

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – FEA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**“ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES
TEORES DE NITROGÊNIO EM DOIS NÍVEIS DE
TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE LIPÍDIOS E
ÁCIDO GAMA-LINOLÊNICO POR *Spirulina maxima*”**

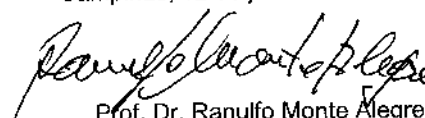
PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Ricardo Verthein Tavares de Macedo, aprovada pela Comissão Julgadora em 12 de janeiro de 2000.

Autor : **Ricardo Verthein Tavares de Macedo**

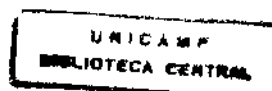
Orientador : **Dr. Ranulfo Monte Alegre**

Campinas, 12 de janeiro de 2000.


Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Presidente da Banca

Dissertação de tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Campinas, dezembro de 1999



693740006

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	
TOMBO	40188
PROC.	278/00
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	29/01/00
N.º CPO	

CM-00135982-5

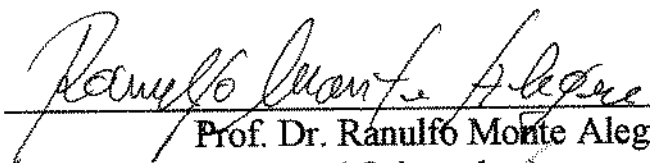
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

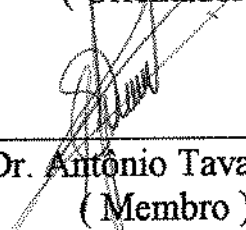
M151e Macedo, Ricardo Verthein Tavares de
Estudo da influência de diferentes teores de nitrogênio em dois níveis de temperatura na produção de lipídios e ácido gama-linolênico por *Spirulina maxima* / Ricardo Verthein Tavares de Macedo. – Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Ranulfo Monte Alegre
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Ácidos graxos. 2. Spirulina. 3. Lipídios. I. Alegre, Ranulfo Monte. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
(Orientador)


Prof. Dr. Antônio Tavares da Silva
(Membro)


Prof. Dr. Vanildo Luiz del Bianchi
(Membro)

Prof. Dr. Luiz Antônio Viotto
(Membro)


Prof.^a. Dr.^a. Lúcia Regina Durrant
(Membro)


Prof.^a. Dr.^a. Iracema de Oliveira Moraes
(Membro)

Prof.^a. Dr.^a. Deise Maria Fontana Capalbo
(Membro)

À Liberdade De Consciência

À Liberdade De Consciência

À Igualdade De Direitos

À Fraternidade Entre Os Homens

Dedico este trabalho

Às Lembranças

Paulo Tavares de Macedo (1917-1997), sem você nada teria sido possível, meu verdadeiro mestre, no momento o que mais queria é que estivesse aqui, mesmo sabendo que estará sempre presente...

Alzira Verthein Tavares de Macedo (1947-1999), meu estímulo, meu referencial, o exemplo a seguir, verdadeira e única irmã, minha fã incondicional, sei que estará sempre me apoiando...

Gustavo Freiman Tavares de Macedo (mar 1993 - ago 1993), meu pequeno mestre, em sua curta mas expressiva missão trazendo as mensagens de luz, de resistência e de equilíbrio, em nossos piores momentos...

Ao Triunfo

Darcylla Verthein Tavares de Macedo, das grandes perdas à vitória final, da realização, dos filhos, dos netos e dos seus bisnetos, o legado do seu exemplo de sinceridade, de retidão, de resistência de dignidade e de fé.

À Alegria

Da satisfação e da alegria de vencer tantos obstáculos, da realização do trabalho apesar das atribulações, da sensação do dever cumprido.

Às Sementes

Aos filhos queridos, **Bárbara, Ricardo Antônio, Gabriela e Hudson**, meus grandes amigos, à vontade de poder dar o bom exemplo, de aprender tanto com vocês. Que possam levar adiante sempre acesa a chama da dignidade, do respeito, do amor ao próximo, da elevação moral e da espiritualização que vocês me inspiraram.

Aos Amores

Aos meus pequenos mestres **Pedro Henrique, Jade, Rafaela e Giovana**, com a certeza de que o amor retorna ao amor. As boas sementes geram novas e belas flores dando novos e belos frutos, estarei sempre com vocês.

Aos Amigos

Aos que direta ou indiretamente estiveram sempre ao meu lado, mesmo que não os visse presentes sei que ali estavam.

Agradecimentos

FEA/UNICAMP

*Ao **Ranulfo Monte Alegre** – Meu orientador e grande amigo, a você o meu agradecimento especial, pelo apoio incondicional sem o qual nada se realizaria, pela coluna capilar especialmente importada para a realização das análises no cromatógrafo da EMBRAPA, tantos problemas resolvidos, pelo apoio moral, por sempre acreditar na realização deste trabalho, levarei sempre a sua lembrança, seguirei o seu exemplo, estarei à ordem para o que precisar, esperando poder continuar juntos em outros trabalhos.*

*À **Comissão de Pós-Graduação** – Pela confiança, consideração e apoio.*

PICD/CAPE

*À **Denise, Débora, Célio** do PICD/UFRRJ, à **Regina e Maria das Graças** do DPPG/UFRRJ – Pela atenção, consideração e amizade.*

*À **CAPE** – Pela bolsa concedida, desejando que o país possa um dia usufruir do conhecimento científico e tecnológico que financia através do governo federal, mas pouco colhe.*

Em Casa

*À **Lenice Freiman de Oliveira** – Pela sua presença no dia a dia, pela sua ajuda, pela sua consideração e pela sua amizade.*

DTA/UFRRJ

***Wilson Pereira de Andrade** – Ao amigo, sem o qual não conseguiria realizar as análises de lipídios, pelos fins de semanas em que me ajudou. incondicionalmente.*

***Gilvair Marconde de Souza** – Ao amigo, pelo apoio no computador, sem o qual ainda estaria tentando aprender.*

***Helio de Magalhães Cardoso** – Ao amigo pela consideração e ajuda fora dos horários de expediente, pelo cuidado com as culturas nos fins de semana, sempre presente, pela atenção e amizade.*

*Ao **Paulo Henrique** – Pela ajuda, boa vontade, amizade e consideração.*

*Às técnicas **Lúcia, Dina, Irlene, Lúcia** – Pela ajuda sempre que precisei.*

*À **Soraia** e ao **Antônio Tavares** – Pelo estímulo, consideração e a amizade.*

*Ao **Luiz Otávio** – Pelo apoio do IT.*

*Ao **Pedro, Arlene, Djalva, Rosa e Martins** – Pelo apoio do departamento.*

*Ao **Gerson** – Pelo apoio da Pós-Graduação no conserto do fermentador.*

*À **Maria Paula e Alice** – Pelo apoio em toda parte inicial do trabalho no laboratório e na manutenção das culturas.*

*Ao **Edio Mariano** – Pela atenção, consideração e apoio.*

CNPAB/EMBRAPA/CTAA.

Alberto Duque Portugal – Ao amigo pela consideração, amizade e o apoio da EMBRAPA.

Johana Dobëreiner – Pela consideração e amizade, sempre quando presente.

Geraldo Baeta – Ao grande amigo de todas as horas, pelo apoio do laboratório de gramíneas, pelos slides, pela consideração e amizade.

Roberto Gregio, Altiberto, Vanderlei (Sauva), Zé Vicente, Rojane, Carlinhos – Por sempre abrirem as portas, pela colaboração e pela consideração.

Rosemar do CTAA – Pela atenção e colaboração.

IA /UFRRJ

Ao Felipe Brasil – Pelo apoio nas fotos digitais e slides, pela consideração.

CENPES/PETROBRÁS

À Maria Isabel e toda a sua equipe do CENPES – Pelas análises realizadas em espectrometria de massa e cromatografia e por me receber tão bem.

IMPrensa/UFRRJ

Gilberto da Silva Reis – Ao amigo, pelo apoio, pela orientação e boa vontade nas montagens e nas cópias e pela consideração.

ICE

Ao Dari Cesarin Sobrinho – Pelo apoio na cromatografia, pela amizade e pela consideração.

À Beth, ao Maurício e ao Paulo – Pelo apoio nas análises estatísticas, pela atenção e consideração.

DTQ

Ao Maurício Mancini – Pelo apoio e orientação no programa “Statistica”.

Manutenção

Ao amigo engenheiro Alberto Alfredo Castro – O companheiro, pelas peças que fabricou para o fermentador, pela orientação correta na manutenção dos equipamentos do laboratório, pela consideração e amizade.

Fiéis escudeiros

Ao José Carlos (Porquinho), ao Sebastião (Tião), à Adriana (Adri) – Meus fiéis escudeiros, incondicionalmente ao meu lado, em todas as ocasiões sempre me ajudando, pela consideração e amizade.

ÍNDICE

Resumo	ix
Summary	x
Nomenclatura	xi
1 – INTRODUÇÃO:	01
2 – OBJETIVOS:	03
3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:	
3.1 - Importância das microalgas	04
3.1.1 - Alimentação	05
3.1.2 - Usos terapêuticos	07
3.1.3 - Produtos de interesse	08
3.1.4 - Tratamento de efluentes	09
3.2 - Características da Spirulina	10
3.3 - Metabolismo	12
3.4 - Composição da Spirulina	
3.4.1 - Composição centesimal	14
3.4.2 - Composição de aminoácidos	15
3.4.3 - Conteúdo de vitaminas	16
3.4.4 - Conteúdo em carboidratos e ácidos nucleicos	16
3.4.5 - Conteúdo em pigmentos	17
3.4.6 - Conteúdo de sais minerais	18
3.4.7 - Composição de lipídios	19
3.4.8 - Ácido gama-linolênico	22
3.5 - Cultivo da Spirulina	
3.5.1 - Considerações gerais	23
3.5.2 - Parâmetros para o cultivo de Spirulina	27
3.5.2.1 - Influência dos nutrientes	27
3.5.2.2 - Influência da incidência de luz	28
3.5.2.3 - Influência da temperatura	29
3.5.3 - Sistemas de produção de Spirulina	
3.5.3.1 - Crescimento celular	31

4 – MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 - Material utilizado	
4.1.1 - <i>Spirulina</i> utilizada	35
4.1.2 - Meio de cultura	35
4.1.3 - Cultivo da <i>Spirulina</i>	37
4.1.4 - Equipamentos utilizados	38
4.2 - Controles realizados	
1 - Relação peso seco x densidade ótica	38
2 - Peso seco dos experimentos	39
3 - pH	39
4 - Temperatura	39
4.3 - Análise dos resultados	
1 - Umidade	40
2 - Cinzas	40
3 - Proteínas	40
4 - Lipídios totais	40
5 - Esterificação, metilação e análise de ácidos graxos	41
6 - Carboidratos	41
7 - Análise dos ácidos graxos apolares por cromatografia	41
4.4 - Análise dos parâmetros cinéticos	
1 -Parâmetros cinéticos	42
1.a - Velocidade específica	42
1.b - Tempo de geração	42
1.c - Fator de rendimento -	42
1.d – Vel. específica x consumo de substrato	42
1.e - Produtividade	43
2 - Avaliação de lipídios e ácidos graxos	43

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO:

5.1 - Crescimento	45
5.1.1 - Curvas de crescimento a 35°C	45

5.1.2 - Curvas de crescimento a 25°C	46
5.1.3 - Produção de biomassa	46
5.2 - Variação do pH	
5.2.1 - Curvas da variação do pH a 35°C	48
5.2.1 - Curvas de variação do pH a 25°C	48
5.3 - Velocidades específicas de crescimento	49
5.3.1 - Velocidade específica de crescimento à 35°C - 2,5N	50
5.3.2 - Velocidade específica de crescimento à 35°C - 0,2N	50
5.3.3 - Velocidade específica de crescimento à 35°C - 0,0N	51
5.3.4 - Velocidade específica de crescimento à 25°C - 2,5N	51
5.3.5 - Velocidade específica de crescimento à 25°C - 0,2N	52
5.3.6 - Velocidade específica de crescimento à 25°C - 0,0N	52
5.4 - Produtividade	53
5.4.1 - Produtividade máxima	53
5.4.2 - Produtividade total	54
5.5 - Composição centesimal	
5.5.1 - Composição centesimal da biomassa	55
5.5.2 - Composição geral em biomassa e umidade	58
5.5.3 - Composição geral dos ácidos graxos	59
5.5.4 - Composição dos ácidos graxos apolares selecionados	61
5.6 - Análises estatísticas	65
5.6.1 - Matriz da composição geral	66
5.6.2 - Matriz da composição dos ácidos graxos	67
5.6.4 - Proteínas	68
5.6.5 - Lipídios totais	69
5.6.6 - Ácidos graxos	70
5.6.7 - Ácido gama-linolênico	71
5.6.8 - Produtividade do ácido gama-linolênico	72
5.6.9 - Ácido palmítico	73
5.6.10 - Ácido palmítoleico	74
5.6.11 - Ácido esteárico	75

5.6.11 - Ácido esteárico	75
5.6.12 - Ácido oleico	76
5.6.13 - Ácido linoleico	77
6 – CONCLUSÕES:	78
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	79

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01 - Países produtores de microalgas	04
Tabela 02 - Composição centesimal das microalgas	14
Tabela 03 - Composição de aminoácidos e padrão da FAO	15
Tabela 04 - Composição de vitaminas da Spirulina	16
Tabela 05 - Faixas do espectro de absorção dos pigmentos	18
Tabela 06 - Composição de lipídios das microalgas	20
Tabela 07 - Composição de ácidos graxos das microalgas	21
Tabela 08 - Aumento de lipídios em estarvação de nitrogênio	25
Tabela 09 - Composição em diferentes concentrações de KNO ₃	26
Tabela 10 - Percentagem de ácidos graxos em diferentes níveis de N	27
Tabela 5.4 - Produtividades para os diversos tratamentos	53
Tabela 5.5.1 - Composição centesimal da biomassa	56
Tabela 5.5.2 - Composição em biomassa e umidade	59
Tabela 5.5.3 - Composição centesimal dos ácidos graxos	60
Tabela 5.3.1 - Matriz da composição geral	66
Tabela 5.3.2 - Matriz da composição dos ácidos graxos	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 5.1.1 - Curvas de crescimento a 35°C	45
Figura 5.1.2 - Curvas de crescimento a 25°C	46
BIOM – Superfície de resposta para a biomassa	47

Figura 5.2.2 - Variação de pH a 25°C -----	49
PRODM - Superfície de resposta da produtividade máxima-----	54
PRODT - Superfície de resposta da produtividade total -----	55
PROT - Superfície de resposta para proteínas -----	68
LIPT - Superfície de resposta para lipídios totais -----	69
AGRAX - Superfície de resposta para ácidos graxos -----	70
GLA - Superfície de resposta para ácido gama-linolênico -----	71
PGLA - Superfície de resposta para produtividade do ácido gama-linolênico-----	72
PALM - Superfície de resposta para o ácido palmítico -----	73
PMOLEI - Superfície de resposta para o ácido palmitoleico -----	74
ESTEAR - Superfície de resposta para o ácido esteárico -----	75
OLEICO - Superfície de resposta para o ácido oleico -----	76
LINOLEI - Superfície de resposta para o ácido linoleico -----	77

CATÁLOGO DAS FOTOS

- f-01 --- bolsas plásticas de 60 l para cultivo, desenvolvidas na Itália para aquacultura.
- f-02 --- gel de *Spirulina maxima*, deste trabalho, aparecendo a ficocianina azul.
- f-03 --- *S. maxima*, foto com aumento 400 x, tirada no Setor de Patologia Animal, UFRRJ.
- f-04 --- Agitador de pás flutuante, em tanque aberto, Itália.
- f-05 --- modelo de tanques com agitação de palhetas, raceways, utilizados em Israel, Itália.
- f-06 --- tanque aberto, circular, de tamanho pequeno, diâmetro de 20m, Aquacultura, RJ.
- f-07 --- tanque aberto de grande porte, oblongo, para microalgas para aquacultura, Itália.
- f-08 --- bolsas plásticas de 60 l para cultivo, utilizadas no DTA/UFRRJ.
- f-09 --- fotobiorreator tubular reto, Itália.
- f-10 --- fotobiorreator tubular com curvas, com maior percurso para melhor produtividade.
- f-11 --- *Spirulina maxima* espiralada e reta, aumento de 400 x, Patologia Animal, UFRRJ.
- f-12 --- Erlenmeyers 1000 ml com cultura estoque, sob iluminação, DTA/UFRRJ.
- f-13 --- Erlenmeyers com cultura estoque, vista em primeiro plano, DTA/UFRRJ.
- f-14 --- Crescimento da *Spirulina* no fermentador Virtis, à 25°C, DTA/UFRRJ.
- f-15 --- Filtração da cultura, recuperação do gel em peneira, DTA/UFRRJ.

- f-16 --- Vista frontal do fermentador Virtis de 3 dornas, parte inferior aberta, DTA/UFRRJ.
- f-17 --- Espectrofotômetro Spectronic 20, DTA/UFRRJ.
- f-18 --- Estufa de secagem, DTA/UFRRJ.
- f-19 --- Balança analítica Metler, DTA/UFRRJ.
- f-20 --- Potenciômetro Corning para pH, DTA/UFRRJ.
- f-21 --- Vista frontal do controle de temperatura do fermentador Virtis, DTA/UFRRJ.
- f-22 --- Balança para umidade Metler, DTA/UFRRJ.
- f-23 --- Mufla para carbonização da amostra, análise de cinzas, DTA/UFRRJ.
- f-24 --- Aparelho Micro-Kjeldahl, CNPAB/EMBRAPA.
- f-25 --- Aparelho extrator soxlet, DTA/UFRRJ.
- f-26 --- Coluna capilar DB-225, no cromatógrafo Perkin-Helmer, CNPAB/EMBRAPA.

APÊNDICES

A.1.1 - Crescimento a 35°C (2,5 g/l KNO ₃)	97
A.1.2 - Crescimento a 35°C (0,2 g/l KNO ₃)	97
A.1.3 - Crescimento a 35°C (0,0 g/l KNO ₃)	98
A.1.4 - Crescimento a 25°C (2,5 g/l KNO ₃)	98
A.1.5 - Crescimento a 25°C (0,2 g/l KNO ₃)	99
A.1.6 - Crescimento a 25°C (0,0 g/l KNO ₃)	99
A.1.7 - pH a 35°C (2,5 g/l KNO ₃)	100
A.1.8 - pH a 35°C (0,2 g/l KNO ₃)	100
A.1.9 - pH a 35°C (0,0 g/l KNO ₃)	101
A.1.10 - pH a 25°C (2,5 g/l KNO ₃)	101
A.1.11 - pH a 25°C (0,2 g/l KNO ₃)	102
A.1.12 - pH a 25°C (0,0 g/l KNO ₃)	102
A.1.13 - PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DAS SUP. DE RESPOSTA	103
1 - BIOM - Parâmetros para biomassa	103
1.1 - Dispersão dos resultados para biomassa	103
2 - PRODM - Parâmetros para produtividade máxima	104

2.1 – Dispersão dos resultados para produtividade máxima -----	104
3 – PRODT – Parâmetros para produtividade total -----	105
3.1 – Dispersão dos resultados para produtividade total -----	105
4 – PROT – Parâmetros para proteínas -----	105
4.1 – Dispersão dos resultados para proteínas -----	106
5 – LIPT – Parâmetros para lipídios totais -----	106
5.1 – Dispersão dos resultados para lipídios totais -----	107
6 – AGRAX – Parâmetros para ácidos graxos totais -----	107
6.1 – Dispersão dos resultados para ácidos graxos totais -----	108
7 – GLA – Parâmetros para ácido gama-linolênico -----	108
7.1 – Dispersão dos resultados para ácido gama-linolênico -----	109
8 – PGLA – Parâmetros para produtividade do ácido gama-linolênico -----	109
8.1 – Dispersão dos resultados para produtividade ácido gama-linolênico-----	109
9 – PALM – Parâmetros para ácido palmítico-----	110
9.1 – Dispersão dos resultados para ácido palmítico -----	110
10 – PMOLEI – Parâmetros para ácido palmitoleico -----	111
10.1 – Dispersão dos resultados para ácido palmitoleico -----	111
11 – ESTEAR – Parâmetros para ácido esteárico -----	112
11.1 – Dispersão dos resultados para ácido esteárico -----	112
12 – OLEICO – Parâmetros para ácido oleico -----	113
12.1 – Dispersão dos resultados para ácido oleico -----	113
13 – LINOLEI – Parâmetros para ácido linoleico -----	114
13.1 – Dispersão dos resultados para ácido linoleico-----	114
A.2.1 – Fluxograma da esterificação dos ácidos graxos – CENPES-----	116
A.2.2 – Resultados da esterificação – CENPES/PETROBRAS -----	117
A.2.3 – Especificação do método e da coluna – CENPES/PETROBRAS -----	118
A.2.4 – Resultados da análise cromatográfica am. padrão – CENPES/PETROBRAS-	119
A.2.5 – Cromatogramas e espectro massa da am. padrão – CENPES/PETROBRAS --	120
A.2.6 – Cromatogramas,espectro da coluna para o GLA – CENPES/PETROBRAS --	121
A.2.7 – Cromatograma do espectro da coluna DB-225 – CENPES/PETROBRAS ---	122
A.2.8 – GLA-05 -----	123

A.2.9 - GLA-06	123
A.2.10 - GLA-68	124
A.2.11 - GLA-08	124
A.2.12 - GLA-58	125
A.2.13 - GLA-57	126
A.2.14 - GLA-14	127
A.2.15 - GLA-40	127
A.2.16 - GLA-41	128
A.2.17 - GLA-23	129
A.2.18 - GLA-69	129
A.2.19 - GLA-37	130
A.2.20 - GLA-17	131
A.2.21 - GLA-49	131
A.2.22 - GLA-51	132
A.2.23 - GLA-25	133
A.2.24 - GLA-26	133
A.2.25 - GLA-29	134

A.2.9 - GLA-06	123
A.2.10 - GLA-68	124
A.2.11 - GLA-08	124
A.2.12 - GLA-58	125
A.2.13 - GLA-57	126
A.2.14 - GLA-14	127
A.2.15 - GLA-40	127
A.2.16 - GLA-41	128
A.2.17 - GLA-23	129
A.2.18 - GLA-69	129
A.2.19 - GLA-37	130
A.2.20 - GLA-17	131
A.2.21 - GLA-49	131
A.2.22 - GLA-51	132
A.2.23 - GLA-25	133
A.2.24 - GLA-26	133
A.2.25 - GLA-29	134
A.2.26 - Cromatograma da amostra GLA-06	135

RESUMO

Foi estudado o cultivo da microalga *Spirulina maxima*, que produz quantidades elevadas do ácido graxo gama-linolênico, GLA, de grande interesse terapêutico, sendo ela de fácil manejo, em meios com três níveis de nitrogênio, 2,5N (2,5g/l KNO₃), 0,2N (0,2g/l KNO₃) e ausência de N, nas temperaturas (T) de 25°C e 35°C, correspondentes às isotermas do clima do Brasil. Utilizou-se 3 dornas com 3 litros cada uma do meio de cultivo proposto por Paoletti et al (1975), sob condições limitantes de N, luminosidade constante de 2.400 lux, no laboratório do DTA/UFRRJ, baseando-se em estudos anteriores.

Observou-se que embora a biomassa, a velocidade específica e a produtividade tenham diminuído com a diminuição de T e de N, houve um acentuado aumento na fração lipídica e dos ácidos graxos, de até 4 vezes no crescimento com ausência de N. Segundo autores, isto se deve à utilização das biliproteínas quando em condições de stress, observado pela diminuição das proteínas, 35% em média aproximadamente.

Foram feitas as análises cromatográficas dos ácidos graxos apolares, na coluna capilar DB - 225, com a quantificação dos componentes e a análise estatística dos resultados, aplicando-se planejamento fatorial de 3 x 2, com superfície de resposta.

Dos seis principais ácidos graxos apolares que foram avaliados, o GLA, aumentou 3,55 vezes em ausência de N a 35°C, e 4,28 vezes em ausência de N a 25°C, aproximadamente, e a produtividade 3,4 vezes a 35°C e 4,2 vezes a 25°C respectivamente, para os valores médios.

Os outros 5 ácidos graxos identificados mostraram variações substanciais com a diminuição ou ausência de N, todos obedecendo a uma variação linear com T e não linear com N, para os valores médios. O ácido palmítico, o maior componente, diminuiu com a diminuição de T e aumentou com a diminuição de N, 2,21 vezes a 35°C e 2,95 vezes a 25°C para o meio com 0,2N. O ácido palmitoleico aumentou com o abaixamento de T de 35°C para 25°C em até 3,3 vezes para o meio com 2,5N. O ácido esteárico diminuiu com o abaixamento de T e aumentou com a diminuição de N, 6,9 vezes a 35°C para o meio com 0,2N e 10,7 vezes a 25°C em ausência de N. O ácido oleico diminuiu com o abaixamento de T e aumentou com a diminuição de N, 3,3 vezes a 35°C e 2,2 vezes a 25°C para o meio com 0,2N. O ácido linoleico diminuiu com abaixamento de T e aumentou com a diminuição de N, 3,2 vezes a 35°C e 2,9 vezes a 25°C em ausência de N.

SUMMARY

The growth of *Spirulina maxima*, which produces high amount of gammalinolenic acid (GLA) of a great therapeutic concern, was studied in a medium with three nitrogen levels, 2.5N (2.5 g/l KNO_3), 0.2N (0.2 g/l KNO_3) and nitrogen absence at temperatures (T) of 25 and 35°C, corresponding to the Brazilian climate isotherms. Three vessels were filled each with 3 litre of medium as proposed by Paoletti et al. (1975), under limited nitrogen conditions and constant brightness of 2,400 lux, as defined by our earlier studies.

Although the biomass growth rate and productivity decreased with T and N concentration reduction, it was observed an accentuated fatty-acids increase in the lipid fraction until 4 times in the medium without nitrogen, that was due the biliproteins use at stress conditions. The observed average protein decrease was approximately 35%.

The chromatographic analyses of the apolar fatty-acids were accomplished by DB-225 capillary column with component quantification and statistical evaluation of the results through 3 x 2 factorial planning with surface response.

Among the six principal fatty acids evaluated, the average values of GLA concentration increased 3.55 and 4.80 times in nitrogen absence at 35 and 25°C respectively, while its productivity increased 3.46 and 4.20 times at the same temperatures respectively.

Other five fatty-acids were identified and their average concentrations showed substantial variation with concentration decrease or absence of N not following a linear correlation, but a linear correlation was observed with respect to T.

The palmitic acid concentration decreased 2.21 and 2.95 times when N concentration was reduced to 0.2N at 35 and 25°C respectively. The palmitic acid concentration increased 3.3 times when T decreased from 35 to 25°C in the medium with 2.5N. The stearic acid concentration increased 6.9 times at 35°C when N concentration was reduced to 0.2N and 10,7 times at 25°C in the absence of N. The oleic acid concentration increased 3.3 and 2.2 times at 35 and 25°C respectively when N concentration was reduced to 0.2N. The linolenic acid concentration increased 3.2 and 2.9 times at 35 and 25°C respectively in the absence of N.

NOMENCLATURA UTILIZADA

BV	valor biológico
PER	índice de eficiência proteica
w3	ômega 3 - família de ácidos graxos (LA, EPA, DHA)
w6	ômega 6 - família de ácidos graxos
PGE1	prostaglandina 1
PGE2	prostaglandina 2
μ_x	velocidade específica de crescimento (d^{-1})
μ_{max}	velocidade específica de crescimento máxima (d^{-1})
t	tempo (dias)
t_d	tempo de geração (dias)
t_t	tempo total do cultivo (dias)
t_m	tempo onde o crescimento alcança o valor máximo (dias)
S	substrato (g/l)
K_s	valor do substrato onde a velocidade específica é $\frac{1}{2} \mu_{max}$ (g/l)
V	volume do substrato (litros)
X	biomassa em peso seco (g)
Y	rendimento (%)
$Y_{x/s}$	rendimento de biomassa por substrato consumido (%)
$Y_{p/x}$	rendimento de produto por biomassa produzida (%)
$Y_{p/s}$	rendimento de produto por substrato consumido (%)
N	nitrogênio
T	temperatura ($^{\circ}C$)
rep	repetição
BIOM	biomassa
PRODM	produtividade máxima
PRODT	produtividade total
PROT	proteínas
LIPT	lipídios totais
CIN	cinzas
CHIDR	carboidratos
AGRAX	ácidos graxos
ALA	ácido alfa-linolênico
GLA	ácido gama-linolênico
PGLA	produtividade do ácido gama-linolênico
DGLA	ácido dihomogama-linolênico
LA	ácido linoleico
AA	ácido araquidônico
EPA	ácido eicosapentaenóico
DHA	ácido docohexaenóico
PALM	ácido palmítico
PMOLEI	ácido palmitoleico
ESTEAR	ácido esteárico
OLEICO	ácido oleico
LINOLEI	ácido linoleico

1 - INTRODUÇÃO :

As microalgas são cultivadas comercialmente em vários países com diversas aplicações comerciais, principalmente devido aos altos teores de proteínas, lipídios, sais minerais, vitaminas, e pigmentos. O maior potencial das microalgas ainda é a aplicação em alimentos e uso terapêutico.

As espécies mais comuns são as Clorofíceas (verdes) e as Cianofíceas (verde-azuladas), sendo os gêneros mais cultivados *Clorella*, *Scenedesmus*, *Dunaliella* e *Spirulina*.

Segundo o Institute Français du Pétrole (1963), as tribos da África Central utilizam *Spirulina maxima* como alimento básico, onde esta cresce naturalmente em lagoas alcalinas.

A *Spirulina* é uma cianobactéria, utilizada principalmente como complemento alimentar e dietas de emagrecimento. A sua velocidade de crescimento bem como o tamanho do tricoma, apontam para a facilidade de manuseio e a simplicidade na produção, aliada à sua rusticidade.

As altas concentrações de proteínas de fácil digestão, com a presença de todos os aminoácidos essenciais em teores acima do padrão da FAO-OMS para nutrição, lipídios contendo ácidos graxos essenciais, beta-caroteno, vitaminas do complexo B e sais minerais, indicam a sua preferência.

A *Spirulina* é a única dentre várias microalgas estudadas a apresentar quantidades substanciais de ácido gama-linolênico (GLA) na fração lipídica produzida.

O GLA tem sido apontado como tendo propriedades terapêuticas importantes, fazendo parte do grupo de ácidos graxos essenciais. Há evidências de que a perda da enzima D6D (delta-6-dessaturase), que converte ácido linoleico em gama-linolênico, está relacionada com o envelhecimento.

Fatores destrutivos, como diabetes, alcoolismo, radiações, viroses oncogênicas, produtos carcinogênicos e outros, reduzem a atividade da D6D, resultando carência de GLA e seus derivados, fator crucial para a produção de prostaglandina E1 (PGE1), substância principal do sistema imunológico do organismo.

As consequências adversas da perda da D6D, são a carência de GLA e de seus derivados, ácido araquidônico (AA), ácido dihomo-gamalinolênico (DGLA), prostaglandina E1, prostaglandina E2 e ácidos graxos de cadeia longa.

A importância da produção do GLA pela *Spirulina* é que as outras fontes mais conhecidas possuem concentrações menores do que esta, por exemplo o leite materno e óleo extraído da semente oleaginosa da gramínea “evening prim-rose”.

A economicidade do processo de cultivo é dependente da temperatura e embora algumas espécies sejam adaptadas a temperaturas extremas (menores que 20° C e maiores que 40° C) as isotermas mínimas e máximas ótimas para o seu crescimento estão entre 25° C e 35° C, fazendo com que as regiões do mundo compreendidas dentro destas faixas sejam privilegiadas para a produção destas microalgas.

As regiões do mundo mais propícias são: México, América Central, Indonésia, Norte da Austrália, Nova Guiné, Sudoeste Asiático, Índia, Arábia Saudita, Brasil e América do Sul exceto regiões do sul, sendo que o Brasil apresenta-se como um dos países com maiores disponibilidades de matéria prima e mão de obra qualificada, com as maiores possibilidades de produção de algas de todo o mundo.

Para o Brasil vê-se um grande potencial pelas excelentes condições de clima, porém a experiência de produção de microalgas é muito pequena e está restrita à *Spirulina* tendo sido necessária a importação da ordem de 10 t (Microalgas S.A., 1988), com o preço de US\$ 20,00 a US\$ 40,00 o quilo. A produção nacional nesta ocasião atingia menos de 10% do mercado interno.

No Brasil a *Spirulina* é usada apenas para a produção de cápsulas (de 300 mg) destinadas às dietas de emagrecimento. O seu efeito controlador do apetite ocorre se ingerida uma ou duas horas antes das refeições, devido a presença dos aminoácidos essenciais em quantidades balanceadas e composição rica em proteínas (Hansen, 1984).

Tem sido utilizada em formulações de alto teor nutritivo (health food), servindo de complementação proteica e vitamínica, inclusive B₁₂.

Estudos para a obtenção de ficocianina e ácidos graxos essenciais já são reconhecidos e realizados em Israel, França e Japão.

2- OBJETIVOS :

Este trabalho teve como objetivo estudar o crescimento de *Spirulina maxima* buscando a otimização da produção de lipídios, em especial o ácido graxo gama-linolênico, considerando o alto teor deste ácido graxo que ela contém e a rusticidade e simplicidade de manuseio. Buscou a obtenção de parâmetros cinéticos que favoreçam o acúmulo de lipídios, em escala de laboratório, em dornas de 3 litros, com vistas à utilização posterior em maior escala em sistema fechado, onde seja possível o controle das variáveis que levem à produção dos diversos compostos de interesse.

A observação das influências causadas pelas alterações das condições de cultivo, para o aumento da produção de lipídios, foi feita nos limites de temperatura dentro da faixa ótima representativa das condições do Brasil, de 25° C e de 35° C, com variação de três níveis de nitrogênio, de acordo com estudos que demonstraram o aumento da formação de lipídios com a diminuição da concentração de nitrogênio, em meios com 2,5 g/l de NO₃, 0,2 g/l de NO₃ e 0 g/l de NO₃ (ausência), respectivamente.

Foi feita a análise estatística dos resultados, de planejamento fatorial com superfície de resposta, a qual objetivou mostrar a maximização da produção dos lipídios bem como dos ácidos graxos de interesse da sua composição, com os respectivos parâmetros cinéticos.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

3.1- Importância das microalgas:

As microalgas verdes (clorofíceas) e as verde-azuladas (cianofíceas), fazem parte das espécies de maior interesse econômico na extração de substâncias úteis ou na utilização como complemento alimentar. Estas podem produzir quantidades substanciais de uma massa celular que será matéria prima para extração de diversas substâncias para suplemento alimentar ou para uso terapêutico, como proteínas, vitaminas, lipídios, corantes e sais minerais, (Ciferri & Tiboni, 1985; Cohen, 1986; Richmond, 1986; Fox, 1987; Borowitzka, 1992; Lincoln et al, 1993).

Embora até pouco tempo as aplicações comerciais se restringissem ao aproveitamento como fonte proteica, as microalgas ganham destaque em aproveitamento de diversos compostos químicos como ficocianina, ácido gama-linolênico (*Spirulina*), carotenóides (*Dunaliella*), clorofilas (*Clorella*), e vários outros, (Cohen, 1986).

No Brasil, a produção é muito pequena, salvo esforços individuais, em que algumas instituições desenvolveram até o momento algumas pesquisas, como na UFRJ, com *Scenedesmus quadriculata* e *Clorella homosfera* (Rosemberg, 1976); na PUC RJ, com *Spirulina platensis* do lago Chad, África, em culturas externas (Wagner et al, 1987) e no DTA/UFRRJ, onde tem-se trabalhado em especial com *Spirulina* (Robbs, 1988).

A produção mundial de *Spirulina* (cianofícea) ultrapassa 850 t/ano e a de *Clorella* (clorofícea) 1500 t/ano, sendo os principais produtores mostrados na tabela 1, (Hills & Nakamura, 1981; Cresswell et al, 1989).

TABELA 01 – Países produtores de microalgas, (Hills & Nakamura, 1981; Cresswell et al, 1989).

PAÍSES	ESPÉCIES	PRODUÇÃO (t/ano)	ANO
Chlorella ind. / EUA	<i>Chlorella</i>	150	1976
Sumpack / EUA	<i>Chlorella</i>	50	1976
Kansai Chlor.Co./Japão	<i>Chlorella</i>	3	1977
Okinawa Chlor.Co./Japão	<i>Chlorella</i>	50	1977

Taiwan Chlor.Co./Formosa	<i>Chlorella</i>	1.000	1976
China Chlor.Co./China	<i>Chlorella</i>	320	1977
Sosa Texcoco/Mexico	<i>Spirulina</i>	300	1983
Taiwan/Formosa	<i>Spirulina</i>	300	1983
Dainippon Inc.Chem./EUA	<i>Spirulina</i>	90	1983
Siam Algae Co./Tailandia	<i>Spirulina</i>	60	1983
Spam.Spirul.Co./Japão	<i>Spirulina</i>	40	1983
Kibbutz Hells e Ein-yohow/Israel	<i>Spirulina</i>	30	1984

3.1.1- Alimentação

Várias espécies de microalgas são usadas como fonte de proteínas na suplementação alimentar. Golebiowska et al (1993) compararam *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella* e *Chlamydomonas* com outras fontes como a soja, o milho e o trigo, concluindo pelo alto valor proteico da biomassa algal.

Metzer et al (1983), propuseram que as microalgas podem ser usadas como fonte alternativa de lipídios comestíveis devido aos altos níveis de triglicerídios bem como sua alta produtividade.

A *Spirulina* tem uma história antiga em sua utilização como alimento e as pesquisas não observaram nenhum fator indesejável quanto à toxicidade, teratogenicidade, ácido nucleico, bactérias, pesticidas, cancerígenos e metais pesados, concluindo que a *Spirulina* é um alimento seguro para humanos e para animais, (Atatsuka, 1979; Chamorro-Cevallos (b), 1980; Kay, 1991).

O potencial das cianobactérias foi considerado como excelente para a suplementação humana, (Soeder & Subardja, 1972; Braun, 1988).

Durante a 2ª guerra mundial, a Alemanha produziu microalgas como fonte de alimento e outros países a seguiram a partir de 1947. Esta dependia no entanto de estrutura, fonte de carbono e da cultura do inóculo para a sua viabilidade. No Japão foi construída a primeira planta piloto de *Chlorella* após a guerra, e outras plantas foram também construídas na Alemanha e na Rússia. Em 1960 o Japão começou a produção industrial de

Clorella em Taiwan, alcançando sucesso como um novo alimento, e a partir daí o cultivo em maior escala passou a ser feito em diversos países.

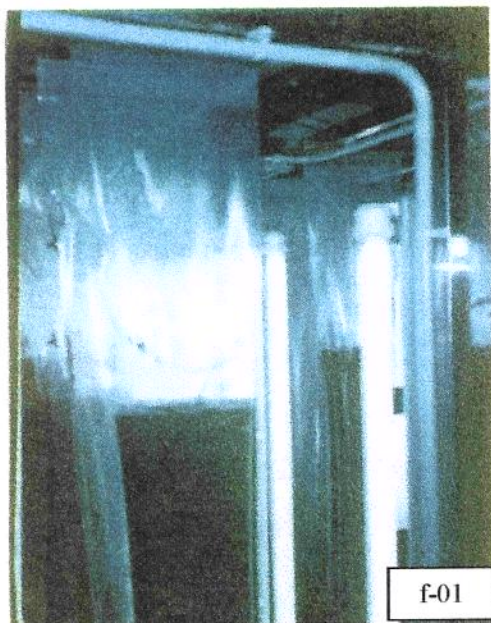
O uso de microalgas na alimentação humana e animal aumenta o conteúdo de proteínas e vitaminas, 600 mg/dia, em pó, nutre um indivíduo em suas necessidades proteicas e vitamínicas, (Battacharjee, 1970).

A fração proteica da *Spirulina* possui alta digestibilidade, 82 % em *Spirulina* fresca, e valor biológico (BV) encontrado, razão de N absorvido/ N total, foi de 79,5%, (Becker et al, 1982; Dillon et al, 1993). Esta é usada em dietas vegetarianas como enriquecimento proteico, (Becker, 1993).

Foram encontrados resultados altamente positivos utilizando *Spirulina* como suplementação em alimentação, em experimento como combate à subnutrição realizado na Índia, (Chandra-Babu & Rajasekaran, 1991).

As cianobactérias apresentaram excelentes resultados como ração animal, e estudos em alimentação de aves mostram que pode-se substituir em torno de 10% da fração proteica com sucesso, (Spacek et al, 1968; Blum et al, 1975). O teste de avaliação em alimentação animal mais utilizado é o PER (Razão de eficiência proteica) e em estudos com *Spirulina*, no México, a PER foi de 2,2, comparada com 1,86 de outras fontes, (Bourges et al, 1971; Richmond, 1988).

A utilização das microalgas para aquacultura é considerada de grande importância.



Na Itália desenvolveu-se um sistema de cultivo voltado para aquacultura em bolsas plásticas de 60 litros, sendo testado com sucesso no DTA/UFRRJ para *Spirulina* (f-01), (Campos, 1996).

No Brasil o sistema de produção de microalgas para aquacultura é feito com uma ampliação de escala de crescimento, iniciando-se com garrafas plásticas de 2 litros, aumentando-se para garrafas de 20 litros e para tanques de 100 litros, sendo este último em galpões com telhas transparentes sem controle de temperatura, (Triani, 1997).

A biomassa algal é utilizada para alimentação de moluscos bivalves, em estágio de larvas e jovens. As algas deverão ter alta concentração de ácidos graxos da família w_3 , (De Pauw & Persoone, 1988).

As cianobactérias dão excelentes resultados em aquacultura, a *Spirulina* é utilizada em alimentação de larvas de ostras, camarões e peixes, (Becker, 1981; Pantastico et al, 1986; Fabregas & Herrero, 1986; Ayala & Vargas, 1987; De Pauwn & Persoone, 1988; Benemann, 1992).

3.1.2 – Usos Terapêuticos

Devido a rica composição das microalgas, em especial a *Spirulina*, seus componentes são de grande aplicação terapêutica. Proteínas de fácil digestão são os mais abundantes constituintes, seguidos de carboidratos, lipídios, minerais, vitaminas e clorofila. Na fração proteica as biliproteínas têm grande importância e quanto à composição de aminoácidos, esta é bem balanceada, com exceção dos sulfurados, apresentando todos os aminoácidos essenciais em quantidades acima do padrão estabelecido pela FAO, (Paoletti et al, 1980).

Especialmente na *Spirulina*, o conteúdo em ácidos nucleicos é baixo, contém vitaminas lipossolúveis (pró-vitamina A, E, K e F), vitaminas do complexo B (B_1 , B_2 , B_6 , B_{12} , Biotina, mesoinositol, ácido Fólico e pantotenato de Ca) e vitamina C, sendo que os sais minerais mais abundantes são K, P, Mg, Fe. Tem tido grande aplicação para prevenção de doenças bem como para a terapia de várias patologias, muito pela presença do GLA, necessário na síntese do ácido araquidônico (AA) e da prostaglandina-1 (PGE_1), da ficocianina, da vitamina B_{12} , do beta caroteno e outros, conforme discriminado abaixo, (Henrikson, 1988; Richmond, 1988; Dubacq & Pham-Quoc, 1993):

- 1) Na desnutrição e no combate à anemia, com ferro assimilável e vitamina B_{12} , (Fox, 1993; Franke et al, 1994; Sautier & Tremolieres, 1976; Fox, 1993).
- 2) Na intoxicação por pesticidas organo-fosforados, (Richmond, 1988).
- 3) Na cicatrização de feridas e no tratamento de eczemas tópicos, (Tanticharoen et al, 1994; Richmond, 1988).

- 4) No tratamento do alcoolismo, da psicose maniaco-depressiva e esquizofrenia, deficiência de GLA, (Horrobin, 1981; Horrobin et al, 1983).
- 5) Nas doenças cardiovasculares, na regulação da pressão arterial, influência do GLA, (Kernoff et al, 1977; Fox, 1993; Richmond, 1988; Becker, 1993).
- 6) Na recuperação de artrites, (Richmond, 1988).
- 7) No controle da obesidade e na redução do colesterol, (Devi & Venkataraman, 1983; Becker et al, 1986; Nakaya, 1986; Nakaya et al 1988; Fox, 1993).
- 8) No controle de certos tipos de câncer, influência do beta-caroteno e da ficocianina, (Vandamme, 1993; Fox, 1993; Fedkovic et al, 1993)
- 9) Na correção da deficiência de vitamina A, (Annapurna et al, 1991; Lemoine et al, 1993).
- 10) Na eliminação de radionucleídeos, crianças de Tchernobyl tratadas com *Spirulina* diminuíram o nível do célio radioativo, (Fox, 1993).
- 11) Na correção da deficiência de zinco no sistema imunológico e no tratamento da diabetes tipo I, pela ação do GLA, (Pascaud, 1993).
- 12) Efeito antioxidante, no controle do envelhecimento, (Fedkovic et al, 1993; Bulik, 1993).
- 13) Na eliminação de metais pesados, de drogas e na redução da nefrotoxicidade, (Belay et al, 1992; Sandau et al, 1996).
- 14) No tratamento da AIDS, ajudando na atuação do *Lactobacillus* intestinal e melhorando o sistema imunológico, (Belay et al, 1992; Fox, 1993; Pascaud, 1993).

3.1.3 – Produtos de Interesse

O cultivo industrial de microalgas é baseado na eficiência e direcionamento de um sistema de transformação da energia solar em compostos orgânicos de interesse para extração de substâncias, ou aproveitamento em sua forma bruta. Dos produtos mais importantes e conhecidos, destacam-se : proteínas e outros polímeros, pigmentos, enzimas, gás metano e hidrogênio, sais e osmorreguladores e produtos farmacêuticos, (Cohen, 1986; Richmond, 1986; Fox, 1987).

As proteínas representam a maior produção por ser o principal componente das microalgas, calculando-se a média anual, em *Spirulina*, de 50 t/hectare, (Savins, 1978; Golebiowska et al, 1993).

Obtiveram-se excelentes resultados para a produção de compostos orgânicos e gás, incluindo pigmentos e vitaminas, por *Spirulina platensis*, (Richmond, 1988; Cysewsky, 1992; Aoyama et al, 1997).



Está sendo usado pela indústria farmacêutica o pigmento clorofiliano com nome de Fitoclorin, (Yamagushi, 1981; Albitskya et al, 1996).

A ficocianina está sendo usada industrialmente como corante de alimentos, remédios e cosméticos, substituindo corantes sintéticos, sendo o único corante azul natural (f-02). Este leva o nome de Linablue, produzido pela indústria Dainippon Ink et Chemical Inc., (Chen et al, 1996). Esta microalga também pode ser produzida em meio aquoso para aplicação em aquacultura, na produção de peixes ornamentais, (Matzunaga, 1993).

Na produção de polissacarídeos a *Spirulina platensis* contém aproximadamente 13,6 % de carboidratos, com dez tipos de monômeros. Estes polissacarídeos tem utilidade como substância citostática, (Madhavi et al, 1987; Filali et al, 1993; Pulz et al, 1994).

A substância citostática de nome Spirulan, polissacarídeo com importância terapêutica, é extraída da *Spirulina subsalsa*, (Patentes japonesas da Seiko-Epson, 1986; Shinohara, 1986 e Toa-Fuel, 1986).

3.1.4 – Tratamento de Efluentes

Devido à capacidade de algumas microalgas absorverem seletivamente com facilidade diversos íons metálicos dissolvidos, estas despertam interesse na remoção de metais poluentes bem como na recuperação daqueles economicamente interessantes, (Horikoshi et al, 1979; Blank, 1985; Kessler, 1986; Greene et al, 1986; Kaplan, 1987).

A *Spirulina* tem a vantagem de ser colhida com facilidade, devido ao tamanho do tricoma ser bem maior do que as demais microalgas, o que leva à solução do grande problema da remoção da biomassa no tratamento de efluentes, (Richmond, 1988).

Várias espécies de microalgas podem utilizar fontes de carbono de esgoto sanitário, onde absorvem nitrogênio e fósforo. A biomassa produzida poderá então ser aproveitada para ração animal ou fertilizante, abaixando consideravelmente a carga poluidora, (Reid et al, 1961; França et al, 1978; Wong et al, 1980; França et al 1981; Ayala et al, 1987; Lincoln et al 1993).

Biomassa de *Spirulina platensis* foi produzida a partir de efluentes de fábrica de amido na Tailândia, aproveitando a alcalinidade promovida pela presença de bicarbonato, sendo então utilizada para ração de peixes e camarão, (Tanticharoen et al, 1993).

Cianobactérias foram crescidas em rejeitos da criação de suínos no México, após aeração e estabilização, com ótimos resultados, (Canizares-Villanueva et al, 1995).

As microalgas *Spirulina* e *Chlorella* mostraram capacidade de adsorverem os metais cádmio, zinco, chumbo e cobre com grande eficiência e sem nenhuma toxidez, produzindo uma biomassa economicamente viável, (Sandau et al, 1996).

Spirulina e *Chlorella* foram crescidas em efluentes de uma fábrica de fertilizantes na Nigéria, com substancial aumento do teor de lipídios na sua biomassa, (Anaga et al, 1996).

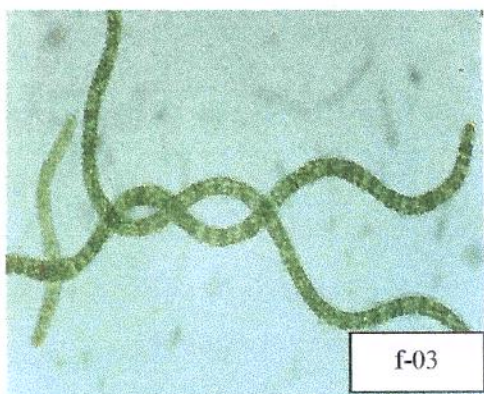
Spirulina foi cultivada na Índia, em meio com adição de excremento digerido de gado, promovendo boa diminuição dos custos, (Chattopadhyay et al, 1996).

3.2 – Características da *Spirulina*

A *Spirulina* é uma microalga verde azulada (cianoficea), multicelular, sem membrana celular, filamentosa, cujos filamentos são formados por células cilíndricas com 1 a 1,2 μm de diâmetro. Os filamentos ou tricomas possuem geralmente forma helicoidal, sendo esta espiral a característica do gênero *Spirulina*, onde se movimenta girando em torno do seu eixo. As dimensões das hélices e distância entre elas podem variar com as espécies, podendo ocorrer polimorfismo, surgimento de outros tipos de filamentos dentro da mesma espécie, a partir de um mesmo filamento, (Ciferri, 1983 ; Richmond, 1988). Não

possuem heterocistos, células fixadoras de nitrogênio, e a reprodução é feita por hormogonia, fragmentação do filamento, possuindo também vesículas de gás, que garantem a sua flutuação (f-03), (Garnier et al, 1993; Madigan et al, 1997).

As cianobactérias, como foram designadas, espiruladas, das quais faz parte o gênero *Spirulina*, são aquáticas, constituindo o maior grupo de procarióticas fotossintéticas, sendo que uma grande parte do oxigênio do planeta foi produzido por organismos semelhantes.



São capazes de fazer a fotossíntese e podem ser induzidas a produzirem compostos tais como proteínas, carboidratos, pigmentos, lipídios, vitaminas e sais minerais, (Knoll, 1985; Whitton, 1992; Vonshak, 1992).

Possuindo clorofila α e outros pigmentos, como a ficocianina, que dá a cor azulada, e os carotenóides, que estão localizados no interior das células em várias camadas, juntamente estas substâncias participam da fotossíntese produzindo oxigênio, (Baker et al, 1975; Bold et al, 1985; Raven et al, 1992).

A *Spirulina* é um organismo ubíquo, podendo ser encontrada em vários ambientes como: solos, lagos alcalinos ou não, fontes termais, água do mar, nascentes, podendo colonizar ambientes com concentrações elevadas de sais, impróprias para a maioria dos demais microrganismos. A *Spirulina maxima* e *Spirulina platensis* podem ser encontradas em abundância em lagos alcalinos na América Central e na África.

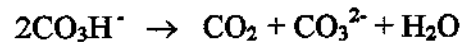
É uma microalga mesofílica, com temperatura ótima de crescimento entre 35 e 37°C, podendo algumas cepas crescerem entre 18 e 39 °C, (Richmond et al, 1980). A maioria das cianobactérias, p.ex. a *Spirulina*, é essencialmente fotoautotrófica, não podendo crescer no escuro e nem ter fonte de carbono orgânico. Porém, na presença de luz, ela utiliza carboidratos, sendo ainda que a adição de 2% de glicose em presença de luz favorece a produção de biomassa e pigmento, (Richmond, 1988; Marquez et al, 1995).

Necessita de alta alcalinidade, sendo a faixa ótima de pH situada entre 8,3 e 11,0, não suportando mudanças bruscas, (Zarrouk, 1966).

As principais fontes de nitrogênio são os nitratos, sendo que a uréia e os sais de amônio também podem ser utilizados, porém com restrições em relação às concentrações, (Richmond, 1988; Madigan et al, 1997).

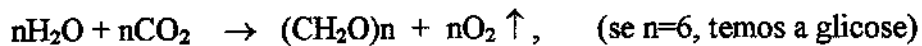
3.3 – Metabolismo

Quanto ao sistema metabólico, os cloroplastos constituem a sede da fotossíntese, em células eucarióticas, podendo ter até quarenta por célula, nos vegetais superiores, e um apenas em *Chlorella*. Na *Spirulina*, por ser procariótica, não existe cloroplasto, a clorofila está difusa pelas membranas, os cromatóforos estão em lamelas isoladas, em forma redonda ou filamentosa. A *Spirulina* por ter metabolismo autotrófico, utiliza meio inorgânico, CO₂ (em formação ou injeção direta), na presença de luz, (Rosemberg, 1976):

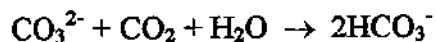


fotossíntese

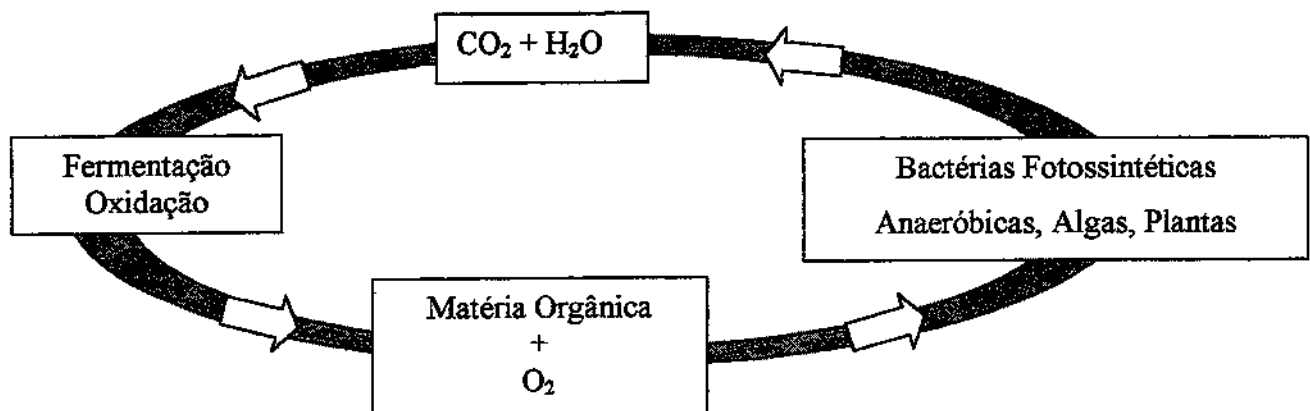
Na fotossíntese :



Para recuperar o íon bicarbonato, devido ao excesso de carbonato, é necessário injetar CO₂:

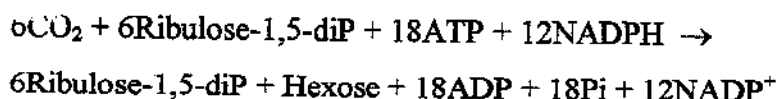


O ciclo ecológico da microalga fotossintética é :



Além da clorofila e ficocianina, a *Spirulina* possui outros pigmentos que atuam como antenas na captação de luz para a fotossíntese, localizados nas camadas de membranas no interior da célula, tilacóides. Estas guardam também o principal produto de reserva destas cianobactérias, o glicogênio, possuindo uma bainha mucilaginosa, (Raven et al, 1992).

O evento da fotossíntese, em relação ao ciclo fotossintético de assimilação do CO₂, pode ser resumido como (Rosemberg, 1976) :



Com relação à presença de lipídios em microalgas, são vários os fatores que desempenham papel importante como reguladores na sua biossíntese. Seus efeitos, no entanto, funcionam algumas vezes de maneira oposta em diferentes espécies de algas. Um dos fatores de maior importância prática é o conteúdo de nitrogênio no meio de cultivo. Quando o meio é desprovido de nitrogênio, o teor de lipídios tende a diminuir em poucos dias e, a seguir, em muitos casos, há um rápido aumento da sua concentração, sendo que a velocidade de produção destes lipídios é o mais importante, (Cohen, 1986).

Na seleção de cepas para cultivos de interesse, deve-se levar em conta as características morfológicas, ecológicas e fisiológicas. A temperatura, por exemplo, é um fator muito importante. Em uma mesma espécie de *Chlorella elipsoidea*, existem cepas psicrófilas, 10 – 15°C, mesófilas, 16 – 34°C, e termófilas, 35 – 45°C, (Tomaselli et al, 1987).

A *Spirulina* em particular é mesofílica, com temperatura ótima entre 35 – 37°C, mas algumas cepas podem crescer de 18°C até 39°C, (Richmond, 1980).

Em *Spirulina* o desenvolvimento da produção de biomassa depende da disponibilidade de dados sobre a economia do processo metabólico de crescimento por pelo menos um ano, para a avaliação da sua performance, velocidade de crescimento, melhor produção em biomassa e/ou constituintes metabólicos, capacidade termofílica ou psicrófila e ainda alterações genéticas extensivas, que dependeriam de elucidações do mecanismo de recombinação ou meios de se manipular geneticamente, (Ciferri, 1983).

Em relação ao aspecto genético, os sistemas recombinantes não são ainda disponíveis para *Spirulina* e nem plasmídios ou fagos têm sido isolados, existindo a descrição de um

micro-método para a produção e regeneração de esferoplastos a partir de tricomas de *Spirulina platensis*, (Lanfaloni et al, 1989).

3.4 – Composição da *Spirulina*

3.4.1 – Composição centesimal :

A composição bioquímica centesimal de *Spirulina maxima* e *Spirulina platensis* foi examinada em cultivos em laboratório e tanques abertos por um período de 10 anos na Itália. A proteína é o constituinte mais abundante. Na fração proteica, a biliproteína ficocianina é considerável, 6,3 a 13% do peso seco, sendo os outros componentes a ficoeritrina (traços) e a cianoficina.

A tabela 02 mostra a composição centesimal de *S. maxima* e *S. platensis* em cultivo em laboratório e em tanque aberto, (Paoletti et al, 1980).

TABELA 02 – Composição centesimal das microalgas, (Paoletti et al, 1980):

Fração	Cultivo em laboratório (% média)		Cultivo em tanque aberto (% média)	
	<i>Spirulina platensis</i>	<i>Spirulina maxima</i>	<i>Spirulina platensis</i>	<i>Spirulina maxima</i>
Proteína bruta	69	72	61	60
Lipídios	11	12	12	15
Carboidratos	15	11	19	16
Cinza	5	5	8	9
Ácido nucleico	4,5	4,6	4,3	4,3

Segundo os autores, o conteúdo de ácidos nucleicos é baixo, 7 a 7,6% da fração da proteína verdadeira e 6 a 6,5% da proteína crua. Os lipídios variam de 6 a 13% em *Spirulina platensis* e de 7 a 12% em *Spirulina maxima* e carboidratos de 12 a 20% em *Spirulina platensis* e de 10 a 16% em *Spirulina maxima*.

3.4.2 – Composição de aminoácidos :

Os aminoácidos estão presentes em sua maioria em concentrações acima do padrão da FAO/WHO, com exceção dos sulfurados e lisina, (Clement, 1975; Paoletti et al, 1980; Dillon et al, 1993).

A tabela 3 mostra uma comparação da composição de aminoácidos de *Spirulina* com o padrão estabelecido pela FAO/WHO para nutrição de crianças em idade pré-escolar, (mg/g de proteína).

TABELA 03- Composição de aminoácidos da Spirulina e padrão da FAO.

Aminoácidos	<i>S. maxima</i> mg/l	<i>S. maxima</i> mg/l	<i>S. platensis</i> mg/l	FAO/WHO mg/l
Cistina	4		9	28
Isoleucina	18	60	67	
Fenilalanina	50	49	53	
Leucina	60	87	98	
Lisina	46	41	48	
Metionina	14	20	25	
Triptofano	14	12	3	
Treonina	46	49	62	
Valina	80	63	71	
Ácido aspártico	86	99	118	63
Ácido glutâmico	126	135	103	
Alanina	68	77	95	
Arginina	65	72	73	
Glicina	48	47	57	
Prolina	39	39	42	
Serina	42	45	51	
Tirosina	40	40	53	

3.4.3 – Conteúdo de vitaminas

Em relação ao conteúdo em vitaminas, a biomassa de *Spirulina* contém vitaminas lipossolúveis (pró-vitamina A, E, K e F) e hidrossolúveis, vitaminas do complexo B (B₁, B₂, B₆, B₁₂, Biotina, Mesoinositol, Ácido Fólico e pantotenato de Ca) e vitamina C, possuindo 4 vezes mais vitamina B₁₂ do que o fígado, (Paoletti et al, 1980; Richmond, 1988; Oesterdhal et al, 1989; Gallegos, 1993; Bonnin, 1993). A tabela 4 mostra o conteúdo vitamínico (mg/kg de peso seco), de *Spirulina maxima*, (Paoletti et al, 1980).

TABELA 04- Composição de vitaminas da *Spirulina*, (Paoletti et al. 1980).

VITAMINAS	CONTEUDO (U.L.)
β caroteno (pró-vitamina A)	1.400,0
Tocoferol (E)	140,0
Filoquinona (K)	90,0
Vitamina F	1.300,0
Tiamina (B ₁)	54,0
Riboflavina (B ₂)	41,0
Piridoxina (B ₆)	3,0
Cianocobalamina (B ₁₂)	6,0
Biotina	0,4
Inositol	340,0
Ácido Fólico	0,6
Pantotenato de Cálcio	11,0
Vitamina C	70,0

3.4.4 - Conteúdo em carboidratos e ácidos nucleicos :

Os carboidratos de *Spirulina*, em sua maior parte, são usados como reserva de energia, chegando em média a aproximadamente 15% da sua massa seca. Por hidrólise podem formar glicose, levulose, sacarose, glicerol e polióis. Em *Spirulina platensis* o teor de

carboidratos varia de 12 a 20% e em *Spirulina maxima* de 5 a 16% do peso seco, aproximadamente, (Quillet, 1975; Paoletti et al, 1980; Richmond, 1988).

Um polissacarídeo exocelular de *Spirulina platensis* tem sido estudado com bom potencial sob aspecto econômico, (Filali-Mouhim et al, 1993).

Em relação ao teor de ácidos nucleicos, estas têm a vantagem de possuírem uma menor concentração do que as leveduras, podendo-se obter concentrados proteicos com baixos teores de ácidos nucleicos, (Hedenskog et al, 1972; Hedenskog et al, 1973).

Em relação à quantidade segura para ingestão destes ácidos, pesquisas concluíram, nos Estados Unidos, que estas algas unicelulares podem ser ingeridas na dieta humana em até 100 g/dia. (Bhattacharjee, 1970). A *Spirulina* contém aproximadamente 3,6% de RNA e 0,8% de DNA em relação ao peso seco dos ácidos.

3.4.5 - Conteúdo em pigmentos

Os pigmentos encontrados na *Spirulina* são a Clorofila α , 1,7% do peso seco da célula e único clorofiliano, Carotenóides e Xantofilas, aprox. 0,5% do peso seco. As biliproteínas Ficocianina e Aloficocianina em maior quantidade, aproximadamente 20% da proteína celular. A clorofila absorve luz vermelha e azul do espectro, sendo o máximo de absorção a 680 nm para luz vermelha e a 430 nm para luz azul, (Balloni et al, 1980; Tornabene et al, 1985; Ruiz et al, 1990; Lemoine et al, 1993; Garnier et al, 1993; Madigan et al, 1997).

A tabela 5 mostra o sistema de pigmentos em *Spirulina maxima* e *Spirulina platensis*, com pigmentos fundamentais (fund), e pigmentos acessórios, com a faixa do espectro de absorção, (Balloni et al, 1980).

TABELA 05 – Faixas do espectro de absorção dos pigmentos, (Balloni et al, 1980).

PIGMENTOS	ESPECTRO DE ABSORÇÃO
1) Clorofilas : Clorofila α (fund)	violeta (400-430nm) e vermelho (650-680 nm).
2) Carotenos : β caroteno (fund) 4-cheto-3'-hidroxi- β caroteno	Violeta e azul (410-480 nm) Violeta e azul (420-510 nm)
3) Xantofilas : Zeaxantina Criptoxantina Echinenone Mixtoxantofila Oscilaxantina	Violeta e azul (420-510 nm)
4) Biliproteína : C-ficocianina (fund) C-ficoeritrina Aloficocianina	Amarelo e laranja (550-650 nm)

Existem evidências, em *Spirulina*, de que a ficocianina pode estocar o nitrogênio. Em relação aos carotenóides, o β -caroteno, zeaxantina e mixoxantina representam 90%, sendo que o β -caroteno na forma cis demonstra ser mais eficiente do que os sintéticos na forma trans, na formação da vitamina A. É um antioxidante e importante na prevenção de deficiências de vitamina A. 10g de *Spirulina* seca corresponde a 4,3 ovos, 25 g de cenouras ou 15,6 l de leite, (Boussida et al, 1980; Seshadri et al, 1991; Fedkovic, 1993; Bonnin, 1993).

3.4.6 – Conteúdo de sais minerais :

O conteúdo em sais minerais está em torno de 6 a 9% da biomassa de *Spirulina*, possuindo quantidades relativamente grandes de potássio, fósforo, magnésio e cálcio, podendo variar em função da lavagem da biomassa, (Paoletti et al, 1980).

A quantidade de ferro na *Spirulina* é aproximadamente 10 vezes maior do que a do espinafre, (Hansen, 1984).

Estas também produzem tensoativos organominerais, como fosfatidil -glicerol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e galactosil diglicerídios, (Benson et al, 1962; Thompson, 1980).

2.6.7 – Composição de lipídios.

Lipídios são de grande importância econômica para várias aplicações, sua composição sendo semelhante aos lipídios vegetais e de pescado, permite que sejam utilizados como óleo comestível. Autores propuseram o uso como fonte alternativa de lipídios na dieta humana e animal, pelos altos níveis de triglicerídios e a alta produtividade. A fração lipídica é composta de 8 a 10% de lipídios apolares e de 90 a 92% de lipídios polares. Na fração apolar, há a predominância dos ácidos graxos livres, com pequena concentração de mono, di e triglicerídios. Na fração polar, os principais componentes são os mono e digalactosil, diglicerídios e fosfatidil glicerol. Entre os ácidos graxos, verificou-se que predominam o ácido palmítico, acompanhado de boa quantidade de ácido linoleico e gama-linolênico, (Hudson et al, 1974; Paoletti et al, 1980; Metzger et al, 1983).

Spirulina platensis pode conter 20 a 30% do conteúdo lipídico em ácidos graxos essenciais, assim como ceras, pigmentos fosfolipídicos, esteróis e hidrocarbonetos, (Nichols & Wood, 1968).

Spirulina e *Porphyridium* são citadas como produtoras de ácidos graxos poliinsaturados, em trabalho sobre aplicação industrial de óleos produzidos por microrganismos, (Kyle & Ratledge, 1992).

A tabela 6 mostra algumas classes de microalgas e o seu conteúdo lipídico. Este conteúdo, em algumas algas, pode variar de 1 a 70% de seu peso seco, sob condições especiais, podendo chegar a 85%, o que supera o teor de lipídios da maioria das plantas terrestres, (Spoeha & Milner, 1949, Iwamoto et al, 1955; Kates et al, 1966; Constantopoulos et al, 1967; Galloway et al, 1969; Chuegas et al, 1969; Thomas et al, 1982).

TABELA 06 – Composição de lipídios das microalgas, (Metzer et al, 1983).

CLASSE DA MICROALGA	% DE LIPÍDIOS (peso seco)
Cyanophyce	2 - 23
Chrysophyceae	12 - 72
Prymnesiophyceae	5 - 48
Cryptophyceae	3 - 17
Xanthophyceae	6 - 16
Dinophyceae	5 - 36
Bacillariophyceae	1 - 39
Chlorophyceae	1 - 70
Euglenophyceae	17

No início do século as gorduras menos insaturadas tinham mais valor para fins alimentares e as gorduras vegetais hidrogenadas eram comercializadas como substitutas das gorduras animais. Nas últimas décadas, porém, os óleos vegetais poliinsaturados (ricos em ácido linoleico) como o de milho, o de girassol e o de soja, passaram a ser os preferidos em termos nutricionais, de acordo com médicos e nutricionistas, mas atualmente, além da recomendação de que os triglicerídios contenham ácidos graxos poliinsaturados, é importante que contenham ácidos graxos esterificados da família ômega₃, (Nestel, 1987).

Dentro do grupo poliinsaturado, os mais importantes são os ácidos graxos essenciais, que para a alimentação humana são o linoleico (LA) (18:2), o gama-linolênico (GLA) (18:3-6,9,12), os eicosanoides, dihomogamalinolêni-co (DGLA) (20:3-8,11,14), araquidônico (AA) (20:4-5,8,11,14), eicosapentaenóico (EPA) (20:5-5,8,11,14,17), e ainda o ácido docosahexaenóico (DHA) (22:6). Hoje é reconhecido o potencial dos ácidos graxos ômega₃ para a saúde, porém os óleos de plantas terrestres contém ácidos graxos poliinsaturados (AGP), da família ômega₆, e os mamíferos são incapazes de converterem ácidos graxos ômega₆ em ômega₃ e vice-versa.. O organismo humano não é capaz de alongar e dessaturar o ácido ômega₃ de forma eficiente, embora estejam presentes nas plantas verdes e em maior quantidade no óleo de soja (6-10%). É importante portanto que a dieta de lipídios contenham ácidos graxos poliinsaturados de cadeias longas (C20,C22) da família ômega₃, (Turker, 1987).

As fontes de triglicerídios com quantidades expressivas de EPA e DHA são os óleos de peixes, como atum, sardinha, salmão, em decorrência da alimentação com microalgas. O óleo da semente da “evening primrose” contém cerca de 10% de GLA, sendo recomendada para tratamento de redução de colesterol e de escleroderma. Entre os ácidos graxos constituintes dos triglicerídios das microalgas, destacam-se o linoleico, o gama-linolênico e os eicosanóides, que são precursores das prostaglandinas, prostaciclina, leucotrienos e tromboxanas. Estas substâncias são reguladoras de várias funções fisiológicas, destacando-se o controle da pressão sanguínea, fixação do óvulo no ovário, respostas imunológicas, processos inflamatórios e trombose, (Fogerty & Svoronos, 1987; Nestel, 1987). A tabela 7 mostra a composição percentual de ácidos graxos em *S. maxima* e *S. platensis*.

TABELA 07- Composição de ácidos graxos das microalgas, (Paoletti et al, 1980) :

ÁCIDO GRAXO	<i>S. platensis</i>	<i>S. maxima</i>
Laurico	0,2	0,1
Mirístico	0,6	0,6
Miristoleico	0,2	tr
n-Pentadecanóico	tr	tr
Palmitico	50,0	57,4
Palmitoleico	8,7	6,6
n-Heptadecanóico	0,2	0,4
Palmitolinoleico	1,0	1,0
Hexadecadienoico	0,7	0,5
Esteárico	0,9	1,2
Oleico	3,9	2,7
Linoleico	13,4	10,1
γ -linolênico	19,1	17,7
α -linolênico	0,3	0,3
n-Eicosadienóico	0,3	9,4

3.4.8 – Ácido gama-linolênico :

Os ácidos graxos essenciais tem sido empregados no tratamento de hipertensão, da hiperlipemia, na perda da consciência, da percepção e dos movimentos, na redução do colesterol sanguíneo, na inibição da agregação plaquetária no sangue, como agente anti-secretor e intragástrico, como cosméticos, aromatizantes e na alimentação de doentes, (Spritz, 1969; Wilians, 1973; Baran et al, 1977; Nakajima et al, 1979; Liang et al, 1980; Yukigosse, 1981; Nippon Suisan Kaisha, 1982; Ciferri et al, 1985). Foi demonstrado que o GLA tem sido 170 vezes mais efetivo na redução do colesterol plasmático do que o LA, maior constituinte dos óleos poliinsaturados, (Huang et al, 1983).

O GLA tem sido usado com sucesso em pacientes com doenças cardíacas, mal de Parkinson e esclerose múltipla, em crianças no tratamento de eczema tópico, em mulheres na redução da síndrome pré-menstrual. Uma provisão direta do GLA tem papel importante na nutrição. O GLA é raro em alimentos, sendo o leite materno praticamente a única exceção, (Horrobim, 1982).

As fontes principais onde são encontrados o GLA são, o óleo das sementes de “evening primrose”, já citado anteriormente, com cerca de 8% dos ácidos graxos totais, (Kunkel et al, 1982; Wolf et al, 1983), encontrado também em sementes de “borage”, caroço do “black-currant” e em algumas cianobactérias, (Wolf et al, 1983; Bulik, 1993). Estas plantas são das famílias *Primulaceae*, *Boraginaceae* e *Sanfragaceae*, (Hill, 1937).

As principais fontes comerciais são o óleo de “evening primrose” e “black currant”, mas algumas outras fontes também podem ser incluídas, como a cevada, aveia, fungos das espécies *Rhizopus* e *Mortierella* e a *Spirulina*, que possui as maiores concentrações, (Carter, 1988).

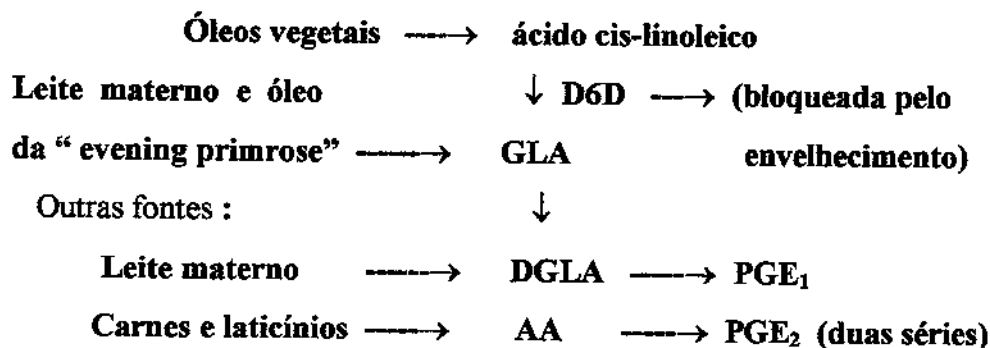
A *Spirulina* tem cerca de 20 a 30% de GLA na composição dos ácidos graxos e experimentos mostram que é possível remover a fração lipídica, que contém o GLA, sem destruir a proteína da biomassa, diminuindo o odor desagradável da *Spirulina* comercial, (Cohen, 1986).

Mudanças das funções corporais associadas à velhice são consequências de mutações nas células, e um dos principais fatores pode ser a perda da atividade da enzima D6D (delta-6-dessaturase), que converte o ácido cis-linoleico em ácido gama-linolênico. A

consequência é a carência do GLA e seus derivados, DGLA, PGE₁, AA, duas séries de prostaglandinas e os ácidos graxos de cadeia longa. A carne fornece bom suprimento do AA, sendo as carências mais notadas as do GLA, DGLA e PGE₁, onde a dieta humana tem pequenas quantidades ou ausência destes ácidos. A perda da PGE₁ é o fator mais importante, pois esta reduz a pressão sanguínea, inibe a agregação plaquetária e a proliferação no músculo liso vascular, (Comfort, 1979; Horrobim, 1980).

Existem evidências indiretas que apontam para a D6D como causa de doenças como escleroderma e síndrome de sjogren do sistema imunológico, visto que estas respondem à injeção de produtos que contém GLA, (Horrobim & Campbell, 1980).

O esquema abaixo mostra o metabolismo dos ácidos graxos essenciais e suas fontes naturais, (Horrobim, 1982):



Existem fortes evidências da redução da atividade da D6D em diabetes e exposição crônica ao álcool, em humanos e animais, , (Horrobim et al, 1981).

A atividade da D6D em células humanas é perdida seletivamente em consequência da exposição às radiações ionizantes, virus oncogênicos e produtos carcinogênicos, (Dunbar & Bailey, 1975; Bailey, 1977).

3.5 – Cultivo da *Spirulina*

3.5.1 – Considerações gerais :

A utilização de água do mar ou águas alcalinas para a produção de biomassa alimentar a partir de microalgas, pode ser alternativa viável em regiões áridas onde a escassez de água

impede a produção de alimentos. A *Spirulina* poderá ser a melhor opção pelo alto teor proteico, 60 a 70%, e por responder bem à radiação solar intensa, à temperaturas acima de 30°C, além de crescer bem em águas com alta salinidade e em pH até 11, e elevar o conteúdo de lipídios através do controle de nitrogênio no meio, (Amon, 1980).

Estudos com 30 espécies de microalgas mostraram que algas verdes com 17,1% de lipídios totais (% do peso seco total), após 4 a 9 dias de estarvação de nitrogênio, aumentaram 2 ou 3 vezes o seu conteúdo lipídico, tendo o maior aumento, cerca de 72%, ocorrido em *Nanochloropsis salina*, cultivada em 9 dias em meio sem nitrogênio, (Shiffrin & Chisholm, 1981).

Foi sugerindo o aproveitamento industrial da *Spirulina platensis*, onde a redução de nitrato foi muito mais efetiva do que a variação de temperatura, do ponto de vista tecnológico e econômico, (Mendes, 1992). O autor sugere que devem ser feitos novos ensaios com condições de estresse para a observação dos efeitos sinérgicos em relação a síntese de ácidos graxos, em particular o GLA. Este recomenda o estudo visando verificar a redução da fonte de nitrogênio como fator de aumento da produção do GLA. Um aumento de ácidos graxos insaturados, em particular o GLA que representa 2% na célula, foi conseguido transferindo-se células de *Spirulina platensis* para meios com várias concentrações de cloreto de amônio, sendo a concentração de 25 mM a melhor, apresentando aumento de 1,2 a 2 vezes em relação à célula não tratada.

Um trabalho muito importante neste sentido mostrou que uma cepa de *Spirulina platensis* resistente à inibição pelo herbicida, Sandoz 9585, obtida através de seleção por transferências seriadas em concentrações crescentes, aumentou substancialmente o GLA e manteve a produção estável em pelo menos 50 gerações, (Cohen et al, 1992)

Alguns autores alertam sobre a discrepância nos valores obtidos nestes experimentos, devido a sensibilidade do estoque lipídico a fatores ambientais, como também a diferentes procedimentos nos laboratórios durante as pesquisas. Como exemplo, foi encontrado 85% (peso seco) em *Chlorella* cultivada em ausência de nitrogênio, (Spoehr & Milner, 1949; Iwamoto et al, 1955), porém foi encontrado a metade deste valor, nas mesmas condições, por Zhukova et al, 1969.

A tabela 08 mostra algumas espécies de algas ricas em lipídios, e o aumento do lipídio em função da estarvação de nitrogênio, (Shiffrin & Chisholm, 1981).

TABELA 08 – Aumento da concentração de lipídios em microalgas em função da estarvação de nitrogênio, (Shifrin & Chishoum, 1981).

ALGA	Meio c/ 2,5 g/l N (g/l)	Ausência de N (g/l)
Nannochloris	20,0	47,8
Micrococcus	27,0	49,5
Nitzschia papea	27,2	39,5
Isochrysis sp.	20,0	47,0
Chlorella salina	40,8	72,2
Chlorella pyrenoidosa	14,4	35,8
Chlorella vulgaris	33,1	54,2

O conhecimento qualitativo e quantitativo dos lipídios em microalgas depende do método de extração utilizado e variações tem sido citadas sobre o conteúdo de ácidos graxos em *Spirulina*. Variações de 1,5 a 12% do peso seco têm sido citadas indicando haver diferenças importantes nos procedimentos de análise. Fatores como os métodos empregados para o rompimento das células, secagem e outros, podem influir na determinação dos lipídios, (Dubinsky & Aaronson, 1979; Ciferri, 1983).

O aumento do conteúdo lipídico durante a ausência de nitrogênio pode ser devido também em parte ao decréscimo de algum outro componente celular, como proteína, mas foi observado que o carbono assimilado no estresse de nitrogênio foi 50 a 70% do total preferencialmente para a síntese de lipídios, (Fogg, 1959; Fogg, 1965; Opute, 1974; Healey, 1979).

Um trabalho foi desenvolvido em dois estágios, o primeiro com teor de nitrogênio padrão maximizando a produção de biomassa e o segundo com a biomassa produzida no primeiro mantida em ausência de nitrogênio, mostrando um aumento de 80% dos lipídios, com uma composição similar aos dos derivados do cacau, milho, germe de trigo e linhaça, (Amon, 1980).

Torres, 1994, em trabalho de tese desenvolvido no laboratório de fermentações do DTA/UFRRJ, mostrou a influência da concentração de nitrogênio do meio sobre o acúmulo de lipídios em *Spirulina maxima*, confirmando a observação de Shifrin (1981) e outros autores.

O trabalho mostra que a redução do nitrogênio do meio foi efetiva em elevar a concentração de lipídios totais e de ácidos graxos totais em cerca de três vezes, aumentando o rendimento e a produtividade de lipídios e de GLA na biomassa em comparação ao cultivo tradicional. Ocorre a redução de proteína na biomassa, nos meios deficientes em KNO_3 , o que está provavelmente relacionado com a escassez de nitrogênio, somada a degradação da c-ficocianina durante o cultivo, conforme as tabelas 09 e 10. As alterações não afetam o perfil de ácidos graxos, levando a afirmação de que a *Spirulina maxima* cultivada com redução de nitrogênio tem excelente potencial para produção de biomassa seca com alta concentração de GLA, (Torres, 1994).

TABELA 09 - Composição da *Spirulina maxima* em diferentes concentrações de KNO_3 , produtividade de lipídios e GLA (médias de quatro cultivos), (Torres, 1994).

PARÂMETROS MEDIDOS	KNO_3 (2,5 g/l)	KNO_3 (0,2 g/l)	Ausência de N
Biomassa (mg/l)	1.157	768	1.562
Proteínas (% P.S.)	68,5	52,0	56,3
Lipídios (% P.S.)	9,2	29,7	25,3
Ac.graxos totais (%P.S.)	7,8	22,0	19,8
GLA (%P.S.)	1,9	4,4	4,7
Produção lipídios (mg/l)	106,4	228,1	395,2
GLA (mg/l)	21,6	34,1	73,1
Produtividade lipídios %	15,2	32,6	30,3
GLA (mg/l dia)	3,1	4,9	5,6

TABELA 10- Percentagem de ácidos graxos da *Spirulina maxima* cultivada em concentrações de N, em g/l KNO₃, (2,5 ; 0,2; e ausência), (Torres, 1994).

ÁCIDOS GRAXOS		KNO ₃ (2,5 g/l)	KNO ₃ (0,2 g/l)	Ausência de N
Palmitico	(16:0)	47,60	49,47	47,60
Palmitoleico	(16:1)	1,95	2,40	2,25
Estearico	(18:0)	1,83	1,77	3,43
Oleico	(18:1)	7,78	10,84	8,11
Linoleico	(18:2)	13,57	10,27	14,06
γ-linolênico	(18:3)	23,95	20,17	23,65
α-linolênico	(18:3)	traços	traços	traços
outros		3,32	5,06	1,07

3.5.2 – Parâmetros para o cultivo de *Spirulina*

Os principais parâmetros que devem ser levados em conta na produção da biomassa estão diretamente ligados ao ambiente do cultivo, os nutrientes do meio de cultivo, a incidência de luz e a temperatura, (Richmond, 1988).

3.5.2.1 – Influência dos nutrientes :

Nitrato e amônio são utilizados como fonte de nitrogênio, sendo que a ficocianina pode servir como reserva para a *Spirulina* quando o nível de nitrogênio disponível diminui, podendo ser observado pela diminuição da coloração azul da célula, (Boussiba & Richmond, 1980; Madigan et al, 1997).

Quando nitrato, nitrogênio, fosfato e bicarbonato estão em baixas concentrações, há um aumento significativo da concentração de carboidratos e um decréscimo de proteína total. Quando a concentração de cloreto de sódio aumenta, há também um aumento de carboidratos, (Tadros, 1991).

O aumento do oxigênio dissolvido provoca inibição na taxa de crescimento e deterioração da cultura de *Spirulina*, (Marquez et al, 1995).

O efeito do estresse de sal, por altas concentrações, também foi observado quando houve retardamento do crescimento (adaptação), com uma posterior retomada, (Vonshak et al, 1988).

Observou-se que o rendimento máximo de biomassa situou-se na faixa ótima de concentração celular, entre 400 e 500 mg/l em peso seco. Uma diluição abrupta no meio de cultivo prejudica bastante a cultura sensível à radiação solar, (Richmond, 1988).

Quanto ao meio mineral para o cultivo este deverá estar tamponado, para não afetar as células com variações bruscas de pH, com concentração de bicarbonato 2,2 M, sendo que o pH poderá variar de 8,0 a 11,0, (Zarrouk, 1966).

Os meios mais apropriados foram aperfeiçoados, buscando preencher as necessidades da célula para o seu completo desenvolvimento, por vários pesquisadores, (Zarrouk, 1966; Paoletti et al, 1980; Mahajan et Kamat, 1995). A adição de licor preto de eucálio, KRAFT, em cultura em tanque aberto, provocou um aumento no crescimento e na produtividade da *Spirulina*, (Chauan et al, 1995; Singh et al, 1995).

Houve aumento de pigmentos e produção de células quando se adicionou glicose em culturas autotróficas e mixotróficas, (Chen et al, 1996).

3.5.2.2 –Influência da incidência da luz

Para a *Spirulina*, que é fotoautotrófica, torna-se vital a presença de luz para o seu desenvolvimento. As mudanças de intensidade de luz promovem adaptação na fisiologia da célula, gerando maior ou menor quantidade de pigmentos e ficobiliproteínas, (Garnier et al, 1993).

Observou-se que a *Spirulina* cultivada no escuro por 144 horas continha 26% mais GLA do que a mesma cepa em cultivo normal, (Richmond & Becker, 1986).

A quantidade e a qualidade da luz afeta diretamente a produção de carotenóides pela *Spirulina*, assim como a intensidade e duração da radiação e a concentração celular, pois a luz diminui com a profundidade da cultura, (Tamiya, 1957; Olaizola et al, 1990).

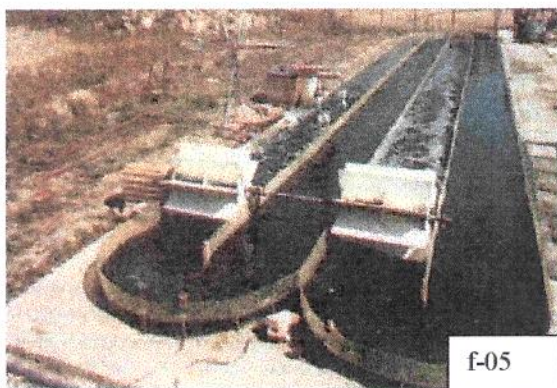
A agitação tem várias funções importantes no cultivo da *Spirulina* pois afeta os



efeitos da densidade celular com a luminosidade, evitando o auto sombreamento com regime intermitente de luz, (f-04) (Richmond & Vonshak, 1987; Richmond & Becker, 1986).

Trabalhos tem sido desenvolvidos quanto aos efeitos da luz nas cianobactérias, devido ao alto valor da ficocianina, diretamente influenciada pela luminosidade. A informação

sobre as condições geográficas e de intensidade de irradiação são de fundamental importância para a construção de um sistema industrial de cultivo, seja em aberto ou em fotobiorreatores, (Tomaselli et al, 1993; Tredici et al, 1993; Cornet et al, 1995; Watanabe et al, 1995).



Em Israel foi observada fotoinibição em culturas externas, em tanques oblongos (raceways), (f-05), a céu aberto, e quando no verão o crescimento praticamente cessou após o meio dia, (Richmond & Arad, 1990).

Foi estudada a fotoinibição como fator limitante para culturas externas, verificando-se que promovia uma boa proteção contra este

efeito fazendo-se sombreamento, (Vonshak et al, 1988).

Pesquisas mostraram que o conteúdo de proteína é mais alto em culturas de baixa luminosidade e o conteúdo de carboidratos mais alto em culturas com alta luminosidade, (Tadros et al, 1993).

3.5.2.3 – Influência da temperatura

Culturas de *Spirulina* em condições de campo demonstram que a temperatura ótima durante o dia é cerca de 40°C e a noite 24°C, sendo que acima de 40°C esta não cresce. Em

laboratório não ocorre crescimento a 45°C em 24 horas, mas retoma o crescimento quando retorna a 35°C. Acima de 45°C ocorre quebra do tricoma seguido da lise da célula, e a exposição a 50°C resulta em morte da cultura em pouco tempo, (Charenkova et al, 1975).

Foi observado, em culturas pesquisadas em Israel, que diferentes cepas de *Spirulina* tiveram crescimento ótimo nas temperaturas entre 35 e 37°C, sendo que a temperatura de 40°C prejudica a cultura externa. A temperatura mínima onde há crescimento é de 18°C aproximadamente, sendo que quando esta baixa para 12°C a cultura se deteriora, só suportando temperaturas mais baixas durante a noite, (Richmond & Vonshak, 1978; Richmond et al, 1980).

Foram feitos experimentos comparativos com 10 cepas de *Spirulina platensis* e 8 cepas de *Spirulina maxima* em relação a temperatura ótima de crescimento, tolerância a salinidade, percentagem de respiração no escuro, eficiência fotossintética em condições fotolimitantes e produção de proteínas. Chegou-se à conclusão de que algumas cepas não crescem acima de 36°C, enquanto outras crescem acima de 40°C. Quando foram colocadas em temperaturas próximas da máxima, todas reduziram drasticamente a quantidade de proteína e aumentaram o conteúdo de carboidratos, (Richmond & Vonshak, 1978).

Trabalho sobre efeitos em *Spirulina platensis* M₂, em fotobiorreator, mostra que temperaturas elevadas determinam mudanças nos filamentos, na composição macromolecular, na concentração de lipídios, ácidos graxos e ficobiliproteínas-clorofila e no seu crescimento, com decréscimo do teor proteico, aumento dos lipídios e carboidratos, tendo os ácidos graxos aumentado a sua saturação. Estudando os efeitos promovidos pelo estresse em *Spirulina*, chegou-se a conclusão que um aumento de 30°C para 42°C promove um decréscimo de 58,6% para 45% em proteínas, um aumento de 29,9% para 38,3% em carboidratos e um aumento de 7,4% para 11,5% em lipídios totais, (Tomaselli et al, 1993).

Estudos sobre temperatura noturna de um fotobiorreator mostra que esta afeta a produtividade com perda de biomassa, (Tozillo et al, 1991).

Estudos sobre efeitos de luz, temperatura e ausência de nitrogênio mostram que o aumento da temperatura de 25°C para 38°C aumenta a taxa de crescimento bem como também o conteúdo de lipídios totais, (Tedesco & Duerr, 1989).

A observação de diversos fatores em conjunto, promovendo estresse em cultura de *Spirulina*, mostrou que para algumas linhagens a temperatura, luz e salinidade promove um decréscimo na taxa de crescimento e mudanças no metabolismo celular, resultando em redução da síntese de proteínas e de pigmentos, aumento na síntese de carboidratos e alteração na composição de ácidos graxos, (Tadros et al, 1993).

A produção de biomassa está diretamente relacionada com a temperatura, a intensidade de luz, a concentração de nutrientes bem como com a concentração de oxigênio dissolvido, (Vonshak et al, 1982).

3.5.3 – Sistemas de produção de *Spirulina*

3.5.3.1 – Crescimento celular

Para o desenvolvimento da produção de biomassa, é importante a disponibilidade de dados sobre a economia do processo, em escala piloto com pelo menos um ano de operação, assim como também a avaliação do desempenho da cepa, dados sobre a velocidade de crescimento, produção, composição e susceptibilidade à contaminação quando em processo contínuo ou semi-contínuo. Em laboratório, seria interessante a pesquisa de cepas ou mutantes com características favoráveis, tais como crescimento rápido, maior produção de biomassa ou constituintes celulares, capacidade psicrófila ou termofílica, etc., (Ciferri, 1983).

O cultivo de *Spirulina* para fins alimentares em vários países é feito em tanques abertos, circulares para escalas menores e oblongos para grandes produções (acima de 100 m³/tanque). A agitação é feita normalmente com pás rotativas, “padle-wheel”, (f-04). O meio é totalmente mineral, alcalino devido a alta concentração de bicarbonato, (mais de 10 g/l). O bicarbonato é a fonte principal de carbono, sendo este reconstituído com a injeção direta de CO₂ sobre o carbonato formado, (Tomaselli et al, 1993).

Foi desenvolvido um estudo utilizando gás resultante da fermentação alcoólica (mistura rica em CO₂), como fonte de carbono para *Spirulina maxima*, obtendo-se melhor produtividade em biomassa do que com anidrido puro, com o pH estabilizando entre 9,0 e 10,5, (Ferraz & Aquarone, 1985).

Em cultivos externos, com tanques abertos ou cobertos, a altura da lâmina do meio de cultivo é de 15 a 20 cm e a concentração celular nos cultivos semi-contínuos situa-se entre 200 e 500 mg/l. A colheita é feita após uma concentração da cultura em peneira vibratória



de 360 mesh, produzindo uma geléia com cerca de 8% de matéria seca, que deve ser lavada com água acidificada, pH 4,0, para remoção dos carbonatos dissolvidos, que poderá ser estocada a Observou-se que a *Spirulina* cultivada no escuro por 144 horas continha 26% mais GLA do que a mesma cepa em cultivo normal, (Richmond & Becker, 1986).

A quantidade e a qualidade da luz afeta diretamente a produção de carotenóides pela *Spirulina*, assim como a intensidade e duração da radiação e a concentração celular, pois a luz diminui com a profundidade da cultura, (Tamiya, 1957; Olaizola et al, 1990).

0 a -2°C por vários dias, ou a -18°C indefinidamente, (Richmond, 1988).

Tem sido citados altos valores de produção de biomassa a céu aberto (50 a 60 g/m²/dia), com bons resultados para tanques pequenos (100 a 200 m²). Na maioria dos cultivos em grande escala as produções em base anual não excedem 30 a 40 ton/ha, correspondente a uma taxa de 9 a 11 g/m²/dia, (Vonshak, 1987), (f-06, f-07).



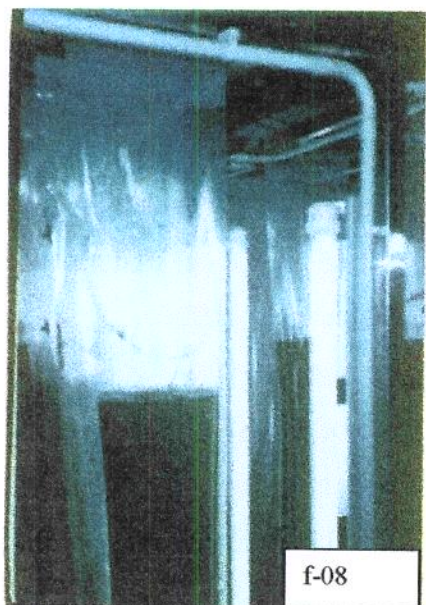
A *Spirulina* pode ser cultivada em tanques circulares ou ovais com dimensões de 500 a 10.000 m² e profundidade de 15 a 20 cm, de diversos materiais como concreto, plástico, tijolos ou fibra de vidro, podendo estar cobertos ou abertos, (Vonshak, 1989; Chattopadhyay & Roychoudhury, 1996).

Quando os tanques forem cobertos devem ser com material de PVC transparente, sendo indispensável em regiões subtropicais e temperadas onde no inverno a temperatura chega a 0°C , pois previne a perda por

evaporação, a perda de calor e evita contaminação. As desvantagens da cobertura é a redução da incidência de luz, acúmulo de poeira e a condensação, aumentando também o custo em aproximadamente 15% do capital, (Richmond, 1988).

O cultivo também tem sido feito em condutos rasos com área de 1.000 a 5.000 m², com curva e circulação com pás, sistema “raceways”, adequado para regiões com condições estáveis de clima, (Vonshak, 1982), (f-07).

Outro sistema de cultivo é em batelada com a cultura com células imobilizadas, onde as algas liberam para o meio os metabólitos úteis, sem remoção das células, sendo os principais os polissacarídeos extracelulares, os corantes, os óleos e o glicerol, (Lewin, 1990).



Um sistema de bolsas plásticas com 60 litros foi desenvolvido em cultivo de microalgas para aquacultura na Itália, sendo testado no laboratório de fermentações do DTA/UFRRJ para crescimento de *Spirulina*, (Campos, 1996), (f-08).

Um processo mais moderno de cultivo externo é um reator tubular onde a microalga circula por tubos transparentes, com diâmetro em torno de 6”, por bombeamento e circulação de CO₂, (Tomaselli et al, 1993; Richmond et al 1993; Torzillo et al, 1993; Forth, 1996), (f-09).

Um outro sistema de fotobiorreator tubular, iluminado interna e externamente, para cultivo em larga escala, tem maior potencial de produção, (Borowitzka, 1994).



Em uma pesquisa sobre o desempenho de fotobiorreator helicoidal, com iluminação com lâmpadas fluorescentes e gaseificado com CO₂, obteve-se uma máxima taxa de crescimento. O sistema permite ser usado em estufa com recuperação de gás e produção de biomassa alimentar de cianobactérias, (Watanabe et al, 1995).

O material utilizado em fotobiorreatores pode ser vidro inclinado, achatado, com exposição ao sol com uma inclinação adequada, devendo se conhecer as condições locais



de irradiação solar, (Cornet et al, 1995; Hu-Q et al, 1996).

Um fotobiorreator fortemente curvo, tubular, mostrou aumento da produtividade em torno de 10% em comparação com o convencional, (Carlozzi & Torzillo, 1996).

Huntley et al, 1966, desenvolveram um sistema de fotobiorreator parcialmente cheio para a produção de pigmentos, ácidos graxos, carboidratos e outros, (f-10).

3.5.3.2 – Processamento :

O processo de colheita representa a maior dificuldade quanto ao desenvolvimento industrial de microalgas, de uma maneira geral. A *Spirulina* tem a vantagem de possibilitar o uso de filtração, devido aos filamentos que são longos. O processo de colheita pode ser feito também de outros modos, tais como centrifugação, com retorno do sobrenadante ao tanque, por floculação e por filtração, filtro prensa, microcoador, tela, areia, (Becker, 1981), ou por peneiras vibratórias de 360 mesh, referida anteriormente, com produção de geléia com 8% de matéria seca, sendo que o ideal é que toda a biomassa seja removida sem nenhuma quebra de célula, (Richmond, 1988).

A secagem pode ser por atomizador, "spray-dryer" dando um produto fino, ou por secador de tambor, "drum-dryer", dando um produto em forma de flakes. A secagem ao sol não é recomendada para uso humano devido a contaminações, por não estar em temperaturas elevadas, e pelo forte odor provocado pela degradação devido a secagem lenta.

A utilização de estufa com circulação de ar pode acelerar o processo, ou a secagem da geléia a vácuo, para concentração a até 20% de sólidos, porém vai exigir um controle higiênico-sanitário mais rigoroso para a redução da carga microbiana, devendo-se fazer com que a temperatura alcance 70°C. Nas indústrias utilizam-se o "spray-dryer" ou o "drum-dryer", (Richmond, 1988).

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Material utilizado

- 4.1.1 - *Spirulina* utilizada
- 4.1.2 - Meio de Cultura
- 4.1.3 - Cultivo da *Spirulina*
- 4.1.4 - Equipamentos Utilizados

4.2 - Controles Realizados

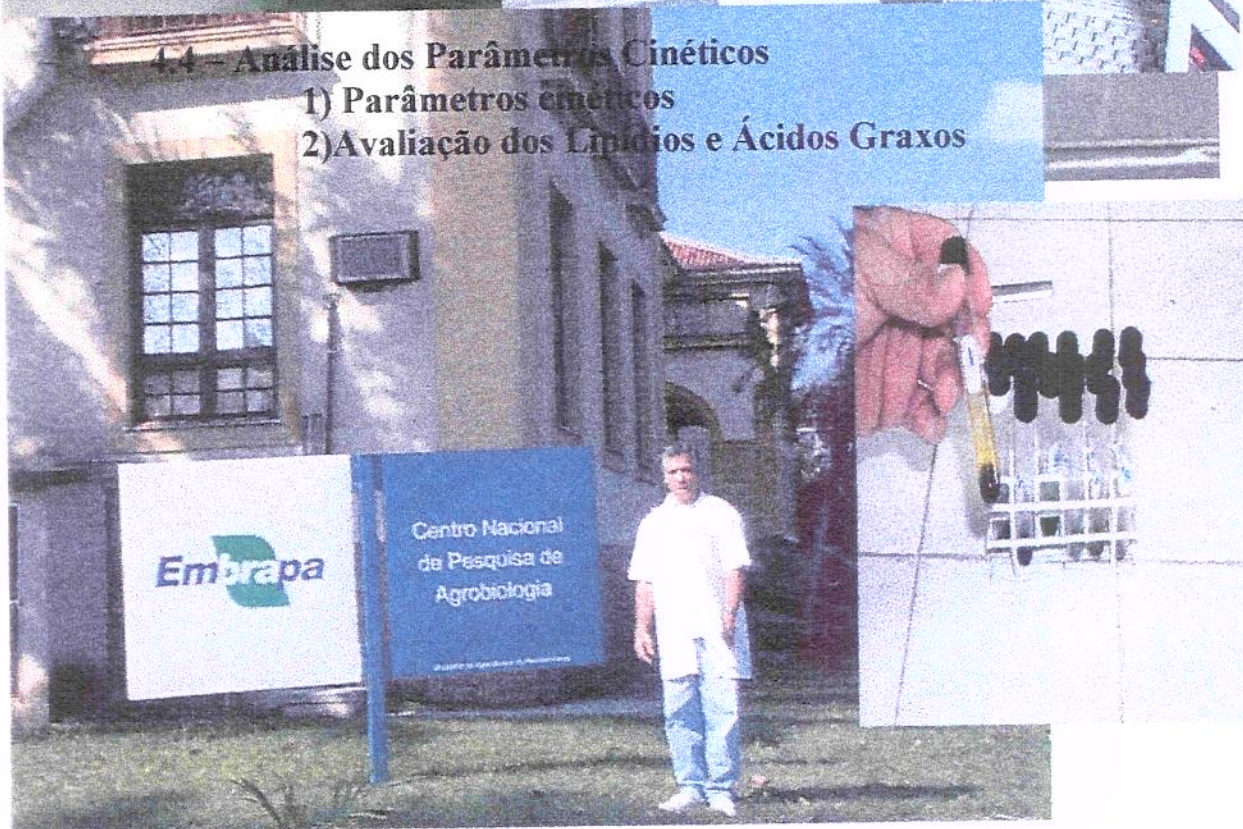
- 1) Relação Peso Seco x Densidade Ótica
- 2) Peso Seco
- 3) pH
- 4) Temperatura

4.3 - Análises Realizadas

- 1) Umidade
- 2) cinzas
- 3) Proteínas
- 4) Lipídios totais
- 5) Esterificação, Metilação, Análise dos Ácidos Graxos
- 6) Carboidratos
- 7) Análise dos Ácidos Graxos Por Cromatografia

4.4 - Análise dos Parâmetros Cinéticos

- 1) Parâmetros cinéticos
- 2) Avaliação dos Lipídios e Ácidos Graxos

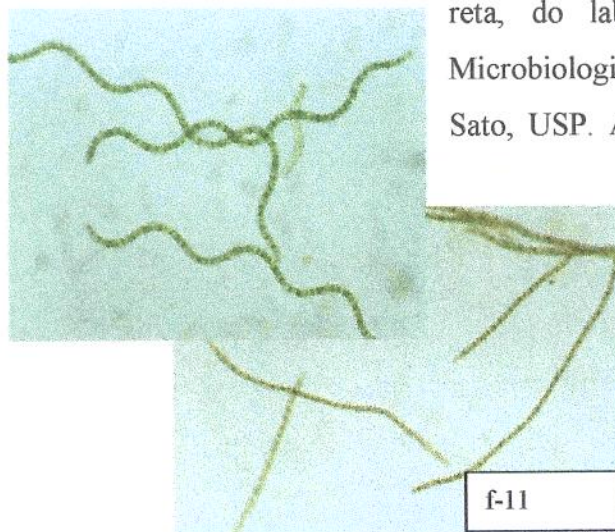


4 – MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 – Material utilizado

4.1.1 – *Spirulina* utilizada :

Foi utilizada a cepa de *Spirulina maxima*, não axênica, de forma predominantemente



reta, do laboratório de fermentações do Setor de Microbiologia do DTA/UFRRJ, cedida pelo Dr. Sunao Sato, USP. A cepa, juntamente com outras de coleções

internacionais, tem origem no Centro di Studio dei Microrganismi Autotrofi – CSMA, del CNR – Firenze, Itália e do Dr. Avigad Vonshak, da Ben-Gurion University of the Negev, Israel, (f-11).

Foram usados 200 ml de meio de cultura em erlenmeyers de 1000 ml com a

cepa de *Spirulina* mantida em crescimento, sempre em fase exponencial, como estoque, para fornecer o inóculo para os experimentos, (Meio recomendado por Paoletti et al, 1975).



Os erlenmeyers de 1000 ml com as culturas, em 200 ml de meio, foram mantidos sob iluminação artificial com duas lâmpadas fluorescentes de 40w, a 40 cm sôbre as amostras, sendo renovados e repicados mensalmente para um novo meio de cultivo, (f-12). A iluminação foi intermitente, com fotoperíodo de 12 horas aproximadamente, simulando os efeitos de dia e noite.

4.1.2 – Meio de Cultura

O meio de cultivo utilizado foi o citado por Paoletti et al (1975) com a seguinte composição :

1- Composição de macro-nutrientes:

SUBSTÂNCIAS	CONCENTRAÇÃO (g/l)
KNO ₃	2,5
NaHCO ₃	15,15
Na ₂ CO ₃	8,9
K ₂ SO ₄	1,9
K ₂ HPO ₄	0,5
NaCl	0,92
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,25
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,05

2 – Composição de Microelementos (solução 1):

SUBSTÂNCIAS	CONCENTRAÇÃO (g/l)
H ₃ BO ₃	2,860
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,810
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,220
Na ₂ Mo ₂ O ₄ .2H ₂ O	0,390
CaSO ₄ .5H ₂ O	0,079
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,049

3- Solução de Fe.EDTA (solução 2):

SUBSTÂNCIAS	CONCENTRAÇÃO (g/l)
EDTA-Na	29,8
FeSO ₄ .7H ₂ O	24,9
H ₂ O (q.s.p.)	1.000 ml

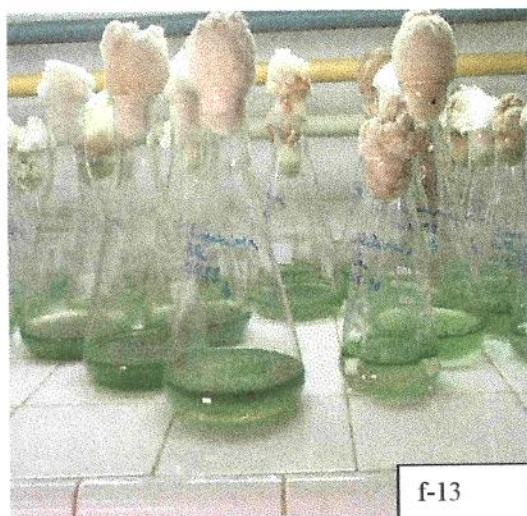
4- O pH inicial do meio de cultivo foi de aproximadamente 9,5.

5- Para cada litro de meio com solução de macroelementos, adicionou-se 1ml da solução 1, de microelementos, e 1 ml da solução 2, de Fe.EDTA.

6- Para os experimentos com privação de nitrogênio, foram usadas as concentrações modificadas de KNO₃, para 0,2 g/l e para 0,0 g/l (ausência).

4.1.3 – Cultivo da *Spirulina*

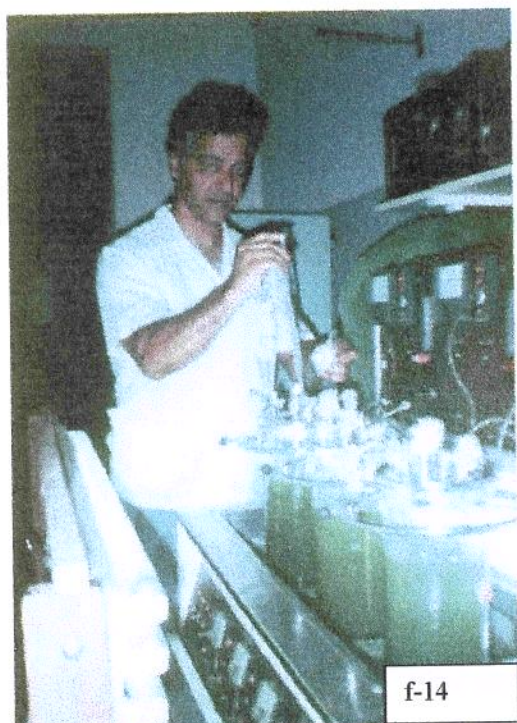
O inóculo foi feito com o equivalente a 100 mg/l de massa seca da microalga, a



partir da cultura estoque, recolhido com solução salina 0,9% (densidade ótica lida, a 560 nm, igual a 0,1), (f-13).

Foram inoculadas 3 dornas com 3.000 ml de meio cada uma, com crescimento em dois níveis de temperatura e três níveis de nitrogênio, com três repetições para cada tratamento.

As culturas foram mantidas com agitação constante, com 3 rotores de 4 palhetas, a 100 rpm aproximadamente, mantidas por fotoperíodo de 24 horas com iluminação, de 6 lâmpadas fluorescentes de 40 watts cada, correspondente a 2.400 lux, a 40 cm das culturas, (f-14).



As amostragens foram feitas de 24 em 24 horas, quando foram avaliadas durante o crescimento, a densidade ótica, o pH, relação peso seco (P.S.) x densidade ótica (D.O.) e, ao final de cada partida, a biomassa, a composição centesimal, a concentração de lipídios e a composição de ácidos graxos.

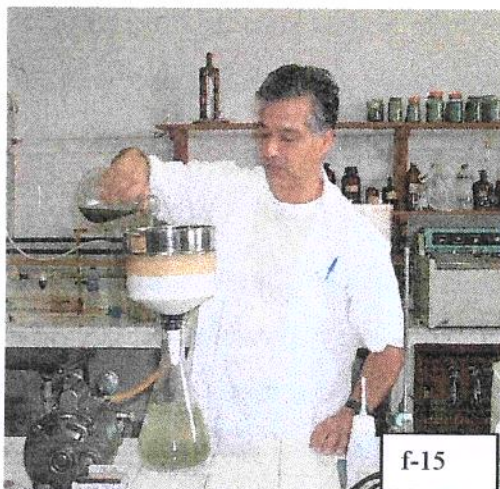
Foram feitas as análises e comparados os resultados dos diferentes cultivos com os valores obtidos da revisão bibliográfica.

A colheita da biomassa foi feita após 15 dias de cultivo, através de peneira de nylon, com 325 mesh (0,44 mm de abertura), (f-15).

A biomassa em forma de gel, retida na peneira, foi lavada com água acidulada, para remoção dos carbonatos, em seguida guardada em frascos estéreis e congelada em freezer (-20°C, aproximadamente).

4.1.4 - Equipamentos utilizados.

1- Fermentador com 3 dornas de 3 l, marca VIRTIS, USA, (f-16).



2-Espectrofotômetro Baush & Lomb, Spectronic 20, (f-17).

3-Espectrofotômetro HP – 8451-A.

4-Bomba de vácuo, com kitasato e funil, com peneira de 325 mesh, (f-15).

5- Estufa para determinação do teor de umidade e peso seco, (f-18).

6 - Potenciômetro Corning, modelo PS15, para leituras de pH (f-20).

7- Aparelho Micro-Kjeldahl, para análise de nitrogênio, (f-24).



8- Aparelho extrator sohxlet, para extração de lipídios (f-25).

9- Balança analítica Metler, Instrumental Company, type H15, cap.160g (f-19).

10-Espectrógrafo de massa acoplado a cromatógrafo, CG/EM., modelo : HP 5988 A. CENPES, Petrobrás, RJ.

11- Cromatógrafo CG, modelo Perkin-Elmer, Auto System VL, Cromatógrafo a Gás, com ionização de chama, condensação térmica, captura de elétrons, EMBRAPA, CNPAB, Km 47, Seropédica, RJ (f-26).

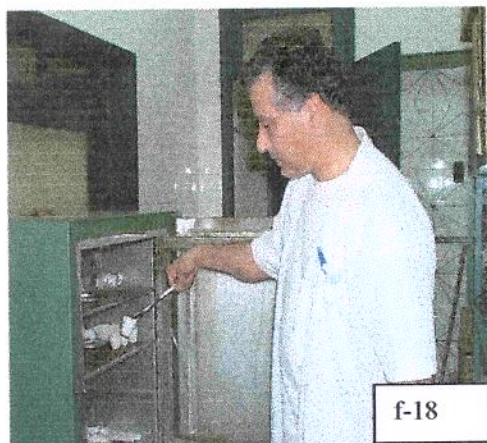


4.2 – Controles realizados.

1) Relação Peso Seco (P.S.) x Densidade Ótica (D.O.) :

Obteve-se a relação peso seco x densidade ótica, pela centrifugação e concentração da amostra padrão, para cada tratamento, lavando-as e ressuspendendo-as com solução salina.

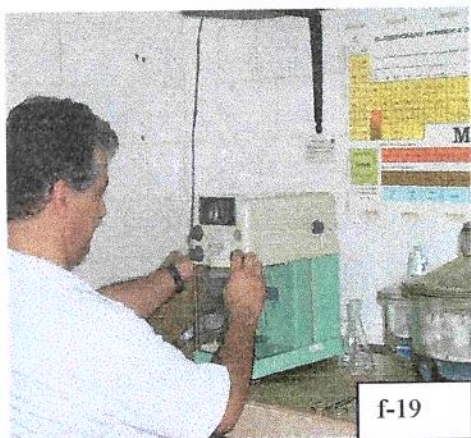
A seguir foram feitas 4 diluições da amostra original, com 25% de redução em cada diluição, sendo determinadas as densidades óticas a 600 nm.



f-18

A amostra original, em triplicata, foi levada a estufa a 105°C para secagem até peso constante. (Normas Técnicas do Instituto Adolfo Lutz, 1985), (f-18).

Foram plotados, em gráfico linear milimetrado, os pontos de P.S. em ordenada e D.O. em abscissa, calculado o seu coeficiente angular e considerando este como o fator da relação P.S. x D.O.



f-19

2) Peso seco dos experimentos :

Com a leitura diária de D.O., obtiveram-se os pontos experimentais, para a elaboração das curvas de crescimento, multiplicando-se o valor encontrado pelo fator calculado da relação P.S. x D.O., em mg/l.

3) pH

Foi medido o pH diariamente, após cada amostragem, com potenciômetro, obtendo-se os valores da variação do pH durante o cultivo (f-20).



f-20

4) Temperatura

A temperatura foi mantida constante em cada cultivo por um banho com água corrente, aquecida ou resfriada, através de termopares conectados às dornas com termostatos com controle automático, calibrados na temperatura desejada, os quais fazem parte do equipamento, mantendo a água do banho nas temperaturas de 35°C e 25°C,

respectivamente, por uma serpentina no interior do reservatório de água do Fermentador Virtis (f-21).



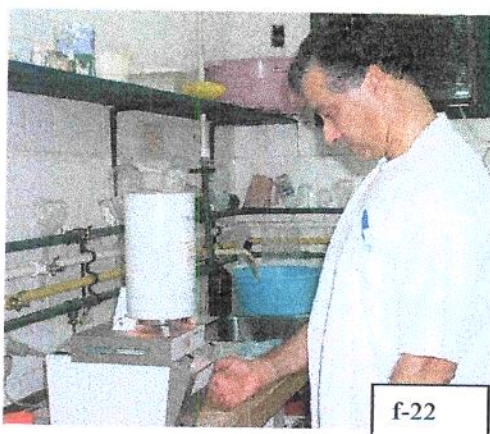
Virtis (f-21).

4.3 – Análises realizadas :

1) Umidade

A determinação de umidade foi feita em balança infravermelho (mod. Mettler PI60N e LP11), com temperatura ajustada em 95°C até peso constante. (Normas Técnicas do Instituto Adolfo

Lutz, 1985) (f-22).



2) Cinzas

A determinação de cinzas das amostras foi feita com a carbonização em chapa e incineração em mufla a 550°C. (LANARA, 1981) (f-23).

3) Proteínas

A determinação do teor de proteínas, foi feita por processo Micro-Kjeldahl (Manual de Métodos Empregados Em Estudos de Microbiologia Agrícola – Alves et al, 1994), no laboratório do CNPAB-EMBRAPA. Os resultados multiplicados pelo fator 6,25 mostraram o conteúdo em proteína bruta, (f-24).



4) Lipídios totais

A determinação dos lipídios totais foi feita segundo as Normas Técnicas do Instituto Adolfo Lutz, (1985), com extração contínua com éter de petróleo em extrator sohxlet, (f-25), e pesados em balança analítica Mettler Inst. Company, type H15, cap. 160 g, (f-19).



5) Esterificação, metilação e análise de ácidos graxos :

A metodologia da extração de lipídios, da esterificação, bem como das análises dos ácidos graxos em cromatógrafo, estão descritas e especificadas no apêndice, A-2-1 a A-2-2

6) Carboidratos

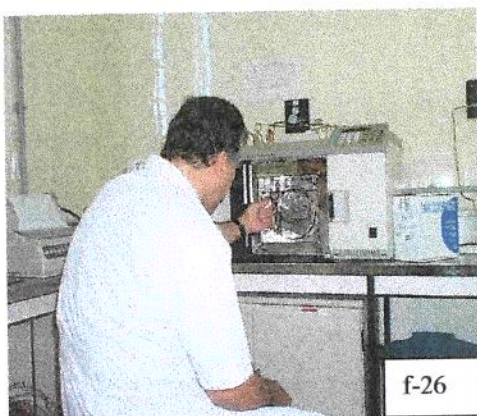
A determinação de carboidratos foi feita pela diferença entre o peso total da amostra seca e a soma dos pesos de umidade, cinzas, proteínas e lipídios.



7) Análise dos ácidos graxos apolares por cromatografia :

A análise dos ácidos graxos foi feita no cromatógrafo Perkin-Elmer, utilizando-se a coluna DB – 225, especialmente especificada para esta análise, no laboratório de cromatografia do CNPAB – EMBRAPA, Seropédica, RJ, (f-26).

A amostra, contendo a mistura dos ácidos graxos extraídos da *Spirulina maxima*, esterificados e metilados, foi injetada no aparelho através de uma micro seringa de 10 µl, em uma quantidade de 1 µl aproximadamente.



4.4 – Análise dos parâmetros cinéticos :

1) Parâmetros cinéticos :

Os parâmetros obtidos a partir do cultivo, as variáveis dependentes consideradas, foram a biomassa, a produtividade, o nitrogênio, os lipídios totais, os ácidos graxos apolares, o ácido gama-linolênico, o ácido palmítico, o ácido palmitoleico, o ácido esteárico, o ácido oleico e o ácido linoleico.

As curvas de crescimento foram desenvolvidas a partir da produção de biomassa em 3 l de meio, nos diversos tratamentos. Os modelos foram ajustados, com os respectivos parâmetros cinéticos, a partir dos melhores coeficientes de correlação encontrados, utilizando-se das equações conhecidas da literatura.

As equações cinéticas para *Spirulina* foram consideradas a partir das apresentadas pelo CNR, AQ/2/21, Firenze, 1982.

1.a) Velocidade específica :

$$\mu_x = 1/x \cdot dx/dt \quad , \text{ ou } \quad \mu_x \cdot t = \ln \cdot x/x_0 \quad ,$$

– Onde x e dx/dt foram considerados a partir das curvas de crescimento, as quais mostraram modelos polinomiais de 3º ou 4º graus. Mostra a velocidade com que ela aumenta a sua massa por unidade de massa, a unidade é hora^{-1} ou dia^{-1} .

1.b) Tempo de geração :

$$t_d = \ln \cdot 2 / \mu_x \quad , \quad \text{para } \textit{Spirulina} \text{ } t_d \text{ varia de 2,8 a 4,5 h.}$$

– É o tempo em que ela duplica a sua massa, a unidade é horas ou dias.

1.c) Fator de rendimento :

$$Y_{x/s} = \Delta X / \Delta S, \quad Y_{p/x} = \Delta P / \Delta X = Y_{p/s} = \Delta P / \Delta S$$

– É a relação do que produz pelo que consome, ou por outro produto, a unidade é %.

1.d) Velocidade específica x consumo de substrato :

$$\mu_x = \mu_{\max} \cdot S / (K_s + S)$$

– É a relação da variação da velocidade específica, que passa por um máximo, com o consumo do substrato.

1.e) Produtividade :

$$P_T = X / t_T \quad , \quad \begin{cases} P_T = \text{Produtividade total} = \text{quanto produziu no final.} \\ t_T = \text{Tempo total de crescimento} \end{cases}$$

$$P_m = X / t_m \quad , \quad \begin{cases} P_m = \text{Produtividade máxima} = \text{onde produziu o máximo} \\ t_m = \text{Tempo em que alcança o máximo de crescimento} \end{cases}$$

2) Avaliação de lipídios e ácidos graxos :

Para a composição dos ácidos graxos foram levados em conta os seis ácidos identificados pela análise em espectrógrafo de massa, realizada no CENPES – PETROBRÁS, RJ, sendo especificada a coluna capilar DB – 225 (adquirida especificamente para estas análises pelo professor Dr. Ranulfo Monte Alegre), separa os ácidos graxos na ordem, por tamanho de sua cadeia de carbono, conforme o apêndice A.2.7. A amostra de *Spirulina maxima* analisada foi a que correspondeu ao crescimento a 35°C no meio com 2,5N, para a escolha e especificação da coluna a ser utilizada, vide apêndices A.2.1 a A.2.6.

A partir destes resultados, esta coluna foi instalada no cromatógrafo, conforme descrito anteriormente, e as análises nela realizadas apresentaram cromatogramas através dos quais, após eliminadas as áreas não significativas, foram calculadas as áreas correspondentes aos picos identificados.

Foram considerados apenas os picos correspondentes aos seis ácidos principais, identificados na análise de espectrometria de massa, correspondentes à maior parte dos ácidos graxos presentes, sendo os picos restantes considerados como “outros”, porém não calculados. Vide apêndice A.2.8 em diante.

Para a avaliação da influência dos parâmetros limitantes no teor dos lipídios e dos ácidos graxos, em especial o ácido graxo GLA, foi utilizada a metodologia de superfície de resposta, a partir da análise quantitativa dos lipídios totais e ácidos graxos apolares, e das análises no cromatógrafo a gás, dos ésteres metílicos dos ácidos graxos apolares extraídos.

As variáveis independentes consideradas, para a análise estatística, foram a Temperatura e a Concentração de KNO₃, conforme a tabela abaixo:

VARIÁVEIS INDEPENDENTES	FAIXA DE VARIAÇÃO
Temperatura - (°C)	25 - 35
conc. KNO ₃ - (g/l)	0 - 0,2 - 2,5

As análises estatísticas dos resultados foram feitas utilizando-se o software “Statística”, considerando-se o planejamento fatorial 3 x 2. A estimativa do erro foi calculada em função dos experimentos em triplicata no ponto central, sendo obedecidas as seguintes considerações :

1) O método utilizado foi o de “Análise de Estimativa Não Linear” e o de “Regressão Múltipla”, do software “Statistica – versão 5.0”.

2) Os Parâmetros Estimados – “Estimate” – foram calculados a partir do modelo proposto.

3) Erro Padrão – “Std.Err”. – Deverá ter um valor menor do que o valor do Parâmetro Estimado em no mínimo 20%, para que o modelo seja considerado viável.

4) Teste t – t (14) – É calculado em função do número dos casos necessários, deverá ter valor maior do que um mínimo, tabelado para 95% de confiança, mostrando o quanto significativamente é o parâmetro diferente de zero.

5) Nível p – “p-level” – mostra a percentagem de erro acarretada pelos parâmetros, devendo tender a 0.

6) Matriz de Correlação dos Parâmetros Estimados – função da matriz de covariância, deverá apresentar valores menores que 1,0, o mais próximo de 0 possível, mostrando a menor dispersão possível entre os valores calculados.

7) Gráfico dos valores Preditos x Observados da variável dependente na análise dos resíduos – mostra a dispersão destes valores graficamente, sendo que as curvas deverão estar o mais próximas possível da diagonal, para a menor dispersão possível.

8) R – Coeficiente de Correlação da função proposta como modelo, deverá tender para 1,0.

Os pontos onde se encontraram os melhores resultados em relação ao aumento dos lipídios, particularmente ao aumento dos teores de GLA, indicaram as condições onde provavelmente teremos a otimização da produção do ácido graxo desejada.

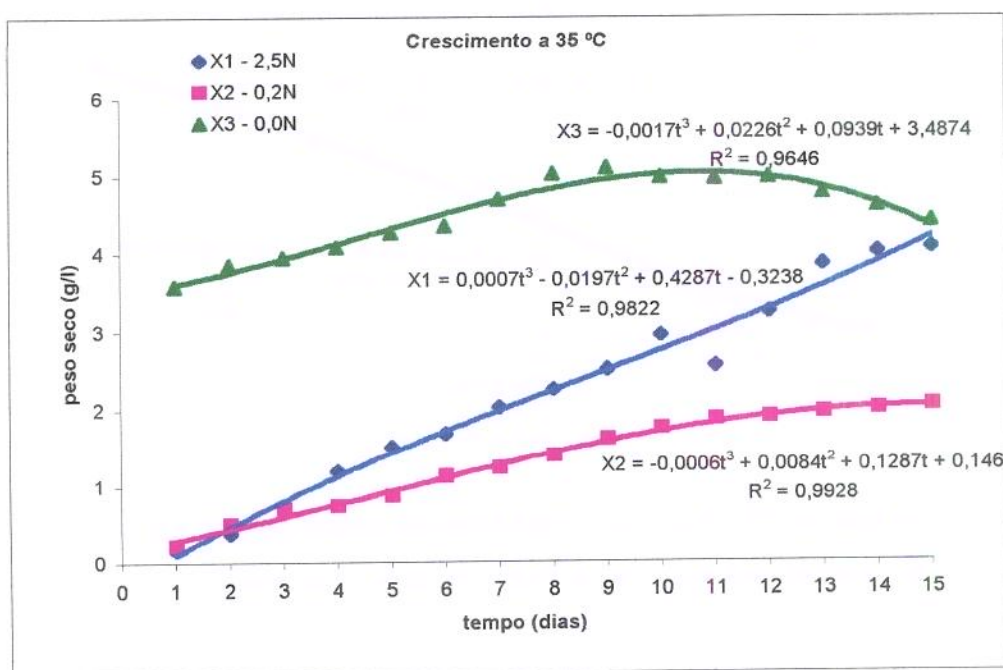
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO:

5.1 – Crescimento :

Foram obtidos resultados do peso seco (g/l) por 3 l de meio, versus tempo (dias), em 15 dias de crescimento, com 3 repetições para cada tratamento, conforme tabelas do apêndice A.1.1 a A.1.12.

5.1.1– Curvas de Crescimento a 35°C:

figura 5.1.1 – Curvas de crescimento a 35°C .



As equações X_1 , X_2 e X_3 mostram o peso seco médio para os tratamentos com 2,5, 0,2 e 0,0 g/l de KNO_3 no meio de cultivo, respectivamente, ajustando-se a um modelo polinomial de 3º grau.

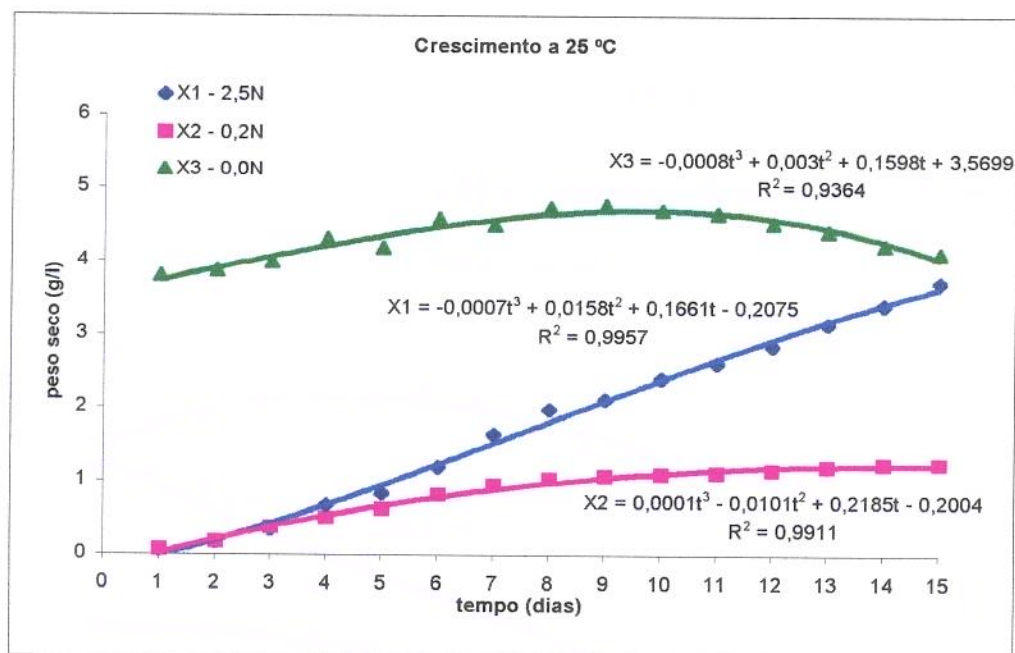
O crescimento em ausência de N mostrou queda a partir do 9º dia, devido ao esgotamento das reservas de proteína da microalga, conforme observação anterior de Torres (1994).

O crescimento em concentração de 0,2 g/l KNO_3 , mostrou menor desenvolvimento, com aparente descoloração, devido a utilização do pigmento ficocianina, e outras biliproteínas, conforme já observado por Boussida & Richmond (1980).

5.1.2 – Curvas de crescimento a 25°C :

As curvas da figura 2 apresentam as equações X_1 , X_2 e X_3 que mostram o peso seco médio da biomassa para os tratamentos com 2,5, 0,2 e 0,0 g/l de KNO_3 , respectivamente, ajustando-se a um modelo polinomial de 3º grau.

figura 5.1.2 – Curvas de crescimento a 25°C.



O crescimento a 25°C manteve comportamento semelhante ao crescimento a 35°C, com desempenho proporcionalmente menor em termos de biomassa.

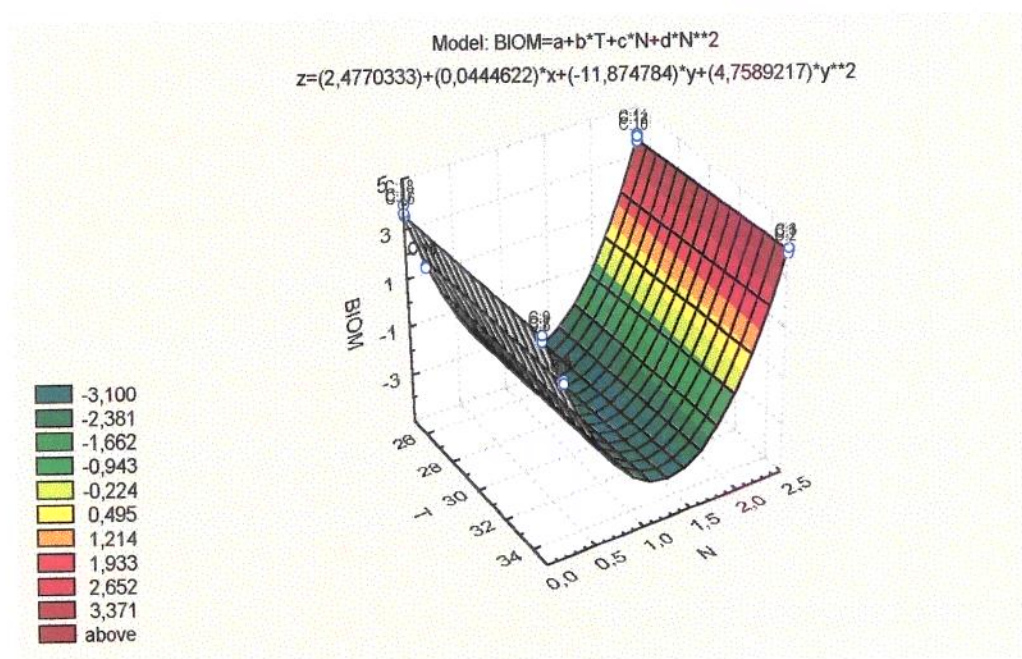
5.1.3 – Produção de Biomassa:

Em relação à biomassa celular produzida, observou-se queda linear com a temperatura, T , mais acentuada e não linear com o nitrogênio, N , vide figuras 5.1.1, 5.1.2, geradas a partir das tabelas do apêndice A.1.1 a A.1.6 e análises estatísticas 5.6.3, BIOM.

A biomassa decresceu, para os valores médios, cerca de 3,1% em meio com 2,5 N, 39,5% em meio com 0,2 N e 5% em ausência de N, entre as temperaturas 35°C e 25°C, aproximadamente.

BIOM, representando a biomassa em peso seco, foi a variável que avaliou o crescimento celular da *Spirulina maxima* nos tratamentos, apresentando os seguintes resultados comparativos com os parâmetros estatísticos utilizados:

- 1) O Std.Err. apresentou valores de 4,8 a 20 vezes menor do que os parâmetros, .
- 2) O teste t (14) mostrou para o menor valor, $B = 4,814787 > 1,761$ mínimo.
- 3) O valor de p-level para B foi $0,0275\% \ll 5\%$ máximo.
- 4) A matriz de correlação dos parâmetros estimados e a análise dos resíduos, mostrou dispersão dos resultados, mas boa correlação.
- 5) A superfície apresentou valores negativos como consequência do ajuste do modelo proposto, de coeficiente de regressão $R = 0,98714$ considerado bom, mas não relacionados com os valores experimentais.
- 6) A função proposta foi linear em T e em N, e quadrática em N.
- 7) Superfície de resposta para a biomassa – **BIOM**:

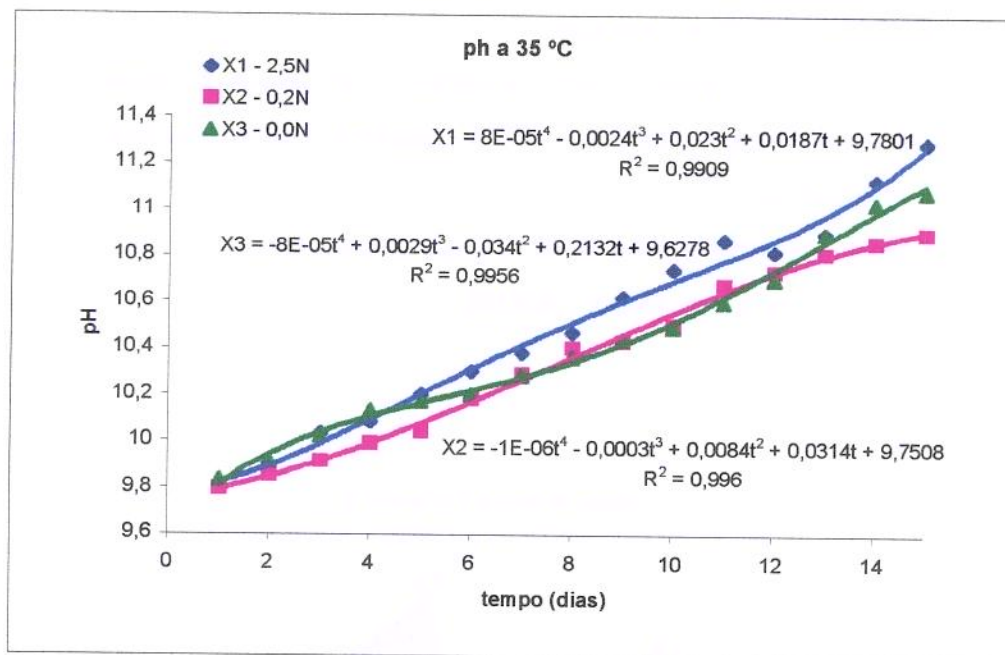


5.2 – Variação do pH :

5.2.1 – Curvas da variação do pH a 35°C:

As curvas da figura 3 mostram a variação do pH, com as equações X_1 , X_2 e X_3 ajustando-se a um modelo polinomial de 4º grau.

Figura 5.2.1 – Variação de pH a 35°C.



Não se observou alterações significativas em relação à variação do pH, comparando-se os crescimentos nos diferentes meios de cultivo, confirmando observações de Torres (1994).

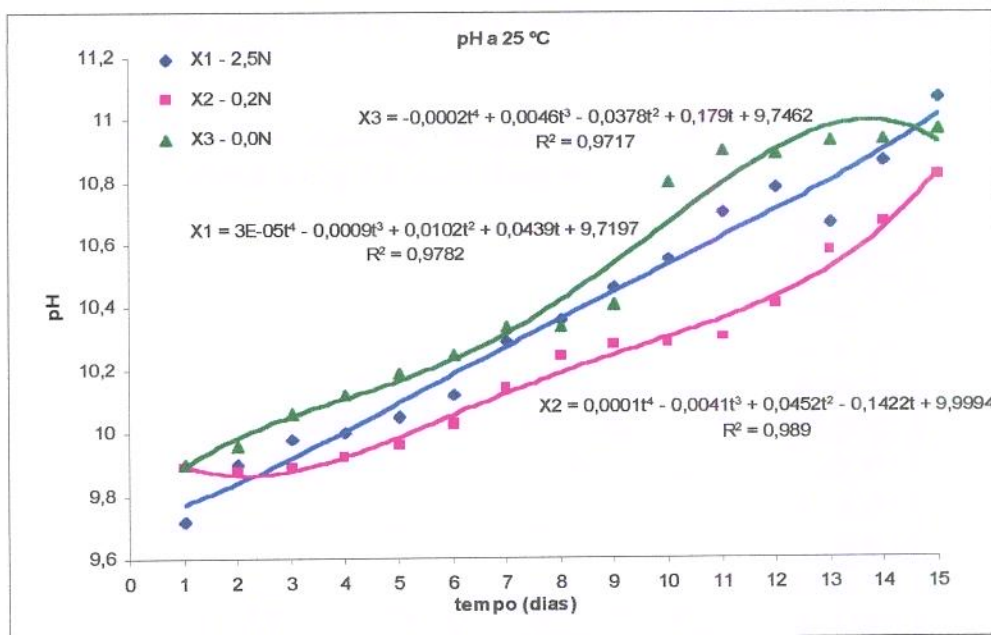
Nos diversos tratamentos o pH inicial ficou entre 9,6 a 9,9, no meio de cultivo logo após a inoculação, e entre 10,8 a 11,2 ao final do crescimento.

5.2.2 – Curvas de variação do pH a 25°C:

As curvas da figura 4 mostram a variação do pH, com as equações X_1 , X_2 e X_3 ajustando-se a um modelo polinomial de 4º grau.

Observou-se comportamento semelhante à variação do pH a 35°C, não mostrando alterações significativas entre os tratamentos.

Figura 5.2.2 – Variação do pH a 25°C.



5.3 – Velocidades específicas de crescimento :

As velocidades específicas de crescimento foram calculadas para cada ponto, obedecendo à equação $\mu = (dx/dt)/x$, sendo x, peso seco da biomassa (g/l) produzida e t o tempo (dias), calculados de acordo com as integrais das equações de crescimento polinomial de terceiro grau para cada ponto de amostragem, visto não ser possível obter-se uma velocidade específica constante, como para um crescimento binário onde existe uma fase exponencial de crescimento.

Para as velocidades específicas observou-se comportamento diferente para cada temperatura, para os seus valores médios. A 35°C houve aumento do crescimento em 2,5 N comparando com o crescimento em 0,2 N e queda para o crescimento em 0 N. A 25°C houve queda mais acentuada do crescimento a 2,5 N para o crescimento a 0,2 N e menor para o crescimento a 0 N. Vide 5.1.5.1 a 5.1.5.6.

Para cada dia observou-se diminuição da velocidade específica, correspondente aos pontos da curva polinomial ajustada, não sendo os mesmos em relação aos valores experimentais. Devemos portanto considerar que, de acordo com autores, Torres (1994), Paoletti et al (1980), que após 7 dias aproximadamente começa a declinar o crescimento, o que nos levaria a tomar o valor médio até os 7 primeiros dias e não até aos 15 dias.

As tabelas a seguir mostram as respectivas velocidades específicas, estas ajustadas ao modelo polinomial de terceira ordem para todos os casos, tomadas em 15 dias, dia a dia.

2,5N – 35°C	
Tempo (dias)	μ
1	4,971196
2	0,893807
3	0,500376
4	0,351459
5	0,272858
6	0,224023
7	0,190507
8	0,165874
9	0,146827
10	0,131503
11	0,118778
12	0,107938
13	0,098512
14	0,090180
15	0,082724

5.3.1) -Velocidade Específica de Crescimento a 35°C em meio com 2,5 g/l de KNO₃:

$$\mu = \frac{dX/dt}{X}$$

Onde:
X = (peso seco)
t = tempo

$$X1 = 0,0007t^3 - 0,0197t^2 + 0,4287t - 0,3238$$

$$\mu_1 \text{ (médio)} = 0,025858 \text{ d}^{-1}$$

0,2N – 35°C	
Tempo (dias)	μ
1	0,469735
2	0,315363
3	0,235841
4	0,188029
5	0,156517
6	0,134464
7	0,118384
8	0,106330
9	0,097137
10	0,090078
11	0,084687
12	0,080668
13	0,077844
14	0,076137
15	0,075560

5.3.2) Velocidade Específica de Crescimento a 35°C em meio com 0.2 g/l de KNO₃ :

$$\mu = \frac{dX/dt}{X}$$

Onde:
X = (peso seco)
t = tempo

$$X2 = -0,0006t^3 + 0,0084t^2 + 0,1287t + 0,1460$$

$$\mu_2 \text{ (médio)} = 0,2021746 \text{ d}^{-1}$$

Y3 – 0,0N	
Tempo (dias)	μ
1	0,029047
2	0,030446
3	0,031248
4	0,031594
5	0,031613
6	0,031420
7	0,031106
8	0,030747
9	0,030403
10	0,030129
11	0,029973
12	0,029994
13	0,030262
14	0,030882
15	0,032026

5.3.3 - Velocidade Específica de Crescimento a 35°C – 0,0 N :

$$\mu = \frac{dX/dt}{X}$$

Onde:
X = (peso seco)
t = tempo

$$X3 = -0,0017t^3 + 0,0226t^2 + 0,0939t + 3,4874$$

$$\mu_3 (\text{médio}) = 0,034786 \text{ d}^{-1}$$

Y1 - 2,5N	
Tempo (dias)	μ
1	-0,13810
2	-0,26977
3	-1,11173
4	0,664426
5	0,274661
6	0,179526
7	0,136556
8	0,112208
9	0,096713
10	0,086187
11	0,078798
12	0,073585
13	0,070022
14	0,067838
15	0,066937

5.3.4) Velocidade Específica de Crescimento a 25°C – 2,5 N :

$$\mu = \frac{dX/dt}{X}$$

Onde:
X = (peso seco)
t = tempo

$$X1 = -0,0007t^3 + 0,0158t^2 + 0,1661t - 0,2075$$

$$\mu_1 (\text{médio}) = 0,556437 \text{ d}^{-1}$$

Y2 - 0,2N	
Tempo (dias)	μ
1	2,635597
2	1,058545
3	0,555056
4	0,383552
5	0,297628
6	0,246422
7	0,212761
8	0,189241
9	0,172152
10	0,159439
11	0,149882
12	0,142719
13	0,137465
14	0,133807
15	0,131556

5.3.5) Velocidade Específica de Crescimento a 25°C – 0,2N :

$$\mu = \frac{dX/dt}{X}$$

Onde:
X = (peso seco)
t = tempo

$$X_2 = 0,0001t^3 - 0,0101t^2 + 0,285t + 0,2004$$

$$\mu_2 \text{ (médio)} = 0,153785 \text{ d}^{-1}$$

Y3 - 0,0N	
Tempo (dias)	μ
1	0,043150
2	0,041522
3	0,039929
4	0,038406
5	0,036979
6	0,035664
7	0,034473
8	0,033415
9	0,032499
10	0,031734
11	0,031136
12	0,030724
13	0,030530
14	0,030604
15	0,031026

5.3.6) Velocidade Específica de Crescimento a 25°C – 0,0 N :

$$\mu = \frac{dX/dt}{X}$$

Onde:
X = (peso seco)
t = tempo (dia)

$$X_3 = -0,0008t^3 + 0,0030t^2 + 0,1598t + 3,5699$$

$$\mu_3 \text{ (médio)} = 0,30726 \text{ d}^{-1}$$

5.4 – Produtividade :

A tabela 5.4 mostra as produtividades TOTAL e MAXIMA, calculadas de acordo com as equações citadas anteriormente, em g/l/dia.

Tabela 5.4 – Produtividades para os diversos tratamentos.

TEMP (°C)	NITROG (g/l)	REP	BIOM (g/l)	P.TOTAL (g/l/dia)	P.MAX (g/l/dia)
35	2,5	1	4,0600	0,2814	0,3194
35	2,5	2	3,9222	0,2596	0,3036
35	2,5	3	4,1241	0,2744	0,3069
35	0,2	1	2,0621	0,136	0,2158
35	0,2	2	2,0727	0,1501	0,2453
35	0,2	3	1,9452	0,1357	0,2122
35	0	1	3,8847	0,0799	0,1979
35	0	2	3,7833	0,0568	0,1936
35	0	3	4,0597	0,0929	0,2701
25	2,5	1	3,5183	0,1916	0,230
25	2,5	2	3,8371	0,245	0,2675
25	2,5	3	3,7415	0,2322	0,2481
25	0,2	1	1,2436	0,0743	0,1261
25	0,2	2	1,2437	0,0606	0,127
25	0,2	3	1,1905	0,054	0,1205
25	0	1	3,5176	0,0806	0,2192
25	0	2	3,6451	0,0532	0,3416
25	0	3	3,9746	0,0333	0,2139

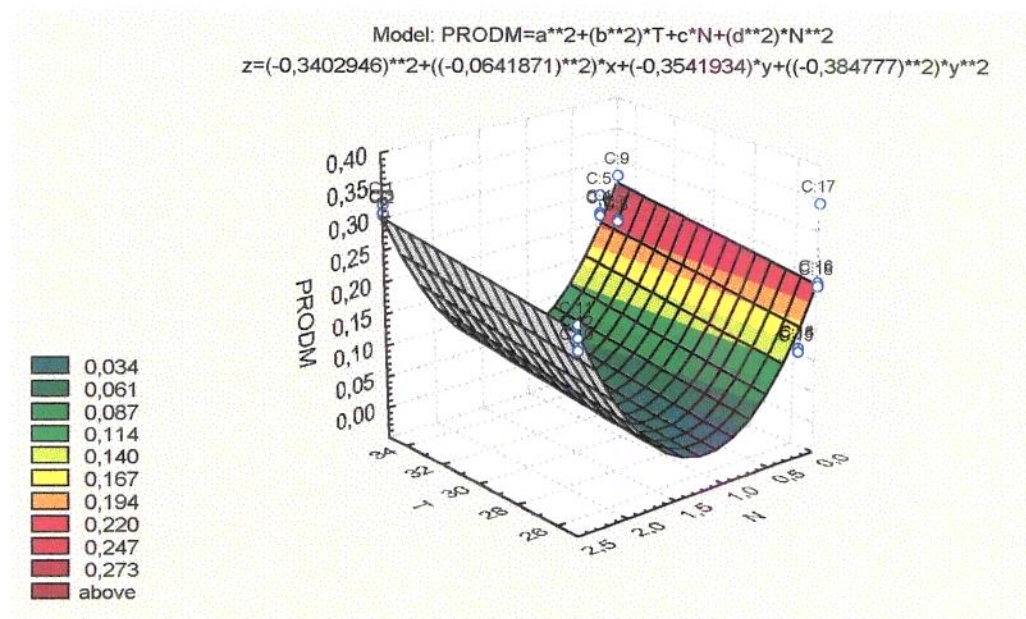
A produtividade máxima acompanha a variação da produção de biomassa e a produtividade total decresce com T, vide análise estatística a seguir, 5.4.1 e 5.4.2 respectivamente.

5.4.1 – Produtividade máxima :

PRODM, representando a produtividade máxima, foi a variável que avaliou a produção de biomassa no ponto máximo do crescimento, em valores médios, apresentando os seguintes resultados comparativos com os parâmetros estatísticos utilizados:

- 1) O Std.Err. apresentou valores de 3,11 a 6,7 vezes menor do que os valores dos parâmetros.
- 2) O teste t (14) mostrou para o menor valor $C = 3,10556 > 1,761$ mínimo.

- 3) O valor de p-level para o maior valor, C foi 0,775% << 5% máximo.
- 4) A matriz de correlação dos parâmetros estimados e análise dos resíduos, mostrou alguma dispersão dos resultados, valores altos para B com A e C com D, mantendo boa correlação para os demais.
- 5) A superfície apresentou inflexão na curva, mas dentro da variação dos valores experimentais, embora com baixo coeficiente de correlação $R = 0,75654$.
- 6) A função proposta foi linear em T, com o quadrado do coeficiente, linear em N e quadrática em N, com o quadrado do coeficiente.
- 7) Superfície de resposta para a produtividade máxima – **PRODM**:

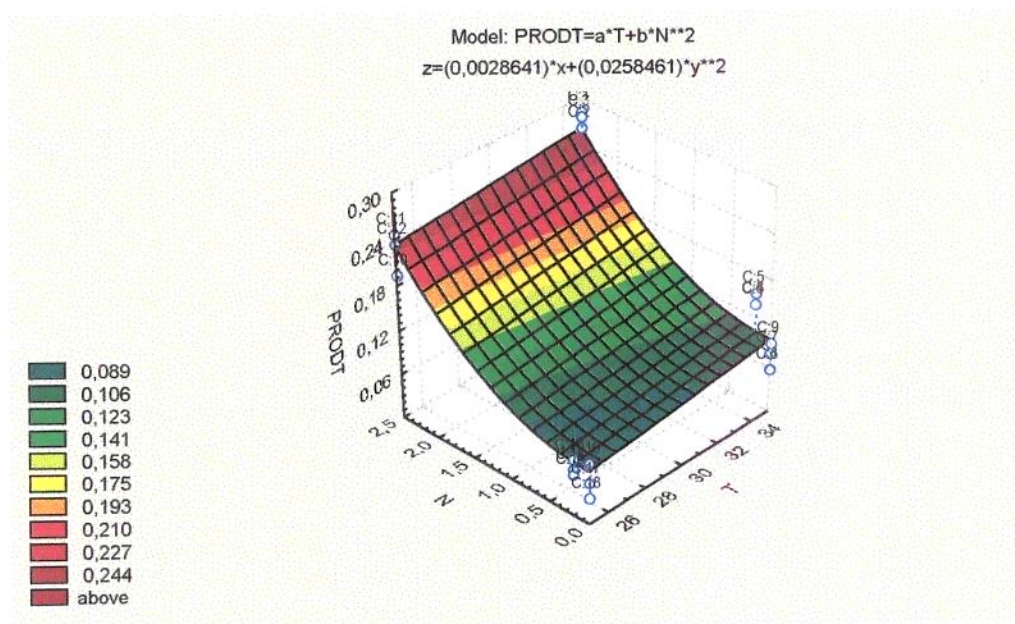


5.4.2 – Produtividade total :

PRODT, representando a produtividade total, foi a variável que avaliou a produção de biomassa ao final do crescimento, 15 dias, em valores médios, apresentando os seguintes valores comparativos com os parâmetros estatísticos analisados :

- 1) O Std.Err. apresentou valores de uma ordem de grandeza menores do que os valores dos parâmetros.
- 2) O teste t (16) mostrou valores >> 1,746 mínimo.
- 3) O valor de p-level para todos foi igual a 0% << 5%.

- 4) O A matriz de correlação dos valores estimados e análise dos resíduos mostrou muito pouca dispersão e boa correlação.
- 5) A superfície apresentou valores bem condizentes com os observados experimentalmente, com um bom valor do coeficiente de correlação $R = 0,95215$.
- 6) A função proposta foi linear em T e quadrática em N, sem constante.
- 7) Superfície de resposta para a produtividade total – **PRODT**:



5.5 – Composição centesimal :

5.5.1 – Composição centesimal da biomassa :

1) A composição em **proteínas** mostrou queda linear com a temperatura e acentuadamente não linear com o nitrogênio. Vide tabela 5.5.1 e 5.6.4, **PROT**.

Para a variação de N, à 35°C, apresentou uma diminuição de 29% do meio com 2,5N para o meio com 0,2N, e de 33% do meio com 2,5N para o meio com ausência de N, para valores médios, indo além das observações feitas por Torres (1994), de 24% e 18% respectivamente.

À 25°C, apresentou uma diminuição de 40% do meio com 2,5N para o meio com 0,2N, e de 39% do meio com 2,5N para o meio com ausência de N, para valores médios.

Para a variação de T, de 35°C para 25°C, para o meio com 2,5 N houve um aumento de 1,4%, para o meio com 0,2N houve uma diminuição de 15% e para o meio com ausência de N houve uma diminuição de 8%, aproximadamente para valores médios.

Para o meio 2,5N os valores iniciais encontrados estão de acordo com os citados por Paoletti et al (1980), Boussida & Richmond (1980) e Torres (1994), de 68,5% a 77%.

A tabela 5.5.1 a seguir mostra a composição centesimal da biomassa, em cada tratamento. A composição foi expressa em percentagem da biomassa seca.

Tabela 5.5.1 – Composição centesimal da biomassa.

T °C	N g/l	REP	PROTEINAS %	CINZAS %	CARBOIDRATOS %	LIPÍDIOS TOTAIS %
35	2,5	1	68,42	7,6	16,03	7,95
35	2,5	2	71,02	5,84	14,92	8,22
35	2,5	3	71,81	5,77	13,54	8,88
Média			70,4167	6,40333	14,83	8,35
Desvio padrão			1,77371	1,03693	1,24744	0,47843
35	0,2	1	53,28	5,76	18,18	22,78
35	0,2	2	52,46	5,58	17,65	24,31
35	0,2	3	44,56	8,25	22,15	25,04
Média			50,1	6,53	19,3267	24,0433
Desvio padrão			4,81527	1,49228	2,4594	1,15336
35	0	1	44,48	6,23	26,03	23,26
35	0	2	49,13	7,09	21,09	22,69
35	0	3	48,19	6,81	21,48	23,52
Média			47,2667	6,71	22,8667	23,1567
Desvio padrão			2,45866	0,43863	2,74646	0,42454
25	2,5	1	70,74	7,34	14,98	6,94
25	2,5	2	72,33	6,52	14,88	6,27
25	2,5	3	71,19	6,96	12,87	7,98
Média			71,42	6,94	14,2433	7,06333
Desvio padrão			0,81957	0,41037	1,19039	0,86165
25	0,2	1	41,64	8,12	27,36	22,88
25	0,2	2	42,92	7,38	26,54	23,16
25	0,2	3	43,38	7,84	26,79	21,99
Média			42,6467	7,78	26,8967	22,6767
Desvio padrão			0,90163	0,37363	0,42028	0,61093
25	0	1	44,74	6,65	26,56	22,35
25	0	2	44,81	7,39	25,96	21,84
25	0	3	41,09	8,91	29,15	20,85
Média			43,54667	7,65	27,22333	21,68
Desvio padrão			2,127824	1,152215	1,695297	0,762693

2) A composição em **cinzas** mostrou para a variação de T, de 35°C para 25°C, aumento de 7,8% para o meio com 2,5N, de 16% para o meio com 0,2N e de 12,3% em ausência de N, aproximadamente para valores médios.

Para variação de N a 35°C, do meio com 2,5N para o meio com 0,2N mostrou um aumento de 2% e para o meio com ausência de N um aumento de 4,6%, aproximadamente para os valores médios. A 25°C, do meio com 2,5N para o meio com 0,2N mostrou um aumento de 10,8% e para o meio com ausência de N 9,3%, aproximadamente para valores médios. Vide tabela 5.5.1.

Os valores iniciais encontrados para cinzas estão compatíveis com os citados por Paoletti et al (1980), de 4% a 6% para o meio 2,5N, e por Torres (1994), de 8,1% para valores médios para o meio 2,5N, para *Spirulina maxima*.

3) Os **lipídios totais** mostraram uma função linear com T e não linear com N. Vide tabela 5.5.1 e 5.3.5 LIPT.

Para a variação de T, de 35°C para 25°C, mostraram para o meio com 2,5N uma diminuição de 15,4%, para o meio com 0,2N uma diminuição de 5,7% e para o meio com ausência de N uma diminuição de 6,4%, aproximadamente para valores médios. Este pequeno decréscimo na concentração dos lipídios totais para a diminuição da temperatura, para uma mesma concentração de nitratos contraria em parte o que foi observado por Mendes (1992).

Para a variação de N à 35°C, os resultados mostraram que do meio com 2,5N para o meio com 0,2N houve um aumento de 2,88 vezes e para o meio com ausência de N houve um aumento de 2,8 vezes, aproximadamente para valores médios. À 25°C, os resultados mostraram que do meio com 2,5N para o meio com 0,2N houve um aumento de 3,21 vezes e para o meio com ausência de N houve um aumento de 3,07 vezes, aproximadamente para valores médios, estando de acordo com observação de Torres (1994), sendo um pouco menos expressiva do que este a 35°C e mais a 25°C.

Cabe citar a constatação de vários autores. Mendes (1992), que embora tenha observado uma correlação inversa entre aumento da temperatura e o acúmulo de lipídios totais, bem como com a redução de nitratos com o acúmulo de lipídios, observou que este acúmulo era muito mais expressivo com a diminuição de nitratos do que com a da temperatura. Shifrin et al (1981), por outro lado, constatou que várias espécies de

microalgas sob estarvação de nitrogênio após 4 a 9 dias aumentaram 2 a 3 vezes o conteúdo de lipídios, corroborando com os resultados encontrados. Torres (1994) também constatou aumento de 2,14 vezes com a redução de nitratos de 2,5 para 0,2 g/l, e de 3,7 vezes para o meio com ausência de N, em cultivo de *Spirulina maxima*, confirmando também as observações. Spoehr & Milner (1949) e Iwamoto et al (1955) já haviam reportados aumento do conteúdo de lipídios, 85%, para a microalga *Clorella*, cultivada em ausência de N, confirmada por Zhudova et al (1969), porém com valor menor do que este, sob as mesmas condições.

4) A concentração de carboidratos foi calculada pela diferença de 100% menos a soma de proteínas + cinzas + lipídios totais. Mostrou o valor de 14,8% a 35°C e 14,2% a 25°C para o meio 2,5N, compatível com os valores citados por Paoletti et al (1980), de até 20% para *Spirulina platensis* e de até 16% para *Spirulina maxima*, por Quillet (1975), por Richmond (1988) e por Torres (1994), de 16,3% para *Spirulina maxima*.

Para variação de N a 35°C, do meio 2,5N para o meio 0,2N, houve aumento de 23,3% aproximadamente, e para o meio com ausência de N houve aumento de 34,6% aproximadamente. A 25°C, do meio 2,5N para o meio 0,2N houve aumento de 47% e para o meio com ausência de N houve aumento de 47,6%. Vide tabela 5.5.1.

5.5.2 – Composição geral em biomassa e umidade:

A umidade do gel não mostrou alterações significativas, sendo as variações apresentadas, de 73% a 84% para 35°C, de 78% a 83% para 25°C, provavelmente devido a questões experimentais de amostragem, fatores como filtração, lavagem do gel com solução salina, congelamento e descongelamento da amostra.

A tabela 5.5.2 a seguir, mostra a composição geral em percentagem de biomassa e de umidade no gel, e em peso seco total, em g, da *Spirulina maxima* para cada dorna com 3 litros de meio de cultivo cada uma, em triplicata.

Tabela 5.5.2 – Composição em biomassa e umidade.

T (°C)	N g/l KNO ₃	REP	UMIDADE %	BIOMASSA %	BIOMASSA g
35	2,5	1	85,06	14,94	4,0600
35	2,5	2	81,06	18,94	3,9222
35	2,5	3	79,89	20,11	4,1241
média			82,00	18,00	4,0354
desvio padrão			2,71	2,71	
35	0,2	1	79,37	20,63	2,0621
35	0,2	2	67,95	32,05	2,0727
35	0,2	3	71,66	28,34	1,9452
média			72,99	27,01	2,0267
desvio padrão			5,83	5,83	
35	0	1	84,59	15,41	3,8847
35	0	2	84,25	15,75	3,7833
35	0	3	85,56	14,44	4,0597
média			84,80	15,20	3,9092
desvio padrão			0,68	0,68	
25	2,5	1	84,48	15,52	3,5183
25	2,5	2	81,06	18,94	3,8371
25	2,5	3	83,78	16,22	3,7415
média			83,11	16,89	3,3990
desvio padrão			1,81	1,81	
25	0,2	1	82,44	17,56	1,2436
25	0,2	2	81,36	18,64	1,2437
25	0,2	3	71,01	28,99	1,1905
média			78,27	21,73	1,2259
desvio padrão			6,31	6,31	
25	0	1	83,85	16,15	3,5176
25	0	2	78,24	21,76	3,6451
25	0	3	77,46	22,54	3,9746
média			79,85	20,15	3,7124
desvio padrão			3,49	3,49	

5.5.3 – Composição geral dos ácidos graxos :

A tabela 5.5.3 a seguir mostra a composição de cada ácido graxo em percentagem dos ácidos graxos totais, AGRAX, os quais correspondem à percentagem dos lipídios totais, LIPTOT, estes calculados em percentagem da biomassa seca produzida , BIOM, para cada tratamento em triplicata.

Tabela 5.5.3 – Composição centesimal dos ácidos graxos.

T °C	N g/l KNO ₃	rep	LIPTOT (%BIOM)	AGRAX (%LIPT)	GLA (%)	PALM (%)	PMOLEI (%)	ESTEAR (%)	OLEICO (%)	OLEI (%)	OUTROS (%)
35	2,5	1	7,95	84,19	9,37	57,32	2,13	1,48	10	9,67	9,51
35	2,5	2	8,22	82,66	9,13	58,37	2,77	1,43	10	9,67	8,26
35	2,5	3	8,88	80,44	12,6	52,81	2,28	0,99	7,1	10,44	13,78
Média			8,35	82,43	10,37	56,17	2,39	1,30	9,33	9,93	10,52
Desvio padrão			0,48	1,89	1,94	2,95	0,33	0,27	1,93	0,44	2,89
35	0,2	1	22,78	75,99	16,72	43,28	1,04	2,64	12,48	9,14	14,70
35	0,2	2	24,31	81,06	11,67	44,52	1,05	3,59	10,51	8,76	19,90
35	0,2	3	25,04	82,05	12,48	45,35	1,02	3,38	10,41	9,08	19,22
Média			24,04	79,70	13,62	44,38	1,04	3,20	11,13	8,99	17,94
Desvio padrão			1,15	3,25	2,71	1,04	0,02	0,50	1,17	0,20	2,83
35	0	1	23,26	76,74	13,34	39,54	1,47	1,77	6,67	11,7	25,51
35	0	2	22,69	70,28	15,03	40,6	1,58	2,73	7,98	12,87	19,21
35	0	3	23,52	82,34	14,91	41,45	1,67	2,57	7,61	12,55	19,24
Média			23,16	76,45	14,43	40,53	1,57	2,36	7,42	12,37	21,32
Desvio padrão			0,42	6,04	0,94	0,96	0,10	0,51	0,68	0,60	3,63
25	2,5	1	6,94	80,09	10,63	47,6	6,52	0,71	9,58	9,68	15,28
25	2,5	2	6,27	79,44	15,81	41,97	9,11	0,54	5,67	13,17	13,73
25	2,5	3	7,98	75,38	11,68	51,74	8,06	0,65	6,39	10,73	10,75
Média			7,06	78,30	12,71	47,10	7,90	0,63	7,21	11,19	13,25
Desvio padrão			0,86	2,55	2,74	4,90	1,30	0,09	2,08	1,79	2,30
25	0,2	1	22,88	80,06	18,63	40,05	1,74	2,18	5,64	11,32	20,44
25	0,2	2	23,16	75,36	12,69	47,21	2,87	2,88	5,43	7,59	21,33
25	0,2	3	21,99	78,89	13,41	43,92	1,92	2,28	4,24	8,24	25,99
Média			22,68	78,10	14,91	43,73	2,18	2,45	5,10	9,05	22,59
Desvio padrão			0,61	2,45	3,24	3,58	0,61	0,38	0,76	1,99	2,98
25	0	1	22,35	84,83	19,4	40,14	3,43	0,85	5,71	11,62	18,85
25	0	2	21,84	62,65	20,96	40,9	3,14	1,23	3,7	12,94	17,13
25	0	3	20,85	82,66	13,29	26	1,54	0,67	2,49	8,67	47,34
Média			21,68	76,71	17,88	35,68	2,70	0,92	3,97	11,08	27,77
Desvio padrão			0,76	12,23	4,05	8,39	1,02	0,29	1,63	2,19	16,97

5) Os **ácidos graxos totais**, expressos em percentagem dos lipídios totais, correspondentes aos ésteres metílicos dos ácidos graxos apolares, para cada tratamento, se comportaram de maneira paralela com os lipídios totais. Mostraram também ser função linear com T e não linear com N. Vide tabela 5.5.3 e 5.3.6 **AGRAX**.

Para a variação de T, de 35°C para 25°C, diminuiu 19,7% em meio com 2,5N, diminuiu 19,7% em meio com 0,2N 7,6% e diminuiu 6,15% em meio com ausência de N, para os valores médios.

Para a variação de N, para 35°C, do meio com 2,5N para o meio com 0,2N aumentou 2,78 vezes, para o meio com ausência de N aumentou 2,57 vezes, aproximadamente para valores médios. Para 25°C, do meio com 2,5N para o meio com 0,2N aumentou 3,2 vezes, para o meio com ausência de N aumentou 3,0 vezes, aproximadamente para os valores médios.

5.5.4 - Composição dos ácidos graxos apolares selecionados:

Os ácidos graxos selecionados, identificados diretamente ou imediatamente próximos dos picos da amostra analisada pelo CENPES, tomada como padrão, foram :

- 1) Ácido Palmítico ----- C16:0 – (hexadecanoico)
- 2) Ácido Palmitoleico ----- C16:1
- 3) Ácido Estearico ----- C18:0
- 4) Ácido Oleico ----- C18:1 cis
- 5) Ácido Linoleico ----- C18:2
- 6) Ácido gama-Linolênico ----- C18:3 – (GLA)

Os seis ácidos foram especificados por serem expressivamente os maiores componentes dos ácidos graxos extraídos da *Spirulina maxima*, cerca de 80% do seu conteúdo aproximadamente em valores médios, escolhidos por serem apresentados por outros autores como sendo quase que a totalidade dos ácidos presentes na microalga. Vide tabela 5.5.3.

Observou-se que no crescimento feito por Torres (1994), o conteúdo destes ácidos graxos foi de aproximadamente 96,8% em média, para os tratamentos por ele efetuados, e que a composição dos ácidos graxos citada por Paoletti et al (1980) apresentou quinze ácidos, sendo estes seis equivalentes a 95,7% do seu conteúdo, versus 80% apresentado por

este trabalho. Isto se explica pelo cromatógrafo utilizado para as análises, e a coluna especificada para tal, ser bem mais moderno e muito mais sensível, apresentando, com a mesma atenuação e picos bem significativos, em torno de vinte e sete ácidos graxos, desde 10 até 22 carbonos na cadeia. Portanto não serão comparados os resultados encontrados para os ácidos palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico e linoleico com a literatura, além do que não se tem notícia sobre como ocorre a variação da composição destes com a variação do nitrogênio no meio.

1) O ácido gama linolênico, GLA, mostrou a mesma tendência dos ácidos graxos e lipídios totais sendo que em relação à temperatura, este se apresentou sem alterações significativas de 35°C para 25°C. Diminuiu em torno de 4% em meio com 2,5N, aumentou em 3% em meio com 0,2N e aumentou em 3,5% em ausência de N aproximadamente, para valores médios, demonstrando que não houve mudanças importantes para esta faixa de temperatura. Vide a tabela 5.5.3 e 5.6.7, GLA, onde apresentou função linear em T e não linear em N.

Em relação à variação de N, para 35°C houve um aumento de 3,6 vezes do meio com 2,5N para o meio com 0,2N, e aumento de 3,55 vezes para o meio em ausência de N, para os valores médios, versus 2,32 vezes e 2,5 vezes, respectivamente para as mesmas condições, no crescimento realizado por Torres (1994). Para 25°C houve um aumento de 3,84 vezes do meio com 2,5N para o meio com 0,2N e aumento de 4,28 vezes em ausência de N, para os valores médios.

Os resultados corroboraram com citações de vários autores. Cohen et al (1992) observou um aumento substancial de GLA de *Spirulina platensis* resistente a um herbicida, quando a expôs a condições limitantes, em stress, mantendo-se estável por várias gerações. Manabe et al (1992) constatou aumento de 1,5 a 2 vezes na concentração de GLA transferindo células de *Spirulina platensis* para meios com concentrações reduzidas de cloreto de amônio. Conforme foi observado neste trabalho os resultados confirmaram o que foi citado por Hudson et al (1974), Metzger et al (1983), Paoletti et al (1980) e Torres (1994) que entre os ácidos graxos apolares extraídos da *Spirulina* predominavam o ácido palmítico, acompanhado de expressiva quantidade do ácido gama-linolênico e do ácido linoleico.

2) A produtividade de GLA manteve a mesma tendência, vide tabela 5.6.2 e 5.6.8, **PGLA**.

Para 35°C esta apresentou um aumento de 1,8 vezes do meio com 2,5N para o meio com 0,2N, e 3,46 vezes para o meio com ausência de N, para valores médios, versus 1,58 vezes e 1,81 vezes respectivamente para as mesmas condições no crescimento realizado por Torres (1994). Para 25°C aumentou 1,3 vezes do meio com 2,5N para o meio com 0,2N e 4,2 vezes do meio com 2,5N para o meio com ausência de N, para os valores médios.

3) O ácido palmítico apresentou também função linear em T e não linear em N. Vide a tabela 5.5.3 e 5.6.9, **PALM**.

Para variação em T, de 35°C para 25°C, diminuiu cerca de 30% para o meio com 2,5N, 9% para o meio com 0,2N e 18% em ausência de N, para valores médios.

Para variação em N, em 35°C aumentou 2,21 vezes do meio 2,5N para o meio 0,2N e aumentou 1,86 vezes do meio 2,5N para o meio 0N, para valores médios, versus o aumento de 1,58 vezes e de 1,81 vezes respectivamente, segundo observação de Torres (1994). Em 25°C aumenta 2,95 vezes do meio 2,5N para o meio 0,2N e 2,25 vezes do meio 2,5N para o meio 0N.

4) O ácido palmitoleico mostrou para a variação de T, de 35°C para 25°C, um aumento de 3,3 vezes em meio com 2,5N, de 2,1 vezes em meio com 0,2N e 1,72 vezes em ausência de N, para valores médios.

Para variação de N apresentou, para 35°C, diminuição de 2,3 vezes do meio com 2,5N para o meio com 0,2N e 1,5 vezes para o meio com ausência de N. Para 25°C, diminuiu 3,62 vezes do meio com 2,5N para o meio com 0,2N e 2,93 vezes para o meio com ausência de N, para valores médios.

Apresentou também função linear com T e não linear com N. Vide a tabela 5.5.3 e 5.6.10, **PMOLEI**.

5) O **ácido esteárico** mostrou, para a variação da temperatura de 35°C para 25°C, diminuição de 56% em meio com 2,5N, de 30% em meio com 0,2N e de 64% em ausência de N, para valores médios, apresentando também relação linear com T e não linear com N.

Para variação de N, a 35°C aumentou 6,9 vezes do meio com 2,5N para o meio com 0,2N, e 4,7 vezes do meio com 2,5N para o meio com ausência de N. A 25°C aumentou 3,75 vezes do meio com 2,5N para o meio com 0,2N e 3,75 vezes do meio com 2,5N para o meio com ausência de N, em valores médios. Vide a tabela 5.5.3 e 5.6.11, **ESTEAR**.

6) O **ácido oleico** mostrou também função linear com T e não linear com N.

Para a variação de T de 35°C para 25°C, diminuiu 36% em meio com 2,5N, 57% em meio com 0,2N e 51% em ausência de N, para valores médios.

Para a variação de N, para 35°C, aumentou 3,3 vezes do meio com 2,5N para o meio com 0,2N e 2 vezes do meio com 2,5N para o meio com ausência de N, para valores médios. Para 25°C, aumentou 2,2 vezes do meio com 2,5N para o meio com 0,2N e 1,6 vezes do meio com 2,5N para o meio com ausência de N, para valores médios. Vide a tabela 5.5.3 e 5.6.12, **OLEICO**.

7) O **ácido linoleico** apresentou também função linear com T e não linear com N. Para a variação em T, de 35°C para 25°C diminuiu 8,8% para o meio com 2,5N, 6,4% para o meio com 0,2N e 16,9% para o meio com ausência de N, para valores médios.

Para variação em N, a 35°C ocorreu um aumento de 2,5 vezes do meio com 2,5N para o meio com 0,2N e de 3,2 vezes do meio com 2,5N para o meio com ausência de N. A 25°C aumentou 2,6 vezes do meio com 2,5N para o meio com 0,2N e 2,9 vezes do meio com 2,5N para o meio com ausência de N. Vide a tabela 5.5.3 e 5.6.13, **LINOLEI**.

Os resultados apresentados para a composição dos ácidos graxos mostraram que houve uma sensível alteração no perfil dos ácidos graxos apolares presentes na *Spirulina maxima* quando foram alteradas as concentrações de nitrogênio, o que contrariou a observação de Torres (1994), de que “as alterações nas concentrações de nitrogênio não afetaram o perfil dos ácidos graxos da *Spirulina maxima*”.

5.6 – Análises estatísticas.

As análises estatísticas foram feitas para cada variável, as quais foram definidas como a seguir:

5.1.3 – BIOM	biomassa em g.
5.4.1 – PRODM	produtividade máxima em g/l/dia
5.4.2 – PRODT	produtividade total em g/l/dia
5.5.4 – PROT	proteína em %
5.6.5 – LIPT	lipídios totais em %
5.6.6 – AGRAX	ácidos graxos apolares totais %
5.6.7 – GLA	ácido gama-linolênico em %
5.6.8 – PGLA	produtividade do ácido gama-linolênico em %
5.6.9 – PALM	ácido palmítico em %
5.6.10 – PMOLEI	ácido palmitoleico em %
5.6.11 – ESTEAR	ácido oleico em %
5.6.12 – OLEICO	ácido oleico em %
5.6.13 – LINOIEI	ácido linoleico em %

As análises estatísticas, de estimativa não linear com a superfície de resposta, para cada variável estão descritas a seguir para PROT, LIPT, AGRAX, GLA, PGLA, PALM, PMOLEI, ESTEAR, OLEICO, LINOIEI, estas relativas à variação da composição para cada ácido graxo, em função das variações das condições provocadas nos diversos experimentos.

As demais BIOM, PRODM, PRODT, foram descritas anteriormente nos itens relativos à biomassa, produtividade máxima e produtividade total, onde também foi feita análise de estimativa não linear.

As análises de regressão múltipla, com a dispersão dos resultados e gráfico de valores preditos versus observados, estão no apêndice A.1.13 – PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DAS SUPERFÍCIES DE RESPOSTAS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS, de 1 a 13.

A tabela 5.6.1, representa a matriz das variáveis, relativas à composição geral da biomassa, utilizadas nas análises estatísticas, para todos os tratamentos em triplicata.

A tabela 5.6.2 representa a matriz das variáveis, relativas à composição dos ácidos graxos apolares nos ácidos graxos totais, utilizadas nas análises estatísticas, para todos os tratamentos em triplicata. Ambas as tabelas compõem a matriz geral **camelo.sta.** aplicada no programa “Statistica” para o cálculo dos parâmetros estatísticos e modelos das variáveis.

5.6.1 – Matriz da composição geral, utilizada nas análises estatísticas (camelo. sta).

T °C	N g/KNO ₃	rep	BIOM g	PROD M g/l/dia	PRODT g/l/dia	PROT %	PTOT %	AGRAX %
35	2,5	1	4,0600	0,3194	0,2814	68,42	7,95	84,19
35	2,5	2	3,9222	0,3036	0,2596	71,02	8,22	82,66
35	2,5	3	4,1241	0,3069	0,2744	71,81	8,88	80,44
35	0,2	1	2,0621	0,2158	0,136	53,28	22,78	75,99
35	0,2	2	2,0727	0,2453	0,1501	52,46	24,31	81,06
35	0,2	3	1,9452	0,2122	0,1357	44,56	25,04	82,05
35	0	1	3,8847	0,1979	0,0799	44,48	23,26	76,74
35	0	2	3,7833	0,1936	0,0568	49,13	22,69	70,28
35	0	3	4,0597	0,2701	0,0929	48,19	23,52	82,34
25	2,5	1	3,5183	0,23	0,1916	70,74	6,94	80,09
25	2,5	2	3,8371	0,2675	0,245	72,33	6,27	79,44
25	2,5	3	3,7415	0,2481	0,2322	71,19	7,98	75,38
25	0,2	1	1,2436	0,1261	0,0743	41,64	22,88	80,06
25	0,2	2	1,2437	0,127	0,0606	42,92	23,16	75,36
25	0,2	3	1,1905	0,1205	0,054	43,38	21,99	78,89
25	0	1	3,5176	0,2192	0,0806	44,74	22,35	84,83
25	0	2	3,6451	0,3416	0,0532	44,81	21,84	62,65
25	0	3	3,9746	0,2139	0,0333	41,09	20,85	82,66

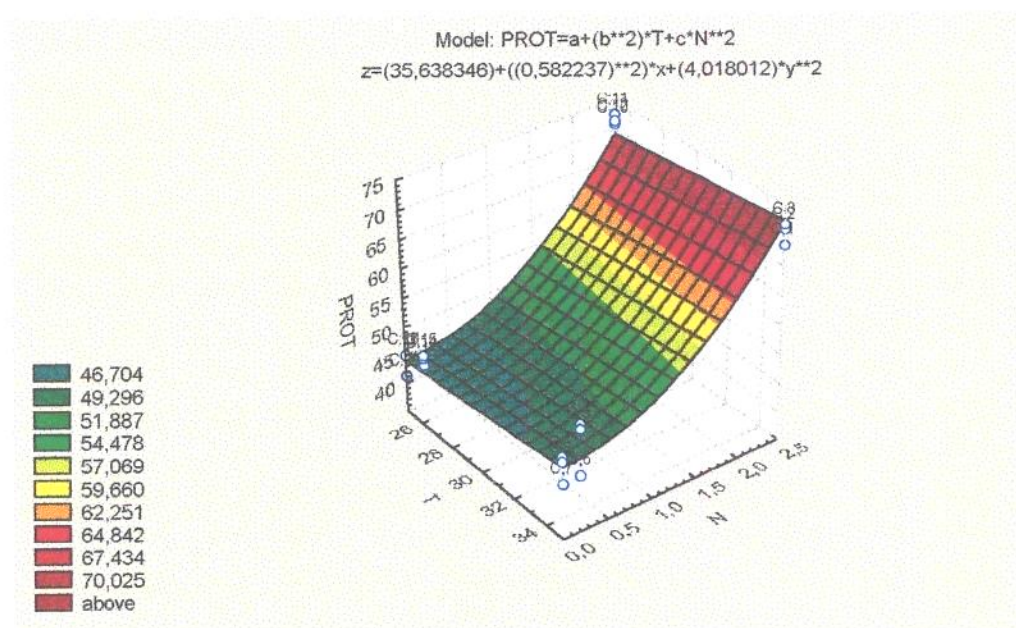
5.6.2 – Matriz da composição dos ácidos graxos, utilizada nas análises estatísticas (camelo.sta).

T °C	N g/IKNO ₃	rep	GLA %	PGLA %	PALM %	PMOLEI %	ESTEAR %	OLEICO %	LINOLEI %	OUTROS %
35	2,5	1	9,37	1,697	57,32	2,13	1,48	10,52	9,67	9,51
35	2,5	2	9,13	1,622	58,37	2,77	1,43	10,37	9,67	8,26
35	2,5	3	12,6	2,475	52,81	2,28	0,99	7,10	10,44	13,78
35	0,2	1	16,72	3,979	43,28	1,04	2,64	12,48	9,14	14,70
35	0,2	2	11,67	3,177	44,52	1,05	3,59	10,51	8,76	19,90
35	0,2	3	12,48	3,255	45,35	1,02	3,38	10,41	9,08	19,22
35	0	1	13,34	6,167	39,54	1,47	1,77	6,67	11,70	25,51
35	0	2	15,03	6,045	40,60	1,58	2,73	7,98	12,87	19,21
35	0	3	14,91	7,815	41,45	1,67	2,57	7,61	12,55	19,24
25	2,5	1	10,63	1,386	47,60	6,52	0,71	9,58	9,68	15,28
25	2,5	2	15,81	2,015	41,97	9,11	0,54	5,67	13,17	13,73
25	2,5	3	11,68	1,753	51,74	8,06	0,65	6,39	10,73	10,75
25	0,2	1	18,63	2,829	40,05	1,74	2,18	5,64	11,32	20,44
25	0,2	2	12,69	1,837	47,21	2,87	2,88	5,43	7,59	21,33
25	0,2	3	13,41	1,847	43,92	1,92	2,28	4,24	8,24	25,99
25	0	1	19,40	8,625	40,14	3,43	0,85	5,71	11,62	18,85
25	0	2	20,96	6,969	40,90	3,14	1,23	3,70	12,94	17,13
25	0	3	13,29	6,091	26,00	1,54	0,67	2,49	8,67	47,34

5.6.4 – Proteínas :

PROT representa a avaliação da produção de proteínas pela *Spirulina maxima*, no final do crescimento, nas condições de cada tratamento, apresentando os seguintes valores comparativos com os parâmetros estatísticos utilizados :

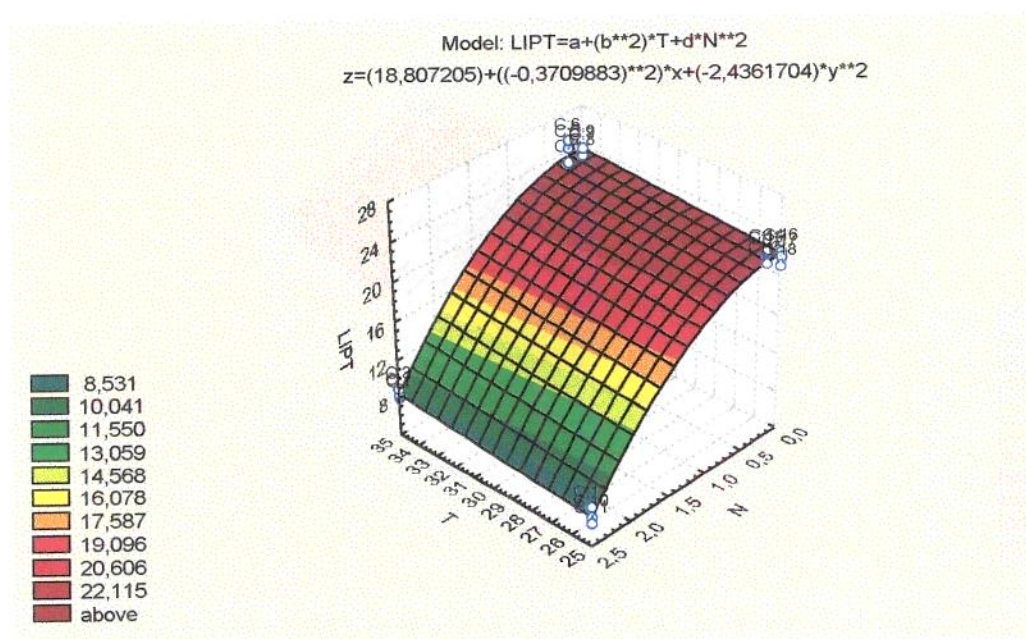
- 1) O Std.Err. apresenta valores de 5,0 a 16,6 vezes menor do que os valores dos parâmetros.
- 2) O teste t (15) mostra para o menor valor $C = 5,086336 > 1,753$ mínimo.
- 3) O valor de p-level maior é de 0,0134% << 5% máximo.
- 4) A matriz de correlação dos parâmetros estimados e análise de resíduos, mostra valor alto somente para B com A, com boa correlação para os demais e pouca dispersão.
- 5) A superfície apresenta bom coeficiente de correlação $R = 0,97505$ e muito boa correspondência com os valores experimentais.
- 6) A função proposta é linear em T, com o quadrado do coeficiente, e quadrática em N.
- 7) Superfície de resposta para proteínas – **PROT**:



5.6.5 – Lipídios totais :

LIPT, representando lipídios totais, foi a variável que avaliou a quantidade de lipídios produzida pela *Spirulina maxima* no final do crescimento, para cada tratamento, apresentando os seguintes valores comparativos com os parâmetros estatísticos utilizados :

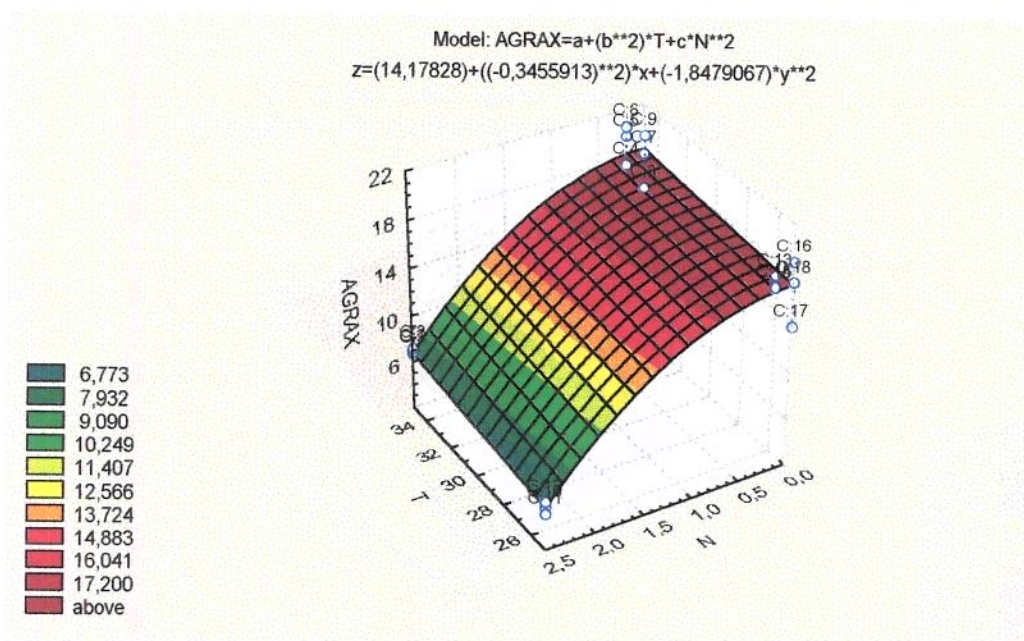
- 1) O Std.Err. mostrou valores de aproximadamente uma ordem de grandeza menores do que os dos parâmetros.
- 2) O teste t (15) mostrou para o menor valor de $B = 7,13447 > 1,753$ mínimo.
- 3) O valor de p-level mostrou não acarretar erro entre os parâmetros, com valor 0 para todos estes, $0 < 5\%$.
- 4) A matriz de correlação dos parâmetros estimados e análise de resíduos mostrou muito pouca dispersão nos resultados, e apenas o valor alto de B com A, tendo boa correlação para os demais.
- 5) A superfície apresentou excelente relação com os valores experimentais, com coeficiente de correlação $R = 0,99459$.
- 6) A função proposta foi linear em T, com o do seu coeficiente e quadrática em N.
- 7) Superfície de resposta para lipídio total – **LIPT**:



5.6.6 – Ácidos graxos :

AGRAX, representando a avaliação da produção dos ácidos graxos apolares totais produzidos, como uma fração do lipídio total, ao final de cada tratamento, apresentando os seguintes valores comparativos com os parâmetros estatísticos utilizados :

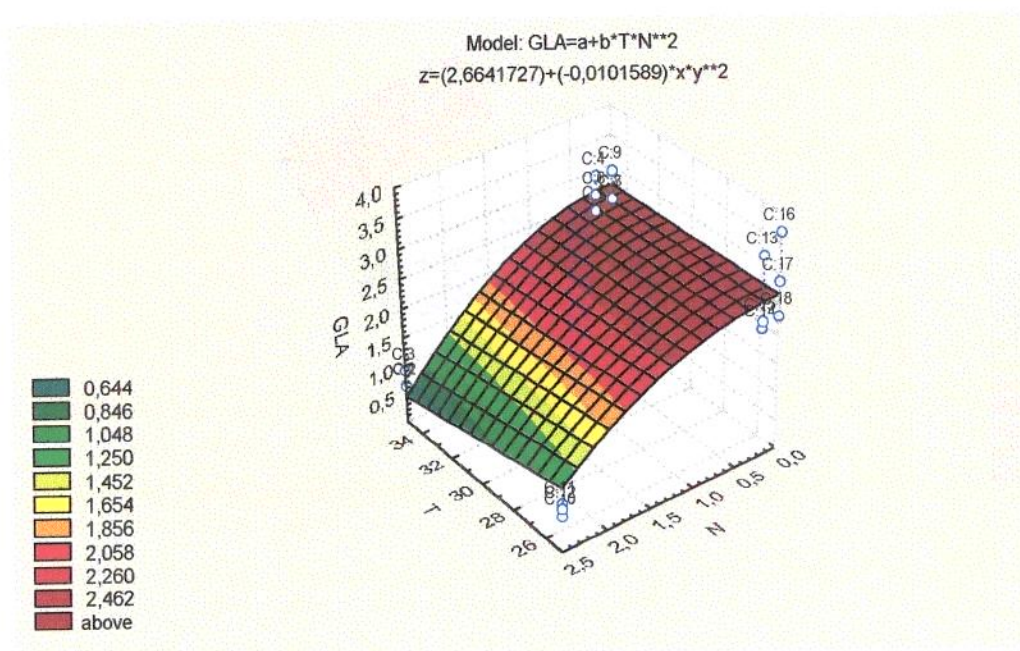
- 1) O Std.Err. apresentou valores de 3 a 14 vezes menores do que os valores dos parâmetros.
- 2) O teste t (15) mostrou valores acima do mínimo, sendo o de pior resultado $B = 3,18940 > 1,753$.
- 3) O valor de p-level para o maior valor de B foi 0,609% << 5% máximo.
- 4) A matriz de correlação dos parâmetros estimados e análise dos resíduos só apresentou valor alto para B com A, com boa correlação para os demais.
- 5) A superfície apresentou boa relação com os valores experimentais, com bom valor para o coeficiente de correlação $R = 0,96576$.
- 6) A função proposta foi linear em T e o quadrado do seu coeficiente, e quadrática em N.
- 7) Superfície de resposta para ácidos graxos – **AGRAX**:



5.6.7 – Ácido gama-linolênico :

GLA, representando o ácido graxo gama-linolênico, foi a variável que avaliou a quantidade de ácido gama-linolênico produzido no final do crescimento, para cada tratamento, apresentando os seguintes valores comparativos com os parâmetros estatísticos utilizados :

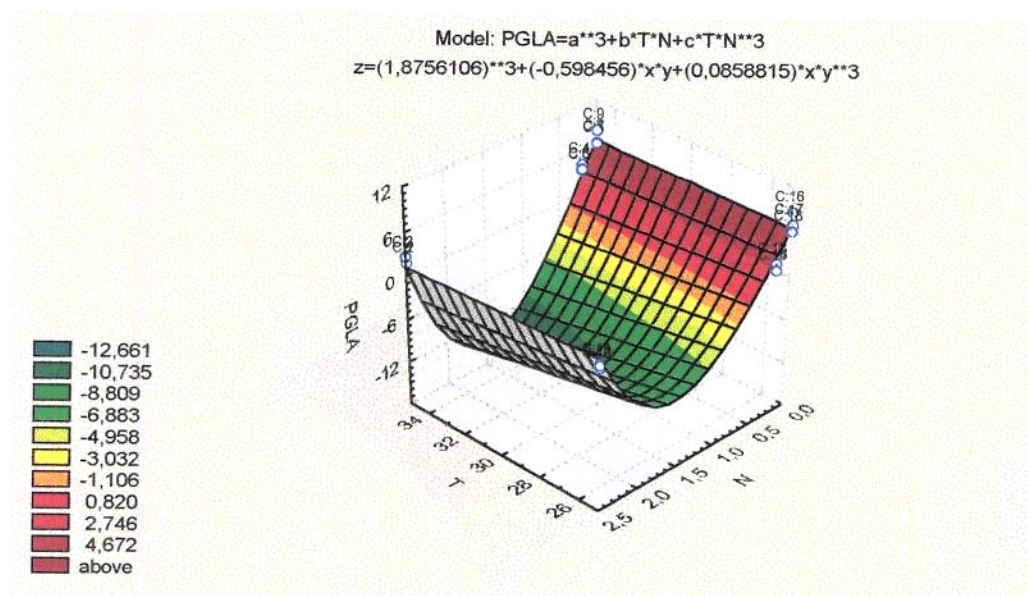
- 1) O Std.Err. apresentou valores de uma ordem de grandeza menores do que os valores dos parâmetros.
- 2) O teste t (16) mostrou valores $\gg 1,746$ mínimo.
- 3) O valor de p-level para todos foi de $0\% \ll 5\%$.
- 4) A matriz de correlação de valores estimados e análise de resíduos apresentou resultado regular para B com A, e pouca dispersão.
- 5) A superfície mostrou uma boa relação para os valores experimentais, embora com valor para o coeficiente de correlação pouco menor do que o desejado, $R = 0,90761$.
- 6) A função proposta foi linear em T e quadrática em N.
- 7) Superfície de resposta para o ácido gama-linolênico – **GLA**:



5.6.8 – Produtividade do ácido gama-linolênico :

PGLA, representando a produtividade total do ácido gama-linolênico, foi a variável que avaliou a produtividade do ácido gama-linolênico no final do crescimento, 15 dias, para cada tratamento, apresentando os seguintes valores comparativos com os parâmetros estatísticos utilizados :

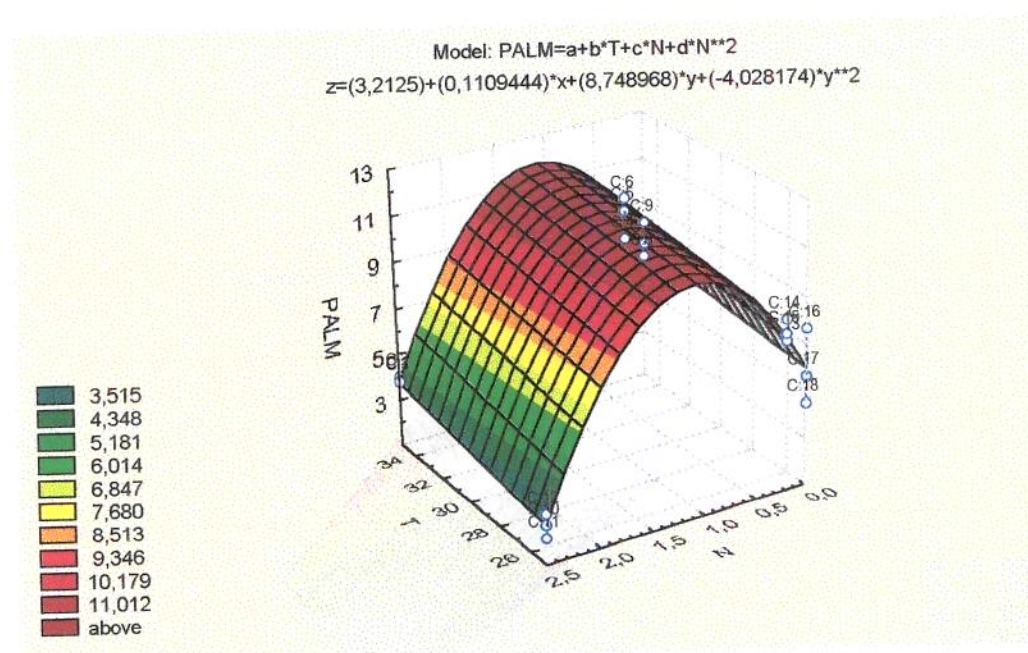
- 1) O Std.Err. apresentou valores 5 a 40 vezes menores do que os parâmetros.
- 2) O teste t (15) apresentou para o menor valor de C $4,894283 > 1,753$ mínimo.
- 3) O valor de p-level maior para C foi de $0,0195\% \ll 5\%$ máximo.
- 4) A matriz de correlação dos valores estimados e análise dos resíduos mostrou dispersão com correlação alta para C com B, e regular para os demais.
- 5) A superfície não mostrou boa relação com os valores experimentais, com valores negativos, prevalecendo os melhores resultados para os parâmetros, com valor abaixo do desejável de $R = 0,87886$.
- 6) A função proposta foi linear em T, com relação cruzada de T com cubo de N, e cubo da constante.
- 7) Superfície de resposta para produtividade do GLA - **PGLA**:



5.6.9 – Ácido palmítico :

PALM, representando a produção do ácido palmítico, foi a variável que avaliou a produção do ácido palmítico ao final do crescimento, para cada tratamento, apresentando os seguintes resultados comparativos com os parâmetros estatísticos utilizados :

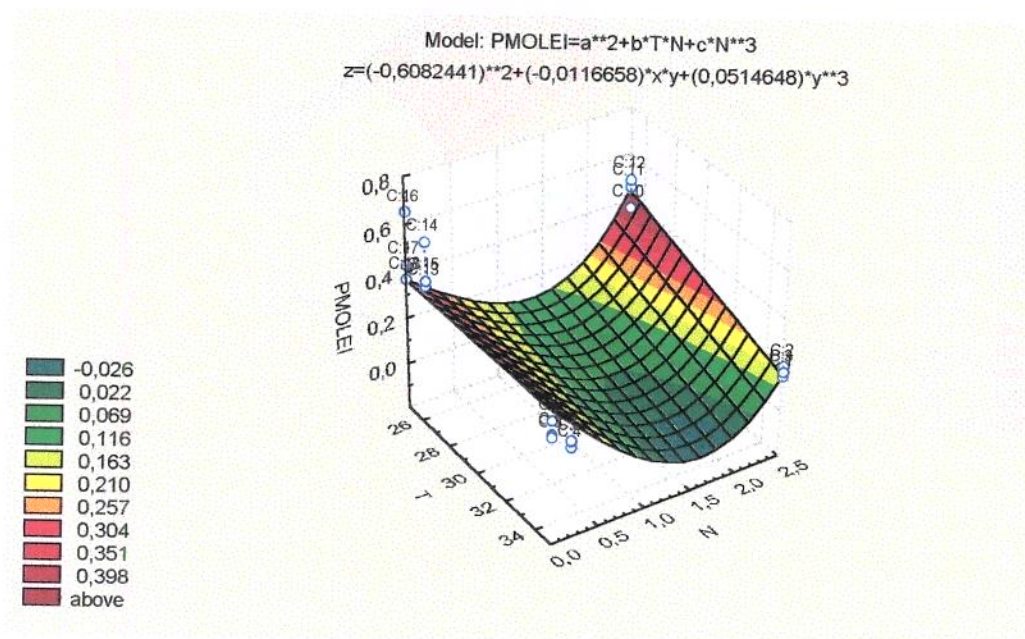
- 1) O Std.Err. apresentou valores de 2,6 a 4 vezes menor do que os parâmetros.
- 2) O teste t (14) para o menor valor foi $A = 2,690451 > 1,761$.
- 3) O valor de p-level para o pior parâmetro, A, foi $1,7582\% < 5\%$ máximo.
- 4) A matriz da correlação dos valores estimados e análise dos resíduos mostrou alguma dispersão, com valor elevado para B com A e C com D.
- 5) A superfície mostrou valores que representam os observados, com bom coeficiente de correlação, $R = 0,94714$.
- 6) A função proposta foi linear em T e em N, quadrática em N.
- 7) Superfície de resposta para o ácido palmítico – **PALM**:



5.6.10 –Ácido palmitoleico :

PMOLEI, representando o ácido palmitoleico, foi a variável que avaliou a produção do ácido palmitoleico no final do crescimento, para cada tratamento, apresentando os seguintes valores comparativos com os parâmetros estatísticos utilizados :

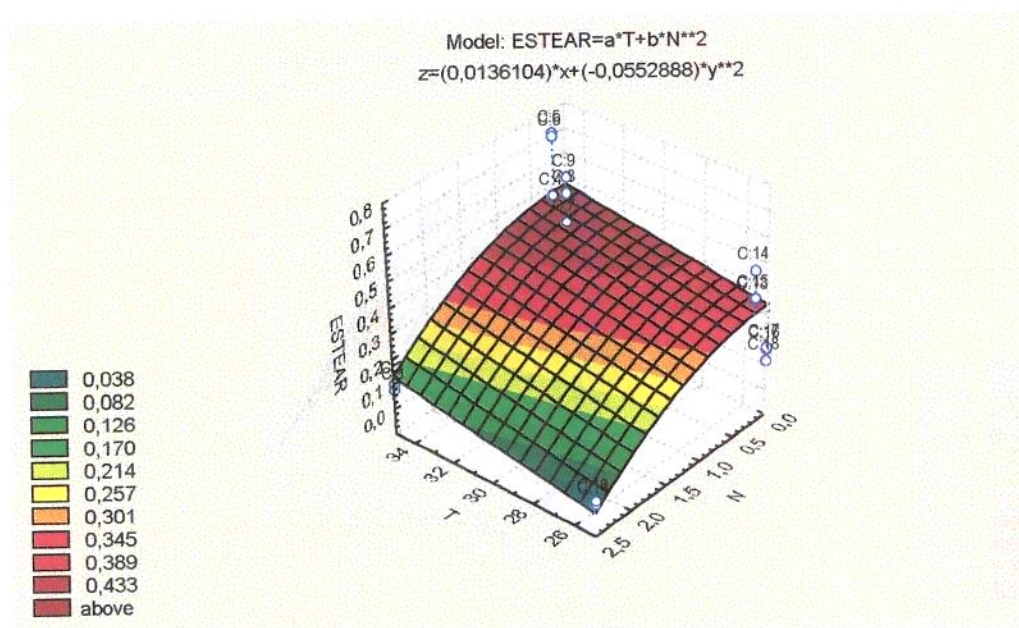
- 1) O Std.Err. apresenta valores para os parâmetros em T e em N, de 3,2 a 3,4 vezes menor, e a constante 22 vezes.
- 2) O teste t (15) mostra para o menor valor $C = 3,215616 > 1,753$ mínimo.
- 3) O valor de p-level maior é de $0,5776\% < 5\%$ máximo.
- 4) A matriz da correlação dos valores estimados e análise dos resíduos apresenta alguma dispersão, com valores altos para C e B.
- 5) A superfície mostra valores representativos dos experimentais, com coeficiente de correlação abaixo do desejado, prevalecendo os parâmetros estimados e a coerência com os valores experimentais, com $R = 0,67106$, a valor mais baixo.
- 6) A função proposta é linear e cruzado com T e N, e cúbica em N.
- 7) Superfície de resposta para o ácido palmitoleico – **PMOLEI**:



5.6.11 – Ácido esteárico :

ESTEAR, representando o ácido eateárico, foi a variável que avaliou a produção do ácido esteárico no final do crescimento, para cada tratamento, com os seguintes valores comparativos com os parâmetros estatísticos utilizados :

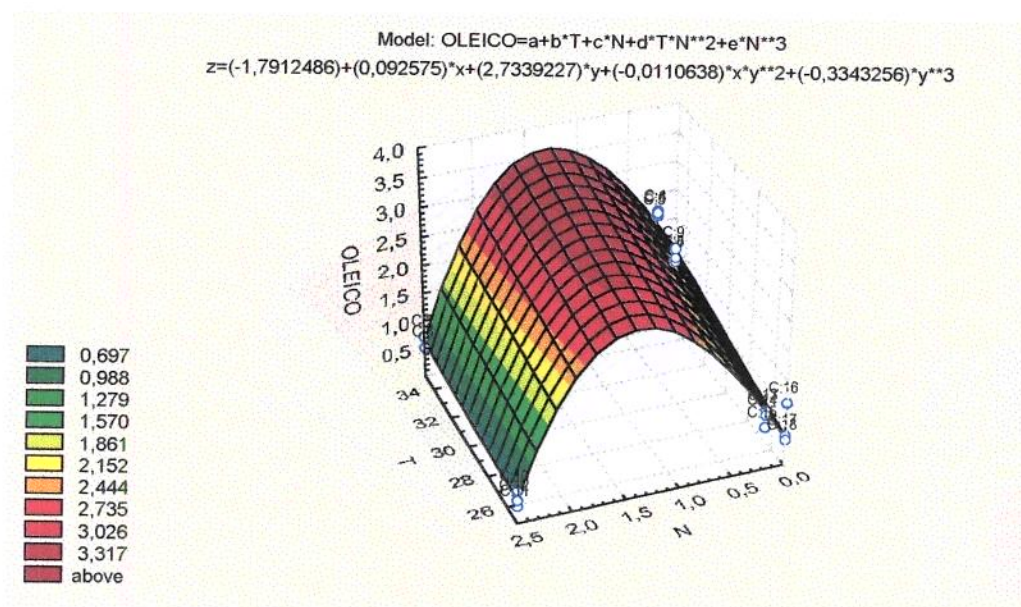
- 1) O Std.Err. mostra valores de 5 a 10 vezes menores do que os parâmetros.
- 2) O teste t (16) mostra para o menor valor $B = 5,17769 > 1,746$ mínimo.
- 3) O valor de p-level para todos os parâmetros é aproximadamente $0 < 5\%$ máximo.
- 4) A matriz de correlação dos valores estimados e análise dos resíduos mostra dispersão e valores médios para A com B.
- 5) A superfície apresenta uma boa representação com os valores experimentais, com valor abaixo do desejável para o coeficiente de correlação $R = 0,81973$.
- 6) A função proposta é linear em T e quadrática em N.
- 7) Superfície de resposta para o ácido esteárico – **ESTEAR**:



5.6.12 – Ácido oleico :

OLEICO, representando o ácido oleico, foi a variável que avaliou a produção do ácido oleico ao final do crescimento, para cada tratamento, com os seguintes valores comparativos com os parâmetros estatísticos utilizados :

- 1) O Std.Err. apresenta valores de 3 a 7 vezes menores do que os parâmetros.
- 2) O teste t (13) mostra para o seu menor valor $C = 3,0872 > 1,771$ mínimo.
- 3) O valor de p-level maior para C, $0,950\% < 5\%$ máximo.
- 4) A matriz de correlação dos valores estimados e análise de resíduos mostra alguma dispersão, com valores altos para B com A e C com E e razoáveis para os demais.
- 5) A superfície apresenta valores bem coerentes com os experimentais, com coeficiente de correlação razoável $R = 0,94525$.
- 6) A função proposta é linear em T e em N, com relação cruzada de T e quadrado de N, e cúbica em N.
- 7) Superfície de resposta para o ácido oleico – **OLEICO**:



6 – CONCLUSÕES

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



6 – CONCLUSÕES:

1 – Destacamos dois aspectos principais no cultivo da *Spirulina* sob condições limitantes em nitrogênio com variação da temperatura, o primeiro a possibilidade da produção de uma biomassa com teores elevados de ácidos graxos, o segundo a possibilidade da extração destes ácidos graxos, de grande interesse econômico.

2 – Para tanto será necessário o conhecimento dos parâmetros cinéticos, para o nosso clima, e da melhor maneira de se diminuir o teor de nitrogênio e a temperatura, visando a otimização da produção destas substâncias, o que foi o objetivo deste trabalho.

3 – Como contribuição inédita do trabalho foi possível mostrar o que acontece quando provocamos estas alterações simultâneas, da temperatura e do nitrogênio, com a composição dos ácidos graxos apolares da *Spirulina*, com modelos matemáticos propostos a partir das análises estatísticas, com superfícies de resposta, realizadas.

4 – Foi observado que houve um aumento substancial dos ácidos graxos da *Spirulina*, de 3,5 vezes a 35°C e de 4,28 vezes a 25°C para o GLA em especial, bem como na sua produtividade, quando se diminuiu o teor do nitrogênio até próximo de zero e a temperatura na faixa estudada. Embora com efeito menos significativo para a diminuição da temperatura, este foi porém efetivo em termos percentuais.

5 – Foi observado também a diminuição do teor de proteínas quando se alteraram as condições de cultivo, confirmando as citações de diversos autores.

6 – Os resultados mostraram possibilidades para o cultivo em maior escala no Brasil, onde as alterações como as estudadas neste trabalho poderão levar à produção de lipídios, e do GLA em particular, em quantidades bem maiores do que as conseguidas em um cultivo tradicional, de uma maneira economicamente viável.

7 – Os resultados mostraram também que houve uma efetiva mudança na composição dos ácidos graxos apolares da *Spirulina* quando se alterou a concentração de nitrogênio simultaneamente com a temperatura, chegando a aumentar em várias vezes o seu conteúdo, porém não proporcionalmente.

8 – Dos seis ácidos graxos estudados, presentes em maior quantidade, somente o ácido palmitoleico aumentou com o abaixamento da temperatura e diminuiu com a diminuição do nitrogênio, ao contrário dos demais que diminuíram com o abaixamento da temperatura e aumentaram com a diminuição do nitrogênio.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AOAC - 14006. – **Official Methods of Analysis**. 14th ed., Association of official analytical chemists. Washington. DC, USA, 1984.
- ANAGA, A.; ABU, G. O. – Labotatory scale cultivation of *Chorella* and *Spirulina* as a source using waste effluent from a Fertilizer Company in Nigeria. **Bioresource Technology**, 58(1): 93-95, 1996.
- ANNAPURNA, V. V.; DESOSTHALE, Y. G.; BAMJI, M. S. – *Spirulina* as a source of vitamin A plant. **Foods for Human Nutrition**, 41(2): 125- 134, 1991.
- AOYAMA, K.; UEMURA, I.; MIYAKE, J. – Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a cyanobacterium, *Spirulina platensis*. **Fermentation Bioeneengineering**, 83(1): 17-20, 1997.
- ATATSUKA, k. – Acute toxicity and general pharmacological studies. **Mein College of Pharmacy**. Japan, 1979.
- AYALA, F.; VARGAS, T. – Experiments on *Spirulina* culture on waste-effluent media and at the pilot plant. In: RAGAN, M.A. & BIRD, C.J. (eds). **Twelfth International Seaweed Symposium**. São Paulo, Brasil. 151/152: 91-93, 1987.
- BAILEY, J. M. – Lipid metabolism in culture cells. In: **Lipid Metabolism in Mammals 2**. (ed. F. Snyder), Plenum Press, New York, p. 352. 1977.
- BAKER, J.J.; ALLEN, G.E. – Fotossíntese. In: KIRCHNER, E. E. (trad.). **Estudo da Biologia**. São Paulo. Ed. Edgard Blücher INL. São Paulo. Brasil, vol.1, pp. 177-208, 1975.
- BALLONI, W.; TOMASELLI, L.; GIOVANNETTI, L. – Biologia Fondamentele del genere *Spirulina*. In: MATERASSI, R. (ed). **Prospective Della Coltura di Spirulina**

- in **Itália**. Consiglio Nazionale Delle Ricerche, Accademia Dei Georgofili. Firenze, 20 - 21 nov., pp. 49-85, 1980.
- BECKER, E. W. – Algal mass cultivation, production, utilization. **Process Biochemistry**, 16(5): 10-14, 1981.
- BECKER, E. W. - Development of *Spirulina* research in a developing country India. In: DOUMENGE, F.; DURAND-CHASTEL, H. & TOULEMON, A. (eds). **Spiruline Algue de Vie. Bulletin de L'Institut Océanographique**, Monaco, N°12, 141-155, 1993.
- BECKER, E. W.; JAKOBER, B.; LUFT, D. – Clinical and biochemical evaluations of the alga *Spirulina* with regard to application in the treatment of obesity. A double-blind cross-over study. **Nutrition Reports International**, 33(4): 565-574, 1986.
- BECKER, E.W.; VENKATARAMAN, L.V. – Biotechnology and exploitation of algae: the Indian approach. Eschborn: **German Agency for Technical Cooperation**, p.215, 1982.
- BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K. – Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. In: Mc Lachlan, J.L. (ed.). **Papers Presented at the Fourteenth Internatinal Seaweed Symposium**, 5(2): 235-241, 1992.
- BENEMANN, J.R. – Microalgae aquaculture feeds. **Applied Phycology**. 4(3): 233-245, 1992.
- BANNON, C. D.; CRASKE, J. D.; HILLIKER, A. E. – Analysis fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. In: Fats with F. A. containing four or more carbon atoms. **J.A.O.C.S.** 62(10): 1501-1507, 1992.
- BARAN, J. S.; LIANG, C. – Antihyper lipidemic fatty acids, **S. African Patent 7604**. 303, july 20, 1977.

- BENSON, A. A.; SHIBUYA, I. – Surfactant lipids. In: Lewin, R. A. Physiology and Biochemistry of algae. Academic Press, N. Y. USA. pp. 371-383, 1962.
- BHATTACHARJEE, J.K. – Microorganisms as potential sources of food. **Advanced Applied Microbiology**, 13: 139-161, 1970.
- BLUM, J.C.; GUILLAUMIN, S.; CALET, C. – Nutritive value of *Spirulina* algae for the layin ghen. **Ann. of Nutrients Alimentations**. French, 29(6): 675-682, 1975.
- BOROWITZKA, M. A. – Algal biotechnology products and processes-matching science and economics. **Applied Phycology**, 4(3): 267-279, 1992.
- BOROWITZKA, M. A. – Large-scale algal culture systems: the next generation. **Australian Biotechnology**, 4(4): 212-215, 1994.
- BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. – **Micro-Algal Biotechnology**. Cambridge University Press, Cambridge, 477 pp, 1988.
- BOURGES, H.; SOTOMAYOR, A.; MENDOZA, E. – Utilization of the alga *Spirulina* as a protein source. **Nutr. Rep. Int.**, july, 4(1): 31-43, 1971.
- BOUSSIBA, S.; RICHMOND, A. – C-phycoerythrin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*. **Archives of Microbiology**, 125(12): 143-147, 1980.
- BRAUN, L. – *Spirulina: Food for the future*. Aquaculture Departments of Agriculture. National Agricultural Library. Information Center. Beltsville, Md.: and US.; p. 5 - 9, 1988.
- BULIK, C.G. – How the *Spirulina*, a blue-green alga, preserves the cell from degeneration, and extends youth and human lifespan. In: DOUMENGE, F.; DURAND-CHASTEL, H.; TOULEMONT, A. (eds). **Spiruline Algue de Vie**. Bulletin de L'Institut Océanographique. Monaco, N° 12, p.121-132, 1993.

- CAMPOS, D.C.P. – Avaliação de um sistema de cultivo de *Spirulina maxima* para propagação industrial e utilização em Aquacultura. **Monografia - UFRRJ**. Seropédica, Rio de Janeiro, 1996.
- CANIZARES-VILLANUEVA, R.O.; DOMINGUEZ, A. R.; CRUZ, M. S. I.; RIOS-LEAL, E – Chemical composition of cyanobacteria grown in diluted aerated swine wastewater. **Bioresource Technology**, 51(2-3): 111-116, 1995.
- CARLOZZI, P.; TORZILLO, G. – Productivity of *Spirulina* in a strongly curved outdoor tubular photobioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 45(½): 18-23, 1996.
- CARTER, J.P. – Gamma-Linolenic acid as a nutrient. **Food Technology**. 42(6): 72-82, 1988.
- CHAMORRO-CEVALLOS, G. (a) – Etude toxicologique de l'algue *Spirulina* plante pilote productrice de protéines (*Spirulina* de Sosa Texcoco, S. A.). Report. **Unido**. 10.387, 1980.
- CHAMORRO-CEVALLOS, G. (b) – Toxicological Research on the alga *Spirulina*. **Unido**. 24. oct., 1980.
- CHANDRA-BABU, S.; RAJASEKARAN, B. – Biotechnology for rural nutrition and economic evaluation of algal protein supplements in south India. **Food Policy**, 16(5): 405-414, 1991.
- CHARENKOVA, H. A.; MIHAILOV, A. A.; PINEVITCH, V. V. – Influence des températures extrêmes sur la croissance de L'algue blue-vert *Spirulina platensis*. (Gom.) Geitler. **C. R. Acad. Bulg. Sci.** 28: 799-802, 1975.
- CHATTOPADHYAY, P.; ROYCHOUDHURY, A.; PAL, R. – Evaluation of algal biomass quality cultivated at rural level by low cost method. **Exp. Biol., Indian**, 34(3): 226-231, 1996.

- CHAUHAN, V.S.; SINGH, G.; RAMAMURTHY, V. – Eucalyptus Kraft black liquor enhances growth and productivity of *Spirulina* in outdoor cultures. **Biotechnology Program**, 11(4): 457-460, 1995.
- CHEN, F.; ZHANG, Y.; GUO, S. – Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. **Biotechnology Letters**, 18(5): 603-608, 1996.
- CIFERRI, O. – *Spirulina*, the edible microorganism (algae, single-cell protein). **Microbiological Review**, 47(4): 551-578, 1983.
- CIFERRI, O.; TIBONI, O. – The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. **Annals Review Microbiology**, 39: 503-526, 1985.
- CLEMENT, G. – Production and characteristic constituents of the algae *Spirulina platensis* and *Spirulina maxima*. **Ann. Nutr. Aliment.**, 29(6): 477-488, 1975.
- COHEN, Z. – Products from microalgae. In: RICHMOND, A., **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Florida, USA: CRC Press, p. 421-454, 1986.
- COHEN, Z.; DIDI, S.; HEIMER, Y.M. – Overproduction of gamma-linolenic acid and eicosapentaenoic acid by algae. **Plant. Physiology**, 98(2): 569-572, 1992.
- COHEN, Z.; NORMAN, H.A.; HEIMER, Y.M. – Potential use of substituted pyridazinones for selecting polyunsaturated fatty acid overproducing cell lines of algae. **Phytochemistry**, 32(2): 259-264, 1993.
- COHEN, Z.; REUNGJITCHACHAWALI, M.; SIANGDUNG, W. – Herbicide-resistant lines of microalgae: Growth and fatty acid composition. **Phytochemistry**, 3(4): 973-978, 1993.
- COHEN, Z.; VONSHAK, A. – Fatty acid composition of *Spirulina* and *Spirulina* like cyanobacteria in Relation to their chemotaxonomy. **Phytochemistry**, 30(1): 205-206, 1991.

- COHEN, Z.; VONSHAK, A.; RICHMOND, A. – Fatty acid composition of *Spirulina* strains grown under various environmental conditions. **Phytochemistry**, 26(8): 2255-2258, 1987.
- CORNET, J.F.; DUSSAP, C.G.; GROS, J.B. – A simplified monodimensional approach for modeling coupling between radiant light transfer and growth kinetics in photobioreactors. **Chemical Engineering Science**, 50(9): 1489-1500, 1995.
- CYSEWSKI, G.R. – Feeds, foods and pigments from *Spirulina*. **Journal of Phycology**, 28(3): 12, 1992.
- DAINIPPON INK. & CHEMICALS INC. – Production of highly purified alcoholophilic phycocyanin. **Japanese Patent**. PR: JP-80 77 890; 1980.
- DE PAUW, N.; PERSOONE, G. – Microalgae in Aquaculture. In: BOROWITZA, M. A.; BOROWITZA, L.J. (eds). **Microalgal Biotechnology**. Cambridge University Press., Cambridge, p.1997-221, 1988.
- DEVI, M.A.; VENKATARAMAN, L.V. – Hypocholesterolemic effect of blue-green algae *Spirulina platensis* in albino rats. **Nutr. Rep. International**, 28: 519-530, 1983.
- COBELAS, M. A.; LECHADO, J. Z. – Lipids in microalgae A. Review 1. **Biochemistry**, Grasas y aceites. 40(2): 118-145, 1989.
- DUBACQ, J.P.; PHAM-QUOC, K. – Biotechnology of *Spirulina* lipids: a source of gamma-linolenic acid. In: DOUMENGE, F.; DURAND-CHASTEL, H.; TOULEMONT, A. (eds). **Spiruline Algue de Vie**. Bulletin de L'Institut Océanographique. Monaco, 1993, N°12, p. 59-64, 1993.
- CRESSWELL, R.C.; REES, T. A. V; SHAN, N. – **Algal and Cyanobacterial Biotechnology**. John Wiley & Sons Inc. NY, 1989.
- DUBINSKY, Z.; AARONSON, S. – Increase of lipid yields from some algae by acid extraction. **Phytochemistry**, 18:51, 1979.

- DUNBAR, L. M.; BAILEY, J. M. – Delections and essential fatty acid metabolism in cultured cells. **J. Bio. Chem.**, 250:1152-1154, 1975.
- EARTHRISSE COMPANY. – Medical research with *Spirulina*. **Earthrise news letter**. San Rafael, USA, 10, 1988.
- FABREGAS, J.; HERRERO, C. – Marine microalgal as a potential source of mineral in fish diets. **Aquaculture**, 51: 237-243, 1986.
- FALANGHE, H. – Produção de Microrganismos. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E. & BORZANI, W. **Tecnologia das fermentações**. Edgard Blücher, São Paulo, Brasil, v.1: 246-285, 1975.
- FEDKOVIC, Y.; ASTRE, C.; PINGUET, F. – *Spiruline* et cancer. In: DOUMENGÉ, F.; DURAND-CHASTEL, H. & TOULEMONT, A. (eds.). ***Spiruline* Algue de Vie**. Bulletin de L'Institut Océanographique. Monaco, 1993, N^o Esp.12, p. 117-120.
- FERRAZ, C. A.; AQUARONE, E.; FLORENZANO, G. – Utilização de sub-produtos da indústria alcooleira na obtenção de biomassa de *Spirulina maxima*. Parte I - Emprego do Anidrido Carbônico. **Revista de Microbiologia**. São Paulo, 16(3): 179-187, 1985.
- FERRAZ, C. A.; AQUARONE, E.; KRAUTER, M. – Utilização de sub-produtos da indústria alcooleira na obtenção de biomassa de *Spirulina maxima*. Parte II - Emprego do Resíduo da Destilação do Mosto Fermentado (vinhaça). **Revista de Microbiologia**, São Paulo. 17(1): 15-21, 1986.
- FILALI, M. R.; CORNET, J. F.; FONTAINE, T. – Production, isolation and preliminary characterization of exopolysaccharide of the Cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Biotechnology Letters**, 15(6): 567-572, 1993.
- FOX, R. D. – *Spirulina*, real aid to development. In: RAGAN, M. A.; BIRD, C. J. (eds). Printed in the Netherlands. **Hydrobiologia. Twelfth International Seaweed Symposium**. São Paulo, Brasil, 151/152: 95-97, 1987.

- FOX, R. D. – Health benefits of *Spirulina* and proposal for a nutrition test on children suffering from Kwashiorkor and Marasmus. In: DOUMENGE, F.; DURAND-CHASTEL, H.; TOULEMONT, A. (eds.). **Spiruline Algue de Vie**. Bulletin de L'Institut Océanographique. Monaco, N° 12, p. 179-186, 1993.
- FORTH, K. – Bioreactor for producing biomass. Australian Patent. **Environment Research**. PN: WO; WO-9621723; 1996.
- FRANKE, H.; SPRINGER, M.; PULZ, O. – Polyunsaturated fatty acids from microalgae. **International Foods Ingredients**. 4: 41-45, 1994.
- GALLEGOS, A. J. – The past, present and future of algae in Mexico. In: DOUMENGE, F.; DURAND-CHASTEL, H.; TOULEMONT, A. (eds.). **Spiruline Algue de Vie**. Bulletin de L'Institut Océanographique. Monaco, N° 12, p. 133-139, 1993.
- GARNIER, f.; THOMAS, J. C. – Light regulation of phycobiliproteins in *Spirulina maxima*. In: DOUMENGE, F.; DURAND-CHASTEL, H.; TOULEMONT, A. (eds.). **Spiruline Algue de Vie**. Bulletin de L'Institut Océanographique. Monaco, N° esp.12, p. 41-48, 1993.
- GOLEBIEWSKA, B.; GRAJEK, W. – Microalgae as a raw material for the food industry. **Przemysl - Spozywczy**, 47(7): 185- 187, 1993.
- HANSEN, M. – La *Spirulina*, un sorprendente suplemento dietético natural. **Edaf Mexicana S/A**. 76 pg., 1984.
- HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. – Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory practice**, London, 22(6): 475-479, 1983.
- HEDENSKOG, G.; EBBINCHAUS, L. – Reduction of the nucleic acid content of single-cell protein concentrates. **Biotechnology and Bioengineering**, 14: 447-457, 1972.
- HILLS, C.; NAKAMURA, H. – **Food from sun light**. World hunger research project. University of the trees press. Kingsport press. USA. 1981.

- HORIKOSHI, T.; NAKAJIMA, A.; SAKAGUCHI, T. – Uptake of Uranium by *Chlorella regularis*. **Agricultural Biological Chemistry**, 43(3): 617-623, 1979.
- HORROBIN, D. F. – Loss of Delta-6-Desaturase activity as key factor in aging. **Medical Hypotheses**, Montreal, Canada, 7: 1211-1220, 1981.
- HORROBIN, D. F. - A biochemical basis for alcoholism and alcohol-induced damage including de fetal alcohol syndrome and cirrhosis. **Med. Hypotheses**, 6: 929-942, 1980.
- HORROBIN, D. F. – A newconcept of lifestyle-related cardiovascular disease: the importance of interactions between cholesterol, essencial fatty acids, prostaglandin, E1 and thromboxane A2. **Med. Hypotheses**, 6: 785-800, 1980.
- HORROBIN, D. F. – Essential fatty acids: A review in clinical uses of essential fatty acids. **Eden press**. London, 1982.
- HORROBIN, D. F. – The regulation of prostaglandin biosynthesis: Negative feed back mechanisms and the selective control of formation of 1 and 2 series prostaglandins: relevance to inflamation and immunity. **Med. Hypotheses**, 6: 687-709, 1980.
- HORROBIN, D. F. – The reversibility of cancer. The relevance of cyclic amp, calcium, essential fatty acids and protaglandin e 1. **Med Hypotheses**, 6: 469-486, 1980.
- HORROBIN, D. F.; CAMPBELL, A. – Stogren's syndrome and the sicca syndrome: the role of prostaglandins e 1 deficiency. Treatment with essencial fatty acids and vitamin C. **Med. Hypotheses**, 6: 225-232, 1980.
- HORROBIN, D. F.; HUANG, Y.S. – Schizophrenia the role of abnormal essential fatty acids and prostaglandin metabolism. **Medical Hypotheses**, Montreal, Canada, 10: 329-336; 1983.
- HUANG, Y. S.; MANKU, M. S. – Triacyhglicerol composition of evening primrose oil. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 60: 748-763, 1983.

- HUDSON, B.J.F.; KARIS, I.G. – The lipids of the alga *Spirulina*. **Science Food Agriculture**, 25(7): 759-763, 1974.
- HUNTLEY, M. E.; NILER, P. P.; REDALJE, D. – Controlling growth of microorganisms in partly filled bioreactor. USA patent. **Aquasearch**. San Diego, CA, USA. PN: WO; WO-9603494, 1996.
- HU-Q; GUTERMAN, H.; RICHMOND, A. – A flat inclined modular photobioreactor for outdoor mass cultivation of photoautotrophs. **Biotechnology Bioengineering**, 51(1): 51-60, 1996.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL) – **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. vol.1, 3ª ed. São Paulo, Brasil, 1985.
- INSTITUTE FRANÇAIS DU PETROLE. – **A new type of food algae**. 14.237 A: 1-9, 1967.
- IWAMOTO, H.; YONEKAWA, G.; ASAI, T. – Fat synthesis in unicellular algae. I – culture conditions for fat accumulation in *Chlorella* cells. **Bull. Agric. Chem. Soc. JPN.**, 19: 240-252, 1955.
- KAY, R. A. – Microalgae as food and supplement. **Critical reviews, in food. Sci. and Nutrit.** 30 (6): 555-573, 1991.
- KENYON, C. N.; STANIER, R. Y. – Possible evolution significance of polyunsaturated fatty acids in blue-green algae. **Nature**, (London), 227: 1164-1166, 1970.
- KERNOFF, P. B. A.; WILLIS, A. L.; STONE, K. J. – Antithrombotic potential of dihomono- γ -linolenic acid in man. **British Medical Journal**. 2: 1441-1444, 1977.
- LAWS, E. A.; TAGUSHI, S.; HIRATA, J. – High algal production rates achieved in a shallow outdoor flume. **Biotechnology and bioengineering**. 28: 191-197, 1986.
- LEMOINE, Y.; DANG, D.K.; PHAN, P. A. – Influence of salinity on the growth rates and on pigment and protein contents of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis*. In:

- DOUMENGE, F.; DURAND-CHASTEL, H.; TOULEMONT, A. (eds.). *Spiruline Algue de Vie*. Bulletin de L'Institut Océanographique. Monaco, N° 12, p.77-87, 1993.
- LEWIN, R. A. – Phycotechnology : yesterday, today and tomorrow (may be I). **Third International Symposium on Marine Biogeographic and Evolution in the Pacific**. 47(1): 256-257, 1990.
- LINCOLN, E. P; CRAWFORD, J. J. W.; WILKIE, A. C. – *Spirulina* in animal agriculture. In: DOUMENGE, F.; DURAND-CHASTEL, H.; TOULEMONT, A. (eds.): *Spiruline algae de vie*. Bulletin de L'Institut Oceanographique. Monaco, (12): 109-115, 1993.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. – Microbial evolution, systematics, and taxonomy. In: SIMON & SCHUSTER (eds). **Biology of Microorganisms**. Prentice - Hall. New Jersey 8th Edition, p.606-634, 1997.
- MAHAJAN, G.; KAMAT, M. – Gamma-Linolenic acid production from *Spirulina platensis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, 43(3): 466-469, 1995.
- MANABE, E.; HIRANO, M.; TAKANO, H. – Influence of ammonium chloride on growth and fatty acid production by *Spirulina platensis*. **Applied Biochemical Biotechnology**. 34/35: 273-281, 1992.
- MARQUEZ, F. J., SASAKI, K.; NISSHO, N. – Inibitory effect of oxygen accumulation on the growth of *Spirulina platensis*. **Biotechnology Letters**, 17(2): 225-228, 1995.
- MATSUNAGA, T. – Phycocyanin production method. **Japan Patent PN: JP; JP-07046993**; 1995.
- MENDES, L. B. B. – Biossíntese de produtos de química fina: ácido gama-linolênico a partir da microalga *Spirulina maxima*. **Dissertação de Tese de Mestrado**. Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 1992.

- METZER, P.; DESCOULS, N.; CASADO, N. – Microalgal as a source of triglicerides. **Comm. Eur. Communities**. p. 339, 1983.
- MAHAJAN, G.; KAMAT, M. Gamma-linolenic acid production from *Spirulina platensis*. **Appl. microbiol. Biotechnol.** 43: 466-469, 1995.
- MONTEIRO, M. P. C. – Característica do crescimento de *Spirulina maxima* em diferentes temperaturas e em alguns sistemas de cultivo. **Tese de mestrado**, apresentada no FPRJ, setembro , 1998.
- NAKAYA, N. Effect of *Spirulina* on reduction of serums Cholesterol. **Progress in Medicine**, Tokyo, Univ. Japan, p. 6-11, 1986.
- NAKAYA, N.; HOMMA, Y.; GOTO, Y. – Cholesterol lowering effect of *Spirulina*. **Nutrition Reports Intern.**, 37(6): 1329- 1337, 1988.
- NICHOLS, B. W.; WOOD, B. T. B. – The occurrence and biosynthesis of gamma-linolenic acid in blue-green alg. *Spirulina platensis*. **Lipids**, 3: 46, 1968.
- OESTERDAHL, B. G.; JOHANSSON, E. – Vitamin B₁₂ in algae and fermented foods. **Var. Foeda**, 41(1/2): 37-42, 1989.
- OGAWA, T.; TERVI, G. – Studies on the growth of *Spirulina platensis*. I - On the pure culture of *Spirulina platensis*. **J. Ferment. Technol.**, 48: 361-367, 1970.
- OGAWA, T.; TERVI, G. – Growth kinetics of *Spirulina platensis* in autotrophic and mixotrophic cultures. p. 543-549. In: Terui, G. (ed). **Fermentation Technology Today**. Society of Fermentation Tecnology, Tokyo, 1972.
- OLAIZOLA, M.; DUERR, E. O. – Effects of light intensity and quality on growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. **Applied Phycology**. 2(2): 97-104, 1990.
- PANTASTICO, J. B.; BALDIA, S. F.; BALDIA, J. P. – Efficiency of some cyanophytes as larval feed for silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and the culture of

- Spirulina platensis*. In: MACLEAN, L.; DIZON, L. B. HOSILLOS, L. V. (eds.). **The First Asian Fisheries Forum**. Asian Fisheries Society Manila, Philippines, p. 609-614, 1986.
- PASCAUD, M. – The essential polyunsaturated fatty acids of *Spirulina* and our immune response. In: DOUMENGE, F.; DURAND-CHASTEL, H.; TOULEMONT, A. (eds). **Spiruline Algue de Vie**. Bulletin de L'Institut Océanographique. Monaco, N° 12, 49-57, 1993.
- PAOLETTI, C.; PUSHPARAJ, B.; TOMASELLI, F. L. – Ricerche sulla nutrizione minerale di *Spirulina platensis*. **Atti XVII Congr. Naz. Soc. It. Microbiol.**, Padova, 26-28 ott., vol 2, p. 845-853, 1975.
- PAOLETTI, C.; VICENZINI, M.; BOCCI, F. – Composizione biochimica generale delle biomasse di *Spirulina platensis* e *Spirulina maxima*. In: MATERASSI, R. (ed). **Prospettive della Ricerche**. Accademia Dei Georgofili. Firenze, 20-21 nov., 111-125, 1980.
- QUILLET, M. – Studies on the glucide substances enhanced by (the algae) *Spirulina* (nutritive value). **Ann. Nutr. Aliment.**, 29(6): 553-561, 1975.
- REID, G. W.; ASSENZO, J. R. – **Culture and harvest of attached algae grown on domestic sewage. Part I**. Walter Sewage. 6: 248-265, 1961.
- RICHMOND, A. – Cell response to environmental factors. In: **Handbook of Microalgal Mass Culture**. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, p. 69-99, 1986.
- RICHMOND, A. – *Spirulina*. In: Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (eds). **Microalgal Biotechnology**. Cambridge University Press, Cambridge, New York, p. 85-121, 1988.
- RICHMOND, A.; VONSHAK, A. – *Spirulina* culture in Israel. **Archieve of Hydrobiology Beihong**, 11: 274-280, 1978.

- RICHMOND, A.; VONSHAK, A.; ARAD, S. M. – Environmental limitation in outdoor production algal biomass. In: **Algae Biomass**. G. Shelef & C. J. Soeder (eds), Amsterdam, Elsevier/North Holland. Biomedical Press. p. 65-72, 1980.
- RICHMOND, A.; BECKER, W. – Technological aspects of mass cultivation -A general outline. In: **Handbook of Microalgal Mass Culture**. Ed. Richmond.. Boca Raton. CRC. Press, Fl. USA, pp.245-263, 1986.
- RICHMOND, A.; LICHTENBERG, E.; STAHL, B. – Quantitative assessment of the major limitations on productivity of *Spirulina platensis* in open raceways. **Applied Phycology**. 2(3): 195-206, 1990.
- RICHMOND, A.; BOUSSIBA, S.; VONSHAK, A. – A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors. **Applied Phycology**, 5: 327-332, 1993.
- ROSEMBERG, J. A. – Potencial das Algas. Possibilidades de *Scenedesmus quadriculata* isolada no Rio de Janeiro. **Tese para concurso de professor titular**, Departamento de Engenharia Bioquímica, UFRJ, 1976.
- RUIZ, R. L.; MÓS, E. N. – Produção de biomassa de *Spirulina maxima* para alimentação humana e animal. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, 21(1): 85-97, 1990.
- SANDAU, E.; SANDAU, P.; PULZ, O. – Heavy metal sorption by microalgae. **Acta Biotechnology**, 16(4): 227-235, 1996.
- SESHADRI, C. V.; UMESH, B. V.; MANOHARAN, R. – Beta-carotene studies in *Spirulina*. **Bioresource Technology**. 38 (2-3): 111-113, 1991.
- SHIFRIN, I. S.; CHISHOLM, S. W. – Phytoplankton lipids : Inespecific differences and effects of nitrate, silicate and light dark cycles. **T. Phycology**. 17: 374-384, 1981.
- SINGH, G.; CHAUHAN, V. S.; RAMAMURTHY, V. – Kraft black liquor for improving the productivity of *Spirulina* biomass. **Biotechnology Letters**, 17(7): 771-776, 1995.

- SOEDER, C. J.; SUBARDJA, M. – On the suitability of microscopic algae as food supplement. **Dechema-Monographien**. Germany, 70: 55-70, 1972.
- SPACEK, F.; CECHOVSKY, J.; JURCOVA, Z. – The use of algal for feeding chickens. **Acta Univ. Fac. Agronom.**, 16(3): 391-369, 1968.
- SPOEHR, H. A.; MILNER, H. W. – The chemical composition of *Chlorella*. Effect of environmental conditons. **Plant Physiology**. 24: 120-149, 1949.
- TADROS, M.; SMITH, W.; JOSEPH, B – Yield and quality of cyanobacteria: *Spirulina maxima* in continuous culture in response to light intensity. **Applied Biochemical Biotechnology**, 39-40: 337-347, 1993.
- TADROS, M.; SMITH, W.; JOSEPH, B - Yield and quality of cyanobacteria *Spirulina maxima* in continuous culture in response to sodium chloride. **Applied Biochemical Biotechnology**, 51-52: 275-281, 1995.
- TAMIYA, H. – Mass culture of algae. **Annals Revisions of Plant Physiology**, 8: 309-334, 1957.
- TANTICHAROEN, M.; BUNNAG, B.; VONSHAK, A. – Cultivation of *Spirulina* using secondary treated starch waste-water australas. **Biotechnology**, 3(4): 223-226, 1993.
- TANTICHAROEN, M.; REUNGJITCHACHAWALI, M.; BOONAG, B. – Optimization of gamma-linolenic acid (GLA) production in *Spirulina platensis*. **Applied Phycology**, 6(3): 295-300, 1994.
- TEDESCO, M.A.; DUERR, E.O. – Light, temperature and nitrogen starvation effects on the total lipid and fatty acid content and composition of *Spirulina platensis* UTEX 1928. **Applied Phycology**, 1(3): 201-209, 1989.
- THOMPSON, G. A. – Plant lipids of taxonomic significance. In: BEL, E. A.; CHARLWOOD, B. V. **Encyclopedia of Plant Physiology**, New Series. Berlim. Springer Verlag, 8: 353-535, 1980.

- TOMASELLI, L. – Biotecnologie per la riproduzione di *Spirulina*, monografia n° 17. **Consiglio Nazionale delle Ricerche. IPRA - Roma, 1987.**
- TOMASELLI, L.; GIOVANNETTI, L.; SACCHI, A. – Effects of temperature on growth and biochemical composition in *Spirulina platensis* strain M₂. In: STADLER, T. & KARAMANOS, Y. (eds). **Algal Biotechnology**. SAA-4 Meet. 15 -17 Sept., 305-314, 1987.
- TOMASELLI, L.; TORZILLO, G.; GIOVANNETTI, L. – Recent research on *Spirulina* in Italy. In: RAGAN, M. A. & BIRD, C. J. (ed.). Printed in the Netherlands. **Twelfth International Seaweed Symposium**. São Paulo, Brasil, v.151/152, p. 79-82, 1987.
- TOMASELLI, L.; GIOVANNETTI, L.; TORZILLO, G. – Physiology of stress response in *Spirulina* spp. In: DOUMENGE, F.; DURAND- CHASTEL, H. & TOULEMONT, A. (eds). **Spiruline Algue de Vie**. Bulletin de L'Institut Océanographique, Monaco, N° 12, p. 65-75. 1993,
- TORRES, C. G. – Influência da Concentração de Nitrogênio na produção de lipídios e ácido gama-linolênico em *Spirulina maxima*. **Tese de Mestrado, do Curso de Pós-Graduação em Ciência de Tecnologia de Alimentos, UFRRJ, 1994.**
- TORZILLO, G.; SACCHI, A.; MATERASSI, R. – Temperature as an important factor affecting productivity and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors. **Bioresource Technology**, 38(2-3): 95-100, 1991.
- TOZILLO, G.; CARLOZZI, P.; PUSHPARAJ, B. – A two-plane tubular photobioreactor for outdoor culture of *Spirulina*. **Biotechnology and bioengineering**. 42(7): 888-891, 1993.
- TRIANI, L. – Comunicação, **II Curso Internacional de Biotecnologia de Cultivo de Ostras do Rio de Janeiro – FIPERJ, 1997.**
- TREDICI, M. R.; CHINIZITELLI, G.; BIAGLIONI, S. – Novel photobioreactors for the mass cultivation of *Spirulina* spp. In: DOUMENGE, F.; DURAND-CHASTEL, H.;

- TOULEMONT, A. (eds). *Spiruline Algue de Vie. Bulletin de L'Institut Océanographique*. Monaco, N° esp. 12: 89-96, 1993.
- VANDAMME, E. J. – Production of vitamins and related biofactors by microorganisms. *Agro-Food Industry High-Technology*, 4(5): 29-31, 1993.
- VONSHAK, A. – Laboratory Techniques for the cultivation of microalgae. In: Richmond, A. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC. Press, p. 117-145, 1980.
- VONSHAK, A. – Mass production of *Spirulina* an overview. In: TOMASELLI, L. *Biotechnologie per la Produzione di Spirulina*. C.N.R. Monografia n° 17 - IPRA - ROMA, p. 9-14, 1987.
- VONSHAK, A. – Recent advances in microalgal biotechnology. *Biotechnology Advances*, 8(4): 709-727, 1990.
- VONSHAK, A.; ABELIOVICH, A.; BOUSSIBA, S. – Production of *Spirulin* biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass*, 2(3): 175-185, 1982.
- VONSHAK, A.; ABELIOVICH, A.; BOUSSIBA, S. – Production of *Spirulin* biomass: maintenance of monoalgal culture outdoors. *Biotechnology and Bioengineering*, 25(2): 341-349, 1983.
- VONSHAK, A.; ABELIOVICH, A.; GUY, M. – The response of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* to salt stress. *Archives Microbiology*, 150(5): 417-420, 1988.
- VONSHAK, A.; RICHMOND, A. – Mass production of the blue-green alga *Spirulina* an overview. *Biomass*, 15(4): 233-247, 1988.
- WATANABE, Y.; De-La NOUE, J.; HALL, D. O. – Photosynthetic performance of a helical tubular photobioreactor incorporating the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biotechnology Bioengineering*, 47(2): 261-269, 1995.

- WOLF, R. B.; KLEIMAN, R.; ENAGLND, R.E. – New Sources of gamma-linolenic acids. **Am. Oil Chem. Soc.**, 60(14): 1859, 1983.
- WILLIAMS, J. – Additive containing arachidonic acid or gamma-linolenic acid for food or cosmetics. **German Patent**. 2, 352, 797, oct. 3, 1973.
- ZAROUK, C. – Contribution A L'etude D'une cyanophyceae. (Influence de divers facteurs physiques el chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima* (Setch et Gardna) Geitler. **PHD Thesis**, University of Paris, France, 1966.
- ZHUKOVA, T.; KLAYCHKO; GURVICH, T. L.; VLADIMIROVA, M. T.; KYCANOSOVA, T. A. – Comparative characteristics of the growth and direstion of biosynthesis of various strains of *Chlorella* under conditions of nitrogen starvation. II formation of carbohydrates and lipids. **Sov. Plant. physiology** (Engz. Transl. Fiziol. Rast.). 16: 96-101, 1969.

APÊNDICE

A.1.1 - Crescimento a 35°C (2,5 g/l KNO₃)

Peso seco (g/l) / (3 l)					
t(dias)	dorna 1	dorna 2	dorna 3	média	d.padrão
0	0,0687	0,0687	0,0794	0,0741	0,0076
1	0,2282	0,2282	0,2282	0,2282	0,0000
2	0,4726	0,4195	0,4301	0,4407	0,0281
3	0,8234	0,8447	0,7171	0,7951	0,0684
4	1,2911	1,2698	1,2061	1,2557	0,0442
5	1,5887	1,5887	1,5462	1,5745	0,0245
6	1,7375	1,6737	1,8013	1,7375	0,0638
7	2,2052	2,0564	1,9926	2,0847	0,1091
8	2,3753	2,2902	2,2265	2,2973	0,0747
9	2,6091	2,5666	2,5241	2,5666	0,0425
10	3,0555	2,8855	3,0768	3,0059	0,1048
11	3,7783	3,4595	3,5976	3,6118	0,1599
12	3,9909	3,7783	3,6720	3,8137	0,1624
13	4,2035	3,9909	3,7783	3,9909	0,2126
14	4,2035	3,9105	4,0972	4,0704	0,1483
15	4,2035	3,9909	4,2035	4,1326	0,1227

A.1.2 - Crescimento a 35°C (0,2 g/l KNO₃)

Peso seco (g/l) / (3 l)					
t(dias)	dorna 1	dorna 2	dorna 3	media	d. pad.
0	0,1100	0,1000	0,1100	0,1100	0,0000
1	0,1600	0,1500	0,1600	0,1600	0,0000
2	0,3100	0,3200	0,3100	0,3100	0,0000
3	0,5000	0,5000	0,4600	0,4800	0,0283
4	0,7300	0,8000	0,6900	0,7100	0,0283
5	0,9900	1,0500	0,9300	0,9600	0,0424
6	1,4400	1,4400	1,3400	1,3900	0,0707
7	1,6000	1,7200	1,6800	1,6400	0,0566
8	1,8400	2,0400	1,8600	1,8500	0,0141
9	2,2200	2,3400	2,1600	2,1900	0,0424
10	2,5000	2,5400	2,3000	2,4000	0,1414
11	2,6800	2,7200	2,4000	2,5400	0,1980
12	3,0000	3,2400	2,8800	2,9400	0,0849
13	3,2000	3,4000	3,0000	3,1000	0,1414
14	3,6000	4,0000	3,4000	3,5000	0,1414
15	3,8000	4,0000	3,5000	3,6500	0,2121

A.1.3 - Crescimento a 35°C (0,0 g/l KNO₃)

Peso seco (g/l) / (3 l)					
t(dias)	dorna 1	dorna 2	dorna 3	media	d.pad.
0	3,3532	0,1500	0,1700	1,7616	2,2509
1	3,5019	3,6720	3,5658	3,5339	0,0452
2	3,8846	3,8846	3,7571	3,8209	0,0902
3	3,8846	3,9909	3,9378	3,9112	0,0376
4	4,0972	4,0972	4,0441	4,0707	0,0375
5	4,3098	4,3098	4,0760	4,1929	0,1653
6	4,3098	4,4161	4,3098	4,3098	0,0000
7	4,6818	4,7350	4,6287	4,6553	0,0375
8	4,9901	5,0538	5,0007	4,9954	0,0075
9	5,1070	5,1601	5,0007	5,0539	0,0752
10	5,0538	4,9476	4,8944	4,9741	0,1127
11	5,0007	4,8944	4,9476	4,9742	0,0375
12	4,9794	4,8944	4,9476	4,9635	0,0225
13	4,8413	4,7350	4,7350	4,7882	0,0752
14	4,7350	4,6288	4,4161	4,5756	0,2255
15	4,5224	4,2035	4,4692	4,4958	0,0376

A.1.4 - Crescimento a 25°C (2,5 g/l KNO₃)

peso seco (g/l) / (3 l)					
t (dias)	dorna 1	dorna 2	dorna 3	mêdia	d. padrão
0	0,0900	0,0794	0,0794	0,0847	0,0075
1	0,1325	0,1325	0,1431	0,1378	0,0075
2	0,2388	0,2494	0,2494	0,2441	0,0075
3	0,4089	0,4195	0,4089	0,4089	0,0000
4	0,6959	0,8447	0,6959	0,6959	0,0000
5	0,9935	1,0147	0,9935	0,9935	0,0000
6	1,2273	1,3336	1,2273	1,2273	0,0000
7	1,6100	1,8438	1,6524	1,6312	0,0300
8	1,9714	2,1202	2,0564	2,0139	0,0601
9	2,1202	2,3115	2,1202	2,1202	0,0000
10	2,4816	2,4816	2,4603	2,4710	0,0151
11	2,5879	2,8855	2,5879	2,5879	0,0000
12	2,8004	3,0130	2,9493	2,8749	0,1053
13	3,0981	3,3532	3,2256	3,1619	0,0902
14	3,3106	3,7358	3,3947	3,3527	0,0595
15	3,6083	3,9165	3,8209	3,7146	0,1503

A.1.5 - Crescimento a 25°C (2,5 g/l KNO₃)

peso seco (g/l) / (3 l)					
t (dias)	dorna 1	dorna 2	dorna 3	mêdia	d. padrão
0	0,1006	0,1112	0,1325	0,1166	0,0226
1	0,1644	0,1750	0,1750	0,1697	0,0075
2	0,2388	0,2919	0,3026	0,2707	0,0451
3	0,4195	0,5045	0,4833	0,4514	0,0451
4	0,5896	0,6002	0,5789	0,5843	0,0076
5	0,6852	0,7171	0,7596	0,7224	0,0526
6	0,8659	0,9616	0,9191	0,8925	0,0376
7	1,0254	1,0679	1,0573	1,0414	0,0226
8	1,1104	1,1742	1,0998	1,1051	0,0075
9	1,1742	1,1954	1,1423	1,1583	0,0226
10	1,2273	1,1848	1,1635	1,1954	0,0451
11	1,2592	1,1635	1,2061	1,2327	0,0375
12	1,3017	1,2486	1,2486	1,2752	0,0375
13	1,3442	1,2805	1,2805	1,3124	0,0450
14	1,3655	1,3230	1,3017	1,3336	0,0451
15	1,3442	1,3549	1,3230	1,3336	0,0150

A.1.6 - Crescimento a 25°C (0,0 g/l KNO₃)

Peso seco (g/l) / (3 l)					
t (dias)	dorna 1	dorna 2	dorna 3	mêdia	d.padrão
0	3,1406	3,4595	3,7783	3,4595	0,4509
1	3,4595	3,7996	4,1078	3,7837	0,4584
2	3,3851	4,0972	4,0972	3,7412	0,5035
3	3,6720	4,2567	4,0122	3,8421	0,2406
4	3,8953	4,7137	4,2885	4,0919	0,2780
5	3,9059	4,4692	4,1822	4,0441	0,1954
6	4,5224	4,6074	4,5862	4,5543	0,0451
7	4,0547	4,6818	4,7350	4,3949	0,4810
8	4,5224	4,8625	4,8200	4,6712	0,2104
9	4,6287	4,8413	4,8413	4,7350	0,1503
10	4,7137	4,7350	4,6606	4,6872	0,0375
11	4,6925	4,6818	4,5862	4,6394	0,0752
12	4,5436	4,5011	4,5224	4,5330	0,0150
13	4,4799	4,4161	4,3629	4,4214	0,0827
14	4,2673	4,1929	4,2035	4,2354	0,0451
15	4,0972	4,0653	4,1504	4,1238	0,0376

A.1.7 - pH a 35°C (2,5 g/l KNO₃)

pH					
t (dias)	dorna 1	dorna 2	dorna 3	média	d.padrão
1	9,8000	9,8000	9,8100	9,8033	0,0058
2	9,9000	9,8900	9,9000	9,8967	0,0058
3	10,0300	10,0300	10,0200	10,0267	0,0058
4	10,0900	10,0700	10,0700	10,0767	0,0115
5	10,2100	10,1900	10,2100	10,2033	0,0115
6	10,3000	10,3000	10,3000	10,3000	0,0000
7	10,4000	10,2800	10,3700	10,3500	0,0624
8	10,5000	10,4600	10,4600	10,4733	0,0231
9	10,6500	10,6000	10,6000	10,6167	0,0289
10	10,7900	10,7300	10,7100	10,7433	0,0416
11	10,9100	10,8400	10,8500	10,8667	0,0379
12	10,8500	10,7500	10,7600	10,7867	0,0551
13	10,9500	10,8500	10,8900	10,8967	0,0503
14	11,1900	11,0900	11,1200	11,1333	0,0513
15	11,3400	11,2700	11,2700	11,2933	0,0404

A.1.8 - pH a 35°C (0,2 g/l KNO₃)

pH					
t(dias)	dorna 1	dorna 2	dorna 3	media	d. pad.
0	9,5900	9,6000	9,6000	9,5950	0,0071
1	9,7100	9,7300	9,7400	9,7250	0,0212
2	9,9000	9,9100	9,9000	9,9000	0,0000
3	9,9800	10,0000	9,9700	9,9750	0,0071
4	10,0100	10,0400	9,9900	10,0000	0,0141
5	10,0800	10,1000	10,0300	10,0550	0,0354
6	10,1300	10,1300	10,1300	10,1300	0,0000
7	10,2900	10,3500	10,2900	10,2900	0,0000
8	10,3700	10,4400	10,3500	10,3600	0,0141
9	10,4700	10,5600	10,4500	10,4600	0,0141
10	10,5800	10,7000	10,5600	10,5700	0,0141
11	10,7100	10,8500	10,6800	10,6950	0,0212
12	10,8100	11,0600	10,7400	10,7750	0,0495
13	10,7200	10,9900	10,6500	10,6850	0,0495
14	10,9000	11,2800	10,8000	10,8500	0,0707
15	11,1400	11,7000	11,0000	11,0700	0,0990

A.1.9 - pH a 35°C (0,0 g/l KNO₃)

pH					
t(dias)	dorna 1	dorna 2	dorna 3	media	d.pad.
0	9,8300	9,8500	9,8000	9,8150	0,0212
1	9,8300	9,8600	9,8000	9,8150	0,0212
2	9,8200	9,8900	9,9200	9,8700	0,0707
3	10,0200	10,0600	9,9700	9,9950	0,0354
4	10,1500	10,1300	10,1000	10,1250	0,0354
5	10,1800	10,1500	10,1800	10,1800	0,0000
6	10,2000	10,2000	10,2000	10,2000	0,0000
7	10,2500	10,3200	10,2700	10,2600	0,0141
8	10,2900	10,4800	10,3000	10,2950	0,0071
9	10,3500	10,6000	10,3600	10,3550	0,0071
10	10,4000	10,6500	10,4200	10,4100	0,0141
11	10,5800	10,6800	10,5500	10,5650	0,0212
12	10,7000	10,7500	10,6500	10,6750	0,0354
13	10,9000	10,9500	10,8600	10,8800	0,0283
14	11,0000	11,1000	10,9800	10,9900	0,0141
15	11,1000	11,1000	11,0500	11,0750	0,0354

A.1.10 - pH a 25°C (2,5 g/l KNO₃)

pH					
t(dias)	dorna 1	dorna 2	dorna 3	media	d. pad.
0	9,5900	9,6000	9,6000	9,5950	0,0071
1	9,7100	9,7100	9,7400	9,7250	0,0212
2	9,9000	9,9000	9,9000	9,9000	0,0000
3	9,9800	9,9800	9,9800	9,9800	0,0000
4	10,0100	10,0100	9,9900	10,0000	0,0141
5	10,0800	10,0500	10,0300	10,0550	0,0354
6	10,1300	10,1000	10,1300	10,1300	0,0000
7	10,2900	10,3000	10,2900	10,2900	0,0000
8	10,3700	10,3500	10,3500	10,3600	0,0141
9	10,4700	10,4500	10,4500	10,4600	0,0141
10	10,5800	10,5200	10,5600	10,5700	0,0141
11	10,7100	10,7000	10,6800	10,6950	0,0212
12	10,8100	10,7800	10,7400	10,7750	0,0495
13	10,7200	10,6500	10,6500	10,6850	0,0495
14	10,9000	10,9000	10,8000	10,8500	0,0707
15	11,1400	11,0600	11,0000	11,0700	0,0990

A.1.11 - pH a 25°C (0,2 g/l KNO₃)

pH					
t(dias)	dorna 1	dorna 2	dorna 3	media	d. pad.
0	9,8800	9,8700	9,8700	9,8750	0,0071
1	9,8900	9,8900	9,8800	9,8850	0,0071
2	9,8500	9,8900	9,8900	9,8700	0,0283
3	9,8900	9,8900	9,8900	9,8900	0,0000
	9,9000	9,9300	9,9300	9,9150	0,0212
5	9,9400	9,9600	9,9700	9,9550	0,0212
6	10,0000	10,0400	10,0400	10,0200	0,0283
7	10,1400	10,1400	10,1300	10,1350	0,0071
8	10,2100	10,2700	10,2300	10,2200	0,0141
9	10,2800	10,2800	10,2900	10,2850	0,0071
10	10,2900	10,3000	10,2900	10,2900	0,0000
11	10,3000	10,3000	10,3000	10,3000	0,0000
12	10,4100	10,4000	10,4200	10,4150	0,0071
13	10,5000	10,6100	10,6200	10,5600	0,0849
14	10,6900	10,6500	10,6800	10,6850	0,0071
15	10,8000	10,8300	10,8200	10,8100	0,0141

A.1.12 - pH a 25°C (0,0 g/l KNO₃)

pH					
t(dias)	dorna 1	dorna 2	dorna 3	media	d. pad.
0	9,8600	9,8600	9,9200	9,8900	0,0424
1	9,8900	9,8900	9,9100	9,9000	0,0141
2	9,9700	9,9600	9,9400	9,9550	0,0212
3	10,0500	10,0700	10,0600	10,0550	0,0071
4	10,1100	10,1500	10,1100	10,1100	0,0000
5	10,2000	10,2100	10,1600	10,1800	0,0283
6	10,2600	10,2700	10,2100	10,2350	0,0354
7	10,3300	10,3700	10,3100	10,3200	0,0141
8	10,3300	10,3700	10,3300	10,3300	0,0000
9	10,4000	10,4600	10,3700	10,3850	0,0212
10	10,7600	10,8600	10,7700	10,7650	0,0071
11	10,8900	10,9000	10,9000	10,8950	0,0071
12	10,9000	10,8900	10,8900	10,8950	0,0071
13	10,9500	10,9200	10,9200	10,9350	0,0212
14	10,9800	10,9500	10,9000	10,9400	0,0566
15	10,9800	10,9700	10,9500	10,9650	0,0212

A.1.13 – PARÂMETROS ESTATÍSTICOS DAS SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS:

1 – BIOM (superfície de resposta para biomassa) :

Model: **BIOM** =a+b*T+c*N+d*N**2 (camelo.sta)

Dep. var: **BIOM** Loss: (OBS-PRED)**2

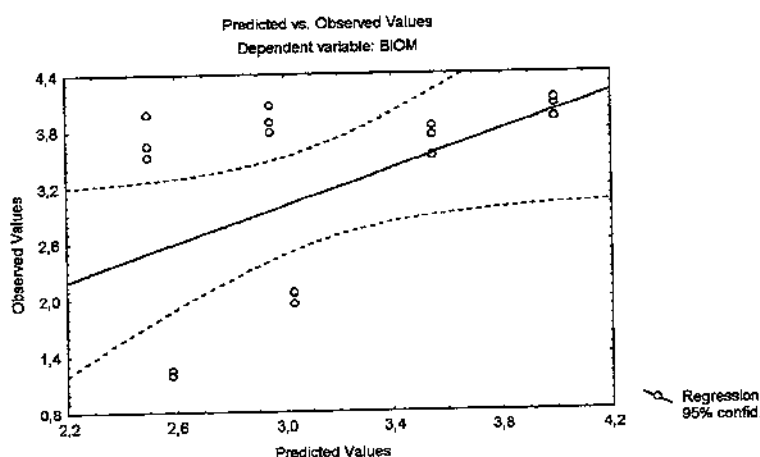
Final loss: 0,537240498 R=0,98714 Variance explained: 97,444%

	A	B	C	D
Estimate	2,477033	,044462	-11,8748	4,75892
Std.Err.	,288348	,009235	,6127	,23665
t(14)	8,590441	4,814787	-19,3807	20,10978
p-level	,000001	,000275	,0000	,00000

1.1 – Dispersão dos resultados para BIOM :

Correlation Matrix of Parameter Estimates (camelo.sta)

	A	B	C	D
A	1,000000	-,960769	-,195484	,187457
B	-,960769	1,000000	-,000000	,000000
C	-,195484	-,000000	1,000000	-,997791
D	,187457	,000000	-,997791	1,000000



2 – PRODM (superfície de resposta para a produtividade máxima) :

Model: $\text{PRODM} = a**2 + (b**2)*T + c*N + (d**2)*N**2$ (camelo.sta)

Dep. var: PRODM Loss: $(\text{OBS}-\text{PRED})**2$

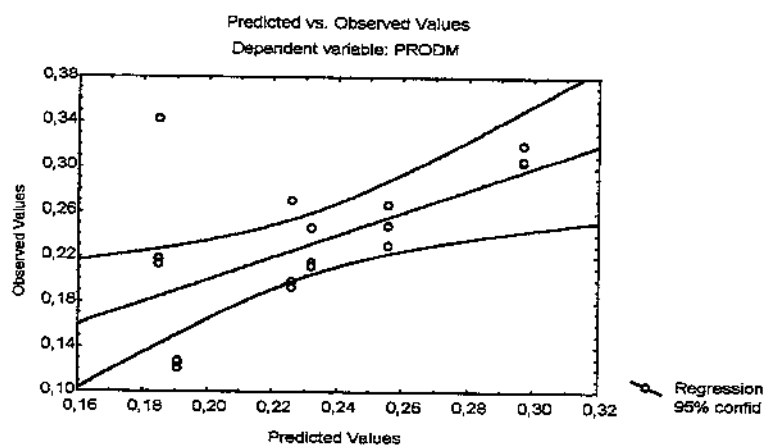
Final loss: ,030779783 R=,75654 Variance explained: 57,235

	A	B	C	D
Estimate	-,34029	-,06419	-,35419	-,38478
Std.Err.	,09428	,01612	,11405	,05714
t(14)	-3,60939	-3,98144	-3,10556	-6,73427
p-level	,00284	,00136	,00775	,00001

2.1 – Dispersão dos resultados para PRODM :

Correlation Matrix of Parameter Estimates (camelo.sta)

	A	B	C	D
A	1,000000	-,963074	,157012	,146617
B	-,963074	1,000000	,010453	,009761
C	,157012	,010453	1,000000	,996349
D	,146617	,009761	,996349	1,000000



3 – PRODT (superfície de resposta para a produtividade total) :

Model: **PRODT** = $a \cdot T + b \cdot N^{**2}$ (camelo.sta)

Dep. var: **PRODT** Loss: (OBS-PRED)**2

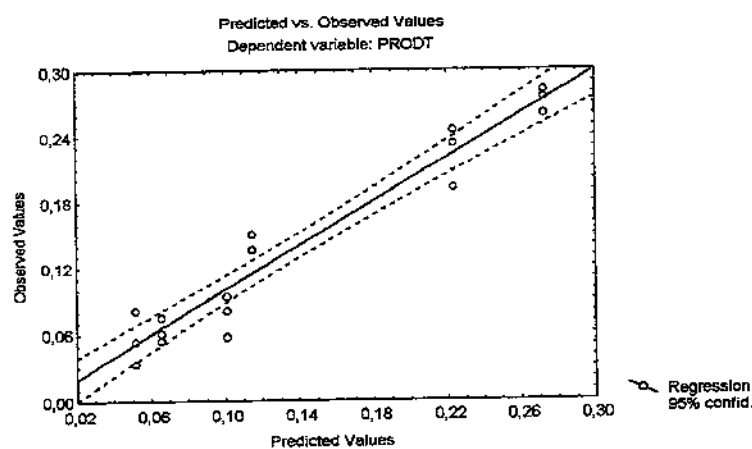
Final loss: ,011950088 R=,95215 Variance explained: 90,658%

	A	B
Estimate	,00286	,02585
Std.Err.	,00026	,00218
t(16)	11,08162	11,86491
p-level	,00000	,00000

3.1 – Dispersão dos resultados para PRODT :

Correlation Matrix of Parameter Estimates (camelo.sta)

	A	B
A	1,000000	-,573128
B	-,573128	1,000000



4 – PROT (superfície de resposta para proteínas) :

Model: **PROT** = $a + (b^{**2}) \cdot T + c \cdot N^{**2}$ (camelo.sta)

Dep. var: **PROT** Loss: (OBS-PRED)**2

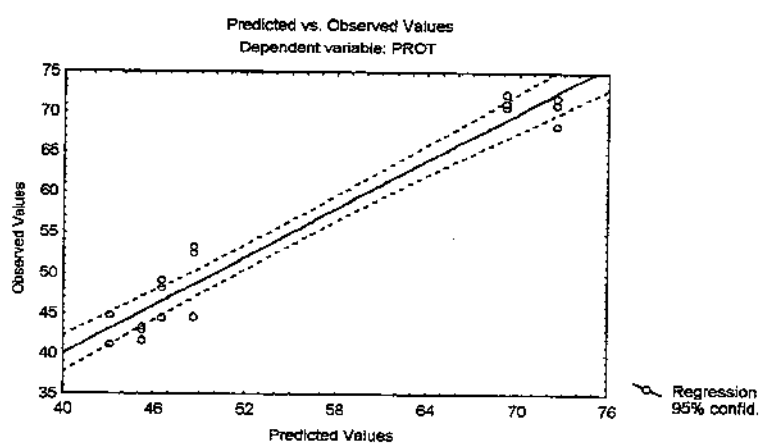
Final loss: 132,61040803 R=,97505 Variance explained: 95,072%

	A	B	C
Estimate	35,63835	,582237	4,01801
Std.Err.	4,09336	,114471	,23863
t(15)	8,70638	5,086336	16,83809
p-level	,00000	,000134	,00000

4.1 – Dispersão dos resultados para PROT :

Correlation Matrix of Parameter Estimates (camelo.sta)

	A	B	C
A	1,000000	-,977624	-,122227
B	-,977624	1,000000	,000000
C	-,122227	,000000	1,000000



5 – LIPT (superfície de resposta para lipídios totais) :

Model: $LIPT = a + (b^{**2}) * T + d * N^{**2}$ (camelo.sta)

Dep. var: LIPT Loss: (OBS-PRED)**2

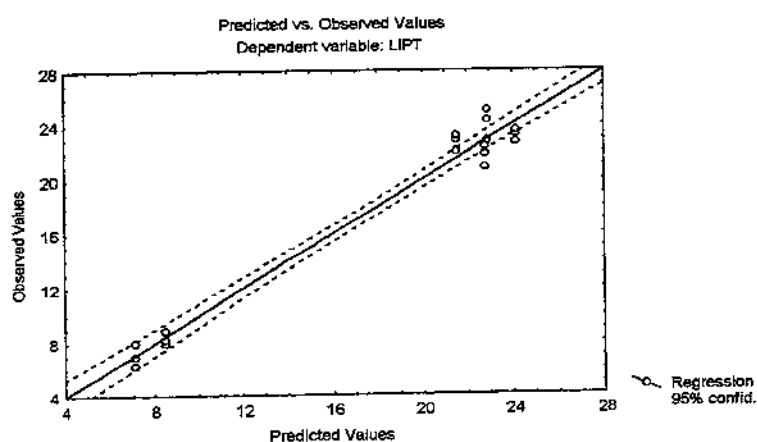
Final loss: 10,140144125 R=,99459 Variance explained: 98,921%

	A	B	D
Estimate	18,80721	-,37099	-2,4362
Std.Err.	1,18178	,05200	,0660
t(15)	15,91432	-7,13447	-36,9195
p-level	,00000	,00000	,0000

5.1 – Dispersão dos resultados para LIPT :

Correlation Matrix of Parameter Estimates (camelo.sta)

	A	B	D
A	1,000000	,979492	-,117070
B	,979492	1,000000	-,000000
D	-,117070	-,000000	1,000000



6 – AGRAX (superfície de resposta para ácidos graxos totais) :

Model: $AGRAX = a + (b \cdot T) + c \cdot N^2$ (camelo.sta)

Dep. var: AGRAX Loss: $(OBS - PRED)^2$

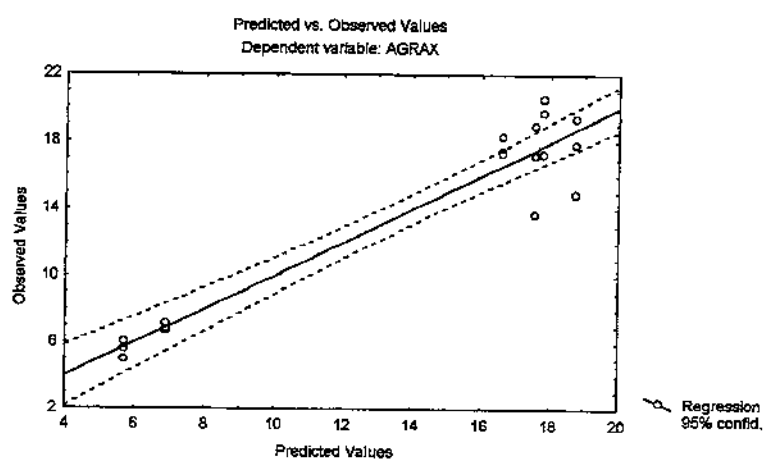
Final loss: 38,727101716 R=,96576 Variance explained: 93,268%

	A	B	C
Estimate	14,17828	-,34559	-1,8479
Std.Err.	2,29483	,10836	,1290
t(15)	6,17835	-3,18940	-14,3299
p-level	,00002	,00609	,0000

6.1 – Dispersão dos resultados para AGRAX :

Correlation matrix of Parameter Estimates (camelo.sta)

	A	B	C
A	1,000000	,979225	-,117819
B	,979225	1,000000	-,000000
C	-,117819	-,000000	1,000000



7 – GLA (superfície de resposta para o ácido gama-linolênico) :

Model: $GLA = a + b \cdot T \cdot N^{**2}$ (camelo.sta)

Dep. var: GLA Loss: (OBS-PRED)**2

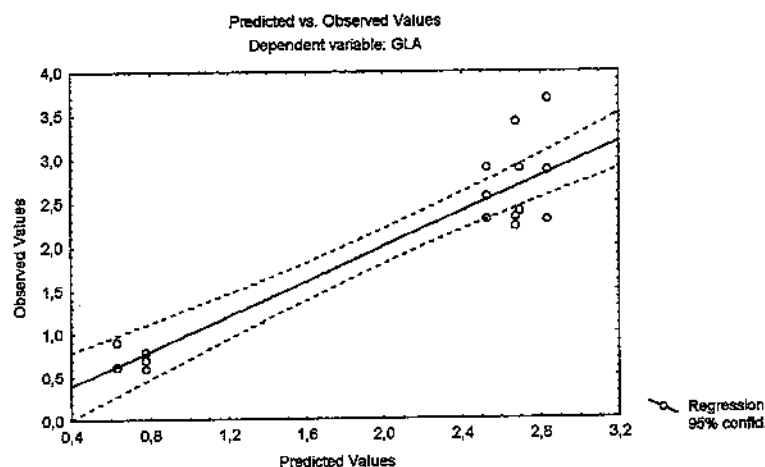
Final loss: 3,212286507 R=,90761 Variance explained: 82,376%

	A	B
Estimate	2,66417	-,01016
Std.Err.	,12888	,00117
t(16)	20,67200	-8,65100
p-level	,00000	,00000

7.1 – Dispersão dos resultados para GLA :

Correlation Matrix of Parameter Estimates (camelo.sta)

	A	B
A	1,000000	-,573128
B	-,573128	1,000000



8 – PGLA (superfície de resposta para produtividade do ácido gama-linolênico) :

Model: $PGLA = a**3 + b*T*N + c*T*N**3$ (camelo.sta)

Dep. var: PGLA Loss: (OBS-PRED)**2

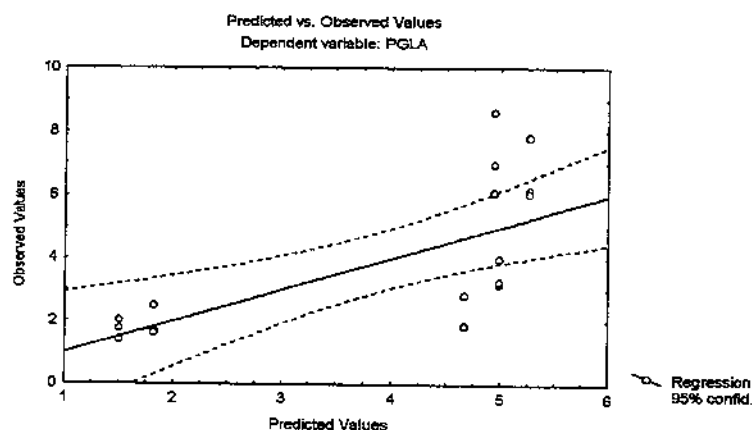
Final loss: 22,467681061 R=,87886 Variance explained: 77,239%

	A	B	C
Estimate	1,87561	-,59846	,085881
Std.Err.	,04514	,11363	,017547
t(15)	41,55175	-5,26662	4,894283
p-level	,00000	,00009	,000195

8.1 – Dispersão dos resultados para PGLA :

Correlation Matrix of Parameter Estimates (camelo.sta)

	A	B	C
A	1,000000	-,686086	,654333
B	-,686086	1,000000	-,997355
C	,654333	-,997355	1,000000



9 – PALM (superfície de resposta para o ácido palmítico) :

Model: **PALM** = $a + b \cdot T + c \cdot N + d \cdot N^2$ (camelo.sta)

Dep. var: **PALM** Loss: (OBS-PRED)**2

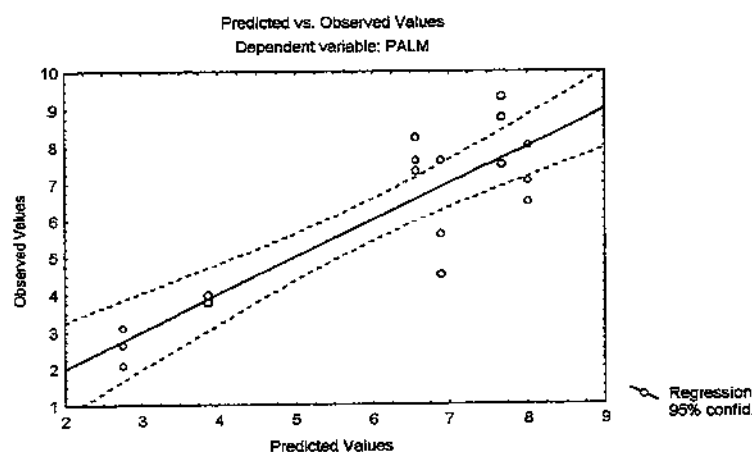
Final loss: 9,212385778 R=,94714 Variance explained: 89,707%

	A	B	C	D
Estimate	3,212500	,110944	8,748968	-4,02817
Std.Err.	1,194038	,038240	2,537221	,97995
t(14)	2,690451	2,901281	3,448248	-4,11060
p-level	,017582	,011613	,003918	,00106

9.1 – Dispersão dos resultados para PALM :

Correlation Matrix of Parameter Estimates (camelo.sta)

	A	B	C	D
A	1,000000	-,960769	-,195484	,187457
B	-,960769	1,000000	,000000	-,000000
C	-,195484	,000000	1,000000	-,997791
D	,187457	-,000000	-,997791	1,000000



10 – PMOLEI (superfície de resposta para o ácido palmitoleico) :

Model: $PMOLEI = a**2 + b*T*N + c*N**3$ (camelo.sta)

Dep. var: PMOLEI Loss: $(OBS - PRED)**2$

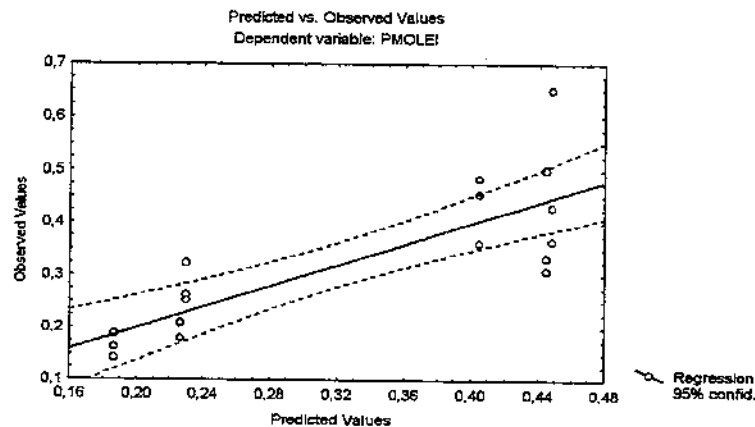
Final loss: ,180794408 R=,67106 Variance explained: 45,032..

	A	B	C
Estimate	-,6082	-,01167	,051465
Std.Err.	,0273	,00339	,016005
t(15)	-22,3150	-3,44432	3,215616
p-level	,0000	,00361	,005776

10.1 – Dispersão dos resultados para PMOLEI :

Correlation Matrix of Parameter Estimates (camelo.sta)

	A	B	C
A	1,000000	,302811	-,174842
B	,302811	1,000000	-,975637
C	-,174842	-,975637	1,000000



11 – ESTEAR (superfície de resposta para o ácido esteárico) :

Model: **ESTEAR** = $a \cdot T + b \cdot N^{**2}$ (camelo.sta)

Dep. var: **ESTEAR** Loss: (OBS-PRED)**2

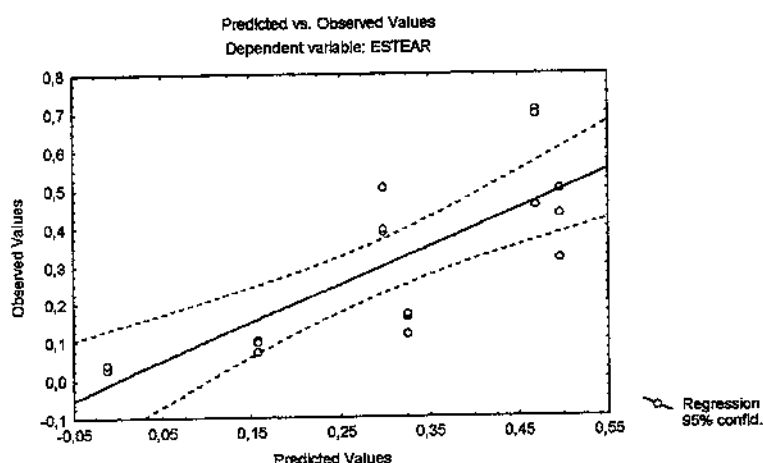
Final loss: ,287153063 R=,81973 Variance explained: 67,196

	A	B
Estimate	,01361	-,05529
Std.Err.	,00127	,01068
t(16)	10,74266	-5,17769
p-level	,00000	,00009

11.1 – Dispersão dos resultados para ESTEAR :

Correlation Matrix of Parameter Estimates (camelo.sta)

	A	B
A	1,000000	-,573128
B	-,573128	1,000000



12 – OLEICO (superfície de resposta para o ácido oleico) :

Model: **OLEICO** = $a + b \cdot T + c \cdot T \cdot N^{**2} + d \cdot N + e \cdot N^{**3}$ (camelo.sta)

Dep. var: **OLEICO** Loss: (OBS-PRED)**2

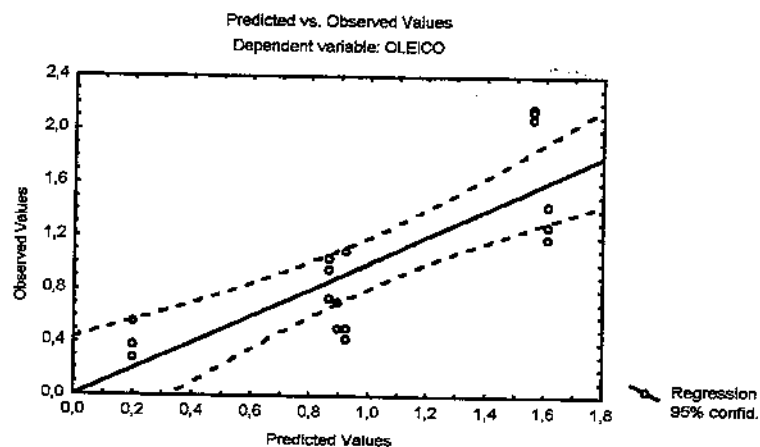
Final loss: ,668900671 R=,94525 Variance explained: 89,350%

	A	B	C	D	E
Estimate	-1,79125	,092575	-,01106	2,733923	-,33433
Std.Err.	,40488	,013138	,00364	,659174	,10926
t(13)	-4,42410	7,046133	-3,03872	4,147495	-3,06001
p-level	,00069	,000009	,00950	,001147	,00912

12.1 – Dispersão dos resultados para OLEICO :

Correlation Matrix of Parameter Estimates (camelo.sta)

	A	B	C	D	E
A	1,000000	-,973493	-,178968	,565632	-,065839
B	-,973493	1,000000	,017830	-,581033	,215142
C	-,178968	,017830	1,000000	-,030686	-,914743
D	,565632	-,581033	-,030686	1,000000	-,370275
E	-,065839	,215142	-,914743	-,370275	1,000000



13 – LINOLEI (superfície de resposts para o ácido linoleico) :

Model: $LINOLEI = a**2 + (b**2)*T + c*N**2$ (camelo.sta)

Dep. var: LINOLEI Loss: (OBS-PRED)**2

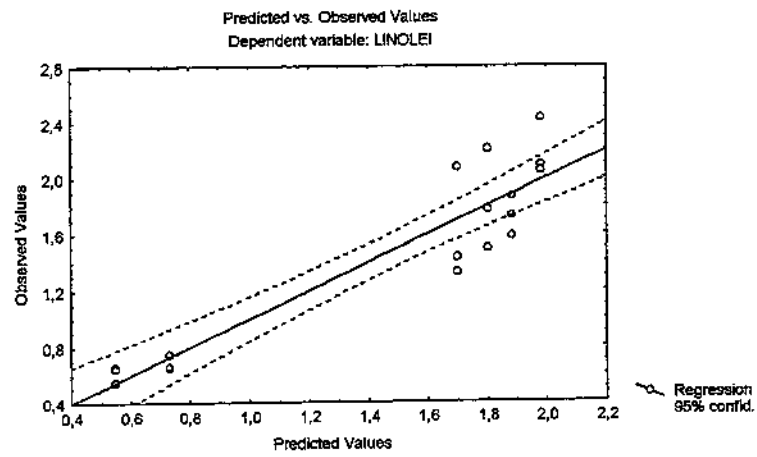
Final loss: 1,133102674 R=,91463 Variance explained: 83,654%

	A	B	C
Estimate	1,136521	,135318	-,19073
Std.Err.	,161320	,044246	,02205
t(15)	7,045152	3,058303	-8,65165
p-level	,000004	,007967	,00000

13.1 – Dispersão dos resultados para LINOLEI :

Correlation Matrix of Parameter Estimates (camelo.sta)

	A	B	C
A	1,000000	-,976269	-,116721
B	-,976269	1,000000	-,009177
C	-,116721	-,009177	1,000000



A.2.1 – FLUXOGRAMA DA ESTRIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS

 PETROBRAS PETRÓLEO BRASILEIRO S.A. CENTRO DE PESQUISAS E DESENVOLVIMENTO LAMPODO A. MENEZ DE MELLO (CENPES)	CERTIFICADO DE ENSAIO C.E	Nº 98/010
SUPERINTENDÊNCIA DE PESQUISA INDUSTRIAL - SUPESQ DIVISÃO DE QUÍMICA - DIQUIM	Este C.E cancela e substitui o C.E. nº XX - 000/00	FOLHA 02 / 11

FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO ANALÍTICO EFETUADO

AMOSTRA : SPIRULLINA
 REFERÊNCIA : Experiência nº 26 (T = 35°C)

```

    graph TD
      A[AMOSTRA LIOFILIZADA DE SPIRULLINA  
EXPERIMENTO 26] --> B[HIDROLISE ÁCIDA (SOLUÇÃO DE HCl 4N) -  
AQUECIMENTO SOB REFLUXO/ TEMPO: 15 MINUTOS]
      B --> C[LAVAGEM COM ÁGUA SEGUIDO POR  
FILTRAÇÃO EM PAPEL DE FILTRO]
      C --> D[RESÍDUO DO PAPEL DE FILTRO E SECO EM  
ESTUFA SEM VÁCUO POR 20 MINUTOS A 100°C]
      D --> E[EXTRAÇÃO EM SOXHLET COM ÉTER DE  
PETRÓLEO NO RESÍDUO SECO POR 8 HORAS]
      E --> F[EVAPORAÇÃO DO ÉTER DE PETRÓLEO SOB  
JATO DE NITROGÊNIO E CALOR  
BRANDO]
      F --> G[RESÍDUO SECO SUBMETIDO A ESTERIFICAÇÃO COM  
ÁCIDO SULFÚRICO/METANOL POR 4 HORAS  
SOB REFLUXO]
      G --> H[EXTRAÇÃO EM FUNIL DE SEPARAÇÃO  
COM ÉTER DE PETRÓLEO]
      H --> I[ANÁLISE DO ESTERIFICADO POR LV. E CHN]
      H --> J[ANÁLISE DO ESTERIFICADO POR CG/EM]
    
```

DESCRIÇÃO DO PROCESSO ANALÍTICO

1. HIDRÓLISE ÁCIDA

1.1 APARELHAGEM E MATERIAIS

- Manta com agitação
- Pérolas de vidro
- Balão de fundo redondo
- Condensador de bolas
- Proveta
- Balança Analítica
- Placa de Petri

Os resultados reportados neste documento são referentes a amostra ensaiada.
 Este C.E somente pode ser reproduzido na sua totalidade e com a autorização do cliente.
 DÚVIDAS E SUGESTÕES, FAVOR CONTATAR O RESPONSÁVEL PELA APROVAÇÃO DESTES DOCUMENTOS, NO TELEFONE PARA CONTATO.
 Cidade Universitária - Quadra 07 - Ilha do Fundão - CEP 21949 - 900 - Rio de Janeiro - RJ - Brasil Tels.: (021) 280-3438/ 398-6195 - Fax: (021) 596-6296

A.2.2 – RESULTADOS DA ESTERIFICAÇÃO – AMOSTRA PADRÃO

 PETROBRAS PETROLEO BRASILEIRO S.A. CENTRO DE PESQUISAS E DESENVOLVIMENTO LABORATÓRIO A. MAGUEZ DE MELLO - LEMOP	CERTIFICADO DE ENSAIO C.E	Nº 98/010
SUPERINTENDÊNCIA DE PESQUISA INDUSTRIAL - SUPESQ DIVISÃO DE QUÍMICA - DIQUIM	Este C.E cancela e substitui o C.E. nº XX - 000/00	FOLHA 06 / 11

RESULTADOS ANALÍTICOS DO LABORATÓRIO DE MÉTODOS ESPECIAIS
--

ANÁLISES EFETUADAS NA AMOSTRA LIOFILIZADA			
ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	Bandas características de componente nitrogenado (Figura 1)		
ANÁLISE ELEMENTAR ORGÂNICA	Carbono	Hidrogênio	Nitrogênio
	46,9%	7,4%	10,8%
HIDRÓLISE ÁCIDA			
Peso da Amostra Liofilizada		4,1954 g	
Peso Final após a Hidrólise + Secagem em estufa		3,1619 g	
Rendimento do Processo de Hidrólise Ácida		75,4%	
EXTRAÇÃO EM SOXLHET COM ÉTER DE PETRÓLEO			
Peso Final após a Extração		286,8 mg	
Rendimento do Processo de Extração em Soxhlet		9,1%	
ESTERIFICAÇÃO COM METANOL EM MEIO ÁCIDO			
Peso Final após a Esterificação		254,9 mg	
Rendimento do Processo de Esterificação		88,9%	
RENDIMENTO TOTAL DO PROCESSO		6,1 %	
ANÁLISES EFETUADAS NO EXTRATO ESTERIFICADO			
ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	Bandas características de ésteres metílicos (Figura 2)		
ANÁLISE ELEMENTAR ORGÂNICA	Carbono	Hidrogênio	Nitrogênio
	76,8%	6,9%	0,4%
CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS	Resultados a seguir		

Os resultados reportados neste documento são referentes a amostra ensaiada.

Este C.E somente pode ser reproduzido na sua totalidade e com a autorização do cliente.

DÚVIDAS E SUGESTÕES, FAVOR CONTATAR O RESPONSÁVEL PELA APROVAÇÃO DESTES DOCUMENTOS, NO TELEFONE PARA CONTATO.
 Cidade Universitária - Quadra 07 - Ilha do Fundão - CEP 21949 - 900 - Rio de Janeiro - RJ - Brasil Tels.: (021) 280-3438 / 598-6195 - Fax: (021) 596-6296

A.2.3 – ESPECIFICAÇÃO DO MÉTODO E DA COLUNA CAPILAR

 PETROBRAS INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO PETROBRAS S.A. - NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO	CERTIFICADO DE ENSAIO C.E	Nº 98/010
SUPERINTENDÊNCIA DE PESQUISA INDUSTRIAL - SUPESQ DIVISÃO DE QUÍMICA - DIQUIM	Este C.E cancela e substitui o C.E. nº XX - 000/00	FOLHA 07 / 11

RESULTADOS ANALÍTICOS DO LABORATÓRIO DE CG/EM

- Identificação da amostra :
 - Spirullina (esterificado) - SCAD 98-05490
- Parte experimental :

A amostra foi analisada por CG/EM nas condições de análise abaixo descritas :

Condições da análise de CG/EM	
Sistema CG/EM: HP 5988A	
Coluna: Fenil - metil silicone (DB-225 30m x 0.25 mm x 0.25 um)	Temperatura da interface: 220°C
Modo de injeção: split (150mL/min)	Temperatura da fonte de íons: 200°C
Temperatura do injetor: 250 °C	Gás de arraste: He (10 psi)
Temperatura do forno: 70°C(1min) - 20°C/min -180° - 3°C/min - 220°C (15min)	Volume de amostra: 1 µL
Energia dos elétrons: 70 eV	Faixa de varredura de massas: (15 - 450) u.m.a.
	Corrente de emissão: 300 uA
- Resultados:

A figura 3 apresenta o cromatograma de íons total obtido para a amostra após análise por CG/EM.

Através da análise dos espectros de massas obtidos foi possível identificar os compostos apresentados na tabela 1. Os espectros de massas obtidos para os compostos encontram-se na figura 4.

Partindo-se das premissas mencionadas abaixo, sugere-se a presença do éster metílico do ácido γ Linolênico:

- O éster metílico do ácido γ -linolênico apresenta tempo de retenção menor que o do éster metílico do ácido α -linolênico em uma coluna cromatográfica DB-225, conforme pode ser verificado na figura 5.

Os resultados reportados neste documento são referentes a amostra ensaiada.

Este C.E somente pode ser reproduzido na sua totalidade e com a autorização do cliente.

DÚVIDAS E SUGESTÕES, FAVOR CONTATAR O RESPONSÁVEL PELA APROVAÇÃO DESTE DOCUMENTO. NO TELEFONE PARA CONTATO.

Cidade Universitária - Quadra 07 - Ilha do Fundão - CEP 21949 - 900 - Rio de Janeiro - RJ - Brasil Telex: (021) 280-3438/ 598-6195 - Fax: (021) 596-6296

A.2.4 – RESULTADOS DA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DA AMOSTRA PADRÃO

 PETROBRAS PETROLEO BRASILEIRO S.A. CENTRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO LAMBERTO A. MOUTZ DE MELLO (CEOPUS)	CERTIFICADO DE ENSAIO C.E	Nº 98/010
SUPERINTENDÊNCIA DE PESQUISA INDUSTRIAL - SUPESQ DIVISÃO DE QUÍMICA - DIQUIM	Este C.E. cancela e substitui o C.E. nº XX - 000/00	FOLHA 08 / 11

RESULTADOS ANALÍTICOS DO LABORATÓRIO DE CG/EM

- A injeção de uma mistura padrão de ésteres metílicos contendo o éster do ácido α -linolênico, mostrado na figura 6, mostrou que o composto presente na amostra analisada possui tempo de retenção menor que o do padrão.

- O espectro de massas obtido é compatível com o éster do ácido γ -linolênico.

TABELA 1 : Identificação dos compostos enumerados na figura 1

Nº DO PICO	IDENTIFICAÇÃO
1	Éster metílico do ácido hexadecanóico
2	Éster metílico do ácido octadecanóico
3	Éster metílico do ácido Octadecenoico
4	Éster metílico do ácido γ -Linolênico

• Sugestão:

Sugere-se as condições cromatográficas apresentadas na figura 5 para o caso de necessidade de quantificação dos ésteres por cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama.

CONCLUSÃO

As análises efetuadas na amostra de Spirulina do Experimento 26, sugere a presença do Éster do Ácido γ -Linolênico.

Os resultados reportados neste documento são referentes a amostra ensaiada.
 Este C.E. somente pode ser reproduzido na sua totalidade e com a autorização do cliente.

DÚVIDAS E SUGESTÕES, FAVOR CONTATAR O RESPONSÁVEL PELA APROVAÇÃO DESTES DOCUMENTOS. NO TELEFONE PARA CONTATO.
 Cidade Universitária - Quadra 07 - Ilha do Fundão - CEP 21949 - 900 - Rio de Janeiro - RJ - Brasil Telex: (021) 280-3438 / 598-6195 - Fax: (021) 596-6296

A.2.5 – CROMATOGRAMAS E ESPECTRO DE MASSA DOS ÉSTERES DOS ÁCIDOS GRAXOS NA FAIXA DE INTERESSE ANALISADA

PETROBRAS PETROLEO BRASILEIRO S.A. CENTRO DE PESQUISAS E DESENVOLVIMENTO (RODOLFO A. MACHES DE MELO - CTPO)	CERTIFICADO DE ENSAIO C.E	Nº 98/010
SUPERINTENDÊNCIA DE PESQUISA INDUSTRIAL - SUPESQ DIVISÃO DE QUÍMICA - DIQUIM	Este C.E cancela e substitui o C.E. nº XX - 000/00	FOLHA 10 / 11

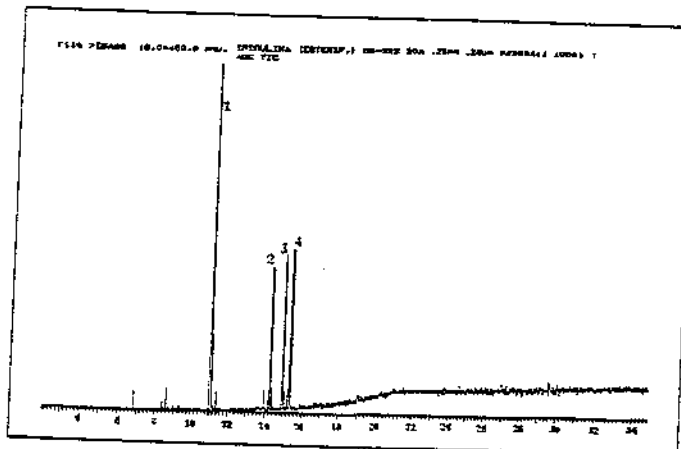


Figura 3 - Cromatograma de Íons Total da Amostra Esterificada

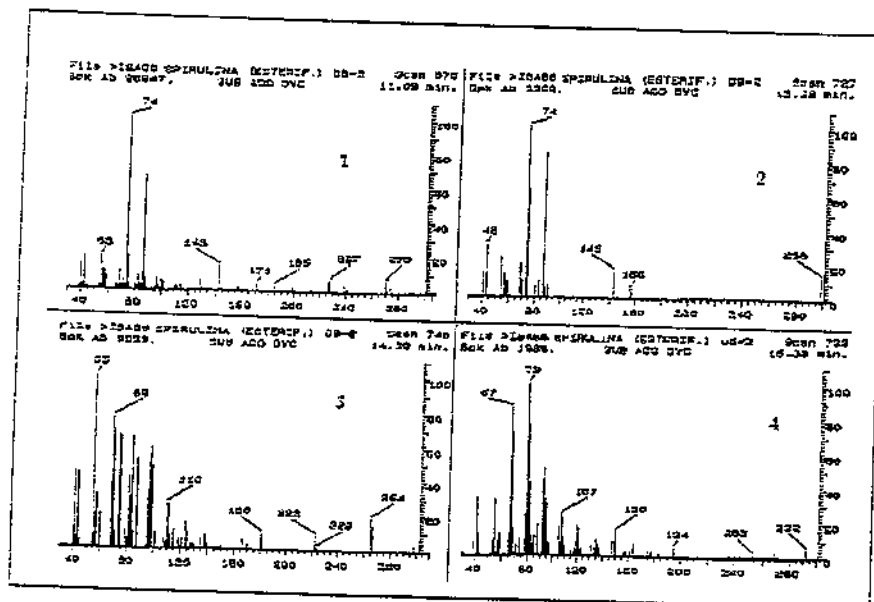


Figura 4 - Espectros de Massas dos Compostos

Os resultados reportados neste documento são referentes a amostra ensaiada.
 Este C.E somente pode ser reproduzido na sua totalidade e com a autorização do cliente.
 DÚVIDAS E SUGESTÕES, FAVOR CONTATAR O RESPONSÁVEL PELA APROVAÇÃO DESTES DOCUMENTOS, NO TELEFONE PARA CONTATO.
 Cidade Universitária - Ilha do Fundão - CEP 21949-900 - Rio de Janeiro - RJ - Brasil. Tels.: (021) 280-3438/ 598-6195 - Fax: (021) 596-6296

A.2.6 – CROMATOGRAMAS DA COLUNA ESPECIFICADA, DB-225, E DA FAIXA DO Ácido Gama-Linolênico

PETROBRAS PETROLEO BRASILEIRO S.A. CENTRO DE PESQUISAS E DESENVOLVIMENTO LITORAL DO MAR DO MARANHÃO	CERTIFICADO DE ENSAIO C.E	Nº 98/010
SUPERINTENDÊNCIA DE PESQUISA INDUSTRIAL - SUPESQ DIVISÃO DE QUÍMICA - DIQUIM	Este C.E cancela e substitui o C.E. nº XX-000/00	FOLHA 11 / 11

FIGURAS

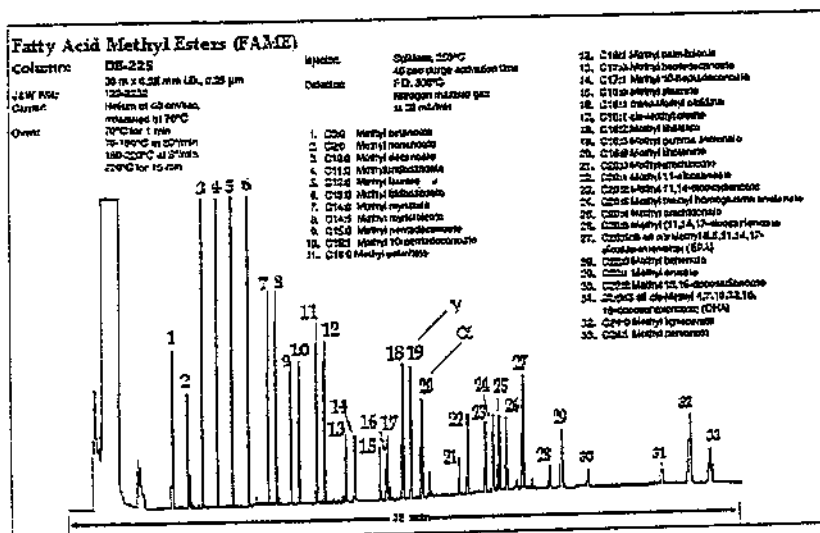


Figura 5 - Tempo de Retenção do éster metílico do ácido γ -linolênico x éster metílico do ácido α -linolênico

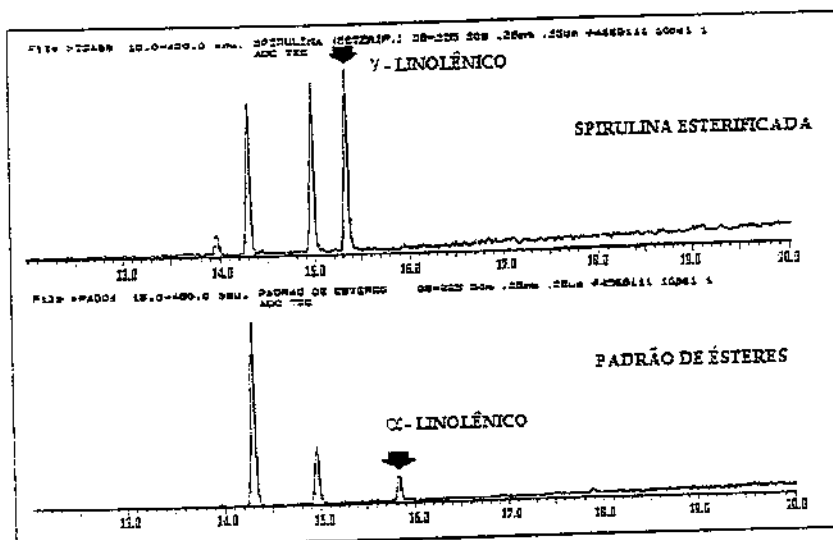


Figura 6 - Amostra Esterificada x Padrão de Ésteres α/γ

Os resultados reportados neste documento são referentes a amostra ensaiada.

Este C.E somente pode ser reproduzido na sua totalidade e com a autorização do cliente.

DÚVIDAS E SUGESTÕES, FAVOR CONTATAR O RESPONSÁVEL PELA APROVAÇÃO DESTE DOCUMENTO, NO TELEFONE PARA CONTATO.

Cidade Universitária - Quadra 07 - Ilha do Fundão - CEP 21949-900 - Rio de Janeiro - RJ - Brasil Telex: (021) 380-3438 / 598-6193 - Fax: (021) 596-6296

A.2.7 – CROMATOGRAMA DO ESPECTRO DE SEPARAÇÃO DA COLUNA ESPECIFICADA – DB -225

Fatty Acid Methyl Esters (FAME)

Column:

DB-225

30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 µm

122-2232

J&W P/N:

Carrier:

Helium at 40 cm/sec,

measured at 70°C

Oven:

70°C for 1 min

70-180°C at 20°/min

180-220°C at 3°/min

220°C for 15 min

Injector:

Splitless, 250°C

45 sec purge activation time

FID, 300°C

Nitrogen makeup gas

at 30 mL/min

12. C16:1 Methyl palmitoleate

13. C17:0 Methyl heptadecanoate

14. C17:1 Methyl 10-heptadecenoate

15. C18:0 Methyl stearate

16. C18:1 *trans*-Methyl elaidate

17. C18:1 *cis*-Methyl oleate

18. C18:2 Methyl linoleate

19. C18:3 Methyl gamma linolenate

20. C18:3 Methyl linolenate

21. C20:0 Methyl eicosanoate

22. C20:1 Methyl 11-eicosanoate

23. C20:2 Methyl 11,14-eicosadienoate

24. C20:3 Methyl methyl homogamma linolenate

25. C20:4 Methyl arachidonic acid

26. C20:5 Methyl (11,14,17-eicosatrienoate)

27. C20:5n3 all *cis*-Methyl 5,8,11,14,17-eicosapentenoate; (EPA)

28. C22:0 Methyl behenate

29. C22:1 Methyl erucate

30. C22:2 Methyl 13,16-docosadienoate

31. 22:5n3 all *cis*-Methyl 4,7,10,13,16-docosahexenoate; (DHA)

32. C24:0 Methyl lignocerate

33. C24:1 Methyl nervonate

1. C8:0 Methyl octanoate

2. C9:0 Methyl nonanoate

3. C10:0 Methyl decanoate

4. C11:0 Methyl undecanoate

5. C12:0 Methyl laurate

6. C13:0 Methyl tridecanoate

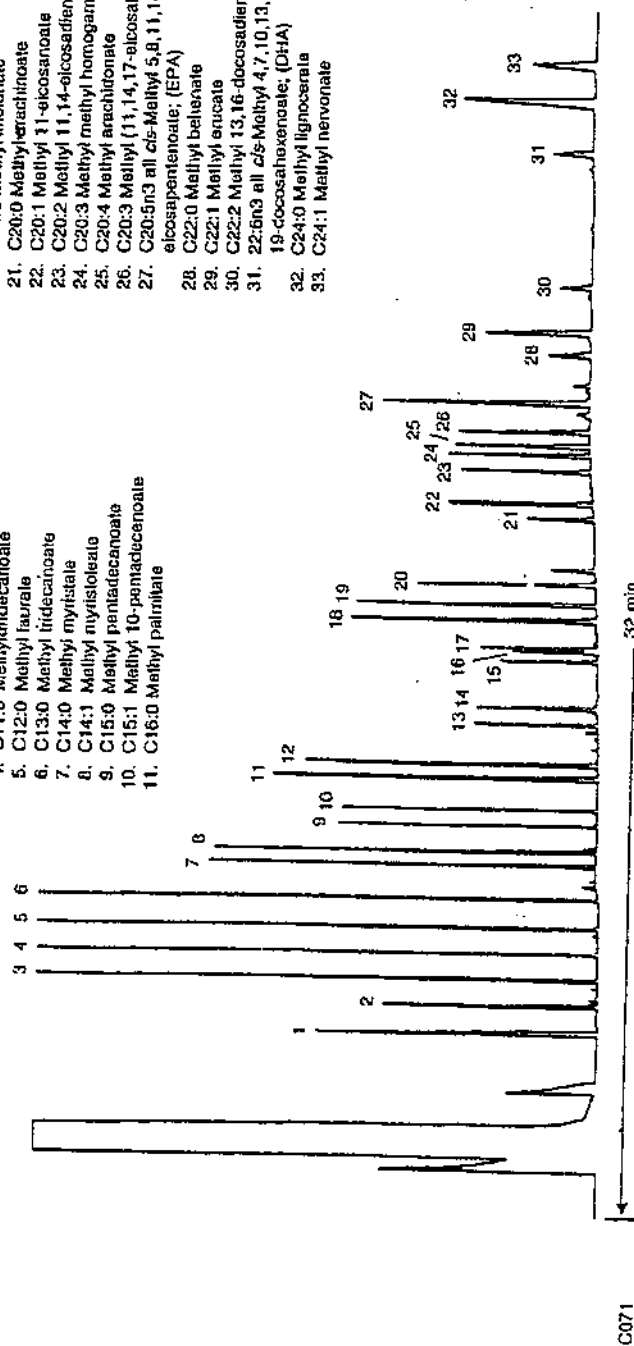
7. C14:0 Methyl myristate

8. C14:1 Methyl myristoleate

9. C15:0 Methyl pentadecanoate

10. C15:1 Methyl 10-pentadecenoate

11. C16:0 Methyl palmitate



A.2.8 - GLA 05 35° 2,5 g/l KNO₃

AG	Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
	3	7,043	352460	27,5962	T	0,3092	1,3309
	4	7,24	2212422	151,3161	T	1,9407	7,2978
	8	8,15	274438	15,1271	T	0,2407	0,7296
	12	8,603	354803	17,7863	V	0,3112	0,8578
	13	8,827	742785	37,6845	T	0,6516	1,8175
	15	9,008	330372	11,6392	V	0,2898	0,5613
	17	9,415	248065	14,6305	T	0,2176	0,7056
1	25	11,21	53986324	808,4095	T	47,3562	38,9889
	26	11,315	704969	25,171	T	0,6184	1,214
2	27	11,402	2003297	81,9215	T	1,7573	3,951
	28	11,598	453046	6,2875	T	0,3974	0,3032
	30	12,105	461999	6,7419	T	0,4053	0,3252
	32	12,317	201067	7,2463	T	0,1764	0,3495
	34	12,622	320695	12,2736	T	0,2813	0,5919
	36	13,522	231129	5,9592	T	0,2027	0,2874
3	37	13,84	1397142	32,7352	T	1,2256	1,5788
4	38	14,172	9910460	222,9964	T	8,6933	10,7549
5	43	14,812	9106743	182,079	T	7,9883	8,7815
6	45	15,153	8824772	208,3229	T	7,741	10,0472
	46	15,258	451453	4,076	T	0,396	0,1966
	50	16,782	348298	7,8158	T	0,3055	0,3769
	52	17,813	811473	3,8553	T	0,7118	0,1859
	54	18,44	362912	2,8011	T	0,3183	0,1351
	55	18,728	548028	11,6049	T	0,4807	0,5597

A.2.9 - GLA 06 35° 2,5 g/l KNO₃

AG	Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
	8	8,657	1350959	67,192	T	0,3936	1,9422
	9	8,777	5862415	303,9287	T	1,6498	8,785
	10	8,855	475339	16,227	V	0,1385	0,469
	11	9,112	360236	10,9703	T	0,105	0,3171
	12	9,395	396415	15,5332	V	0,1155	0,449
	13	9,77	373514	11,6745	V	0,1088	0,3374
	14	9,992	546545	30,5769	T	0,1592	0,8838
	15	10,268	641336	19,9655	T	0,1869	0,5771
	16	10,52	1130234	34,334	T	0,3293	0,9924
	18	10,802	2254182	55,5637	T	0,6568	1,6061
	20	11,102	668770	18,5862	T	0,1949	0,5372
	23	11,685	1180125	36,8466	T	0,3438	1,065
	25	12,485	1122926	7,457	V	0,3272	0,2155
	26	13,273	482122	8,235	V	0,1405	0,238
1	27	14,09	168798816	979,0522	T	49,1807	28,2993
2	28	14,245	8002127	205,978	T	2,3315	5,9538
	29	14,428	1018591	16,4272	T	0,2968	0,4748
	31	14,87	384101	5,3719	T	0,1119	0,1553
	32	15,057	893739	12,9044	T	0,2604	0,373

	33	15,288	688480	17,5763	T	0,2006	0,508
	34	15,473	462751	13,4366	T	0,1348	0,3884
	35	15,658	989416	31,9679	T	0,2883	0,924
	38	16,717	654788	12,3669	V	0,1908	0,3575
3	39	17,082	6125071	98,0153	T	2,2578	3,6321
4	40	17,425	29541684	314,563	T	8,9756	10,3268
	41	17,543	430664	9,4821	T	0,1255	0,2741
	42	17,71	654981	7,5134	T	0,1908	0,2172
5	43	18,115	26517848	310,6025	T	7,7262	8,9779
6	44	18,483	46890234	462,8107	T	12,0521	16,5122
	45	18,595	417238	6,1441	T	0,1216	0,1776
	49	19,835	973203	31,0146	V	0,2835	0,8965

A.2.10 - GLA 68 35° 2,5 g/l KNO₃

AG	Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
	6	8,943	6975762	345,3898	T	3,6418	12,1727
	8	10,655	2228393	74,574	T	1,1634	2,6282
	10	10,947	3448512	103,365	T	1,8003	3,6429
	11	11,16	754788	24,7931	T	0,394	0,8738
	12	11,257	672600	25,1052	T	0,3511	0,8848
	13	11,323	391583	17,062	V	0,2044	0,6013
	14	11,468	895294	26,9572	T	0,4674	0,9501
	16	11,828	808799	13,8268	T	0,4222	0,4873
	19	12,323	850076	12,6927	T	0,4438	0,4473
1	21	14,183	99745304	907,4802	T	52,0732	31,9827
	22	14,287	1142961	39,7607	T	0,5967	1,4013
2	23	14,392	4310650	150,6779	T	2,2504	5,3104
	24	14,595	1523605	52,5562	T	0,7954	1,8523
	25	15,452	747738	10,1769	V	0,3904	0,3587
	26	15,835	520762	20,0534	V	0,2719	0,7067
3	29	17,295	1870110	36,8798	T	0,9763	1,2998
4	30	17,678	13407802	175,2011	T	6,9997	6,1747
5	33	18,445	19731216	251,5355	T	10,3009	8,865
6	34	18,845	23790786	376,8229	T	12,4203	13,2805
	35	18,953	996374	7,8783	T	0,5202	0,2777
	36	20,367	1078767	26,7373	T	0,5632	0,9423
	37	20,643	657638	10,2797	T	0,3433	0,3623
	41	22,285	354785	8,0579	T	0,1852	0,284
	43	22,803	590960	13,1387	T	0,3085	0,4631

A.2.11 - GLA 08 35° 0,2 g/l KNO₃

AG	Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
	3	6,395	134133	4,8786	0	0,1549	0,2297
	4	6,685	108902	6,6486	V	0,1257	0,313
	5	6,947	114073	9,293	V	0,1317	0,4375
	6	7,402	340749	6,9289	V	0,3934	0,3262

	7	7520	4736263	333,6062	T	5,4686	15,7994
	10	8,238	448385	10,1017	T	0,5177	0,4756
	13	8,817	460235	30,1943	T	0,5314	1,4215
	15	9,033	596342	39,2142	T	0,6885	1,8461
	16	9,075	130513	7,8209	T	0,1507	0,3682
	17	9,202	393667	17,221	T	0,4545	0,8107
	18	9,27	219136	13,4106	T	0,253	0,6313
	19	9,315	130343	7,9947	T	0,1505	0,3764
	20	9,43	323327	18,2617	T	0,3733	0,8597
	22	9,713	291472	11,3638	T	0,3365	0,535
	24	10,082	388292	13,5812	V	0,4483	0,6394
1	27	11,408	35067860	633,3771	T	40,4899	29,8176
	28	11,518	332538	12,7556	T	0,384	0,6005
2	29	11,603	840705	37,4353	T	0,9707	1,7623
	31	11,808	529774	18,5544	T	0,6117	0,8735
	34	12,51	104991	4,0934	V	0,1212	0,1927
	36	12,81	130810	5,0104	T	0,151	0,2359
3	40	14,013	2137572	46,4338	T	2,4681	2,186
4	41	14,328	10115012	221,8114	T	11,6789	10,4423
5	44	14,947	7403792	151,6398	T	8,5485	7,1388
6	45	15,307	13543614	301,4551	T	15,6377	14,1917
	49	16,01	359219	5,113	T	0,4148	0,2407
	51	16,63	650543	19,9322	T	0,7511	0,9384
	52	16,875	295514	8,103	V	0,3412	0,3815
	55	18,377	418002	12,4765	T	0,4826	0,5874
	57	18,753	498229	14,206	T	0,5753	0,6688

A.2.12 - GLA 58 35° 0,2 g/l KNO3

AG	Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
	4	7,02	260131	6,9021	T	1,1644	0,9434
	8	7,91	1091524	90,4736	T	4,8861	12,3661
	11	9,368	121031	6,1879	T	0,5418	0,8458
	13	9,608	155024	7,3321	T	0,6939	1,0022
	15	9,795	104606	2,727	T	0,4683	0,3727
	16	9,93	172956	10,284	T	0,7742	1,4056
	22	10,78	81819	3,5891	V	0,3663	0,4906
1	24	12,165	8771428	274,6487	T	39,2641	37,5395
	25	12,345	83028	2,9817	T	0,3717	0,4075
2	26	12,442	207688	7,9162	T	0,9297	1,082
	30	13,547	125507	4,641	T	0,5618	0,6343
3	31	15,043	707854	23,9656	T	3,1686	3,2757
4	33	15,382	2069853	75,3785	T	9,2654	10,3029
	34	15,465	135865	3,2013	T	0,6082	0,4376
5	36	16,042	1725028	54,6135	T	7,7219	7,4647
6	38	16,412	2299082	80,4004	T	10,2915	10,9893
	40	16,685	123049	3,0924	V	0,5508	0,4227
	41	16,892	50719	1,5054	0	0,227	0,2058

	42	17,792	51892	1,1977	T	0,2323	0,1637
	43	17,943	111135	2,1967	T	0,4975	0,3003
	45	18,442	116955	2,5659	V	0,5235	0,3507
	46	19,733	65452	1,6723	0	0,293	0,2286
	47	20,133	60111	1,7415	T	0,2691	0,238
	48	20,288	79656	1,8994	0	0,3566	0,2596

A.2.13 - GLA 57 35° 0,2 g/l KNO3

AG	Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
	3	7,148	473429	12,9484	T	1,5195	1,2539
	4	7,47	64487	4,8316	V	0,207	0,4679
	6	8,063	1770493	137,0471	T	5,6824	13,2709
	8	8,83	192239	8,1221	T	0,617	0,7865
	13	9,792	176249	11,8174	T	0,5657	1,1443
	15	9,887	96577	4,4447	T	0,31	0,4304
	16	9,985	61039	3,7581	T	0,1959	0,3639
	17	10,065	70420	4,0839	T	0,226	0,3955
	18	10,123	265726	17,2026	V	0,8529	1,6658
	19	10,25	108811	6,2137	T	0,3492	0,6017
	21	10,565	75083	3,6478	V	0,241	0,3532
	23	10,822	45839	2,0211	T	0,1471	0,1957
	24	10,987	89600	4,6627	V	0,2876	0,4515
	25	11,135	38382	2,2964	T	0,1232	0,2224
1	27	12,42	12458046	357,7262	T	39,9844	34,6403
	28	12,595	105169	3,9227	T	0,3375	0,3799
2	29	12,69	279303	12,791	T	0,8964	1,2386
	30	12,915	109559	4,4676	T	0,3516	0,4326
	33	13,715	58104	1,9928	T	0,1865	0,193
	34	13,805	163577	6,137	T	0,525	0,5943
	35	14,052	37881	1,5267	T	0,1216	0,1478
3	37	15,318	928602	28,6103	T	2,9804	2,7705
4	39	15,667	2860090	93,1777	T	9,1795	9,0228
	40	15,75	176907	4,5112	T	0,5678	0,4368
5	42	16,34	2493812	84,5833	T	8,004	8,1906
6	44	16,713	3428008	104,4393	T	11,0023	10,1134
	45	16,97	156980	4,0714	T	0,5038	0,3943
	48	18,11	110159	2,6904	T	0,3536	0,2605
	49	18,25	153263	3,0207	T	0,4919	0,2925
	51	18,738	94550	3,0333	T	0,3035	0,2937
	57	20,445	90221	2,793	T	0,2896	0,2705
	58	20,582	77226	1,7714	0	0,2479	0,1715

A.2.14 - GLA 14 35° 0,0 g/l KNO3

AG	Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
	2	7,027	38235	3,8947	V	0,1715	0,5833
	4	7,307	240111	8,2976	V	1,0767	1,2428
	5	7,622	65228	3,9934	V	0,2925	0,5981
	6	8,15	179666	5,8815	T	0,8057	0,8809
	7	8,235	1704338	135,1414	V	7,6429	20,2413
	8	9,04	22164	3,0239	V	0,0994	0,4529
	10	10,023	144042	9,1665	T	0,6459	1,3729
	11	10,072	57063	3,4489	T	0,2559	0,5166
	13	10,222	61536	3,8734	V	0,276	0,5802
	14	10,307	110040	6,8363	T	0,4935	1,0239
	16	10,495	151126	8,952	O	0,6777	1,3408
	17	10,928	74425	3,4715	V	0,3337	0,52
	18	11,598	25780	1,0624	O	0,1156	0,1591
1	20	12,705	5907450	192,2224	T	26,4912	28,7908
2	22	13,008	219649	8,5569	T	0,985	1,2816
	25	14,418	55727	1,654	O	0,2499	0,2477
3	26	15,687	263895	8,8057	T	1,1834	1,3189
4	28	16,033	998865	33,4194	T	4,4793	5,0055
	29	16,138	160387	5,1151	O	0,7192	0,7661
5	30	16,743	1747571	60,2148	T	7,8368	9,0189
6	31	17,123	1992651	73,4946	O	8,9358	11,0079
	32	17,612	108712	3,1979	V	0,4875	0,479
	33	17,937	156788	3,6424	O	0,7031	0,5456
	35	18,713	128475	1,7902	O	0,5761	0,2681
	36	20,503	48518	1,5385	O	0,2176	0,2304
	37	20,928	113247	3,045	O	0,5078	0,4561

A.2.15 - GLA 40 35° 0,0 g/l KNO3

AG	Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
	2	6,925	72701	4,6228	V	0,2204	0,4158
	4	7,188	371343	15,1382	T	1,1255	1,3617
	5	7,512	74913	5,7699	V	0,2271	0,519
	6	8,012	407126	13,4546	T	1,234	1,2103
	7	8,108	2196226	170,3764	T	6,6567	15,3256
	9	8,872	193806	8,635	T	0,5874	0,7767
	11	9,595	130454	8,7085	T	0,3954	0,7833
	13	9,84	191199	11,9118	T	0,5795	1,0715
	15	9,935	137362	5,9363	T	0,4163	0,534
	16	10,033	85083	5,3126	T	0,2579	0,4779
	17	10,113	87433	4,9749	T	0,265	0,4475
	18	10,17	74030	3,8426	V	0,2244	0,3456
	19	10,298	151525	8,5456	T	0,4593	0,7687
	20	10,615	104252	4,7604	T	0,316	0,4282

	21	10,713	91545	4,9698	T	0,2775	0,447
	23	11,037	143916	6,474	T	0,4362	0,5823
	24	11,34	113558	3,5252	T	0,3442	0,3171
1	25	12,465	12160710	356,0598	T	36,859	32,0281
	26	12,64	152643	5,8156	T	0,4627	0,5231
2	27	12,737	473906	21,0174	T	1,4364	1,8905
	28	12,965	151280	6,4689	V	0,4585	0,5819
	30	13,853	173053	5,573	T	0,5245	0,5013
3	33	15,358	817954	23,9088	T	2,4792	2,1506
4	35	15,688	2392261	68,8939	T	7,2509	6,1971
	36	15,79	333823	10,1781	T	1,0118	0,9155
5	38	16,383	3856249	112,9171	T	11,6883	10,1571
6	40	16,762	4501753	139,8002	T	13,6448	12,5752

A.2.16 - GLA 41 - 35° 0,0 g/l KNO₃

AG	Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
	1	6,892	91571	6,9846	V	0,2033	0,5072
	3	7,988	235057	8,1149	T	0,5219	0,5892
	4	8,085	3340190	237,6881	T	7,4167	17,2585
	8	8,85	139032	4,8483	T	0,3087	0,352
	11	9,567	195106	13,2567	T	0,4332	0,9626
	13	9,81	306682	19,9822	T	0,681	1,4509
	14	9,857	214701	7,0755	T	0,4767	0,5137
	15	10,002	127291	7,8226	T	0,2826	0,568
	16	10,083	117642	6,8444	T	0,2612	0,497
	17	10,138	119777	5,8727	V	0,266	0,4264
	18	10,267	255296	13,3792	T	0,5669	0,9715
	20	10,582	176780	6,859	T	0,3925	0,498
	21	10,68	166761	8,1381	T	0,3703	0,5909
	24	11,007	176984	9,1494	V	0,393	0,6643
	26	11,79	50614	2,6277	V	0,1124	0,1908
1	28	12,452	17514468	410,8572	T	38,8896	29,8323
	29	12,613	207842	7,5692	T	0,4615	0,5496
2	30	12,713	707340	28,9814	T	1,5706	2,1043
	31	12,933	206803	9,0871	T	0,4592	0,6598
	35	13,83	205990	7,4197	T	0,4574	0,5387
	36	14,062	92333	2,3267	0	0,205	0,1689
3	39	15,337	1085350	29,455	T	2,4099	2,1387
4	40	15,675	3216059	97,4823	T	7,141	7,0782
	41	15,765	422541	12,7289	T	0,9382	0,9242
5	43	16,37	5303308	140,8842	T	11,7756	10,2296
6	44	16,74	6300647	183,1627	T	13,9901	13,2994
	45	16,965	211077	5,0149	T	0,4687	0,3641
	46	17,19	303398	7,2468	T	0,6737	0,5262
	49	18,238	258330	5,5404	T	0,5736	0,4023
	53	20,02	156997	4,9514	0	0,3486	0,3595
	55	20,425	350944	9,1265	T	0,7792	0,6627

A.2.17 - GLA 23 25° 2,5 g/l KNO₃

AG	Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
	2	6,228	737090	23,1347	T	0,3433	0,6433
	4	6,397	1467415	23,2797	T	0,6835	0,6473
	6	6,818	8188501	462,1759	T	3,8139	12,8508
	10	7,595	388940	13,2123	T	0,1812	0,3674
	11	7,823	655967	24,3048	T	0,3055	0,6758
	12	7,95	2319396	93,0033	T	1,0803	2,586
	13	8,133	4162710	165,4546	T	1,9388	4,6005
	14	8,322	2492873	61,9	T	1,1611	1,7211
	15	8,46	1953604	76,3722	T	0,9099	2,1235
	16	8,697	1071001	16,211	T	0,4988	0,4507
1	20	10,24	97535600	978,2885	T	45,4282	27,2013
2	21	10,38	13370076	397,6026	T	6,2272	11,0553
	22	10,535	1103535	23,646	T	0,514	0,6575
	25	11,395	878640	22,9844	T	0,4092	0,6391
3	27	12,523	1463485	22,2305	T	0,6816	0,6181
4	28	12,8	19634122	280,5628	T	9,1448	7,801
5	30	13,415	19827652	298,5887	T	9,2349	8,3022
6	31	13,75	21786832	388,9313	T	10,1474	10,8142
	33	14,463	631812	12,9152	T	0,2943	0,3591
	36	15,138	1055020	23,1144	T	0,4914	0,6427
	37	15,398	808679	15,3367	T	0,3767	0,4264
	38	15,672	415756	7,4117	T	0,1936	0,2061
	42	16,977	369379	7,8989	T	0,172	0,2196
	44	17,372	575003	11,7677	T	0,2678	0,3272
	48	18,915	293358	3,2267	0	0,1366	0,0897

A.2.18 - GLA 69 25° 2,5 g/l KNO₃

AG	Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
	1	7,593	282366	12,889	V	0,1362	0,4431
	4	8,235	194920	13,4343	V	0,094	0,4619
	6	8,918	5517165	282,8984	T	2,6612	9,7266
	13	10,635	2494290	84,7594	T	1,2031	2,9142
	15	10,927	3669784	104,4882	T	1,7701	3,5925
	16	11,142	862739	24,7685	T	0,4161	0,8516
	17	11,238	788490	28,2037	T	0,3803	0,9697
	18	11,303	312860	13,1701	V	0,1509	0,4528
	19	11,445	1034057	26,6052	T	0,4988	0,9147
	22	11,918	413759	10,1074	V	0,1996	0,3475
	24	12,298	703974	12,2342	T	0,3396	0,4206
	25	12,468	711427	14,5751	V	0,3432	0,5011
1	27	14,14	104264392	836,4852	T	50,2923	28,7599
2	28	14,418	16231898	333,2797	T	7,8295	11,4588
	29	14,582	1469748	41,7979	T	0,7089	1,4371

	31	15,05	359133	9,5655	T	0,1732	0,3289
	33	15,448	233443	8,3626	T	0,1126	0,2875
	35	15,832	579755	22,1253	T	0,2796	0,7607
3	37	17,275	1299905	30,9952	V	0,627	1,0657
4	38	17,667	12876233	199,7706	T	6,2109	6,8685
5	40	18,45	21617520	284,7388	T	10,4273	9,7898
6	42	18,847	23537612	368,512	T	11,3534	12,6701
	43	19,367	226477	3,6199	T	0,1092	0,1245
	47	20,347	697820	15,1301	T	0,3366	0,5202
	48	20,638	450505	6,4979	T	0,2173	0,2234
	54	22,278	339977	7,8271	V	0,164	0,2691
	55	22,777	343150	5,0234	V	0,1655	0,1727

A.2.19 - GLA 37 25° 2,5 g/l KNO3

AG	Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
	2	6,418	846814	39,6974	T	0,3664	1,0038
	5	6,737	529020	9,2679	T	0,2289	0,2343
	11	7,602	9298813	549,4852	T	4,0237	13,8938
	12	7,698	226450	17,8714	T	0,098	0,4519
	22	9,323	569533	27,2777	T	0,2464	0,6897
	23	9,397	1081143	46,2699	T	0,4678	1,1699
	24	9,562	918948	32,2712	V	0,3976	0,816
	25	9,852	530821	16,7638	T	0,2297	0,4239
	26	9,915	753777	16,7318	V	0,3262	0,4231
	28	10,223	618159	14,1827	T	0,2675	0,3586
	29	10,345	1077870	22,792	T	0,4664	0,5763
1	33	11,697	93218616	972,9857	T	40,337	24,602
2	34	11,89	20246396	461,4403	T	8,7609	11,6676
	36	12,067	2099187	84,2226	T	0,9083	2,1296
	38	12,405	511384	17,9218	T	0,2213	0,4532
	39	12,757	233205	7,4877	V	0,1009	0,1893
	41	13,063	616030	23,4304	T	0,2666	0,5924
	43	13,677	307893	10,3608	T	0,1332	0,262
	45	14	355294	9,696	T	0,1537	0,2452
3	47	14,335	1203490	25,4121	T	0,5208	0,6425
4	48	14,635	12587404	179,7499	T	5,4468	4,545
5	50	15,35	29252964	350,1356	T	12,6582	8,8532
6	51	15,668	35124800	501,6106	T	15,199	12,6833
	54	16,318	365242	8,0711	T	0,158	0,2041
	56	16,988	1173321	27,1193	T	0,5077	0,6857
	57	17,228	662225	14,2943	T	0,2866	0,3614
	58	17,502	313841	5,8272	T	0,1358	0,1473
	61	18,7	390085	8,9849	T	0,1688	0,2272
	63	19,092	477063	6,9943	T	0,2064	0,1769
	65	19,547	451101	5,4269	T	0,1952	0,1372
	68	20,54	448941	6,1102	T	0,1943	0,1545

A.2.20 - GLA 17 25° 0,2 g/l KNO₃

AG	Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
	2	8,748	527146	24,2662	V	0,2451	0,8181
	3	9,525	22503052	607,1485	T	10,4619	20,469
	6	11,358	1928324	53,0448	V	0,8965	1,7883
	7	11,675	2961354	69,434	T	1,3768	2,3408
	8	11,912	851463	26,1056	T	0,3959	0,8801
	9	12,028	1093721	34,2499	T	0,5085	1,1547
	10	12,105	602818	21,7624	V	0,2803	0,7337
	11	12,255	1549848	46,6715	V	0,7205	1,5734
	13	12,79	834263	35,7209	V	0,3879	1,2043
	15	12,99	447887	11,7963	T	0,2082	0,3977
1	19	15,135	78471984	705,7004	T	36,4826	23,7915
2	21	15,392	3415499	112,0053	T	1,5879	3,7761
	22	15,592	1028710	27,1051	T	0,4783	0,9138
	27	16,542	405505	13,06	V	0,1885	0,4403
	29	16,958	322147	10,3774	T	0,1498	0,3499
3	35	18,533	4274609	65,2473	T	1,9873	2,1997
4	36	18,932	11061997	102,4986	T	5,1429	3,4556
5	37	19,805	22182504	223,3983	T	10,3129	7,5315
6	38	20,252	36508584	431,3853	T	16,9733	14,5434
	43	21,892	1557388	29,7517	T	0,724	1,003
	48	24,195	769070	16,0606	T	0,3575	0,5415
	49	24,857	2651293	43,7882	T	1,2326	1,4762

A.2.21 - GLA 49 25° 0,2 g/l KNO₃

AG	Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
	3	7,113	461684	9,528	V	1,7776	1,1275
	4	7,935	219651	7,9423	T	0,8457	0,9399
	5	8,022	1616253	130,8322	T	6,223	15,4824
	7	8,788	136307	5,2995	T	0,5248	0,6271
	10	9,495	97235	4,9163	T	0,3744	0,5818
	12	9,74	185824	8,5739	T	0,7155	1,0146
	13	9,842	60859	2,5028	T	0,2343	0,2962
	15	10,065	69976	4,32	V	0,2694	0,5112
	16	10,193	101678	5,3717	T	0,3915	0,6357
	17	10,507	60643	2,8086	V	0,2335	0,3324
	18	10,607	64607	3,5792	T	0,2488	0,4236
	19	10,763	57424	2,6402	T	0,2211	0,3124
	20	10,925	85189	3,7246	V	0,328	0,4408
	21	11,212	69236	2,31	T	0,2666	0,2734
1	22	12,348	11116351	310,0624	T	42,8008	36,692
	23	12,523	234837	9,1539	T	0,9042	1,0833
2	24	12,628	676943	32,8045	T	2,6064	3,882

	26	12,845	89737	3,9268	V	0,3455	0,4647
	29	13,722	255677	8,8035	V	0,9844	1,0418
3	32	15,225	678942	19,7781	T	2,6141	2,3405
4	34	15,563	1277939	45,4191	T	4,9204	5,3748
	35	15,668	219160	7,5866	T	0,8438	0,8978
5	37	16,245	1786684	60,1188	T	6,8792	7,1143
6	39	16,622	2987656	87,0654	T	11,5033	10,3031
	40	16,875	243326	6,9465	T	0,9369	0,822
	42	18,028	93548	2,5392	T	0,3602	0,3005
	45	18,645	224716	5,7171	T	0,8652	0,6765
	48	19,952	64039	1,9456	V	0,2466	0,2302
	50	20,49	169568	4,6662	T	0,6529	0,5522

A.2.22 - GLA 51 25° 0,2 g/l KNO₃

AG	Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
	3	6,848	111697	6,8304	V	0,5266	0,8333
	4	7,127	408624	6,8006	T	1,9266	0,8297
	6	8,04	2767951	219,6821	T	13,0507	26,8022
	8	8,803	94463	3,5968	T	0,4454	0,4388
	11	9,517	95735	6,3638	T	0,4514	0,7764
	12	9,565	49757	2,4986	T	0,2346	0,3048
	13	9,76	157548	10,1825	T	0,7428	1,2423
	14	9,805	102461	3,9892	T	0,4831	0,4867
	15	9,948	61330	3,9114	T	0,2892	0,4772
	16	10,03	56269	3,398	T	0,2653	0,4146
	17	10,088	60584	3,2508	V	0,2857	0,3966
	18	10,212	108727	6,1991	T	0,5126	0,7563
	19	10,525	62293	3,0461	V	0,2937	0,3716
	20	10,627	75480	4,4316	V	0,3559	0,5407
1	25	12,363	8579722	275,2976	T	40,4528	33,5875
	26	12,545	115777	4,3561	T	0,5459	0,5315
2	27	12,647	374563	17,0593	T	1,766	2,0813
	29	12,873	84817	3,5879	T	0,3999	0,4377
3	30	15,250	425372	18,9887	V	2,1082	2,8139
4	31	15,578	721055	34,9417	T	3,2416	4,2510
5	36	16,275	1607878	55,9222	V	7,581	6,8228
6	37	16,653	2617059	81,0722	T	12,3392	9,8912
	39	18,185	107644	2,5188	V	0,5075	0,3073
	43	20,378	131934	3,8683	T	0,6221	0,4719

A.2.23 - GLA 25 25° 0,0 g/l KNO3

AG	Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
	2	6,947	431240	17,4746	V	0,1993	0,506
	5	7,542	1010585	33,7974	T	0,4671	0,9786
	7	7,75	930451	20,0953	T	0,4301	0,5818
	10	8,157	12579563	529,3854	T	5,8146	15,3278
	11	8,268	253156	12,5782	T	0,117	0,3642
	13	8,485	217475	10,2584	V	0,1005	0,297
	14	8,605	771731	54,7329	T	0,3567	1,5847
	17	9,47	397903	12,2747	T	0,1839	0,3554
	18	9,633	2856181	102,7115	T	1,3202	2,9739
	19	9,878	2991986	96,3602	T	1,383	2,79
	21	10,153	3074274	75,5619	T	1,421	2,1878
	22	10,33	1203860	40,7901	T	0,5565	1,181
	25	10,74	950939	48,6237	T	0,4395	1,4078
	26	10,837	269355	13,003	T	0,1245	0,3765
	27	10,895	335187	14,4495	T	0,1549	0,4184
1	30	12,62	82169312	806,1838	T	37,9806	23,3422
2	31	12,818	7030425	188,7589	T	3,2496	5,4653
	32	13,012	1783485	47,6415	T	0,8244	1,3794
	35	13,772	314813	9,7801	T	0,1455	0,2832
	37	14,097	445319	15,7862	T	0,2058	0,4571
	39	14,405	260314	6,896	V	0,1203	0,1997
	42	15,268	515044	10,3416	T	0,2381	0,2994
3	43	15,425	1738893	47,1947	T	0,8038	1,3665
4	44	15,718	11695802	131,4083	T	5,4061	3,8048
5	46	16,47	23786528	250,0748	T	10,9947	7,2406
6	47	16,847	39718096	503,789	T	18,3586	14,5867
	49	17,467	602544	14,437	T	0,2785	0,418
	52	18,067	734924	13,6599	T	0,3397	0,3955
	53	18,195	1929808	44,8773	T	0,892	1,2994
	54	18,452	1238742	21,2971	T	0,5726	0,6166

A.2.24 - GLA 26 25° 0,0 g/l KNO3

AG	Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
	2	6,338	780066	29,7486	T	0,3602	0,9853
	4	6,707	835115	14,2132	T	0,3856	0,4708
	6	6,995	636267	34,8916	T	0,2938	1,1557
	8	7,655	15187996	592,364	T	7,0137	19,6199
	10	8,095	665005	48,0279	T	0,3071	1,5908
	13	9,19	2081271	77,1864	T	0,9611	2,5565
	14	9,455	2685574	92,6945	T	1,2402	3,0702
	15	9,653	840243	22,1861	T	0,388	0,7348
	16	9,743	1743750	42,2952	T	0,8052	1,4009
	17	9,935	1045553	30,8258	T	0,4828	1,021

	20	10,37	722940	24,7605	T	0,3338	0,6201
1	24	12,513	83700296	751,2825	T	38,6519	24,8835
2	25	12,738	6430644	148,9304	T	2,9696	4,9328
	27	12,975	1915924	50,8756	T	0,8848	1,6851
	29	13,855	298478	9,014	V	0,1378	0,2986
	31	14,248	454629	12,6713	T	0,2099	0,4197
	32	15,443	222736	5,0897	T	0,1029	0,1686
3	33	15,895	2526728	43,3337	T	1,1668	1,4353
4	34	16,243	7570887	66,3745	T	3,4962	2,1984
5	36	17,197	26486544	237,3366	T	12,2312	7,8609
6	37	17,645	42885532	429,0698	T	19,8041	14,2114
	39	18,435	793862	14,5718	T	0,3666	0,4826
	41	19,363	2074125	39,5029	T	0,9578	1,3084
	42	19,685	968980	15,8844	T	0,4475	0,5261

A.2.25 - GLA 29 25° 0,0 g/l KNO3

AG	Pk #	RT	Area	Height	BC	Area Percent	Height Percent
	2	6,19	946229	26,1359	T	0,1832	0,4128
	4	6,848	97342760	963,4236	T	18,8434	15,2177
	5	6,96	8071547	164,8921	T	1,5625	2,6045
	6	7,157	2071724	36,9548	T	0,401	0,5837
	9	7,467	16394702	596,4454	T	3,1736	9,4211
	11	7,865	835481	45,7586	T	0,1617	0,7228
	16	8,853	3184381	112,6635	T	0,6164	1,7796
	17	9,085	3368602	102,058	T	0,6521	1,6121
	19	9,34	4786565	72,5454	T	0,9266	1,1459
	21	9,805	8151133	131,5302	T	1,5779	2,0776
	24	10,66	25352648	256,047	T	4,9077	4,0444
	25	11,205	42030032	537,2169	T	8,1361	8,4856
1	26	11,792	126208960	972,4173	T	24,4312	15,3598
2	28	11,947	7458572	267,5748	T	1,4438	4,2265
	30	12,152	2322971	64,5791	T	0,4497	1,0201
	32	12,912	1554426	21,7654	T	0,3009	0,3438
	34	13,218	1321779	24,2056	T	0,2559	0,3823
	37	14,62	3259960	47,755	T	0,6311	0,7543
4	38	14,92	12108487	118,4809	T	2,3439	1,8715
5	40	15,638	42101472	334,2497	T	8,1499	5,2796
6	41	16,06	64494756	693,9581	T	12,4847	10,9614
	43	16,672	944685	18,858	T	0,1829	0,2979
	45	17,413	3121543	70,4796	T	0,6043	1,1133
	46	17,657	1343697	31,4227	T	0,2601	0,4963
	48	19,19	1556554	37,5874	T	0,3013	0,5937
	50	19,588	2055437	44,8198	T	0,3979	0,708

A.2.26

(GLA_06.D01) NO

