

XII-024 - TEOR DE CLOROFILA-A E DO RENDIMENTO DA BIOMASSA DE CHLORELLAS SP PRODUZIDAS A PARTIR DO PROCESSO DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS

Maniza Sofia Monteiro Fernandes⁽¹⁾

Engenheira Sanitária Ambiental pela Universidade Estadual da Paraíba(UEPB), doutoranda em Engenharia Química pela Universidade Federal de Campina Grande

Tereziana Silva da Costa

Química Industrial pela Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Mestranda em Engenharia Química pela Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

Rodrigo Vieira Alves

Graduado em Química Industrial pela UEPB, Mestre em Engenharia Química pela UFCG, Doutorando em Engenharia Química pela UFCG.

Sonáli Amaral de Lima

Licenciada em Sociologia pela Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Graduanda em Nutrição pela Faculdade Maurício de Nassau.

Kepler Borges França Engenheiro Químico pela UFPB, Doutor pela University of Kent at Canterbury. Atualmente é professor associado ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Campina Grande.

Endereço⁽¹⁾: Rua Antônio José Santiago,115 - Brasil -- e-mail: maniza-f@hotmail.com

RESUMO

Andrade et al. (2008) e Chisti (2007) caracterizam as microalgas como micro-organismos fotossintéticos, que combinam água e dióxido de carbono atmosférico com luz solar para produzirem várias formas de energia para produzirem biomassa (polissacarídeos, proteínas, lipídios e hidrocarbonetos), que pode ser utilizada na produção de biocombustíveis e suplementos alimentares, e também podem ser empregados na captura de dióxido de carbono da atmosfera. Nos últimos anos, observou um elevado interesse no potencial biotecnológico das microalgas, principalmente devido à identificação de diversas substâncias sintetizadas por estes organismos. A imensa biodiversidade delas aliadas ao melhoramento genético e ao estabelecimento de tecnologia de cultivo em grande escala vêm permitindo que estas sejam utilizadas em diversas aplicações. O cultivo de microalgas representa uma potencial fonte de biomassa rica em clorofila e sais minerais como: fósforo, ferro, manganês, cobre, zinco, magnésio e cálcio. Este experimento teve como objetivo avaliar a composição de minerais, bem como determinar o teor de clorofila a da microalga *Chlorella* sp cultivada em diferentes percentuais de permeado da separação de membranas. Esse tipo de microalga é rica em fonte de nutrientes concentrados considerada como possuidora de elementos necessários para dar sustento à vida na Terra. Uma de suas mais notáveis qualidades nutritivas é seu alto conteúdo protéico é rica em nutrientes: contém aproximadamente, 60% de proteínas, mais que a soja (37%), a carne bovina (45%) e o trigo (10%), é rica em pigmentos como astaxantina clorofila entre outros; mais que 20 tipos de vitaminas e sais minerais, com destaque para beta caroteno (pró-vitamina A) e vitamina B12 e todos os aminoácidos essenciais (BORGUETTI,2009).

PALAVRAS-CHAVE: Clorellas, clorofila a, rendimento da biomassa

INTRODUÇÃO

Os produtos oriundos da biotecnologia, principalmente a cultura de microalgas, têm crescido devido a características tais como: alta produtividade, uso da luz solar como fonte de energia e reduzido impacto ao meio ambiente. A biotecnologia através do cultivo de microalgas surge como uma alternativa para suplementação alimentar nas áreas mais carentes (ANDRADE, 2005).

Grande parte das microalgas são fototróficas, sendo assim, necessitam de uma fonte de luz, água e nutrientes básicos para o crescimento. Dentre estes nutrientes destacam-se o carbono (inorgânico), nitrogênio e fósforo,

sendo vitais para o desenvolvimento das algas, bem como, o equilíbrio entre alguns parâmetros operacionais como: controle de dióxido de carbono, remoção de oxigênio, pH, temperatura e intensidade luminosa (MATA, MARTINS e CAETANO, 2010).

De acordo com CHISTI (2007), estes microorganismos fotossintetizantes são utilizados em aquicultura, para produção de suplemento alimentar e para a extração de compostos de alto valor comercial, apresentando potencial para uso em biorremediação e biofertilização, assim como para a produção de vários tipos diferentes de biocombustíveis.

As microalgas apresentam clorofila e outros pigmentos fotossintéticos, os quais são capazes de realizar fotossíntese. Sua sistemática implica na consideração de diversos critérios a qual estão relacionadas. São principalmente encontradas no meio marinho, em água doce e no solo e são responsáveis por pelo menos 60% da produção primária de oxigênio na Terra (CHISTI, 2007).

Para que espécies de microalgas possam produzir satisfatoriamente várias formas de energia, é indispensável cuidados no processo e sistemas de cultivo dos microorganismos, considerando as peculiaridades de cada espécie, adaptação ao ambiente, bem como a disponibilidade de nutrientes associados à viabilidade econômica. A *Chlorella* sp é rica em fonte de nutrientes concentrados considerada como possuidora de elementos necessários para dar sustento à vida na Terra. Uma de suas mais notáveis qualidades nutritivas é seu alto conteúdo protéico é rica em nutrientes: contém aproximadamente, 60% de proteínas, mais que a soja (37%), a carne bovina (45%) e o trigo (10%), é rica em pigmentos como astaxantina clorofila entre outros; mais que 20 tipos de vitaminas e sais minerais, com destaque para beta caroteno (pró-vitamina A) e vitamina B12 e todos os aminoácidos essenciais (BORGUETTI, 2009).

Um dos maiores problemas na produção de microalgas é a sua separação, tendo em vista a necessidade de preservar sua biomassa, bem como as características da célula. Dentro dos diversos métodos de separação de microalgas os mais utilizados são: centrifugação, filtração através de membranas e floculação, e em determinados casos, onde as dimensões são bastante pequenas, utiliza-se a separação por meio da adição de coagulante, que em sua maioria, são constituídos por sais metálicos; a escolha de um determinado tipo de separação depende das propriedades das microalgas, tais como densidade, tamanho e o valor do produto desejado.

Dependendo do método de separação convencional quase sempre proporciona descarte dos resíduos líquidos devido a não reutilização dos mesmos, esses contém na sua composição substâncias que podem comprometer a qualidade ambiental.

A separação por membrana de microalgas retém praticamente todos os nutrientes no permeado, todavia este ainda é rico, por isso pode oferecer condições de ser inoculado para cultivos de novas microalgas, avaliando a eficiência da separação e que seja economicamente viável e ambientalmente correto.

Este estudo objetiva avaliar a composição do teor de clorofila a e o rendimento da biomassa presentes na microalga *Chlorella* sp cultivada em diferentes percentuais de permeado da separação de membranas.

MATERIAIS E MÉTODOS

A cepa utilizada foi *Chlorella* sp proveniente do laboratório de biotecnologia Alimentar da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), mantida no cepário localizado no Labdes (Laboratório de Referência em Dessalinização). Para o cultivo das microalgas foi utilizado o BBM – Bold's Basal Medium (BOROWITZKA, 1988), homogeneizados por aeração mantidos sob iluminação artificial através de lâmpadas fluorescentes de 40W com fotoperíodo de 12 horas. Após repiques dessas foram desenvolvidos os cultivos em fotobiorreatores de 50 L com uma população inicial de 10^5 cel.mL^{-1} da microalga em estudo até atingir a fase estacionária que correspondia a uma população de 10^7 cel.mL^{-1} .

Esse monitoramento foi feito através de contagem com o auxílio de uma câmara de Neubauer, após atingirem a população desejada, realizava-se a separação das microalgas pelo processo de membrana Cerâmica onde foi utilizada uma membrana de AlSiO_4 (alumina) de 30 cm e de diâmetro de 1,1 cm com um fluxo de $60 \text{ L/m}^2 \cdot \text{h}$ e

porosidade de 10^{-6} m produzida no Laboratório de Cerâmica- LabCEM localizado no LABDES. O processo de separação foi realizado com uma bomba de grafite (marca PROCON) com motor de 1/2Hp, o sistema foi regulado a um gradiente de pressão constante de 2 Kgf/cm².

O meio de cultivo foi separado gerando duas correntes, a do permeado contendo os nutrientes do meio de cultura e os metabolitos das microalgas e o concentrado que apresentava a biomassa. Foi estudado em várias proporções para a reutilização do permeado, após a suplementação esperava-se o crescimento celular até atingir a fase estacionária, avaliando em seguida o rendimento da biomassa e a clorofila "a" com intuito de viabilizar esse estudo. A determinação das concentrações de clorofila-a.

Para realização da determinação da clorofila-a foram coletadas 50 mL do cultivo na fase lag e log, em seguida realizou-se a separação por meio da filtração a vácuo utilizando membrana de porosidade 0,45µm. Após a filtração, a membrana passa pelo processo de banho-maria por dois minutos, deixando esfriar num local escuro após este período, o conteúdo do frasco foi centrifugado, fez-se a leitura com os seguintes comprimentos de onda 665 e 750nm, para medir os correspondentes comprimentos de ondas foram utilizados um espectrofotômetro de marca Biospectro o qual foi calibrado com metanol P.A.

Determinou-se o rendimento da biomassa do cultivo logo após a inoculação e antes de efetuar a separação das microalgas. Utilizou-se membrana de celulose de porosidade 0,45µm, após a filtração, a biomassa foi levada a estufa a temperatura de 60°C até atingir peso constante.

RESULTADOS

O parâmetro analisado foi o rendimento da biomassa e a clorofila a com um meio contendo 250 mL, 500 mL e 750 mL do permeado do processo de separação para completar 1000 mL do inoculo.

A Tabela 1 busca mostrar o desenvolvimento das espécies de *Chlorella sp* no permeado do processo de separação por OI. Observa-se que a maior produtividade celular ocorreu para o percentual de 500 mL de permeado ao meio de cultura. Porém essa diferença não foi significativa em relação ao da suplementação 250mL de permeado. Aparentemente a produção depende de vários fatores, como percentual de microorganismos presente no meio, temperatura, nutrientes, pH, luminosidade ambiental, dentre outros.

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 1 a quantidade de microalgas colocados em cada alíquota foi a mesma na ordem de 10^7 cel.mL⁻¹. Observou-se que a produtividade inicial diminuiu em função da quantidade de permeado, ou seja, a concentração de nutriente presente no meio passou a ser um parâmetro importante.

Por outro lado o rendimento da biomassa final aumentou até o da adição de 500 mL do permeado, começando a diminuir a partir de 750 mL, aparentemente nesse estágio ocorre um atraso em função do consumo de nutrientes e consequentemente para os dias estudados o valor do rendimento não foi suficiente para atingir um valor superior ao resultado obtido com o da adição de 500 mL do permeado. Já para a suplementação com 100% de permeado não foi possível efetuar a produtividade por já apresentar resultados insatisfatórios em relação aos outros experimentos as *Chlorellas sp* não atingiram a densidade celular máxima, inclusive pode-se perceber durante este cultivo várias células mortas.

MATERIAIS E MÉTODOS

A cepa utilizada foi *Chlorella sp* proveniente do laboratório de biotecnologia Alimentar da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), mantida no cepário localizado no Labdes (Laboratório de Referência em Dessalinização). Para o cultivo das microalgas foi utilizado o BBM – Bold's Basal Medium (BOROWITZKA, 1988), homogeneizados por aeração mantidos sob iluminação artificial através de lâmpadas fluorescentes de 40W com fotoperíodo de 12 horas. Após repiques dessas foram desenvolvidos os cultivos em fotobiorreatores de 50 L com uma população inicial de 10^5 cel.mL⁻¹ da microalga em estudo até atingir a fase estacionária que correspondia a uma população de 10^7 cel.mL⁻¹.

Esse monitoramento foi feito através de contagem com o auxílio de uma câmara de Neubauer, após atingirem a população desejada, realizava-se a separação das microalgas pelo processo de membrana Cerâmica onde foi

utilizada uma membrana de AlSiO_4 (alumina) de 30 cm e de diâmetro de 1,1 cm com um fluxo de $60\text{L}/\text{m}^2\cdot\text{h}$ e porosidade de 10^{-6}m produzida no Laboratório de Cerâmica- LabCEM localizado no LABDES. O processo de separação foi realizado com uma bomba de grafite (marca PROCON) com motor de 1/2Hp, o sistema foi regulado a um gradiente de pressão constante de $2\text{Kg}/\text{cm}^2$.

O meio de cultivo foi separado gerando duas correntes, a do permeado contendo os nutrientes do meio de cultura e os metabolitos das microalgas e o concentrado que apresentava a biomassa. Foi estudado em várias proporções para a reutilização do permeado, após a suplementação esperava-se o crescimento celular até atingir a fase estacionária, avaliando em seguida o rendimento da biomassa e a clorofila "a" com intuito de viabilizar esse estudo. A determinação das concentrações de clorofila-a.

Para realização da determinação da clorofila-a foram coletadas 50 mL do cultivo na fase lag e log, em seguida realizou-se a separação por meio da filtração a vácuo utilizando membrana de porosidade $0,45\mu\text{m}$. Após a filtração, a membrana passa pelo processo de banho-maria por dois minutos, deixando esfriar num local escuro após este período, o conteúdo do frasco foi centrifugado, fez-se a leitura com os seguintes comprimentos de onda 665 e 750nm, para medir os correspondentes comprimentos de ondas foram utilizados um espectrofotômetro de marca Biospectro o qual foi calibrado com metanol P.A.

Determinou-se o rendimento da biomassa do cultivo logo após a inoculação e antes de efetuar a separação das microalgas. Utilizou-se membrana de celulose de porosidade $0,45\mu\text{m}$, após a filtração, a biomassa foi levada a estufa a temperatura de 60°C até atingir peso constante.

RESULTADOS

O parâmetro analisado foi o rendimento da biomassa e a clorofila a com um meio contendo 250 mL, 500 mL e 750 mL do permeado do processo de separação para completar 1000 mL do inoculo.

A Tabela 1 busca mostrar o desenvolvimento das espécies de *Chlorella sp* no permeado do processo de separação por OI. Observa-se que a maior produtividade celular ocorreu para o percentual de 500 mL de permeado ao meio de cultura. Porém essa diferença não foi significativa em relação ao da suplementação 250mL de permeado. Aparentemente a produção depende de vários fatores, como percentual de microorganismos presente no meio, temperatura, nutrientes, pH, luminosidade ambiental, dentre outros. De acordo com os resultados mostrados na Tabela 1 a quantidade de microalgas colocados em cada alíquota foi a mesma na ordem de $10^7\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$. Observou-se que a produtividade inicial diminuiu em função da quantidade de permeado, ou seja, a concentração de nutriente presente no meio passou a ser um parâmetro importante.

Por outro lado o rendimento da biomassa final aumentou até o da adição de 500 mL do permeado, começando a diminuir a partir de 750 mL, aparentemente nesse estágio ocorre um atraso em função do consumo de nutrientes e consequentemente para os dias estudados o valor do rendimento não foi suficiente para atingir um valor superior ao resultado obtido com o da adição de 500 mL do permeado. Já para a suplementação com 100% de permeado não foi possível efetuar a produtividade por já apresentar resultados insatisfatórios em relação aos outros experimentos as *Chlorellas sp* não atingiram a densidade celular máxima, inclusive pode-se perceber durante este cultivo várias células mortas.

Tabela 1: Rendimento da biomassa e de clorofila-a em função do percentual de permeado.

Volume do permeado	Avaliação do desenvolvimento da <i>chlorellas sp</i> no permeado da OI			
	Rendimento da biomassa ($\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$)		Clorofila ($\mu\text{g}/\text{L}$)	
	Inicial do cultivo	Final do cultivo	Inicial do cultivo	Final do cultivo
250mL	0,040	0,860	421,42	12354,90
500mL	0,034	0,940	1295,67	12162,51
750mL	0,020	0,750	1352,67	11273,44
100%	0,013	N/D	276,45	N/D

No que consta a clorofila-a as células apresentaram valores satisfatórios isso foi devido à presença de nitrato sabendo que quando há um excesso desses constituintes no meio favorece a maior realização de fotossíntese. De acordo com a Tabela 4 observa-se que em função do percentual do permeado a concentração final da clorofila diminui gradativamente. Qualitativamente, observa-se que a composição do meio em termos de nutrientes fez com que a incidência da luz diminuísse em função do percentual do permeado.

A Tabela 2 mostra o desenvolvimento das microalgas *Chlorella* sp no permeado da membrana cerâmica que apresentou melhores resultados do rendimento da biomassa quando faz-se a suplementação com 250mL e 500mL do permeado o que mostra a viabilidade no uso do permeado no cultivo das microalgas.

Em sistemas comerciais de produção de microalgas, de maneira geral, as empresas produtoras de microalgas visam alcançar a máxima produtividade e, isto implica em elevada produção de biomassa (ou de produto de interesse) no menor espaço de tempo possível (TREDICI, 2004). Por obterem um intervalo muito curto da fase lag ate atingir a fase log, pode-se afirmar que a velocidade de crescimento e a produtividade estão diretamente relacionadas. (KAYOMBO et al., 2003; TUKAJ et al., 2003).

Observa-se que com o uso de membranas cerâmicas obteve-se melhor rendimento da biomassa, bem como uma maior velocidade de crescimento, já que rapidamente as células alcançavam o numero máximo de células. Assim, para o cultivo das microalgas com o permeado das membranas cerâmicas apresenta melhor relação custo benefício, uma vez que as membranas cerâmicas apresentam um menor custo operacional que as membranas de osmose inversa.

Tabela 2: Rendimento da biomassa e de clorofila-a em função do percentual de permeado.

Volume do permeado	Avaliação do desenvolvimento da <i>Chlorella</i> sp. no permeado da membrana Cerâmica			
	Rendimento da biomassa (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)		Clorofila (µg/L)	
	Inicial do cultivo	Final do cultivo	Inicial do cultivo	Final do cultivo
250mL	0,044	0,990	1369,10	13994,67
500 mL	0,035	0,996	1017,40	15100,91
750 mL	0,17	0,798	907,21	11296,46
100%	0,2	0.716	916,50	11256,19

Logo, as concentrações dos nutrientes no permeado favoreceram o desenvolvimento celular de forma satisfatória, com esse estudo percebe que as membranas podem ser utilizadas para a separação das microalgas, uma vez que foi possível um alto rendimento e que favoreceu e favorecem a utilização do permeado como suplementação do meio de cultivo reduzindo dessa forma os custos com a preparação do meio de cultura para o desenvolvimento das microalgas.

CONCLUSÕES

A clorofila-a e o rendimento da biomassa foram encontradas valores superiores aos obtidos com cultivo apenas em BBM, esses resultados pode ter sido devido o acréscimo de nutrientes no meio ;

A clorofila-a os valores foram muito altos provavelmente porque o permeado havia ainda alguma presença de microalgas antes de serem inoculados, assim, estes resultados podem estar vinculados ao fato das células já estarem adaptadas ao cultivo com excesso de nitrato, nitrito e fósforo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, M.R. Cultivos autotróficos e mixotróficos de *Spirulina platensis* em diferentes escalas e condições ambientais no extremo sul do Brasil. Dissertação apresentada para a obtenção do título de mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos na sub-área de Bioprocessos em alimentos. Rio Grande do Sul, 2005.
2. BORGUETTI, I.V.; Avaliação do crescimento de Microalga *Chlorella Minutissima* em meio de cultura com diferentes concentrações de Manipueira. 2009. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná de Curitiba, 2009;
3. BOROWITZKA, M.A. Pharmaceutical and agrochemicals from microalgas. Chemicals from algae. Washington DC: Cohen, Z., 1999. p 313-352.
4. CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances, v.25(3), 294-306, 2007
5. KAYOMBO, S.; MBWETTE, T.S.A.; KATIMA, J.H.Y.; JORGENSEN, S.E. Effect of substrate concentration on the growth of heterotrophic bacteria and algae in secondary facultative ponds. Water Research, v.37, p. 2937–2943, 2000
6. MATA, T.M.; MARTINS, A.A; CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.14, p.217-232 jan. 2010.
7. MATA, T.M.; MARTINS, A.A; CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v.14, p.217-232 jan. 2010.
8. TREDICI, M.R. Mass production of microalgae: photobioreactors. In: RICHMOND, A.(Ed). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science, p.178-214. 2004.
9. TUKAJ, Z.; MATUSIAK-MIKULIN, K.; LEWANDOWSKA, J.; SZURKOWSKI, J. Changes in the pigment patterns and the photosynthetic activity during a light-induced cell cycle of the green algae *Scenedesmus armatus*. Plant Physiology and Biochemistry, v.41, p.337–344, 2003.