

Produção e caracterização de biomassa de *Galdieria sulphuraria* em melaço de cana-de-açúcar

Production and characterization of *Galdieria sulphuraria* biomass in sugar cane molasses

RESUMO

Larissa Silva de Oliveira
larissa.1998@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

Eduardo Bittencourt Sydney
eduardosydne@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

A *Galdieria sulphuraria* é uma microalga eucarionte poliextremófila, significando que ela cresce em uma faixa de pH entre 0 e 4, é de grande interesse biotecnológico. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento e a produção de compostos fenólicos da microalga utilizando como meio o melaço de cana-de-açúcar e a influência da presença uma fonte de nitrogênio. Durante o estudo obteve-se como resultados que o uso do sulfato de amônia como fonte de nitrogênio apresentou melhor desempenho na produção de biomassa e na produção de compostos fenólicos – sendo para este necessário um novo estudo devido a influência dos sólidos insolúveis durante a leitura no espectrofotômetro. O presente estudo permite abertura para estudos futuros sobre a variação da relação C/N na produção de biomassa e compostos fenólicos, e eficiência de outros métodos de extração.

PALAVRAS-CHAVE: Cultivo em melaço. Melaço e fontes de nitrogênio. *Galdieria sulphuraria*.

ABSTRACT

Galdieria sulphuraria is a eukaryotic polyextremophile microalgae, meaning that it grows in a pH range between 0 and 4, it is of great biotechnological interest. The present work aimed to evaluate the growth and production of phenolic compounds in microalgae using sugarcane molasses as a medium and the influence of the presence of a nitrogen source. During the study was obtained as results that the use of ammonium sulfate as a source for the best performance in the production of biomass and production of phenolic compounds - being for this required a new study due to the influence of the insoluble solids during reading in the spectrophotometer. The present study allows opening for future studies on the variation of the C / N ratio in the production of biomass and phenolic compounds, and efficiency of other extraction methods.

KEYWORDS: Cultivation in molasses. Molasses and nitrogen sources. *Galdieria sulphuraria*.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

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



INTRODUÇÃO

Segundo Nachiluk (2020) o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar e açúcar no mundo e o segundo maior na produção de etanol, e que por meio de dados levantados pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) a previsão era de que a safra de 2019/2020 teria uma produção de 642 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, tendo uma alta geração de resíduos e subprodutos como o melaço e vinhaça (NACHILUK, 2020) .

Dentre os microrganismos que podem ser cultivados em resíduos e subprodutos do setor sucroalcooleiro, encontram-se as microalgas que são seres unicelulares que podem ser cultivadas em meios autotróficos onde a fonte de carbono é o gás carbônico e heterotróficos onde as fontes são de carbono orgânico como glicose, maltose e frutose (ZIMERMANN, 2019).

A *Galdieria sulphuraria* é uma microalga eucarionte poliextremófila, significando que ela cresce em uma faixa de pH entre 0 e 4, em altas temperaturas de até 56 °C, podendo crescer em mais de 50 fontes de carbono o que pode influenciar na composição da biomassa, sendo possível induzir o microrganismo a produzir em sua célula ou excrete moléculas bioativas (SYDNEY et al., 2019; ZIMERMANN, 2019).

Além da produção da produção de moléculas bioativas, segundo Eduardo et al (2019) a *Galdieria sulphuraria* pode ser aplicada também no tratamento residuais de águas e biocombustíveis, no qual a biomassa produzida durante o tratamento de águas pode ser empregada posteriormente na produção de biocombustíveis, e na indústria alimentícia devido ao acúmulo de um glicogênio ramificado (SYDNEY et al., 2019).

O presente trabalho tem como objetivo a caracterização da biomassa em termos de compostos fenólicos da microalga *Galdieria sulphuraria* tendo como meio de cultivo o melaço.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo se deu no desenvolvimento de três etapas gerais, sendo a primeira o **cultivo em melaço**, segunda a **produção de biomassa** e a terceira a **caracterização da biomassa** com base nos compostos fenólicos totais.

Para o **cultivo em melaço**, foi preparado também três soluções de 300 mL de melaço uma para cada concentração a ser estudada (0,1%, 0,5% e 1%) e distribuiu-se igualmente cada solução em outros três erlenmeyers de 250 mL. Em seguida, para estudo da influência do nitrogênio determinou-se a concentração de sacarose a partir do grau brix para cada concentração de melaço e calculou a quantidade de nitrogênio a partir de uma relação C/N igual 30, e conseqüentemente a quantidade de o NaNO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a serem pesadas para as três concentrações de melaço, reservando um erlenmeyer de cada concentração para o estudo da ausência do nitrogênio. O pH fora ajustado para 2,50 com H_3PO_4 e NaOH e autoclavado. Em seguida microrganismo foi inoculado utilizando a capela de fluxo laminar a partir de um meio do cultivo mãe, um volume de 20% de *G. sulphuraria*. Em seguida os cultivos foram levados ao *shaker* em uma temperatura de 45 °C a 115 rpm.

Durante uma semana (por exceção do fim semana) realizou-se a retirada amostras de 200 μL para realizar contagem pela Câmara de Neubauer, considera-se o dia em que o microrganismo é inoculado como dia zero, em seguida traçou-se um gráfico (Concentração celular vs Tempo de fermentação).

Para **produção de biomassa** utilizou-se o mesmo procedimento do **cultivo em melão**, porém com algumas alterações, sendo agora um volume de 600 mL em um erlenmeyer de 1 L e ao invés de usar o shaker utilizou-se a incubadora BOD a 45 °C em conjunto com um sistema de aeração por meio de bombas de aquário, os cultivos foram envoltos em papel kraft para evitar a entrada de luz.

Realizou-se o peso seco inicial e final a partir de uma amostra de 15 mL de cada cultivo, centrifugando as amostras em tubos falcon tarados a 20 °C e 10956 G (10000 rpm) e colocando para secar em uma estufa a 80 °C por 24h.

O tempo de fermentação de cada cultivo fora determinado com base nas curvas de crescimento obtidas no **cultivo em melão**. Ao término de cada fermentação os cultivos foram levados para geladeira por 24h para ajudar na decantação das células, e os 200 mL finais de cada cultivo foram centrifugados em tubos falcon tarados para obtenção da biomassa a 20 °C e 10956 G (10000 rpm) e secou-se em uma estufa a 80 °C por 24h.

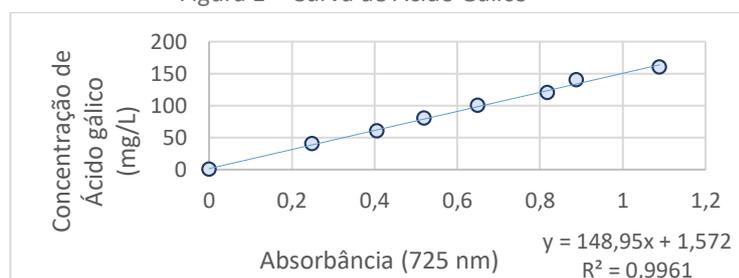
A **caracterização da biomassa** se deu partir das biomassas produzidas, das quais foram preparados os extratos na proporção de 1/10 (m/v), e em seguida realizada uma diluição de 1/10 (v/v) para todos os extratos. Em seguida foi realizada a análise de Compostos Fenólicos Totais – Método de Folin-Ciocalteu.

Como o resultado do Método de Folin-Ciocalteu é expresso em equivalente de ácido gálico, montou-se de uma curva de ácido gálico a partir de diluições de solução mãe de ácido gálico 200 mg/L, onde as concentrações se encontravam na faixa de 0 – 160 mg/L.

A realização do método se deu pela seguinte adição: 150 μL do extrato, 2400 μL de água e 150 μL de Folin-Ciocalteu, que em seguida ficaram em repouso por um tempo de três minutos, com o intuito de adequar a leitura para cada extrato realizou-se três diluições utilizando os volumes de 30 μL , 75 μL e 150 μL de extrato, para um volume final de 150 μL que fora acertado com água destilada.

Ao término do tempo de repouso foram adicionados 300 μL de carbonato de sódio e agitado por vinte segundos em um vórtex, e novamente deixado em repouso, mas agora por um tempo de uma hora com ausência de luz. O mesmo procedimento se deu para as soluções da curva de Ácido Gálico. E em seguida lido por um espectrofotômetro em 725nm.

Figura 1 – Curva de Ácido Gálico

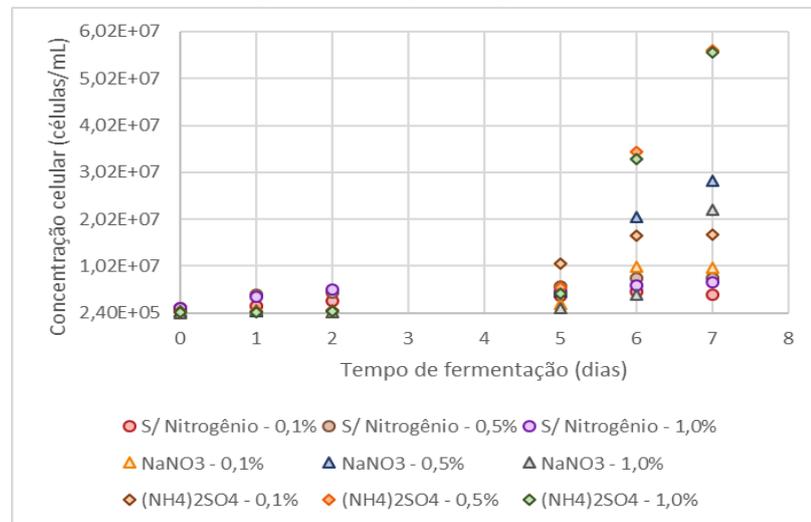


Fonte: Autoria própria.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas três diferentes concentrações de melaço e a influência de duas fontes de nitrogênio com uma relação C/N igual a 30 para o crescimento da microalga *Galdieria sulphuraria* resultando em seis diferentes curvas de crescimento apresentadas na figura 2.

Figura 2 – Exemplo de figura



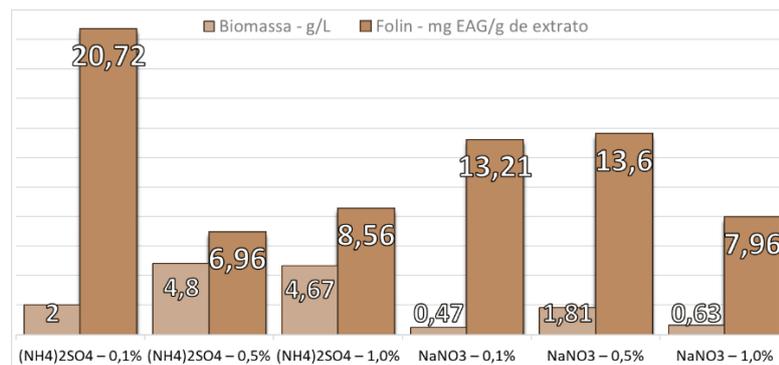
Fonte: Autoria própria.

Nota-se que independente da presença ou ausência do nitrogênio a melhor concentração de melaço foi a de 0,5%, o que se refere a aproximadamente 5 g/L de sacarose. Como nitrogênio é um dos fatores limitantes de crescimento para microorganismos nota-se que nos cultivos onde há sua presença as taxas de crescimento são maiores (MORENO, 2017).

E dentre as duas fontes de nitrogênio estudadas observa-se que em concentrações iguais de melaço o sulfato de amônia apresenta uma taxa de crescimento superior, segundo Cai et al (2013) para microalgas eucariotas as fontes de nitrogênio amoniacais são as favoritas por não precisarem sofrer uma reação redox para serem assimiladas o que resulta em uma economia de energia (CAI; PARK; LI, 2013).

A partir das curvas do cultivo em melaço com relação C/N igual a 30, determinou-se que o cultivo contendo NaNO₃ teria uma fermentação de seis dias e os demais de sete, em seguida determinou-se a concentração de biomassa obtida ao término das fermentações e a concentração de compostos fenólicos, conforme a figura 3.

Figura 3 – Concentração de biomassa e concentração de compostos fenólicos em termos de equivalentes de ácido gálico



Fonte: Autoria própria.

Ao analisar as concentrações de compostos fenólicos para os cultivos com concentração de melão 0,1%, é possível observar que a presença do sulfato de amônio proporciona a obtenção de uma biomassa com maior concentração de compostos fenólicos em comparação ao nitrato de sódio, um motivo para isso ter ocorrido é a disponibilidade do nitrogênio que segundo Parra (2016), influencia tanto o crescimento como o conteúdo celular, e como *Galdieria sulphuraria* apresenta preferência pelo sulfato de amônio por não requisitar o gasto de energia para a realização reação redox para que o nitrogênio possa ser assimilado, o sulfato de amônio se apresenta com uma maior disponibilidade para assimilação. (CAI; PARK; LI, 2013; PARRA, 2016)

Devido ao fato de que quando é preparado o meio de melão para as concentrações de 0,5% e 1,0% existe a presença de sólidos insolúveis, que ao término da fermentação quando o cultivo foi centrifugado e secado para a realização das análises, esses sólidos ainda se encontravam presentes, o que pode causar interferência na leitura das amostras no espectrofotômetro devido ao desvio de luz, tornando esses valores imprecisos.

Os valores encontrados para os extratos de melão 0,1% e 0,5% se encontram abaixo da concentração encontrada por C. Gürlek et al (2020) que foi de 312 mg EAG/g de extrato, isso pode se dar devido a uma diferente metodologia de extração empregada, onde o autor utiliza o metanol como solvente para extração e o uso de mais durante o processo, outro fator que pode estar relacionado é o uso de diferentes meios de cultivo, onde C. Gürlek et al (2020) utilizou o *Cyanidium Medium* e durante este projeto o meio empregado foram soluções a base de melão. (GÜRLEK et al., 2020)

CONCLUSÃO

A *Galdieria sulphuraria* apresenta grande habilidade de adaptação, apresentando crescimentos em melão um subproduto na produção do açúcar. Conforme as curvas de crescimento e dados da biomassa produzida, é possível afirmar que o sulfato de nitrogênio é a melhor fonte de nitrogênio dentre as testadas para o crescimento celular, e que a concentração de 0,5% de melão apresenta-se como a melhor para o crescimento.

Com base nos dados obtidos pelo resultado do método de Folin-Ciocalteu o melão apresenta um potencial bioativo, que apesar dos valores obtidos serem consideravelmente baixos quando comparados com a literatura, este estudo

permite a abertura de estudos futuros sobre a eficiência de outros métodos de extração.

AGRADECIMENTOS

A UTFPR pela disponibilização da estrutura, aos professores Dr. ^a Alessandra e Dr. Eduardo pela oportunidade de trabalhar neste projeto, pela confiança e por toda orientação proporcionada. Aos meus pais por tornarem isso possível. E a Rafaela C. e Larissa P. pela ajuda prestada.

REFERÊNCIAS

CAI, Ting; PARK, Stephen Y.; LI, Yebo. Nutrient Recovery from Wastewater Streams by Microalgae: Status and Prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 19, p. 360–369, 1 mar. 2013.

GÜRLEK, Ceren et al. Screening of Antioxidant and Cytotoxic Activities of Several Microalgal Extracts with Pharmaceutical Potential. **Health and Technology**, v. 10, n. 1, p. 111–117, 1 jan. 2020.

MORENO, Irina Charlot Peña. **INFLUÊNCIA DA DISPONIBILIDADE DE NITROGÊNIO NA EXPRESSÃO DE GENES DO METABOLISMO CENTRAL DA LEVEDURA DEKKERA BRUXELLENSIS CULTIVADA EM ANAEROBIOSE**. 2017. Universidade Federal, Recife, 2017.

NACHILUK, Katia. **Cana-de-açúcar: produção e processamento em 2019**. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/out/TerTexto.php?codTexto=14767>. Acesso em: 24 jun. 2020.

PARRA, Maria Isabel Fuentes. **Efeito da irradiância e disponibilidade de nitrogênio no crescimento, teor de clorofila, perfil de glicerídeos totais e potencial antioxidante de Desmodesmus sp**. 2016. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

SYDNEY, Eduardo Bittencourt et al. Biomolecules from Extremophile Microalgae: From Genetics to Bioprocessing of a New Candidate for Large-Scale Production. **Process Biochemistry**, v. 87, p. 37–44, 1 dez. 2019.

ZIMERMANN, Jéssika Darc Fernandes. **Cultivo da microalga Galdieria sulphuraria em permeado soro de leite**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa. 2019. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br:8080/jspui/handle/1/4572>. Acesso em: 25 jun. 2020.