

Estudo termodinâmico da produção de *Spirulina platensis* utilizando uréia como fonte de nitrogênio

Carlos Eduardo Nascimento Sassano¹, João Carlos Monteiro de Carvalho¹, Attilio Converti², Mario Zilli², Sunao Sato¹, Paolo Torre², Luiz Antonio Gioielli²

RESUMO

Os resultados previamente apresentados de cultivos de *Spirulina platensis*, conduzidos alimentando uréia de forma descontínua alimentada com fluxo exponencialmente crescente, foram usados neste trabalho para conduzir a um estudo termodinâmico sobre o crescimento dessa cianobactéria e o seu rendimento fotossintético. Neste propósito, simples balanços de matéria, de entalpia e de energia de Gibbs, foram usados, recorrendo ao tradicional modelo energético de dois fotossistemas (I e II), sem transporte inverso de elétrons (RET), proposto na literatura para a maioria dos organismos fotossintéticos.

INTRODUÇÃO

A cultura de microrganismos fotossintetizantes pode representar uma vantajosa fonte alternativa de proteínas, de apreciável valor biológico, para consumo animal e humano. Ao lado de tal perspectiva, tem-se a possibilidade de obter produtos de "química fina", dentre os quais: pigmentos, carotenóides, esteróides,

vitaminas, ácidos graxos polinsaturados e lipídeos⁽¹⁻⁴⁾. Estudos neste sentido têm sido realizados desde o início da década de 50, principalmente com dois gêneros de microalgas verdes: *Chlorella* e *Scenedesmus*. Entretanto, surgiram problemas para sua utilização, devido aos elevados custos de extração e secagem da biomassa, além da presença de parede celulósica e de baixa digestibilidade, que foram notavelmente atenuados mediante o emprego de *Spirulina*^(3,5).

A *Spirulina* apresenta vantagens em relação aos demais fotoautótrofos, entre elas, a separação fácil e econômica do meio de cultivo devido à forma espiralada e maiores dimensões (diâmetro de aproximadamente 10 mm e comprimento de dezenas a centenas de mm)^(6,8).

Em relação à biomassa algal esta é, principalmente, avaliada com base no seu conteúdo de proteínas. Porém, outros constituintes estão tendo cada vez mais importância no valor nutricional de um alimento, isto é, principalmente a fração lipídica e a quantidade e qualidade dos ácidos graxos constituintes⁽⁹⁻¹¹⁾.

Numerosos fatores influenciam o crescimento do gênero *Spirulina*, entre os quais as fontes de carbo-

UNITERMOS: *Spirulina platensis*, Parâmetros termodinâmicos, Produção de microalgas.

1. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica – FCF - Universidade de São Paulo - Avenida Prof. Lineu Prestes 580, Bl. 16, 05508-900 São Paulo - SP

2. Dipartimento di Ingegneria Chimica e di Processo - Università di Genova - via Opera Pia 15, 16145 Gênova - Itália (converti@unige.it)

no e nitrogênio. As cianobactérias tornam-se dominantes em pH alcalinos porque são capazes de utilizar CO₂ em baixas concentrações com uma eficiência maior que as microalgas verdes⁽¹²⁾. Estes autores demonstraram que lagos dominados por cianobactérias, ao serem agitados, passaram a ser dominados por algas verdes. Segundo Miller e Colman, a forma de carbono preferencialmente assimilada por cianobactérias é o bicarbonato⁽¹³⁾. Dentre os principais nutrientes do meio em fermentação para as microalgas, a fonte de carbono é o maior responsável pelo pH básico⁽¹²⁾.

Quanto à fonte de nitrogênio, trabalhos anteriores demonstraram como a *Spirulina* pode utilizar uréia seja em reator de batelada⁽¹⁴⁾, que em reator descontínuo alimentado^(15,16). Esta fonte de nitrogênio a baixo custo, fornece ótimos rendimentos em ácido graxo g-linolênico⁽¹⁷⁾. A *Spirulina* cresce satisfatoriamente em meios pouco concentrados de uréia, enquanto concentrações acima de 300-500 mg/l, demonstraram-se fortemente inibitórias^(14,15).

A intensidade luminosa é outro parâmetro que influencia fortemente o crescimento celular, pelo menos até um limite (5-10 klux), denominado ponto de saturação luminosa⁽¹⁸⁾. Tal constatação experimental indica que a máxima velocidade de crescimento celular é limitada por outros processos, além da assimilação de carbono e nitrogênio. Além das limitações fisiológicas para o crescimento celular, deve-se considerar o sombreamento, que é a consequência do aumento populacional microbiano. Através deste aumento celular, a quantidade de luz disponível para cada célula é atenuada, passando a não ser mais homogênea sua distribuição na cultura. Quando o efeito do sombreamento passa a ser significativo, isto é, limita a luz disponível, o crescimento celular passa para uma fase linear, na qual a quantidade de biomassa produzida por unidade de tempo depende, principalmente, da quantidade de luz que a célula recebe⁽⁶⁾. A agitação também é um fator importante a ser considerado no crescimento da *Spirulina*, pois garante a suspensão das células no meio líquido e fornece homogênea distribuição de luz⁽¹⁹⁾.

O uso de *Spirulina* deu um avanço muito grande à cultura de microalgas, porque, em relação às microalgas *Chlorella* e *Scenedesmus* utilizadas anteriormente, apresenta^(7,20): (a) menor risco de contaminação no cultivo, devido à capacidade de crescer a valores altos de pH; (b) tamanho maior, o que facilita a separação do meio de cultura; (c) fácil digestibilidade; (d) alto teor de proteínas; (e) baixa quantidade de ácidos nucléicos; (f) componentes celulares de grande importância tais como vitamina A, clorofila, ácidos graxos essenciais, etc. Tudo isto faz com que a *Spirulina* seja uma ótima fonte de componentes nutricionais e de alto valor nutritivo.

Este estudo constitui a continuação de um trabalho anterior, que foi direcionado aos aspectos bioenergéticos deste sistema algal⁽¹⁶⁾. Os resultados previamente apresentados, de ensaios conduzidos variando a massa total alimentada de uréia, foram usados neste trabalho, para efetuar um estudo termodinâmico sobre o crescimento de *S. platensis* e sobre o seu rendimento fotossintético.

MATERIAIS E MÉTODOS

A cepa *Spirulina platensis*, proveniente do Laboratório de Microbiologia Zootécnica da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga, foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr Rogério Lacaz Ruiz.

Os meios e as técnicas utilizados para a manutenção e o crescimento bem como o inóculo e as técnicas analíticas, foram recentemente apresentados⁽¹⁶⁾. A quantidade de uréia total a ser adicionada durante os cultivos foi 80 mg/l.

Para os ensaios foram adotados mini-tanques de forma alongada, em que a agitação da cultura foi executada por pás rotativas, na frequência de 23 rotações por minuto.

A temperatura do meio em fermentação foi mantida ao valor ótimo de 25°C⁽²¹⁾ por aquecimento, com auxílio de resistências e controlada por meio de termostatos. A luminosidade de 6,0 klux foi obtida por meio de lâmpadas fluorescentes de 40 W.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para este estudo termodinâmico têm sido usado os resultados experimentais apresentados em um trabalho anterior⁽¹⁶⁾, que se referiam a ensaios padrão de crescimento descontínuo da microalga *Spirulina platensis*, conduzidos, empregando KNO₃ como fonte de nitrogênio, bem como a ensaios em que a quantidade desejada de uréia, foi variada entre 275 e 725 mg por litro de reator. A alimentação foi feita com frequência diária durante 12 dias consecutivos, utilizando uma solução de uréia suficientemente concentrada, de modo a implicar uma variação desprezível do volume de reação.

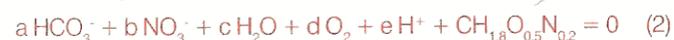
A velocidade específica de crescimento celular em função do tempo foi calculada através da equação:

$$\mu = \frac{1}{t_i - t_{i-1}} \ln \frac{X_i}{X_{i-1}} \quad (1)$$

que vale notoriamente para o processo descontínuo.

Na primeira parte deste estudo, tem sido determinada a estequiometria do crescimento da microalga baseado sobre o balanço da energia de Gibbs, dissipada neste propósito.

Considerando-se para a biomassa seca de *S. platensis* a composição microbiana média (CH_{1,8}O_{0,5}N_{0,2}) proposta por Roels⁽²²⁾, pode-se propor o seguinte balanço, com referência à produção autótrofa de um C-mol de biomassa em ausência de transporte inverso de elétrons:



Os coeficientes estequiométricos podem ser estimados como segue:

- a) Balanço de carbono: $a + 1 = 0$
 - b) Balanço de nitrogênio: $b + 0,2 = 0$
 - c) Balanço de carga elétrica: $-a - b + e = 0$
 - d) Balanço do grau de redução: $-4d + \gamma_X = 0$
- onde $\gamma_X = 5,8$ para KNO₃ ou $\gamma_X = 4,2$ para a uréia⁽²³⁾

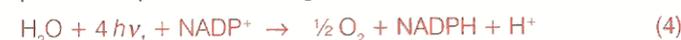
e) Balanço de oxigênio: $3a + 3b + c + 2d + 0,5 = 0$

Para a estimativa do número de fótons envolvidos no crescimento autótrofo, f , é necessário recorrer, no entanto, a um balanço da energia de Gibbs, que considere também, as contribuições energéticas associáveis ao crescimento⁽¹⁶⁾, $1/Y_{GX}$, assim como à luz absorvida, hcN/λ , e a influência do pH⁽²³⁾:

$$f = \left(\frac{1}{\Delta g_{f(\text{Fótons})}} \right) \left[-a \Delta g_{f(\text{HCO}_3^-)} - b \Delta g_{f(\text{NO}_3^-)} - c \Delta g_{f(\text{H}_2\text{O})} - e \left(\Delta g_{f(\text{H}^+)} + RT \ln \left[\frac{10^{-\text{pH}}}{10^{-7}} \right] \right) - \Delta g_{f(\text{Biomassa})} - \frac{1}{Y_{GX}^{\text{max}}} - m_G(t_i - t_{i-1}) \ln \left(\frac{X_i}{X_{i-1}} \right) \right] \quad (3)$$

Os valores dos coeficientes estequiométricos e de $\Delta g_f^{\circ'}$ dos vários componentes em condições padrão biológicas^(23,24) são apresentados na Tabela 1. Por outro lado, a Figura 1 mostra que a procura energética para a formação de um C-mol de biomassa, em termos de número de fótons absorvidos, aumenta (em valor absoluto) durante o curso de uma produção descontínua, como conseqüência da progressiva diminuição da velocidade específica de crescimento. A procura energética aumenta consideravelmente durante a fase de declínio da velocidade, demonstrando assim que, em condições de empobrecimento do meio e/ou de elevadas concentrações celulares, que podem levar ao efeito de sombreamento, a cultura tende a consumir substrato preferencialmente, para a própria manutenção, em vez de crescer. Nestas condições de crescimento limitado pode-se também notar que o uso de KNO₃ como fonte de nitrogênio (ensaio padrão), implica uma procura energética notavelmente maior que em presença de uréia, o que sugere um menor rendimento da conversão de energia solar em biomassa no caso do nitrato.

Com base aos princípios fundamentais da fotossíntese⁽⁶⁾, pode-se propor o seguinte esquema simplificado para a oxidação de um mol d'água:



Composto	Coefficiente esteq. (mol/C-mol _x)	$\Delta g_i^{o'}$ (kJ/mol)	$\Delta h_i^{o'}$ (kJ/mol)
HCO ₃ ⁻	-1,00	-587,2	-692,4
Biomassa	+1,00	- 67,0	- 91
Fótons	+ f	+206,2	0
a) NO ₃ ⁻ como fonte de nitrogênio			
NO ₃ ⁻	-0,20	-111,4	-173,0
H ⁺	-1,20	- 39,9	0
H ₂ O	+0,20	-237,3	-286,0
O ₂	+1,44	0	0
b) NH ₄ ⁺ como fonte de nitrogênio			
NH ₄ ⁺	-0,20	-79,4	-133,0
H ⁺	-0,80	- 39,9	0
H ₂ O	+0,40	-237,3	-286,0
O ₂	+1,0	0	0

TABELA 1 - Valores dos coeficientes estequiométricos e da energia de Gibbs de formação dos vários reagentes e produtos referidos à produção de um C-mol de biomassa em condições padrão biológicas (T = 298,16 K; C = 1 M; pH = 7,0).

Li et al. têm recentemente demonstrado para *S. platensis* que, excitando com luz de 580 nm, é emitida luz fosforescente de λ correspondente a 657 nm, 685 nm e 715 nm e que a emissão com o primeiro comprimento de onda, típica dos ficobilissomos, é devida a ambos os fotossistemas I e II⁽²⁵⁾.

A diferença energética entre os fótons absorvidos (ϵ_1) e emitidos (ϵ_2 e ϵ_3) corresponde à diferença de potencial entre os dois fotossistemas (ΔE_1):

$$2 \epsilon_1 = \epsilon_2 + \epsilon_3 + 2 F \Delta E_1 \quad (5)$$

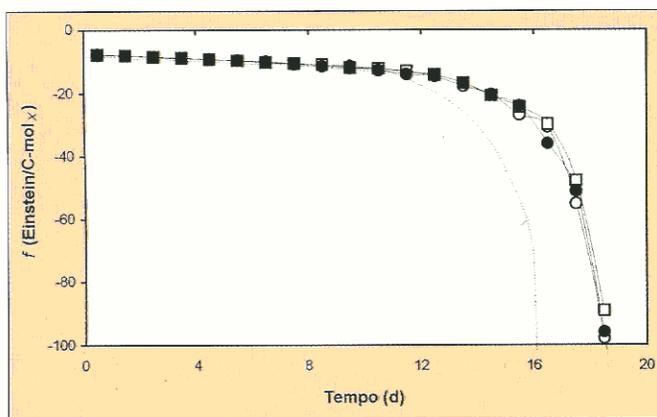


Figura 1 - Comportamento em função do número de fótons absorvidos para a formação de um C-mol de biomassa. $t_{ft} = 12$ d. m_{at} (mg/L): (□) 275; (●) 500; (○) 725. (----) Ensaio padrão com KNO₃.

A absorção de outros dois fótons torna-se responsável da transferência, com mecanismo análogo, dos dois elétrons até o potencial de redução padrão do NADPH e implica a emissão de dois fótons adicionais com baixa energia (ϵ_4 e ϵ_5), o primeiro dos quais associado aos ficobilissomos:

$$2 \epsilon_1 = \epsilon_4 + \epsilon_5 + 2 F \Delta E_{II} \quad (6)$$

Assumindo as diferenças de potencial respectivamente entre os dois fotossistemas ($\Delta E_I = 0,580$ V) e o fotossistema I e o NADPH ($\Delta E_{II} = 0,656$ V) mencionadas na literatura para um grande número de sistemas fotossintéticos diferentes⁽²⁶⁾ e combinando as Equações (5) e (6), é possível calcular que os dois fótons de 657 nm contribuem por cerca de 51% da inteira energia emitida, o de 715 nm por cerca de 24% e o de 685 nm por cerca de 25%. Na realidade, a situação fenomenológica é mais complexa.

Relacionando estes resultados com o número de fótons absorvidos calculado anteriormente⁽¹⁶⁾ e com o daqueles teoricamente necessários para a síntese de um C-mol de biomassa (8 fótons), pode-se estimar além da energia de Gibbs absorvida, $1/Y_{GX}$, também o calor dissipa-

do. Relacionando estes resultados com o número de fótons absorvidos calculado anteriormente⁽¹⁶⁾ e com o daqueles teoricamente necessários para a síntese de um C-mol de biomassa (8 fótons), pode-se estimar além da energia de Gibbs absorvida, $1/Y_{GX}$, também o calor dissipa-

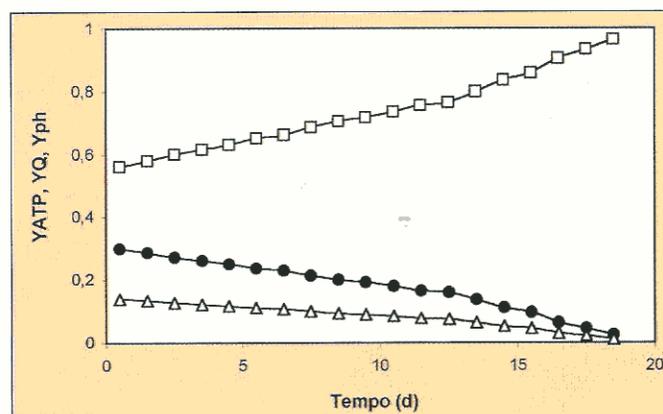


Figura 2 - Comportamento em função do tempo das frações de energia fixada pelo sistema (Y_{ph}) (●), recuperada como ATP (Y_{ATP}) (△) e liberada como calor (Y_Q) (□), durante o ensaio padrão.

pado, Q, de acordo com o balanço energético:

$$1/Y_{GX} = \Delta g_{ATP} + \Delta h + Q \quad (7)$$

Para isto é necessário calcular a fração de energia recuperada como ATP ($\Delta g_{ATP} = 223 \text{ kJ C-mol}_x^{-1}$), supondo um rendimento de $1,5 \text{ mol}_{ATP}/\text{mol}_{NADPH}$, e a entalpia fixada pelo sistema ($\Delta h = 477 \text{ kJ C-mol}_x^{-1}$), a partir do potencial de redução padrão dos fotossistemas.

A Figura 2 apresenta os valores destes parâmetros energéticos, em função do tempo no caso do ensaio padrão (ST), escolhido como exemplo. Calcula-se que, em condições ótimas de crescimento (começo do ensaio), 28% da energia de Gibbs absorvida é fixada pelo sistema para aumentar o próprio conteúdo entálpico (Δh), de acordo com as observações de Richmond⁽⁶⁾, sendo que esta fração decresce até aproximadamente 11% com o progressivo empobrecimento do meio de cultivo. A energia recuperada como ATP decresce, no entanto, de 13% até 5%, enquanto a fração não fixada e liberada como calor aumenta complementarmente de 59% até 84%. Estes resultados demonstram claramente que durante o processo descontínuo, a eficiência da fotossíntese decresce com o aumento da biomassa, provavelmente por causa do progressivo efeito de sombreamento, sobre a absorção da luz exercido pelas camadas celulares mais periféricas.

É possível, enfim, verificar a validade do modelo bioenergético proposto através de um confronto da entalpia fixada pelo sistema mediante fotossíntese, Δh , e aquela estimada, usando os dados termodinâmicos disponíveis na literatura. A este propósito, por analogia com a energia de Gibbs, pode-se utilizar o seguinte balanço entálpico.

$$a \Delta h_{f, \text{HCO}_3^-} + b \Delta h_{f, \text{NO}_3^-} + c \Delta h_{f, \text{H}_2\text{O}} + g \Delta h_{f, \text{H}^+} + \Delta h_{f, \text{Biomassa}} + (1/Y_{PR}) = 0 \quad (8)$$

Substituindo os valores da entalpia padrão de formação e os coeficientes estequiométricos da Tabela 1 calculam-se contribuições entálpicas de $513,3 \text{ kJ/C-mol}_x$ e $578,8 \text{ kJ/C-mol}_x$ usando-se respectivamente NH_4^+ (proveniente da hidrólise da uréia) e NO_3^- como fontes de nitrogênio. Estes valores são respectivamente 7% e 21% superiores aquele calculado a partir do potencial de redução padrão dos fotossistemas ($477 \text{ kJ C-mol}_x^{-1}$), o que constitui uma primeira confirmação da validade das hipóteses formuladas.

CONCLUSÕES

Este estudo constitui a continuação de um trabalho anterior, que foi direcionado aos aspectos bioenergéticos do crescimento de *Spirulina platensis*, usando uréia como fonte de nitrogênio. Os resultados de cultivos obtidos variando a massa total alimentada de uréia, foram usados para a estimativa dos principais parâmetros termodinâmicos deste sistema algal e de seu rendimento fotossintético.

O número de fótons envolvidos no crescimento autótrofo pareceu aumentar significativamente durante o curso de cada produção descontínua, evidenciando assim, que o rendimento fotossintético, diminui na medida em que a biomassa cresce. Os valores estimados das percentagens das diversas frações energéticas em relação à energia de Gibbs absorvida sugerem que, em condições ótimas de crescimento, menos de um terço da energia absorvida é fixada pelo sistema, para aumentar o próprio conteúdo entálpico, enquanto apenas 13% da energia é recuperada como ATP e mais do que a metade é liberada como calor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cohen, Z.V., Vonshak A., Richmond A. (1987) Fatty acid composition of *Spirulina* strains grown under various environmental conditions. *Phytochemistry* 26, 2255-2258.
2. Roughan, P.G. (1988) *Spirulina*: a source of dietary gamma-linolenic acid. *J. Sci. Food Agric.* 47, 85-93.
3. Cohen Z.V., Vonshak A. (1990) Fatty acid composition of *Spirulina* and *Spirulina*-like cyanobacteria in relation to their chemotaxonomy. *Phytochemistry* 30, 205-206.
4. Cohen Z.V., Didi S., Heimer Y. (1991) Overproduction of gamma-linolenic and eicosapentenoic acids by algae. *Plant Physiol.* 98, 569-572.
5. Telor E, Boussiba S, Richmond E. (1990) Products and chemicals from *Spirulina platensis*. North-Holland Biomedical Press, Israel.
6. Richmond A. (1983) Phototrophic microalgae. In: Rehm H.-J. and Reed G., eds., *Biotechnology, Dellweg* (volume ed.) Vol. 3, Verlag Chemie, Weinheim, Alemanha, pp. 109-143.
7. Piorreck M., Baasch K.L., Pohl P. (1984) Biomass production, total protein, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry* 23, 207-213.
8. Ferraz C.A.M. (1986) Produção de *Spirulina maxima*: Influência de ecofatores e uso de um sub-produto da indústria alcooleira, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo.
9. Materassi R., Paoletti C., Balloni W., Florenzano G. (1980) Some considerations on the production of lipid substances by microalgae and cyanobacteria. In: Shelef G. and Soeder C.J., eds., *Algae Biomass*. Elsevier-North Holland. Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands, p. 1015.
10. Carr N.G., Whitton B.A. (1973) *The Biology of the Blue-Green Algae*, Blackwell Scientific Publication, Oxford, London.
11. Sonntag N.V. (1979) Structure and composition of fats and oils. In: Swern D., ed., *Baileys Industrial Oil and Fat Products*, New York, v. 1, p. 1-98.
12. Simmons G.M.Jr., Parker B.C., Allnut F.T.C., Brown D., Cathey D., Seaburg K.G. (1979) Ecological comparison of oasis lakes and soils. *Antart. J.* 14, 181.
13. Miller A.G., Colman B. (1980) Evidence for carbonate transport by the blue-green alga (cyanobacterium). *Plant Physiol.* 65, 397-402.
14. Faintuch B.L. (1989) Análise comparativa da produção de biomassa a partir de três cianobactérias empregando distintas fontes nitrogenadas, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo.
15. Cezare E.A. (1998) Contribuição ao estudo da produção de biomassa de *Spirulina platensis* empregando uréia como fonte de nitrogênio por meio de processo descontínuo alimentado, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo.
16. Sassano C., Carvalho J.C.M., Converti A., Oliveira I.M., Sato S., Torre P., Gioielli L.A. (2002) *Farmácia e Química* 35(2), 37-43.
17. Mahajan G., Kamat M. (1995) g-Linolenic acid production from *Spirulina platensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 466-469.
18. Balloni W., Tomaselli L., Giovannetti L., Margheri M.C. (1980) *Biologia fondamentale del genere Spirulina*. In: *Atti del Convegno Prospettive della coltura di Spirulina in Italia*. Firenze.
19. Becker E.W., Venkataraman L.V. (1980) *Production and Processing of Algae in Pilot Plant Scale Experiences of the Indo-German Project*, North-Holland Biomedical Press, West Germany, India.
20. Ciferri O, Tiboni O. (1985) The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. *Microbiol. (Italy)* 39, 503-526.
21. Lynch D.V., Thompson G.A. (1984) Microsomal phospholipid molecular species alternation during low temperatures acclimation in *Dunaliella*. *Plant Physiol.* 74, 193-197.
22. Roels J.A. (1983) *Energetics and Kinetics in Biotechnology*. Elsevier Biomedical, Amsterdam.
23. Heijnen J.J. (2001) Stoichiometry and kinetics of microbial growth from a thermodynamic perspective. In: Ratledge C. and Kristiansen B., eds., *Basic Biotechnology*, 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 45-58.
24. Lide D.R. (1990) *Handbook of Chemistry and Physics*, 71st edn., CRC, Boca Raton, FL.
25. Li Y, Zhang J., Xie J., Zhao J., Jiang L. (2001) Temperature-induced decoupling of phycobilisomes from reaction centers. *Biochim. Biophys. Acta* 1504, 229-234.
26. Govindjee, Eaton-Rye J.J. (1986) Electron transfer through photosystem II acceptors: interaction with anions. *Photosynth. Res.* 10, 365.