

CULTIVO E PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA CIANOBACTÉRIA *Spirulina* COM MONOETANOLAMINA E RECICLO DE NUTRIENTES

G. M. ROSA¹, L. MORAES¹, B. B. CARDIAS¹, SOUZA, M. R. A. Z., COSTA, J. A. V.

¹ Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos, Laboratório de Engenharia Bioquímica

E-mail para contato: jorgealbertovc@terra.com.br

RESUMO – O cultivo de microalgas converte CO₂ em biomassa por processo biológico, ao passo que a fixação química de CO₂ é realizada artificialmente com melhores resultados. Assim, unir estes processos pode ser uma alternativa para aumentar a captura deste gás de efeito estufa com menor impacto ambiental. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de monoetanolamina no cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18. Para isso, cultivos foram conduzidos em modo semicontínuo, com reciclo de meio, com adição de MEA e sem adição de MEA, em fotobiorreatores tubulares de 2,0 L, a 30 °C, fotoperíodo de 12 h claro/12 h escuro, 41,6 $\mu\text{mol}_{\text{fótons}}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, por 25 d. Nos ensaios com MEA foram obtidos os maiores resultados de produtividade de biomassa (62,1 mg.L⁻¹.d⁻¹), eficiência de utilização de CO₂ (15,8 % m.m⁻¹), biomassa gerada (3,57 g) e concentração de carboidratos na biomassa (96,0 % superior ao ensaio sem MEA). Assim, *Spirulina* pode unir a biofixação de CO₂ com a produção de biomassa enriquecida com carboidratos.

1. INTRODUÇÃO

O aumento na demanda por combustíveis fósseis nos últimos anos desperta o interesse crescente em fontes renováveis de energia baseadas na transformação de biomassa (ELLIOTT *et al.*, 2013). Entre estas, a biomassa de microalgas tem potencial para fornecer energia renovável, oriunda do biodiesel, bioetanol, biohidrogênio e biogás. Além disso, estes micro-organismos têm a capacidade de sintetizar moléculas bioativas, tais como carotenoides, ácidos graxos, antioxidantes, anti-inflamatórios e outros compostos orgânicos valiosos, os quais podem ser utilizados na alimentação, em produtos farmacêuticos e cosméticos, bem como compor biomateriais e nanoestruturas (FERREIRA *et al.*, 2013).

O cultivo semicontínuo é um modo de condução em que uma porção do meio de cultivo é removido periodicamente e o restante é utilizado como o ponto de partida para a continuação da cultura. A quantidade relativa de meio novo adicionado é chamada de “taxa de renovação” e a concentração de biomassa no momento da adição deste meio novo é chamada “concentração de corte” (REICHERT *et al.*, 2006). Este modo de cultivo evita a ocorrência de baixa taxa de divisão celular no início do processo, bem como diminui limitações no que se refere a nutrientes e à penetração da luz no interior da cultura (HO *et al.*, 2012). Contudo, a adição de meio de cultivo

novo a cada corte traz como consequência o aumento da pressão osmótica do meio, o que, segundo Sudhir *et al.* (2005), prejudica o aparato fotossintético de microalgas como *Spirulina*.

O aumento da pressão osmótica no meio diminui a solubilidade do CO₂ (GREEN e PERRY, 2008), a qual é governada pelo equilíbrio termodinâmico da dissociação do ácido carbônico (KIM *et al.*, 2013). Logo, a biofixação de CO₂ por microalgas seria melhorada se maior concentração do gás fosse dissolvido no meio líquido. Ao encontro disso, absorventes químicos, como a monoetanolamina (MEA), podem aumentar a mitigação de CO₂ para o meio de cultivo. Neste contexto, cultivar microalgas em modo semicontínuo com reciclo de nutrientes e adição de absorvente químico pode ser uma alternativa para reduzir os custos com nutrientes e maximizar a produção de biomassa e a biofixação de CO₂.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da adição de monoetanolamina na produção de biomassa e na concentração das principais macromoléculas de *Spirulina*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Manutenção do inóculo

O micro-organismo utilizado foi *Spirulina* sp. LEB 18 (MORAIS *et al.*, 2008). A manutenção do inóculo desta microalga com CO_{2(g)} como fonte de carbono foi alcançada pela decantação do mesmo, ressuspensão em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) sem carbono e a alimentação (0,12 mL_{CO2}.mL_{meio}⁻¹.d⁻¹) com o gás, 1 min, a cada 1 h, durante o período claro.

2.2 Condições de cultivo

Os ensaios foram realizados com concentração celular inicial de 0,20 g.L⁻¹, a 30 °C, fotoperíodo 12 h claro/12 h escuro, 41,6 μmol_{fótons}.m⁻².s⁻¹, agitação promovida pela injeção de ar comprimido (RADMANN e COSTA, 2008). Os experimentos foram realizados em duplicata, com adição de monoetanolamina (MEA, C₂H₇NO), sem adição de MEA (ensaio controle), em fotobiorreatores tubulares verticais (FBRT) de 2,0 L (com 1,8 L de volume útil), por 25 d, conduzidos de forma semicontínua. O CO₂ foi adicionado em vazão específica de 0,36 mL_{CO2}.mL_{meio}⁻¹.d⁻¹, 2 min, a cada 1h, durante o período claro. A concentração celular de corte foi 0,5 g L⁻¹ (REICHERT *et al.*, 2006) e a fração volumétrica de reciclo de meio foi 0,5, sendo que a cada reciclo de meio foi adicionado 0,20 mmol.L⁻¹ de MEA.

2.3 Determinações analíticas

Os ensaios tiveram monitorados diariamente a concentração de biomassa, pH e alcalinidade. Nos dias em que a concentração de biomassa atingiu a concentração de corte foram retiradas amostras também após a realização do corte. A concentração de biomassa foi determinada por densidade óptica das culturas a 670 nm em espectrofotômetro (QUIMIS Q798DRM, Diadema - SP - Brasil), a partir de curva de calibração que relacionou a densidade óptica e massa seca da microalga. O pH foi determinado por medição direta da amostra com pHmetro digital (PH-221,

LUTRON - Taiwan) e a alcalinidade por titulação potenciométrica (APHA, 1998). A concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID) foi calculada a partir das frações de ionização do carbono no meio de acordo com Carmouze (CARMOUZE, 1994).

2.4 Respostas avaliadas do cultivo

A produtividade de biomassa (P_x , $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) (Equação 1) foi obtida com a concentração de biomassa (X , mg.L^{-1}) no tempo t (d) e a concentração de biomassa (X_0 , mg.L^{-1}) no tempo t_0 (d). A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, d^{-1}) foi calculada por regressão linear aplicada à fase logarítmica de crescimento de cada ciclo em um perfil $\ln X$ (g.L^{-1}) contra t (d), no qual o coeficiente angular da reta obtida é $\mu_{\text{máx}}$. A partir deste perfil também foi obtido o tempo de geração (t_g) (Equação 2). A eficiência de utilização de CO_2 (E , % m.m^{-1}) foi calculada segundo a Equação 3, a partir da produtividade de biomassa (P_x , $\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), fração mássica de carbono na biomassa (x_{cbm}), massas molares de dióxido de carbono (M_{CO_2}) e carbono (M_C), volume útil do fotobiorreator ($V_{\text{útil}}$, L) e a taxa mássica de alimentação com CO_2 (\dot{m} , mg.d^{-1}). A biomassa gerada ao final dos ensaios (B_g , g) (Equação 5) foi calculada com a concentração de biomassa obtida ao final de cada ciclo de crescimento (X_{fi} , g.L^{-1}), a concentração de biomassa no início de cada ciclo de crescimento (X_{ii} , g.L^{-1}) e o volume de cultivo retirado em cada corte (V_{Ci} , L).

$$P_x = \left(\frac{X - X_0}{t - t_0} \right) \quad (1)$$

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{\text{máx}}} \quad (2)$$

$$E = P_x * x_{\text{cbm}} * \frac{M_{\text{CO}_2}}{M_C} * V_{\text{útil}} * \frac{1}{\dot{m}} * 100 \quad (3)$$

$$B_g = \sum [(X_{fi} - X_{ii}) V_{Ci}] + (X_{fn} - X_{in}) V_{Cn} \quad (4)$$

2.5 Recuperação da biomassa

A biomassa obtida a cada corte foi separada por centrifugação (HITACHI himac CR-GIII, Tóquio - Japão) a 15200g, 15 min e 20 °C, ressuspensa em água destilada e novamente centrifugada nas mesmas condições. Posteriormente, a biomassa foi concentrada a 50 mL em recipiente estéril, congelada a -80 °C, liofilizada e armazenada a -20 °C até sua caracterização.

2.6 Caracterização da biomassa

Macromoléculas: a análise de proteínas e carboidratos foi realizada a partir de extratos preparados (5 mg de biomassa microalgal e 10 mL de água destilada) sonificados em sonda ultrassônica, com ciclos de 20 min (1 min ligado e 1 min desligado); a concentração de proteínas foi determinada a partir de método colorimétrico (LOWRY *et al.*, 1951) e a concentração de

carboidratos foi determinada por método colorimétrico fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956); a concentração de lipídios foi determinada pelo método de Folch (FOLCH *et al.*, 1957).

Análise elementar de carbono e nitrogênio: foi realizada a cada corte e ao final dos ensaios em Analisador Elementar CHNS/O Serie 2400 (Perkin Elmer).

2.7 Análise estatística

As respostas obtidas foram avaliadas através de análise de variância, seguida por teste de Tukey, com nível de 95% de confiança.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O experimento com MEA alcançou 8 ciclos de crescimento (Figura 1a) em fase log com coeficiente de determinação (R^2) de 0,9826, 0,9963, 0,9933, 0,9832, 0,9853, 0,9998, 0,9888, 0,9999. Este fato aponta que a adição do MEA a cada corte, combinado ao reciclo de nutrientes, foi benéfico ao crescimento de *Spirulina*. O ensaio controle apresentou 5 ciclos de crescimento, sendo obtida fase lag nos 3 primeiros dias, fase log nos 4 primeiros ciclos e em 4 dias do 5º ciclo. Além disso, sem a adição do MEA a microalga atingiu a fase estacionária a partir do 20º d de ensaio (Figura 1b).

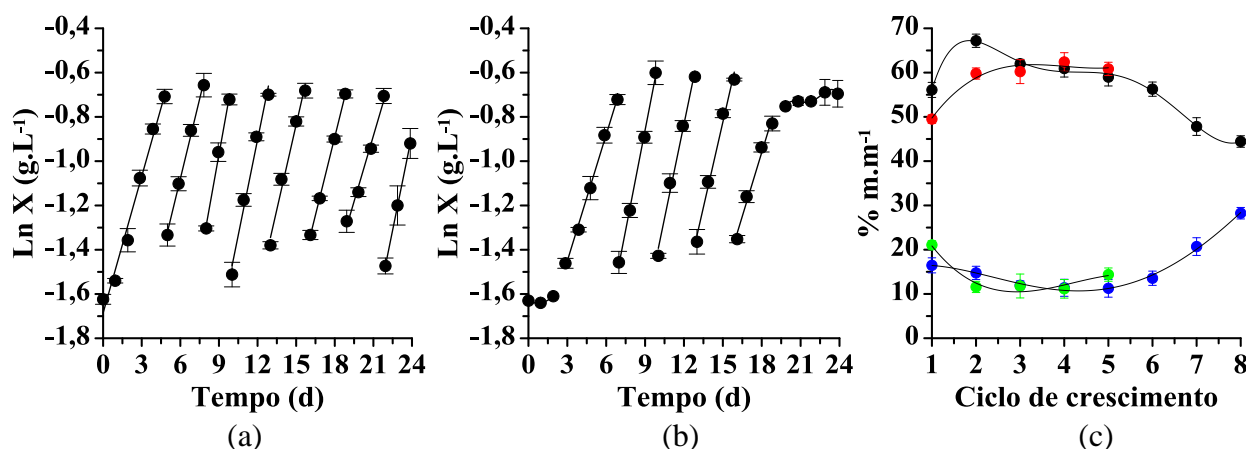


Figura 1 - Perfis médios linearizados de concentração celular de *Spirulina* sp. LEB 18 obtidos com MEA (a) e no ensaio controle (b); concentração média de proteínas (com MEA (●) e ensaio controle (●)) e carboidratos (com MEA (●) e ensaio controle (●)) (c).

O retardo do crescimento pode ocorrer devido ao período de adaptação fisiológica provocado por mudanças nas concentrações de nutrientes (LEE e SHEN, 2004), como por exemplo, o reciclo de meio. A existência de fase log em todos os ciclos de crescimento no ensaio com MEA mostrou que a adição de 0,2 mmol.L⁻¹ do absorvente químico a cada corte, combinado com o reciclo de nutrientes, foi benéfico à multiplicação celular de *Spirulina* sp. LEB 18. Contudo, em ambas as condições testadas neste trabalho, com ou sem adição de absorvente químico, houve deposição de matéria orgânica na superfície lateral interna dos biorreatores. Este fato pode ter inibido a

disponibilidade de luz para o crescimento da microalga, em ambas as condições proporcionadas, devido à blindagem (CHEN et al. 2013) deste material orgânico presente.

A solubilidade do dióxido de carbono no meio líquido diminui com o aumento da temperatura e da concentração salina (GREEN e PERRY, 2008). O meio Zarrouk é composto por uma concentração elevada de sais inorgânicos quando comparado a outros meios de cultivo. Desta forma, a pressão osmótica no meio Zarrouk pode limitar a dissolução de gases mesmo na presença de absorvente químico de CO_2 . O pH do ensaio com adição de MEA e do ensaio controle apresentaram comportamento semelhante ao longo do cultivo de *Spirulina*. Este parâmetro variou entre as médias 7,1 e 8,9 para o ensaio com MEA e entre 6,9 e 8,8 para o ensaio controle. O CO_2 dissolvido no meio participa do equilíbrio químico $\text{CO}_{2(g)} \leftrightarrow \text{CO}_{2(aq)} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-}$. Sendo assim, estes intervalos de pH obtidos podem ser um indicativo de que o carbono estava presente na forma de bicarbonato (RICHMOND, 2004), que é uma das formas preferenciais da microalga absorver carbono (KIM et al., 2013). Neste contexto, as condições empregadas no cultivo de *Spirulina* no presente estudo não mostraram diferença evidente entre o cultivo com adição de MEA e o cultivo controle no que diz respeito à concentração de carbono inorgânico dissolvido (CID), já que a variação entre valores iniciais e finais foram muito semelhantes ($62,4 \pm 0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ - $178,4 \pm 4,9 \text{ mg.L}^{-1}$ e $62,0 \pm 0,0 \text{ mg.L}^{-1}$ - $185,2 \pm 0,8 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente).

Os valores médios dos parâmetros de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, t_g), de biofixação de CO_2 (E) e as concentrações elementares (carbono e nitrogênio), nos cultivos com e sem adição de MEA, não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$). Contudo, a adição de MEA proporcionou melhores resultados máximos de todos os parâmetros avaliados (Tabela 1).

Tabela 1 - Resultados obtidos com cultivo de *Spirulina* com adição de MEA e no cultivo controle de velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), tempo de geração (t_g), produtividade de biomassa (P_x), eficiência de utilização de CO_2 (E), biomassa gerada (B_g) concentração elementar de carbono (C) e nitrogênio (N) na biomassa da microalga

		$\mu_{\text{máx}}$ (d^{-1})	t_g (d)	P_x ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)	E (% m.m^{-1})	B_g (g)	C (% m.m^{-1})	N (% m.m^{-1})
MEA	Máximo	0,323	3,51	62,1	15,8	3,57	47,2	11,2
	Mínimo	0,198	2,15	5,6	1,4	3,17	44,9	9,0
	Média	0,254 ^a	2,80 ^a	26,3 ^a	6,7 ^a	3,35 ^a	45,8 ^a	10,6 ^a
	d. p.*	0,043	0,48	0,9	0,2	0,08	0,6	0,7
		$\mu_{\text{máx}}$ (d^{-1})	t_g (d)	P_x ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)	E (% m.m^{-1})	B_g (g)	C (% m.m^{-1})	N (% m.m^{-1})
Controle	Máximo	0,301	3,64	44,0	11,1	2,66	46,0	11,1
	Mínimo	0,190	2,30	14,8	3,7	2,42	45,6	9,6
	Média	0,245 ^a	2,94 ^a	29,1 ^b	7,4 ^a	2,55 ^b	45,8 ^a	10,5 ^a
	d. p.*	0,051	0,64	1,0	0,3	0,11	0,2	0,7

Letras minúsculas sobrescritas iguais na mesma coluna, para as mesmas respostas, indicam que as médias não diferiram estatisticamente ao nível de 95% de confiança ($p > 0,05$); *d.p.: desvio padrão amostral.

A produtividade de biomassa e a biomassa gerada de *Spirulina* apresentaram comportamento decrescentes ao decorrer dos ciclos de crescimento, semelhante nas duas condições testadas, sendo que os valores médios entre os ciclos de crescimento para P_x foram iguais ($p>0,05$) e a B_g foi maior 31,4 % no ensaio com MEA ($p<0,05$) (Tabela 1). O máximo μ_{\max} foi 7,3 % maior e o mínimo t_g foi 13,5% menor nos ensaios com MEA em relação ao ensaio controle. Reichert *et al.* (2006) em cultivo semicontínuo com *Spirulina* sp. cepa Paracas, com renovação de meio a cada corte, obtiveram μ_{\max} ($0,101 \text{ d}^{-1}$) e P_{\max} ($37,0 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) inferiores aos máximos obtidos no corrente trabalho. Isso ressalta que o uso de meio novo não promove maiores taxas de crescimento e de produtividade de biomassa. Em alguns casos, o reciclo de meio pode provocar uma pequena depleção de nutrientes como o fósforo que, segundo Hu (2004), pode provocar incremento na concentração de compostos de reserva em microalgas procarióticas como *Spirulina*.

A concentração de proteínas na biomassa de *Spirulina* produzida com MEA diminuiu a partir do 3º ciclo de crescimento (Figura 1c) e atingiu o teor médio final de $44,4 \pm 6,9\% \text{ m.m}^{-1}$. Este valor está abaixo do que normalmente é encontrado ($60\text{-}70\% \text{ m.m}^{-1}$) com esta cepa (BORGES *et al.*, 2013). O perfil da concentração de carboidratos ao longo dos ciclos de crescimento (Figura 1c) nos ensaios com MEA indicam que o reciclo de nutrientes pode ter privado a absorção de nitrogênio por *Spirulina* e influenciado a rota metabólica da microalga à formação de carboidratos. Este fato pode ser ratificado pela concentração final de carboidratos, na biomassa cultivada com MEA (8º ciclo), ter sido superior àquela cultivada sem MEA (5º ciclo) (Figura 1c). A concentração de lipídios na biomassa do corrente trabalho, cultivada com MEA ($8,3 \pm 1,4\% \text{ m.m}^{-1}$) e sem MEA ($10,0 \pm 1,2\% \text{ m.m}^{-1}$), foi superior ao encontrado por Borges *et al.* (2013) ($5,0\% \text{ m.m}^{-1}$) e Moraes *et al.* (2009) ($3,3\% \text{ m.m}^{-1}$) com esta cepa de microalga. Estes autores cultivaram *Spirulina* em reatores abertos, o que implica, segundo Chisti (2007), em menor produtividade de biomassa, mas não justifica os baixos teores de lipídios em relação aos encontrados nos presentes experimentos.

A depleção de nitrogênio no cultivo de microalgas causa desperdício de luz pela célula por dissipação de energia na forma de calor e luz na forma de fluorescência. Sendo assim, a microalga perderia eficiência no processo fotossintético, podendo diminuir sua produtividade de biomassa e compostos nitrogenados (KLOK *et al.*, 2013). Desta forma, assim como ocorreu com a concentração de carboidratos, a concentração de lipídios pode ter aumentado, nas duas condições testadas, por escassez ou perda de algum nutriente devido ao reciclo de meio. Nestas condições são obtidas baixas concentrações de clorofila *a* e aumento do conteúdo de carboidratos (HU, 2004). Complementando esta ideia, entende-se que a redução de clorofila está ligada a parte da redução de proteínas, pois segundo Masojídek *et al.* (2004) estes pigmentos verdes são compostos lipofílicos associados em complexos proteicos de microalgas.

4. CONCLUSÃO

A adição de monoetanolamina e o reciclo de meio de cultivo proporcionaram o menor tempo de geração (2,15 d), maiores resultados de produtividade de biomassa ($62,1 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), biomassa gerada (3,57 g) e eficiência de utilização de CO_2 ($15,8\% \text{ m.m}^{-1}$). Ao final da batelada semicontínua, a concentração de proteínas na biomassa de *Spirulina* cultivada com MEA ($44,4 \pm 6,9\% \text{ m.m}^{-1}$) foi cerca de 37,0 % inferior à do ensaio controle ($60,8 \pm 4,0\% \text{ m.m}^{-1}$), mas a

concentração de carboidratos obtidos foi cerca de 96,0 % superior no ensaio com absorvente químico. Diante do exposto, ficou evidenciado que o cultivo com MEA e reciclo de meio pode ser uma alternativa para aumentar a produção de biomassa e carboidratos de *Spirulina* sp. LEB 18. Neste contexto, *Spirulina* pode ser obtida com menores custos com nutrientes, atingindo um espaço em bioprocessos que requeira maiores concentrações desta macromolécula como, por exemplo, a produção de bioetanol.

5. REFERÊNCIAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA) - *Standard Methods. For The Examination of Water and Wastewater*. 20^o ed. Washington: American Public Health Association, 1998.
- 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. *Braz. J. Chem. Eng.*, v. 30, No. 2, p. 277-287, 2013.
- CARMOUZE, J. P. *O metabolismo dos ecossistemas aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas*. São Paulo: Editora Edgard Blucher: FAPESP, 253p., 1994.
- CHEN, C-Y.; KAO, P-C.; TSAI, C-J.; LEE, D-J.; CHANG, J-S. Engineering strategies for simultaneous enhancement of C-phyocyanin production and CO₂ fixation with *Spirulina platensis*. *Bioresource Technol.*, v. 145, p. 307–312, 2013.
- CHISTI Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.*, v. 25, p. 294-306, 2007.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- ELLIOTT, D. C.; HART, T. R.; SCHMIDT, A. J.; NEUENSCHWANDER, G. G.; ROTNESS, L. J.; OLARTE, M. V.; ZACHER, A. H.; ALBRECHT, K. O.; HALLEN, R. T.; HOLLADAY, J. E. Process development for hydrothermal liquefaction of algae feedstocks in a continuous-flow reactor. *Algal Res.*, v. 2, p. 445-454, 2013.
- FERREIRA, A. F.; RIBEIRO, L. A.; BATISTA, A. P.; MARQUES, P. A. S. S.; NOBRE, B. P.; PALAVRA, A. M. F.; SILVA, P. P.; GOUVEIA, L.; SILVA, C. A. Biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga – Energy and CO₂ emission and economic analyses. *Bioresource Technol.*, v. 138, p. 235-244, 2013.
- FOLCH J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, v. 226, p. 497-509, 1957.
- GREEN, D. W.; PERRY, R. H. *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, USA: McGraw-Hill, 3735 p., 2008.
- HO, S-H.; LU, W-B.; CHANG, J-S. Photobioreactor strategies for improving the CO₂ fixation efficiency of indigenous *Scenedesmus obliquus* CNW-N: Statistical optimization of CO₂ feeding, illumination, and operation mode. *Bioresource Technol.*, v. 105, p. 106-113, 2012.

- HU, Q. Environmental Effects on Cell Composition. In: RICHMOND, A. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell Science, 566 p., 2004. Cap. 5, p. 83-93.
- KIM, G.; CHOI, W.; LEE, C-H.; LEE, K. Enhancement of dissolved inorganic carbon and carbon fixation by green alga *Scenedesmus* sp. in the presence of alkanolamine CO₂ absorbents. *Biochem. Eng. J.*, v. 78, p. 18- 23, 2013.
- KLOK, A. J.; MARTENS, D. E.; WIJFFELS, R. H.; LAMERS, P. P. Simultaneous growth and neutral lipid accumulation in microalgae. *Bioresource Technol.*, v. 134, p. 233-243, 2013.
- LEE, Y-K.; SHEN, H. Basic Culturing Techniques. In: RICHMOND, A. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell Science, 566 p., 2004. Cap. 3, p. 40-56.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-276, 1951.
- MASOJÍDEK, J.; KOBLÍZEK, M.; TORZILLO, G. Photosynthesis in Microalgae. In: RICHMOND, A. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell Science, 566 p., 2004. Cap. 2, p. 20-39.
- MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R.; TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J. A. V. Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. *Aquaculture*, v. 294, p. 60–64, 2009.
- MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and Characterization of a New *Arthrospira* Strain. *Z. Naturforsch.*, v.63, p. 144-150, 2008.
- RICHMOND, A. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, London: Blackwell Science, 566 p., 2004.
- RADMANN, E. M; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO₂, SO₂ e NO. *Quím. Nova*, v. 31, nº 7, p. 1609-1612, 2008.
- REICHERT, C. C.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. *Braz. J. Chem. Eng.*, v. 23, No. 01, p. 23-28, 2006.
- SUDHIR, P-R.; POGORYELOV, D.; KOVÁCS, L.; GARAB, G.; MURTHY, S. D. S. The Effects of Salt Stress on Photosynthetic Electron Transport and Thylakoid Membrane Proteins in the Cyanobacterium *Spirulina platensis*. *J. Biochem. Mol. Biol.*, v. 38, No. 4, p. 481-485, 2005.
- ZARROUK, C. *Contribution à l'étude d'unecyanophycée. Influence de diversfacteurs physiques et chimiquessur la croissance et photosynthese de Spirulina maxima Geitler*. Ph.D. Thesis, University of Paris, 1966.