

Encapsulamento de *Spirulina maxima* em esferas de alginato para cultivo em biorreator agitado

Spirulina maxima encapsulation in alginate beads for agitation bioreactor cultivation

RESUMO

Rafaela Carriel Pontes
rpontes@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

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

Sabe-se que a cianobactéria *Spirulina maxima* possui uma composição rica em nutrientes essenciais para manutenção do corpo humano e de outros animais e vem sendo explorada principalmente pelas áreas alimentícia e farmacêutica. Dentre as técnicas convencionais da indústria está o cultivo de microrganismos em biorreatores, fornecendo nutrientes adequados para favorecer o crescimento microbiano. Foram feitos ensaios comparativos de cultivo da *Spirulina maxima* em biorreator de tanque agitado e *airlift* para analisar o impacto das condições de cultivo e a influência delas no crescimento, verificando que as variações e aumento de rotação em rpm e as altas tensões de cisalhamento sofridas permitiram o crescimento celular sem ocasionar quebra da estrutura celular microbiana.

PALAVRAS-CHAVE: *Spirulina*. Biorreator. Indústria.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

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



ABSTRACT

Cyanobacteria *Spirulina maxima* is known to have a composition rich in nutrients essential for the maintenance of the human body and other animals and has been mainly exploited by the food and pharmaceutical areas. Among the industry's conventional techniques is the cultivation of microorganisms in bioreactors, providing adequate nutrients to favor microbial growth. Comparative trials of *Spirulina maxima* cultivation were performed in airlift and agitated tank bioreactor to analyze the impact of the cultivation conditions and their influence on growth, verifying that the variations and increase of rotation in rpm and the high shear stresses allowed the cell growth without causing breakdown of microbial cell structure.

KEYWORDS: *Spirulina*. Bioreactor. Industry.

INTRODUÇÃO

As cianobactérias são organismos procarióticos e realizam fotossíntese. Recebem esse nome devido a sua secreção de pigmentos azul-esverdeado (ciano) e tem morfologia celular variada (TORTORA, 1982). A facilidade de cultivo *in vitro* e custo-benefício de produtividade facilita o cultivo em laboratório.

Diferentes espécies de *Spirulina* vêm sendo exploradas devido à sua composição. Rica em proteínas, aminoácidos essenciais, vitaminas, minerais, antioxidantes, ácidos graxos e outros (LEHNINGER, 1985). É conhecida a sua bioatividade tornando-se fonte farmacêutica em potencial, além de ser muito usada em suplementação alimentar (AMBROSI, 2008).

A *Spirulina* sp. é rica em proteínas (de 50 a 70%), incluindo aminoácidos essenciais e não essenciais, sua parede celular é composta de mucopolissacarídeos (açúcares simples e proteínas) de fácil digestibilidade (MOURTHÉ, 2010). Esse aspecto eleva a fragilidade microbiana e dificulta o cultivo em condições de estresse excessivo (agitações elevadas, falta de luminosidade e outros) (MATSUDO, 2006).

A *Spirulina maxima* pode ser encapsulada objetivando melhor controle celular do crescimento da cianobactéria e para facilitar a recuperação da biomassa. O encapsulamento facilita a produção em larga escala desse microrganismo, com aplicações industriais. Existem vários materiais que podem ser usados para encapsulamento, dentre eles o alginato.

Tradicionalmente a *Spirulina maxima* é cultivada com pouca ou nenhuma agitação mecânica, pois acredita-se que sua morfologia seja sensível a agitação (MATSUDO, 2006). O objetivo desse trabalho é detectar a fragilidade da parede celular da *Spirulina maxima* e comparar cultivo celular em reator agitado e *airlift*.

MATERIAL E MÉTODOS

A *Spirulina maxima* é mantida em meio de cultivo líquido, contendo alta concentração de sais que mantém o pH alcalino (HENRARD, 2012). O meio de cultivo para crescimento da *Spirulina maxima* é denominado Zarrouk e sua composição (em g/L) é: MgSO₄.7H₂O: 0,2; K₂HPO₄: 0,5; NaCl: 1; FeSO₄.7H₂O: 0,01; NaHCO₃: 16; K₂SO₄: 1; CaCl₂: 0,4; C₁₀H₁₆O₈N₂: 0,08; EDTA dissódico: 0,01. Para manter o cultivo mãe de *Spirulina maxima* em boas condições de multiplicação, deve-se garantir que há constante fornecimento de nutrientes que permitam o desenvolvimento microbiano. É feito o processo de corte, que consiste na troca (a cada 15 dias) de aproximadamente 1L do material contido no cultivo mãe por 1L de meio de cultivo novo e estéril.

Utilizou-se o método do peso seco para determinação de biomassa. Foram retiradas amostras de 20 mL de cada meio inoculado e colocou-se em tubos falcon previamente secos e pesados (mantidos 24h na estufa de 80° C e resfriados por 15 minutos em dessecador). Esse material foi centrifugado durante 15 minutos a 5000 rpm (com F= 3577g) na centrífuga. O sobrenadante foi separado em outro frasco

e os tubos com a biomassa foram levados para a estufa de 80°C por 24h e então aferiu-se a massa novamente, com o objetivo de obter a biomassa presente na amostra.

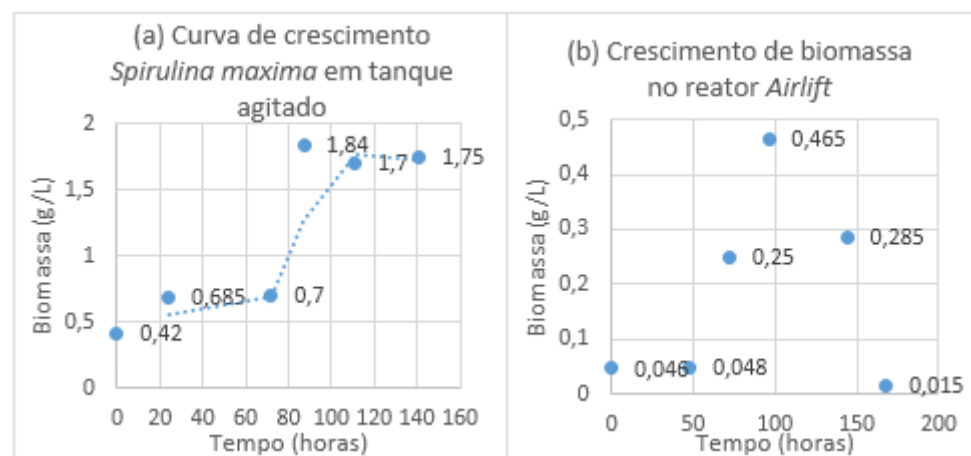
Cultivo em biorreator: preparou-se 200 mL de meio de cultivo, com 40 mL de inóculo. Esse material foi mantido em ambiente com iluminação e temperatura controlados por 15 dias para crescimento da *Spirulina maxima* inoculada no reator. O reator é previamente autoclavado com 2L de meio de cultivo (pH=10) 200 mL do cultivo da *Spirulina maxima* foi inoculado no reator, nos dois ensaios (tanque agitado e *airlift*) em reator: retirou-se 10 amostras (a cada 24h) para determinação de peso seco. O reator de tanque agitado teve 10 amostras entre 10 a 1090 rpm.

A composição da *Spirulina maxima* é rica em proteínas e para determinar quebra da parede celular dosa-se proteínas totais presentes no meio utilizando o método de Bradford (CURSO DE VERÃO USP, 2019). Preparou-se uma curva padrão proteica utilizando BSA- Albumina bovina com diferentes concentrações com (500, 650, 750, 1000 e 1500) µg/mL para construção da curva. Adicionou-se 80 µL de cada amostra (amostras do reator e das soluções de BSA) com 4 mL do reagente de Bradford, deixando reagir por 5 min e depois tirou-se a leitura de cada amostra no espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No gráfico 1 estão ilustradas as curvas de crescimento da *Spirulina maxima* em: (a) reator de tanque agitado; (b) reator *airlift*; fazendo um comparativo da eficiência de crescimento de biomassa nos dois ensaios.

Gráfico 1 – Curva de crescimento microbiano de cultivo em biorreator em: (a) Reator de tanque agitado; (b) Reator *airlift*.



Fonte: Autoria própria (2019).

Como pode ser visto no gráfico 1 (a) observa-se que há crescimento de biomassa (em g/L) aumenta com o passar do tempo, mesmo com aumento da velocidade de rotação do biorreator de 10 até 1090 rpm. De 0 a 90h há um crescimento de biomassa de 0,42 g/L até 1,84 g/L, ocasionando um aumento de biomassa de 4,3 vezes. Observa-se o comportamento de uma curva de crescimento contendo uma fase lag, exponencial, estacionária e de morte celular.

Todavia, esse é um comportamento de uma curva crescimento microbiano normal, sendo natural o declínio da curva quando não há alimentação do meio e passa a faltar nutrientes no cultivo, impedindo o crescimento do microrganismo.

Em termos de concentração de biomassa, o reator *Airlift* obteve um aumento significativo em relação ao reator com agitação contínua, no período de 0 a 90h a concentração celular inicial é de 0,046 g/L e a final é 0,46 g/L conferindo um aumento de biomassa de 10 vezes conforme pode ser visto no gráfico 1 (b). O reator *airlift* oferece tensão cisalhamento menor pela ausência das pás que garantem uma homogeneização, bombeamento e quebra mecânica do oxigênio fornecido no meio (GUIMARÃES, 2012). Ocorreu adesão das células nas paredes devido a movimentação do cultivo, sendo a homogeneização fundamental no processo, porque a falta de um nutriente é crucial para o crescimento de microrganismos (MÉNDEZ, 2019).

As velocidades de agitação permitiram analisar que mesmo com grandes velocidades houve aumento de biomassa sem causar danos físicos a célula. Evidenciando que as condições de cultivo têm grande influência no crescimento microbiano como a presença ou ausência de determinados nutrientes ou fatores de estresse (como agitação mecânica), podendo delimitar fatores como a redução da taxa de crescimento. A figura 1 mostra a morfologia da célula de *Spirulina maxima* com o passar do tempo de cultivo.

Figura 1 – Morfologia da *Spirulina maxima* durante o cultivo em biorreator de tanque agitado com aumento microscópico de 400x.



Fonte: Autoria própria (2019).

A figura 1 mostra a morfologia da cianobactéria com o aumento das rotações nos dias 1,4 e 7, observa-se que a estrutura microbiana sofreu pouca influência. Indicando que se houve quebra da parede celular da *Spirulina* não afetou a estrutura morfológica com o aumento da rotação em rpm.

Na determinação de proteínas totais, foram feitas leituras das amostras iniciais, médias e finais para os dois ensaios no biorreator. Todas as amostras do reator de tanque agitado quanto e do reator *airlift* foram analisadas com o método de Bradford para determinação de proteínas e os valores foram iguais a zero. Indicando que não houve quebra celular da cianobactéria durante os ensaios em reator.

CONCLUSÃO

Os experimentos em biorreator mostraram o impacto das condições de cultivo e a influência delas no crescimento microbiano. No reator agitado, foi possível determinar que mesmo com as variações e aumento de rotação em rpm e as altas tensões de cisalhamento sofridas houve crescimento celular, além de impedir sedimentação de biomassa. No caso do reator *airlift*, apesar da menor tensão de cisalhamento oferecida foi possível determinar um maior crescimento celular. Nos dois casos, a dosagem de proteínas totais presentes no sobrenadante foi zero, indicando que nenhum dos ensaios em reator há rompimento da barreira celular da *Spirulina maxima*. Para trabalhos futuros serão testados os efeitos do cultivo de partículas imobilizadas e cultivadas em reator.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Tecnológica Federal do Paraná, por permitir uso das instalações para realização de pesquisa e ao meu colega Felipe Albuquerque por me ensinar e auxiliar pacientemente no laboratório.

REFERÊNCIAS

AMBROSI, M. A. et al. Propriedades de saúde de *Spirulina spp.* **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Rio Grande do Sul, v. 29, n. 2, p.109-117, 29 jul. 2008. Bimestral.

GUIMARÃES, Luís Pedro Costa. **Projeto e construção de um fotobiorreator para crescimento acelerado de microalgas**. Dissertação de mestrado- Universidade do Minho, p. 118, 2012.

HENRARD, Adriano. **Cultivo semicontínuo das microalgas *Cyanobium sp.* e *Chlorella sp.*** Dissertação de Mestrado – Rio Grande do Sul. 132 p., 2009.

LEHNINGER, Albert Lester; NELSON, David L; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica**. São Paulo, SP: Sarvier, 1985. 725 p.

MATSUDO, Marcelo Chuei; PAULO, São. **Cultivo de *Spirulina platensis* por processo descontínuo alimentado repetitivo utilizando uréia como fonte de nitrogênio**. p. 103, 2006.

MÉNDEZ, ARTURO SOLIS. Estudo das variáveis de reatores (RACEWAY E VERTICAL AGITADO) PARA PRODUÇÃO DE *SPIRULINA PLATENSIS*. **Tese de Doutorado**. São Paulo, SP: Unesp, 2019.

MOURTHÉ, KARYNE. OBTENÇÃO DE BIOMASSA DE *Arthrospira platensis* (SPIRULINA) UTILIZANDO DO SORO DE LEITE. **Dissertação de mestrado** – Minas Gerais, 2010.

Curso de Verão. **XIV Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular: Extração e Quantificação de proteínas.** Atualizada. Portal do Conhecimento do Departamento de Bioquímica: Departamento de Bioquímica USP, 2019. Pertence ao Instituto de Química. Disponível em:
http://cursobioquimica.iq.usp.br/paginas_view.php?idPagina=172&idTopico=656#.XYqvJtJKjMy. Acesso em: 20 ago. 2019

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 1982. 827 p.