

## Cultivo e caracterização de *Chlorella vulgaris* em micropartículas de alginato de cálcio em meio de cultivo à base de licor negro

## Cultivation and characterization of *Chlorella vulgaris* in calcium alginate microparticles in black liquor culture medium

### RESUMO

**Felipe de Albuquerque Santos**  
[felipe.1995@alunos.utfpr.edu.br](mailto:felipe.1995@alunos.utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

**Alessandra Cristine Novak Sydney**  
[alessandrac@utfpr.edu.br](mailto:alessandrac@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

A microalga *Chlorella vulgaris* é amplamente estudada e comercializada. Os custos de meios de cultivo tradicionais são elevados e precisam ser continuamente reduzidos, visando aumentar sua competitividade. Nesse sentido, o licor negro apresenta-se como fonte alternativa de nutrientes para o cultivo da *C. vulgaris*, visto que é um subproduto da indústria de papel e celulose e apresenta baixo custo. O objetivo principal deste estudo foi determinar a proporção ideal de licor negro e Meio Bristol Modificado (MBM) para cultivo de *Chlorella vulgaris* em micropartículas de alginato de cálcio, visando a facilidade de reciclo da microalga com peneiramento de micropartículas e potencialidade de propriedades antioxidantes. A metodologia utilizada foi gelificação iônica, através do método de gotejamento, no qual uma solução contendo alginato e *C. vulgaris* foi gotejada sobre uma solução de Cloreto de Cálcio 0,125M. As amostras foram subdivididas em quantidades iguais de micropartículas e inseridas em frascos Erlenmeyer contendo licor negro suplementado com Meio Bristol Modificado (MBM). Os cultivos foram mantidos a 25°C, em fotoperíodo 12h:12h, durante 15 dias. A microalga *C. vulgaris* apresentou maior crescimento no número de células na proporção 40% MBM e 60 % licor negro e as células imobilizadas apresentaram maior teor de compostos fenólicos totais.

**PALAVRAS-CHAVE:** Downstream. Imobilização. Subprodutos.

**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

The microalgae *Chlorella vulgaris* is widely studied and marketed. The costs of traditional culture medium are high and need to be continually reduced to increase its competitiveness. In this way, black liquor is an alternative source of nutrients for the cultivation of *C. vulgaris*, as it is a byproduct of the pulp and paper industry and has a low cost. The main objective of this study was to determine the ideal proportion of black liquor and Modified Bristol Medium (MBM) for cultivation of *C. vulgaris* in calcium alginate microparticles, aiming at the ease of microalgae recycling with microparticle sifting and potential antioxidant properties. The methodology used was ionic gelation through the drip method, in which a solution containing alginate and *C. vulgaris* was dripped on a 0.125M Calcium Chloride solution. The samples were subdivided into equal amounts of microparticles and inserted into Erlenmeyer flasks containing black liquor supplemented

with Modified Bristol Medium (MBM). The cultures were kept at 25°C, in photoperiod 12h:12h, for 15 days. The microalgae *C. vulgaris* showed higher growth in the number of cells in the proportion 40% MBM and 60% black liquor and the immobilized cells showed higher contents of total phenolic compounds.

**KEYWORDS:** Downstream. Immobilization. Byproducts.

## INTRODUÇÃO

Uma das microalgas em evidência atualmente é a *Chlorella vulgaris*, a qual está em destaque no campo de pesquisas devido ao seu potencial econômico, visto que é muito utilizada na produção de suplementos alimentares à base de ferro e no tratamento de resíduos abundantes em nitrogênio e fósforo. O meio de cultivo tradicional utilizado para cultivar *C. vulgaris* é o Meio Bristol Modificado (MBM). A necessidade de meios de cultivo mais baratos é uma das problemáticas atuais no que tange o cultivo de microalgas. Nesse sentido, o licor negro, proveniente da indústria de papel e celulose, apresenta-se como fonte alternativa de nutrientes devido à sua rica composição iônica e seu baixo valor econômico. A imobilização serve como técnica suporte para facilitar o peneiramento e a reutilização do ativo biológico inserido nesse meio. O objetivo principal deste estudo foi determinar a proporção ideal de licor negro e Meio Bristol Modificado (MBM) para cultivo de *Chlorella vulgaris* em micropartículas de alginato de cálcio, a fim de avaliar o crescimento da microalga e possíveis efeitos antioxidantes.

## MATERIAL E MÉTODOS

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

### a) Centrifugação das células de *Chlorella vulgaris*

No fluxo laminar, foi retirada uma alíquota de 800mL de um Erlenmeyer contendo 6L do cultivo inicial. Essa alíquota foi distribuída em 16 tubos Falcon e centrifugada a 5000 rpm durante 30 minutos. Esse método foi baseado em Marcon (2005) com a diferença no tempo de centrifugação. 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;

### b) 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* à uma altura de 33cm bombeada a 180mL.h<sup>-1</sup> e gotejada sobre uma solução de CaCl<sub>2</sub> 125mM, através de uma ponteira de micropipeta 200µL 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  $\text{CaCl}_2$  é de 1,5m. A altura da ponteira até a superfície da solução de  $\text{CaCl}_2$  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 ( $\text{CaCl}_2$ ) por 30 minutos para cura, assim como sugerido por Costa (2014). Posteriormente, as micropartículas foram filtradas com peneira metálica, lavadas com água destilada para remover  $\text{CaCl}_2$  não-ligado e inseridas em cada amostra;

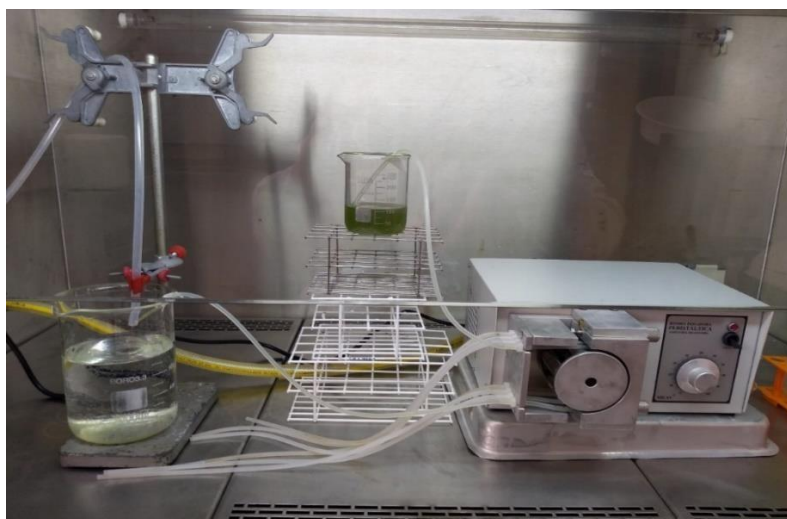
#### c) Redissolução das micropartículas

As células de *Chlorella vulgaris* imobilizadas foram redissolvidas com citrato de sódio 50mM, de acordo com Simpson et al (2003), e centrifugadas durante 30 minutos a 5000rpm para posterior realização de contagem do número de células;

#### d) Procedimento de extração

Para o caso das micropartículas, foram dissolvidas em citrato de sódio e centrifugadas a 5000 rpm. Descartou-se o sobrenadante. As células livres foram centrifugadas a 5000 rpm e descartou-se o sobrenadante. Em ambos os casos, a biomassa foi seca a 50°C em estufa durante 24h. Após isso, 0,1g de cada amostra foram misturados a 2mL de água e aquecidos durante 30 minutos a 80° C, de acordo com Hajimahmoodi (2009). Foi centrifugado a 5000rpm durante 30 minutos e utilizado o sobrenadante para posterior análise.

Figura 1 – Sistema gerador de micropartículas.



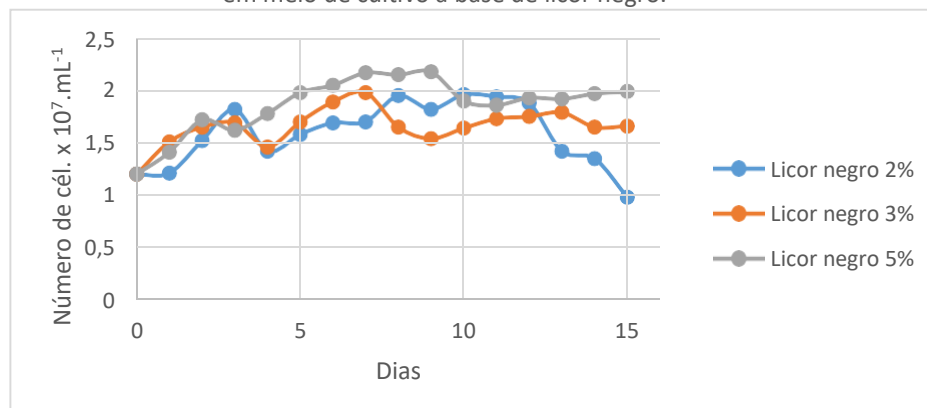
Fonte: Adaptado de Bressel (2007)

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em um primeiro momento, Novak (2018) sugere o teste em concentrações entre 2% e 5% para testes com microalgas, visto que o excesso de licor negro pode ser prejudicial ao crescimento das células. As células ficaram imobilizadas em micropartículas de alginato de cálcio durante 15 dias em quantidades iguais e sob

as mesmas condições nas três amostras. O resultado do crescimento do número de células está expresso na figura 2.

Figura 2 - Curva de crescimento de *Chlorella v.* imobilizada em alginato de cálcio em meio de cultivo à base de licor negro.



Fonte: Autoria própria (2019).

As células imobilizadas no meio de cultivo com licor negro 5% apresentaram maior taxa de crescimento. Um dos fatores relacionados a esse fato está ligado à quantificação iônica, na qual o íon  $\text{NO}_3^-$  apresenta-se em maior quantidade na amostra de licor negro 5%. A microalga *C. vulgaris* é um microrganismo que tem o íon nitrato como um de seus nutrientes limitantes, de acordo com Marcon (2005).

Uma das formas de melhorar esse cultivo é aproximar a quantidade iônica presente na amostra de licor negro 5% com a quantidade iônica presente em MBM puro. Para isso, foram realizadas 5 diferentes diluições de licor negro 5% suplementadas com diferentes proporções de MBM puro a fim de avaliar a melhor proporção entre licor negro 5% e MBM puro. Foi preparada uma solução controle com 100% MBM, de acordo com a tabela 1.

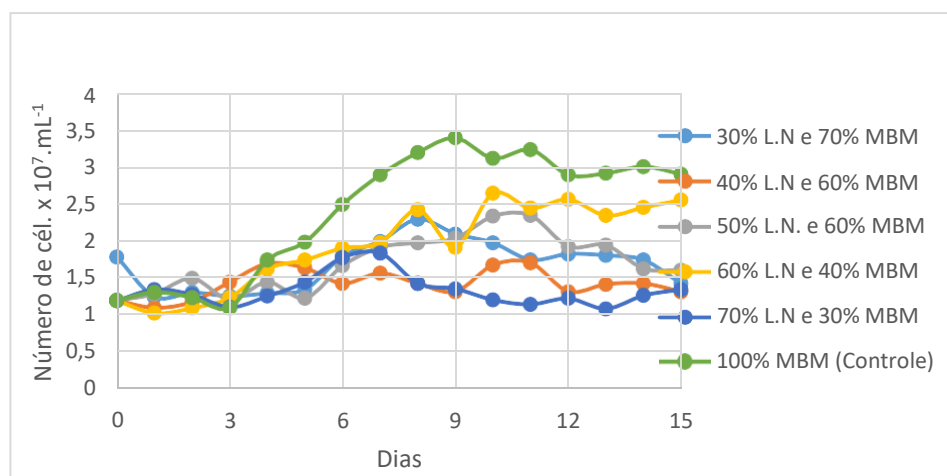
Tabela 1 - Proporções entre licor negro e MBM puro

| Licor negro 5% | MBM puro |
|----------------|----------|
| 30%            | 70%      |
| 40%            | 60%      |
| 50%            | 50%      |
| 60%            | 40%      |
| 70%            | 30%      |

Fonte: Autoria própria (2019).

A curva de crescimento das respectivas proporções entre licor negro e MBM puro estão representadas na figura 3.

Figura 3 - Curva de crescimento de *Chlorella v.* imobilizada em diferentes proporções de licor negro e MBM.



Fonte: Autoria própria (2019).

Os motivos para o crescimento não ser equivalente à solução controle advêm de vários fatores: excesso de íons  $\text{Br}^-$  e  $\text{F}^-$ , falta de íons  $\text{PO}_4^{3-}$ , excesso de de íons sódio ou falta de íons Ferro.

Para determinar compostos fenólicos, foram analisadas três amostras: biomassa de micropartículas cultivadas do meio de cultivo de licor negro 5% (60%) e MBM (40%); biomassa de células livres cultivadas em MBM; e biomassa de células livres cultivadas em licor negro (5%).

A curva analítica ( $y = 0,0051x + 0,0052$  e  $R^2 = 0,9925$ ) foi construída com solução padrão de ácido gálico, do qual foram preparadas soluções variando de 100 a 400  $\text{mg.L}^{-1}$ . O teor de fenóis totais foi determinado através da curva analítica e seus resultados foram expressos em  $\text{mg}$  de equivalente de ácido gálico (EAG).  $\text{g}$  de *Chlorella vulgaris*  $^{-1}$  e estão expressos na tabela 2.

Tabela 2 - Teor de fenóis totais de *Chlorella vulgaris*.

|                                | Concentração ácido gálico equivalente ( $\text{mg AGE/g Chlorella v. seca}$ ) |
|--------------------------------|---|
| Células livres em licor negro  | 0,0435  |
| Micropartículas em licor negro | 0,2511  |
| Células livres em MBM          | 0,0270  |

Fonte: Autoria própria (2019).

A amostra contendo micropartículas em licor negro (5%) (60%) e MBM (40%) obteve o maior teor de compostos fenólicos totais. Um dos motivos das micropartículas apresentarem maior teor de compostos fenólicos pode ser devido ao acúmulo de compostos tóxicos para as células no interior das micropartículas. Sousa (2016) sugere que há possibilidade de acúmulo de compostos indesejados dentro das partículas. Esse fator pode provocar maior estresse ambiental para as células.

O método escolhido de extração de compostos fenólicos pode influenciar no seu teor. Hajimahmoodi (2009) recomenda a extração por três métodos principais: hexano, acetato de etila e água. No presente estudo, foi utilizada a extração com água a 80°C.

Foi encontrado por Li (2007) valores médios de 0,97 a 2,67 mg EAG/g para *Chlorella vulgaris* com extração em água. Quando cultivadas em micropartículas em licor negro adicionado com MBM, as células apresentam o maior teor de compostos fenólicos totais, ou seja, são as que apresentam maior potencial antioxidante.

## CONCLUSÃO

De forma geral, através dos estudos das tabelas contendo os íons de cada meio de cultivo e da confirmação através do crescimento da microalga em meio complementado entre MBM e licor negro, pode-se chegar na proporção ideal entre licor negro e MBM de 60% e 40%, respectivamente. Com essa proporção, houve um aumento de 113% no número de células, o que representa a potencialidade do uso do licor negro como meio complementar para o MBM no cultivo de *Chlorella vulgaris* e compostos fenólicos totais.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação Araucária pela concessão de bolsa para o desenvolvimento do projeto vigente durante o período 2018/2019 e aos laboratórios D-002 e D-003 da UTFPR, campus Ponta Grossa.

## REFERÊNCIAS

Alessandra Cristine Novak Sydney; Eduardo Bittencourt Sydney; Almeida, A.C.O. FURTADO, I. F. S. P. C. . **Processo de produção de biomassa a partir do tratamento de licor negro por meio do cultivo de cianobactérias e microalgas e uso da biomassa obtida**. BR nº BR10201807471, 29 nov. 2018.

BRESSEL, T.A.B. Sistema gerador de microcápsulas de alginato. Tese de Doutorado em Genética e Biologia Molecular – UFRGS. Porto Alegre, p. 56, 2007.

COSTA, B.S. Micropartículas produzidas por gelificação iônica recobertas com gelatina de peixe e isolado proteico de soja. Dissertação em Engenharia de Alimentos – UNICAMP. Campinas, p. 49, 2014.

HAJIMAHMOODI, Mannan et al. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. **Journal Of Applied Phycology**, [s.l.], v. 22, n. 1, p.43-50, 19 mar. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-009-9424-y>.

Li, Het al. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, [s.l.], v.102, n.3, p.771-776, 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.022>.

MARCON, A.E. Remoção de coliformes fecais com microalgas (*Chlorella*) imobilizadas em matriz de alginato de cálcio. Dissertação em Engenharia Sanitária – UFRN. Natal, p.31, 2005.

SIMPSON, N.E.; GRANT, S.C.; BLACKBAND, S.J.; CONSTANTINIDIS I. NMR properties of alginate microbeads. *Biomaterials*, v.24, p. 4941-4948, 2003.