

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

CULTURA DE SPIRULINA MAXIMA EM
MEIO DE CRESCIMENTO CONSTITUÍDO
DE CINZA VEGETAL

Dissertação submetida à Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção do Grau
de Mestre em Ciência dos Alimentos

ANTÔNIO JOSÉ PRUDÊNCIO
(Farmacêutico-Bioquímico)

Orientador: Prof. Dr. Ernani S. Sant'Anna

FLORIANÓPOLIS (SC), JANEIRO DE 1992.

"CULTURA DE SPIRULINA MAXIMA EM
MEIO DE CRESCIMENTO CONSTITUIDO
DE CINZA VEGETAL "

ANTÔNIO JOSÉ PRUDÊNCIO

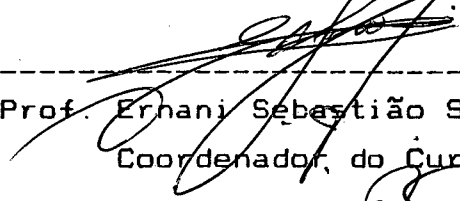
ESSA DISSERTAÇÃO FOI JULGADA ADEQUADA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE

MESTRE EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO - BIOTECNOLOGIA ALIMENTAR, APROVADA EM SUA
FORMA FINAL PELO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

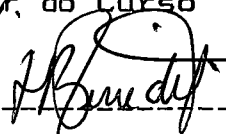


Dr. Ernani Sebastião Sant'Anna
Orientador

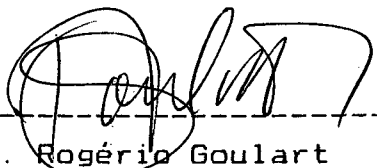


Prof. Ernani Sebastião Sant'Anna
Coordenador do Curso

BANCA EXAMINADORA:



Dr. Honório Domingos Benedet



M.Sc. Rogério Goulart

À minha esposa Vera e
as minhas filhas Fabiana e
Viviane, pela compreensão,
estímulo e inspiração.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ernani Sebastião Sant'Anna, pela orientação e estímulo na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Honório Domingos Benedet, Chefe do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aos mestrandos em Ciência dos Alimentos, Regina Coeli de Oliveira Tôrres e César Damian; aos técnicos de laboratório, Luciano Valdemiro Gonzaga e Francisco Vetúlio Wagner; aos Departamentos de Engenharia Rural do CCA e da Coord. de Extensão do CAL; à Profa. Edna Regina Amante, pela colaboração recebida.

As bibliotecárias da Biblioteca Central e Biblioteca Setorial do CFM/UFSC, Juliana Nedick e Diva Savi Scalco, pela revisão das referências bibliográficas.

As minhas queridas filhas, Fabiana e Viviane, pela participação na revisão e montagem deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta dissertação.

RESUMO

Foram realizadas sessenta culturas de Spirulina maxima em meios de crescimento alternativos constituídos de cinza de carvão vegetal e de palha de arroz.

Em todos os experimentos, houve crescimento de Spirulina. O melhor rendimento de biomassa foi obtido em meio semi-natural à base de cinza de carvão vegetal, que alcançou 108,9% no sistema descontinuo em relação ao meio controle. A produtividade conseguida foi 0,30 mg/l/h. Foi determinada a composição química dos meios propostos.

O melhor meio de cultura alternativo conseguido foi o meio semi-natural, constituído à base de cinza de carvão vegetal e nitrato de potássio.

Palavras-chave: Spirulina maxima; Biomassa de Spirulina maxima; Meio alternativo para Spirulina; Cinza vegetal como substrato para cultura de Spirulina; Cultura de Spirulina.

ABSTRACT

Sixty cultures of Spirulina maxima in alternative growth media constituted by vegetable coal ash and rice straw was realized.

In all of the experiments was growth of Spirulina. The best yield of biomass was obtained in natural medium with vegetable coal reaching 108,9% in intermittent system in relation to control medium. The productivity obtained was 0,30 mg/l/h. The chemical composition of proposed media was determined.

The best growth alternative medium obtained was the natural medium constituted by vegetable coal ash with potassium nitrate.

Key-words: Spirulina maxima; Biomass of Spirulina maxima;
Alternative medium of Spirulina; Vegetable ash with
substratum of medium Spirulina; Culture of Spirulina.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. Cultura de <i>Spirulina maxima</i>	35
3.2. Coleta e preparo das amostras	35
3.3. Preparo dos meios de cultura	36
3.4. Controle, monitoração e coleta da biomassa	38
3.5. Equipamentos e material de consumo	41
3.6. Fluxograma da metodologia	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5. CONCLUSÕES	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE TABELAS

1	- Concentração de <u>Spirulina maxima</u> em meio sintético de Paoletti et al. (Sistema Contínuo)	44
2	- Concentração de <u>Spirulina maxima</u> em meio constituído de cinza de carvão vegetal (Sistema Contínuo)	45
3	- Concentração de <u>Spirulina maxima</u> em meio constituído de cinza de palha de arroz + nitrato (Sistema Contínuo)...	46
4	- Concentração de <u>Spirulina maxima</u> em meio à base de cinza de carvão vegetal + nitrato (Sistema Contínuo)	47
5	- Concentração de <u>Spirulina maxima</u> em meio sintético de Paoletti et al. (Sistema Descontínuo)	48
6	- Concentração de <u>Spirulina maxima</u> em meio constituído de cinza de carvão vegetal (Sistema Descontínuo)	49
7	- Concentração de <u>Spirulina maxima</u> em meio constituído de cinza de palha de arroz + nitrato (Sistema Descontínuo)	50
8	- Concentração de <u>Spirulina maxima</u> em meio à base de cinza de carvão vegetal + nitrato (Sistema Descontínuo)	51
9	- Taxa de crescimento da <u>Spirulina maxima</u> na fase exponencial (Sistema Contínuo)	54
10	- Eficiência na produção de biomassa de <u>Spirulina maxima</u> em relação ao meio sintético (Sistema Descontínuo)...	56
11	- Produtividade de <u>Spirulina maxima</u> nos sistemas contínuo e descontínuo	57
12	- Determinação por absorção atômica dos principais metais e fósforo nos meios naturais (ppm)	62

LISTA DE FIGURAS

- 1 - Efeito do nitrato sobre o crescimento de Spirulina maxima em meios constituídos com cinza vegetal (Sistema Descontínuo) 53
- 2 - Curva de crescimento de Spirulina maxima em meios à base de cinza de carvão vegetal (Sistema Contínuo e Descontínuo) 58
- 3 - Curva de crescimento de Spirulina maxima em meios semi-naturais em relação ao meio controle (Sistema Contínuo) 61

1 . INTRODUÇÃO

O grande aumento populacional e o clima tem sido apontados como as principais causas da escassez de alimentos no mundo. A expectativa é de que a taxa de crescimento da população mundial dobre nos próximos 35 anos, com o agravamento na oferta de alimentos (3).

Nos países em desenvolvimento cuja população representa 70% da população mundial, o valor calórico da dieta de suas populações é muito baixo e há falta de alimentos. O déficit de calorias e a deficiência de proteínas na alimentação, também está ocorrendo em alguns países desenvolvidos. Por este motivo, o estudo e o desenvolvimento de novas fontes produtoras de proteínas comestíveis de baixo custo, estão sendo consideradas um assunto prioritário por muitos países (3).

Nas pesquisas alimentícias ocupa lugar de destaque a descoberta de novas fontes protéicas, que sejam utilizáveis pelos tecidos para o seu crescimento e atividades vitais, isto é, proteínas que contenham aminoácidos essenciais (38).

As principais fontes de proteínas utilizáveis na alimentação humana têm sido de origem vegetal e animal, sendo em ambos os casos escassas, seja pelas quantidades que possuem de proteínas, seja por seu elevado preço sobretudo as de origem animal, que justamente são as que possuem o mais alto valor biológico (38).

A humanidade começa a olhar com mais interesse o mundo dos microrganismos, que devidamente selecionados por sua fácil multiplicação e cultivo, pela elevada proporção de substâncias protéicas assimiláveis e de baixo custo, poderá vir a ser uma fonte alternativa de alimentos.

2) Vários microrganismos já estão sendo usados como fontes protéicas, sendo os mais importantes, as bactérias do gênero Bacillus e Pseudomonas, leveduras como a Saccharomyces, Cândida e as microalgas do gênero Chlorella, Scenedesmus e Spirulina. Alguns destes já estão sendo produzidos em escala industrial para fins alimentícios, tanto animal como humano (12, 37, 38).

12) As microalgas de um modo geral, constituem um sistema extremamente eficiente na produção fotossintética de proteínas, e por este motivo, tem sido realizadas pesquisas microbiológicas nos últimos vinte anos em diversos países sobre a cultura em larga escala, como meio de se obter proteína para fins alimentícios (25).

CULTURA DE SPIRULINA MAXIMA
MEIO DE CRESCIMENTO CONSTITU
DE CINZA VEGETAL.

Os microrganismos fotossintetizantes foram inicialmente denominados de microalgas, sendo muito utilizados pelos astecas na forma de caldo, que era adicionado em todas as suas preparações alimentares. As microalgas foram utilizadas pelos astecas como alimento até a chegada dos conquistadores espanhóis, que restringiram seu uso como forma de dominar os nativos. Os astecas davam o nome de "Tecuitlatl" a esse vigoroso alimento verde, e o misturavam com o milho do mesmo modo que os africanos.

A Spirulina platensis era a microalga mais utilizada pelos nativos do lago "Chad" na África, e a Spirulina maxima no México. Estas primitivas algas unicelulares são conhecidas como as plantas mais antigas do mundo, com uma história que chega a ter três milhões de anos.

Encontram-se tão bem adaptadas em água alcalina que têm permanecido, praticamente sem mudanças evolutivas desde muito antes do aparecimento dos insetos, peixes ou mamíferos sobre a superfície da terra, como atestam os fósseis encontrados no Transvaal (28, 68).

Algumas espécies de microrganismos são consideradas como uma das maiores fontes de alimentos, ou pelo menos, como um complemento nutricional para os animais e os homens. A esses microrganismos se dá o nome de "Single-cell protein" (SCP), que compreende diferentes espécies de bactérias, fungos filamentosos, leveduras e microalgas.

Os trabalhos sobre o valor nutritivo das microalgas, relatam que esses microrganismos possuem alto teor em proteínas, lipídios, carboidratos e aminoácidos essenciais. São considerados também como excelente fonte de vitaminas lipossolúveis, pigmentos, sais mine-

rais, aminos, ácidos graxos insaturados e produtos farmacológicos (12, 25, 28, 36, 37, 38).

3º) LOPEZ (36), ressalta o valor de microrganismos, tais como, Chlorella, Scenedesmus ou Spirulina, que podem competir com o valor nutritivo do ovo, do leite e da carne de vaca, sendo que a Spirulina é a microalga mais indicada na alimentação humana, pelo seu alto teor protéico e por possuir uma parede celular com teor baixo em celulose e por ser mais sensível aos fermentos digestivos.

4º) Estudos nutricionais feitos pelo Instituto Francês do Petróleo (IFP), mostraram que a Spirulina é uma rica fonte de proteínas que contém todos os aminoácidos essenciais em proporções comparáveis a outras proteínas convencionais como carne, ovo, soja e leite, atendendo ainda as exigências da FAO com exceção da metionina que aparece com baixo teor (12, 36, 37).

A biomassa de microalgas possui o conteúdo protéico com uma composição balanceada de aminoácidos, porém com uma certa carência de aminoácidos sulfurados. Esta deficiência pode ser sanada, através do desenvolvimento de espécies produtoras de taxas adequadas de aminoácidos sulfurados (cisteína e metionina), por mutação com o auxílio da engenharia genética (25).

Testes realizados com ratos e frangos mostraram que a Spirulina tem um valor nutritivo elevado e uma boa digestibilidade (25).

Recentemente, o uso de alimentos de fontes fotossintética tem despertado em alguns países, grande interesse na sua produção com fins comerciais. Vários estudos estão sendo conduzidos com microalgas e bactérias vermelhas, como um exemplo típico de possíveis fon-

tes de alimento (3, 25, 36).

As microalgas atuam também como agentes depuradores de águas residuais urbanos e industriais.

5° No caso de águas industriais as microalgas atuam como descontaminantes e desintoxicantes, ao removerem os ions tóxicos poluidores de águas potáveis de córregos e rios.

6° Por outro lado, as águas de esgotos sanitários seriam depuradas pela ação de microrganismos, que decompõem a matéria orgânica ao atuarem na troca fotossintética de gás, ou seja, aproveitamento de CO₂ num sistema fechado, ao mesmo tempo que liberam oxigênio fotossintético. Os principais nutrientes nesses efluentes são o fósforo e o nitrogênio, que são capazes de causar problemas de poluição nos lagos e rios (36, 37).

Os processos convencionais de tratamento são relativamente eficazes, porém de custo elevado na remoção de contaminantes. Normalmente são removidos por esses métodos somente de 20 à 40% dessas substâncias.

O emprego de Spirulina é considerado um dos possíveis métodos que podem ser usados com maior eficácia, na remoção em grande quantidade desses resíduos (36, 37).

Kosaric et al. (35) empregaram este método com excelentes resultados na despoluição dos efluentes e na obtenção da biomassa, com boas características nutricionais compatíveis ao consumo animal ou humano.

O presente trabalho foi motivado pelo fato de que no Brasil os estudos sobre a produção de Spirulina ainda são insuficientes e em países do terceiro mundo a produção de proteínas a partir de microrganismos fotossintetizantes, é ainda considerada de alto custo se produzida pelos processos convencionais de cultura com meios sintéticos.

A cinza de carvão vegetal constitui uma excelente fonte de substâncias minerais, indispensáveis ao cultivo de Spirulina (Tabela 12) (5).

O alto teor em minerais, o pH tamponado, a facilidade de obtenção e seu baixo custo, dão à cinza vegetal uma grande vantagem sobre os demais resíduos na produção de biomassa (5).

Esse trabalho pretende contribuir no desenvolvimento de novos meios de cultura, visando produzir proteínas de alto valor nutritivo com baixo custo e também, colaborar para o aproveitamento de resíduos domésticos e industriais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

72) A Spirulina maxima é uma microalga verde-azulada (Cyanophyta), pertencente a família das Oscillatoriaceae. Apresenta-se com estrutura multicelular, tem bom crescimento em águas alcalinas de pouca profundidade com salinidade elevada, e são encontradas em países situados na África, Ásia, América do Norte e do Sul. Essas regiões encontram-se em latitudes entre 35° S e 35° N, com incidência de luz da ordem de 600 a 850 KJ/cm² por ano e com uma insolação total de 3.000 a 4.000 h/ano (47, 58).

73) A Spirulina possui uma velocidade de crescimento específico elevado, se comparada com outros microrganismos e plantas superiores. Ela pode ser cultivada em sistema contínuo e semi-contínuo e produzida durante o ano todo (58).

Segundo SANTILLAN (58), a Spirulina como outras cianobactérias possui as seguintes propriedades:

a - Ciclo de vida curto, sendo de um dia em condições de laboratório e de 3 a 5 dias em condições naturais.

b - Velocidade de crescimento específico elevado: $0,3 \text{ d}^{-1}$ em condições de laboratório; $0,2 \text{ d}^{-1}$ em condições naturais durante o verão e $0,1 \text{ d}^{-1}$ durante o inverno.

c - Crescimento em meio aquático, permitindo um cultivo com biomassa concentrada, conseqüentemente uma boa eficiência na conversão de energia solar (3 a 4,5%).

d - Alta produção de alimento protéico (28 ton/ha/ano).

e - Tendência à flutuação e agregação de massas, facilitando a coleta.

f - Alto teor protéico, vitamínico, de sais minerais, de carotenos e quantidades moderadas de lipídios e carboidratos.

A classificação das Spirulinas dentro da família das Oscillatoriaceae, se deve ao fato de que várias células resultantes da divisão entre elas, ficam unidas formando um filamento espiralado (trichoma). A reprodução celular se faz por divisão das células dentro do trichoma (19).

As ficocianinas, as ficoeritrinas e uma parte importante dos diversos complexos clorofilados nas microalgas, desempenham um papel importante no processo de óxido-redução fotossintético.

Os carotenóides, são pigmentos abundantes nas membranas das microalgas. Além destes pigmentos, existem outros que atuam também nas reações fotoquímicas (19).

(9) As Espirulinas são algas microscópicas de forma helicoidal. O comprimento médio é de 250μ , quando a microalga possui 7 espirais e o diâmetro é da ordem de 10μ .

Aparentemente, as microalgas, são pertencentes ao grupo de bactérias por possuírem certas características das mesmas e por outro lado, com algas por terem um sistema clorofílico (15).

10^o Atualmente as *Espirulinas* mais cultivadas, pertencem a duas espécies distintas: *Spirulina platensis* e *Spirulina maxima*. A primeira é originária do Chad (África) e a segunda provém do México.

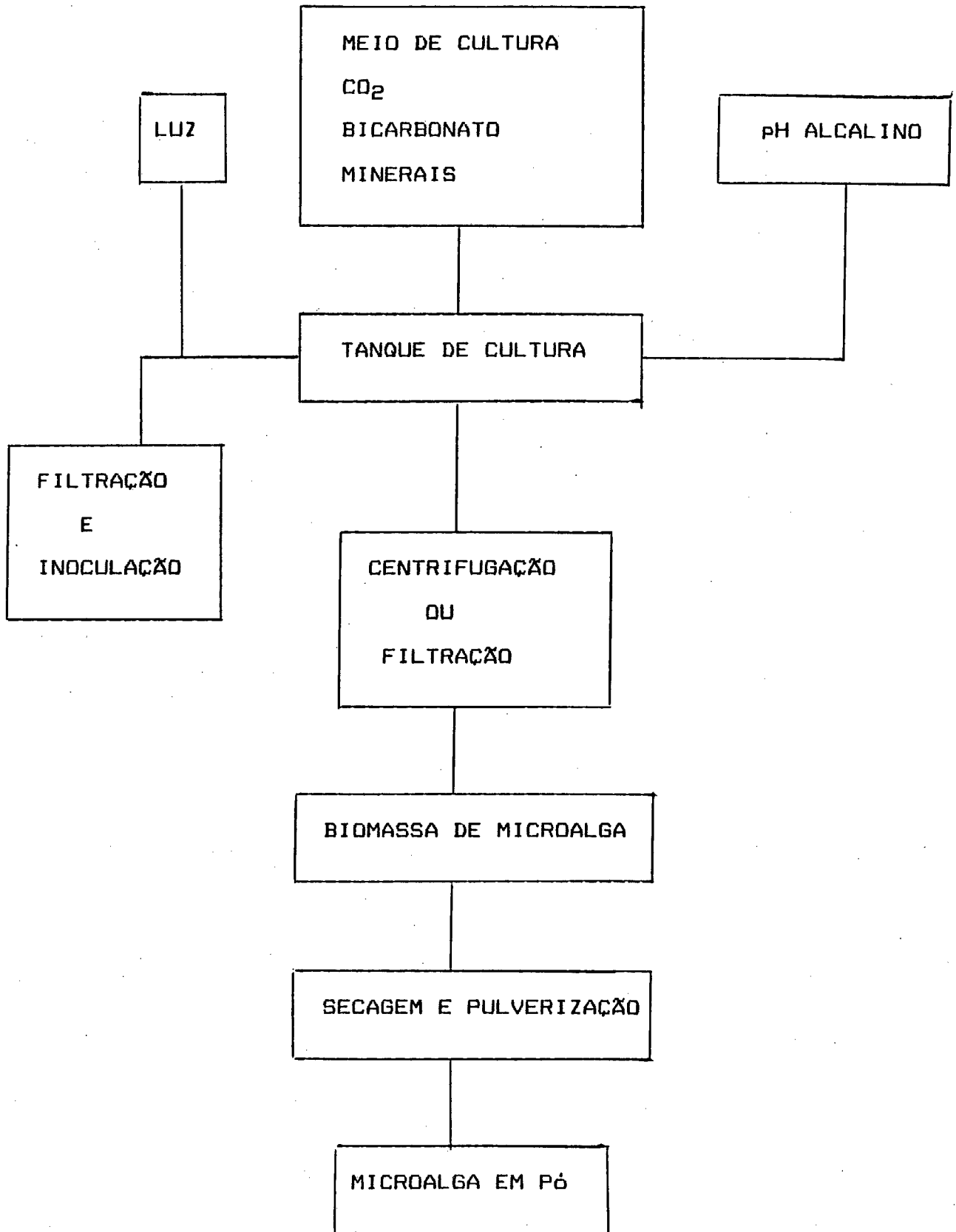
11^o Essas duas espécies vivem em habitat natural no meio de água rica em sais alcalinos, notadamente em bicarbonato e carbonato, formando uma película verde na superfície da água.

As *Espirulinas* podem ser obtidas em meio natural, semi-natural ou em cultura sintética (15, 19).

12^o A *Spirulina platensis* existe naturalmente no lago Chad (África). A superfície dessas águas, varia de alguns hectares à centenas de hectares e a profundidade não ultrapassa a 1,50 m. A temperatura média anual da água é de 25°C e o pH varia de 9,5 à 11,0 (15, 17).

13^o No México, a *Spirulina maxima* é produzida pelo processo semi-natural usando-se a água do lago Texcoco, situado a uns 30 km ao norte da cidade do México. A água para cultivo da *Spirulina* é bombeada do lago para tanques e submetida a uma concentração por meio de evaporadores solares (15).

SANTILLAN (58), sugere o seguinte esquema no processamento industrial de biomassa de *Spirulina*:



O meio sintético da Spirulina, requer os seguintes nutrientes:

- a - Gás carbônico
- b - Nitrogênio
- c - Enxofre
- d - Potássio
- e - Fósforo
- f - Magnésio
- g - Cálcio
- h - Micronutrientes

O pH deve ser na faixa de 9 à 11, a salinidade com 3 à 8%, a temperatura com 30 à 32°C e com alta iluminação (58).

A Spirulina é considerada uma promissora fonte de alimentos de alto valor nutritivo, e pode ser facilmente cultivada à luz do dia (10, 67).

Nas próximas décadas, prevê-se que a produção e o uso de biomassa de microalgas, será praticado por muitos países.

As microalgas Spirulina maxima e Spirulina platensis têm sido propostas como fonte de alimentos para a dieta do homem e dos seguintes animais: moluscos, peixes, aves e mamíferos (4, 32).

A produção de biomassa de microalgas, poderá ser de grande importância em regiões áridas e semi-áridas, onde a agricultura tradicional não encontra condições para se desenvolver.

As regiões mais favoráveis para a produção de Spirulina ao ar livre, encontram-se situadas aproximadamente a 35º de latitude nor-

te e sul do equador. Essas regiões são muito ensolaradas, não possuem variação acentuada de temperatura e são pouco chuvosas.

Nestas condições favoráveis, a produção média anual de uma cultura em meio sintético é em torno de $12 \text{ g/m}^2/\text{dia}$ de microalgas secas, ou aproximadamente 40 ton/ha/ano de biomassa seca, o que representa, 28 ton/ha/ano de proteínas (4, 15).

A velocidade de crescimento das Espirulinas, nas condições ideais de cultura em laboratório e com um fotoperíodo de 12 horas, permite estipular uma produção teórica de $42 \text{ g/m}^2/\text{dia}$ de biomassa seca.

Nas condições externas (tanques de cultivo ao ar livre), o rendimento médio anual é de $12 \text{ g/m}^2/\text{dia}$ de matéria seca (19).

Segundo LOPEZ (37), a produção da microalga "Chlorella" realizada em condições normais de cultivo, poderá alcançar de 15 a $25 \text{ g/m}^2/\text{dia}$ de biomassa seca, chegando a 60 T/ha/ano .

A Spirulina se constitui numa rica fonte de proteínas de ótima qualidade, contendo os principais aminoácidos essenciais, sais minerais e vitaminas (12, 28, 56).

Segundo YOSHIDA & HOSHII (76) a Spirulina contém as seguintes substâncias:

SUBSTÂNCIAS	(g/100g de biomassa seca)
Proteínas	60 - 70
Carboidratos	10 - 20
Lipídios	5
Cinzas	7
Fibras	2
Umidade	6

HANSSEN (28), faz a seguinte comparação do valor protéico da Spirulina com as principais fontes protéicas convencionais:

AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS	SPIRULINA	Prot. FAO	OVO	SOJA
g % proteínas				
Fenilalanina	4,40	2,80	6,00	4,95
Isoleucina	6,02	4,20	6,80	5,30
Leucina	8,65	4,80	9,90	7,70
Lisina	4,53	4,20	6,30	6,30
Metionina	2,45	2,20	3,10	1,37
Treonina	5,14	2,80	5,00	3,95
Triptofano	1,61	1,40	1,70	1,49
Valina	5,56	4,20	7,40	3,95

Em 1980, RICHMOND (55) relata que a Spirulina também é boa fonte em vitaminas e sais minerais, contendo os seguintes valores:

VITAMINAS	(mg/kg)
Beta caroteno	1.700
Cianocobalamina (B ₁₂)	1.6
Pantotenato de cálcio	11
Ácido fólico	0.5
Inositol	350
Niacina (B ₃)	118
Piridoxina (B ₆)	3
Tiamina (B ₁)	55
Tocoferol (E)	190

SAIS MINERAIS	(mg/kg)
Cálcio	1.180
Fósforo	8.280
Ferro	528
Sódio	344
Cloro	4.200
Magnésio	1.663
Zinco	33
Potássio	14.353

SANTILLAN (58), em 1982 encontrou na Spirulina os seguintes componentes: 70% de proteína bruta, vitaminas, principalmente do grupo B, E e H (Biotina), ácidos nucléicos na proporção de 4,2 à

4,4%, assim como, de 6,2 à 7,0% de ácidos graxos insaturados. Os principais pigmentos encontrados foram: B - caroteno com 0,23%, xantofilas na proporção de 0,12 à 0,15% e ficobilinas na quantidade de 12 à 15%.

MATERASSI et al. (42), estudaram diversas espécies de microalgas do gênero Spirulina para obtenção de vitamina B₁₂ e observaram que estes microrganismos possuem alta capacidade de sintetizar este tipo de vitamina.

O Instituto Francês de Petróleo (IFP), também considera a Spirulina maxima como sendo uma fonte rica em proteínas, contendo aminoácidos essenciais na proporção comparável a outras fontes convencionais de proteínas, recomendados pela FAO.

Em 1974 NGUYEN et al. (48), relatam testes em ratos e frangos demonstrando que a Spirulina maxima possui um bom valor nutritivo e boa digestibilidade.

Considerando o valor nutritivo da Spirulina maxima e a relativa simplicidade no seu cultivo e coleta, devido ao seu tamanho comparado com outras microalgas, várias plantas pilotos estão sendo desenvolvidas e testadas na França, Argélia e México (25).

Em 1975 FLORENZANO (25), verificou que a biomassa de microalgas comparada com outras fontes protéicas contém um baixo teor em ácidos nucléicos e alto teor em vitaminas e carotenóides.

Segundo FLORENZANO (25), a utilização de biomassa de microalgas pelo homem como alimento, apresenta certa dificuldade em seu aproveitamento por causa da parede celulósica das células de Spirulina, as quais não são digeridas pelo homem.

Contudo para FLORENZANO (25), esse problema poderá ser resolvido, fazendo-se a lise enzimática da parede celular, que irá transformar a biomassa num produto alimentício de boa digestibilidade, podendo ser introduzida na dieta humana.

MATERASSI et al. (42), ao contrário do que afirma FLORENZANO (25), relatam que a biomassa de Spirulina apresenta uma boa qualidade nutricional e tem sido recomendada para a dieta animal e humana.

A Spirulina tem sido muito estudada como sendo uma futura fonte de alimentos. Possui alto teor em proteínas (60 à 70%) em matéria seca, contém todos os aminoácidos essenciais, apresenta alto teor em pigmentos especialmente carotenóides, boa digestibilidade e ausência de compostos tóxicos (4, 12, 46).

A riqueza de proteínas (65 à 70%) da matéria seca de Spirulina explica o seu interesse como futura fonte alimentícia (8, 9, 59).

SAUTIER et al. (57), testaram diversas amostras de Spirulina maxima, na preparação de alguns pratos da culinária francesa.

A biomassa de Spirulina preparada sob diversas formas (atomizada, liofilizada, hidrolizada e descolorida com álcool), foi utilizada em sopas, omeletes e sobremesas.

A regulamentação para consumo de Spirulina está sendo estudada pelo México, Japão, Canadá, EUA, França, Inglaterra, Alemanha, Nova Zelândia, Austrália, Coréia e outros países, cujo consumo vem des-

pertando cada vez mais interesse (58).

Normalmente as microalgas crescem suspensas na água alcalina contida em tanques rasos e bem iluminados. Nestes tanques existem meios de cultura formados por sais, carbonatos, nitratos e fosfatos dissolvidos na água (63).

Existem dois métodos, segundo SANTILLAN (58), para o cultivo da Spirulina: a cultura artificial e a semi-natural.

O primeiro método foi desenvolvido pelo Instituto Francês do Petróleo (IFP), que se baseia na agitação, homogeneização e suplementação com CO₂ como fonte de carbono. Este método tem sido testado em projetos piloto de pequeno porte, com uma área aproximadamente de 1.000 m² (58).

O segundo método conhecido por semi-natural, foi desenvolvido pela Companhia Mexicana Sosa Texcoco S/A, o qual consiste no uso de águas alcalinas do lago Texcoco com pH 11,0, suplementada com nutrientes para aumentar a produção de biomassa. É um método que tem sido usado com sucesso, resultando disso uma produção de aproximadamente 3.000 toneladas de biomassa de Spirulina durante 9 anos (58).

O tanque de crescimento para Spirulina tem em torno de 0,5 m de profundidade, com sistema de chicana e recirculação do meio de cultura com auxílio de um aparelho misturador (58).

CLÉMENT (15), recomenda que os tanques de grande superfície devem ser construídos de maneira econômica e, munidos de agitação suficiente para que a utilização da luz e dos sais sejam aproveitados da melhor maneira possível na cultura de Spirulina.

O tanque de cultura do Instituto Francês do Petróleo (IFP), consiste de uma plataforma horizontal contendo uma divisória no centro, e com uma lâmina de meio de cultura de 10 à 20 cm de altura. Nas extremidades do tanque, existe um compartimento de distribuição do gás (CO₂) à cultura, para manutenção do pH e serve também como propulsor da circulação do meio de cultura no tanque.

Tanques deste tipo, medem 5 m² de superfície, sendo que a coleta da biomassa é feita regularmente e o meio de cultura, é constantemente corrigido para repor os sais minerais utilizados pela Spirulina (15).

A coleta industrial da Spirulina é feita através de filtração por gravidade com auxílio de uma tela com malhas reduzidas ou com um filtro convencional. Usa-se também, filtro horizontal com emprego de vácuo parcial. A biomassa é lavada sobre o filtro para que se remova os resíduos de sais minerais do meio de cultura.

A secagem da Spirulina é efetuada de maneira clássica, usando-se aquecedores cilíndricos ou por atomização. Após a secagem a Spirulina pode ser estocada sem alterações na sua biomassa (15).

Segundo IEHANA (30), a biomassa de Spirulina pode ser separada do meio de crescimento por filtração, coagulação, sedimentação ou centrifugação.

O meio de cultura para Spirulina, requer todos os elementos necessários para o desenvolvimento de organismos autotróficos, tais como: N, P, Mg, S, Fe, K e Na. Os microelementos indispensáveis são Ca, Cl, B, Mn, Mo, Co, Zn e Cu (19).

MACCARTHY et al. (39), constataram em pesquisas, a influência do Mg^{+2} , Na^{+} e K^{+} , na velocidade de crescimento de microalgas. A participação destes metais no meio de cultura, influi muito sobre o processo bioquímico da microalga.

LÓPEZ et al. (38), utilizaram o nitrogênio nítrico (NO_3-N) e o sulfato de amônio ($(NH_4)_2 SO_4$), como fontes de nitrogênio em meios sintéticos para a produção de microalgas.

O nitrogênio líquido, é a fonte mais adequada de nitrogênio para a síntese de aminoácidos e de proteínas totais.

→ LÓPEZ (37), em 1981 constatou que a melhor assimilação do nitrogênio pela microalga, provém de fonte que contém em seu meio o nitrato. As respostas das células a este nutriente são de origem fisiológica, facilitando o crescimento, dando tamanho e aspecto celular mais próprio de microalgas.

→ Em 1985, BOLD & WYNNE (10), também verificaram que a fixação do nitrogênio do meio é muito comum entre as microalgas. O nitrogênio pode ser suplementado pelo NO_3 , NO_2 , ou NH_4 .

Segundo LOPEZ (37), quando no meio de cultura existe o nitrogênio amônico na forma de $(NH_4)_2SO_4$, a quantidade de nitrogênio

consumida é bem menor e a cultura descora ficando amarelo esverdeado, causando uma parada do crescimento, com um aumento anormal das células.

O consumo de nitrogênio usando-se nitrato no cultivo de Chlorella, é de 373 mg por g de peso seco da microalga contra, 277 mg com a utilização de nitrogênio amônico $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (38).

→ Em 1980 EYKELENBURG (20), constatou que a temperatura, a intensidade de luz e a concentração de nitrato exercem um efeito muito grande na velocidade de crescimento da Spirulina.

→ Segundo EYKELENBURG (20), a alta concentração de nitrato, aumenta a produção e a velocidade de crescimento da Spirulina à temperatura de 35°C.

A utilização do nitrato, baseia-se na sua redução à nitrito, hidroxilamina e a íons amônia. A ativação deste mecanismo, se dá pela luz incidente sobre as cianobactérias no meio de cultura.

WU & POND (72), em 1981, empregaram como fonte sintética de crescimento para a Spirulina maxima, o seguinte meio:

SUBSTÂNCIAS	(g/l)
NaNO ₃	2.50
NaHCO ₃	12.00
MgSO ₄	0.09
K ₂ HPO ₄	0.10
NaCl	1.00
EDTA	0.001

Sol. de Microelementos		1.00
Água destilada	q. s. p.	1.000

Composição da solução de microelementos, segundo WU & POND (72):

SUBSTÂNCIAS		(g/l)
H ₃ PO ₃		2.50
FeCl ₃ 6H ₂ O		0.80
MnSO ₄ H ₂ O		0.20
NaSeO ₃		0.20
CoCl ₂ 6H ₂ O		0.15
MoO ₃		0.02
CaCl ₂		2.50
ZnSO ₄ 2H ₂ O		0.10
Água destilada	q. s. p.	1.000

IEHANA (30) em 1987 usou no cultivo de Spirulina, as seguintes substâncias como meio sintético: 10g de NaHCO₃; 0.25g de K₂HPO₄; 2.5g de NaNO₃; 1.0g de K₂SO₄; 1.0g de NaCl; 0.2g de MgSO₄ 7H₂O; 0.04g de CaCl₂ 2H₂O; 0.01g de FeSO₄ 7H₂O e 0.09g de EDTA. Também foi usado 1 ml de solução de microelementos.

PAOLETTI et al. (49) utilizaram como meio sintético para a Spirulina, a seguinte composição:

SUBSTÂNCIAS	(g/l)
NaCl	0.92
Na ₂ SO ₄	1.88
Na 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 7H ₂ O	0.25
Fe - EDTA	1.00 ml
Solução de Microelementos	1.00 ml
Água destilada q.s.p.	1.000 ml

Preparo das soluções, segundo PAOLETTI et al. (49):

1 - Fe-EDTA: EDTA-Na ₂	29.8g
FeSO ₄ 7H ₂ O	24.9g
Água destilada q.s.p.	1.000 ml

2 - Solução de Microelementos:

SUBSTÂNCIAS	(mg/l)
SnCl ₂ 2H ₂ O	304
MnCl ₂ 4H ₂ O	173
CoCl ₂ 5H ₂ O	194
SeCl ₂ 6H ₂ O	146
BaCl ₂ 2H ₂ O	2.846
LiCl	293

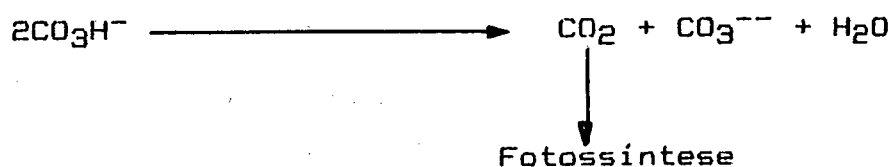
CuSO ₄ 5H ₂ O		186
NiSO ₄ 6H ₂ O		717
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O		121
Água destilada	q.s.p.	1.000 ml
o pH do meio deverá ser de		9.4 ± 0.2

O cultivo de Spirulina requer um meio alcalino com muitos sais minerais, predominando carbonato e bicarbonato de sódio.

↳ Para um crescimento ótimo CLÉMENT (15), recomenda que o pH do meio de cultura esteja entre 8,5 à 11,0, e a temperatura em torno de 32°C.

O CO₂ necessário para manter o pH durante a fotossíntese provém do próprio meio, que contém ions de carbonatos e bicarbonatos (15).

Segundo CLÉMENT (15), o mecanismo de assimilação do carbono, se dá da seguinte maneira:



Durante o período de crescimento da Spirulina, a concentração de ions carbonato aumenta. Para recompor a reserva de ions bicarbonato, injeta-se CO₂ conforme a necessidade do meio.

↳ A alcalinidade do meio de cultura da Spirulina é um fator muito favorável para se obter com facilidade, a nutrição carbonada de uma cultura em grande escala.

↳ O meio alcalino fornece inicialmente, uma reserva razoável de ions bicarbonatos na cultura, estabelecendo um teor de CO₂ de re-

serva para o pH se manter constante (15).

Segundo DUMARTRAIT et al. (19), a tolerância de salinidade pela Spirulina é alta (7 à 56g/l), o pH ótimo é de 8 à 11, com os limites extremos de \approx 7,0 à 11,3, e a temperatura ideal é de 32 à 40°C. A passagem de ar com CO₂, na cultura de micralga, melhora o crescimento.

KOSARIC et al. (36), recomendam como fonte de carbono o emprego de 2% de Co₂ no ar usado, o qual irá servir também para estabilizar o pH na faixa de 8,5 à 10,0.

A Spirulina maxima cresce e vive em condições alcalinas, podendo sofrer inibição no seu crescimento com pH inadequado.

Trabalhos experimentais realizados em 1974 por KOSARIC et al. (36), revelaram que o pH ideal para a produção de Spirulina maxima em meio sintético, está na faixa de 9,0 à 10,0 e, o seu pH ótimo é em torno de 9,5.

KOSARIC et al. (36), verificaram também, que o crescimento foi drasticamente reduzido a pH 11,0 e completamente inibido a pH 8,0 ou menos. O crescimento da Spirulina em meio sintético, aumenta linearmente após o período de 14 dias, com uma concentração de mais de 2g/l de biomassa seca. A biomassa foi coletada por filtração, lavada com água destilada, para remover os sais presentes e, depois de limpa, foi secada a 105°C até peso constante e estocada a 0°C, para conservação e análise.

IEHANA (30) em 1987 cultivou Spirulina em grande quantidade, usando como pré-cultura, células incubadas em frascos de vidro,

contendo o volume de 200 ml de meio sintético esterilizado. As culturas foram incubadas a 30°C, com pH na faixa de 9,2 a 9,7 e iluminadas, dia e noite, com lâmpadas fluorescentes (Matsushita Electric Co, 20W FL, 20, SSD), com irradiação de 1,70 cal/cm²/h. A concentração de células foi medida num intervalo de um a dois dias, com auxílio de um espectrofotômetro (Shimazu Seisakusho Co., Spectro-20). A leitura das amostras foi feita a 560 nm e as células após serem separadas por filtração foram secas em estufa.

Ainda segundo IEHANA (30), a luz irradiada deve conter grande quantidade de luz azul, vermelha e verde, para promover a fotossíntese de microalgas e plantas. A concentração de células, dificilmente aumenta nos primeiros quatro dias. A fase exponencial, se dá do sexto ao vigésimo dia em cultura de grande quantidade.

KOSARIC et al. (36) em 1974, cultivaram microalgas em frasco erlenmeyer de 250 ml, contendo 100 ml de meio. As culturas foram iluminadas com 4.000 lux, usando lâmpadas fluorescentes de 40 Watts. As experiências foram conduzidas em agitador, à temperatura de 30°C ± 0,5°C.

TORZILLO et al. (65) em 1984, determinaram o efeito da tensão de oxigênio sobre o crescimento e a produção de proteínas na biomassa de Spirulina maxima. A experiência foi realizada em frascos de vidro com capacidade de 500 ml, contendo 300 ml de meio de cultura padrão para Spirulina, sob agitação de 100 rpm e luz branca fluorescente com intensidade de 7.000 lux à 30°C.

KOSARIC et al. (36) relatam em suas experiências realizadas em 1974 sobre o cultivo de Spirulina, que a alta intensidade de luz melhora sensivelmente o crescimento pela ativação das células e do processo de fotossíntese. A média de 4.000 lux foi a melhor intensidade de luz encontrada para o meio de crescimento utilizado. O tempo de iluminação também afeta o crescimento, assim como, a produtividade. As culturas sob iluminação contínua, resultam em maior rendimento do que em períodos intermitentes de 12 horas, tanto no meio sintético quanto no meio com resíduos.

EYKELENBURG (20) em 1980, cultivou Spirulina platensis, usando meio mineral em recipientes cilíndricos de 10x10 cm, com iluminação de luz fluorescente (Philips TL-33, 40 Watts), com incidência de 300 a 2.100 lux. A temperatura oscilou entre 15 a 30°C, e o nitrato de sódio foi usado como fonte de nitrogênio, na proporção de 0 a 300 mM. O crescimento da Spirulina foi determinado pelo peso seco, obtido pela coleta diária de uma amostragem que, após filtrada, foi lavada e secada a 70°C por 24 horas.

COHEN et al. (16) em 1986, determinaram a composição de ácidos graxos de Spirulina cultivada em meio sintético, usando frascos de vidro contendo 500 ml do meio em banho-maria, sob luz branca fluorescente. A intensidade de luz sobre a cultura foi de 1500 E/m²/sec, e o meio foi saturado com uma mistura de ar-CO₂ (99:1), à temperatura de 30-35°C. As culturas tiveram um crescimento exponencial após o sexto dia, confirmando as afirmações de IEHANA (30).

MATERASSI et al. (41) em 1984 demonstraram em experimentos, que a Spirulina maxima pode ser facilmente adaptada em água salgada, enriquecida com nitrato, fosfato, bicarbonato e Fe-EDTA. As experiências foram conduzidas em períodos diurnos e noturnos, com ciclo de 12 horas cada obtiveram 500 mg.l^{-1} . Os resultados obtidos, mostraram que não há diferenças significativas na produtividade de Spirulina, produzida em água do mar enriquecida e comparada com produção em meio sintético. A biomassa produzida em meio contendo água salgada, foi determinada pelo peso seco de células coletadas com auxílio de papel de filtro (Sartorius tipo SM 11301). As amostras foram lavadas duas vezes, com solução de NaCl a 0,4%, e secas à 105°C até obter peso constante. Durante o período noturno a produtividade foi menor, resultando numa perda maior de biomassa em cultura com água do mar (6% do peso seco) contra, 3,9% da cultura com meio controle, contrariando as afirmações de KOSARIC et al. (36).

GARRET et al. (27) em 1978, obtiveram biomassa de Chlorella vulgaris, usando como meio de cultura resíduos animais. A mistura semi-líquida utilizada como amostra, foi obtida de lodo de chiqueiros e, estocadas sob repouso, aproximadamente por cinco semanas. O líquido sobrenadante foi filtrado em malhas de 2 mm e centrifugado a 7.000 rpm, por 2 minutos. A fase líquida foi diluída na proporção de 1:1, com água destilada estéril. O volume de amostra utilizado foi de 250 ml em frasco de vidro com tampão de algodão. A amostra foi inoculada com 1 ml de células de cultura estoque de Chlorella.

A cultura estoque foi mantida em agar inclinado, contendo: 0,1% de proteose peptona; 0,02% de KNO_3 ; 0,002% de K_2HPO_4 ; 0,002% de $\text{MgSO } 7\text{H}_2\text{O}$ e 1% de agar.

O crescimento da microalga foi determinado pela contagem de células, usando-se um hemocitômetro e microscópio de contraste de fase.

A determinação do peso da biomassa foi feita pela coleta, centrifugação e secagem das células obtidas.

Segundo GARRET et al. (27), a possibilidade de culturas de microalgas, a partir de líquidos provenientes de resíduos de detritos de animais, é viável porque associa o processo de reciclagem de nutrientes, com a síntese de biomassa e a purificação de resíduos poluidores.

KOSARIC et al. (36) em 1974 cultivaram Spirulina maxima, usando como meio de cultura águas de efluentes, provenientes da estação municipal de tratamento de esgoto de Londres.

O pH do efluente usado (inicialmente na faixa de 6,8 à 7,3), foi corrigido para 9,5 usando-se 1g/l de bicarbonato de sódio, que além de servir como tampão do meio, evita uma mudança brusca do pH durante a fase de crescimento. A inoculação de Spirulina maxima foi de 0,5 g de células secas para 10 litros do meio de cultura. A melhor taxa de crescimento foi encontrada após o sexto dia, com decréscimo de biomassa após esse tempo. A concentração máxima de células obtidas foi de 0,77 g/l de efluente após nove dias de cultura.

Ainda segundo KOSARIC et al. (36), o percentual de crescimento e a produtividade da biomassa em efluentes tratados foi menor do que no meio sintético, devido a deficiência de nutrientes nos resíduos utilizados.

KOSARIC et al. (36) verificaram também neste experimento, que a melhor faixa de temperatura para cultura de Spirulina em meio sintético foi de 30 à 40°C e com efluente ficou entre 25 à 35°C. O crescimento foi completamente inibido a 10°C e 45°C.

WU & POND (72) em 1981 realizaram testes de crescimento de Spirulina, usando detritos de animais (aves, suínos e gado), previamente fermentados. O liquor utilizado foi enriquecido com nutrientes sintéticos (KH_2PO_4 ; NaCl ; NaHCO_3 e Uréia).

O resíduo de aves foi considerado uma boa fonte de nitrogênio para a produção comercial de microalgas. Os resíduos fermentados de suínos, revelaram-se como boa fonte de fósforo inorgânico, amônia, magnésio e manganês no cultivo de Spirulina.

Os demais "liquors" de resíduos fermentados de animais apresentaram-se pobres em fósforo e nitrogênio.

AYALA & BRAVO (4) em 1973 utilizaram, também com sucesso, detritos animais (porco, gado e carneiro), após fazê-los passar por um processo de fermentação anaeróbica em biodigestores, para produzir Spirulina. O líquido efluente foi usado no preparo de meios de cultura, revelando-se como uma boa fonte de nutrientes para a produção de biomassa de microalgas.

A massa seca obtida nos meios de cultivo com efluentes foi de 795 à 1.230 mg/l, contra 1.115 mg/l em meio sintético.

Nos meios com resíduos animais obteve-se de 57 à 63% de proteína bruta, contra 62,5% em meio controle. A eficiência na conversão de nitrogênio atingiu de 64 à 67%, e em meio sintético obteve-se somente 24%. A taxa de crescimento da microalga foi determinada diariamente por densidade ótica a 560 nm. Na coleta das células, usou-se também filtração através de papel de filtro Whatman.

A temperatura de cultivo da Spirulina foi de $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, com uma luminosidade de 3 a 30 Klux durante o período diurno.

As experiências realizadas por AYALA & BRAVO (4), mostraram que efluentes de detritos de animais fermentados são passíveis de serem utilizados como fontes alternativas, no preparo de meios de cultura para a Spirulina.

NGUYEN et al. (46) em 1974 cultivaram Spirulina maxima em efluentes oriundos do esgoto do Centro Municipal de Ontário, localizado no Canadá. Os meios de cultura usados nos experimentos foram preparados com água residual de efluentes do Centro de Controle de Poluição de Ontário, tendo como controle o meio empregado por CLÉMENT (15).

Esses meios foram acondicionados em recipientes de vidro, esterilizados em autoclave a 2 atm e 120°C por 15 minutos, sendo em seguida resfriados e conservados em geladeira.

As culturas foram iluminadas com lâmpadas fluorescentes, com intensidade de 1.200 lux e aeradas com ar contendo 2% de CO_2 , o qual foi dispersado nos meios com a velocidade de 0,5 vvm, com auxílio de um agitador magnético.

A temperatura de cultivo foi mantida à $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com auxílio de um incubador. O pH foi controlado na faixa de 8,5 a 10 pelo ajuste do teor de CO_2 contido na mistura de ar, fornecida aos meios.

O inóculo usado foi de 0,5 g de Spirulina seca, previamente cultivada em meio de cultura estoque, debaixo das mesmas condições de cultivo dos experimentos.

NGUYEN et al. (47) coletaram a biomassa por filtração em papel de filtro Whatman, a qual foi lavada várias vezes com água destilada, para remover os sais dissolvidos. As amostras depois de secas e resfriadas foram transformadas em pó fino e mantidas a 0°C para análises. Os resultados obtidos demonstraram que a biomassa de Spirulina produzida em meios contendo somente água residual de esgotos, apresentaram um baixo teor de proteínas, comparado com o meio sintético usado como controle.

A proporção relativa de aminoácidos das proteínas obtidas por NGUYEN et al. (47), foi constante e comparável com amostras cultivadas em meio sintético.

No meio contendo resíduos de efluentes, após dez dias de cultivo, obteve-se os seguintes resultados em peso seco: proteína 28,3%; carboidratos 43,2%; gorduras 9,2%; cinzas 14,5% e umidade 4,7%. Por outro lado, no meio sintético, a percentagem em peso seco foi a seguinte: proteína 63,1%; carboidratos 16,6%; gorduras 1,0%; cinzas 13,9% e umidade 5,0%.

Segundo NGUYEN et al. (47), a variação na percentagem de proteínas e elevação das demais substâncias, se deve, unicamente, à deficiência de nitrogênio e outros nutrientes, nas amostras de meios contendo resíduos de efluentes.

NGUYEN et al. (47) observaram ainda, que ocorre um decréscimo na produção de proteínas e elevação no teor de carboidratos, gorduras e cinzas na biomassa de microalgas, quando a quantidade de nutrientes especialmente de nitrogênio no meio de cultura forem deficientes.

Ainda de acordo com NGUYEN et al. (47), os quais citam que LEWIN em (1962), ao realizar pesquisa sobre microalgas, verificou também que a deficiência de nitrogênio no meio, acarreta um decréscimo da ordem de 8 à 10% de peso seco em proteínas, e um aumento de 2% de gorduras em 80% de várias espécies de Chlorella e Scenedesmus.

A cinza de carvão vegetal, por ser rica em sais minerais se constitui numa fonte alternativa de nutrientes, para o cultivo de microalgas.

Os metais em maior abundância na cinza são o ferro, o cálcio, o magnésio, o sódio, o potássio, o silício, o alumínio e o titânio.

A cinza contém um grande número de substâncias metálicas e semi-metálicas, que se apresentam na forma de óxidos básicos e óxidos ácidos (5).

O carvão vegetal produz uma cinza com alto teor de óxidos básicos. Os óxidos básicos de ferro, cálcio, magnésio, sódio e potás-

sio representam de 63 à 68% dos constituintes minerais existentes em cinza de madeira e linhita (5).

A madeira e a linhita possuem os seguintes percentuais de óxidos básicos e óxidos ácidos (5):

ÓXIDOS BÁSICOS

	MADEIRA	LINHITA
Fe ₂ O ₃	1.6	6.0
CaO	56.5	59.7
MgO	4.7	2.0
Na ₂ O	0.5	0.2
K ₂ O	0.1	0.5

ÓXIDOS ÁCIDOS

	MADEIRA	LINHITA
SiO ₂	33.8	17.9
Al ₂ O ₃	2.6	13.2
TiO ₂	0.2	0.5

Segundo MALAVOLTA (40), a cinza contém todos os elementos existentes nas plantas, menos o nitrogênio que se perde durante a queima.

O potássio se encontra na cinza na forma de óxido (K₂O), e principalmente como carbonato (K₂CO₃).

O teor de potássio é muito variável, conforme a origem da cinza. A cinza de palha de café, contém 20% de óxido de potássio; a cinza de palha de arroz 2%; e a cinza de caieiras 3%.

A cinza de origem vegetal, contém em sua composição as seguintes substâncias (40):

óxido de potássio (K_2O)	1 à 20%
óxido do cálcio (CaO)	5 à 25%
óxido de magnésio (MgO)	2 à 5%
Pentóxido de fósforo (P_2O_5)	1 à 2%

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultura de Spirulina maxima

A cultura original de Spirulina maxima usada nos experimentos, foi cedida pela faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - Departamento de Tecnologia das Fermentações.

O inóculo foi preparado em meio sintético de PAOLETTI et al. (49) e, também, nos meios experimentais para adaptação da Spirulina.

3.2. Coleta e Preparo das Amostras

As amostras de cinza foram coletadas em sacos plásticos, previamente desinfetados e secos. A cinza de carvão vegetal foi conseguida de churrasqueiras domésticas e de churrasqueiras de Florianópolis/SC. Quanto as amostras de cinza de palha de arroz, foram for-

necidas pela empresa de beneficiamento de arroz de Alonso da Silva sediada em Tijucas/SC.

A cinza coletada, após passar em malha de 50 e 80 meshes foi pesada e dissolvida em água destilada. A dissolução da cinza foi feita sob agitação por 24 horas, para dissolução dos sais existentes na amostra, sendo em seguida filtrada em tecido de algodão, para a remoção dos sólidos insolúveis.

O filtrado ficou em repouso, para perfeita decantação das substâncias sólidas em suspensão.

O sobrenadante, depois de filtrado em papel de filtro fino, foi esterilizado e determinado o seu pH.

O pH do filtrado ficou entre 10 e 10,3, dentro portanto da faixa ideal de pH (9-11) preconizada por CLÉMENT (15).

3.3. Preparo dos Meios de Cultura

Os sobrenadantes foram preparados nas concentrações de: 50, 75, 100, 125 e 150 g/litro de cinza seca. Essas diluições serviram para determinar a concentração mais adequada de cinza para a constituição do meio de crescimento experimental.

Esses sobrenadantes foram testados com *Spirulina maxima*, sendo escolhido o filtrado contendo 100 g/l de cinza seca, o qual foi denominado de meio de crescimento natural.

Considerando que a cinza é pobre em nitrogênio, os meios de crescimento à base de cinza foram corrigidos com NO_3 , conforme recomendação de LOPEZ (37), e denominados de meios de crescimento semi-naturais.

Os meios de crescimento semi-naturais foram elaborados da seguinte forma:

- Solução de cinza (100 g/l)	130 ml
- KNO_3 (51.4 g/l)	5 ml
- <i>Espirulina</i> (170 g/l)	15 ml

Parte dos meios de crescimento semi-naturais foram suplementadas com todos os nutrientes contidos no meio controle (carbonato, fosfato, Fe-EDTA, bicarbonato, magnésio, cloretos e com solução de micronutrientes) para se verificar as deficiências nutritivas dos mesmos.

Os volumes dos meios de crescimento utilizados nos experimentos foram de 150 ml, colocados em frascos erlenmeyer de 500 ml, os quais continham 10% de inóculo e foram agitados a 96 rpm.

O meio de cultura sintético foi denominado de meio controle e preparado de acordo com PAOLETTI et al. (49).

Foram realizados sessenta experimentos com meios de crescimento naturais e semi-naturais visando obter dados mais precisos. Foram realizadas 10 repetições de cada meio experimental.

3.4. Controle, Monitoração e Coleta da Biomassa

O pH dos meios de crescimento foi determinado durante todo o período de crescimento, com auxílio de potenciômetro (pH meter E520) a cada 24 horas.

De acordo com CLÉMENT (15), a temperatura empregada foi de $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

A luz foi fornecida através de duas lâmpadas fluorescentes de 65 W e quatro lâmpadas ativa folhas de 60W cada.

A composição química dos meios experimentais foi determinada pelos seguintes métodos: O Nitrogênio foi feito de acordo com o método de Kjeldahl (Instituto Adolfo Lutz) (31). Os metais e fósforo foram determinados utilizando-se um Spectrofotômetro de absorção atômica (VARIANT AA-1475) do Laboratório de Química do Solo - CCA/UFSC, usando-se a metodologia descrita no Boletim nº 5 do Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia/UFRGS e o Standard Methods, 15.ed., 1980.

Os experimentos foram realizados em período contínuo e semi-contínuo, com duração de 216 horas de cultivo em cada período.

No período contínuo, o processo de fotossíntese não sofreu interrupção durante as 216 horas de cultura, com ativação dia e noite da Spirulina.

Quanto ao período semi-contínuo, a fotossíntese foi feita com luz e temperatura adequada, somente no período de 12 horas diárias e durante o dia.

Com relação à curva de crescimento, esta foi determinada a cada 24 horas medindo-se a densidade ótica a 560 nm num espectrofotômetro, durante as 216 horas de cultivo, de acordo com procedimentos realizados por IEHANA (30) e AYALA & BRAVO (4).

A coleta das células de Spirulina foi feita através de filtração de alíquotas do meio cultivado, usando-se papel de filtro Millipore (RAWP 047), conforme preconizado por AYALA & BRAVO (4) e NGUYEN et al. (48).

A biomassa foi determinada em balança de precisão (Sauter Máx. 200 g/div. 0,1 mg), através das células secas a 100°C por uma hora e a curva de crescimento do meio natural e semi-natural pelas seguintes equações de reta: $x(g/l) = 0,7143y$ para os meios natural e semi-natural e $x(g/l) = 0,55851y + 0,0008$ para o meio sintético.

Além dos estudos sobre os parâmetros de cultura (pH, luz, temperatura e tempo) foram também verificados a velocidade de crescimento, o rendimento e a produtividade da biomassa de Spirulina, conforme se vê nas tabelas de 9 à 11.

A velocidade de crescimento na fase exponencial foi determinada pela equação:

$$\mu = \frac{dx}{dt}$$

Legenda: μ = veloc. de crescimento da microalga

dx = conc. de células

dt = tempo de cresc. na fase exponencial

A eficiência dos meios de crescimento propostos foi calculada pela produção máxima de células obtidas durante as 216 horas, em relação à biomassa total produzida no meio sintético.

Quanto ao cálculo da produtividade, determinou-se pela seguinte equação:

$$P = \mu \cdot x \cdot v$$

$$P = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt} \cdot x \cdot v$$

$$P = \frac{dx}{dt} \cdot v = \text{mg.l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

Legenda: P = produtividade da microalga

μ = veloc. de crescimento da microalga

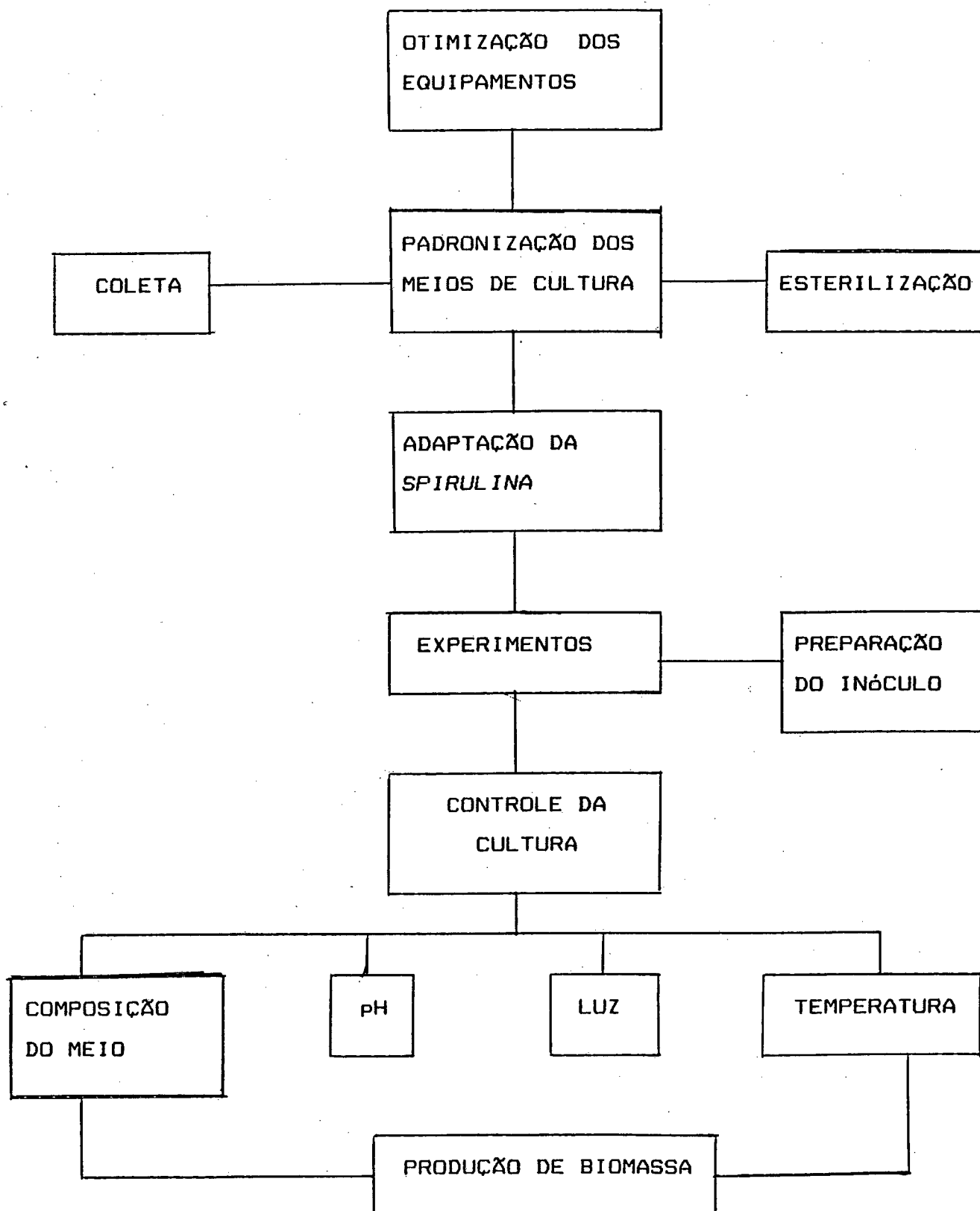
x = conc. de células da microalga

v = volume que contém a biomassa

3.5. Equipamentos e Material de Consumo

- Estufa aeróbica de secagem e esterilização de 120°C, marca Fanem
- Dessecador Pyrex
- Espectrofotômetro (Spectronic 20 da Bausch & Lomb)
- Balança de Precisão, marca Sauter (máximo 200 gr/divisão 0,1 mg)
- Potenciômetro (pH meter E 520 Metrohm Herisau)
- Autoclave, marca Fabbe modelo 103
- Agitador tipo Shaker com termostato de 96 rpm, marca Fanem
- Bomba à vácuo 1/4 HP, marca Brasil
- Lâmpadas fluorescentes, marca Philips TL 65 W/54 RS, luz do dia
- Lâmpada Pholha, 220/230 v, marca Philips de 60 W
- Vidraria de laboratório
- Sais minerais e solventes p.a.
- Frascos erlenmeyer de 500 ml
- Peneiras com 50 e 80 meshes
- Papel de filtro Whatman nº 1
- Papel Millipore (RAWP 047)
- Frasco de Kitazatto e funil de Büchner
- Spectro fotômetro de absorção atômica (VARIANT AA-1475)

3.6. Fluxograma da Metodologia



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as sessenta amostras de meios natural e semi-natural contendo cinzas vegetais apresentaram crescimento de Spirulina maxima (Tabelas 2, 3, 4, 6 e 8).

A biomassa de Spirulina obtida em meio sintético em 9 dias foi de 415 mg.l^{-1} no sistema contínuo e 459 mg.l^{-1} no sistema descontínuo (Tabelas 1 e 5).

No meio natural o crescimento variou de 363 mg.l^{-1} a 484 mg.l^{-1} no sistema contínuo e de 430 à 500 mg.l^{-1} no sistema descontínuo, conforme se vê nas tabelas 2, 3, 4, 6, 7 e 8). Pode-se observar também nestas tabelas que o meio semi-natural no sistema descontínuo, obteve a melhor produção, ou seja, 500 mg/l em 9 dias contra 459 mg.l^{-1} obtida em meio sintético no mesmo sistema.

O meio de crescimento natural à base de cinza vegetal apresentou uma variação mínima do pH, ficando na faixa de 10,0 à 10,3 durante as 216 horas de cultura, tanto no processo contínuo como no descontínuo. A temperatura manteve-se entre 28 à 32°C .

Tabela 1 - Concentração de *Spirulina maxima* em meio sintético de Paoletti et al. (Sistema Contínuo).

pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Biomassa (mg.l ⁻¹)
10.2	28	0	169
10.2	30	24	198
10.1	31	48	219
10.2	30	72	246
10.2	32	96	258
10.1	30	120	285
10.2	31	144	315
10.2	30	168	356
10.2	29	192	375
10.2	30	216	415

Tabela 2 - Concentração de *Spirulina maxima* em meio constituído de cinza de carvão vegetal (Sistema Contínuo).

pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Biomassa (mg.l ⁻¹)
10.3	28	0	124
10.2	29	24	169
10.0	30	48	203
10.1	31	72	234
10.2	30	96	248
10.3	30	120	280
10.3	32	144	306
10.2	31	168	326
10.2	30	192	342
10.3	30	216	363

Tabela 3 - Concentração de *Spirulina maxima* em meios constituído de cinza de palha de arroz contendo KNO_3 (Sistema Contínuo).

pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Biomassa (mg.l^{-1})
10.0	28	0	124
10.1	30	24	158
10.0	29	48	183
9.9	30	72	210
10.0	30	96	221
10.1	32	120	249
10.1	30	144	294
10.0	29	168	326
10.1	30	192	354
10.0	31	216	395

Tabela 4 - Concentração de *Spirulina maxima* em meio constituído de cinza de carvão vegetal contendo KNO_3 (Sistema Contínuo).

pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Biomassa (mg.l^{-1})
10.2	28	0	124
10.1	30	24	169
10.3	30	48	203
10.2	31	72	227
10.1	32	96	247
10.0	31	120	276
10.2	29	144	321
10.2	30	168	363
10.2	31	192	420
10.3	32	216	484

Tabela 5 - Concentração de *Spirulina maxima* em meio sintético de Paoletti et al. (Sistema Descontínuo).

pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Biomassa (mg.l ⁻¹)
10.2	29	0	177
10.3	31	24	198
10.1	31	48	215
10.2	31	72	234
10.2	30	96	291
10.2	31	120	360
10.3	31	144	396
10.1	30	168	405
10.2	29	192	432
10.3	30	216	459

Tabela 6 - Concentração de *Spirulina maxima* em meio constituído de cinza de carvão vegetal (Sistema Descontínuo).

pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Biomassa (mg.l ⁻¹)
10.3	29	0	143
10.3	31	24	169
10.2	31	48	180
10.3	31	72	209
10.2	30	96	277
10.1	31	120	363
10.2	30	144	384
10.2	29	168	395
10.1	30	192	406
10.2	31	216	430

Tabela 7 - Concentração de *Spirulina maxima* em meio constituído de cinza de palha de arroz contendo KNO_3 (Sistema Descontínuo).

pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Biomassa (mg.l^{-1})
10.1	29	0	143
10.0	30	24	168
10.1	31	48	178
9.8	31	72	205
9.8	30	96	270
9.5	31	120	360
9.2	29	144	381
9.2	30	168	395
9.5	31	192	405
9.5	30	216	430

Tabela 8 - Concentração de Spirulina maxima em meio constituído de cinza de carvão vegetal contendo KNO_3 (Sistema Descontínuo).

pH	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Biomassa (mg.l^{-1})
10.3	29	0	143
10.3	31	24	169
10.2	31	48	180
10.3	31	72	209
10.2	30	96	284
10.1	31	120	351
10.0	31	144	384
10.2	30	168	417
10.2	30	192	456
10.2	30	216	500

A fase de crescimento exponencial (log fase), em meio semi-natural no sistema descontínuo, ocorreu após as 72 horas iniciais de incubação (vide Figura 1). No sistema contínuo a "log fase" se deu nas primeiras 24 horas de incubação, conforme se vê na Figura 3. A taxa de crescimento na "log fase" no sistema contínuo do meio à base de cinza de carvão vegetal com nitrato, foi de $2,24 \cdot 10^{-3}$ mg. h^{-1} , contra $1,82 \cdot 10^{-3}$ mg. h^{-1} no meio constituído de cinza de palha de arroz com nitrato. No meio sintético a taxa foi de $1,92 \cdot 10^{-3}$ mg. h^{-1} , conforme mostra a tabela 9.

Durante o cultivo da Spirulina nos meios à base de cinza vegetal, observou-se que esses meios ficaram de cor verde amarelada quando há redução ou ausência de nitrogênio e verde escuro, quando devidamente suplementado com nitrato. O teor de nitrato adicionado nos meios de crescimento foi de $1,71$ g. l^{-1} .

O meio de crescimento semi-natural no sistema descontínuo apresentou um rendimento de biomassa maior do que os demais meios de crescimento, conforme se vê na figura 1.

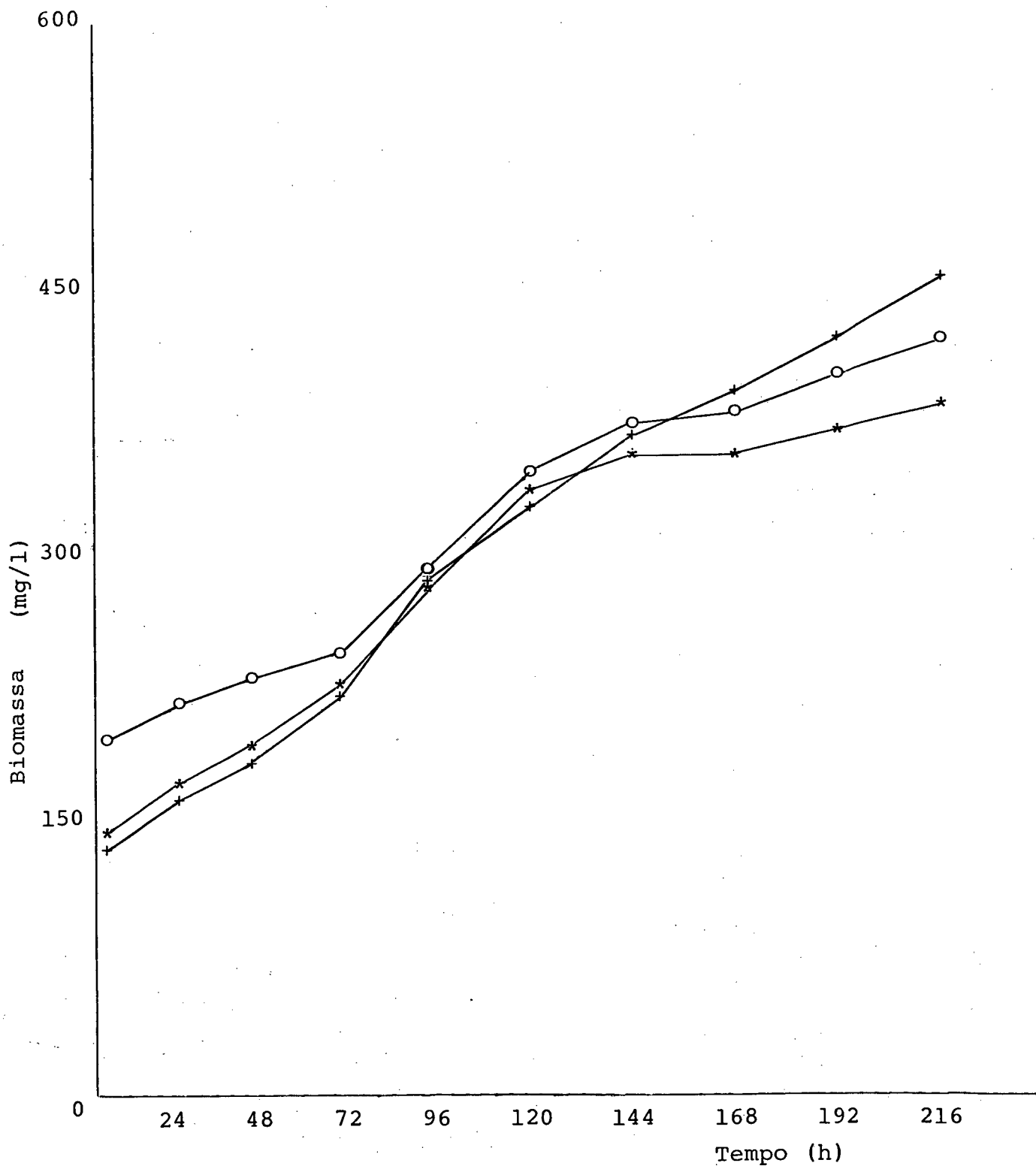


Figura 1 - Efeito do nitrato sobre o crescimento de *Spirulina maxima* em meios constituídos de cinza vegetal (Sistema Descontínuo).

Legenda: * - meio natural
 + - semi-natural
 o - meio sintético

Tabela 9 - Taxa de crescimento da *Spirulina maxima* na fase exponencial (Sistema Contínuo).

Meios	(mg.l ⁻¹)
Sintético	1,92 . 10 ⁻³
Semi-natural (*)	1,82 . 10 ⁻³
Semi-natural (**)	2,24 . 10 ⁻³

(*) Cinza de palha de arroz + nitrato

(**) Cinza de carvão vegetal + nitrato

Na tabela 10 pode-se observar que o meio semi-natural constituído de cinza de carvão vegetal, proveniente de churrasqueira, apresentou uma melhor eficiência do que o meio de crescimento com cinza de palha de arroz.

O nitrogênio total encontrado nos meios de crescimento constituídos de cinza de carvão vegetal e palha de arroz foram: 28 mg.l^{-1} e 49 mg.l^{-1} respectivamente contra 350 mg.l^{-1} no meio sintético.

Considerando o baixo teor de nitrogênio, os meios de crescimento foram suplementados com nitrato na dosagem de 233 mg de nitrogênio por litro de meio. Essa suplementação foi feita para igualar à concentração de nitrogênio com o meio controle.

O processo descontínuo demonstrou ser o melhor método para o cultivo de Spirulina, com maior produtividade de biomassa (Tabela 11 e Figura 2).

A produtividade poderá ser aumentada significativamente se a Spirulina maxima for cultivada em tanques de crescimento com maior intensidade de luz e reação mais prolongada de fotossíntese da microalga.

Tabela 10 - Eficiência na produção de biomassa de Spirulina maxima em relação ao meio sintético (Sistema Descontínuo).

Meios	Produção máxima (mg.l ⁻¹)	Eficiência (%)
Sintético	459	100,0
Natural (*)	430	93,7
Semi-Natural (**)	430	93,7
Semi-Natural (***)	500	108,9

Legenda: (*) cinza de carvão vegetal
 (**) cinza de palha de arroz + nitrato
 (***) cinza de carvão vegetal + nitrato

Tabela 11 - Produtividade de Spirulina maxima nos sistemas contínuo e descontínuo.

Sistemas	Meios	Produtividade (mg.l ⁻¹ .h ⁻¹)
Contínuo	Sintético	0,17
	Natural (*)	0,17
	Semi-Natural (**)	0,19
	Semi-Natural (***)	0,25
Descontínuo	Sintético	0,23
	Natural (*)	0,23
	Semi-Natural (**)	0,23
	Semi-Natural (***)	0,30

Legenda: (*) cinza de carvão vegetal

(**) cinza de palha de arroz + nitrato

(***) cinza de carvão vegetal + nitrato

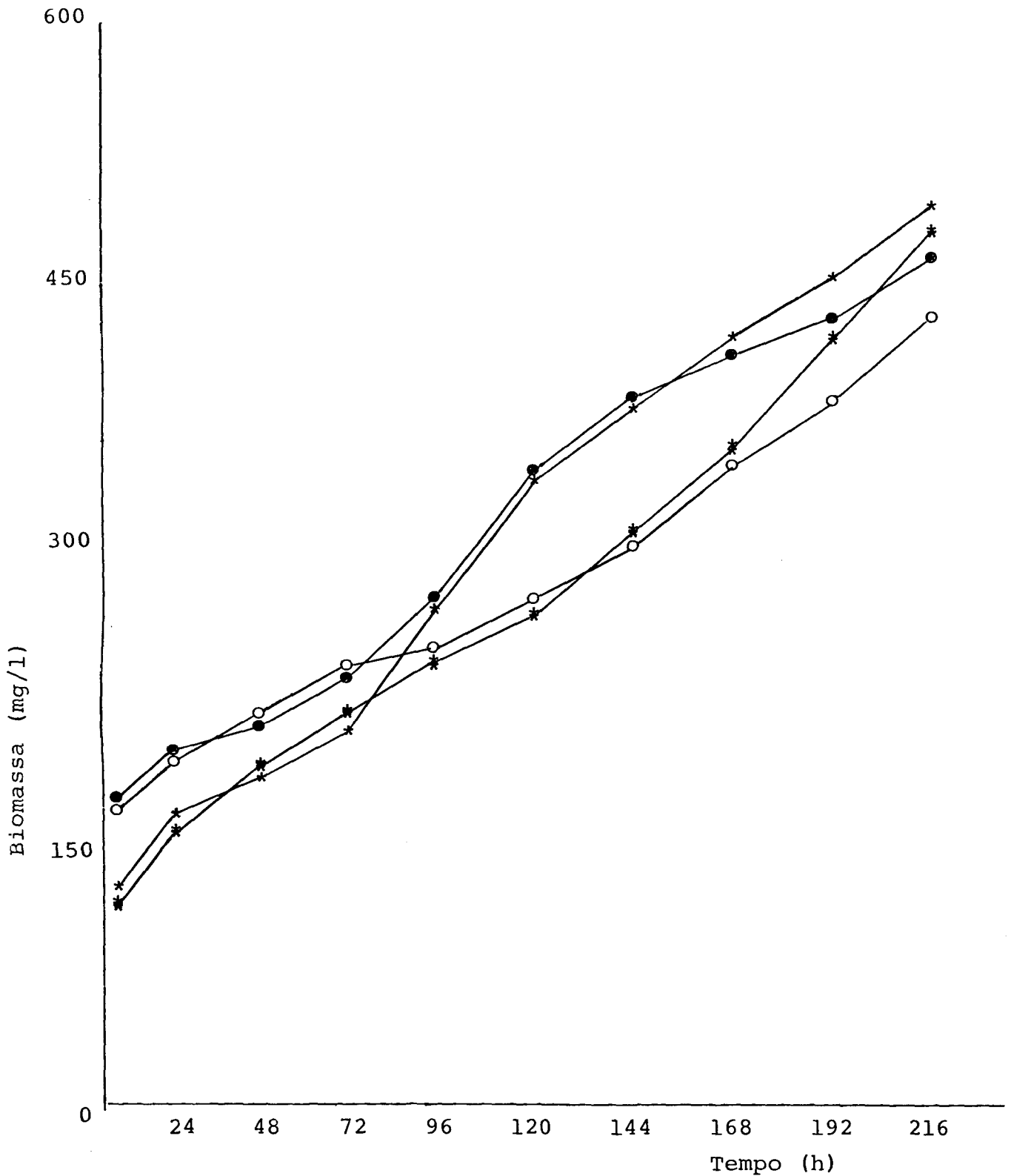


Figura 2 - Curva de crescimento de *Spirulina maxima* em meios à base de cinza de carvão vegetal (Sistema Contínuo e Descontínuo)

Legenda:

- † - meio semi-natural (contínuo)
- * - meio semi-natural (descontínuo)
- o - meio sintético (contínuo)
- - meio sintético (descontínuo)

Após o cultivo não se registrou a presença de resíduos minerais ou precipitações de sais nos meios propostos, permitindo obter-se uma biomassa isenta de impurezas com excelente qualidade.

A cor da biomassa obtida adquiriu tom verde-azulado, quando secada em estufa a 70°C por 1 hora com atmosfera saturada de CO₂, e verde escuro após a secagem em estufa aeróbica, a 110°C por 1 hora.

O crescimento da Spirulina apresentou melhor eficiência e produtividade no meio semi-natural à base de cinza de carvão vegetal, se comparado com o meio constituído de cinza de palha de arroz e do meio controle, conforme se vê na Figura 3 e Tabela 11.

Os meios semi-naturais além de serem testados com nitrato foram também suplementados com nutrientes do meio controle, os quais não revelaram aumento significativo no rendimento da biomassa.

A análise por absorção atômica, apresentou resultados que revelaram a composição mineral dos meios naturais empregados, os quais possuem quase todos os elementos inorgânicos existentes nos meios sintéticos para o cultivo de Spirulina (Tabela 12).

Pode-se observar pela Tabela 12, que houve um grande consumo de metais (magnésio, cálcio, ferro, sódio e potássio) pela Spirulina, nos meios empregados. Os demais elementos foram parcialmente utilizados, com exceção do cádmio e cromo que apresentaram traços nas amostras analisadas.

A análise serviu também para avaliar o potencial de minerais existentes nos meios propostos, considerando-se que, após 216 horas de cultivo ainda permaneceram nesses meios um teor de elementos metálicos e fósforo, suficientes para continuar a cultura e obter um rendimento mais expressivo de biomassa.

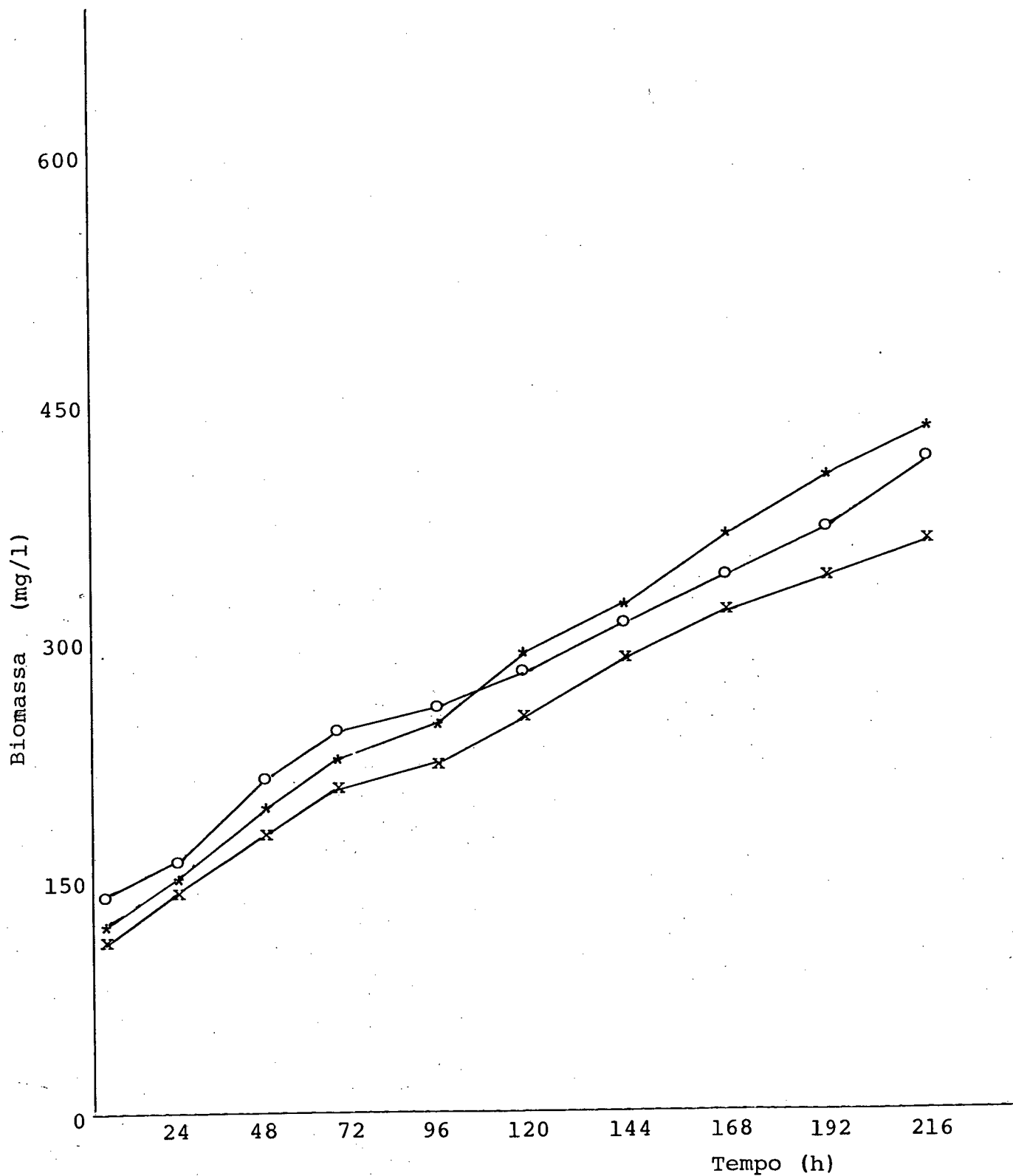


Figura 3 - Curva de crescimento de *Spirulina maxima* em meios semi-naturais em relação ao meio controle (Sistema Contínuo).

Legenda: * - meio semi-natural (cinza de carvão vegetal + KNO₃)
 x - meio semi-natural (cinza de palha de arroz + KNO₃)
 o - meio sintético

Tabela 12 - Determinação por absorção atômica dos principais metais e fósforo nos meios semi-naturais em ppm.

Meios	Cd	Cu	Zn	Pb	Hg	Ca	Mn	Cr	Fe	K	Na	P
A ₁	0,10	1,45	0,45	0,45	58,5	14,8	0,20	traços	7,35	4.718	2.000	3,30
A ₂	0,07	0,09	0,23	0,29	40,2	3,28	0,18	traços	3,57	3.750	1.750	2,70
A ₃	traços	1,15	0,20	0,20	11,0	18,8	0,10	traços	6,00	5.209	2.460	2,40
A ₄	traços	0,89	0,09	0,17	3,3	7,68	0,06	traços	1,92	4.250	2.000	2,18

Legenda:

A₁ - Cinza de carvão vegetal + nitrato

A₂ - Cinza de carvão vegetal + nitrato (após 216 horas de cultivo)

A₃ - Cinza de palha de arroz + nitrato

A₄ - Cinza de palha de arroz + nitrato (após 216 horas de cultivo)

5. CONCLUSÕES

1. Os meios de cultura constituídos de cinza vegetal, apresentaram ótimo teor de fósforo e minerais com exceção do nitrogênio. Esses meios apresentaram também um pH estável na faixa de 10 à 10,3.

2. O melhor rendimento de biomassa obtido foi em meio de crescimento semi-natural à base de cinza de carvão vegetal em sistema descontínuo, que apresentou uma eficiência de 108,9% em relação ao meio controle. A maior produtividade ($0,30 \text{ mg.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$), também foi obtida com esse meio de crescimento.

3. A cinza de carvão vegetal ou de resíduos agrícolas, por reunir em sua composição quase todos os elementos minerais, deve ser melhor investigada como meio de cultura alternativo, para a produção em escala industrial de biomassa de Spirulina de baixo custo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADRIAN, J., FRANGNE, R. Comportement thermique des microorganismes alimentaires: Levedures et algues spirulines. *Ind. Alim. et Agric.*, Bellevue, p.1365-1375, 1975.
2. AL'BITSKAYA, O.N., ZAITSEVA, G.N., ROGOZHIN, S.V. et al. Characterization of the protein product from the *Spirulina platensis* biomass. *Appl. Biochem. and Microbiol.*, Moscow, v.15, n.5, p.568-570, 1979.
3. ARAI, S., YAMASHITA, M., FUJIMAKI, M. Enzymatic modification of proteins extracted from photosynthetic microorganisms *Spirulina maxima* and *Rhodospseudomonas capsulatus*. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, Tokyo, v.22, p.447-456, 1976.
4. AYALA, F., BRAVO, B.R. Animal wastes media for *Spirulina* production. *Phycol. Docum. Code*, Santiago, v.9, p.450-481, 1983.

5. BADIN, E.J. *Coal Science and Technology*. Amsterdam: Elsevier, 1984. v.6, p.2-3: Basic and acidioxide constituents in some fossil fuels.
6. ----- *Coal Science and Technology*. Amsterdam: Elsevier, 1984. v.6, p.10: Major-abundance, minor-abundance impurity elements in coal
7. BARANOWSKI, J.D., DOMINGUEZ, C.A., MAGARELLI, P.C. Effects of drying on selected qualities of *Spirulina platensis* protein. *J. of Agric. Food Chem.*, Honolulu, v.32, n.6, p.1385-1387, 1984.
8. BARON, C.C.A., CLEMENT, G. Nutritional and biochemical quality of *Spirulina* algae for human consuption. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, 4, 1974, Dijon. *Proceedings...* 32. Dijon: Univ. of Dijon, 1974. 8A, p.30-32.
9. BENEMANN, J.R., WEISSMAN, J.C., OSWALD, W.J. Algal biomass. *Econ. Microbiol.*, Berkely, v.4, p.177-206, 1979.
10. BOLD, H.C., WYNNE, M.J. *Introduccion to the algae*. 2.ed. Cliffs: Prentice-Hall, 1985. p.15-33: Cultivation of algae in the laboratory.
11. ----- *Introduccion to the algae*. 2.ed. Cliffs: Prentice-Hall, 1985. p.34-71: Divisions Cyanophyta and Prochlorophyta.
12. BOROWITZKA, M.A., BOROWITZKA, L.J. *Micro/algal biotechnol.*

Cambridge: University Press, 1988. 477p.

13. BOUDENE, C.I., COLLAS, E., JENKINS, C. Recherche et dosage de divers toxiques minéraux dans les Algues Spirulines de différentes origines. *Ann. Nutr. Alim.*, Paris, v.30, p.577-588, 1976.
14. BUSHELL, M.E. Product formation and plant cell specializations A case study of photosynthetic development in plant cell cultures. *Progress in Industrial Microbiology*, Amsterdam, v.17, p.109-159, 1983.
15. CLÉMENT, G. Production et constituants caractéristiques des Algues *Spirulina platensis* et *maxima*. *Ann. Nutr. Alim.*, Paris, v.29, p.477-488, 1975.
16. COHEN, Z., VONSHAK, A., RICHMOND, A. Fatty acid composition of *Spirulina* strains grown under various environmental conditions. *Jacob Blaustein Inst.*, Negev, p.2255-2258, 1986.
17. DELPEUCH, F., JOSEPH, A., CAVELIER, C. Consumption and nutritional contribution of blue-green algae to several populations in the Kanem region of Chad. *Ann. Nutr. Alim.*, Paris, v.29, n.6, p.497-517, 1975.
18. DEVI, M.A., SUBBULAKSHMI, G., DEVI, K.M. et al. Studies on the proteins of mass-cultivated, Blue-Green Alga (*Spirulina platensis*). *J. Agric. Food Chem.*, Mysore, v.29, n.3, p.522-

525, 1981.

19. DUMARTRAIT, E.G., MOYSE, A. Caracteristiques biologiques des Spirulines. *Ann. Nutr. Alim.*, Paris, v.30, p.489-496, 1976.
20. EYKELENBURG, C.V. Ecophysiological studies on *Spirulina platensis*. Effect of temperature, light intensity and nitrate concentration on growth and ultrastructure. *Antonie van Leeuwenhoek*, Amsterdam, v.46, p.113-127, 1980.
21. FERRAZ, C.A.M., AQUARONE, E., KRAUTER, M. Efeito da luz e do pH no crescimento de *Spirulina maxima*. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, v.16, n.2, p.132-137, abr./jun., 1985.
22. _____. Utilização de subprodutos da indústria alcooleira na obtenção de biomassa de *Spirulina maxima*. Parte I - Emprego do anidrido carbônico. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, v.16, n.3, p.179-187, jul./set. 1985.
23. _____. Utilização de subprodutos da indústria alcooleira na obtenção de biomassa de *Spirulina maxima*. Parte II - Emprego do resíduo da destilação do mosto fermentado (vinhaça). *Rev. Microbiol.*, São Paulo, v.17, n.1, p.15-21, jan./mar. 1986.
24. FERRAZ, C.A.M., FREY, K.G., AQUARONE, E. Influência do acetato de sódio na produção celular de lipídios e no "up take" de Mn e Fe de *Chlorella vulgaris*. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, v.14, n.2, p.78-83, abr./jun. 1983.

25. FLORENZANO, G. Le proteine delle microalghe a destinazione alimentare. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, Firenze, v.52, p.11-25, 1975.
26. FLORENZANO, G., BOLLONI, W., MATERASSI, R. et al. *Il metodo de trattament a batteri fotosintéticos delle oque di scarico*. Firenze: [s.n.] 1982. p.1-57: I batteri fotosintetici.
27. GARRET, M.K., WEATHERUP, S.T.C., ALLEN, M.D.B. Algal culture in animal slurry. *Food Chem.*, Belfast, v.15, p.141-154, 1978.
28. HANSEN, M. *La Espirulina*. Madrid: Ediciones, 1984. 75p.
29. HUANG, S.W., LIN, L.P. Nutrient requirements on the growth of cultivated edible microalgae for mass production. *J. Chin. Agric. Chem. Soc.*, Taiwan, v.19, n.3/4, p.2, 1981.
30. IEHANA, M. Kinetic analysis of the growth of *Spirulina* sp. in batch culture. *J. Ferment. Tech.*, Hiroshima, v.65, n.3, p.267-275, 1987.
31. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Normas analíticas*. São Paulo, 3.ed., IMESP, v.1, p.44-45, 1985.
32. JACQUET, J. Microflore des préparations de Spirulines. *Ann. Nutr. Alim.*, Paris, v.29, p.589-601, 1976.

33. JÜTTNER, F. Mass cultivation of microalgae and phototrophic bacteria under sterile conditions. *Proc. Biochem.*, Tubingen, p.2-7, Mar./Apr. 1982.
34. KARLSON, P. *Bioquímica*. Rio de Janeiro: Koogan, 1970. p.337-350: A fotossíntese.
35. KLAPAN, A. Photoinhibition in *Spirulina platensis*: Response of photosynthesis and HCO_3^- uptake capability to CO_2 - depleted conditions. *J. Exper. Bot.*, Jerusalém, v.32, n.129, p.669-677, 1981.
36. KOSARIC, N., NGUYEN, H.T., BERGOUGNOU, M.A. Growth of *Spirulina maxima* algae in effluents from secondary waste-water treatment plants. *Biotechnol. Bioeng.*, London, v.16, p.881-896, 1974.
37. LÓPEZ, M.R. Las microalgas como fuente de alimento y productos químicos. *Inst. "Jaime Ferrán" de Microbiol.*, Madrid, v.32, n.4, p.245-250, 1981.
38. _____, SÁNCHEZ, M.M.V., CALVO, M.L.M. Estudio sobre *Chlorella* en orden a su utilización en la alimentación humana y/o animal. *Anal. Bromatol.*, Madrid, v.27, n.3, p.275-285, 1975.
39. MACCARTHY, J.J., PATTERSON, G.W. Effects of cation levels of the nutrient medium on the biochemistry of *Chlorella*. *Plant Physiol.*, Maryland, v.54, p.133-135, 1974.

40. MALAVOLTA, E. *ABC da adubação*. 4.ed. São Paulo: Ceres, 1979.
p.58-59: Cinzas.
41. MATERASSI, R., TREDICI, M., BALLONI, W. Spirulina culture in sea-water. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Firenze, 1984.
42. MATERASSI, R., RICCI, D., TOFANI, A. Produzione di vitamina B₁₂ da parte di ceppi di Spirulina. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, Firenze, v.51, p.465-467, 1974.
43. MONTES, A.L. *Microbiologia de los alimentos*. São Paulo: Resenha, 1977. v.1, p.158-159: Las algas en la alimentación.
44. ----- *Microbiologia de los alimentos*. Sao Paulo: Resenha, 1977. v.1, p.53-54: Membranas filtrantes.
45. MURTHY, S.D.S., SABAT, S.C., MOHANTY, P. Mercury-induced inhibition of photosystem II activity and changes in the emission of fluorescence from phycobilisomes in intact cells of the Cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant Cell Physiol.*, New Delhi, v.30, n.8, p.1153-1157, 1989.
46. NEGUT, G., SEGAL, B., NAGY-TDETH, F. et al. Potential for utilization of algae. *Hyg. Publ. Health Cent.*, Temisvar, v.18, n.5/6, p.265-268, 1977.

47. NGUYEN, H.T., KOSARIC, N., BERGOUGNOU, M.A. Some nutritional characteristics of *Spirulina maxima* algae grown in effluents from biological treatment plant. *J. Inst. Can. Sci. Technol. Aliment.*, London, v.7, n.2, p.111-116, 1974.
48. OKAMURA, M.Y., FEHER, G., NELSON, N. Reaction Centers. In: GOVINDJEE, A. *Photosynthesis: energy conversion by plants and bacteria*. New York: Academic Press, 1982. v.1, p.195-264. (Cell biology: a series of monographs, 1).
49. PAOLETTI, C., PUSHBARAJ, B., TOMASELLI, L. Ricerche sulla nutrizione minerale di *Spirulina platensis*. In: *Atti Congr. Naz. Soc. Ital. Microbiol.*, 17^o, Pádova, 1975.
50. PERES, C.S., FIGUEIREDO, M.G., VITORATTO, E., JUNIOR, P.L. Crescimento de bactéria fotossintetizante (BF) anaeróbia em meio constituído de vinhaça. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, v.17, n.1, p.1-9, jan./mar. 1986.
51. PIRT, M.W., PIRT, S.J. The chemical nature of algal (*Chlorella*). *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, London, v.31, p.183-188, 1981.
52. POSTGATE, J.R. *The Fundamental of Nitrogen Fixation*. Cambridge: University Press, 1982. p.17-18: The nitrogen-fixing bacteria.

53. QUILLET, M. Carbohydrates produced by Spirulinas. *Ann. Nutr. Aliment.*, Paris, v.29, n.6, p.553-561, 1975.
54. RENDON, J.L., HERNÁNDEZ, G.M. Dimer-tetramer equilibrium of glutathione reductase from the Cyanobacterium *Spirulina maxima*. *Arch. of Biochem. and Biophys.*, New York, v.268, n.1, p.255-263, Jan. 1989.
55. RICHMOND, A. Phototrophic Microalgae. *Negev: The Jacob Blaustein Inst.*, p.108-143, [1980?].
56. ROBINSON, R.K., GUZMAN-JUAREZ, M. The nutritional potential of the algae. *Plants Foods for Man*, London, v.2, p.195-202, 1978.
57. SANT'ANNA, E.S. *Estudos preliminares para a obtenção de Spirulina maxima em água salgada*. Florianópolis: UFSC/CCA/CAL, 1990 não paginado. Datilografado. Projeto de pesquisa.
58. SANTTILLAN, C. Mass production of *Spirulina*. *Biochem. Res. Depart.*, México, v.38, p.40-43, 1982.
59. SAUTIER, C., TRÉMOLIERES, J. Valeur alimentaire des Algues Spirulines chez L'homme. *Ann. Nutr. Alim.*, Paris, v.30, p.517-534, 1976.
60. SIM, T.S., GOH, A., BECKER, E.W. Comparison of centrifugation, dissolved air flotation and drum filtration techniques for harvesting sewage-grown algae. *Biomass*, Singapore, v.16, p.51-62, 1988.

61. SLOTTON, D.G., GOLDMAN, C.R., FRANKE, A. Commercially grown *Spirulina* found to contain low levels of mercury and lead. *Nutr. Reports Internat.*, Davis, v.40, n.6, p.1165-1171, 1989.
62. SOEDER, C.J. Zur Verwendung von mikroalgen für Ernährungszwecke. *Naturwissenschaften*, Dortmund, v.63, p.131-138, 1976.
63. WHITAKER, J.R., TANNENBAUM, S.R. Single-cell protein. In: TANNENBAUM, S.R. *General aspects of single-cell protein*. Westport: Avi, 1977. p.314-329 (Food Proteins).
64. THOMA, R.W. *Industrial Microbiology*, Pennsylvania; Ross, 1977. v.12, p.37: Sources and management of microorganisms.
65. TORZILLO, G., GIOVANNETTI, L., BOCCI, F. et al. Effect of oxygen concentration on the protein content of *Spirulina* biomass. *Biotechnol. Bioeng.*, Firenze, v.26, p.1134-1135, 1984.
66. VENKATARAMAN, L.V., SHIVASHANKAR, S., NIGAN, B.P. Processing of microalgae as a potential protein source. In: INDIAN CONVENTION OF FOOD SCIENTISTS AND TECHNOLOGISTS, 1, 1979, Mysore. *Proceedings...*, Mysore: Cent. Food Tech. Res. Inst., 1979. p.96.

67. VERMOREL, M., TOULLEC, G., DOMOND, D. et al. Valeur protéique et énergétique des Algues Bleues Spirulines supplémentées en acides aminés. *Ann. Nutr. Alim.*, Paris, n.29, p.535-552, 1975.
68. VONSHAK, A., ABELIOVICH, A., BOUSSIBA, A. et al. Production of Spirulina biomass. *Biomass*, Inghaterra, v.2, n.3, p.175-185, 1982.
69. WACHOWICZ, M., ZAGRODZKI, S. The protein of the alga Spirulina platensis. *Inst. Chem. Tech.*, Lodz, v.28, n.6., p.254-256, 1974.
70. ----- Utilization of furnace gases in culturing of the Spirulina platensis alga. *Inst. Chem. Tech.*, Lodz, v.29, n.10, p.397-400, 1975.
71. WONG, M.H., YIP, S.W., FAN, K.Y. Chlorella cultivation in sludge extracts. *Environm. Poll.*, Shatin, v.12, n.3, p.205-209, 1977.
72. WU, J.F., POND, W.G. Amino acid composition and microbial contamination of Spirulina maxima, a Blue-Green Alga. Grown on the effluent of different fermented animal wastes. *Bull Environm. Contam. Toxicol.*, Ithaca, n.27, p.151-159, 1981.

73. WYDRZYNSKI, T.J. Oxygen evolution in photosynthesis. In: GOVINDJEE, A. Photosynthesis: energy conversion by plants and bacteria. New York: Academic Press, 1982. v.1, p.469-500 (Cell biology: A series of monographs, 1).
74. YANAGIMOTO, M., SAITOH, H. Blue green algae coexistent in stock culture of Spirulina. *Nat. Food Res. Inst.*, n.38, p.96-101, 1981.
75. YASUMOTO, T. Microalgal Toxins. *J. Hyg. Chem.*, Sendai, v.29, n.1, p.5-9, 1983.
76. YOSHIDA, M. e HOSHII, H. Nutritive value of Spirulina, Green Algae, for poultry feed. *Jap. Poultry Sci.*, Chiba-shi, v.17, n.1, p.27-30, 1980.