao programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos e crescer no degrau profissional com o título de Mestre.

À Professora Dra. Lúcia Helena Pelizer Pasotto pela orientação, dedicação, confiança, amizade, incentivo, paciência, aprendizado, acolhimento em sua casa e abdicação de suas atividades, família e afazeres durante este tempo de convivência. Por me apresentar o mundo que existe por traz do cultivo de algas e as possibilidades que advém a partir disso.

À professora Dra. Mônica Hitomi Okura pela orientação, dedicação, tempos de conversa em laboratório sobre o futuro, aprendizado e principalmente por não ter desistido de me ajudar.

Ao professor Dr. Marlei Pasotto pela orientação, dedicação, acolhimento em sua casa, ensinamentos de química e apoio nos momentos que precisei mesmo naqueles que talvez não fossem os mais apropriados.

Aos demais professores do Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica pelos ensinamentos muito úteis durante a confecção do trabalho.

Ao Ênio e ao Mateus técnicos administrativos que me ajudaram no desenvolvimento deste mestrado.

Aos alunos de Iniciação Científica: Luana, Evellin, Crislaine, Mareska, Gabriela, Camila e Bruno.

Aos colegas do Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica pela troca de experiências e alguns pelas caronas entre Uberlândia e Uberaba.

À Universidade Federal de Santa Catarina na pessoa do doutorando Ângelo que providenciou cepas do microrganismo para o trabalho.

Aos amigos pela incansável presença nas atividades da minha vida e por me apoiarem em momentos bons e ruins.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro – Campus Uberlândia pela liberação e compreensão do desenvolvimento das atividades para o desenvolvimento do mestrado.

À banca que aceitou a análise da minha dissertação tenho certeza que as contribuições advindas serão muito úteis para a concretização do sonho.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível”

Charles Chaplin

RESUMO

A cianobactéria *Arthrospira platensis* (*A. platensis*) é uma fonte rica em aminoácidos essenciais, possui alta concentração de vitaminas e pode ser utilizada como matéria-prima de fontes energéticas tal como biocombustíveis. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi analisar a viabilidade técnica e o levantar os custos de diferentes meios para o cultivo da microalga *A. platensis*. Para tanto, utilizou-se cepa de *A. platensis*, cedida pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O cultivo foi realizado em 9 dias de processo, temperatura de $\pm 30^{\circ}\text{C}$, em *shaker*, adaptado com iluminação artificial, com concentração inicial de 50 mg.L^{-1} no laboratório de bioprocessos, junto ao Programa de Mestrado Profissional da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). Foram utilizados três meios: T1 - meio padrão para o cultivo (PAOLETTI *et al.*, 1975), T2 - meio modificado para o cultivo (PAOLETTI *et al.*, 1975) sem microelementos e T3 - meio alternativo substituindo alguns elementos. Foram analisados o crescimento, a concentração máxima ($X_{\text{máx}}$), a produtividade (P_x), a velocidade específica máxima ($\mu_{\text{máx}}$) e levantou-se o custo inicial de investimento para a produção de 1 kg de biomassa pelos três tratamentos propostos. Os resultados foram analisados estatisticamente pela análise de variância, com teste Tukey ($p < 0,05$). Os crescimentos nos três meios se apresentaram fases características de um processo microbiano. O $X_{\text{máx}}$ variou entre $373,29 \pm 100,62 \text{ mg.L}^{-1}$ e $436,17 \pm 107,48 \text{ mg.L}^{-1}$, não apresentando diferença estatística entre os tratamentos. A P_x variou entre $40,39 \pm 12,57 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e $48,22 \pm 13,43 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, também não apresentando diferença estatística entre os tratamentos. $\mu_{\text{máx}}$ variou entre $0,2662 \text{ d}^{-1}$ e $0,3074 \text{ d}^{-1}$, também não apresentando diferença estatística entre os tratamentos. O custo inicial para a produção de 1kg de biomassa em T1 foi de R\$ 3.117,84, o custo em T2 foi de R\$ 2.667,04 representando um custo 14,46% menor que o valor de T1, o custo em T3 foi de R\$ 1.628,85, sendo o menor entre os três tratamentos analisados, representando um custo aproximadamente 47,76% menor que o T1 e 38,93% menor que o T2. De acordo com as condições experimentais em que foi realizado esta dissertação, pode-se concluir que o crescimento da microalga apresentou uma boa viabilidade técnica pois seguiu a normalidade de crescimento microbiano não apresentando diferença entre os tratamentos. Os parâmetros cinéticos e de produtividade foram satisfatórios não apresentando diferença entre os tratamentos e que o menor custo inicial de investimento foi do T3, tornando-se portanto o tratamento indicado para uso.

Palavras – Chave: *Arthrospira platensis*; Meio de cultivo; Viabilidade técnica; Custo inicial de investimentos.

ABSTRACT

The cyanobacteria *Arthrospira platensis* (*A. platensis*) is a rich source of essential amino acids, has a high concentration of vitamins and can be used as a feedstock for energy sources such as biofuels. In this sense, the aim of this study was to analyze the technical viability and raise the costs of different means for the cultivation of microalgae *A. platensis*. Therefore, we used strain of *A. platensis*, courtesy of the Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Cultures were grown in 9-day process, $\pm 30^\circ \text{C}$ temperature in shaker, fitted with artificial light, with initial concentration of 50 mg.L^{-1} in the bioprocess laboratory of Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM). Three means were used: T1 - middle standard for cultivation (PAOLETTI *et al.*, 1975), T2 - modified medium for cultivation without trace (PAOLETTI *et al.*, 1975) and T3 - alternative mean replacing some elements. Growth were analyzed, the maximum concentration (X_{max}), Productivity (Px), the maximum specific rate (μ_{max}) and rose the cost of production of 1 kg of biomass by the three proposed treatments. The results were statistically analyzed by analysis of variance with Tukey test ($p < 0.05$). The growth media of the three treatments presented a microbial process with characteristic phases. X_{max} ranged from $373.29 \pm 100.62 \text{ mg.L}^{-1}$ and $436.17 \pm 107.48 \text{ mg.L}^{-1}$, with no significant difference between treatments. The Px ranged from $40.39 \pm 12.57 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ and $48.22 \pm 13.43 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, and showed also no significant difference between treatments. The μ_{max} ranged from $0,2662 \text{ d}^{-1}$ and $0,3074 \text{ d}^{-1}$ and showed also no significant difference between treatments. The initial investment cost of T1 was R\$ 3,117.84, the initial cost of investment in T2 was R\$ 2,667.04 represents a cost 14.46% less than the value of T1. The cost in T3 was R\$ 1.628,85, the lowest among the three treatments analyzed, representing a cost about 47,76% less than the T1 and 38,93% lower than T2. According to the experimental conditions under which this thesis was researched, it can be concluded that the growth of microalgae showed good technical feasibility for microbial growth followed normality, showing no difference between the treatments. The kinetic parameters and productivity were satisfactory showing no difference between the treatments and the lower initial investment cost was T3, becoming therefore the treatment for use.

Key - Words: *Arthrospira platensis*; Culture medium; Technical viability; Cost of investments.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação do ciclo de vida do gênero <i>Arthrospira platensis</i>	26
Figura 2 – Foto do Shaker Utilizado.	37
Figura 3 – Curva de crescimento comparativo entre os três tratamentos analisados.	41
Figura 4 - Custo de Investimento inicial de comparação dos três tratamentos.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de aminoácidos de proteínas de <i>Spirulina platensis</i> e <i>Spirulina máxima</i> (mg.g ⁻¹ proteína bruta Nx6,25) em comparação com o recomendado pela FAO (<i>Food and Agricultural Organization</i>) para crianças pré-escolares.	25
Tabela 2 - Composição do meio de cultura mineral padrão (PAOLETTI et al., 1975).	35
Tabela 3 - Composição do meio de cultura mineral padrão (PAOLETTI et al., 1975) sem microelementos.	36
Tabela 4 - Composição do meio de cultura alternativo baseado no meio Paoletti (PAOLETTI et al., 1975).	36
Tabela 5 – Dados experimentais durante nove dias de cultivo.	42
Tabela 6 – Análise de custos para o meio Paoletti com microelementos (T1).	45
Tabela 7 – Análise de custos para o meio Paoletti sem microelementos (T2).	45
Tabela 8 – Análise de custos para o meio alternativo (T3).	46

LISTA DE ABREVIATURAS

A. *Platensis* – *Arthrospira platensis*.

ZEE – Zona Econômica Exclusiva.

pH – Potencial Hidrogeniônico.

FDA – *Food and drugs administration*.

FAO - *Food and Agricultural Organization*.

S. – *Spirulina*.

FBR - Fotobioreator.

Kt – Kilo Toneladas.

Ton – Toneladas.

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina.

T1 – Tratamento 1.

T2 – Tratamento 2.

T3 – Tratamento 3.

Px - Produtividade em células.

Xm - Concentração celular máxima obtida.

Xi - Concentração celular inicial.

Tc - Tempo de cultivo.

UV – Ultra Violeta.

v/v – Volume / volume.

g.L⁻¹ – Gramas . Litro⁻¹.

mg. L⁻¹.d⁻¹ – Miligramas. Litro⁻¹.dia⁻¹

mg.L⁻¹- Miligramas. Litro⁻¹

d⁻¹ – Dia⁻¹

LISTA DE SIGLAS

CO_2 – Dióxido de Carbono.

N – Nitrogênio.

P – Fósforo.

K – Potássio.

O_2 – Oxigênio.

NaCl – Cloreto de Sódio.

NaNO_3 – Nitrato de Sódio.

KNO_3 – Nitrato de Potássio.

Na_2SO_4 - Sulfato de Sódio.

K_2HPO_4 – Fosfato de Potássio.

Na_2CO_3 – Carbonato de Sódio.

NaHCO_3 – Bicarbonato de Sódio.

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – Cloreto de Cálcio.

KNO_3 – Nitrato de Potássio.

$\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – Sulfato de Magnésio.

Fe-EDTA – Ferro – Ácido etilenodiamino tetra-acético.

$\text{H}_3\text{BO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – Ácido Bórico.

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – Sulfato de Zinco.

NaMoO_4 – Molibidato de Sódio.

MnSO_4 – Sulfato de Manganês.

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – Sulfato de Cobre.

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – Cloreto de Cobalto.

LISTA DE SÍMBOLOS

α - Alfa.

β - Beta.

μm - Micrometros.

Px - Produtividade

$\mu_{\text{máx.}}$ - Velocidade máxima específica.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	19
3.1 ALGAS.....	19
3.1 MICROALGAS.....	19
3.1.1 Separação de biocompostos em microalgas	21
3.1.2 <i>Arthrospira platensis</i>	23
3.2 FOTOBIOREACTORES.....	26
3.2.1 Sistemas Abertos	27
3.2.2 Sistemas Fechados	27
3.3 MEIO DE CULTIVO	27
3.3.1 Efeitos das fontes de nutrientes	28
3.3.1.1 Efeitos do carbono.....	29
3.3.1.2 Efeitos do nitrogênio	30
3.4 ANÁLISE DE CUSTOS	32
3.4.1 Contabilidade e gerenciamento de custos.....	32
3.4.2 Nomenclaturas aplicadas ao custo.....	33
4 METODOLOGIA.....	35
4.1 MICRORGANISMO E CONDIÇÕES DE CULTIVO	35
4.1.1 Meio de Cultivo.....	35
4.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO	37
4.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS.....	38
4.3.1 Técnicas de acompanhamento do cultivo.....	38
4.3.1.1 Determinação da concentração celular.....	38
4.3.1.2 Construção da Curva de Calibração para determinação de concentração celular	38
4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	38

4.5 CÁLCULOS DOS PARÂMETROS CINÉTICOS	39
4.5.1 Produtividade em células.....	39
4.5.2 Velocidade específica de crescimento	39
4.6 ANÁLISE COMPARATIVA DE CUSTOS	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 CONCENTRAÇÃO MÁXIMA ($X_{m\acute{a}x}$)	42
5.2 PRODUTIVIDADE (P_x).....	43
5.3 VELOCIDADE ESPECÍFICA ($\mu_{m\acute{a}x}$)	44
5.4 ANÁLISE DE CUSTOS	44
5.5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	48
6 CONCLUSÃO.....	51
7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	52
APENDICE A – DADOS PARA A CONFECÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR.	64
APENDICE B – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO CELULAR.....	65
APÊNDICE C – RESULTADO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A CONCENTRAÇÃO MÁXIMA ($X_{m\acute{a}x}$), COM TESTE TUKEY ($P < 0,05$).....	68
APÊNDICE D – RESULTADO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A PRODUTIVIDADE (P_x), COM TESTE TUKEY ($P < 0,05$).....	69
APÊNDICE E – RESULTADO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A VELOCIDADE MÁXIMA ESPECÍFICA ($\mu_{m\acute{a}x}$), COM TESTE TUKEY ($P < 0,05$).....	70

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem grande potencial para o uso de suas fontes de água. Isto está relacionado à sua extensão costeira de mais de oito mil Km, à sua zona econômica exclusiva (ZEE) de 3,5 milhões de km² e à sua dimensão territorial que dispõe de, aproximadamente, 13% da água doce renovável do planeta (ROCHA *et al.*, 2013). Neste sentido, é preciso pensar em alternativas para o uso e ocupação deste potencial objetivando aumentar a produção, através de atividades que chamamos de aquicultura.

Atualmente, por definição a aquicultura é considerada uma atividade agroindustrial multidisciplinar, referente ao cultivo de diversos organismos aquáticos, incluídos neste contexto plantas aquáticas, moluscos, crustáceos e peixes e uma que vem ganhando destaque é o cultivo de algas (OLIVEIRA, 2009).

Algas são organismos simples que em sua maioria são aquáticas (OZKURT, 2009; DERMIBAS, 2010). Ao longo da sua evolução, as algas se tornaram um grupo muito diversificado de organismos fotossintéticos, sendo classificados em dois tipos principais: microalgas e macroalgas (FRANCESCHINI *et al.*, 2010).

É bem conhecido por várias décadas que diferentes espécies de algas podem produzir diferentes tipos de produtos (TOPARE *et al.*, 2012). O interesse em cultivar algas vem do valor que existe nos produtos extraídos delas, conferindo-as um alto valor comercial.

Para a alimentação humana, as algas representam uma das mais promissoras fontes de compostos com atividades biológicas que podem ser usadas como ingredientes funcionais (MARCO *et al.*, 2014). O seu uso é estimulado para aumentar o valor nutricional de alimentos por serem fontes de pigmentos, gordura insaturada, vitaminas, esteróis dentre outros (BATISTA, 2012).

Algas tem recebido considerável interesse como potencial matéria-prima para a produção de biocombustíveis, atendendo assim, a um apelo mercadológico pela diminuição da emissão de gases poluentes e pelo uso de fontes energéticas renováveis. A grande vantagem para isso é que elas se adaptam facilmente às condições ambientais de cultivo, alta eficiência fotossintética e não são competidores em áreas produtoras de alimentos (ZHU *et al.*, 2014). Além disso, elas podem produzir grandes quantidades de polissacarídeos (açúcar) e triglicerídeos (óleo), que são materiais para a produção de bioetanol e biodiesel (SLADE; BAUEN, 2013).

Na produção nacional de algas, empresas que começaram a produzir biocompostos de algas afirmam que a falta de investimentos em tecnologia para a produção e de preço competitivo acabam impedindo o avanço de projetos de produção em larga escala (BARROS, 2013).

Proposições devem ser feitas na tentativa de abaixar o custo de produção e viabilizar sua produção. Novos fotobiorreatores, novos meios de cultivo e o uso de meios de cultivo provenientes de resíduos devem ser estimulados para este fim. É preciso atentar para o custo de produção que através de uma análise detalhada pode ofertar informação sobre qual componente está impactando mais.

Raof *et al.* (2006) destacam que o meio de cultivo constitui parte significativa dos custos de produção, ressaltando a viabilidade econômica da implantação de meios de cultura com a utilização de fertilizantes comerciais. Vários estudos demonstram o potencial de meios alternativos em produzir biomassa de *A. platensis* com eficiência similar a dos meios sintéticos.

Neste sentido este projeto tem por objetivo propor um meio de cultivo alternativo baseado no meio Paoletti (1975), almejando o cultivo da *A. platensis*, analisando o custo para a produção de 1 Kg de biomassa, contribuindo assim, com o desenvolvimento econômico e tecnológico de sua produção e comercialização.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a viabilidade técnica e o levantamento dos custos para a produção de 1 kg de biomassa para os três diferentes meios para o cultivo da microalga *Arthrospira platensis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

São objetivos específicos deste trabalho:

- Analisar o cultivo de *A. platensis* em três meios de cultivo: meio Paoletti, meio Paoletti sem microelementos e meio alternativo;
- Avaliar a velocidade específica de crescimento e produtividade deste cultivo diante das condições propostas;
- Levantar e comparar os custos inicial de investimento dos meios utilizados para este cultivo;

3 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

Para melhor compreensão do estudo, esse item aborda o levantamento teórico dos tópicos analisados.

3.1 ALGAS

O termo alga é rotineiramente usado para indicar uma gama variada de organismos, que podem crescer com o uso de O₂ envolvidos, microrganismos fotossintéticos e com variadas cores relacionadas com o tipo de pigmento (BARSANTI; GUALTIERRI, 2014).

A habilidade de sobreviver sob diferentes condições e resistir a condições extremas físico-químicas fizeram as algas as pioneiras na colonização de novos ambientes (RAJFUR *et al.*, 2012).

Em condições favoráveis as algas crescem com muita rapidez e podem acumular acima de 50% de lipídeos em peso. Existem milhares de espécies de algas na natureza – de algas microscópicas chamadas de microalgas até algas macroscópicas chamadas de macroalgas. As espécies de algas conhecidas no mundo incluem por volta de 55.000 espécies que vivem em ambiente marinho, salobro, água doce e espécies de algas terrestres. Esta lista é constantemente atualizada com novas espécies (KOREIVIENE; KASPEROVICIENTE, 2011).

Ambas macro e microalgas tem sido utilizadas como fonte de alimentos para uma grande variedade de espécies, focada principalmente nas espécies invertebradas (DANTAGNAN *et al.*, 2009).

O uso de algas como alimento e remédio é profundamente enraizado na história humana. No Egito antigo e ainda hoje, fazendeiros costumavam coletar algas que flutuavam na superfície dos lagos para alimentar pássaros e outros animais (AMARA; STEINBUCHER, 2013).

3.1 MICROALGAS

O cultivo de microalgas é um ramo da moderna biotecnologia, embora haja registros de seu cultivo já em 1890. A produção comercial iniciou-se na década de 1960, no Japão, com a microalga *Chlorella*. Desde então, a indústria biotecnológica de microalgas tem se expandido

e diversificado significativamente (BOROWITZA, 1999).

As microalgas são organismos autotróficos que se desenvolvem a partir do processo de fotossíntese, assim como plantas. Fotossíntese é reconhecido como um meio natural de sequestro de CO₂ e as microalgas aquáticas são os mais velozes organismos fotossintéticos que podem fixar carbono em um índice moderado comparado com plantas terrestres. Microalgas também tem a capacidade de utilizar CO₂ livre, íons carbonato e bicarbonato como substratos de crescimento (MARTIS *et al.*, 2013).

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 *Xantophyceae*), *Cryptophyta* e *Dinophyta* (OLAIZOLA, 2003; PULZ; GROSS, 2004; DERNER *et al.*, 2006).

Elas são consideradas como tendo alta eficiência energética, crescem rapidamente com necessidades nutricionais baixas e, portanto, são superiores para a produção de biomassa em comparação com as plantas terrestres (COSTA; MORAES, 2011; MARKOU, 2012).

Esses microrganismos apresentam requisitos simples para seu desenvolvimento (luz, açúcares, CO₂, N, P, K), podem crescer em diversos habitats e em temperaturas extremas com diversas variações no pH (BRENAN; OWENDE, 2010; SOUZA *et al.*, 2012). O armazenamento químico de energia é principalmente carboidratos, proteínas e lipídeos. A composição da biomassa algal é afetada fortemente pelo ambiente e os fatores de cultivo e estes são possíveis de serem manipulados (LI *et al.*, 2008).

A composição dos seus pigmentos e a sua quantidade pré-determinam a cor das células. A divisão-celular – processo sobre o qual a célula divide em duas ou mais células filhas – é um importante ciclo celular de uma alga multicelular ou uma alga monocelular (RASLAVICIUS *et al.*, 2014).

O interesse pelo uso de microalgas surge, em uma primeira instância como uma fonte proteica não convencional, tanto para a alimentação humana quanto como ração animal. A espécie *Arthrospira platensis* da família Oscillatoriaceae compreende o grupo de cianobactéria filamentosa multicelular (microalgas verde-azuladas), formada por células cilíndricas arranjadas em tricomas helicoidais (XU *et al.*, 2010; HARUN *et al.*, 2010).

A vantagem principal para o uso de microalgas para a produção de biocombustíveis (comparado com biocombustíveis de primeira e segunda geração) são que não contribuem para a diminuição de florestas ou excessivo consumo de água e não competem com terras que possam ser usadas para a produção de alimentos (COSTA; MORAIS, 2011). As microalgas

apresentam maior eficiência em produtividade lipídica (algumas espécies podendo alcançar até 80% do peso seco em óleo), em comparação às plantas oleaginosas, reproduzem-se rapidamente e, requerem menor área de cultivo, requerem menos água, podem ser cultivadas em água não potável, além de serem CO₂ neutras e sequestrarem CO₂ pré-existente (SINGH; GU, 2010).

Neste sentido, o cultivo de microalgas para a produção de biodiesel mostra-se vantajoso em várias perspectivas, tais como, o rápido crescimento desses microrganismos que, devido à característica de microscopia, não implica em grandes extensões para sua cultura; o intenso consumo de CO₂; e a composição celular ricamente oleaginosa. Além disso, vale salientar que este modelo de cultivo não gera efeitos sobre a indústria alimentícia, pois não suscita concorrência pelos terrenos cultiváveis (MEDEIROS *et al.*, 2013).

Podem ser observados o uso da biomassa para a produção de: (1) biossíntese de etanol e hidrogênio por fermentação usando algas, (2) biossíntese de carboidrato (produzindo bioetanol e biobutanol via acetona-butanol e fermentação de etanol), hidrocarbonetos (que podem ser levados para a produção de diesel, querosene, dentre outros) e a própria produção de triacilglicerídeos para a produção de biodiesel (RASLAVICIUS *et al.*, 2014).

Dentre as várias técnicas utilizadas, é preciso atentar-se as formas de separação de biocompostos, uma vez que este é um gargalo da produção de algas.

3.1.1 Separação de biocompostos em microalgas

Na produção de biomassa das microalgas, a etapa de separação das mesmas é considerada mais difícil e cara em comparação aos cultivos de plantas oleaginosas. A extração de lipídeos a partir da biomassa algal apresenta desafios que não foram encontrados anteriormente com os grãos oleaginosos (HU *et al.*, 2008). No caso das microalgas, não são bem compreendidas as relações entre a extração dos lipídeos, a associação desses com estruturas celulares e o rompimento das mesmas. A maioria dos métodos de extração atual está enfrentando desafios com os altos custos associados com a remoção de água e as dificuldades de romper as estruturas celulares para tornar os lipídeos suficientemente acessíveis (CHEN *et al.*, 2009).

A maioria das análises econômicas publicadas extrapola os procedimentos de extração de óleo de sementes para biomassa algal. Sementes requerem muito menos pré-tratamento ou processamento e os óleos (principalmente triglicerídeos) são extraídos por prensagem da semente ou usando um solvente apolar para extrair os triglicerídeos. Devido a grandes

diferenças entre as propriedades da biomassa de algas e de sementes e na composição dos óleos, procedimentos específicos deverão ser desenvolvidos, aplicados e custeados para um processo de produção de algas (WILLIAMS; LAURENS, 2010).

Vários métodos podem ser usados para romper as células antes ou durante a extração, dependendo da célula das microalgas e da natureza do produto a ser obtido. Entre estes métodos citam-se: ação mecânica (homogeneização, trituração, ultrassom (sonicação), micro-ondas, autoclave e atomização), química (solventes orgânicos, choque osmótico, ácido e alcalino) e enzimática (reações enzimáticas) (DUSTAN et al., 1992; LEE; YOON; OH, 1998; CHEN et al., 2009; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). No entanto, o método mais eficiente para microalgas ainda não foi bem definido (LEE *et al.*, 2010). As extrações assistidas por ultrassom e por microondas são reconhecidas como técnicas eficientes de extração, pois reduzem drasticamente o tempo de realização desta, aumentando o rendimento e, muitas vezes, a qualidade do extrato (CRAVOTTO; CINTAS, 2007).

Lee *et al.* (2010) testaram diferentes métodos (autoclave, “*bead-beating*”, microondas, sonicação e solução NaCl 10 %) para identificar o mais eficiente no rompimento das células de *Botryococcus sp.*, *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus sp.* O conteúdo lipídico das três espécies foram 5,4-11,9; 7,9-8,1; 10,0-28,6; 6,1-8,8 e 6,8-10,9 g L⁻¹ quando usando autoclave, “*bead-beating*”, micro-ondas, ultrassom e solução de NaCl 10 %, respectivamente. Dos métodos aplicados nas três microalgas a extração por micro-ondas mostrou-se mais eficiente em produtividade lipídica, seguido de homogeneização, sonicação, choque osmótico e autoclave. Os autores citam que resultados semelhantes pelo método de extração lipídica por micro-ondas foram obtidos com óleos vegetais e gorduras animais. Ainda, o método por micro-ondas mostrou-se simples, rápido e eficiente quando testado em microalgas e comprovado em outras matrizes oleicas.

Grima *et al.* (1996) relataram que a extração direta de ácidos graxos a partir da biomassa úmida de *Phaeodactylum tricornutum* com etanol 96 % produziu rendimento ligeiramente inferior (90 %) aos obtidos a partir da biomassa liofilizada (96 %), tornando a secagem dispensável para a redução dos custos da extração. Entre os métodos utilizados para secagem da biomassa de microalgas como *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Spirulina* incluem atomização (*spray-drying*), secagem por tambor (*drum-drying*), liofilização (*freeze-drying*) e secagem ao sol (RICHMOND, 2004).

O conteúdo de lipídeos da biomassa microalgal pode variar entre 1 a 40 % do peso seco e, em certas condições de cultivo, pode alcançar até 85 %. Os lipídeos algais são tipicamente compostos por glicerol, açúcares ou bases esterificadas e ácidos graxos contendo entre 12 e 22 carbonos, podendo ser tanto saturados quanto mono ou poli-insaturados (BECKER, 2004).

Markou (2012) pesquisou a alteração da composição de biomassa da *Arthrospira platensis* sobre várias quantidades de limitação de fósforo. Foi observado que a alteração da composição da biomassa ocorreu gradualmente a medida que o fósforo foi se tornando limitado. Carboidratos e lipídeos aumentaram sua quantidade de 9% para 65% e de 4,9% para 7,5% respectivamente, enquanto as proteínas decresceram em média de 46,5% para 25% a medida que a quantidade de fósforo se tornou limitada.

Arthrospira platensis é a principal microalga produzida comercialmente, sendo utilizado inúmeros motivos elencados no tópico a seguir (LODI *et al.*, 2005).

3.1.2 *Arthrospira platensis*

O gênero *Arthrospira* da família *Oscillatoriaceae* compreende o grupo de cianobactéria filamentosa multicelular (microalgas verde-azuladas), formada por células cilíndricas arranjadas em tricomas helicoidais (HENRIKSON, 1989).

Possui células cilíndricas com diâmetro de 3 – 12 µm, 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 as concentrações 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 espécie humana aprendeu cedo como usar a *Arthrospira* como uma fonte de alimentação, através da observação da migração dos pássaros que se alimentavam com segurança deste alimento (AMARA; STEINBUCHER, 2013). Kebede (1997) reportou que na Etiópia fazendeiros e pastores que viviam próximos aos lagos alcalinos faziam a ração do gado misturado com água com *Arthrospira* mensalmente. Eles acreditavam que tinha efeito

terapêutico e era um complemento na alimentação diária.

A *Arthrospita platensis* parece ser capaz de adaptar-se em certos ambientes onde outros microrganismos não sobreviveriam, como em meios com alta concentração salina. Através da fotossíntese, converte nutrientes em material celular e produz oxigênio. Os nutrientes necessários são: água e fonte de carbono, nitrogênio, fósforo, potássio, ferro e outros minerais (HENRIKSON, 1989).

Além de uma fonte rica em aminoácidos essenciais e alta concentração de vitaminas, as microalgas são vetores para produção de agentes bioativos que possam ter aplicação na área médica, compostos com características bioquímicas específicas, e compostos de fontes energéticas tal como biodiesel, biometano, hidrogênio e biobutanol, biometanol (XU *et al.*, 2010; HARUN *et al.*, 2010). No entanto, o isolamento e o uso desses compostos bioativos provenientes do cultivo de microalgas ainda carecem de pesquisas propondo o seu uso em outros sistemas.

A microalga *A. platensis* é legalmente autorizada como complemento alimentar na Europa, Japão e Estados Unidos pelo FDA (*Food and Drug Administration*), sem efeitos tóxicos ao organismo (VON DER WEID *et al.*, 2000; BELAY *et al.*, 1993). No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) permite sua comercialização desde que o produto final no qual a microalga tenha sido adicionada esteja devidamente registrado (BRASIL, 2009). Certas características da *A. platensis* sugerem aplicações clínicas, sendo que muitos testes revelaram os efeitos terapêuticos dessa microalga em pacientes acometidos de diversas doenças, tais como, aids, desnutrição, dentre outras (RICHMOND, 1990).

A produção comercial da microalga *A. platensis*, um saudável alimento, tem crescido em todo mundo (ALAVA, 1997), um dos motivos é que ela é considerada um alimento funcional. Os alimentos funcionais se caracterizam por oferecer vários benefícios à saúde, além do valor nutritivo inerente à sua composição química, podendo desempenhar um papel potencialmente benéfico na redução do risco de doenças crônicas degenerativas (TAIPINA *et al.*, 2002; NEUMANN *et al.*, 2000).

O consumo de *A. platensis* traz benefícios a saúde humana devido a sua composição química, incluindo compostos como aminoácidos essenciais, vitaminas (especialmente B12), pigmentos naturais (como carotenoides), xantofilas, ficobilinas e clorofila) e ácidos graxos essenciais, particularmente ácido α – linolênico, um precursor das prostaglandinas do corpo (SASSANO, 2004).

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).

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

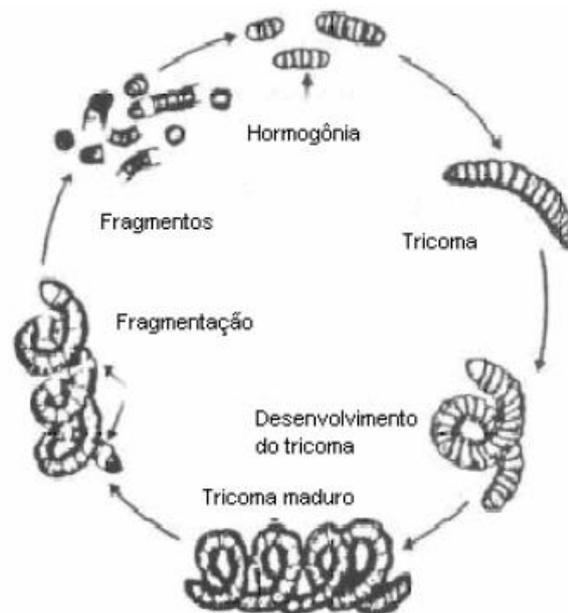
Tabela 1 - Composição de aminoácidos de proteínas de *Spirulina platensis* e *Spirulina maxima* (mg.g⁻¹ proteína bruta Nx6,25) em comparação com o recomendado pela FAO (*Food and Agricultural Organization*) para crianças pré-escolares.

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

Fonte: DILLON *et al.*, 1995.

O ciclo de vida de *Arthrospira* está representado na Figura 1. 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 granuloso 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 1 – Representação do ciclo de vida do gênero *Arthrospira platensis*.



Fonte: (CIFERRI, 1983)

3.2 FOTOBIOREATORES

Desenvolver e construir um fotobioreator (FBR) para o propósito de produção é necessário para o desenvolvimento do crescimento de microalgas em menor escala (por exemplo, em escala de laboratório ou em uma planta piloto de produção). A escala de um FBR deve incluir a influência dos vários fatores no crescimento do microrganismo e no produto final que é necessário. Os dados recolhidos em laboratório devem ser utilizados para a proposição de escalonamento do reator (NIIZAWA *et al.*, 2014).

Vários são os sistemas utilizados para a produção do cultivo de algas em larga escala: sistemas abertos, como os *raceways*, e sistemas fechados, como os reatores tubulares. Trabalhos prévios indicam que a produtividade de um FBR depende da tecnologia empregada, do seu design, a espécie de alga e a produtividade no local onde será desenvolvido e quanto a isso, ainda há um grande espaço para evolução (NORSKER *et al.*, 2011).

3.2.1 Sistemas Abertos

FBR do tipo *raceways* tem sido intensivamente desenvolvido desde da décadas de 1950 para prover escala industrial para a cultura de microalgas. Atualmente, combinada com o escalonamento e com os métodos de cultivo, eles são considerados o meio mais adequado de produção industrial da cultura de microalgas. Este reatores popularmente tem baixo custo inicial quando comparadas com outras tecnologias, como reatores tubulares, o que requisita mais estrutura e equipamentos (PAWLOWSKI *et al.*, 2014).

3.2.2 Sistemas Fechados

FBR tubulares são vantajosos para o escalonamento e para altas taxas de crescimento de biomassa em alga. Esse sistema consiste de um arranjo de tubos transparentes horizontais retos que são colocados cuidadosamente perto um do outro, sendo chamado de Horizontal, ou verticalmente colocado, chamado neste caso de vertical (SLEGERS *et al.*, 2013).

3.3 MEIO DE CULTIVO

O atual interesse em expansão do uso industrial de microrganismos está levando a uma atenção maior para o meio de cultivo utilizado. Por uma questão de rentabilidade e proteção ambiental, é essencial que sejam ofertados nutrientes necessários para assegurar a otimização do cultivo dos organismos, ou maximizar a produtividade, com um custo mínimo. Para isso é preciso ter entendimento de qual ou quais nutrientes os microrganismos requerem e em alguns casos que eles não necessitam (COGNE *et al.*, 2003)

O crescimento de *A. platensis* e a composição da biomassa produzida depende de muitos fatores, os mais importantes são temperatura, luz e principalmente a quantidade de nutrientes disponíveis. Produzir esta microalga com custo reduzido é necessário quando considerada a produção em larga escala para objetivos industriais. O custo dos nutrientes é considerado a

segunda maior influência no custo da produção biomassa da referida cianobactéria (MADJOUR *et al.*, 2012).

O principal nutriente requerido pelo cultivo de *A. platensis* é o carbono, pois suas células contém aproximadamente 50% (v/v) deste elemento. Embora seja o mais importante também se configura como o elemento mais caro. Para um crescimento autotrófico (o qual é mais recomendado para o cultivo aberto em larga escala) o carbono pode ser provido a produção como CO₂, carbonato ou bicarbonato. Se for utilizado bicarbonato este representará cerca de 60% dos custos dos nutrientes (ALAVA *et al.*, 1997).

Atualmente, a produção comercial de *A. platensis* é orientada para um mercado de alimento saudável utilizando um meio químico definido (BELAY; OTA, 1993). O primeiro meio sintético formulado para o cultivo de *A. platensis* foi o meio Zarrouk (1966), que é usado como meio padrão. A partir disso, diferentes meios foram testados para o cultivo de *A. platensis* como o meio *Revised* (RAOOF *et al.*, 2006), meio CRTIR (VENKATARAMAN *et al.*, 1995), meio Bangladesh (KHATUM *et al.*, 1994), meio Rao, meio OFERR (SINGH, 2006) e por fim o meio PAOLETTI (PAOLETTI *et al.*, 1975).

Muitos produtores usam para o crescimento da microalga o meio projetado por Zarrouk (1966) com bicarbonato de sódio como uma fonte de carbono o que corresponde a pelo menos 60% dos custos com nutrientes. A alga assimila durante o seu crescimento CO₂ proveniente do meio de cultivo recobrando assim, a fonte de carbono e eliminando a necessidade de adicionar este composto (ALAVA *et al.*, 1997).

Existe uma falta de informação de como a mudança de componentes de meio de cultivo influencia a síntese de compostos e afetando significante o valor comercial, nutritivo, e terapêutico no produto final a ser gerado (TARKO *et al.*, 2012).

3.3.1 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).

3.3.1.1 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 nucleicos, 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 CO₂ usado 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 *et al.*, 2006) constituindo uma estratégia viável para produções em larga escala.

Segundo Laliberté *et al.* (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 g.L⁻¹, alguns trabalhos demonstram que a utilização de 3 a 4 g.L⁻¹ é suficiente.

O dióxido de carbono é a fonte principal 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 CO₂ 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 CO₂ de 0,44 g.L⁻¹.d⁻¹ conferiu valores máximos de produção de *A. platensis*. (SOLETTO *et al.*, 2008).

O melão, resíduo da produção de açúcar de cana, é utilizado na produção de álcool e

vinagre e como alimento animal. 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 *et al.* (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 *et al.* (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 *et al.* (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 *et al.* (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*.

3.3.1.2 Efeitos do nitrogênio

O nitrogênio é componente fundamental de três classes de substâncias estruturais e do metabolismo primário das células: proteínas, ácidos nucleicos 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 (LOURENÇO, 2006).

Apesar da ampla utilização dos sais de nitrato, estudos mostram uma variedade de fontes alternativas de nitrogênio. Os sais de nitrato (NaNO_3 , 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 *et al.* (2007), mantendo-se o cultivo a 30°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 *et al.* (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.

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 *et al.* (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).

Soletto *et al.* (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 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).

3.4 ANÁLISE DE CUSTOS

O objetivo principal das empresas é a maximização do lucro e, sendo assim, a análise de viabilidade do projeto passa a ter um papel fundamental na tomada de decisão do investidor, que poderá estimar as vantagens e desvantagens futuras, não tendo assim, surpresas desagradáveis no decorrer da vida útil do empreendimento. A busca de informações com maior grau de certeza faz com que se utilizem novas ferramentas para analisar as informações disponíveis (GITMAN, 2003).

O funcionamento de qualquer empreendimento no mercado exige a aquisição (ou aplicação) de recursos mais variados, pelos quais se deve pagar em troca da sua utilização produtiva. Os pagamentos por estes recursos – utilizados dentro de condições determinadas e distintamente, conforme o tipo de cada um – configuram-se como custo da empresa (FILHO, 2009).

Martins (2003) define custos como sendo o gasto relativo ao bem ou serviço utilizado na produção de outros bens ou serviços. Exemplos: matéria-prima, energia elétrica, máquinas, etc. Assim, para acionar certo processo de produção, são necessários por exemplo, o local de instalação, edifícios, infra-estrutura (luz, água, telefone, escritório), máquinas e equipamentos, o trabalho humano e os insumos necessários à produção dos produtos. Além desses recursos relacionados à estrutura administrativa (de produção, da administração geral, de vendas, de marketing, dentre outros).

3.4.1 Contabilidade e gerenciamento de custos

Até o século XIX as relações empresariais eram somente externas e os níveis gerenciais eram apenas superficiais (VIANA, 2005). Foi no evento da Revolução Industrial, com a implantação do capitalismo como sistema econômico mundial, que se iniciou a ideia de contabilidade de custos. Naquele tempo se verificava os custos e as vendas para controlar o

crescimento de uma empresa, assim como avaliar se o negócio resultava em lucro ou prejuízo (SANTOS, 2011).

Desde aquela época foram várias evoluções e adaptações sofridas por essa contabilidade para se chegar ao modelo predominante na atualidade. O grande avanço feito pela literatura contábil de custos foi a partir de meados do século XX, uma vez que os administradores passaram a demandar um conhecimento mais específico para melhorar o gerenciamento das empresas (SANTOS, 2011). Sua primeira função foi apenas de registrar os custos, dando ao administrador informações para avaliar estoques e determinar os resultados e balanços (LEONE, 1991).

Com o passar dos anos, as indústrias foram exigindo da contabilidade de custos uma quantidade cada vez maior de técnicas qualificadas para determinar as ações tomadas pela administração. Com o aperfeiçoamento dessas técnicas a contabilidade de custos aliou-se ao gerenciamento de custos. A partir daquele momento, além de registrar e contabilizar todos os custos de uma empresa, a contabilidade de custos iria influenciar no gerenciamento feito pela administração, fornecendo instrumentos e fatores para gestão da tomada de decisões, formação de preços, determinação dos lucros, levantamento de montante para investimento, etc (LEONE, 1991).

O gerenciamento de custos em uma empresa possui dois objetivos principais: gerencial, para controle interno; e fiscal ou societária, para atender as exigências da legislação sobre as contribuições sociais (PEREZ JUNIOR *et al.*, 2010).

No âmbito do controle interno de uma entidade, gerir custos está relacionado com a apuração de informações dos custos de um produto e analisar suas relações com preço de venda e taxa de lucro (SANTOS, 2011). Certo de que vivemos em um mundo capitalista, sem lucro uma empresa não consegue sobreviver. Assim, o empresário precisa, com rapidez instantânea, ter consciência do resultado do seu negócio, pois caso seja um resultado negativo, quanto mais rápido for tomada uma providência, menor serão os danos causados à empresa (SANTOS, 2011).

3.4.2 Nomenclaturas aplicadas ao custo

Para a aplicação correta dos custos nas empresas, devemos conhecer várias nomenclaturas empregadas em sua aplicabilidade, tais como: Custo Direto, Custo Indireto, Desembolso, Perdas e Despesas.

Para um nivelamento sobre a terminologia empregada nesta dissertação, serão apresentadas a seguir as definições para os termos utilizados na contabilidade de custos, de acordo com Bornia (2002):

- Gasto: é o valor dos insumos adquiridos pela empresa, independente de terem sido utilizados ou não;
- Custo: é o valor dos insumos adquiridos pela empresa e efetivamente utilizados na fabricação dos produtos.
- Desembolso: é o pagamento resultante da aquisição dos insumos, que pode ocorrer em período diferente do gasto;
- Despesa: é o valor dos insumos utilizados pela empresa e não identificados com a fabricação e sim com a administração geral da empresa. Normalmente se divide em administrativa, comercial e financeira;
- Investimento: é o valor dos insumos adquiridos pela empresa e não utilizados no período, mas que poderão ser empregados em períodos futuros.

4 METODOLOGIA

4.1 MICRORGANISMO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Foi utilizada a cianobactéria *Arthrospira platensis*, classificada como *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Nordstead) por Gomont (SILVA *et al.*, 1996), cedida pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4.1.1 Meio de Cultivo

Foi proposta a análise de três meios de cultivo: um meio padrão (PAOLETTI *et al.*, 1975); um meio padrão modificado (PAOLETTI *et al.*, 1975), sem microelementos; e por fim um meio com substâncias alternativas.

O meio mineral padrão utilizado foi o Paoletti (PAOLETTI *et al.*, 1975), cuja composição está contida na tabela 2.

Tabela 2 - Composição do meio de cultura mineral padrão (PAOLETTI *et al.*, 1975).

Componentes	g.L ⁻¹
NaCl	0,92
Na ₂ SO ₄	1,88
K ₂ HPO ₄	0,50
Na ₂ CO ₃	8,89
NaHCO ₃	15,15
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05
KNO ₃	2,57
MgSO ₄ .4H ₂ O	0,25
Solução de Fe-EDTA	1,00
Solução de microelementos*#	1,00

*Quantidades em mL. L⁻¹.

solução de microelementos constituída de: H₃BO₃.4H₂O (2,86g.L⁻¹); ZnSO₄.7 H₂O (0,222g.L⁻¹); NaMoO₄.2 H₂O (0,390g.L⁻¹); MnSO₄ (1,543g.L⁻¹); CuSO₄.5 H₂O (0,079g.L⁻¹); CoCl₂.6 H₂O (0.038g.L⁻¹).

O meio mineral padrão modificado foi o Paoletti (PAOLETTI *et al.*, 1975) sem microelementos, cuja composição está contida na tabela 3:

Tabela 3 - Composição do meio de cultura mineral padrão (PAOLETTI *et al.*, 1975) sem microelementos.

Componentes	g.L⁻¹
NaCl	0,92
Na ₂ SO ₄	1,88
K ₂ HPO ₄	0,50
Na ₂ CO ₃	8,89
NaHCO ₃	15,15
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05
KNO ₃	2,57
MgSO ₄ .4H ₂ O	0,25
Solução de Fe-EDTA	1,00

*Quantidades em mL. L⁻¹.

O meio alternativo foi proposto baseado no meio mineral padrão Paoletti (PAOLETTI *et al.*, 1975), substituindo os seguintes elementos:

- NaCl por Sal Comercial da marca Cisne®.
- NaHCO₃ por Bicarbonato de Sódio comercial da marca Kitano ®.
- KNO₃ por nitrato duplo de sódio e potássio vendido comercialmente como Salitre da marca Vitaplan ® – Fórmula 15-00-14.

A composição completa deste meio está contida na tabela 4:

Tabela 4 - Composição do meio de cultura alternativo baseado no meio Paoletti (PAOLETTI *et al.*, 1975).

Componentes	g.L⁻¹
Sal Comercial da marca Cisne ®	0,92
Na ₂ SO ₄	1,88
K ₂ HPO ₄	0,50
Na ₂ CO ₃	8,89

Bicarbonato da marca Kitano ®	15,15
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05
Nitrato duplo de sódio e potássio da marca Vitaplan ® – Fórmula 15-00-14)	2,57
MgSO ₄ .4H ₂ O	0,25
Solução de Fe-EDTA	1,00

*Quantidades em mL. L⁻¹.

4.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

O inóculo foi preparado em erlemeyer de 250 ml. O cultivo foi realizado de acordo com critérios estabelecidos em estudos anteriores: 8 dias de processo, temperatura $\pm 30^{\circ}\text{C}$, utilizando *shaker* Marq Labor CFW 08- adaptado com luz com iluminação artificial, conforme pode ser visualizado na figura 2. A concentração inicial de inóculo foi de 50 mg.L⁻¹ (PELIZER *et al.*, 1999 e PELIZER *et al.*, 2003).

Figura 2 – *Shaker* marca Marq Labor CFW 08.



Fonte: O Autor, 2014.

4.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS

Os experimentos foram acompanhados por técnicas analíticas descritas a seguir:

4.3.1 Técnicas de acompanhamento do cultivo

4.3.1.1 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada diariamente por turbidimetria, a 560 nm (LEDUY; THERIEN, 1977). Os valores de absorvância obtidos no espectrofotômetro marca Biospectro SP-22, foram convertidas em concentração celular através de uma curva de calibração.

4.3.1.2 Construção da Curva de Calibração para determinação de concentração celular

A curva de calibração foi obtida tomando-se um volume de 25 mL da solução concentrada de células em fase exponencial, com o auxílio de um béquer previamente seco a 70° C por 12 h, e previamente pesado. A amostra foi levada a estufa a 100 – 105°C por um período de 5 horas, suficiente para que mantivesse uma massa constante. A massa das células foi calculada por diferença dos valores das massas dos béqueres antes e depois da filtração. A partir desta solução, foram preparadas diferentes diluições, e alíquotas dessas diluições foram levadas ao espectrofotômetro para leitura da absorvância a 560 nm de comprimento de onda e caminho óptico de 1cm, com água destilada em branco. Obteve-se, dessa forma, uma curva que relaciona concentração celular com o logaritmo de absorvância.

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental foi delineamento inteiramente casualizado (D.I.C), utilizando um esquema fatorial de 3x4, sendo 3 tratamentos denominados aqui T1 (meio padrão), T2 (Meio padrão sem microelementos) e T3 (Meio alternativo), com 4 repetições.

O estudo estatístico das variáveis concentração máxima celular ($X_{máx}$), produtividade (P_x), velocidade específica de crescimento ($\mu_{máx}$) foi realizado pela técnica de análise de variância (ANOVA).

A comparação entre os diferentes tratamentos fixando-se o dia de amostragem foi conduzida utilizando-se o teste Tukey, considerando-se também um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) (NORMAN; STREINER, 1994).

4.5 CÁLCULOS DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

4.5.1 Produtividade em células

$$P_x = \frac{(X_m - X_i)}{T_c}$$

(Equação 1)

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

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

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

T_c = Tempo de cultivo.

4.5.2 Velocidade específica de crescimento

A equação mais simples para descrever o crescimento microbiano é a equação de Monod, que assume a presença de substrato como limitante para o crescimento. A cinética de Monod está representada na equação a seguir:

$$\ln\left(\frac{C_x}{C_{x_0}}\right) = \mu_{max} \cdot t$$

(Equação 2)

Onde: $\mu_{\text{máx}}$ = Velocidade específica máxima;

μ = Velocidade específica de crescimento;

C_x = Concentração celular (mg.L^{-1});

C_{x_0} = Concentração celular inicial (mg.L^{-1});

4.6 ANÁLISE COMPARATIVA DE CUSTOS

Para a análise de custos do meio de cultivo utilizado na produção da biomassa da *A. platensis* nos processos descritos neste trabalho é necessário descrever todos os elementos que compõem os três meios propostos (KALK; LANGLYKKE, 1986).

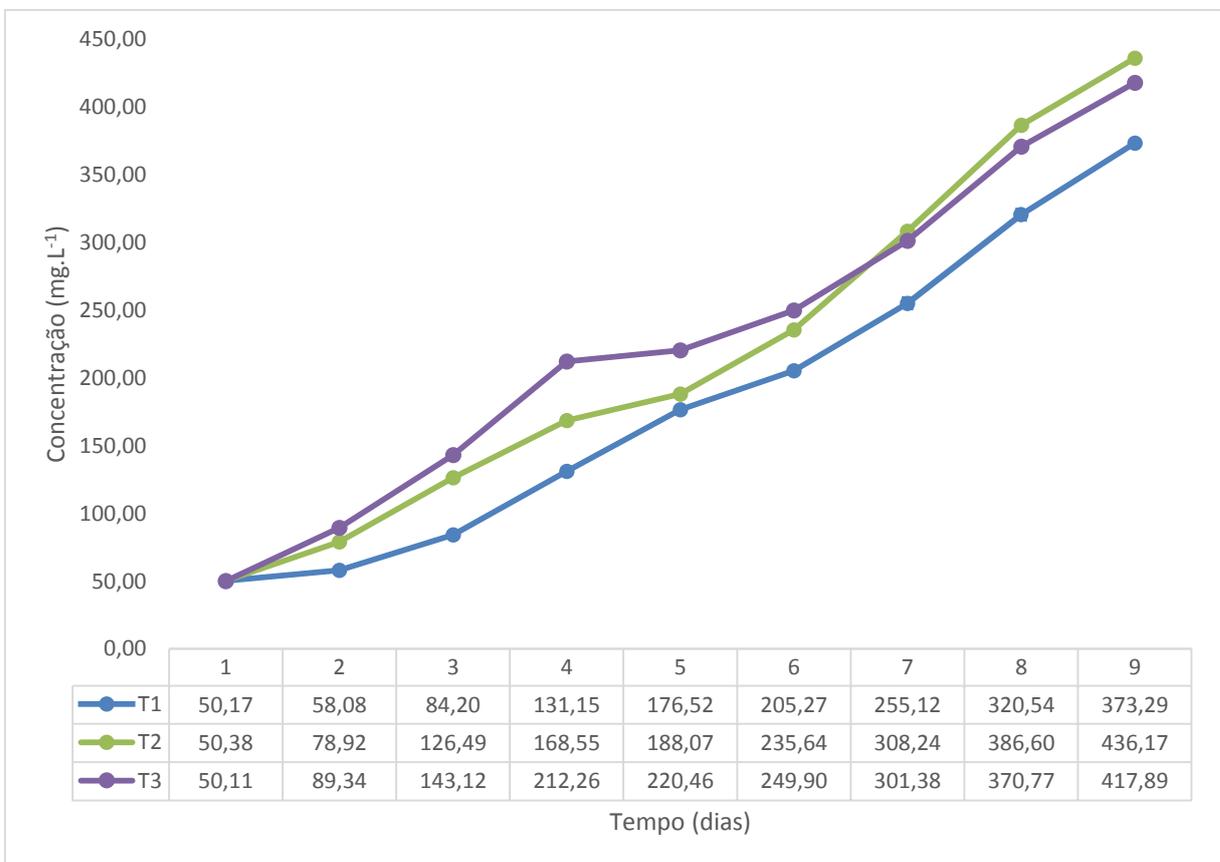
Os custos iniciais de investimento dos reagentes foram determinados através do levantamento diretamente com os fornecedores. Em seguida foram calculados quantos litros de meio seriam necessários para a produção de 1 kg de biomassa nos três tratamentos. O custo dos reagentes, foram então, calculados para os valores encontrados para esta produção. Estes valores estão sujeitos a variações, sendo considerado valores atuais.

Foram excluídas da análise o custo da mão-de-obra, o custo energético, o custo com água e demais custos variáveis, pois entende-se que estes custos seriam similares em todos os meios analisados. Restando unicamente uma comparação com os custo efetivo dos elementos que compõem os meios.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos valores obtidos através da equação de regressão contida no APÊNDICE A e os valores da concentração celular ao longo dos dias que podem ser observadas no APÊNDICE B, traçou-se os resultados experimentais de crescimento para os três tratamentos analisados que podem ser observados na figura 3.

Figura 3 – Curva de crescimento comparativo entre os três tratamentos analisados.



Fonte: O autor.

De acordo com os resultados expostos na figura 3, é possível verificar que os três tratamentos analisados iniciaram-se com concentração de 50 mg.L⁻¹. O T1 manteve-se em crescimento culminando em concentração final ($X_{máx}$) e neste caso concentração máxima de 373,29 mg. L⁻¹. O T2 apresentou crescimento constante até culminar em concentração final e neste caso concentração máxima de 436,17 mg.L⁻¹. E o T3 apresentou crescimento constante culminando em concentração final ($X_{máx}$) e neste caso concentração máxima de 417,89 mg. L⁻¹.

Pode-se verificar que os crescimentos analisados de ambos tratamentos apresentaram fases características de um processo microbiano, ou seja, uma fase de adaptação lag depois uma fase exponencial log e nestes dias de análise não obteve-se a fase estacionária.

Observa-se que no primeiro dia de análise o T1 foi o tratamento que apresentou menor produção, isso pode ser devido ao maior número de assimilação de componentes do meio e numericamente ao final do cultivo, apresentou a menor concentração máxima. Observa-se que o T2 manteve-se em ascensão desde o primeiro dia de cultivo apresentando a partir do sétimo dia o maior crescimento entre os tratamentos analisados. Observa-se que o T3 manteve-se em crescimento sendo o primeiro em produção de biomassa até o oitavo dia de análise.

Thirumala (2012) pesquisou o crescimento de biomassa de *A. platensis* usando oito diferentes meios de cultura de diferentes combinações de água do lago Lonar, N, P e K e meio ZARROUK sob diferentes períodos de incubação. Como resultado, obteve-se que o meio denominado II cresceu no 9º dia de incubação e o meio III cresceu no 15º dia de incubação e que 12 dias era a média geral de incubação.

Os demais resultados experimentais e análise estatística de concentração Máxima ($X_{m\acute{a}x}$), Produtividade (P_x) e Velocidade Específica ($\mu_{m\acute{a}x}$) podem ser visualizados na tabela 5.

Tabela 5 – Dados experimentais durante nove dias de cultivo.

Tratamentos	$X_{m\acute{a}x}$ (mg . L ⁻¹)	P_x (mg. L ⁻¹ . d ⁻¹)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (d ⁻¹)
T1	373,29 ± 100,62 ^{a*}	40,39 ± 12,57 ^a	0,27 com R ² = 0,977 ^a
T2	436,17 ± 107,48 ^a	48,22 ± 13,43 ^a	0,30 com R ² = 0,928 ^a
T3	417,88 ± 113,72 ^a	45,97 ± 14,21 ^a	0,31 com R ² = 0,805 ^a

* Letras diferentes indicam diferenças significantes entre os tratamentos analisados pelo teste ANOVA, com análise Tukey ($p < 0,05$).

5.1 CONCENTRAÇÃO MÁXIMA ($X_{m\acute{a}x}$)

Como observado na tabela 5, a concentração máxima em T1 foi de 373,29 ± 100,62 mg. L⁻¹, para o T2 o resultado foi 436,17 ± 107,48 mg. L⁻¹ e para o T3 foi de 417,88 ± 113,72 mg. L⁻¹. Embora numericamente o resultado de T2 tenha sido maior, a análise estatística ANOVA, teste Tukey ($p < 0,05$) demonstrou que os três tratamentos resultaram em quantidade estatisticamente iguais. A análise estatística completa pode ser visualizada no APÊNDICE C.

Resultados semelhantes foram encontrados por vários autores. Kaushik *et al.* (2006) que cultivaram a *A. platensis* em diferentes diluições de efluentes provenientes de atividades industriais. Após 14 dias de cultivo obtiveram valores de concentração máxima de crescimento variando entre 460 mg.L⁻¹ a 1230 mg. L⁻¹.

Ao cultivar *A. platensis* em um meio de cultivo de baixo custo, Madkour *et al.* (2012) encontraram valores máximos de concentração ($X_{m\acute{a}x}$) entre $591 \pm 0,018$ mg. L⁻¹ e $813 \pm 0,018$ mg. L⁻¹ para diferentes concentrações de nitrato de amônia. E para diferentes concentrações de uréia foram encontrados resultados da ordem de $360 \pm 0,003$ mg. L⁻¹ e $640 \pm 0,006$ mg. L⁻¹. Pandey *et al.* (2010) em sua pesquisa cultivando *A. platensis* em meio Zarrouk por 20 dias encontraram valores de concentração máxima ($X_{m\acute{a}x}$) de $390 \pm 0,020$ mg. L⁻¹.

Lodi *et al.* (2005) realizaram um estudo preliminar de tentativa de remover glicose, acetato e proprionato, selecionados como modelos de poluentes orgânicos, pelo uso do cultivo mixotrófico de *A. platensis* em batelada. Como resultado obtiveram que as culturas sob condições de 30°C, 2,0 klux de intensidade luminosa mostram uma concentração final de biomassa 40% maior que o alternativo 12 horas com luminosidade, 12 horas sem luminosidade.

5.2 PRODUTIVIDADE (Px)

Conforme observado na tabela 5, a produtividade no T1 foi de $40,39 \pm 12,57$ mg. L⁻¹.d⁻¹, no T2 foi de $48,22 \pm 13,43$ mg. L⁻¹.d⁻¹ e no T3 foi de $45,97 \pm 14,21$ mg. L⁻¹.d⁻¹. Os resultados também foram expressos em % de mg. dia⁻¹, para o T1 a produtividade foi de 80% mg. L⁻¹.d⁻¹, para o T2 foi de 96,4% mg. L⁻¹.d⁻¹ e o T3 foi de 91,9% mg. L⁻¹.d⁻¹.

Os resultados indicam que não há influencia entre os tratamentos utilizados na produtividade pois, embora numericamente o resultado de T2 tenha sido maior, a análise estatística de Variância Tukey ($p < 0,05$) demonstrou que os três tratamentos foram estatisticamente iguais. A análise estatística completa pode ser visualizada no APÊNDICE D.

Resultados semelhantes foram encontrados por Jitendra *et al.* (2012). Estes autores cultivaram *A. platensis* em diferentes meios de cultivo por 14 dias. Como resultados de

produtividade obtiveram entre 60 % e 90% em mg.L^{-1} . Para o estudo de Madkour *et al.* (2012) foram encontrados resultados entre de $16 \pm 0,0005 \text{ mg. L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e $52 \pm 0,0005 \text{ mg. L}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

5.3 VELOCIDADE ESPECÍFICA ($\mu_{\text{máx}}$)

Como observado na tabela 3, a velocidade específica para o T1 foi de $0,27 \text{ d}^{-1}$ com $R^2=0,977$, para o T2 foi de $0,30 \text{ d}^{-1}$ com $R^2=0,928$ e para o T3 foi de $0,31 \text{ d}^{-1}$ com $R^2=0,805$. Estatisticamente os resultados de velocidade específica foram estatisticamente iguais ao nível de 5%. A análise estatística completa pode ser visualizada no APÊNDICE E.

Valores semelhantes foram observados por Borges *et al.* (2013) que encontraram os valores entre $0,324 \text{ d}^{-1}$ e $0,354 \text{ d}^{-1}$. Estes autores objetivaram avaliar os parâmetros cinéticos, composição e o conteúdo de ácidos graxos proveniente da *Spirulina* sp. LEB-18 cultivada em Meio Zarrouk (NaHCO_3 $16,8 \text{ g.L}^{-1}$) em meio Zarrouk com a adição de 20% (v/v) de efluente com reduzida concentração de NaHCO_3 ($5,3$ e $2,8 \text{ g.L}^{-1}$).

Soletto *et al.* (2008) estudaram o comportamento da *A. platensis* em diferentes modos de cultivo, variando o dióxido de carbono presente e a densidade de luz do experimento. Como resultado para Velocidade específica máxima ($\mu_{\text{máx}}$) encontraram valores entre $0,19 \text{ d}^{-1}$ e $0,59 \text{ d}^{-1}$, valores portanto semelhantes aos encontrados neste trabalho.

Para o estudo Madkour *et al.* (2012) foram encontrados valores de velocidade máxima específica entre $0,096 \pm 0,006 \text{ d}^{-1}$ e $0,233 \pm 0,016 \text{ d}^{-1}$ para os tratamentos que variaram nitrato de amônia e de $0,099 \pm 0,007 \text{ d}^{-1}$ e $0,225 \pm 0,020 \text{ d}^{-1}$ e o controle foi de $0,321 \pm 0,010 \text{ d}^{-1}$.

5.4 ANÁLISE DE CUSTOS

Para a determinação do custo para 1 Kg de biomassa, procedeu-se primeiramente ao cálculo de litros de meio necessário para a produção.

Para o cálculo de custo por litro temos que para o T1 o custo é R\$ 1,16, o custo para T2 é de R\$ 1,16 e para o T3 é de R\$ 0,68. Para fazermos 1 Kg para cada meio necessitaremos para o T1 de 2.679 litros, para o T2 de 2.293 litros e para o T3 de 2.393 litros.

Sendo assim, o custo para a produção de 1 Kg de biomassa para o T1 pode ser observado

na tabela 6.

Tabela 6 – Análise de custos para o meio Paoletti com microelementos (T1).

Componentes	Custo para 1 Kg de biomassa	% Participação
NaCl	R\$ 4,44	0,14%
Na ₂ SO ₄	R\$ 340,25	10,91%
K ₂ HPO ₄	R\$ 132,77	4,26%
Na ₂ CO ₃	R\$ 857,35	27,50%
NaHCO ₃	R\$ 1.405,26	45,07%
CaCl ₂ .2H ₂ O	R\$ 5,05	0,16%
KNO ₃	R\$ 110,16	3,53%
MgSO ₄ .4H ₂ O	R\$ 40,18	1,29%
Solução de Fe-EDTA	R\$ 220,85	7,08%
Solução de microelementos para 1 L		
H ₃ BO ₃ .4H ₂ O	R\$ 10,00	-
ZnSO ₄	R\$ 19,51	-
NaMoO ₄ .2 H ₂ O	R\$ 87,85	-
MnSO ₄	R\$ 16,76	-
CuSO ₄ .5 H ₂ O	R\$ 9,42	-
CoCl ₂ .6 H ₂ O	R\$ 300,00	-
Custos de Microelementos para 1 ml	R\$ 1,54	0,05%
Total Custo inicial	R\$ 3.117,84	

Como pode ser visto na tabela 6 o custo para a produção de 1 Kg de biomassa de T1 foi de R\$ 3.117,84 e os itens que mais oneram o investimento são o NaHCO₃ (45,07%) seguido pelo Na₂CO₃ (27,5%) e Na₂SO₄ (10,91%).

A análise do custo inicial de investimento para o T2 pode ser observada na tabela 7.

Tabela 7 – Análise de custos para o meio Paoletti sem microelementos (T2).

Componentes	Custo para 1 Kg de biomassa	% Participação
NaCl	R\$ 3,80	0,14 %
Na ₂ SO ₄	R\$ 291,20	10,92 %
K ₂ HPO ₄	R\$ 113,63	4,26 %
Na ₂ CO ₃	R\$ 733,75	27,51 %
NaHCO ₃	R\$ 1.202,67	45,09 %
CaCl ₂ .2H ₂ O	R\$ 4,32	0,16 %
KNO ₃	R\$ 94,28	3,53 %
MgSO ₄ .4H ₂ O	R\$ 34,39	1,29 %
Solução de Fe-EDTA	R\$ 189,01	7,09 %
Total Custo inicial	R\$ 2.667,04	

Como pode ser visto na tabela 7 o custo de investimento para a produção de 1 kg de biomassa em T2 é de R\$ 2667,04 e os itens que mais oneram o investimento são o NaHCO₃ (45,09%), seguido por Na₂CO₃ (27,51%) e por Na₂SO₄ (10,92%).

A análise do custo inicial de investimento para o T3 pode ser observada na tabela 8.

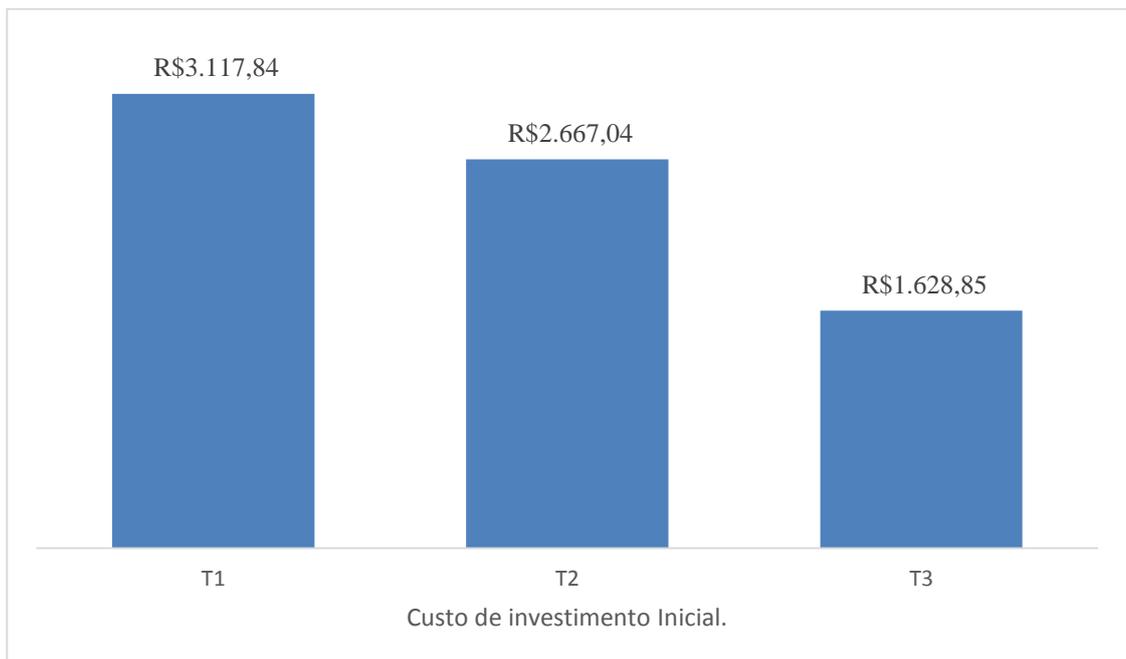
Tabela 8 – Análise de custos para o meio alternativo (T3).

Componentes	Custo para 1 Kg de biomassa	% Participação
NaCl	R\$ 3,96	0,24 %
Na ₂ SO ₄	R\$ 303,94	18,66 %
K ₂ HPO ₄	R\$ 118,60	7,28 %
Na ₂ CO ₃	R\$ 765,85	47,02 %
NaHCO ₃	R\$ 100,42	6,17 %
CaCl ₂ .2H ₂ O	R\$ 4,51	0,28 %
KNO ₃	R\$ 98,40	6,04 %
MgSO ₄ .4H ₂ O	R\$ 35,89	2,20 %
Solução de Fe-EDTA	R\$ 197,28	12,11 %
Total Custo inicial	R\$ 1.628,85	

Como pode ser visto na tabela 8, o custo de investimento para a produção de 1 kg de biomassa de T3 é de R\$ 1.628,85 e os itens que mais oneram o investimento são o Na_2CO_3 (47,02%), seguido por Na_2SO_4 (18,66%) e por Solução de Fe-EDTA (12,11%).

O gráfico que mostra a comparação do custo de investimento dos três tratamentos pode ser visualizado na figura 4.

Figura 4 - Custo de Investimento inicial de comparação dos três tratamentos.



Fonte: O autor.

Como pode ser observado na figura 4 o maior custo de análise é do T1 (R\$ 3.117,84). Dos itens destacados que mais oneram o custo inicial de investimento para a produção de 1kg de biomassa está o NaHCO_3 que foi teve a sua substituição realizada no T3.

O custo para a produção de 1 kg de biomassa em T2 (R\$ 2.667,04) representa um custo 14,46% menor que o valor de T1, ainda assim representa um custo aproximado de 38,9% maior que T3. O elemento que mais onera o custo deste tratamento, NaHCO_3 (47,02%), foi substituído pelo Bicarbonato de Sódio comercial em T3.

O custo para a produção de 1kg de biomassa em T3 (R\$ 1.628,85) foi o menor entre os três tratamentos analisados. Visto que os custos que alguns dos custos que mais oneraram os demais tratamentos foram suprimidos ou substituídos em T3. Este tratamento representa um custo aproximadamente 47,79% menor que o T1 e 38,93% menor que o T2. Alguns autores também

propuseram o uso de meios alternativos para o cultivo desta cianobactéria.

Para aplicação de microalgas em biocombustível, o total de biomassa que é comercialmente produzida é muito pequena comparada com as necessidades requeridas para a produção. A produção de biomassa comercialmente viável hoje é de apenas 5 Kt/ ano com uma produção de custo de US\$ 25.000 / ton (PULZ; GROS, 2004). Entretanto, para ocupar apenas 5% da demanda de biocombustível de um país como os Estados Unidos seriam necessários uma produção de mais de 66.000 Kt/ ano de biomassa rica em óleo a um custo menor que US\$ 400 / t (CHISTI, 2007). Analisando o mercado Europeu para atender a toda malha de transporte com biodiesel de microalgas, seria necessário um cultivo de 9,25 milhões de hectares, resultando em uma produção de 40.000 litros / Hectares. Dia (WIJFFLES; BARBOSA, 2010).

Norsker *et al.* (2011) calcularam o custo da produção de biomassa algal, em escala comercial, para três diferentes sistemas de produção: fotobiorreator aberto, fotobiorreator tubular horizontal e fotobiorreatores em painel. Como resultados chegaram que os fatores importantes foram as condições de irradiação, mistura, sistema fotossintético eficiente, o meio o custo do dióxido de carbono. Otimizando estes fatores a biomassa algal se apresenta como uma fonte promissora em custos para biocombustíveis.

Acien *et al.* (2012) realizaram uma análise de custos para a produção real da produção de biomassa microalgal da microalga *Scenedesmus almeriensis* em fotobiorreator tubular operado por 2 anos. A análise econômica demonstrou que a produção em si e a depreciação foram os principais ofensores do custo. Também chegaram à conclusão que a simplificação da tecnologia utilizada e os testes de escalonamento poderiam aumentar a produtividade e diminuir os custos de produção.

Madkour *et al.* (2012) estudaram um meio de cultivo de baixo custo para a produção em larga escala de *A. platensis*. Para tanto, o meio alternativo proposto continha fosfato simples, bicarbonato de sódio comercial, cloreto de potássio e sal de cozinha. Além disso, foram testadas quatro concentrações de nitrogênio provenientes de nitrato de amônia ou ureia. Os resultados indicaram que o novo meio de cultura preparado pode ser usado como um possível substituinte do meio de cultivo ZARROUK para a produção desta microalga em larga escala.

5.5 DISCUSSÃO

Um dos pré-requisitos para o uso eficiente e econômico das microalgas é ter um alto grau de conversão do seu cultivo em biomassa (RASLAVICIUS *et al.*, 2014). Neste sentido os

resultados contidos neste trabalho são demonstrações suficientes de que houve um cultivo eficiente visto que, partindo-se de uma concentração inicial de 50 mg.L^{-1} , chegou-se a concentrações de $373,29 \pm 100,62$ para o T1, $436,17 \pm 107,48$ para o T2 e $417,88 \pm 113,72$ para o T3. Se formos contabilizar a quantidade de vezes em que se multiplicou o valor inicial chegaríamos a fatores próximos a quase 9 vezes o seu tamanho inicial.

Os resultados indicam que o uso de microelementos é dispensável na produção de *A. platensis* uma vez que o meio que utilizava estes elementos (T1) apresentou resultados de biomassa estatisticamente iguais aos outros meios (T1 e T2) que não continham estes elementos.

É possível ainda afirmar que fatores cinéticos como produtividade (Px) e velocidade específica ($\mu_{\text{máx}}$) apresentaram bons resultados, uma vez que se assemelham a outras pesquisas realizadas.

Embora exista um grande potencial da microalga para a contribuição para a produção de alimentos e bioenergia, a demanda é alta, existindo assim uma grande diferença entre a tecnologia disponibilizada atualmente e a tecnologia necessária para atender à necessidade mundial (ACIÉN *et al.*, 2012). Portanto, faz-se necessário que haja a continuidade de pesquisas para que melhorem os índices de produtividade.

A proposição de um novo meio, representado neste trabalho pelo T3, mostrou-se de muito sucesso, uma vez que apresentou a produtividade, a transformação em biomassa e a velocidade específica estatisticamente iguais aos outros meios. Acrescentando que o custo desta produção é menor que os outros elementos. Portanto, é altamente recomendável o uso deste meio alternativo.

Autores já exploraram meios com elementos alternativos na produção de biomassa de *A. platensis*. Devanathan e Ramanathan (2013) isolaram quatro cepas de *A. platensis* de várias localidades e assim cultivaram-nas em meio Zarrouk enriquecido com água do mar, outro meio com diferentes quantidades de NaHCO_3 , NaNO_3 , K_2HPO_4 e com água do mar. Eles acompanharam os teores de proteínas, lipídeos, clorofila e carotenoides totais durante o cultivo. Os resultados revelaram que há um bom potencial de uso de água do mar com a adição de alguns nutrientes para viabilizar a comercialização de *A. platensis* a baixo custo.

Segundo Alava *et al.* (1997) o meio de cultivo na base de bicarbonato de sódio usado para produzir a microalga *A. platensis* em massa e preparado pelo meio ZARROUK é metaestável em contato com a atmosfera. Este fato causa uma grande perda de CO_2 . Neste sentido, com cálculos e experiências Alava *et al.* (1997) determinaram a relação entre a pressão

parcial de CO₂ de soluções de bicarbonato de sódio e o pH da solução. Com pH 10,2 existe um equilíbrio com a concentração de CO₂ no ar e desta maneira não há perda de CO₂.

Amara e Steinbuchel (2013) objetivaram produzir um produto farmacêutico de uma única célula de *A. platensis* proveniente de uma cultura mista. Para tanto, eles projetaram um meio de cultivo baseado nos meios George e Zarrouk. Uma cultura mista de *Chlorella* e *A. platensis* foi usada para o desenvolvimento do melhor meio que inibiria a *Chlorella* e beneficiaria o crescimento de *Spirulina*. Como resultado obtiveram um meio que foi capaz de produzir o composto farmacêutico proveniente do cultivo de *Spirulina* (*Arthrospira*) para fins medicinais e farmacêuticos, ou uma célula única de proteína.

Cogne *et al.* (2003) estudaram a diminuição taxas de inserção de macro minerais e de traços de elementos caracterizados, em cultivos em batelada e contínuo de *A. platensis* sob condições fotoautotróficas como influencia no cultivo. Como resultado obtiveram que o meio de cultura pode ser otimizado diminuindo os traços de elementos na solução e os macro minerais sem prejuízo da eficiência do processo.

Dwivedi *et al.* (2013) cultivaram *Spirulina máxima* em diferentes meios: Meio Zarrouk, CFTRI, Meio Bangladesh e solução A-5 submetidas a diferentes condições físico-químicas como pH, intensidade de luz e temperatura sendo monitorados por 20 dias. Como resultado obtiveram que o máximo de crescimento em biomassa foi identificado no meio Zarrouk a pH 8 e 25°C de temperatura e 1900 klux de intensidade luminosa.

Murugan e Rajesh (2014) cultivaram duas espécies de *Spirulina*, *platensis* e *platensis* var *lonar*, em meio de cultivo com base em água do mar. O processo foi realizado por um período de 15 dias, em 27°C e em intensidade luminosa constante de 1,7 klux. Os resultados revelaram que o meio com água do mar foram promissores em relação a um meio natural que possa ser utilizado para o cultivo da *Spirulina*. Para o crescimento de biomassa, foi maior no meio alternativo que no meio padrão Zarrouk.

Pandey *et al.* (2010) estudaram o cultivo de *Spirulina máxima* em diferentes meios de cultura (Zarrouk, Rao, CFTRI, OFERR, Revised Media e meio Blangadesh) avaliando crescimento de biomassa, clorofila a e o teor de proteína. O meio Zarrouk apresentou os melhores resultados para o crescimento da cianobactéria.

6 CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais utilizadas nesta pesquisa é possível concluir que:

- Foi possível analisar o crescimento da microalga *A. platensis* nos três meios propostos, sendo que a análise estatística indicou que a concentração final de biomassa foi estatisticamente ($p < 0,05$) igual para todos.
- Os parâmetros cinéticos de produtividade e Velocidade específica para este microrganismo se mostraram eficientes nos três meios estudados.
- Na análise dos custos iniciais de investimento, foi possível concluir que o menor custo é do meio T3.
- Comparando o crescimento, a concentração máxima ($X_{m\acute{a}x}$), a velocidade específica máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$), a Produtividade (P_x) e o custo é possível afirmar que o melhor meio é o meio T3, pois mostra-se uma alternativa tecnicamente viável e com menor custo para o uso.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ACIÉN, F. G.; FERNÁNDEZ, J. M.; MÁGAN, J. J.; MOLINA, E. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnology Advances*, v. 30, p 1344 – 1353, 2012.

ALAVA, D.; MELLO, P. C.; WAGENER, K. The Relevance of the CO₂ Partial Pressure of Sodium Bicarbonate Solutions for the Mass Cultivation of the Microalga *Spirulina*. *Journal of Brazilian Chemistry Society*, v. 28, n. 5, 1997.

AMARA, A. A.; STEINBUCHER, A. New Medium for Pharmaceutical grade *Arthrospira*. *Internacional Journal of Bacteriology*, 2013.

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.

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.

BARSANTI, L.; GUALTIERRI, P. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. CRC Press, 2 ed., 2014.

BATISTA, A. P.; NUNES, M. C.; FRADINHO, P.; GOUVEIA, L.; SOUZA, I.; RAYMUNDO, A.; FRANCO, J. M. Novel foods with microbial ingredients – Effect of gel setting conditions on the linear viscoelasticity of *Spirulina* and *Haematococcus* gels. *Journal of Food Engineering*, v. 110, n. 2, 2012.

BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *J. Appl. Phycol.* 5, 235-41. 1993.

BORGES, J. A.; ROSA, G. M.; MEZA, L. H. R.; HENRARD, A. A.; SOUZA, M. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. *Spirulina* sp. LEB-18 culture using effluent from the anaerobic digestion. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 30, n. 2, 2013.

BORNIA, A. C. Análise gerencial de custos. Porto Alegre: Bookman, 2002.

BOROWITZA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, v. 70, 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. VII Lista dos novos ingredientes aprovados – Comissões Tecno-científicas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Disponível em URL: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_ingredientes.htm. 2009.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p.557-577, 2010.

CHEN, F.; ZHANG, Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fedbatch system. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 20, n. 3, p. 221- 224, 1997.

CHEN, P.; MIN, M.; CHEN, Y.; WANG, L.; LI, Y.; CHEN, Q.; WANG, C.; WAN, Y.; WANG, X.; CHENG, Y.; DENG, S.; HENNESSY, K.; LIN, X.; LIU, Y.; WANG, Y.; MARTINEZ, B.; RUAN, R. Review of the biological and engineering aspects of algae to fuels approach. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, v. 2, n.4, 2009.

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.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, v. 25, p. 294 – 306, 2007.

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.; 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.

COLLEGE, D. P. R.; TAL- PATHARDI, A.; AHMEDNAGAR, D. Influence of Various Culture Media on Growth and Production of Carotenoides in a Cyanobacterium *Lyngbya bipunctata* Lemm. *Bioscience Discovery*, v. 5, 2014.

COSTA, J. A. V., MORAIS, M. G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresource Technology* 102 (1), 2–9, 2011.

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.

DANTAGNAN, P.; HERNADEZ, A.; BORQUEZ, A.; MANSILLA, A. Inclusion of macroalgae meal (*Macrocystis pyrifera*) as a feed ingredient for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): effect on flesh fatty acid composition. *Aquaculture Research*, v. 41, 87–94, 2009.

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.

DEVANATHAN, J.; RAMANATHAN, N. Utilization of seawater as a médium for mass production of *Spirulina Platensis* – a novel approach. *International Journal of Recent Scientific Research* ,v. 4, n. 5, 2013.

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

DWIVEDI, A.; MAHESHWARI, R.; SYEDY, M. Study of mass production of *Spirulina maxima* under different Physical and Chemical environment. *International Journal of Recent Biotechnology*, v. 1, 2013.

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.

FERREIRA, L. S. Estudo da intensidade luminosa no cultivo de *Arthrospira 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.

FILHO, P. L. D. Análise de custos na geração de energia com Bagaço de Cana-de-açúcar: Um estudo de caso em quatro usinas de São Paulo. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Energia da Universidade de São Paulo, 2009.

FRANCESCHINI, I. M.; BURLIGA, A. L.; REVIERS, B.; PRADO, J. F.; REZIG, S. H. Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica. Porto Alegre: Artmed, 2010.

GITMAN, L. J.; Administração financeira: uma abordagem gerencial. São Paulo: Pearson, 2003.

HARUN R., SINGH, M., FORDE, G.M., DANQUAH, M.K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 1037–1047 , 2010.

HENRIKSON, R. Earth food *Spirulina*. California: Ronore Enterprises, 180 p., 1989.

JITENDRA, M.; MADHULIKA, J.; MOHSINA, S.; KOMAL, M.; NEHA, K. Impact of different Physical and Chemical Environment for mass Production of *Spirulina pletensis*- An Immunity Promoter. *International Research Journal of Biological Sciences*, v. 1, n. 6, 2012.

KALK, J.; LANGLYKKE, A. Cost estimation for biotechnology projects. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, Washinton- DC, 1986.

KAUSHIK, R.; PRASANNA, R.; JOSHI, H. C. Utilization of anaerobically digested distillery effluent for the production of *Spirulina platensis* (ARM 730). Journal of Scientific & Industrial Research, v. 65, 2006.

KEBEDE, E. "Response of *Spirulina platensis* (*Arthrospira fusiformis*) from Lake Chitu, Ethiopia, to salinity stress from sodium salts," Journal of Applied Phycology, vol. 9, no. 6, pp. 551– 558, 1997.

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

KHATUM, R., HOSSAIN, M. M., BEGUM, S. M. S.; MAJID, F. Z. Spirulina culture in Bangladesh V. Development of simple, inexpensive culture media suitable for rural or domestic level cultivation of Spirulina in Bangladesh. Journal of Science and Indian Research, v. 29, 1994.

KOREIVIENE, J.; KASPEROVICIENE, J. Coccoid green algae flora in plankton of small lakes of the Baltics uplands. Bot Lith, v. 17, 2011.

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, p. 159-173, 1997.

LEDUY, A.; THERIEN, N. An improved method for optical density measurement of the semimicroscopic blue alga *Spirulina máxima*. Biotechnology and Bioengineering Journal, v. 19, 1977.

LEONE, G. S. G. Custos: um enfoque administrativo. 10. ed. Rio de Janeiro: Fundação Getúlio Vargas, 1991.

LI, Y., HORSMAN, M., WANG, B., WU, N., LAN, C. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 81 (4), 629–636, 2008.

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

LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 2006.

MADKOUR, F. F.; KAMIL, A. E. W; NASR, H. S. Production and nutritive value of *Spirulina platensis* in reduced cost media. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, v. 28, 2012.

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

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

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.

MARCO, E. R.; STEFFOLANI, M. E.; MARTINEZ, C. S.; LEON, A. E. Effects of *Spirulina* Biomass on the technological and nutritional quality of bread wheat pasta. *LWT – Food Science and Technology*, v. 58, n. 1, 2014.

MARKOU, G. Alteration of the biomass composition of *Arthrospira platensis* under various amounts of limited phosphorus. *Bioresource Technology*, v. 116, p. 533–535, 2012.

MARTINS, E. *Contabilidade de custos*. São Paulo: Atlas, 9^a ed., 2003.

MARTIS, R. T.; SINGH, R.; ANKITA, K.; PATHAK, A. N.; GURIA, C. Solubility of carbon dioxide using aqueous NPK 10:26:26 complex fertilizer culture medium and *Spirulina platensis* suspension. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v.1, 2013.

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 platensis* using urea as nitrogen source. *Biochemical Engineering Journal*, v.43, n. 1, p. 52-57, 2009.

MEDEIROS, S. R.; MEDEIROS, A. R. S.; MEDEIROS JÚNIOR, R. N.; MEDEIROS, E. J. R. Análises de aspectos gerais, ecológicos e sócio-econômicos da produção de biodiesel de microalgas a partir de levantamento bibliográfico. *Revista Eletrônica de Petróleo e Gás*, n. 1, 2013.

MOJAAT, M.; PRUVOST, J.; FOUCAULT, A.; LEGRAND, J. Effect of organic carbon sources and Fe^{2+} ions on growth and β -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.

MURUGAN, T.; RAJESH, R. Cultivation of two species of *Spirulina* (*Spirulina platensis* and *Spirulina platensis* var *lonar*) on sea water medium and extraction of C-phycoyanin. *European Journal of Experimental Biology*, v. 4, 2014.

NEUMANN, P.; ABREU, E. S.; TORRES, E. A. F. Alimentos saudáveis, alimentos funcionais, fármaco alimentos, nutracêuticos....você já ouviu falar? *Higiene Alimentar.*, v. 14, p. 19-23. 2002.

NIIZAWA, I.; HEINRICH, J. M.; IRAZOQUI, H. A. Modeling of the influence of light quality on the growth of microalgae in a laboratory scale photo-bio-reactor irradiated by arrangements of blue and red LEDs. *Biochemical Engineering Journal*, v. 90, 2014.

NORMAN, G.R.; STREINER, D.L. *Biostatistics: the bare essentials*. St. Louis: Mosby- Year Book, 1994.

NORSKER, N. H.; BARBOSA, M. J.; VERMUE, M. H.; WIJFFELS, R. H. Microalgal production – a close look at the economics. *Biotechnology Advances*, v. 29, n. 1, p. 24 – 27, 2011.

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

OZKURT, L. Qualifying of safflower and algae for energy. *Energy Education Science and Technology*. V. 23. N. 2, 2009.

PANDEY, J. P.; TIWARI, A.; MISHRA, R. M. Evaluation of Biomass Production of *Spirulina maxima* on Different Reported Media. *Journal of Algal Biomass Utilization*, v. 1, n. 3, 2010.

PAOLETTI, C.; PUSHPARAJ, B.; TOMASELLI, F. L. Ricerche sulla nutrizione minerale di *Spirulina platensis*. *Atti XVII Congr. Naz. Soc. It. Microbiol.*, Padova, 26-28 ott., v.2, p.845-853, 1975.

PAWLOWSKI, A.; MENDOZA, J. L.; GUZMÁN, J. L. BERENGUEL, M.; ACIÉN, F. G.; DORMIDO, S. Effective utilization of flue gases in raceway reactor with event-based pH control for microalgae culture. *Bioresource Technology*, v. 170, 2014.

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

PELIZER, L. H.; DANESI, E. D. G.; RANGEL, C. O.; SASSANO, C. E. N.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S.; MORAIS, I. O. Padronização do meio de secagem da biomassa da *Spirulina platensis*. Revista Farmácia Química, v. 32, n. 1, 1999.

PERES JUNIOR, J.H; OLIVEIRA, L. M.; COSTA, R. G. Gestão estratégica de custos. 6. ed. São Paulo: Atlas, 2010.

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

RAJFUR, M.; KLOS, A.; WACLEWEK, M. Soption of copper (II) ions in the biomass of alga *Spirogyra sp.* Bioelectrochemistry, v. 87, 2012.

RAOOF, B. Standardization of growth parameters for outdoor biomass production of *Spirulina sp.* Ph.D. thesis, Division of Microbiology, Indian Agricultural Research Institute, Nova Delhi – India, 2002.

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

RASLAVICIUS, L.; SEMENOV, V. G.; CHERNOVA, N.; KERSYS, A.; KOPEYKA, A. Producing transportation fuels from algae: In search of synergy. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 40, 2014.

RICHMOND, A. Handbook of microalgal mass culture. Boston: CRC Press; 1990.

ROCHA, C. M. C.; RESENDE, E. K.; ROUTLEDGE, E. A. B.; LUNDSTEDT, L. M. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 48, n. 8, 2013.

SANTOS, J. J. Contabilidade e análise de custos. 6. ed. São Paulo: Atlas, 2011.

SASSANO, C. E. N.; CARVALHO, J. C. M.; GIOIELLI, L. A.; SATO, S.; TORRE, P. kinetics and bioenergetics of *Spirulina platensis* cultivation by fed-batch addition of urea as nitrogen source. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 112, 2004.

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.

SILVA, P. C.; BASSON, P. W. E.; MOE, R. L. Catalogue of the benthic marine algae of the Indian Ocean. University of California publications in botany. Berkeley: University of California Press, 1996.

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.

SINGH, J.; GU, S. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, n. 9, p. 2596-2610, 2010.

SINGH, S. *Spirulina: Spirulina cultivation: Potentials and Prospects. A Green gold mine.* Spirutech- 2006, Jabalpur, Madhya Pradesh, 2006.

SLADE, R.; BAUEN, A. Micro-algae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. *Biomass and Bioenergy*, v. 53, 2013.

SLEGGERS, P. M.; BEVEREN, P. J. M. V.; WIJFFELS, R. H.; STRATEN, G. V.; BOXTEL, A. J. B. Scenarios Analysis of large scale algae production in tubular photobioreactors. *Applied Energy*, v. 105, 2013.

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.

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.

SOUZA, M. P.; BJERK, T. R.; GRESSLER, P. D.; SCHNEIDER, R. C. S.; CORBELLINI, A.; MORAES, M. S. A. As microalgas como uma alternativa para a produção de biocombustíveis – parte 1: Bioetanol. *TECNO-LÓGICA*, Santa Cruz do Sul, v. 16, n. 2, p. 108-116, 2012.

TAIPINA, M. S.; FONTS, M. A. S.; COHEN, V. H. Alimentos funcionais – nutracêuticos. *Higiene Alimentar*, v.16, 28-29. 2002.

TARKO, T.; DUDA-CHODAK, A.; KOBUS, M. Influence of Growth Medium Composition on Synthesis of Bioactive Compounds and Antioxidant Properties of Selected Strains of *Arthrospira Cyanobacteria*. *Czech Journal of Food Science*, v. 30, 2012.

THIRUMALA, M. Optimization of Growth of *Spirulina Platensis* LN1 for production of Carotenoids. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, v.1, n. 2, 2012.

TOPARE, N. S.; CHOPADE, S. G.; RENGE, V. C.; KHEDAR, S. V.; BHAGAT, S. L. An algae bioreactor from Recycle water bottle for Cultivation of Algae. *International Journal of Chemtech Research*. V. 4, n. 1, 2012.

VENKATARAMAN, L.; BHAGYALAKSHMI, V.; RAVISHANKAR, G. A commercial production of micro and macro algae problems and potentials. *Indian Journal of Microbiology*, v. 35; 1995.

VIANA, H. R. G. Lições preliminares sobre custos industriais. Rio de Janeiro: Qualitymark, 2005.

VON DER WEID, D.; DILLON, J.C.; FALQUET, J. Malnutrition: a silent massacre. *Antenna Technology*. 2000.

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.

WIJFFLES, R. H.; BARBOSA, M. J. An outlook on microalgal biofuels. *Science*, v. 9, 2010.

WILLIAMS, P. J. le B.; LAURENS, L. M. L. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy & Environmental Science*, v.3, p. 554-590, 2010.

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.

XU, Y.; ISOM, L.; HANNA, M.A. Adding value to carbon dioxide from ethanol fermentations. *Bioresource Technology*, n. 101, p. 3311–3319, 2010.

ZARROUK, C. Contribution a l'étude du cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* (Setch et Gardner) Geitl. - Thesis, Paris 1966.

ZHU, L. D.; HILTUNEN, E.; ANTILA, E.; ZHONG, J. J.; YUAN, Z. H., WANG, Z. M. Microalgal biofuels: Flexible bioenergies for sustainable development. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. V. 30, 2014.

APENDICE A – DADOS PARA A CONFEÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR.

1 – Dados para curva de calibração para o meio Paoletti com microelementos (T1).

Concentração do cultivo	Absorbância a 560 nm.	Gramas de <i>A. platensis</i>
100 %	0,275	0,28
80 %	0,215	0,23
60 %	0,157	0,14
40 %	0,088	0,08
20 %	0,064	0,05
0 %	0	0

2 - Dados para curva de calibração para o meio Paoletti sem microelementos (T2).

Concentração do cultivo	Absorbância a 560 nm.	Gramas de <i>Arthrospira</i>.
100 %	0,302	0,30
80 %	0,244	0,23
60 %	0,182	0,18
40 %	0,105	0,09
20 %	0,042	0,03
0 %	0	0

3 - Dados para curva de calibração para o meio alternativo (T3).

Concentração do cultivo	Absorbância a 560 nm.	Gramas de <i>Arthrospira</i>.
100 %	0,273	0,27
80 %	0,208	0,21
60 %	0,155	0,13
40 %	0,102	0,12
20 %	0,04	0,01
0 %	0	0

APENDICE B – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO CELULAR.

1 – Curva de calibração para o meio Paoletti com microelementos (T1).

A determinação da concentração celular com o meio Paoletti com microelementos (T1) pode ser visualizada na figura 1.

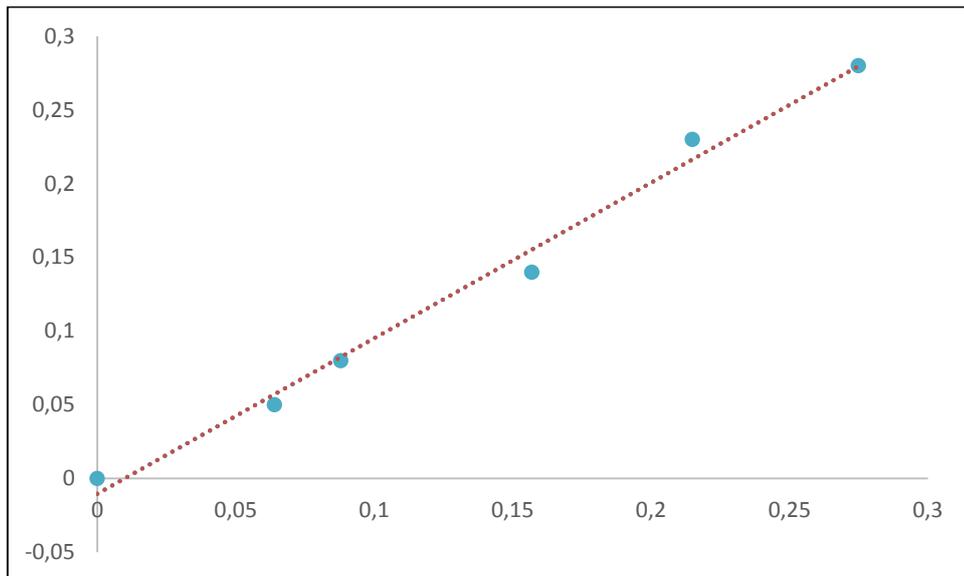


Figura 1 - Curva de calibração para determinação da concentração de *A. platensis* no T1.

Os dados que originaram este resultado podem ser visualizados no APENDICE A.

Segundo a curva da figura 4 , a relação entre a absorbância e a quantidade em mg. L⁻¹ segue a seguinte função:

$$Y = 1,0551.x - 0,0105$$

Onde:

- Y é a quantidade de *A. platensis* em mg. L⁻¹.
- X é a absorbância a 560 nm.

Com o coeficiente de correlação (R²) de 0,99 ou 99%.

2 – Curva de calibração para o meio Paoletti sem microelementos (T2).

A determinação da concentração celular com o meio Paoletti sem microelementos (T2) pode ser visualizada na figura 2.

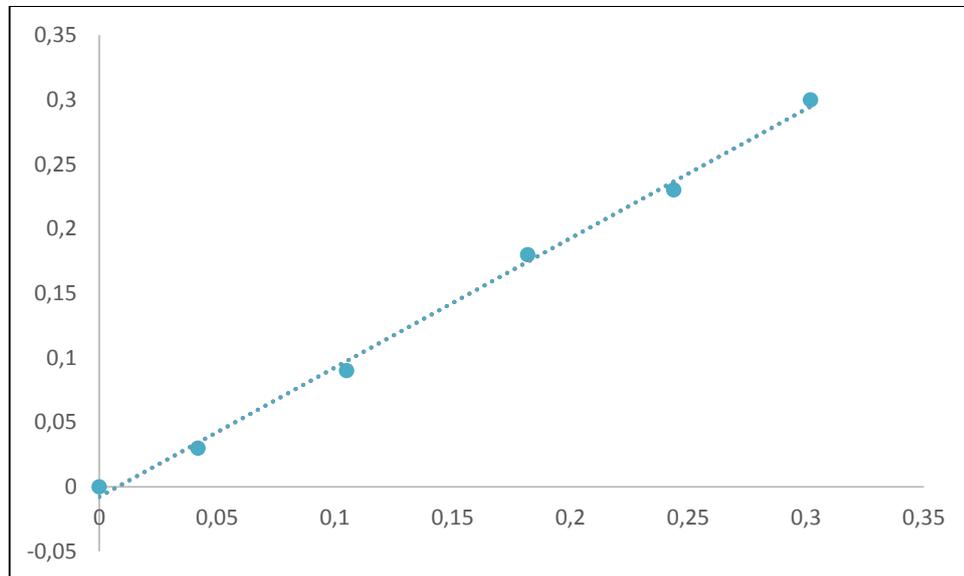


Figura 2 - Curva de calibração para determinação da concentração de *A. platensis* no T2.

Os dados que originaram este resultado podem ser visualizados no APENDICE A.

Segundo a curva da figura 5, a relação entre a absorbância e a quantidade em mg. L⁻¹ segue a seguinte função:

$$Y = 1,0014 \cdot x - 0,0077$$

Onde:

- Y é a quantidade de *A. platensis* em mg. L⁻¹.
- X é a absorbância a 560 nm.

Com o coeficiente de correlação (R^2) de 0,9966 ou 99,66%.

3 – Curva de calibração para o meio alternativo (T3).

A determinação da concentração celular com o meio alternativo sem microelementos (T3) pode ser visualizada na figura 3.

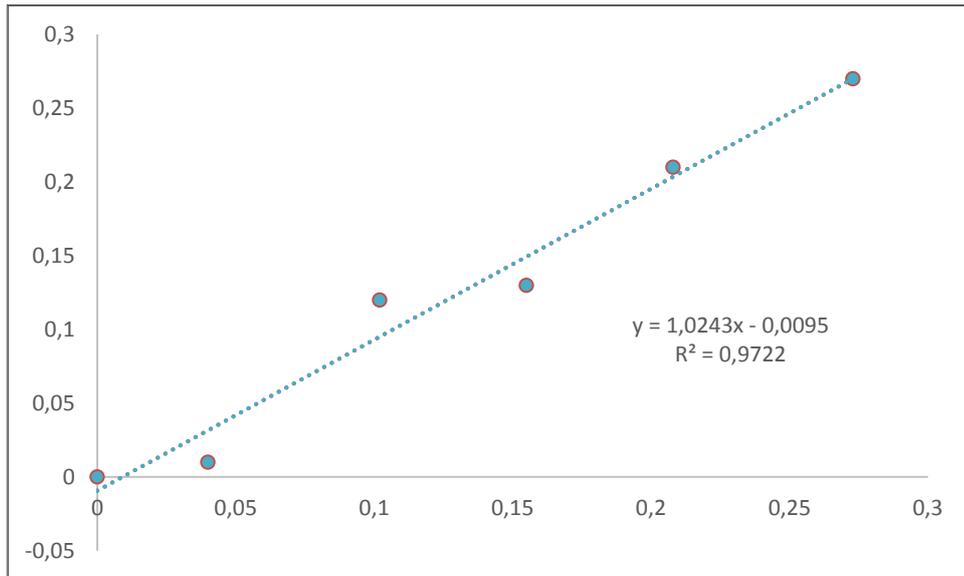


Figura 3 - Curva de calibração para determinação da concentração de *A. platensis* no T3.

Os dados que originaram este resultado podem ser visualizados no APÊNDICE A.

Segundo a curva da figura 5, a relação entre a absorvância e a quantidade em mg. L⁻¹ segue a seguinte função:

$$Y = 1,0243 \cdot X - 0,0095$$

Onde:

- Y é a quantidade de *A. platensis* em mg. L⁻¹.
- X é a absorvância a 560 nm.

Com o coeficiente de correlação (R^2) de 0,9722 ou 97,22%.

APÊNDICE C – RESULTADO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A CONCENTRAÇÃO MÁXIMA (X máx.), COM TESTE TUKEY (P < 0,05).

 Variável analisada: Concentração máxima (mg/L)
 Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	2	8368.866935	4184.433468	0.363	0.7055
erro	9	103832.190378	11536.910042		
Total corrigido	11	112201.057313			
CV (%) =	26.25				
Média geral:	409.1174167	Número de observações:		12	

 Teste Tukey para a FV Tratamentos

DMS: 212,225158406495 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 4
 Erro padrão: 53,7050045199985

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
T1	373.292750	a1
T3	417.889000	a1
T2	436.170500	a1

APÊNDICE D – RESULTADO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A PRODUTIVIDADE (Px.), COM TESTE TUKEY (P < 0,05).

Variável analisada: Produtividade

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	2	130.099817	65.049908	0.361	0.7067
erro	9	1622.250350	180.250039		
Total corrigido	11	1752.350167			
CV (%) =	29.93				
Média geral:	44.8616667	Número de observações:		12	

Teste Tukey para a FV Tratamentos

DMS: 26,527101359673 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 4
 Erro padrão: 6,71286151519769

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
T1	40.390000	a1
T3	45.972500	a1
T2	48.222500	a1

APÊNDICE E – RESULTADO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A VELOCIDADE MÁXIMA ESPECÍFICA (μ máx.), COM TESTE TUKEY (P < 0,05).

 Variável analisada: Velocidade Específica

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	2	0.003266	0.001633	1.623	0.2501
erro	9	0.009056	0.001006		
Total corrigido	11	0.012322			
CV (%) =	10.96				
Média geral:	0.2893417	Número de observações:		12	

 Teste Tukey para a FV Tratamentos

DMS: 0,0626744271538651 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 4
 Erro padrão: 0,0158601855635775

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
T1	0.266250	a1
T2	0.298000	a1
T3	0.303775	a1