



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

MELISSA RIBEIRO DA CRUZ

**CULTIVO *INDOOR* DA MICROALGA *Synechococcus nidulans* EM MEIO NPK E
ANÁLISE PROTEICA PARCIAL DA BIOMASSA MICROALGAL**

FORTALEZA

2020

MELISSA RIBEIRO DA CRUZ

CULTIVO *INDOOR* DA MICROALGA *Synechococcus nidulans* EM MEIO NPK E
ANÁLISE PROTEICA PARCIAL DA BIOMASSA MICROALGAL

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C963c Cruz, Melissa Ribeiro da.
Cultivo indoor da microalga *Synechococcus nidulans* em meio NPK e análise proteica parcial da biomassa microalgal / Melissa Ribeiro da Cruz. – 2020.
40 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2020.
Orientação: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva.

1. Microalgas. 2. *Synechococcus nidulans*. 3. Cultivo indoor. I. Título.

CDD 661

MELISSA RIBEIRO DA CRUZ

CULTIVO *INDOOR* DA MICROALGA *Synechococcus nidulans* EM MEIO NPK E
ANÁLISE PROTEICA PARCIAL DA BIOMASSA MICROALGAL

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em 30/09/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva (Orientador)

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva Souza

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Luiz Ferreira Aguiar Ponte

Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

A meus amados pais, Lucia e Erivaldo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Lucia e Erivaldo, por sempre terem incentivado o estudo como ferramenta principal na minha vida. Vocês são dois grandes amores eternos para mim, e sempre serei grata por todo o apoio, respeito e compreensão que vocês demonstram em todos os caminhos que desejo trilhar. Sou eternamente grata pela experiência inspiradora que é ser filha de vocês!

Às minhas irmãs Mabel e Paloma, e também à minha sobrinha Charlotte: viver junto de mulheres incríveis como vocês torna minha vida muito mais doce! Estamos para sempre juntas, embora nem sempre fisicamente, mas sempre de corações sintonizados! Amo vocês tanto que meus olhinhos encham de água hahaha.

A todos os meus amigos, que se mostraram mais do que juntos de mim quando eu precisei, me ouvindo pacientemente, me aconselhando, me nutrindo com seu amor... Saibam que isso engrandece minha alma, de um jeito inexplicável. São vocês os meus parceiros de UFC: Géssica, Claudiane, Jonathan, Lucas Bedê, Pietro. Também são os parceiros “do mundo”, que me surgiram como verdadeiros presentes nesses grandes encontros inesperados propiciados pelo viver: Ana Luzia, Jessyca, Ana Clara, Uyara, Stefany, Leonardo, Taís, Graziela, Raquel, Mário Ubirajara e Gustavo. Por fim, são também os meus parceiros de escola (como é bom poder ter vocês ainda por perto!): Loren, Thais, Marina, Lydia e Talison. Eu amo cada um de vocês com todo o meu ser, e deixo um pedaço do meu coração com vocês sem medo. Espero que eu consiga retribuir tanta energia positiva à altura e que sigamos sempre juntos!

To the foreign ones, Nathan, Ludivine, Sam and Camila. Thank you for the hours of conversation, you support me in many different ways. Can't wait to hug you in person! You're already in my heart with love/avec amour/con amor.

Ao meu amigo Eder, com quem tive a oportunidade de tanto aprender no Laboratório de Biologia Molecular e do Desenvolvimento, aprendendo muito mais do que apenas sobre Biologia Molecular, mas sobre a vida. Obrigada por todo o companheirismo, por ter sempre segurado a minha mão quando eu quis sair correndo, chorando, e desistir... Eu amo você, e saiba que também é graças a você que eu concluo este ciclo. Obrigada, obrigada e obrigada mais uma vez! Estamos sempre juntos, nunca esqueça.

Ao meu namorado Alain, quem mais me ouve, mais tenta me compreender, mais segura os baques da vida comigo. Eu te amo, amor, e espero passar ainda muitos anos ao seu lado, um comemorando as vitórias do outro, comendo guloseimas e assistindo algo, do jeito que a gente tanto gosta! Obrigada por 100% das vezes ter sido tão compreensivo, e mesmo quando foi difícil, você se esforçou para me ajudar da melhor maneira que pôde. Obrigada pela sua ternura, sua doçura, seu carinho e besteiras compartilhadas. Eu te amo que só!

À minha finada amiga coelha Leia, quem tanto alegrou minha vida nesses 7 anos juntas. Mesmo sem entender, ela me ajudou de diferentes maneiras, e esteve comigo nos piores momentos. É um amor que carregarei para todo o sempre comigo!

A todos os professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, que tanto me ensinaram durante esta caminhada da graduação, em especial o professor André Coelho, quem me acolheu com ternura e me estendeu a mão de ajuda para eu chegar nesta reta final. Serei eternamente grata ao senhor, professor! Também à incrível Profa. Márjory, quem tanto me inspira, muito obrigada por todo o auxílio e paciência!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP) pelo apoio financeiro.

RESUMO

As microalgas apresentam um alto grau de biodiversidade, além de uma biomassa rica em moléculas de alto valor agregado, como proteínas, lipídios e corantes, as quais têm inúmeras possibilidades de aplicação em diferentes nichos de mercado, além da possibilidade de uso na produção de biocombustíveis, de biopolímeros, uso como biorremediadores, etc. Porém, as microalgas ainda são pouco exploradas, mesmo com seu alto potencial de utilização. Neste sentido, este trabalho objetivou estudar o cultivo *indoor* da espécie de microalga *Synechococcus nidulans* em meio NPK, analisando a produção de biomassa e o perfil proteico obtido a partir deste cultivo. Inicialmente, o crescimento da microalga foi feito em um fotobiorreator retangular de placa plana em meio NPK, durante o período de 10 dias, com a finalidade de acúmulo de biomassa. A partir desta biomassa obtida, inicialmente foi realizada a avaliação do crescimento de *S. nidulans* através de uma curva padrão, e também a análise do teor de clorofila *a*. Posteriormente foi realizado um estudo elementar da biomassa microalgal, constatando, entre outras informações, a presença de 34,64% de proteínas totais, 27,40% de lipídios totais e 18,72% de carboidratos totais em sua composição. Em seguida, a partir de um protocolo de lise celular microalgal, foram determinadas as concentrações de proteínas totais do extrato bruto microalgal (EBM) e da Fração Precipitada Rica em Proteínas (FPRP) 60-80%, obtida através da precipitação por sulfato de amônio, sendo na FPRP observada uma maior concentração de proteínas totais (4,28 mg.mL⁻¹) do que no EBM (2,31 mg.mL⁻¹).

Palavras-chave: Microalgas. *Synechococcus nidulans*. Cultivo *indoor*.

ABSTRACT

Microalgae have high biodiversity, in addition to a biomass rich in molecules of high added value, such as proteins, lipids and dyes, which have numerous possibilities of application in different market niches, in addition to the possibility of use in the production of biofuels, biopolymers, use as bioremediators, etc. However, microalgae are still little explored, even with their high potential of use. In this sense, this work aimed to study the indoor cultivation of the microalgae specie *Synechococcus nidulans* in NPK medium, analyzing the biomass production and the protein profile obtained from this cultivation. Initially, the growth of the microalgae was done in a rectangular flat plate photobioreactor in the NPK medium, during the period of 10 days, with the purpose of accumulating biomass. From this biomass obtained, initially the growth of *S. nidulans* was evaluated through a standard curve, and also the analysis of the chlorophyll *a* content. Subsequently, an elementary study of microalgal biomass was carried out, verifying, among other information, the presence of 34.64% of total proteins, 27.40% of total lipids and 18.72% of total carbohydrates in its composition. Then, using a microalgal cell lysis protocol, the total protein concentrations of the microalgal crude extract (EBM) and the Protein Rich Precipitated Fraction (FPRP) 60-80%, obtained through ammonium sulfate precipitation, were determined, with a higher concentration of total proteins (4.28 mg.mL^{-1}) in FPRP than in EBM (2.31 mg.mL^{-1}).

Keywords: Microalgae. *Synechococcus nidulans*. Indoor cultivation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Microalgas: conceito, principais grupos e características.....	10
1.2	Sistemas de cultivo das microalgas.....	11
1.3	Fatores que influenciam no cultivo das microalgas	14
1.4	Principais utilizações das microalgas	16
1.5	Produtos da biomassa microalgal e suas aplicações biotecnológicas	17
1.6	Microalgas do gênero <i>Synechococcus</i>	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo geral.....	20
2.2	Objetivos específicos	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	Material biológico	21
3.2	Preparo do pré-inóculo e cultivo da microalga <i>S. nidulans</i> em fotobiorreatores fechados	21
3.3	Avaliação do crescimento da microalga <i>S. nidulans</i>	22
3.4	Coleta e processamento da biomassa microalgal	22
3.5	Análise elementar da biomassa microalgal.....	22
3.5.1	Teor de umidade.....	22
3.5.2	Teor de cinzas.....	23
3.5.3	Teor de proteínas totais.....	23
3.5.4	Teor de lipídios totais.....	24
3.5.5	Teor de carboidratos totais	25
3.5.6	Teor de fibra bruta.....	25
3.6	Análise da clorofila <i>a</i>	26
3.7	Lise celular e preparação do extrato bruto microalgal (EBM)	26

SUMÁRIO

3.8	Precipitação das proteínas do extrato bruto microalgal (EBM) com sulfato de amônio	27
3.9	Dosagem de proteínas solúveis.....	27
3.10	Perfil eletroforético das proteínas de microalgas.....	27
3.11	Análises estatísticas.....	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
4.1	Curva de crescimento	29
4.2	Análise da clorofila <i>a</i>	30
4.3	Caracterização da biomassa microalgal	31
4.4	Determinação das proteínas solúveis do extrato bruto microalgal (EBM)	32
4.5	Ensaio eletroforético SDS-PAGE	33
5	CONCLUSÕES	35
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

1.1 Microalgas: conceito, principais grupos e características

As microalgas compreendem um vasto e heterogêneo grupo de organismos. Para ser considerado deste grupo o organismo deve ser de tamanho pequeno, geralmente microscópico, ser unicelular (ou se agrupar em colônias com pouca ou nenhuma diferenciação celular), apresentar cor devido a seus pigmentos, ocorrer na maioria das vezes em águas e ser majoritariamente fotoautotrófico (característica que não se faz obrigatória). Estima-se que existam cerca de 200.000 até alguns milhões de espécies de microalgas, das quais cerca de apenas 35.000 seriam descritas (RATHA, PRASANNA, 2012; DERNER *et al.*, 2006).

Quanto aos seus meios de nutrição, microalgas podem ser autotróficas ou heterotróficas. No caso das primeiras, exigem apenas compostos inorgânicos, a exemplo de fontes de carbono como sais, além de luz e CO₂ para o seu crescimento. Já as heterotróficas requerem compostos orgânicos para seu desenvolvimento, já que estas não realizam o processo de fotossíntese. Além destas citadas, algumas microalgas são mixotróficas, ou seja, são capazes de realizar fotossíntese e também adquirir energia a partir de nutrientes orgânicos (LEE, 1980).

Dependendo de sua estrutura celular as microalgas podem ser classificadas em dois grupos: procarióticas (compreendendo as cianobactérias) ou eucarióticas (OLAIZOLA, 2003). As procarióticas englobam Cyanophytas (cianobactérias) e Prochlorophytas, e as eucarióticas englobam Chlorophytas, Euglenophytas, Rhodophytas, Prymnesiophytas, Heterokontophytas, Cryptophytas e Dinophytas (DERNER *et al.*, 2006). Apesar das diferenças estruturais e morfológicas entre os membros de cada divisão, estes são fisiologicamente iguais e apresentam seu metabolismo similar ao de plantas (ABALDE *et al.*, 1995).

A sua reprodução pode ocorrer de modo sexuado ou assexuado. A reprodução assexuada pode envolver a produção de esporos, os quais podem ser móveis (zoósporos) ou imóveis (aplasnóporos), dependendo da existência ou não de flagelos, bem como ocorrer através de fissão binária ou fragmentação (ANDRADE, COLOZZI, 2014a). Os esporos são capazes de gerar um novo indivíduo completo. Já na reprodução sexuada a principal maneira de classificação se dá de acordo com os tipos e formas de gametas produzidos. A presença das fases esporófitas e gametófitas é marcante, e há alternância de gerações (LOURENÇO, 2006).

Com uma estrutura celular bastante simples, o que pode levar a serem erroneamente consideradas organismos que não desempenham um papel importante, as microalgas demonstram uma importância ecológica imensa e impactante em diferentes ecossistemas, pois

estas atuam como os mais antigos produtores primários na cadeia alimentar, produzindo matéria orgânica a partir de luz solar, dióxido de carbono e água, sendo também responsáveis por pelo menos 60% de toda a produção primária da Terra (LOURENÇO, 2006; CHISTI, 2004).

Encontradas por toda a superfície terrestre, principalmente em águas, sejam elas de caráter doce ou salgado, as microalgas também podem ser localizadas na superfície de diversos tipos de solo. A maioria apresenta vida livre, embora alguns tipos vivam em associação com outros organismos (TOMASELLI, 2004).

Tradicionalmente, as algas foram por muito tempo classificadas somente de acordo com a sua coloração; atualmente elas são classificadas não só quanto aos tipos de pigmentos, mas também quanto à natureza química dos produtos de reserva e aos constituintes da parede celular (TOMASELLI, 2004).

A aplicação das microalgas é significativa em vários setores, pois a sua biomassa pode ser convertida em diversos produtos, o que faz elas serem consideradas recursos com alto potencial de utilização para o futuro. Dentre os possíveis produtos estão alimentos, pigmentos, biopolímeros, nutracêuticos, pesticidas, biofertilizantes, carvão vegetal, biopetróleo, combustível de transporte e bióleo. Além disso, as microalgas podem ser usadas em tratamentos de águas residuais e na retenção do acúmulo de carbono dióxido de carbono no meio ambiente (MATHIMANI *et al.*, 2019; CHISTI, 2004).

O Brasil, ao possuir enorme área costeira tropical, 12% do abastecimento de água doce mundial e altos e constantes níveis de insolação durante todo o ano em grande parte do seu território, se faz um país extremamente promissor no quesito de produção em larga escala de microalgas. Estima-se que ¼ das espécies de microalgas de água doce da Terra ocorram em águas brasileiras (BRASIL, COSTA, 2016). São quatro os grandes nichos de mercado para as mercadorias baseadas em microalgas, sendo eles: energia, ração e alimentos, produtos químicos e materiais e produtos farmacêuticos e cuidados pessoais (BARSANTI, GUALTIERI, 2018).

1.2 Sistemas de cultivo das microalgas

O cultivo de microalgas é praticado há cerca de 140 anos e vem acompanhando os progressos científicos desde então. O cultivo define-se como populações de organismos que podem ser mantidas vivas sob condições controladas e artificiais de desenvolvimento. Os cultivos apresentam objetivos diversos, como produção de biomassa e aproveitamento econômico a partir disso, por exemplo (LOURENÇO, 2006).

No mundo, o primeiro registro feito de cultivo de uma espécie de microalga foi em 1850 pelo polonês Cohn, quando este manteve a alga verde flagelada *Haematococcus* viva em laboratório (BARROS, 2010). Contudo, o cultivo das microalgas já a nível comercial iniciou-se somente bem posteriormente, na década de 60 no Japão com o cultivo de *Chlorella*, pois antes disso a ciência aprimorava os métodos de cultivo das microalgas, o que se ligava diretamente ao progresso dos estudos bacteriológicos (LOURENÇO, 2006).

Os sistemas de cultivo de microalgas dividem-se em sistemas abertos e fechados, e a decisão de qual usar parte da finalidade de uso do sistema. Além disso, as principais formas de cultivos de microalgas são fototrófica, heterotrófica, mixotrófica e foto-heterotrófica, como detalhado no Quadro 1 (HAKALIN, 2014).

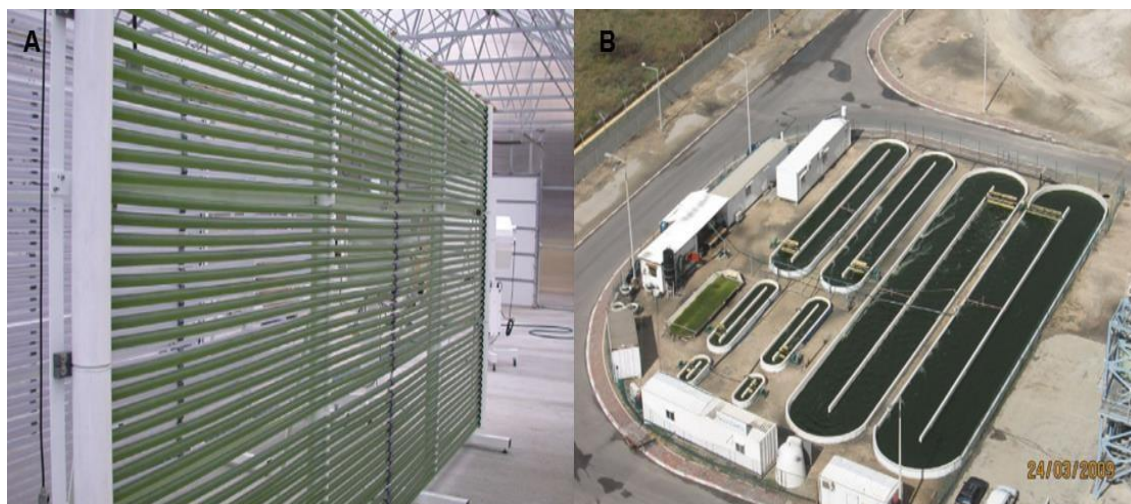
Há várias considerações a serem feitas sobre a escolha de qual sistema de cultura utilizar. Os principais fatores a serem considerados são a biologia da alga, o custo da terra, trabalho, energia, água, nutrientes, clima (no caso de a cultura ser aberta) e o tipo de produto final desejado (BOROWITZKA, 1992).

Quadro 1 - Principais características das condições de cultivo de microalgas

	Fototrófico	Heterotrófico	Mixotrófico	Fotoheterotrófico
Fonte de energia	Luz	Orgânica	Luz e orgânica	Luz
Fonte de carbono	Inorgânica	Orgânica	Inorgânica e orgânica	Orgânica
Densidade celular	Baixa	Alta	Média	Média
Tipo de reator	Aberto ou fotobiorreator	Fermentador convencional	Fotobiorreator fechado	Fotobiorreator fechado
Custo	Baixo	Médio	Alto	Alto
Principais desvantagens	Baixa densidade Contaminação em sistema aberto	Alto custo de substrato Risco de contaminação	Alto custo de substrato e equipamento Risco de contaminação	Alto custo de substrato e equipamento Risco de contaminação

Fonte: Hakalin (2014).

Figura 1 - Fotobiorreatores representando um sistema de cultivo fechado (A) e *raceways* representando um sistema de cultivo aberto (B)



Fonte: Greenwell *et al.* (2010).

O cultivo fototrófico é o mais comum para microalgas e os dois principais métodos empregados para o cultivo em larga escala são os fotobiorreatores tubulares e as pistas abertas. Em menor grau, vêm os fermentadores para cultivo mixo/heterotrófico. Destes, o sistema mais usado é o do tipo pista aberta, em que são utilizados tanques de tamanhos variados, os quais ficam expostos às condições naturais de iluminação, temperatura, evaporação e contaminação, já que ficam a céu aberto, como visto na Figura 1B. Estes tanques geralmente não são profundos, e são construídos em concreto, fibra de vidro ou policarbonato, com terra ou material plástico em seu fundo, e as culturas microalgais são mantidas em circulação constante (RAWAT *et al.*, 2013). Esse sistema é vantajoso, pois apresenta facilidades em sua construção, em sua operação (comparado aos sistemas fechados) e há a redução do custo com energia, já que as microalgas ficam expostas ao sol (BOROWITZKA, 1999). Porém também apresenta desvantagens, como uma alta taxa de evaporação e alta suscetibilidade à contaminação microbiológica, principalmente por espécies competitivas.

Os sistemas fechados também estão em constantes estudos para seu desenvolvimento, e são chamados de fotobiorreatores, observados na Figura 1A. Eles não necessariamente são cultivos hermeticamente fechados, mas sim com contatos mínimos com meio externo (WOJCIECHOWSKI *et al.*, 2013). Os fotobiorreatores são geralmente construídos em plástico, vidro ou policarbonato, e se distribuem em painéis achatados ou em serpentinas. Neles, é possível controlar as condições de cultivo, como a concentração de

nutrientes, temperatura, pH e luz, o que geralmente os leva a apresentar maior produtividade do que os sistemas abertos (RAWAT *et al.*, 2013). Porém, estes são muito caros a se manter, e muitas vezes difíceis de escalonar (BOROWITZKA, 1999).

1.3 Fatores que influenciam no cultivo das microalgas

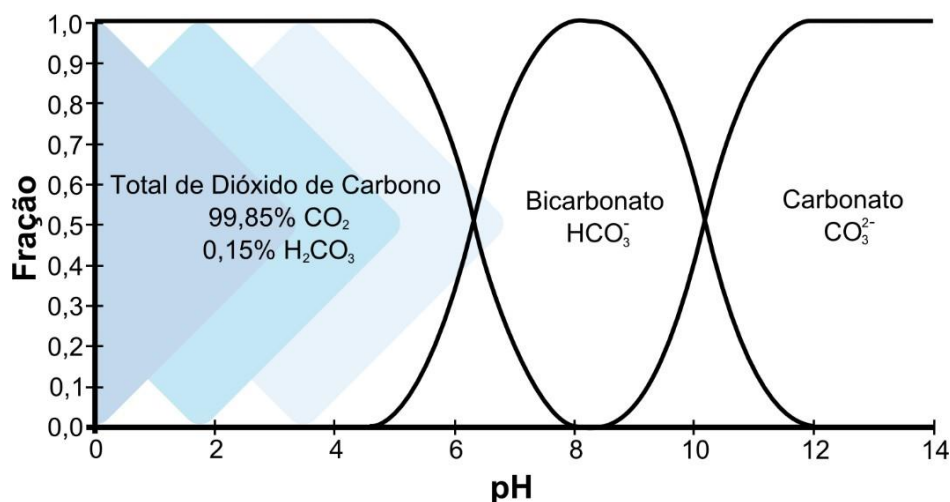
Existem diversos fatores que acabam por influenciar na produção da biomassa microalgal, e independente da metodologia de cultivo a ser utilizada é imprescindível que se mantenha o estado ótimo para o crescimento, já que a atividade metabólica é facilmente afetada pelas condições físicas e químicas ambientais, que são fatores limitantes de crescimento. Os principais fatores físico-químicos que afetam o crescimento das microalgas são a luz, temperatura, pH, salinidade e a disponibilidade de nutrientes (GUILLARD, 1975).

A temperatura é um fator que impacta diretamente na taxa metabólica das microalgas e esta deve ser escolhida de modo personalizado, tendo-se em vista as necessidades de cada espécie e a finalidade do cultivo. Por exemplo, espécies tropicais podem ser cultivadas sob temperaturas entre 20 e 25 °C, espécies de ambientes temperados em temperaturas entre 10 e 20°C, e espécies advindas de ambientes polares cultivadas sob temperaturas de até 5°C (LOURENÇO, 2006). As microalgas do gênero *Synechococcus*, por exemplo, podem alterar suas dimensões celulares quando sob altas temperaturas. Além disso, a temperatura é um fator ambiental muito importante no papel regulatório das concentrações de O₂ e CO₂ na água (WOJCIECHOWSKI *et al.*, 2013).

Já quanto à luminosidade, que permite a atividade fotossintética das algas, importam tanto a intensidade luminosa, que se define como a quantidade de fótons incidentes sobre uma determinada área, quanto a qualidade do espectro luminoso, que é a proporção de diferentes comprimentos de onda no espectro luminoso. As ondas de luz na faixa de comprimento entre 400 e 700 nm são ideais para o estímulo das células microalgais cultivadas (WOJCIECHOWSKI *et al.*, 2013)

A maior parte dos ambientes aquáticos apresenta pH entre 6 e 9 (WOJCIECHOWSKI *et al.*, 2013). O pH da água do mar, por exemplo, é influenciado diretamente por formas de carbono dissolvidas na água, em diferentes proporções, como visto na Figura 2.

Figura 2 - Distribuição das formas de carbono em diferentes pHs na água



Fonte: Adaptado de Liter (2020).

Alguns tampões são utilizados em meios para controlar as variações de pH. Este último se faz de extrema importância, pois consegue interferir no metabolismo das microalgas, podendo modular a permeabilidade da membrana, o transporte de íons e a velocidade das reações enzimáticas, por exemplo, bem como outros processos (LOURENÇO, 2006).

Os gases oxigênio e carbônico se relacionam diretamente aos processos de fotossíntese e respiração, sendo assim extremamente necessários ao cultivo. A água dispõe de pouco oxigênio naturalmente devido à baixa pressão parcial atmosférica e a baixa solubilidade do gás. O CO₂ também deve ser adicionado à água por ser a maior fonte de carbono para a fotossíntese das microalgas, pois as concentrações de CO₂ em água são inversas às de O₂, o qual é mais solúvel (WOJCIECHOWSKI *et al.*, 2013).

Os meios de cultura possuem nutrientes importantes no processo de desenvolvimento das microalgas, podendo ser estes macro ou micronutrientes. Os macronutrientes são requeridos em grandes quantidades e desempenham funções altamente importantes na estrutura e metabolismo das microalgas. Já os micronutrientes são necessários em quantidades menores e apresentam funções enzimáticas e estruturais (WOJCIECHOWSKI *et al.*, 2013).

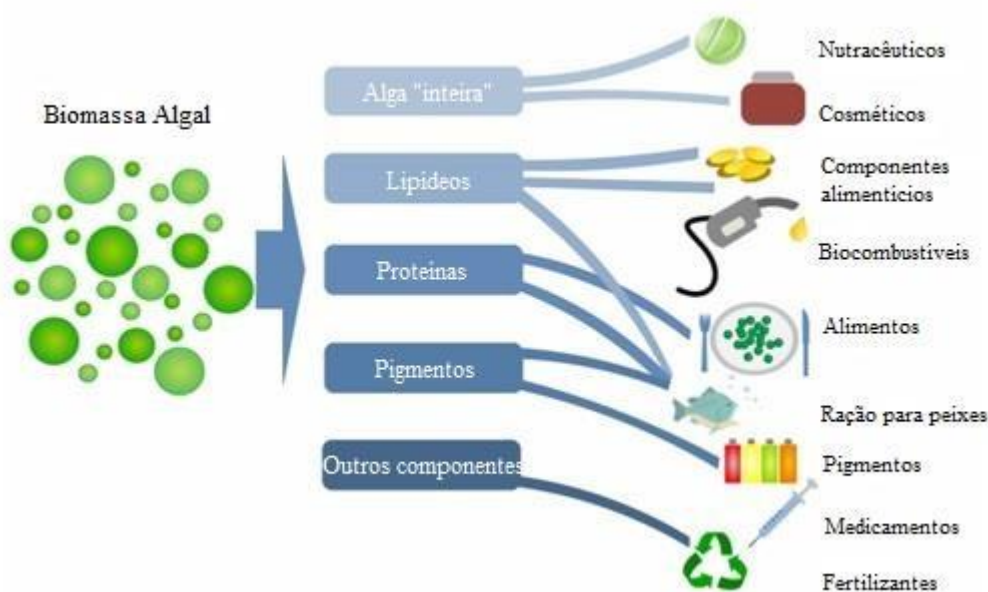
A produção de lipídeos e as concentrações de ácidos graxos nas microalgas parece ter relação direta com a composição dos meios de cultura, com o acúmulo de ácidos graxos sendo resposta aos efeitos limitantes de nutrientes e do tempo de cultivo (CHELLAMBOLI, PERUMALSAMY, 2014). Dentre os vários nutrientes requeridos, os mais importantes são o

fósforo e nitrogênio, os quais já estão presentes em ambientes aquáticos de diversas maneiras, podendo ser dissolvidos, particulados, em formas bióticas etc., embora somente a forma dissolvida é utilizada pelas microalgas diretamente para o seu crescimento. Algumas várias outras espécies também requerem pequenas quantidades de outros compostos orgânicos, a exemplo de vitaminas (LOURENÇO, 2006).

1.4 Principais utilizações das microalgas

As altas concentrações de nutrientes encontrados na biomassa microalgal de espécies diferentes desperta o interesse da comunidade científica, ampliando suas possibilidades de utilização. Assim, as aplicações da biomassa de microalgas se fazem bastante diversificadas, sendo usadas na alimentação humana e animal, em diversos ramos da indústria, no tratamento de águas residuais, na produção de biocombustíveis, etc., como representado na Figura 3.

Figura 3 - Aplicações da biomassa microalgal



Fonte: Adaptado de Slegers (2014).

Um dos exemplos de utilização no campo alimentício é visando a nutrição de organismos aquáticos em cultivo comercial, pois as algas oferecem ácidos graxos importantes no crescimento e metamorfose das larvas (BECKER, 2004). Já na alimentação humana, podem ser comercializadas na forma suplemento alimentar natural, pois dispõem de vários valiosos

pigmentos carotenoides, os quais são conhecidos por apresentar importantes propriedades terapêuticas (GILL, VALIVETY, 1997).

As microalgas também se apresentam como uma excelente aposta na produção de biodiesel, pois estudos revelam que elas possuem um alto rendimento de óleo (PÉREZ 2007). Nesse quesito também se mostram altamente promissoras, pois a humanidade tem uma alta demanda por energia e os recursos se mostram cada vez mais escassos. A queima de combustíveis fósseis vem se tornando cada vez mais obsoleta por gerar elevados níveis de poluição, e a energia limpa das microalgas se torna mais uma vez uma opção interessante (MARTÍN, GROSSMANN, 2012). Contudo, a produção de biodiesel a partir das algas ainda enfrenta um grande problema no que diz respeito à necessidade de uma fonte abundante e concentrada de CO₂ como suplementação em seu cultivo, o que leva ao aumento dos custos de produção em escala comercial (POKOO-AIKINS *et al.*, 2010).

Outra forma de utilização das microalgas é na biorremediação de solos, como os de interesse agrícola que apresentam como poluentes íons, por exemplo (SOLOVCHENKO *et al.*, 2016).

1.5 Produtos da biomassa microalgal e suas aplicações biotecnológicas

Algumas algas podem apresentar até 80% da composição do seu peso de biomassa seca apenas de lipídeos (NARENDAR, JAYACHANDRAN, GANTAR, 2015). Além disso, as microalgas têm 80% do teor médio da energia potencial do petróleo, o que faz com que a sua biomassa seja uma grande promessa quanto à utilização tanto na produção de energia elétrica quanto de biocombustíveis para transportes (MILANO *et al.*, 2016). A fermentação da biomassa para a produção de bioetanol, por exemplo, auxilia na redução da formação de CO₂ quando comparado ao uso dos combustíveis fósseis (PÔJO, 2016).

A biomassa das microalgas ganha cada vez mais destaque graças às pesquisas recentes que vêm revelando a sua riqueza em compostos extremamente visados, como carotenoides, clorofila, lipídeos, proteínas, vitaminas, carboidratos, enzimas, antibióticos etc., mostrando o assim o todo potencial de utilização biotecnológica desta biomassa (LIMA, 2016).

A partir destes compostos, é grande a diversidade de produtos que podem ser gerados, os quais podem ser aplicados na produção de suplementos alimentares, de fármacos, na produção de biocombustíveis, no tratamento de águas residuais, na agricultura, entre outras possibilidades (ARCEO, 2012). A biomassa algal também pode ser submetida à fermentação a

partir da digestão anaeróbia da matéria orgânica, o que gera o biometano, uma outra forma de energia renovável. Além disso, a biomassa restante deste processo de digestão pode ser usada como fertilizante (POJÔ, 2016).

A microalga *Spirulina sp.*, por exemplo, gera vários compostos nutracêuticos com propriedades diversas, sendo possível utilizá-la em terapias contra câncer por conta de seu β -caroteno, também na prevenção da deficiência de vitamina A, na prevenção de doenças degenerativas, no estímulo de produção de certas prostaglandinas e na aceleração do processo de cicatrização de feridas, por exemplo (GARCÍA, 2013). Além disso, várias microalgas fazem-se relevantes como alternativas para a obtenção de proteínas e aminoácidos essenciais nas alimentações humana e animal (LIMA, 2016).

Um outro produto feito a partir da biomassa de microalgas é o *Microp*, o qual é composto por um concentrado de cianobactérias fotossintetizantes em estado dormente, que ao entrar em contato com o solo quebram sua dormência e promovem uma série de benefícios, como fixação de nitrogênio no solo, liberação de cálcio e fosfatos, diminuição do teor salino no solo, suplementação do crescimento das plantas, melhorias nas propriedades físicas do solo, a exemplo da diminuição da erosão etc. O *Microp* atualmente é cadastrado como produto orgânico no *Organic Materials Review Institute* (OMRI) e seu propósito é amenizar problemas de solo e manter o rendimento das culturas e a saúde das plantas sempre no máximo (SOILTECH, 2020).

Outra possibilidade de utilização da biomassa das microalgas é no nicho da dermatocsmética, em que extratos algais ricos em proteínas atuam com suas propriedades antienvhecimento, regeneradores dérmicos e estimulam a síntese de colágeno etc. (LIMA, 2016).

1.6 Microalgas do gênero *Synechococcus*

As microalgas do gênero *Synechococcus* têm alto potencial de biorremediação de metais, já que algumas espécies são capazes de armazenar metais tanto intra como extracelularmente, enquanto outras armazenam em suas superfícies (BENCHRAKAC, 2014). Além disso, a espécie tem sido associada à produção de grãos finos e suspensos de carbonato de cálcio, o que contribui para a deposição de carbonato sedimentar (GRAHAM, WILCOX, 2000).

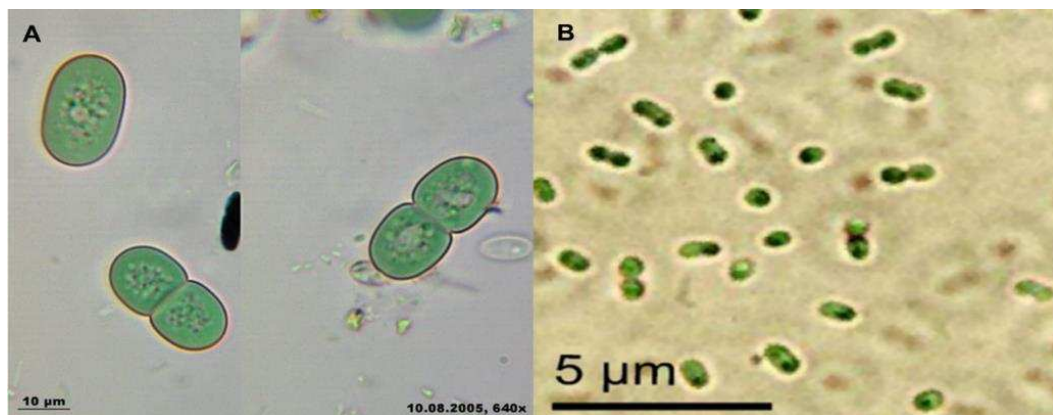
Várias espécies de *Synechococcus* crescem no interior de colônias ou de extratos algais e também pode formar finos agrupamentos em substratos úmidos, como pedras, por exemplo. Outras crescem em fontes termais e minerais, sendo poucas subaéreas. Algumas compõem o plâncton e o picoplâncton de lagos e oceanos (FRANCESCHINI *et al.*, 2010).

A divisão das células desse gênero se dá apenas em uma direção, o que explica as células serem geralmente alongadas, de paredes celulares bastante finas, e podem ser encontradas tanto sozinhas como agrupadas. Seu conteúdo celular é geralmente nas cores verde azulado, verde, laranja pálido ou amarelo (NÄGELI, 1849).

As espécies do gênero *Synechococcus* se reproduzem assexuadamente por fissão binária, além de serem as mais importantes fotossintetizadoras do ambiente marinho, sendo responsáveis por em torno de um quarto da produção de oxigênio total (MARGULIS, SCHWARTZ, 2001).

Deste gênero, mais especificamente a *Synechococcus nidulans* (Figura 4) é uma microalga fotossintética, a qual é capaz de gerar diversos biocompostos, como por exemplo biopolímeros (NISHIOKA *et al.*, 2001). Ela é um importante produtor primário no plâncton de águas frescas doces ou marinhas, mas também já foi encontrada na superfície de outras algas e em plantas.

Figura 3 - Cianobactéria do gênero *Synechococcus* (A) e microfotografia da microalga *Synechococcus nidulans* (B)



Fonte: Sant'Anna *et al.* (2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a viabilidade do cultivo *indoor* da microalga *Synechococcus nidulans* em meio NPK para a produção de biomassa e analisar o perfil proteico microalgal.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- a) testar a eficiência do meio NPK no cultivo da microalga *S. nidulans* em fotobiorreator fechado;
- b) avaliar o padrão de crescimento da microalga *S. nidulans* em meio NPK;
- c) produzir biomassa microalgal utilizando fotobiorreator fechado;
- d) analisar a composição elementar da biomassa microalgal;
- e) extrair e dosar proteínas solúveis da biomassa microalgal;
- f) analisar o perfil proteico da microalga *S. nidulans* por eletroforese.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

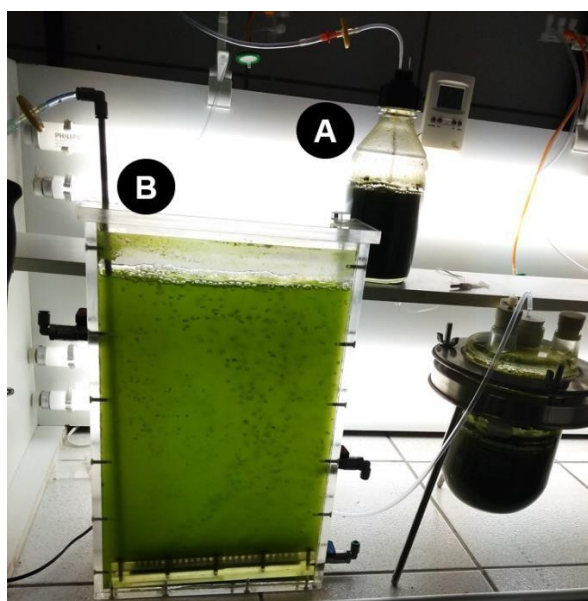
3.1 Material biológico

A microalga *S. nidulans* utilizada no presente trabalho é mantida na algoteca do Laboratório de Biotecnologia Molecular (LabBMol), sediado na Universidade Federal do Ceará (UFC) e, no momento, as informações estão sendo revisadas para o registro no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado).

3.2 Preparo do pré-inóculo e cultivo da microalga *S. nidulans* em fotobiorreatores fechados

Uma alíquota do meio de cultura contendo as microalgas foi inicialmente pré-inoculada sob condições assépticas em um fotobiorreator cilíndrico (Figura 5A) contendo 100 mL de meio Zarrouk (ZARROUK, 1966). Este fotobiorreator foi mantido por 7 dias em câmara termostatzada a 30 °C (+ 2 °C), utilizando-se um fotoperíodo de 12h, intensidade luminosa de 4000 Lux e aeração estéril constante (mantida por aerador elétrico e filtros de 0,25 µm). Após esse período, o pré-inóculo (com uma densidade óptica a 600 nm = 0,5) foi inoculado num fotobiorreator retangular de placa plana (Figura 5B) contendo 4L do meio NPK (20:10:20 g/L) a pH 7,0. A cultura foi mantida por 10 dias na plataforma de crescimento usando as mesmas condições utilizadas para o pré-inóculo.

Figura 5 - Pré-inóculo de microalga *S. nidulans* cultivado em fotobiorreator cilíndrico artesanal (A) e cultivo da microalga em fotobiorreator fechado de placa plana (B)



Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 Avaliação do crescimento da microalga *S. nidulans*

Uma maneira confiável de acompanhar o crescimento celular é medindo a concentração de biomassa usando um espectrofotômetro. Para determinar a concentração de células, a densidade óptica (DO) foi medida a 600 nm usando um espectrofotômetro UV-vis (*Amersham Biosciences*©/*Ultrospec 2100 Pro*). Antes de qualquer estimativa poder ser realizada, foi feita uma curva de calibração com base na densidade óptica da cultura de microalgas e o peso da biomassa seca microalgal (Gráfico 1). Para determinar a concentração de biomassa para uma DO específica, uma amostra de 2 mL foi coletada de 100 mL de cultura microalgal retirada do fotobiorreator durante a fase exponencial. Cinco diluições seriadas (1:2 v/v) foram feitas a partir desta amostra e as densidades ópticas foram registradas. O volume restante da cultura (98 mL) foi submetido à secagem em estufa a 90 °C por 24 h. Após a secagem completa, a amostra foi movida para um dessecador. Após 1 h de resfriamento, o peso seco da biomassa foi medido e registrado. Ao dividir esse valor pelo volume registrado, temos como resultado a concentração de biomassa da amostra original. Este ensaio foi realizado em triplicata.

3.4 Coleta e processamento da biomassa microalgal

Ao final do período de cultivo (correspondente à fase estacionária), a cultura de microalgas foi coletada e concentrada por centrifugação a 10.000 x g por 30 min, à temperatura ambiente (25 °C). O precipitado de biomassa foi lavado com água destilada para a remoção do meio de cultura através de quatro etapas alternadas de ressuspensão em água destilada e centrifugação conforme descrito anteriormente. A biomassa fresca foi pesada em balança analítica e submetida ao processo de liofilização. A biomassa então seca foi pesada para o cálculo de rendimento e acondicionada para uso nas etapas posteriores.

3.5 Análise elementar da biomassa microalgal

3.5.1 Teor de umidade

A determinação da umidade foi realizada por meio da utilização de materiais como cadinhos de porcelana, balança analítica, estufa, dessecador e pinça (para manusear os cadinhos). Amostras de 1 g da biomassa seca foram pesadas em cadinhos de porcelana, previamente tarados em balança analítica. As referidas amostras foram colocadas em estufa com temperatura entre 100 a 105 °C por 24 h, técnica descrita por Nagakura (1972). Depois os

cadinhos foram retirados e transferidos para um dessecador com auxílio de pinça, até atingir a temperatura ambiente, sendo pesados posteriormente. O resultado da umidade foi encontrado pela diferença de peso inicial e final gerando uma resultante em percentagem. A fórmula utilizada foi:

$$\%U = \frac{V_1 - V_0}{V_2 - V_0} \times 100$$

Onde:

U = Umidade;

V₀ = Peso do cadinho seco;

V₂ = Peso do cadinho com amostra;

V₁ = Peso do cadinho com amostra depois da secagem.

3.5.2 Teor de cinzas

Para a determinação do teor de cinzas, amostras de 1 g de biomassa microalgal seca foram adicionadas em cadinhos previamente tarados, os quais foram posteriormente pesados e transferidos para mufla a 600 °C, por 4 h. Depois, os cadinhos foram para o dessecador até atingir a temperatura ambiente para em seguida serem pesados (BRASIL, 2011). Para o cálculo final do teor de cinzas expresso em porcentagem, utilizou-se a fórmula:

$$\%C = \frac{V_1 - V_0}{V_2 - V_0} \times 100$$

Onde:

C = Cinza;

V₀ = Peso do cadinho;

V₁ = Peso do cadinho que continha as cinzas;

V₂ = Peso do cadinho que continha as amostras.

3.5.3 Teor de proteínas totais

A determinação do teor de proteínas totais foi realizada conforme o método de Micro-Kjeldahl, o qual é baseado na transformação do nitrogênio orgânico da amostra em sulfato de amônio pela digestão com ácido sulfúrico e posterior destilação com liberação da amônia, a qual é fixada em solução ácida e titulada.

Pedaços de papel vegetal contendo 0,2 g de amostra macerada foram acondicionados em tubos com 2 g do catalisador, contendo uma mistura de sulfato de cobre (CuSO_4), selênio metálico (Se) e sulfato de potássio (K_2SO_4), aos quais foram posteriormente adicionados 4 mL de ácido sulfúrico. Em seguida, os tubos foram levados ao aparelho digestor a 350 °C, e estes foram observados até o final da digestão. Com o auxílio de um destilador, a amostra digerida foi neutralizada a partir da adição de hidróxido de sódio (NaOH) a 50%, até o surgimento da coloração escura, devido a formação de óxido de cobre (Cu_2O). Esta mistura foi destilada por meio do arraste de vapor e o produto (destilado) foi recolhido em erlenmeyer com 10 mL de solução de ácido bórico (H_3BO_3) a 2%, adicionando-se 300 μL de indicador misto (vermelho de metila e verde de bromocresol), até completar 50 mL. Desse modo, a mistura destilada foi titulada com solução padrão de ácido clorídrico (HCl) a 0,04 M em bureta até o surgimento de uma leve coloração rosada, e assim anotou-se o volume de ácido gasto. A porcentagem de nitrogênio total foi obtida através da fórmula:

$$\%NT = \frac{(\text{Volume da amostra} - \text{Volume do branco}) \times 0,014 \times 0,04}{\text{Peso da amostra}} \times 100$$

A conversão do nitrogênio total (NT) para proteína total (PT) foi obtida a partir da fórmula:

$$\%PT = \%NT \times 6,25$$

3.5.4 Teor de lipídios totais

O teor de lipídios foi determinado pelo método de Soxhlet, o qual visa extrair lipídios totais a partir de matéria orgânica, com o auxílio de um solvente orgânico; neste caso, o utilizado foi o hexano. Balões foram colocados em estufa a 100 °C durante uma hora. Após esse período, estes balões foram levados ao dessecador até atingir a temperatura ambiente, sendo então pesados (BRASIL, 2011). Posteriormente, foram pesadas amostras de 1 g de biomassa para serem colocadas nos cartuchos de extração (papel filtro) e tampadas com algodão. Os balões contendo 100 mL de solvente foram levados ao determinador de gordura para a extração a 90 °C por duas horas. Logo após a extração, a amostra gotejou por trinta minutos (para a recuperação do solvente o aparelho foi calibrado para 150 °C e, posteriormente,

os balões contendo o lipídio foram transferidos ao dessecador até atingir a temperatura ambiente para serem pesados). O cálculo para obtenção da porcentagem de lipídeos foi realizado conforme a equação abaixo:

$$\%Lipídio = \frac{(Peso\ do\ balão + Gordura) - (Peso\ do\ balão\ vazio) \times 100}{(Peso\ da\ Amostra)}$$

3.5.5 Teor de carboidratos totais

O teor de carboidratos totais presentes na biomassa microalgal foi obtido por diferença (PEARSON, 1976), empregando-se a seguinte equação:

$$\%Carboidratos = (100\% \ da \ Biomassa) - [(\%Lipídio) + (\%Cinzas) + (\%Proteínas)]$$

3.5.6 Teor de fibra bruta

O teor de fibra bruta foi determinado pelo método de Hennerberg (WINTON, WINTON, 1958), no qual ocorre a degradação de toda fibra solúvel e de grande quantidade de fibra insolúvel, com digestão ácida e alcalina da amostra previamente dessecada e desengordurada. O resíduo obtido constitui a fibra bruta.

Amostras de 1 g da biomassa delipidada foram adicionadas a uma solução de ácido sulfúrico 1,25% e, após a homogeneização, foram mantidas em banho seco por 30 minutos até alcançar a fervura. Em seguida, essas amostras foram filtradas em papéis de filtro quantitativo, previamente aquecidos em estufa a 105 °C por 1 h e pesados. Em seguida, cada papel de filtro contendo o resíduo foi lavado com água quente até não haver mais reação básica com o papel indicador de pH. Posteriormente, os resíduos foram lavados por 3 vezes com 3 mL álcool etílico (P.A) e 2 vezes com 3 mL de éter etílico (P.A). Após a evaporação dos solventes, os papéis de filtro com o resíduo foram colocados em estufa a 105 °C para secagem, até alcançarem um peso constante. Os papéis com resíduo foram colocados em cadinhos de porcelana previamente tarados, e em seguida foram incinerados em forno mufla a uma temperatura de 600 °C. O teor da fibra bruta foi estipulado através da seguinte fórmula:

$$F = [(P + F + C) - P] - C$$

$$\%F = \frac{F \times 100}{P}$$

Onde:

P = Peso do papel;

F = Fibra;

C = Cinza.

3.6 Análise da clorofila *a*

Para determinação do teor de clorofila *a* microalgal, inicialmente 1g de microalga fresca foi macerado com nitrogênio líquido, sendo em seguida adicionados 5 mL de acetona (P.A.) refrigerada. O produto da maceração foi filtrado em fibra de vidro e coletado em balão volumétrico de 50 mL. A acetona foi adicionada sobre o macerado restante na fibra de vidro, até atingir o volume final de 50 mL de filtrado. Esse procedimento foi realizado sem a presença de luz. A absorbância da clorofila *a* foi medida em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 664, 647 e 630 nm, respectivamente. A concentração do pigmento foi determinada de acordo com a equação definida por Clesceri e Greenberg (1989), descrita abaixo:

$$\text{Clorofila } a \left(\frac{mg}{mL} \right) = 11,85 Abs_{664} - 1,54 Abs_{647} - 0,08 Abs_{630}$$

3.7 Lise celular e preparo do extrato bruto microalgal (EBM)

A biomassa microalgal de 1 g foi pesada em um tubo Falcon e dissolvida em 10 mL do tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contendo NaCl 150 mM, PMSF 1 mM e EDTA 0,2 mM) e homogeneizada sob agitação. A mistura foi submetida a três ciclos de congelamento lento em um freezer a -20 °C, e depois descongelamento. Em seguida, a mistura foi transferida para um homogeneizador Potter e macerada vigorosamente por 10 mim. Após esse período, a mistura macerada foi transferida para um novo tubo Falcon e mantida sob agitação por 60 mim no agitador orbital a 15 °C. Na última etapa do processo de lise, a mistura foi submetida a um ciclo de ultrassonicação usando 180 pulsos de 10s e 180 intervalos de 15 segundos. Durante a ultrassonicação a mistura foi mantida em gelo. Após a etapa de lise, o extrato microalgal foi centrifugado 15.000 x g por 30 min. O sobrenadante (denominado Extrato Bruto Microalgal ou EBM) foi cuidadosamente coletado e o precipitado foi descartado. O EBM foi transferido para microtubos de 2 mL e congelado a -20 °C.

3.8 Precipitação das proteínas do extrato bruto microalgal (EBM) com sulfato de amônio

O EBM foi submetido à precipitação de proteínas com sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, utilizando-se o nível de saturação 60-80%. O EBM saturado foi mantido em repouso por 16 h à 10 °C, e em seguida, centrifugado a 12.000 x g por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado coletado, solubilizado com tampão PBS pH 7, dialisado por 12 h contra água ultrapura (*MilliQ*) e por mais 4 h com o mesmo tampão. Esse solubilizado (denominado Fração Precipitada Rica em Proteínas, ou FPRP) foi submetido à dosagem de proteínas.

3.9 Dosagem de proteínas solúveis

A dosagem de proteínas da fração precipitada rica em proteínas (FPRP) obtida da biomassa microalgal foi realizada através do método de Bradford (1976), que é uma técnica para a determinação de proteínas totais. Para cada 100 µL da FPRP, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. As misturas foram agitadas e deixadas em repouso por 10 min a 25 °C. Em seguida, foi determinada a absorbância a 595 nm, em espectrofotômetro. A concentração de proteínas foi calculada a partir de uma curva padrão obtida com albumina sérica bovina (BSA).

3.10 Perfil eletroforético das proteínas de microalgas

Os ensaios de eletroforese foram realizados sob condições redutoras e desnaturantes (LAEMMLI, 1970). Foi utilizado um gel de aplicação de 3,5% de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) e um gel de separação com 15 % de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 8,8) contendo SDS 1%. As corridas eletroforéticas foram realizadas a 25 mA e uma voltagem inicial de 100 V.

A amostra que apresentou melhor resultado na precipitação de proteína foi preparada em tampão de amostra (Tris-HCl 62,5 mM pH 8,3 contendo SDS 1%, β -mercaptoetanol 0,1%, sacarose e azul de bromofenol 1%): 5 µL do tampão de amostra para 25 µL da amostra analisada. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 2 min e centrifugadas a 1000 rpm por 5 min à temperatura ambiente. Então, foram aplicados 15 e 20 µL de amostras em cada poço do gel, respectivamente, para EBM e FPRP 60-80%. Foram usados marcadores moleculares no primeiro poço. As bandas proteicas foram coradas com

Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,05 %, preparado em uma solução de metanol:ácido acético:água (1:3,5:8, v/v/v).

3.11 Análises estatísticas

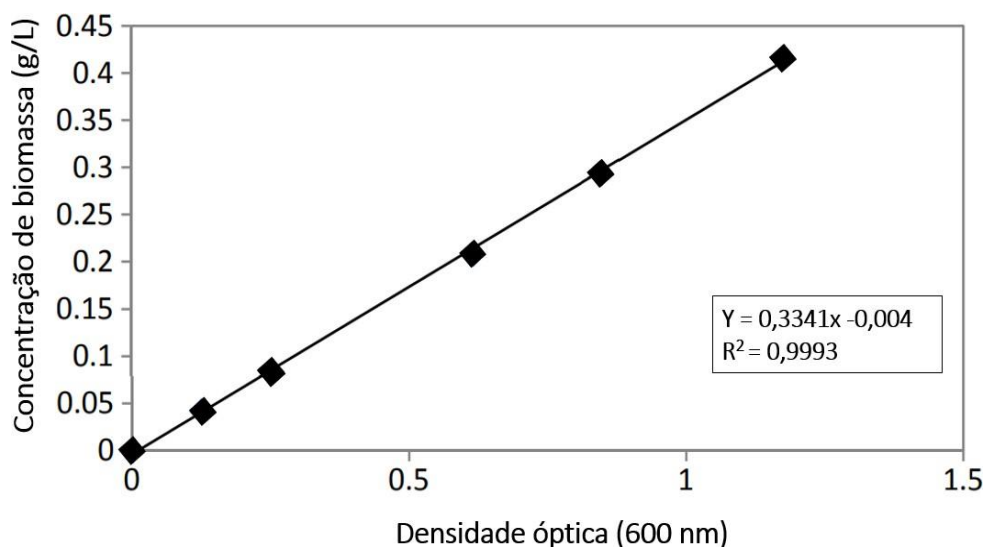
As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância e teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade, visando detectar diferenças entre as médias dos dados obtidos. Para realização destas análises, foi utilizado o programa ASSISTAT 7.5.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Curva de crescimento

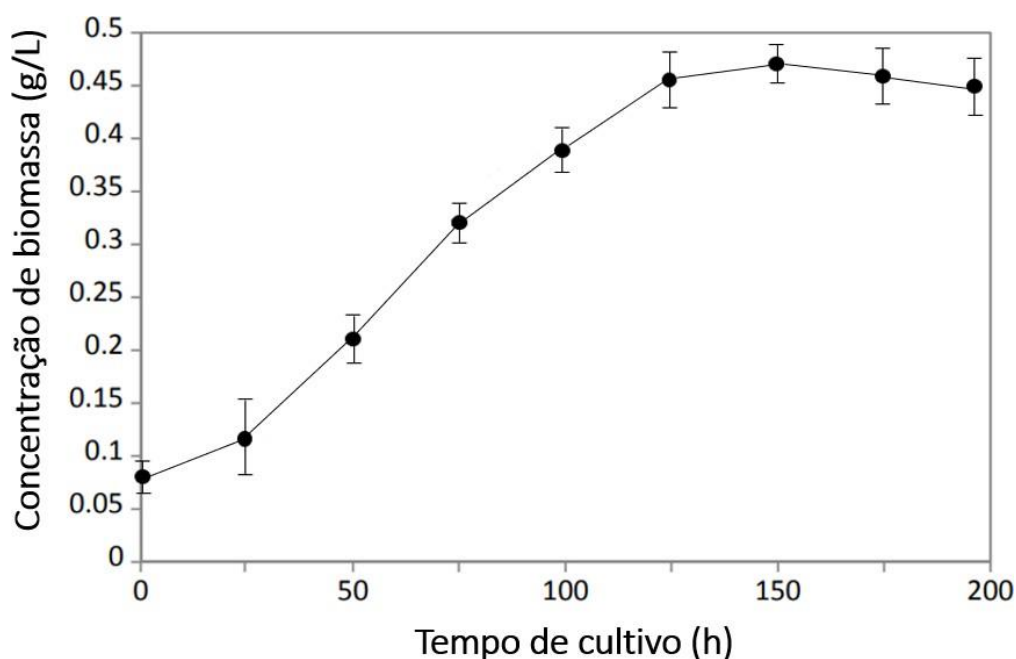
Como descrito anteriormente, a princípio foi feita uma curva de calibração com base na densidade óptica (DO) da cultura de microalgas e o peso da biomassa seca microalgal antes de qualquer medição das concentrações de biomassa ser realizada (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Relação determinada entre a concentração de biomassa seca de *S. nidulans* e a densidade óptica a 600 nm



Fonte: Elaborado pela autora.

Posteriormente foi feita a curva padrão, onde podemos observar as fases de crescimento log e estacionária bem definidas até às 150 h de cultivo (Gráfico 2). A fase lag mostrou-se praticamente imperceptível, sinalizando então que houve uma rápida adaptação do pré-inóculo microalgal ao meio NPK. A fase log foi observada até às 150 h de cultivo, indicando crescimento exponencial das células pelo aumento da síntese de biomoléculas imprescindíveis para o metabolismo celular. A diminuição da taxa de crescimento foi observada após as 150 h, fase na qual notam-se as mudanças na composição do meio por conta da produção de várias biomoléculas como inibidores enzimáticos, esgotamento de nutrientes e fotoinibição devido à alta densidade celular, levando a um decréscimo no crescimento celular.

Gráfico 2 - Curva de crescimento da microalga *S. nidulans* em fotobiorreator

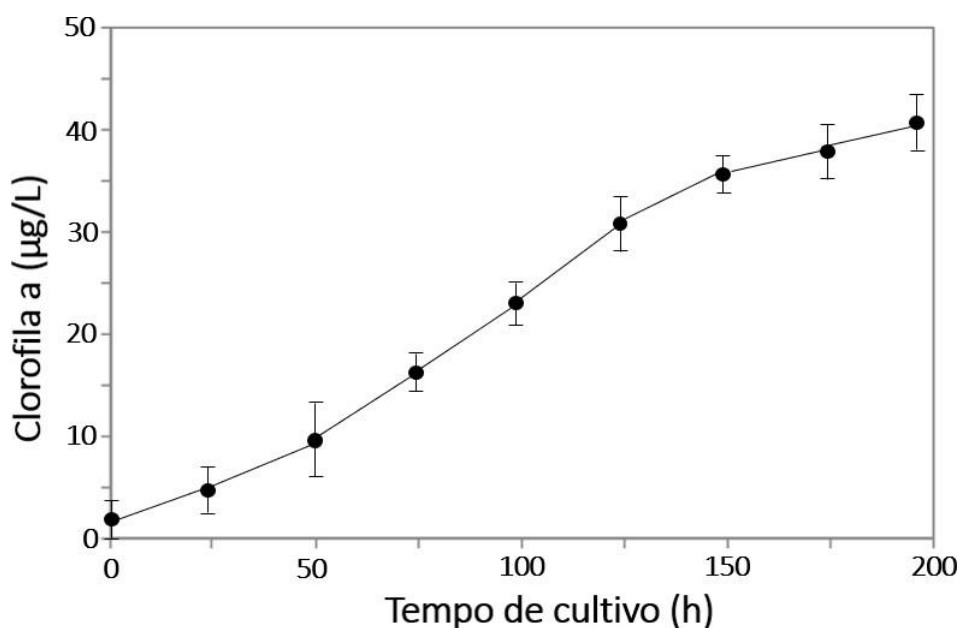
Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 Análise da clorofila *a*

Também foi observado o teor de clorofila *a* ao decorrer das horas de cultivo. A abordagem utilizada foi a de observação do aumento do teor de clorofila concomitantemente ao crescimento das células microalgais. O maior teor de clorofila presente foi obtido perto das 200 h de cultivo, quando no cultivo havia o maior número de células presentes. A partir do extrato da microalga macerada e filtrada, foi calculada a concentração em microgramas de clorofila por litro de meio de cultivo. A concentração do pigmento variou entre valores menores que $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ até valores próximos de $40 \mu\text{g.L}^{-1}$, como é possível verificar no Gráfico 3.

Um alto teor de clorofila aponta uma possível aplicação industrial, especialmente como corante natural, utilizado por exemplo pela indústria alimentícia (BERTOLDI, SANT'ANNA e OLIVEIRA, 2008). Também é sabido que a ingestão de clorofila estimula o crescimento de tecidos, auxiliando na multiplicação de fibroblastos, acelerando o processo de cicatrização (TANAKA *et al.*, 1997; YAMAGISHI *et al.*, 1997).

Gráfico 3 - Concentração de clorofila *a* avaliada durante as diferentes horas de cultivo da microalga *S. nidulans* em fotobiorreator



Fonte: Elaborado pela autora.

4.3 Caracterização da biomassa microalgal

A composição nutricional das microalgas normalmente é avaliada segundo a sua composição química, com valores os quais podem facilmente se alterar em decorrência de fatores de estresse na fase crescimento da biomassa microalgal, como por exemplo quando há uma deficiência de nutrientes, temperaturas extremas, anaerobiose ou outros fatores.

Na literatura, as informações disponíveis sobre a constituição nutricional de microalgas do gênero *Synechococcus* ainda são escassas, porém alguns dados já foram publicados para outras microalgas, como *Nannochloropsis oculata*, *Chlorella vulgaris*, *Chaetoceros muelleri* etc. (OHSE *et al.*, 2009).

A análise da biomassa de *S. nidulans* apresentou uma maior concentração de proteínas totais (34,64%), seguidas por lipídeos (27,40%) e carboidratos (18,72%) (Tabela 1). Os resultados obtidos para essa espécie, referente a presença de proteínas totais, foi similar ao de *Chlorella vulgaris* (33,15%), *Isochrysis sp.* (30,81%) e *Thalassiosira pseudonana* (30,02%), por exemplo (OHSE *et al.*, 2009).

Tabela 1- Teores de umidade, proteínas, lipídios, cinzas, carboidratos e fibras da biomassa microalgal de *S. nidulans* com base na biomassa seca

Constituinte	Teor na biomassa (%)
Umidade	5,51 \pm 0,33
Cinza	6,63 \pm 0,20
Fibra bruta	7,10 \pm 0,42
Lipídios	27,40 \pm 0,88
Proteína total*	34,64 \pm 0,96
Carboidratos**	18,72

* Nitrogênio total x 6,25

**Obtido por diferença

Fonte: Elaborada pela autora.

Já o teor de lipídeos verificado na *S. nidulans* foi maior do que o verificado em outros trabalhos, por exemplo no de Schenk *et al.* (2008) com a *Chlorococcum sp.*, que determinou 19% de conteúdo de lipídeos em biomassa seca da microalga. Já Renaud *et al.* (2002) analisaram a microalga *Chaetoceros sp.* e encontraram um teor de aproximadamente 16,8% de lipídios para esta espécie. Porém, para estes resultados citados, as metodologias dos estudos em questão não se assemelharam à do presente trabalho.

4.4 Determinação das proteínas solúveis do extrato bruto microalgal (EBM)

As proteínas são moléculas por onde a informação genética se expressa, através das possibilidades de combinação dos 20 aminoácidos que formam a cadeia polipeptídica, gerando diversas diferentes propriedades e atividades (LEHNINGER, 1970). As proteínas advindas de microalgas apresentam um bom balanço de aminoácidos e níveis baixos de ácidos nucleicos em comparação com outras fontes de proteína unicelular (ANDRADE, COLOZZI, 2014b).

Observou-se a concentração de 0,231 mg de proteína por mL de microalga utilizada e um teor de proteína total de 2,31 mg no extrato bruto microalgal (Tabela 2), a qual foi submetida a congelamento, descongelamento, maceração e ultrassonicação. Segundo Wang e Zhang (2012), combinar diferentes técnicas de rompimento celular pode favorecer a eficácia do processo de extração.

Tabela 2 - Determinação da concentração e da quantidade de proteínas solúveis totais presentes no extrato bruto microalga e na fração precipitada com sulfato de amônio obtidas da biomassa microalgal de *S. nidulans*

Amostra	Volume do extrato (mL)	Concentração de proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)
EBM ¹	500	0,231	2,31
FPRP ²	10	0,428	4,28

¹Extrato bruto microalgal

²Fração precipitada com sulfato de amônio utilizando-se o nível de saturação 60-80%.

Fonte: Elaborada pela autora.

Este EBM foi posteriormente precipitado com sulfato de amônio no nível de saturação 60-80%, e dele observou-se a concentração de proteínas de 0,428 mg de proteína por mL de microalga utilizada e um teor de proteína total de 4,28 mg (Tabela 2). A separação de proteínas neste caso ocorre devido ao aumento da força iônica do meio por conta da adição de um sal, neste caso o sulfato de amônio, o que leva as moléculas de água a interagirem com os íons disponíveis no meio. Por conseguinte, há o aumento das interações do tipo proteína-proteína, diminuindo a solubilidade do meio e precipitando então as proteínas.

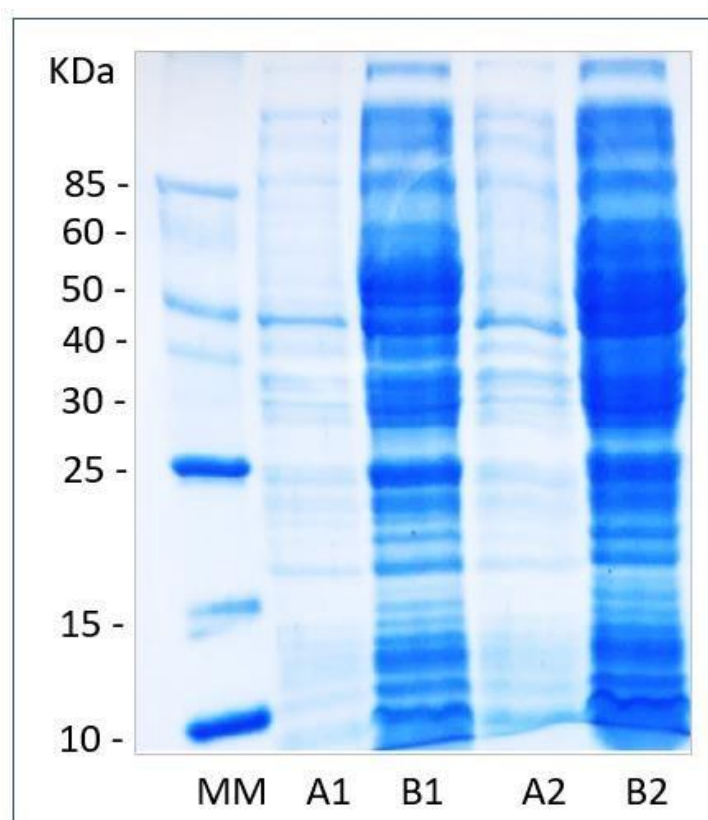
4.5 Ensaio eletroforético SDS-PAGE

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS 15%) a fim de melhor avaliar as composições proteicas do EBM e da FPRP 60-80%. A eletroforese ocorreu em condições desnaturantes para uniformizar as cargas das proteínas, pois estas influenciam diretamente na migração proteica através da poliacrilamida. Assim, a separação pôde ocorrer em função do peso molecular, na qual as proteínas menores têm uma maior mobilidade eletroforética quando comparada com as proteínas maiores.

O perfil eletroforético é uma ferramenta imprescindível durante a avaliação dos efeitos das variáveis envolvidas no cultivo e seu impacto na produção de proteínas, pois os fatores ambientais são capazes de modificar a composição celular das microalgas. Nele, observa-se a distribuição das bandas proteicas no gel.

Pôde-se observar tanto no EBM como no FRP 60-80% uma maior concentração de proteínas de 50 KDa (Figura 6). Além disso, há a presença de muitas bandas, o que sugere uma grande diversidade de proteínas.

Figura 6 – Perfil eletroforético das proteínas presentes na biomassa microalgal de *S. nidulans*. A PAGE-SDS (15%) foi realizada sob condições redutoras utilizando β - mercaptoetanol. MM: Marcadores moleculares; A1: 15 μ L de EBM; B1: 15 μ L de FPRP; A2: 20 μ L de EBM; B2: 20 μ L de FPRP



Fonte: Elaborada pela autora.

5 CONCLUSÕES

A microalga *S. nidulans* se desenvolveu de forma satisfatória em meio NPK, equiparada a meios mais complexos, conforme parâmetros cinéticos e produtividade de biomassa, o que pode promover uma redução de custos do cultivo, além da destinação ambientalmente adequada do meio residual, que pode ser reutilizado como fertilizante na nutrição vegetal.

Com base nos resultados obtidos, também podemos concluir que o cultivo de *S. nidulans* representa uma opção atrativa para a prospecção de polipeptídeos bioativos e/ou desenvolvimento de complementos nutricionais e alimentação animal em virtude, do alto teor de proteínas.

REFERÊNCIAS

- ABALDE, J. *et al.* **Microalgas**: cultivo e aplicaciones. España: Universidade da Coruña, 210p, 1995.
- ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. **Microalgas de águas continentais**: Potencialidades e desafios do cultivo. v. 1, Londrina: Eduel, 2014a.
- ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. **Microalgas de águas continentais**: Produção de biomassa e coprodutos. v. 2, Londrina: Eduel, 2014b.
- ARCEO, A.A. **Produção de biodiesel mediante o processo de hidroesterificação da biomassa das microalgas *Scenedesmus dimorphus* e *Nannochloropsis oculata***. 2012. Tese de doutorado, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 2012.
- BARROS, K.D.S. **Produção de biomassa de *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) para alimentação humana**. Dissertação (Ciência e Tecnologia de alimentos) - UFPB. João Pessoa, 2010.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. Is exploitation of microalgae economically and energetically sustainable? **Algal Research**, v. 31, p. 107–115, 2018.
- BECKER, E.W. Microalgae in human and animal nutrition. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. London: **Blackwell Science**. p.312-320, 2004.
- BENCHRAKA, C.; **The Role of Algae in Heavy Metals Removal from Mining Wastewaters**. 2014, Thesis (Environmental Engineering), Finlandia, Tampere University of Applied Sciences, 2014.
- BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J.L.B. Teor de clorofila e perfil de sais minerais de *Chlorella vulgaris* cultivada em solução hidropônica residual. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 1, p. 54-58, Feb. 2008.
- BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. **Progress in Industrial Microbiology**, vol. 35, p. 313-321, 1999.
- BOROWITZKA, M.A. Algal biotechnology products and processes: matching science and economics. **J. Appl. Phycol.** 4, p. 267-279, 1992.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248, 1976.

BRASIL, B. DOS S. A. F.; COSTA, L. **Agroenergia em revista: microalgas**. Embrapa Agroenergia-Outras publicações técnicas (INFOTECA-E), v. 10, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos Analíticos Oficiais Físico-químicos para Controle de Pescados e seus derivados. Brasília, DF, 2011

CLESCERI, L.S., GREENBERG, A.E.A.D. Eaton (ed.) *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20th ed. **American Public Health Association, American Water Work Association, and Water Environment Federation**, Washington, DC. 1998

CHELLAMBOLI, C. & PERUMALSAMY, M. Application of response surface methodology for optimization of growth and lipids in *Scenedesmus abundans* using batch culture system. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 4, p. 22129-22140, 2014.

CHISTI, Y. Microalgae: our marine forests. Book reviews. RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 566p, 2004.

DERNER, R. B. *et al.* Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1959–1967, 2006.

FRANCESCHINI, I.M., BURLIGA, A.L., REVIERS, B., PRADO, J.F.; RÉZIG, S.H. **Algas: Uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Artmed. 332p, 2010.

GARCÍA, M. DEL C. C. Producción de microalgas con aplicaciones nutricionales para humanos y animales. **CUADERNOS DE ESTUDIOS AGROALIMENTARIOS** | ISSN, p. 2173–7568, 2013.

GILL, I.; VALIVETY, R. Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. **Trends in Biotechnology**, n.15, p.401-409, 1997.

GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. **Algae**. New Jersey: Prentice-Hall, 2000.

GREENWELL, H.C.; LAURENS, L.M.L.; SHIELDS, R.J.; LOVITT, R.W.; FLYNN, K.J. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 7, p. 703–26, 2010.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: **Culture of marine invertebrate animal**. New York: Plenum Publishing, p. 29-60, 1975.

HAKALIN, N. L. S. **Otimização das Condições de Cultivo da Microalga *Scenedesmus* sp. Para Produção de Biodiesel**. Tese (Instituto de Ciências Biológicas). Universidade de Brasília. Brasília: 2014.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680- 685, 1970.

LEE, R. E. **Phycology**. 4^{ed}. Cambridge University Press Cambridge, p.23, 2008

LIMA, R. M. M. *et al.* **Ação antimicrobiana e antioxidante das frações proteicas da microalga *Scenedesmus obliquus***. 2016. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - UFC. Ceará. 2016.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**, 1970. 6^a Edição, Ed. Artmed, 2014.

LITER. **Liter**. Disponível em: <<https://liter.com.br/o-ph-da-agua-de-chuva/carb6nat6/>>. Acesso em: 15 de jun. de 2020.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de Microalgas marinhas: princípios e aplicações. São Carlos: **Rima**, 2006.

MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K. V. **Cinco Reinos: Um Guia Ilustrado dos Filos da Vida na Terra**. Terceira Edição. Editora Guanabara Koogan, 2001.

MARTÍN, M.; GROSSMANN, I. E. On the synthesis of sustainable biorefineries. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 9, p.3044 – 3064, 2012.

MATHIMANI, T., BALDINELLI, A., RAJENDRAN, K., PRABAKAR, D., MATHESWARAN, M., PIETER VAN LEEUWEN, R., PUGAZHENDHI, A. Review on cultivation and thermochemical conversion of microalgae to fuels and chemicals: process evaluation and knowledge gaps. **J. Clean. Prod.** 208, p. 1053-1064, 2019.

MILANO, J.; ONG, H.C.; MASJUKI, H.H.; CHONG, W.T.; LAM, M.K.; LOH, P.K.; VELLAYAN, V. Microalgae biofuels, as an alternative to fossil fuel for power generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 58, p. 180-197, 2016.

NAGAKURA, K. General analysis. In: OKADA, M; HIRAO, S.; NOGUCHI, E.; SUZUKI, T.; YOKOSUKI, M. (Eds.), Utilization of marine products, Tokyo, Japan. **Overseas Technical Cooperation Agency**, p. 159 —169, 1972.

NÄGELI, C., **Gattungen Einzelliger Algen**, Physiologisch und Systematisch Bearbeitet. Zürich, F. Schulthess, p. 56, 1849.

NARENDAR, P.; JAYACHANDRAN, K.; GANTAR, M. Screening of Florida Native Green Microalgae as a Potential Source of Biodiesel. **Journal of Environmental and Social Sciences**, vol. 2, ed. 1, 2015.

NISHIOKA, M. NAKAI, K.; MIYAKE, M.; ASADA, Y.; TAYA, M. Production of poly- β -hydroxybutyrate by thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus sp.* MA19, under phosphate-limited conditions. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1095-1099, 2001.

OHSE, S. *et al.* Produção de biomassa e teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e proteína em microalgas. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 6, p. 1760-1767, Sept. 2009.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal bio- thecnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, vol. 20, p. 359-466, 2003.

PEARSON, D. **Chemical Analysis of Foods**. 7th Edition, Churchill Livingstone, London, 1976.

PÉREZ, HOMERO E. B. **Biodiesel de Microalgas**, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, 1-19, 2007.

PÔJO, V. I. N. C. **Seleção de Microalgas com Potencial de Produção de Biocombustíveis**. 2016. 89 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia). Escola de Engenharia. Universidade do Minho, 2016.

POKOO-AIKINS, G.; NADIM, A.; EL-HALWAGI, M. M.; MAHALEC, V. Design and analysis of biodiesel production from algae grown through carbon sequestration. **Clean, Technol. Environ. Policy**, 12 (3), 239–254, 2010.

RATHA, S. K.; PRASANNA, R. Bioprospecting microalgae as potential sources of “green energy”: challenges and perspectives. **Applied biochemistry and microbiology**, v. 48, n. 2, p. 109 – 125, 2012.

RAWAT, R.; RANJITH KUMAR, T.; MUTANDA, F. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. **Applied Energy**, v. 103, p. 444–467, 2013.

RENAUD, S. M.; THINH, L. V.; LAMBRINIDIS, G.; PARRY, D. L. **Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures**. *Aquaculture*, v. 211, p. 195-214, 2002.

SANT’ANNA, C. L.; *et al.*, **Atlas de cianobactérias e microalgas de águas continentais brasileiras**, 2012. Disponível em:

<https://www.infraestruturameioambiente.sp.gov.br/institutodebotanica/wpcontent/uploads/sites/235/2013/09/virtuais_3atlas.pdf>. Acesso em: 11 de jun. de 2020.

SCHENK, P.M.; THOMAS-HALL, S. R.; STEPHENS, E.; MARX, U.C.; MUSSGNUG, J. H.; POSTEN, C.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. **Bioenergy Res** 1:20–43, 2008.

SLEGERS, P. M. **Scenario studies for algae production**. Dissertation - Wageningen University. 2014.

SOILTECH. **Microp**. Disponível em: <<https://www.soiltechcorp.com/product/microp>>. Acesso em: 14 de jun. de 2020.

SOLOVCHENKO, A. *et al.* Phosphorus from wastewater to crops: an alternative path involving microalgae. **Biotechnology Advances**, [S.l.], v. 34, p. 550 – 564, 2016.

TANAKA, K. *et al.* Oral administration of a unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*, prevents stress-induced ulcer. **Planta Medica**, v.63, n.5, p.465-466, 1997.

TOMASELLI, L. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**, v. 1, p. 3 – 19, 2004.

WANG, X.; ZHANG, X. Optimal extraction and hidrolisis of *Chlorella pyrenoidosa* proteins. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 307 –313, 2012.

WINTON, A.L.; WINTON, K.B. **Analisis de alimentos**. 2. ed. Barcelona: Hasa, 1958.

WOJCIECHOWSKI, J. *et al.* Isolamento e cultivo de microalgas. **Isolamento e Cultivo De Microalgas**, n. January, p. 85, 2013.

YAMAGISHI, Y. *et al.* Therapy for gastric ulcer with *Chlorella*. **Japanese Medical Journal**, v.32, p.25-27, 1997.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une Cyanophycée: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de spirulina máxima**. 1966. Thesis (Ph.D) - Université Des Paris, Paris, 1966.