

TECNOLOGIA DE PRODUÇÃO DE *SPIRULINA PLATENSIS* EM DIFERENTES MEIO DE CULTURA

Nyamien Yahaut Sebastien (Orientador/UNIOESTE); Bernardo Alfredo Mayta Sakamoto; Marta Estavas; Rachel Mohana de Carvalho Refosko;
e-mail: nyamien@hotmail.com..

Universidade Estadual do Oeste do Paraná/Centro de Engenharia e Ciências Exatas Toledo– PR.

Palavras-chave: Cultivo, biomassa *Spirulina platensis*.

Resumo:

As microalgas são importantes fontes energética para alimentação humana e animal e também matéria prima para produção de biocombustível. O presente estudo avaliou o potencial de adaptação da microalga *Spirulina platensis* às condições laboratoriais, sua produção úmida e seu potencial de produção de biomassa seca. Foram testados três meios de cultura inorgânicos T1, T2 e T3 com duas repetições cada um. O monitoramento da cultura foi realizado determinando-se a densidade celular com auxílio de uma câmara de Neubauer e um microscópio óptico da marca Olympus. A temperatura e a salinidade foram mantidas constantes a 18° C e 35‰ respectivamente sem fotoperíodo com lâmpada fluorescente de 40 W durante 61 dias. Realizaram-se a filtragem seguida da secagem em estufa a 60°C até um valor constante e a pesagem em balança analítica. Como resultado, os meios T1, T2 e T3 produziram 2,1 g/L; 0,75 g/L e 2,08 g/L, respectivamente. A análise estatística de comparação de variância indicou diferença estatística entre os meios T1 e T2, T2 e T3 e nenhuma diferença estatística entre T1 e T3. Com estes resultados, conclui-se a possibilidade de produção da *Spirulina platensis* em ambiente controlado no laboratório.

Introdução

O cultivo de microalgas é uma atividade que merece atenção particular, em decorrência do seu rápido desenvolvimento, suas importâncias ecológica e socioeconômica. A produção em larga escala é incomum no Brasil, entretanto muitas culturas antigas e modernas utilizam algas para uma variedade de propósitos e, com o desenvolvimento da biotecnologia, muitas algas terão papel importante no dia a dia (Arruda *et al.*, 2007). Em decorrência do aumento da população e da falta de proteínas, um esforço intenso vêm sendo feito para explorar fontes alternativas de proteínas (Becker, 2004). No Brasil a comercialização e o cultivo de microalgas são recentes, sendo objetos de pesquisas devido a suas propriedades energéticas, como fonte de minerais essenciais e de produção de biocombustível (Sebastien, 1999). Além disso, também lhe é atribuído valor terapêutico na cura do câncer, hipertensão, entre outros males.

A microalga *Chlorella* é um composto alimentar energético que repõe uma série de minerais essenciais em falta na dieta cotidiana. Em outras comunicações, a bióloga Célia Leite Sant'Anna informa que a *Chlorella* é inteiramente absorvida pelo organismo, tendo então bom proveito. Alguns médicos recomendam aos pacientes com enfraquecimento ósseo, osteoporose, à mulher na menopausa, às crianças com resfriamento freqüente ou sofrendo de perturbações nas vias respiratórias, quando muda o clima, e para o tratamento da anemia. Com relação aos obesos, considera-se que a ingestão de cápsulas desta microalga 30 minutos antes das refeições dá uma sensação de saciedade, reduzindo o consumo de alimentos. Verifica-se ainda que em decorrência de sua composição química, as microalgas foram incorporadas à alimentação dos astronautas. Para isto, elas passam por um processo de liofilização e prensagem até a transformação em pastilha ou farinha após um cultivo controlado sem contaminação.

A carência protéica e a demanda elevada de alimento nos países em desenvolvimento da Ásia, América Latina e África, levaram à procura de fontes alternativas de proteínas (Becker, 1994). No Zaire, na Fundação Mutundu, em dezembro de 1995, em 20 casos de má nutrição severa de crianças de 2 a 13 anos de idade, estas receberam junto à comida 10 g/dia de *Spirulina*. Após três meses de tratamento, sete crianças recuperaram 80% do peso, cinco recuperaram 70%; seis recuperaram 40% e duas recuperaram 20% do peso, ressaltando que 13 casos eram de anemia severa e ainda que a recuperação no Benin (África Ocidental) foi de 15 dias com o mesmo tratamento (FOX, 1996). A presença de aminoácido essencial e omega 6 na *Spirulina* permite o tratamento de doenças como hipertensão, esclerose múltipla, diabetes e controle gastrointestinal. Como a *Chlorella*, muitos artigos, observações e comunicações publicadas atestam o valor nutritivo e curativo de *Spirulina*. De acordo com FOX (1996), a análise da *Spirulina* mostra 60% de proteína, 7% de Lipídio, 15 % de glucídio e uma grande quantidade de lipídios insaturados, aminoácidos essenciais, sais minerais e vitaminas.

O uso na alimentação humana como fonte de proteínas é uma possibilidade. Embora sejam antigos os conhecimentos de sua riqueza em nutrientes e vitaminas, sua comercialização é recente. Para seu uso em alimentação humana, é recomendado identificar sua composição química, seu teor de proteína, a presença ou não de substâncias tóxicas (Becker, 2007). De acordo com a UNICEF (1995) apud Fox (1996) 150 milhões de crianças são mal nutridas, onde 30 milhões sofrem de má nutrição avançada de 2º e 3º graus na escala de Gomes, sendo de alto risco de morte. A maioria foi curada em menos de três meses ingerindo 10g/dia de *Spirulina*.

Estudos feitos por Becker (1994) e Fox (1996), foram realizados no Senegal, no Togo, no Chade, no Peru, na China e na Índia, com alguns gêneros, tais como *Spirulina*, *Scenedesmus* e *Chlorella* e introduzidas diretamente na dieta dos desnutridos crônicos. A *Spirulina*, chamada de "Tecuitlatl" pelos astecas no México e "biri" pelos kanembou, tribo do norte

do lago Chade, na África Central, é consumida nestes locais e constitui parte de alimento.

Segundo Becker (1996), muito embora se reconheça o valor protéico das microalgas, a proteína de origem vegetal não pode ser vista como substituto da de origem animal, mas como suplemento alimentar, na alimentação humana e sua comercialização são de qualquer modo totalmente novos. As microalgas são também utilizadas como fonte de matéria prima para as indústrias farmacêuticas. Segundo Richmond (1996), o valor farmacêutico das microalgas é reconhecido há muito tempo. Dentre as propriedades terapêuticas das algas marinhas, pode-se mencionar: antivômito, antihipertensivo, anticoagulante, antiatividade hiperlipêmica, baixa taxa de colesterol, antibiótico, redutor da atividade de tumores, como ativador de enzimas e fonte de vitaminas. De acordo com Preto *et al.* (1981); Krinsky (1988); Ziegler (1989) apud Ben Amotz *et al.* (1991), epidemiológicos e oncológicos sugerem que o alto nível de β -caroteno no homem pode protegê-lo contra o desenvolvimento do câncer. Por esta razão, hoje estudos estão sendo feitos no Instituto Nacional do Câncer, nos Estados Unidos, para mostrar que o uso diário de β -caroteno pode reduzir a ocorrência do câncer nos seres humanos (Fabrega *et al.*, 1996).

Diante da importância das microalgas como complemento alimentar, tanto para os seres humanos como para os organismos aquáticos, surge a necessidade de desenvolver tecnologia de produção de microalga *Spirulina platensis* em laboratório.

Materiais e Métodos

O presente experimento foi realizado no Laboratório de Ecotecnologia e Biomanipulação no Centro de Pesquisa em Aqüicultura Ambiental (CPAA), segundo o modelo ao acaso, constituindo-se de três tratamentos com duas repetições cada. Os meios foram compostos de:

T₁ : 4,0 g/L de NaHCO₃, 1,0 g/L de NPK e 0,1 g/L de Superfosfato;

T₂ : 8,0 g/L de NaHCO₃, 5,0 g/L de NaCl (sal), 0,1 g/L de uréia; 0,1 g/L de NH₄H₃PO₄, 0,1 g/L de K₂SO₄, 0,2 de MgSO₄·7H₂O, 0,001 g/L de FeSO₄;

e T₃: 5,9 g/L de NaHCO₃; 8,6 g/L de NaCl; 0,093 g/L de K₂HPO₄; 0,0058 g/L de FeSO₄, 0,523 g/L de NaNO₃, 0,078 g/L de K₂SO₄. As soluções preparadas passaram por esterilização em autoclave a 121°C durante 20 minutos. O cultivo iniciou-se em tubos de ensaios com volume de 10 mL do meio e 1 mL de cepas puras da microalga, isolada do meio sólido em placa de Petry. A mistura feita, o cultivo foi monitorado acompanhando a densidade celular a cada dois dias, avaliando-se por contagem do número de colônias presentes por mL de meio. A consecução deste processo foi realizada com auxílio de pipetas de um mL para a coleta das amostras, uma câmara de Neubauer e um microscópio óptico modelo Olympus. Os cultivos passaram de 10 mL para 50, 100, 300, 1000 e 5000 mL. Uma aeração foi introduzida a partir de 300 mL, de maneira constante. O cultivo foi acondicionado sobre bancada de cimento pintada de branco e sob luz branca, utilizando-se

lâmpada fluorescente sem fotoperíodo. A temperatura e salinidade foram mantidas a 18° C e 35‰, respectivamente

A colheita da microalga foi feita por filtragem com papel-filtro micropore e uma bomba a vácuo. Em seguida, procedeu-se à secagem em estufa a 60°C durante 48 horas para a obtenção da matéria seca. Com uma balança analítica, obteve-se o peso da matéria seca de *Spirulina*. A determinação do teor de proteína foi feita utilizando a metodologia de Biuret (1978). A comparação dos resultados foi feita por análise de variância a 95% de confiança e uma comparação de valores médios. Os dados foram objeto de transformação em logaritmo neperiano, com a finalidade de estabilizar a variância.

Resultados e Discussão

Após o período de cultivo estipulado, a avaliação do cultivo feito pela análise das curvas de crescimento nos três meios encontra-se na figura 1.

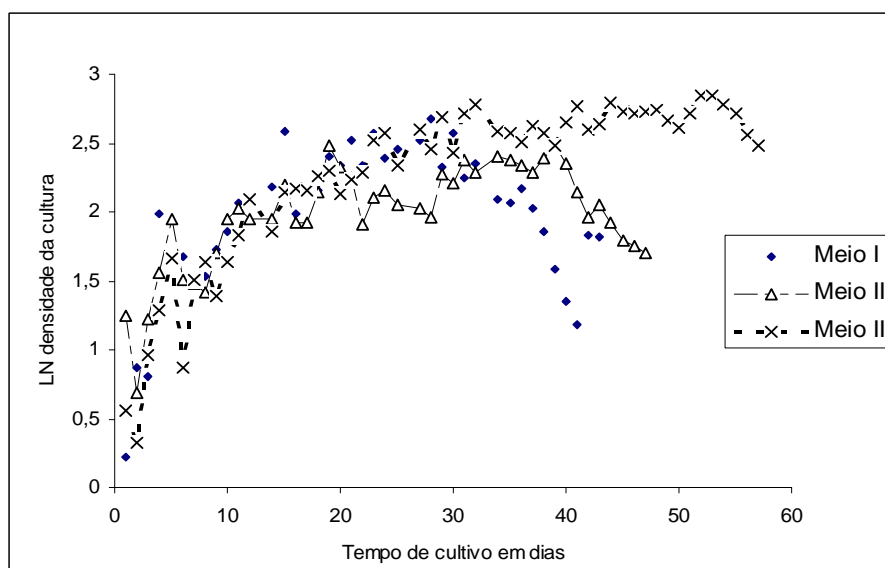


Figura 1 : Curva de crescimento da *Spirulina platensis* nos três meios

FONTE : PESQUISA DIRETA.

Nesta figura, observou-se um crescimento exponencial das microalgas nos dez primeiros dias de cultivo. Do décimo ao vigésimo dia, constatou-se uma redução do crescimento. O meio M1 ou tratamento 1(TI) apresentou uma fase estável, seguida de decréscimo, enquanto os meios MII ou tratamento II(TII) e MIII ou tratamento III(TIII) apresentaram um máximo de crescimento até o quadragésimo e quinquagésimo dia, respectivamente. A densidade celular atingiu valor máximo de 40×10^4 colônias de cel/ml nos dois meios I e II e 20×10^4 colônia de cel/ml no meio III. Estes aumentos em células vivas foram observados até o final da primeira semana. No oitavo dia, iniciou-se a redução de crescimento da cultura traduzido por uma redução das densidades celulares em todos os

meios. Estes dois episódios caracterizam a fase ativa da célula de microalga e o início do esgotamento dos nutrientes que necessitam de uma reposição.

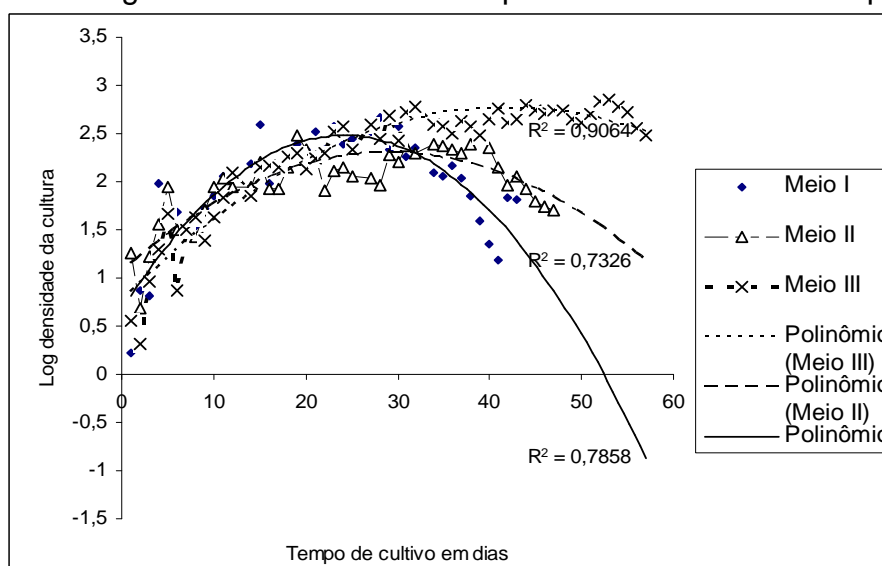


Figura 2 : Ajuste de curva de crescimento da *Spirulina platensis* durante o período

FONTE: PESQUISA DIRETA

A figura 2 apresenta os coeficientes de determinação e o reajuste das curvas de crescimento nos três meios. Determinaram-se nos meios MI, MII e MIII os coeficientes 0,89; 0,82 e 0,93, respectivamente. Os coeficientes próximos de 1 indicam que o sucesso do cultivo decorre do meio de cultura utilizado, não descartando a noção de que parte deste sucesso é decorrente de outros fatores não avaliados.

As análises destes coeficientes pelas regressões determinaram os valores de coeficiente de determinação R^2 do ajuste de curva. Os resultados obtidos foram $R_1^2 = 0,89$, $R_2^2 = 0,82$, e $R_3^2 = 0,93$, indicando que a função polinomial de segundo grau explica o desenvolvimento nos três meios. De acordo com estes valores, o fenômeno de crescimento de *Spirulina platensis* é explicado em 89 % pelo efeito do meio 1, 82% pelo efeito do meio 2 e 93% pelo efeito do meio 3. Valores diferentes de 100 indicam que, além do meio de cultura testado, outros parâmetros não avaliados, como a intensidade de luz, a temperatura, o estado fisiológico das células, que devem ter contribuídos para o crescimento da microalga, no entanto, com efeitos mínimos. Estes valores de coeficiente de determinação foram maiores do que os encontrados por Sebastien e Granja (2005) em cultivo de *Scenedesmus*.

A comparação dos coeficientes indicou por ordem decrescente que o meio III seguido do meio I e meio II apresentaram os melhores desempenhos.

Resultados semelhantes foram obtidos por Sebastien e Klein (2006), em cultivo de *Dunaliella salina*, *Tetraselmis Chuii* e *Isochrysis galbana* em meio Erd Schreiber.

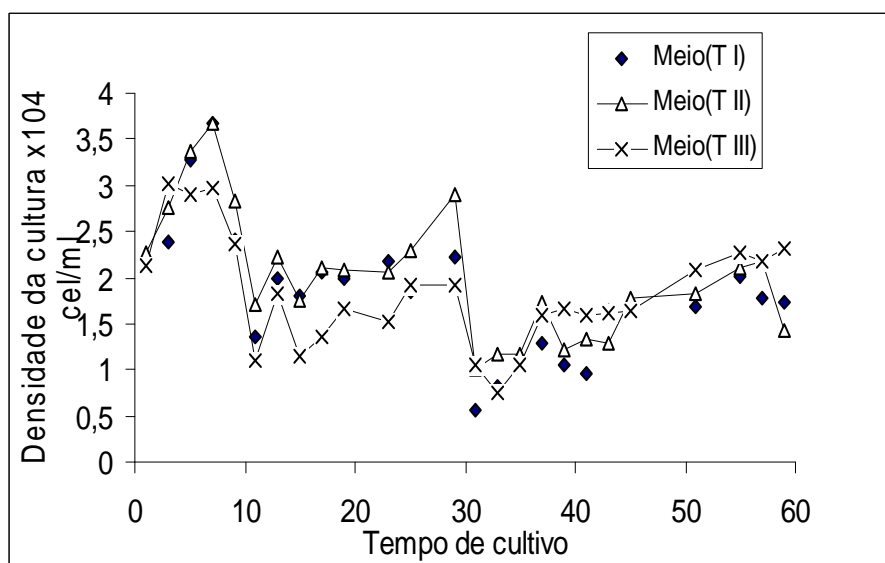


Figura 3 : Produção líquida de *Spirulina platensis* durante o cultivo

FONTE: PESQUISA DIRETA.

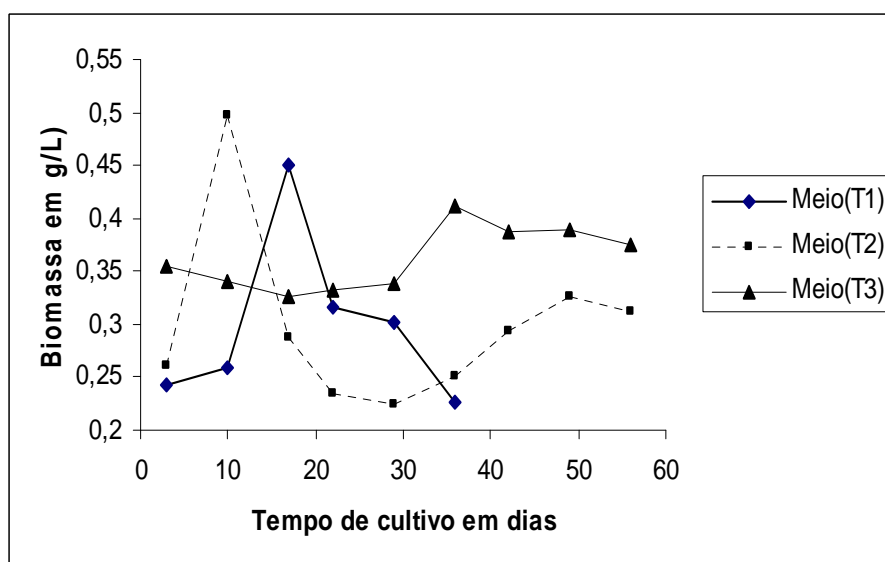


Figura 4 :Produção de biomassa seca de *Spirulina platensis* durante o cultivo

FONTE: PESQUISA DIRETA

A determinação da biomassa e da densidade da cultura ao longo da pesquisa apresentou os resultados nas figuras 3 e 4, que mostram uma irregularidade na produção de biomassa. Os maiores valores foram obtidos nos dez primeiros dias, caracterizando a fase de crescimento e células jovens identificada na figura I. Entre o vigésimo e trigésimo dia, a produção caracterizou-se por uma constância. Esta fase é a de estabilização, caracterizando uma redução dos nutrientes nos meios de cultivos. De forma geral, a produção apresentou uma redução. Esta diminuição decorre de um esgotamento do meio de cultura em nutrientes. De acordo com Richmond *et*

al. (2007) a irregularidade na produção depende a intensidade de lux, a temperatura e das substancias inibidoras.

A biomassa média obtida nos três tratamentos foi de 6,3 g de matéria seca com 3 litros de cultivo, sendo uma produtividade de 2,1 g/L de matéria seca no tratamento I, 1,8g de matéria seca no tratamento II com produtividade de 0,75 g/L e 8,2g no tratamento III, sendo 2,08g/L de produtividade. Resultados semelhantes foram alcançados por Zarrouk (1966) com a mesma espécie. Richmond *et al.* (2007) alcançaram uma produtividade de 0,12 a 0,85 g/L com a espécie *Nannochloropsis*. Duarte Filho *et al.* (2007), em experimento realizado em quatro meios, obtiveram concentração de biomassa inferior, sendo 0,74; 0,70; 0,97 e 0,80 g/L. Em estudo realizado com as espécies *Dunaliella salina* e *Isochrysis galbana*, Sebastien (1999) obteve uma produção de 1,98g/L e 2,01g/L de matéria seca respectivamente. De acordo com Zittelli *et al.* (2007) sob iluminação natural a produtividade máxima alcançada é de 0,38 g/L no outono enquanto no inverno em casa vegetal a produtividade alcança 0,25 g/L.

A curva de calibração feita com farinha de soja a 95% de proteína apresentou o resultado na figura 6 com avaliação do crescimento da cultura por absorbância foi feita no espectrofotômetro modelo Spectrovision nos comprimentos de onda de 670 nm. Determinou-se o coeficiente de determinação nos três meios e a produção de matéria seca por filtragem seguida de secagem em estufa a 60°C e pesagem em balança analítica.

Como resultado os coeficientes de determinação foram $R_1^2 = 0,89$, $R_2^2 = 0,82$, e $R_3^2 = 0,93$. A estimação da quantidade de proteína produzida por tratamento considerando que a *Spirulina* produz 62,8% de proteína de matéria seca (Chrystopher, 1981) produziu 3,95g no tratamento I, 1,13g no tratamento II e 5,14g no tratamento III. A traves da curva de absorbância e da curva de calibração, a produção de proteína foi estimada a 5,52 g/L (Figura 5).

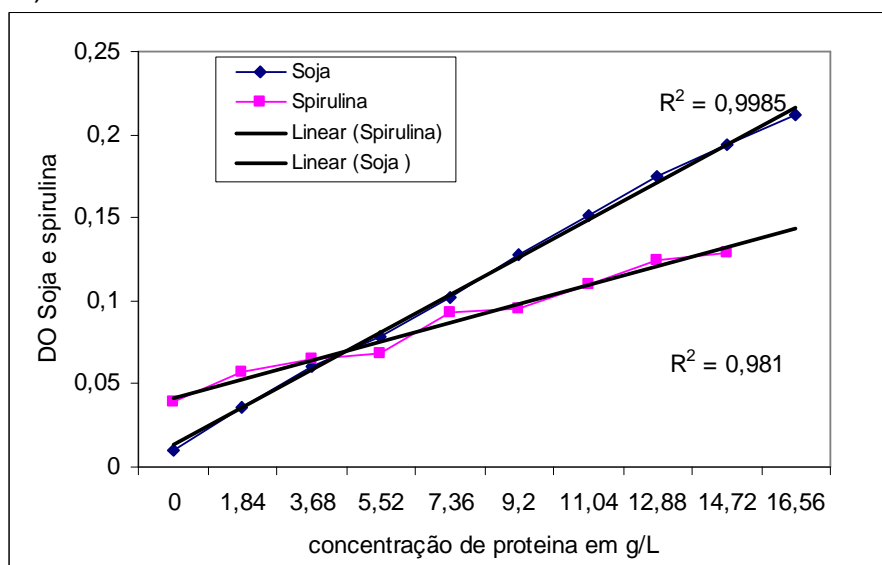


Figura 5: Determinação de teor de proteína de *Spirulina platensis*
FONTE PESQUISA DIRETA

Um estudo de comparação da produção de matéria seca a 95% de confiança, das variâncias das curvas de crescimento e de biomassa úmida nos três meios revela que houve diferença estatística entre os três meios T1, T2 e T3 . Em relação à análise estatística este estudo revelou diferença estatística entre os meios 1 e meio 2; entre o meio 2 e 3; no entanto não houve diferença estatística entre 1 e 3

As análises de variância realizadas entre as curvas de crescimento e a produção de biomassa úmida nos três meios mostraram a existência de uma diferença estatística entre M1 e M3; M2 e M3 ; M1 e M2. A classificação em termo de desenvolvimento apresentou por ordem decrescente a seguinte classificação $M1 < M2 < M3$. Em relação à comparação entre as biomassas secas às análises apresentaram diferença entre M1 e M2 , M2 e M3 e nenhuma entre M1 e M3.

Conclusões

Tomando-se por base estes resultados, conclui-se a possibilidade de produção de *Spirulina platensis* em laboratório, sob condições controladas e podendo servir como fonte alternativa de alimento pelo teor de proteína, tendo um crescimento rápido utilizando os meios 1 ou 2.

Agradecimentos

FINEP pelo financiamento do projeto.

Referências

- Arruda , R.O.M., Silva, R.R., Moraes, I.O. *Spirulina platensis* para produção de biomassa e proteína <http://www.Biológico.sp.gov.br/biologico/V68-acesso> em 12/11/2007
- Becker, E.W. Microalgae in human and Animal Nutrition, *In Richmond A. Handbook of Microalgae Culture : biotechnology and Applied Phycology* , p312-351, 2007.
- Becker, E.W. Major result of the Indo – German Algal Project result, *Arch Hydrobiol*, Stuttgart, v.11, p 23- 43 .1994.
- Becker, E. W *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge: Ed university Press. 293p 1996.
- Ben-Amotz, A., Shaish, A., Avron, M The biotechnology of cultivating *Dunaliella* for production of β carotene Rich Algae . *Bioresource Technology*, Great Britain, v. 38, n. 2/3, p 233-235.,1991.
- Christopher, H.; Hiroshi, N Food from sunlight, California : ed.University of the Trees Press, 378p.,1981.
- Duarte Filho, P., Bauer, P., Costa V.J.A Cultivo de microalga *Spirulina platensis* em diferentes configurações de fotobiorreator e condiçõesde

cultivo. <http://www.eng.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos>. acesso em 12/11/2007

Fabregas, J. *et al* *Tetraselmis suecica* cultured in different nutrient concentration varies in nutritional value to *Artemia*. *Aquaculture Netherlands*; v.143, p 197-202 ,1996.

Fox, R. D *Spirulina*: productio & Potential ., Aix-en-Provence: Edisud , 231p , 1996.

Heussler, P., *et al* Improvement in pond construction and CO₂ supply for the mass production of microalgae_. *Arch Hydrobiol*, Stuttgart, v.11, p 254- 258, 1978.

Sebastien, Y.N, (1999) Biotecnologia de cultivo de microalga: pré-requisito para um desenvolvimento sustentável . Dissertação de mestrado, UFC-110p

Sebastien, Y.N, Klein, V.L.M Efeito do meio de cultivo no cultivo das microalgas *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii* E *Isochrysis galbana*. *Acta Sci Bio. Sci.* , Vol.28;2, 2006.

Sebastien, Y.N, GRANJA, RP Cultivo de *Scenedesmus*: alimento vivo para a manutenção de organismos planctônicos e implementação na dieta humana. *revista varia scientia* v. 05, n. 10, p. 113-121, 2005.

Payer, H. *et al* Major result of the German Microalgal Project at Bangkok, *Arch Hydrobiol*, Stuttgart, v.11, p 41- 55 ,1978.

Richmond, A. Microalgae of economic potential. In, RICHMOND, A., *Handbook of Microalgal Mass culture*: Florida; CRC, 526 p, p 199-243, 1996.

Zarrouk, C Contribution à l'étude de cyanophycées . Influence de divers facteurs physiques e chimiques sur la croissance e la photosynthese de *Spirulina maxima* . Ph.D Thesis, Université de Paris ,1966.

Zittelli, C. Graziella, Rodolfi, L.; Tredici, M.R. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products- Species of high Potential : Mass cultivation of *Nannochloropsis* in closed system. In Richmond A. *Handbook of Microalgae Culture : biotechnology and Applied Phycology* , p298 -303, 2007.