



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA**

CULTIVO E EXTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

DA MICROALGA *Spirulina platensis*.

CRISTIANE FERREIRA DA SILVA

Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Ceará, como parte das exigências para a obtenção do título de Engenheiro de Pesca.

FORTALEZA – CEARÁ – BRASIL

JANEIRO/2004



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S579c Silva, Cristiane Ferreira da.
Cultivo e extração de polissacarídeos sulfatados da microalga *Spirulina platensis* / Cristiane Ferreira da Silva. – 2004.
24 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2004.
Orientação: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias.

1. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

COMISSÃO EXAMINADORA:

**Prof. Wladimir Ronald Lobo Farias, D. Sc.
Orientador/Presidente**

**Prof. Alexandre Holanda Sampaio, Ph.D.
Membro**

**Profa. Ana Lúcia Ponte Freitas, D.Sc.
Membro**

VISTO:

**Prof. Moisés Almeida de Oliveira, D.Sc.
Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca**

**Profa. Artamízia Maria Nogueira Montezuma, M. Sc.
Coordenadora do Curso de Engenharia de Pesca**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me proteger e me auxiliar nos momentos mais difíceis da minha vida.

Ao meu pai Antônio Ferreira que mesmo ausente fisicamente esteve presente nas minhas lembranças em todos os dias vividos.

A uma mulher admirável, minha mãe Zilda que me ensinou a ser quem sou e me proporcionou a alegria de concluir a faculdade. E a minha mãe postiça, a tia Irá.

À minha querida irmã Helena e minhas sobrinhas lindas e amadas Priscila e Patrícia que sempre me deram força.

Ao Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias pela orientação, paciência, amizade e compreensão em todo momento.

Aos colegas que formam o grupo GEAMAR, em especial Glácio e Ariévilo. Aos colegas que conviveram comigo durante o curso.

E a todos os meus professores que contribuíram diretamente para a minha conclusão no curso de Engenharia de Pesca.

<u>SUMÁRIO</u>	páginas
Sumário	iii
Resumo	iv
Lista de Figuras	v
1. INTRODUÇÃO	01
2. MATERIAL E MÉTODOS	04
2.1 Obtenção da microalga <i>Spirulina platensis</i>	04
2.2 Preparo do meio de cultivo	04
2.3 Montagem do experimento	05
2.4 Espectro de absorção	06
2.5 Acompanhamento do cultivo	07
2.6 Correlação entre absorbância e o número de tricomas de <i>S. platensis</i>	07
2.7 Extração de polissacarídeos sulfatados	08
2.8 Determinação da atividade anticoagulante pelo teste do APTT (Tempo de Ativação Parcial da Tromboplastina Ativada)	09
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
3.1 Cultivo da microalga <i>Spirulina platensis</i>	10
3.2 Análise do espectro de absorção da microalga <i>Spirulina platensis</i>	10
3.3 Curva de crescimento de <i>S. platensis</i> expressa em absorbância	11
3.4 Relação entre absorbância e o número de tricomas de <i>S. platensis</i>	12
3.5 Curva de crescimento da microalga <i>Spirulina platensis</i>	14
3.6 Extração de polissacarídeos sulfatados	15
4. CONCLUSÕES	17
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

RESUMO

A microalga *Spirulina platensis*, é cultivada mundialmente em diversos laboratórios e fazendas de aquicultura. Esta microalga é facilmente cultivada e possui uma concentração notável de nutrientes, principalmente proteínas, vitaminas e minerais, sendo utilizada como suplemento alimentar. Este trabalho teve como objetivo, realizar o cultivo da microalga *S. platensis* em meio de cultivo alternativo, preparado com sal grosso comercial, bicarbonato de sódio e enriquecido com fertilizantes agrícolas NPK e superfosfato triplo, visando a determinação da curva de crescimento do cultivo através de espectrofotometria e a otimização da extração de polissacarídeos sulfatados da referida microalga. Atualmente, a extração de moléculas biologicamente ativas desta microalga tem despertado um grande interesse na área biomédica. Dentre essas moléculas, os polissacarídeos sulfatados se destacam, possuindo atividades antivirais, imunomodulatórias e anticoagulante. Apesar do cultivo ser relativamente fácil, é necessária a determinação de um método mais rápido de acompanhamento do crescimento das culturas, a fim de determinar o momento exato das repicagens ou finalização do cultivo. Nesse trabalho, o acompanhamento do cultivo foi realizado através de espectrofotometria, sendo o número de tricomas determinado através de uma regressão linear entre os valores da absorbância a 680 nm e o número de tricomas por mL.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sala de cultivo em laboratório	04
Figura 2	Preparo do meio de cultivo alternativo	05
Figura 3	Fluxograma das etapas de cultivo da microalga	06
Figura 4	Fluxograma da extração de polissacarídeos sulfatados	09
Figura 5	Espectro de absorção da microalga <i>Spirulina platensis</i>	11
Figura 6	Curva de crescimento da microalga <i>Spirulina platensis</i> em meio de cultivo alternativo expressa na absorbância de 680nm	12
Figura 7	Reta de regressão linear obtida entre absorbância a 680 nm e o n°de tricomas/ 5µL da microalga <i>S. platensis</i> em meio de cultivo alternativo	13
Figura 8	Reta de regressão linear obtida entre absorbância a 680 nm e o n°de tricomas/ mL da microalga <i>S. platensis</i> em meio de cultivo alternativo	14
Figura 9	Curva de crescimento da microalga <i>S. platensis</i> em meio de cultivo alternativo expressa em números de tricomas/mL x 10 ³	15
Figura10	Curvas de atividade anticoagulante (APTT) de polissacarídeos sulfatados	16

CULTIVO E EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA MICROALGA *Spirulina platensis*.

CRISTIANE FERREIRA DA SILVA

1. INTRODUÇÃO

A microalga *Spirulina platensis* pertencente à divisão Cyanophyta, denominada como uma microalga fotossintética pluricelular, vem sendo cultivada mundialmente em diversos laboratórios, por possuir uma série de atividades biológicas e pela grande facilidade no cultivo (COHEN *et al*, 1987). Esta foi a primeira forma de vida fotossintética projetada pela natureza a 3,5 milhões de anos atrás, nas águas salgadas de alguns lagos.

A microalga é constituída de 55–70% de proteínas, 15–25% de carboidratos, 6–8% de lipídios, 7–13% de minerais, 3–7% de umidade e 8–10% de fibras. Contém alta taxa de proteína vegetal e, mais de 60% da sua composição química é totalmente digestível. Esta microalga contém a concentração mais notável de nutrientes conhecida em qualquer alimento, planta, grão ou erva. Possui altas concentrações de: β -caroteno, vitamina A, vitamina D, vitamina K, vitamina B-12 (cuja fonte habitual é o tecido animal), ferro e traços de minerais. Possui ainda, entre outros componentes, o raro ácido graxo essencial – ácido gamalinolênico (GLA), alta taxa de polissacarídeos e a maioria dos aminoácidos essenciais e não-essenciais. Há a presença, em alta concentração, dos pigmentos característicos da microalga, a ficocianina e aloficocianina (pigmento azul), como também a presença de clorofila (pigmento verde) e os carotenos (pigmentos amarelos e vermelhos). Seu alto conteúdo de proteína e a composição sem igual de ácidos graxos e vitaminas são usadas como uma base para justificar seus benefícios para a saúde humana (SESHADRI, 1993).

As microalgas são uma fonte natural de alimento na cadeia alimentar de peixes e muitos outros organismos (GIWOJNA, 1987). Muitos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de obter um alimento específico que seja adequado às exigências nutricionais para cada fase de desenvolvimento de diferentes organismos. Alguns desses trabalhos relatam que essa microalga vem sendo utilizada como suplemento alimentar, tanto para o homem (AVIGAD, 1997), como para outros animais: camundongos, galinhas, camarões e peixes (HAYASHI, 1996; QUERESHI, 1994; AVIGAD, 1997; NADEESHA, 2001).

Entre as maiores dificuldades no cultivo em massa de microalgas, destaca-se a eficiência de um método para o acompanhamento detalhado do desenvolvimento do cultivo e o emprego de um meio de cultura de baixo custo em volumes consideráveis, que minimize a perda de biomassa por falta de nutrientes. Um dos aspectos mais importantes na produção de microalgas é a seleção adequada dos meios de cultura, os quais devem conter todos os nutrientes necessários para o crescimento satisfatório dos organismos cultivados. O uso de compostos orgânicos e inorgânicos, como os fertilizantes agrícolas apresentaram bons resultados e custos menos elevados de cultivo e, conseqüentemente, do produto final. A microalga *Spirulina platensis* é considerada apropriada para o cultivo em massa, podendo ser cultivada ao ar livre com acesso à água salobra e oceânica (KLEIN & GONZALEZ, 1983; OLIVEIRA & KOENING, 1984; ALFONSO & NUÑEZ, 1985; BUITRAGO, 1998).

Existem vários fatores que influenciam diretamente no crescimento das microalgas. Os fatores ambientais mais importantes são a luz e, conseqüentemente, a temperatura. A luz é extremamente necessária porque a microalga é um organismo fotossintético e que necessita de luz constante. Já a temperatura afeta as atividades metabólicas e a disponibilidade de nutrientes. Esses são os fatores que mais limitam a produção ao ar livre. Outro fator de grande influência é a salinidade do meio de cultivo, pois causa um efeito direto não só no crescimento como na diminuição da biomassa (AVIGAD, 1997).

O crescimento da microalga *Spirulina platensis* no meio de cultivo e o efeito desses fatores podem ser acompanhados através da técnica de

espectrofotometria, que analisa o comprimento de onda onde há maior absorção de luz pelos pigmentos característicos da microalga em questão, a ficocianina e a aloficocianina.

Nos últimos anos, várias moléculas biologicamente ativas, têm sido extraídas das algas marinhas, tais como os polissacarídeos sulfatados (FARIAS, 2000). Estes polissacarídeos são macromoléculas carregadas negativamente, formadas por unidades repetitivas de açúcar. Estas moléculas possuem atividades anticoagulantes, antitrombóticas (FARIAS *et al*, 2000; FARIAS *et al*, 2001) e imunoestimulantes (FARIAS *et al*, submetido).

A microalga *S. platensis* possui polissacarídeos sulfatados com atividade antiviral (HAYASHI *et al*, 1995) e imunomodulatória (BOAJIANG, 1994), além de estimular as células sangüíneas periféricas e o sistema homatopoiético (CHENG-WU, 1994). Além disso, seus pigmentos (ficocianina) reduzem a predisposição para o desenvolvimento de células cancerosas (SEYAA, 2003).

Nesse estudo foi cultivada a espécie *S. platensis*, utilizando um meio de cultura alternativo à base de fertilizantes agrícolas, com o objetivo de determinar a curva de crescimento através de espectrofotometria e otimizar a extração de polissacarídeos sulfatados da referida microalga.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção da microalga *Spirulina platensis*

As cepas da microalga *S. platensis* utilizadas neste estudo foram obtidas de culturas existentes no Laboratório de Cultivo de Algas Marinhas (FIGURA 1), do Departamento de Engenharia de Pesca, UFC.



FIGURA 1 : Sala de cultivo em laboratório.

2.2. Preparo do meio de cultivo

O meio de cultivo utilizado para o experimento foi preparado com água doce pré-clorada, que foi obtida diretamente da torneira do laboratório. Inicialmente, foram adicionados 30,0 g/L de sal grosso comercial e 10,0 g/L de bicarbonato de sódio. Após a completa dissolução dos sais, os fertilizantes agrícolas superfosfato triplo (0,1 g/L) e NPK (1,0 g/L) foram macerados e adicionados ao meio. Antes de ser adicionado ao inóculo, o meio foi devidamente aerado por 24 horas e decantado (FIGURA 2).

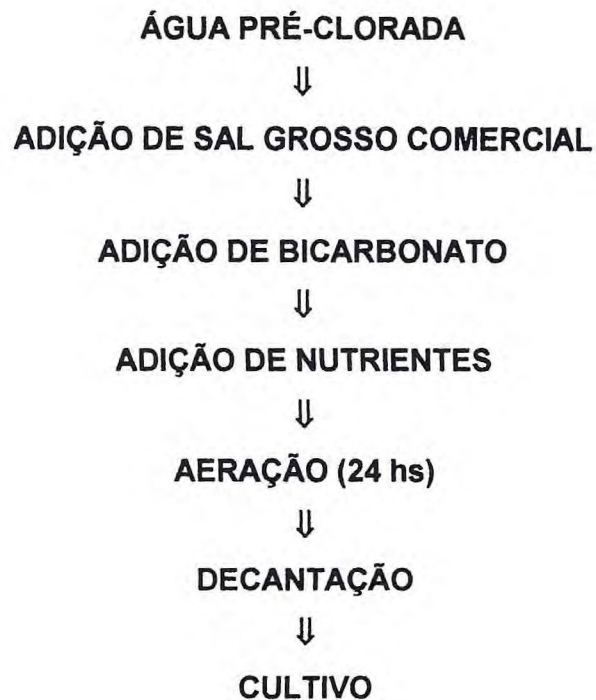


FIGURA 2: Preparo do meio de cultivo alternativo.



2.3. Montagem do Experimento

Todo material utilizado no cultivo foi mantido numa bancada, com iluminação contínua (sem fotoperíodo) fornecida por 2 lâmpadas fluorescentes de 40 watts. Vale salientar que estas mesmas condições de temperatura e luminosidade foram mantidas durante todo o experimento, podendo ter havido alguma variação em função de uma eventual falta de energia.

Um inóculo de 400 mL foi utilizado para o início do cultivo. Nesta fase inicial, o crescimento foi acompanhado visualmente pela intensidade da cor do cultivo, sendo transferido para um erlenmeyer de 1 L, depois para um erlenmeyer de 2 L, e, posteriormente, para um garrafão de 7 L. Em seguida, o cultivo foi transferido para garrafões de 14 L e finalmente foi filtrado, tanto para a obtenção

de um novo inóculo quanto para a extração de polissacarídeos sulfatados (FIGURA 3).

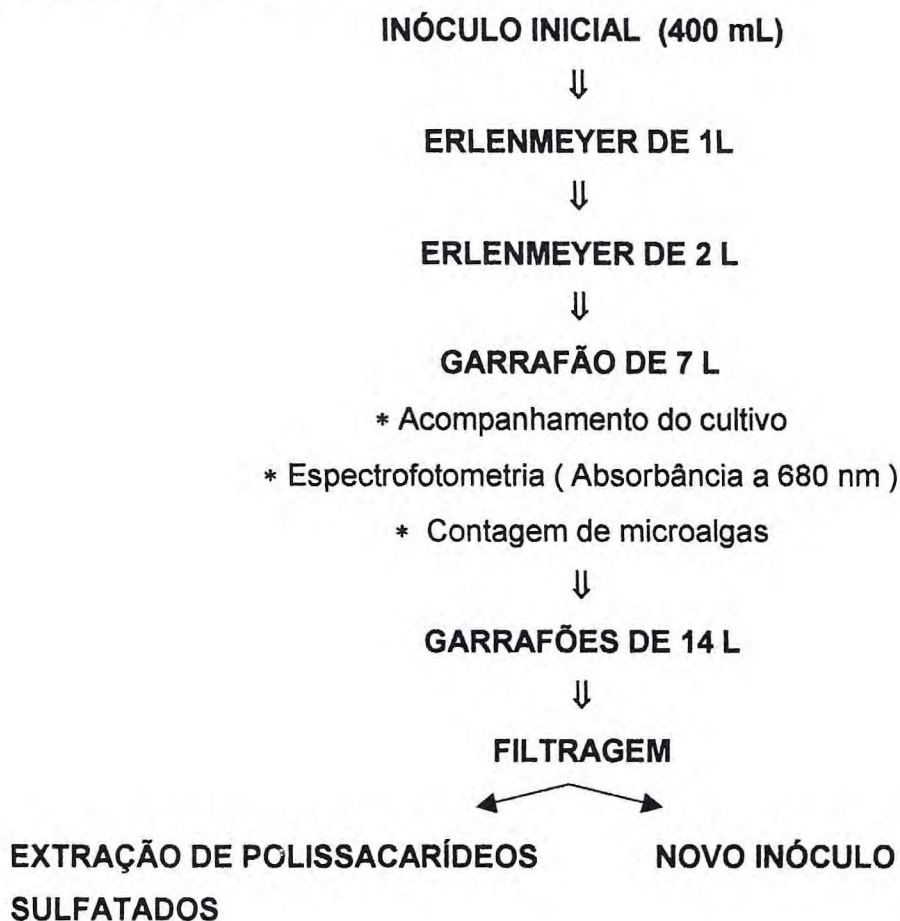


FIGURA 3: Fluxograma das etapas de cultivo da microalga.

2.4. Espectro de absorção da microalga *Spirulina platensis*

A partir de uma amostra do cultivo de *S. platensis* foi realizado uma análise do espectro de absorção, em espectrofotômetro, com o objetivo de se obter o comprimento de onda onde ocorre a maior absorção da luz pelos pigmentos da referida microalga. A análise do espectro de absorção foi realizada numa faixa de varredura de 400 nm a 700 nm.

2.5. Acompanhamento do cultivo

O acompanhamento detalhado do cultivo de *S. platensis* foi realizado em garrações de 7 L. Nessa etapa, o acompanhamento do desenvolvimento da microalga *S. platensis* foi realizado, em intervalos regulares (a cada 48 horas), através do espectrofotômetro, sendo utilizadas amostras de 1,0 mL para a leitura no aparelho.

Em seguida, para cada valor de absorbância determinado, foram tomadas alíquotas de 5 μ L, rigorosamente medidas com o auxílio de 1 pipeta HAMILTON, nas quais foram procedidas contagens do número de tricomas da referida microalga, através da técnica de varredura da lâmina.

Este procedimento foi realizado a fim de se estabelecer uma possível correlação entre absorbância e o número de células por mL. E, portanto, expressar o desenvolvimento do cultivo de *S. platensis*, através do número de células por mililitro.

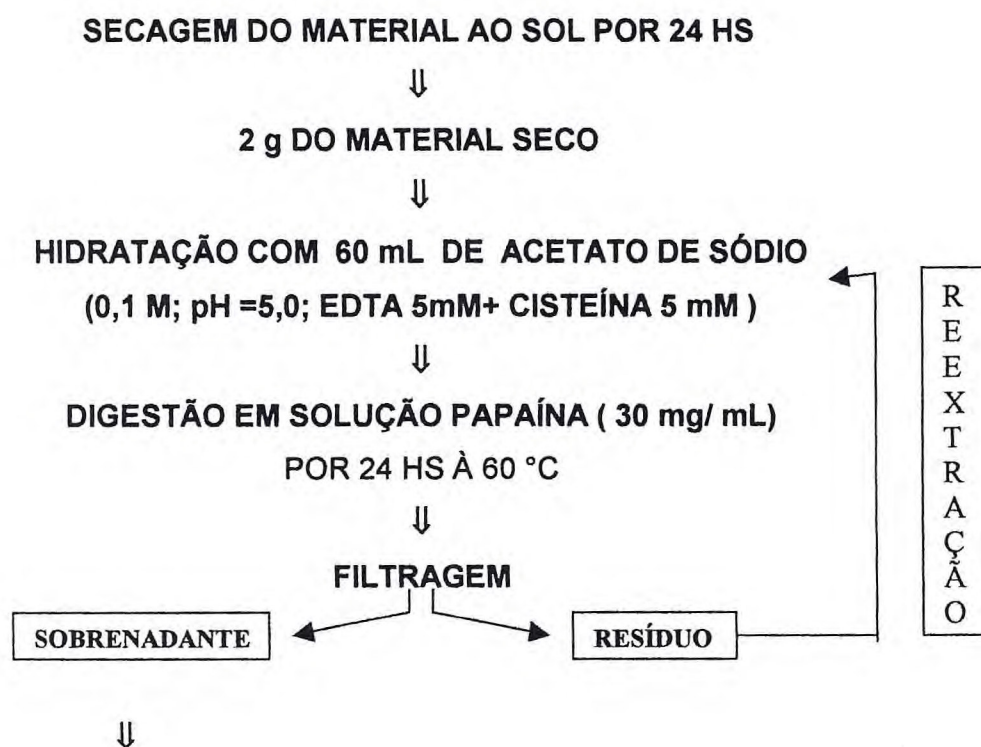
2.6. Correlação entre absorbância a 680 nm e o número de tricomas de *Spirulina platensis*

Os valores de absorbância e respectivos valores de contagem de tricomas foram utilizados para avaliar uma possível correlação entre os mesmos. Para a determinação do grau de correlação linear entre absorbância e o número de tricomas (5 μ L), bem como a determinação da reta de regressão linear, foi utilizado o software Excel".

2.7. Extração de polissacarídeos sulfatados

Esse procedimento foi realizado no Laboratório de Bioquímica Marinha, localizado no Departamento de Engenharia de Pesca. A microalga em estudo, obtida após a filtragem em tela de 60 μ m, foi seca ao sol por um período de 48 horas. Em seguida, 2 g do material seco foi hidratado com 60 mL de solução

tampão acetato de sódio 0,1 M, com pH = 5,0 , contendo EDTA 5mM e cisteína 5mM. A digestão foi realizada por 24 horas a 60 °C, com adição de 7 mL de solução de papaína (30 mg/mL). Após a digestão, o material foi filtrado, centrifugado e depois adicionados 6,4 mL de uma solução de C.P.C. a 10% para precipitação dos polissacarídeos sulfatados. A mistura foi deixada em repouso durante 24 horas à temperatura ambiente. Após este período, o material foi centrifugado e lavado com 250 mL de uma solução de C.P.C. a 0,05%. Depois da lavagem, o material foi novamente centrifugado e o "pellet" foi dissolvido em 115 mL de uma solução de NaCl 2M : etanol (100:15; v:v). Em seguida, foram adicionados à mistura 121 mL etanol absoluto e o material ficou em repouso por 24 horas a 4°C. Após a precipitação dos polissacarídeos sulfatados, o "pellet" foi lavado duas vezes com 245 mL de etanol 80% e uma vez com o mesmo volume do etanol absoluto. Finalmente, o material foi colocado na estufa a 60°C por 24 horas para a completa secagem dos polissacarídeos (FIGURA 4). O resíduo da filtragem foi submetido a novas incubações com o objetivo de otimizar o rendimento.



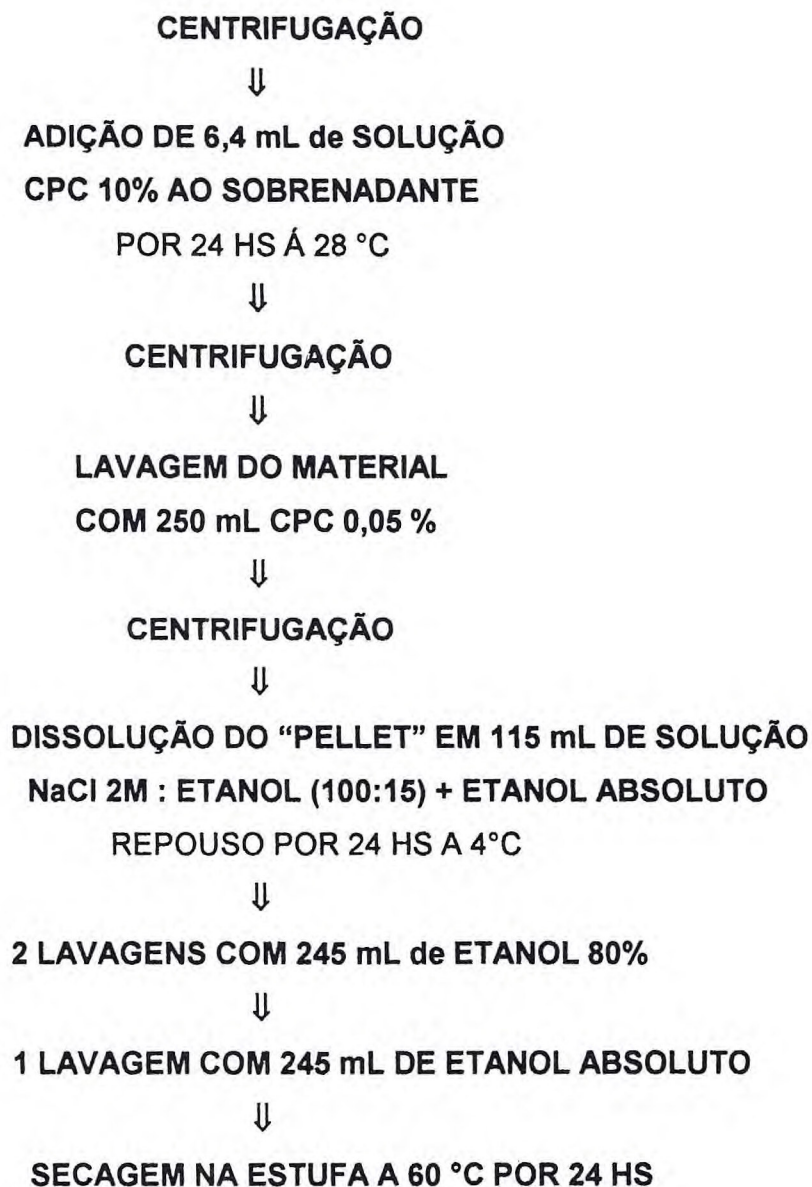


FIGURA 4: Fluxograma da extração de polissacarídeos sulfatados.

2.8. Determinação da atividade anticoagulante pelo teste do APTT (Tempo de Ativação Parcial da Tromboplastina Ativada)

Para a realização deste teste, foi utilizado plasma humano citratado oriundo de, pelo menos, 4 doadores. 100 µL de plasma humano foram incubados a 37 °C, por 3 minutos, juntamente com 100 µL de cefalina ativada. Em seguida, foram

adicionados 10 μ L de várias soluções (11, 8, 4, 2 mg/mL) do polissacarídeos de *S. platensis*, sendo a mistura deixada em banho-maria por mais um minuto. Em seguida, foi adicionado à mistura 100 μ L de uma solução de cloreto de cálcio 0,025M e cronometrado o tempo de coagulação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Cultivo da microalga *Spirulina platensis*

O cultivo foi realizado usando um meio de cultura alternativo, constituído de sal grosso comercial (30,0 g/L), NPK (1,0 g/L), superfosfato triplo (0,1 g/L) e bicarbonato de sódio (10,0 g/L) preparado com água doce pré-clorada. Após 24 horas de aeração constante, o pH se estabilizou em 9,6, a salinidade em 40 ppm, a temperatura foi mantida em torno de 30 °C e a iluminação em 2.200 Lux.

3.2. Análise do espectro de absorção da microalga *Spirulina platensis*

Através da análise do espectro de absorção (FIGURA 5), numa faixa de varredura de 400 nm a 700 nm, foi possível constatar a existência de dois picos de maior absorção pelos pigmentos da microalga em questão. O primeiro pico, com menor comprimento de onda (604 nm) é relativo à absorção pelas xantofilas e carotenos (pigmentos amarelo, vermelho e laranja). Entretanto, o pico de maior importância para o estudo em questão foi o segundo com absorbância 680 nm, pois foi nesse comprimento de onda ocorre maior absorção pelos pigmentos característicos das cianofícias, como a ficocianina (pigmento azul) , da microalga *Spirulina platensis*.

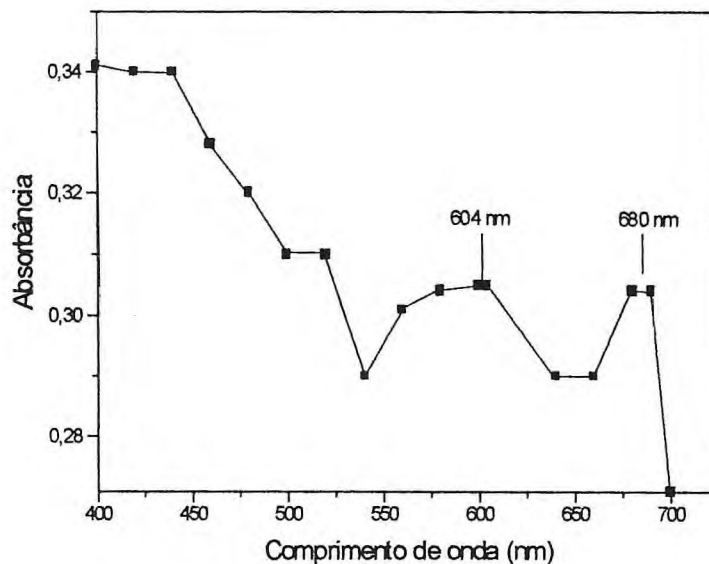


FIGURA 5: Espectro de absorção da microalga *Spirulina platensis*.

3.3. Curva de crescimento da microalga *Spirulina platensis* expressa em valores de absorbância

Inicialmente, a curva de crescimento da microalga *Spirulina platensis* foi expressa em valores de absorbância a 680 nm (FIGURA 6). Analisando o perfil da curva de crescimento de *S. platensis*, foi possível observar que houve uma nítida fase de indução no início do cultivo, logo após a repicagem, no 3º dia. A partir do 5º dia, o cultivo entrou em crescimento exponencial, o qual durou até o 15º dia. A partir do 15º dia, a cultura entrou em fase de diminuição do crescimento relativo. Nesta fase, o aumento do número de células é limitado pela quantidade de nutrientes presentes no meio de cultivo. Desta forma, a repicagem e filtragem das microalgas são realizadas imediatamente, pois a partir desse momento a taxa de mortalidade aumentará devido a uma maior competição por nutrientes e luz, prejudicando a qualidade da microalga. Com base nesse fato foi feita a filtragem e

a repicagem das microalgas no 20º dia, quando o cultivo foi mantido em garrações de 14 L.

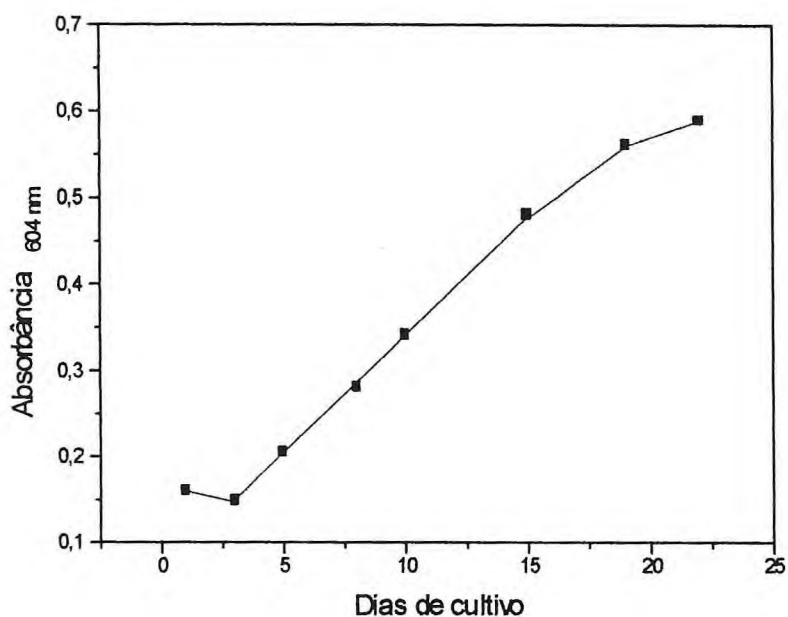


FIGURA 6: Curva de crescimento da microalga *Spirulina platensis* em meio de cultivo alternativo expressa na absorbância de 680 nm.

3.4. Relação entre absorbância e número de tricomas da microalga *Spirulina platensis*

A partir dos valores de absorbância e respectivos valores da contagem dos tricomas de *S. platensis* foi realizada uma análise de correlação linear. Foi verificada a existência de uma relação entre absorbância (680 nm) e o número de células em 5 µL de meio de cultura, cujo coeficiente da correlação "r" foi de 0,9 para um nível de significância de 95% ($\alpha = 0,05$). Em seguida, foi realizada uma regressão linear entre os valores de absorbância e o número dos tricomas (5µL) cuja equação resultante foi a seguinte $y = 18,74 + 603,11 x$, onde y = número de tricomas em 5 µl e x = absorbância em 680nm (FIGURA 7).

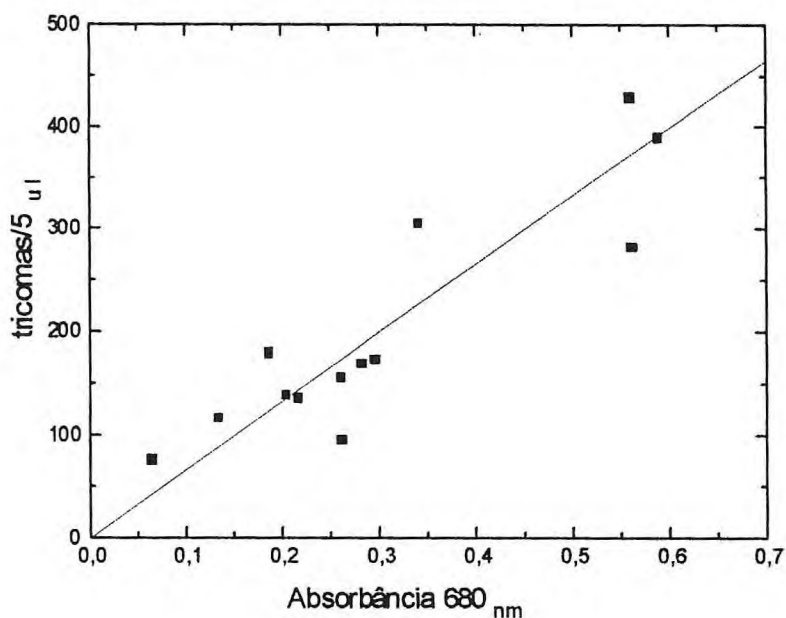


FIGURA 7: Reta de regressão linear obtida entre absorvância a 680 nm e o nº de tricomas/ 5µl da microalga *Spirulina platensis* em meio de cultivo alternativo.

O número de células em 5 µL, foi extrapolado para o número de tricomas por ml, sendo obtida a seguinte equação $y = 3748,6 + 120622,6 x$, onde o y = número de tricomas por mL e x = absorvância a 680 nm (FIGURA 8). A partir desse momento, o acompanhamento da densidade celular no cultivo foi feito através da leitura da absorvância a 680 nm e, através da equação de regressão, obteve-se o número de tricomas por mL.

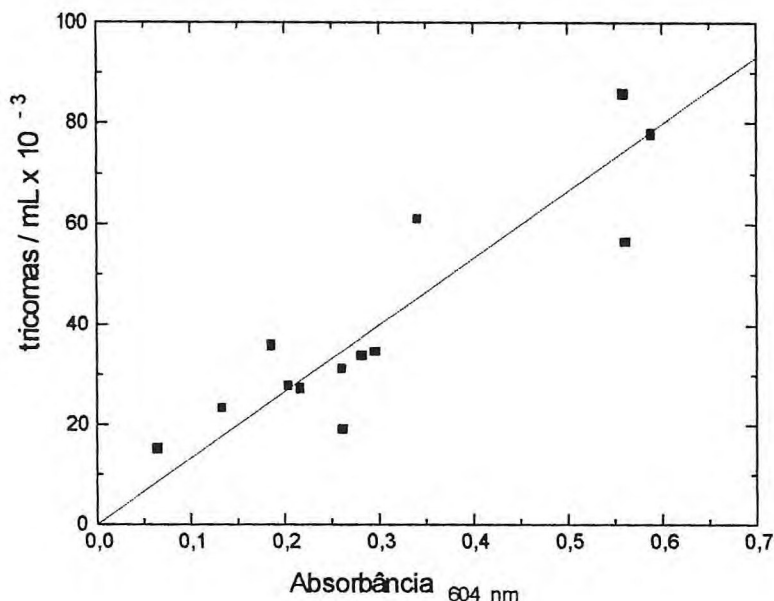


FIGURA 8: Retas de regressão linear obtida entre absorvância a 680 nm e o número de tricomas/ mL da microalga *Spirulina platensis* cultivada em meio alternativo.

3.5. Curva de crescimento da microalga *Spirulina platensis*

Com a determinação da relação entre absorvância e o número de tricomas por mL, obteve-se a curva de crescimento representada pela FIGURA 9. Conforme foi mencionado anteriormente, a cultura entrou em fase de diminuição do crescimento relativo no 15º dia (aproximadamente 60×10^3 tricomas/mL), sendo a biomassa deste cultivo, filtrada em tela de malha 60μ . Parte do material obtido da filtração foi inoculado para continuação do cultivo, e a outra parte foi congelada a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ e em seguida, seca ao sol para a extração de polissacarídeos sulfatados. O meio de cultivo, que foi filtrado nessa etapa, continha ainda tricomas menores que, devido ao tamanho, passaram pela malha. Esse meio filtrado foi reutilizado para a continuação do cultivo. Dessa forma, o mesmo meio de cultivo foi utilizado para duas produções. Provavelmente, o autosombreamento causado

pela alta densidade do cultivo foi o fator limitante para as microalgas não utilizarem todos os nutrientes na primeira produção.

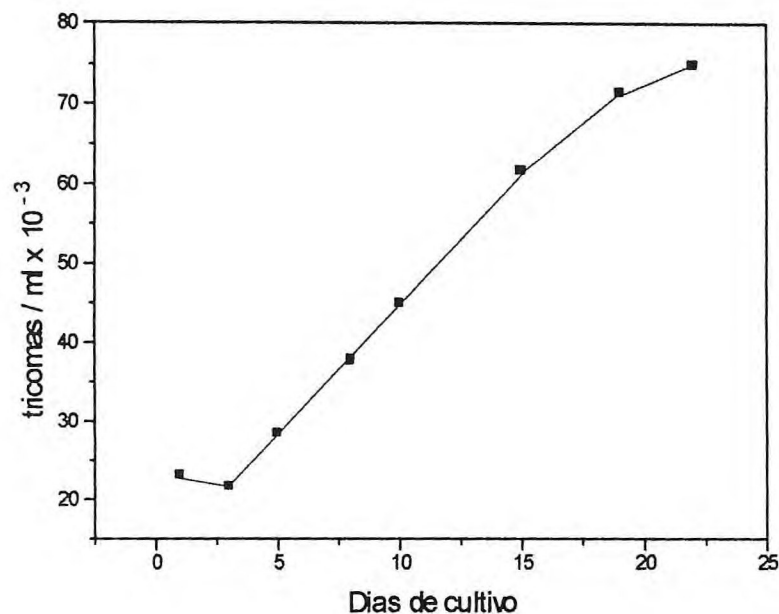


FIGURA 9: Curva de crescimento da microalga *Spirulina platensis* em meio de cultivo alternativo expressa em número de tricomas / mL x 10⁻³.

3.6. Extração de polissacarídeos sulfatados

Mediante o processo de extração realizado, conforme mencionado anteriormente, foi observado a presença de polissacarídeos sulfatados na microalga *Spirulina platensis* cultivada em laboratório. A partir de 2 g do material seco, foram obtidos os resultados descritos abaixo.

Nº de incubações	Polissacarídeos sulfatados em mg
1º	54
2º	59

3°	61
4°	39
5°	37
6°	34
7°	35
8°	31
9°	24

Os maiores rendimentos alcançados na extração de polissacarídeos sulfatados foram nas três primeiras incubações realizadas com a microalga, sendo provavelmente o número ideal de extrações. As outras incubações obtiveram pouca diferença entre os rendimentos obtidos. Estes polissacarídeos sulfatados foram utilizados para ensaios de atividade anticoagulante, apresentando uma baixa atividade, quando comparada com atividades obtidas para os polissacarídeos sulfatados de outras fontes testadas (FIGURA 10).

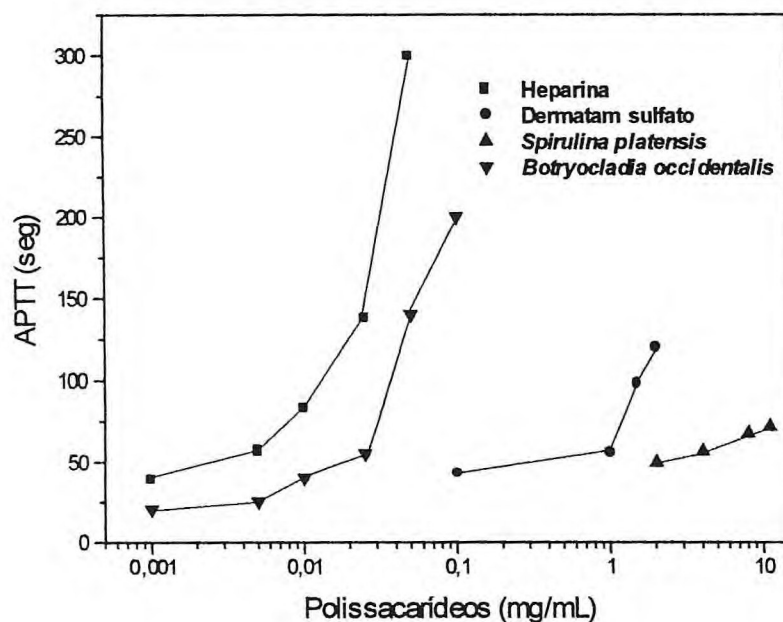


FIGURA 10: Curvas de atividade anticoagulante (APTT) de polissacarídeos sulfatados.

4. CONCLUSÕES

- A microalga *Spirulina platensis* obteve um excelente desenvolvimento no meio de cultura à base de sal grosso comercial e de fertilizantes agrícolas, NPK e superfosfato triplo. A uma temperatura média de 30°C e iluminação contínua de 2.200 lux.
- O estabelecimento de uma correlação entre absorbância a 680 nm e o número de tricomas por mL de *Spirulina platensis* possibilitou o acompanhamento do cultivo através de espectrofotometria.
- Os maiores rendimentos da extração de polissacarídeos sulfatados da microalga *S. platensis*, obtidos nesse trabalho, foram nas três primeiras incubações.
- A microalga *Spirulina platensis*, cultivada em laboratório, produz polissacarídeos sulfatados que possuem uma baixa atividade anticoagulante.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVIGAD, V. *Spirulina platensis* (Arthrospira). **Physiology, Cell-biology and Biotechnology**. Israel. Ed. Avigad Vonshak Ben-Curion University of the Negev, 1997, p.182.

ALFONSO, E.; NUÑEZ, C. M. Uso de nuevos fertilizantes para cultivar fitoplâncton. Cuba. **Revista de Investigaciones Marinas**. v. 6, n. 1, p. 1-8, 1985.

BOAJIANG, G. *et al.* South China Normal Univ. China. Pub. In Proc of Second Asia Pacific Conf. on Algae Biotech. Univ. of Malaysia, p. 33-38, 1994.

BUITRAGO, E.B. Concentración y preservación de microalgas como reserva de alimento de organismos marinos cultivables. **Red Nacional de Acuicultura**. Cuba. p. 47-53, 1998.

CHENG-WU, Zhang *et al.* Nanjing Univ. China. Pub. In Proc of Second Asia Pacific Conf. Algae Biotech. Univ. of Malaysia, p. 58, 1994.

COHEN, Z. *et al.* Fatty acid composition in different *Spirulina* strains under various environmental conditions. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2255, 1987.

FARIAS, W.R.L. *et al.* Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans: Isolation of a unique galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. **J. Biol. Chem.**, v.257, n. 38, p. 29299-29307, 2000.

FARIAS, W.R.L.; NAZARETH, R.A.; MOURÃO, P.A.S., Dual effects of sulfate D-galactans from the red algae *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation. **Thromb. Haemostasis**, v. 86, n.6, p. 1540-1546, 2001.

FARIAS, W.R.L. *et al.* Enhancement of growth in tilapia fingerlings (*Oreochromis niloticus*) by sulfated D-galactans extracted from marine algae. **Science Agricola**, recomendado para publicação.

GIWOJNA, P. Arrow crabs: Housebreaking the narrow snouted bristle horn. **Freshwater and Marine Aquarium**, v. 10, p. 96, 1987.

HAYASHI, *et al.* 1995. Beneficial effects of enteral fat administration on liver dysfunction, liver lipid accumulation, and protein metabolism in septic rats. **Kagawa Nutrition Univ. Japan in Journal of Nutrition Science and Vitaminology.**, v. 6, p. 657-669, 1995.

HAYASHI, *et al.* Enhancement of antibody production in mice by dietary *Spirulina platensis* Pub. In **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 83-87. Japan, 1996.

HIRAHASHI T. *et al.* Activation of the human innate immune system by *Spirulina*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 423-434, 2002.

KLEIN, V. L. M., GONZALEZ, A. A. N. Cultivo da microalga *Tetraselmis chuii* Prings em diferentes meios de cultura. **Ciênc. Agron.**, Fortaleza, v. 24, p. 91-100, 1983.

NANDEESHA, M.C *et al.* Growth performance of two Indian major carps, catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*) fed diets containing different levels of *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 80, p.117-120, 2001.

OLIVEIRA, A. A. G.; KOENING, L. L. Crescimento exponencial de *Tetraselmis chuii* com fertilizantes orgânicos. **Arq. Biol. Tecnol.** v. 27, n. 3, p. 55, 1984.

QUERESHI, M. *et al.* Poultry Science Assoc. Dept. of Poultry Science, North Carolina State, NC. Pub. In **Journal of Poultry Science**, v. 17, p.73-46, 1994.

SESHADRI, C.V. All India Coordinated Project on Spirulina. Shri Amm Murugappa Chettiar Research Center (MCRC). Madras, Índia, 1993.

SEYAA, T. A **Spirulina invade Cuba.**, disponível em <<http://www.tierramerica.net>> Acesso em 02 de dezembro de 2003.

