

Desenvolvimento de micropartículas de alginato de cálcio para imobilização de *Chlorella vulgaris*

Development of calcium alginate microparticles for immobilization of *Chlorella vulgaris*

Felipe de Albuquerque Santos
felipealb11@hotmail.com
Universidade Tecnológica
Federal do Paraná, Ponta Grossa,
Paraná, Brasil.

Alessandra Cristine Novak
Sydney
alessandrac@utfpr.edu
Universidade Tecnológica
Federal do Paraná, Ponta Grossa,
Paraná, Brasil.

RESUMO

A microalga *Chlorella vulgaris* é amplamente estudada e comercializada. Os custos de produção de microalgas devem ser continuamente reduzidos, visando aumentar a sua competitividade. O objetivo do presente estudo foi analisar a viabilidade de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*, aspirando diminuir os custos com a recuperação das suas células, que poderiam ser simplesmente filtradas ao invés de centrifugadas (método convencional). Uma das alternativas para recuperação das células é o método de imobilização celular. Dentre os métodos de imobilização, o método de gelificação iônica é baseado no gotejamento de alginato de sódio sobre solução de cloreto de cálcio, formando alginato de cálcio, que produz uma estrutura em rede tridimensional. A estabilidade, rigidez e esfericidade adequadas das partículas são condições fundamentais para o fluxo de nutrientes entre o meio e as células. O procedimento foi realizado em fluxo laminar com uma bomba peristáltica a 31 rpm, comsaída da solução para gotejamento por ponteira de micropipeta de 200µL, inclinada 45° sobre a solução de cloreto de cálcio 125mM, e fluxo de ar proveniente do biorreator com vazão de 10L.min⁻¹. Depois de encapsuladas, as partículas obtidas foram colocadas em frasco Erlenmeyer contendo meio de cultivo (MBM – Meio Bristol modificado), e outro frasco, contendo apenas células livres e meio de cultivo, foi utilizado como controle. Os cultivos foram mantidos a 25°C, em fotoperíodo 12h:12h durante 7 dias. O desenvolvimento de micropartículas para imobilização de *Chlorella vulgaris* possibilita estudos sobre a aplicação da mesma no tratamento de resíduos, suplementação alimentar e produção de energia.

PALAVRAS-CHAVE: Imobilização, *Chlorella vulgaris*, Downstream.

ABSTRACT

The microalgae *Chlorella vulgaris* is widely studied and commercialized. The costs of producing microalgae should be continuously reduced in order to increase their competitiveness. The objective of the present study was to analyze the viability of growth of *Chlorella vulgaris*, in order to reduce the costs of recovering its cells, which could be simply filtered instead of centrifuged (conventional method). One of the alternatives for cell recovery is the cell immobilization method. Among the immobilization methods, the ionic gelling method is based on the drip of sodium alginate on calcium chloride solution, forming calcium alginate, which produces a three-dimensional network structure. Suitable stability, stiffness and sphericity of the particles are fundamental conditions for the flow of nutrients between the medium and the cells. The procedure was carried out in laminar flow with a peristaltic pump at 31 rpm, with solution outlet for dripping by a micropipette tip of 200µL, inclined 45° on the solution of calcium chloride 125mM, and air flow from the bioreactor with 10L.min⁻¹. After encapsulation, the obtained particles were placed in a flask containing culture medium (MBM), and another flask, containing only free cells and culture medium, was used as a control. Cultures were maintained at 25 ° C, in photoperiod 12h: 12h for 7 days. The development of microparticles for immobilization of *Chlorella vulgaris* enables studies on its application in waste treatment, food supplementation and energy production.

KEYWORDS: Immobilization, *Chlorella vulgaris*, Downstream.

Recebido: 30 ago. 2018.

Aprovado: 04 out. 2018.

Direito autorial:

Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.





1 INTRODUÇÃO

A cada dia que passa, aumenta-se a necessidade do uso de ativos biotecnológicos devido a sua grande aplicação na indústria. Nesse contexto, a microalga *Chlorella vulgaris* tem uma importância fundamental, pois é utilizada na fabricação de suplementos alimentares ricos em ferro e no tratamento de resíduos abundantes em nitrogênio e fósforo. Um dos problemas atuais é a obtenção e a reutilização desse ativo, visto que o método tradicional de obtenção é a centrifugação. Entretanto, essa é uma técnica que demanda muita energia elétrica e alto investimento na compra do equipamento. Devido a esse fato, são utilizados métodos alternativos de obtenção e reutilização do microrganismo, como a imobilização celular. Este trabalho tem por objetivo desenvolver micropartículas de alginato de cálcio (na faixa de 1 μ m a 999 μ m) para imobilizar a microalga *Chlorella vulgaris* capazes de permitirem o desenvolvimento celular e que possam ser recuperadas por peneiramento e reutilizadas.

2 MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no laboratório de Fermentações na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, câmpus Ponta Grossa.

2.1 CULTIVO DE CULTURA DE CÉLULAS

As células da microalga *Chlorella vulgaris* foram cultivadas em MBM (Meio Bristol Modificado) à temperatura de 25 \pm 1°C, sob iluminação de 2 lâmpadas fluorescentes de 15W, fluxo luminoso de 788,8 lux cada, em uma sala do laboratório de Fermentações da UTFPR, câmpus Ponta Grossa em um Erlenmeyer de 6L.

2.2 CENTRIGAÇÃO DAS CÉLULAS DE *Chlorella vulgaris*

No fluxo laminar, foi retirada uma alíquota de 800mL de um Erlenmeyer contendo 6L do cultivo de cultura inicial. Essa alíquota foi distribuída em 16 tubos Falcon e centrifugada a 5000 rpm durante 30 minutos (Marcon, 2005). Descartou-se o sobrenadante, deixando 12,5mL em cada tubo Falcon. De cada tubo, retirou-se uma amostra de 6,25mL para adicionar na solução de 100mL de alginato 3%, totalizando uma solução de alginato acrescida do ativo 1,5%. Ainda foram misturados 6,25mL restantes do ativo de cada tubo Falcon a 100mL de água destilada. Dessa maneira, preparou-se a solução para produzir micropartículas e a solução de controle.

2.3 PREPARAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS COM *Chlorella vulgaris* IMOBILIZADA

No fluxo laminar, foi montado um sistema contendo uma solução 1,5% de alginato acrescida de células de *Chlorella vulgaris* a uma altura de 33cm que passava pela mangueira da bomba peristáltica à 31rpm e caía sobre uma solução de CaCl₂ 125mM, através de uma ponteira de micropipeta 200 μ L inclinada a 45° e inserida dentro do tubo de fluxo de ar proveniente do biorreator. A distância da mangueira proveniente do biorreator até o béquer contendo a solução de CaCl₂ é de 1,5m. A altura da seringa até a superfície da solução de CaCl₂ foi de 3cm. O esquema do sistema foi baseado em Bressel (2007) e está representado na figura 1.

As microalgas encapsuladas foram deixadas em banho iônico (CaCl₂) por 30 minutos para cura, conforme indicado por Costa (2014). Posteriormente, as micropartículas foram filtradas com peneira metálica, lavadas com água destilada para remover CaCl₂ não-ligado e colocadas em 750mL de MBM.

Figura 1. Sistema gerador de micropartículas. a) Solução de alginato 1,5% acrescida de *Chlorella vulgaris*. b) Mangueira da bomba peristáltica. c) Bomba peristáltica Watson-Marlow modelo 120S. d) Ponteira de micropipeta 200 μ L. e) Solução de CaCl₂ 125mM. f) Mangueira de 1,5m provida do biorreator. g) Suportes auxiliares.



Fonte: Autoria própria (2018).

2.4 CULTIVO DAS MICROPARTÍCULAS IMOBILIZADAS E DA SOLUÇÃO DE CONTROLE

As micropartículas foram filtradas com auxílio de uma peneira metálica autoclavada e colocadas em um Erlenmeyer contendo 750mL de MBM. A solução de controle (100mL de células livres + 100mL de água destilada) foi adicionada em outro Erlenmeyer contendo 750mL de MBM. Ambas as amostras foram expostas às mesmas condições: temperatura de 25 \pm 1°C, sob iluminação de 2 lâmpadas fluorescentes de 15W, fluxo luminoso de 788,8 lux cada, em uma sala do laboratório de Fermentações da UTFPR, câmpus Ponta Grossa.

2.5 REDISSOLUÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

As células de *Chlorella vulgaris* imobilizadas foram redissolvidas com citrato de sódio 50mM, assim como sugerido por Simpson et al (2003), e centrifugadas durante 30 minutos à 5000rpm para posterior realização de contagem do número de células.

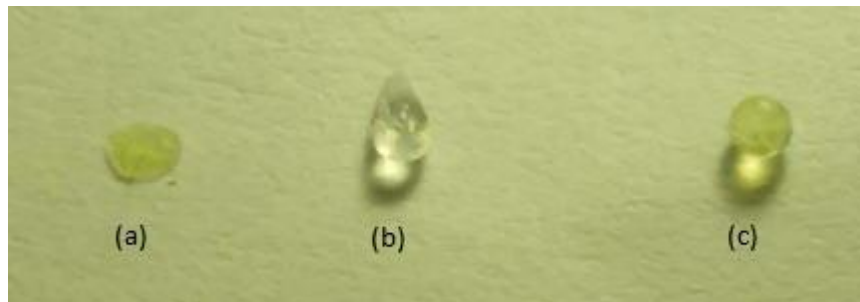
3 RESULTADOS

Tabela 1 – Esfericidade da micropartícula em função da altura do bico gotejador.

Altura de gotejamento (cm)	Esfericidade
7	Partícula achatada
5	Partícula com cauda
3	Partícula esférica

Fonte: Autoria própria (2018).

Figura 2 - Micropartículas com diferentes alturas de gotejamento: (a) com altura de 7cm; (b) com altura de 5cm; (c) com altura de 3cm.



Fonte: Autoria própria (2018).

Tabela 2 - Relação do fluxo de ar e da bomba peristáltica com a esfericidade das micropartículas.

Fluxo de ar (L.min ⁻¹)	Fluxo da bomba peristáltica (mL.h ⁻¹)	Esfericidade das partículas
8,0	140	Micropartículas com cauda
8,5	140	Micropartículas com cauda
9,0	140	Micropartículas com formato de gota
9,5	140	Micropartículas com formato de gota
10,0	140	Micropartículas esféricas

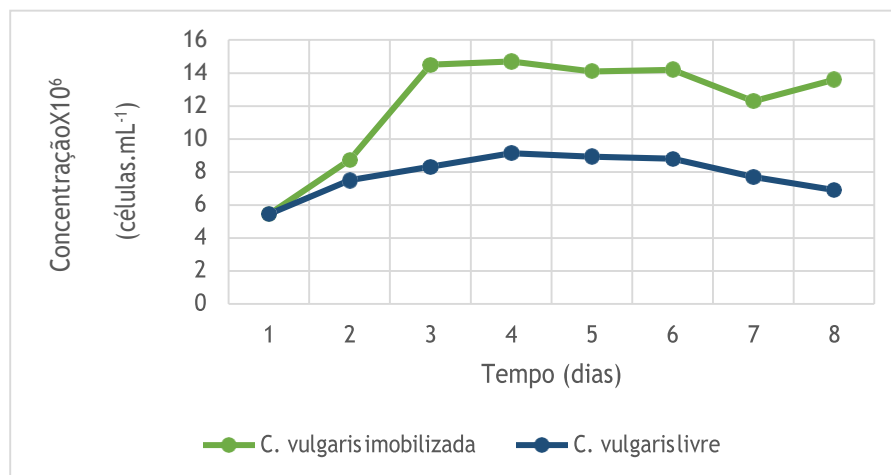
Fonte: Autoria própria (2018).

Tabela 3 - Combinações de concentração de Alginato de sódio e Cloreto de Cálcio.

Concentração de Alg. de sódio (%)	Concentração de Cloreto de cálcio (M)	Resistência
1	0,125	Micropartículas muito frágeis
2	0,125	Micropartículas estáveis
3	0,125	Micropartículas resistentes

Fonte: Autoria própria (2018).

Figura 3 - Gráfico comparativo da microalga imobilizada com a microalga livre.



Fonte: Autoria própria (2018).

4 DISCUSSÃO

A melhor altura de gotejamento encontrada foi de 3 cm. Os resultados demonstram que quanto maior a altura da ponteira, mais irregular o formato da micropartícula. Isso pode ser explicado pelo fato de que quanto maior a altura, maior a velocidade de impacto da gota com a superfície de CaCl_2 , segundo Teixeira (2011).

Após a realização dos testes, o fluxo da bomba peristáltica foi fixado em 140mL.h^{-1} . De acordo com Costa (2014), quanto maior o fluxo da bomba peristáltica, mais irregulares se tornam as micropartículas.

Para definir a concentração de alginato de sódio, testou-se três concentrações: 1%, 2% e 3%, sendo a concentração de 3% ideal para formação de partículas rígidas. Conforme Zimmermann (2001), isso se deve ao fato de que concentrações mais elevadas de alginato tornam a micropartícula mais rígida devido à formação de redes tridimensionais mais complexas.

O pH ideal de crescimento da microalga *Chorella vulgaris* fica em torno de 5,5 a 8,0 e qualquer mudança afeta diretamente na sua curva de crescimento (MARINHO et al., 2017). O pH medido do meio de cultivo foi 7,0. A curva seguiu a tendência de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* inserida em um meio com esse pH.

5 CONCLUSÃO

De maneira geral, as micropartículas produzidas obtiveram o tamanho de diâmetro médio de $890\mu\text{m}$, estando dentro da faixa de $1\mu\text{m}$ a $999\mu\text{m}$. A busca de uma concentração de alginato e cloreto de cálcio, além de uma altura de gotejamento ideal, permitiram a formação de micropartículas esféricas e rígidas e que permitiram o correto crescimento da microalga.



6 REFERÊNCIAS

Avaliação do crescimento da *Chlorella vulgaris* em diferentes pH objetivando sua inserção na matéria-prima do biodiesel. **XVII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2017.**

BRESSEL, Tatiana Azevedo Bastian. **Sistema gerador de microcápsulas de alginato. 2007. 70 f. Tese (Doutorado) - Curso de Genética e Biologia Molecular, UFRGS, Porto Alegre, 2007.**

COSTA, Bianca Souza da. **Micropartículas por gelificação iônica recobertas com gelatina de peixe e isolado proteico de soja. 2014. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas, 2014.**

MARCON. **Remoção de coliformes fecais com microalgas (*Chlorella*) imobilizadas em matriz de alginato de cálcio. 2005. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Sanitária, Ufrn, Natal, 2005.**

SIMPSON, Nicholas E. et al. NMR properties of alginate microbeads. **Biomaterials**, [s.l.], v. 24, n. 27, p.4941-4948, dez. 2003. Elsevier BV.

TEIXEIRA, Vânea Ferreira Tôrres. **Estudo da obtenção de biocatalisadores com matrizes de alginato de cálcio visando a produção de biodiesel. 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Produção Vegetal, UENF, Campos dos Goytacazes, 2011.**

ZIMMERMANN, Ana Lucia Santos. **Desenvolvimento e avaliação de micropartículas contendo microrganismos viáveis utilizados como bioinseticida. 2001. 133 f. Tese (Doutorado) - Curso de Farmácia, USP, São Paulo, 2001.**