



## ESTUDO EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE NO CULTIVO DE MICROALGA VISANDO O AUMENTO NO TEOR DE LIPÍDEOS

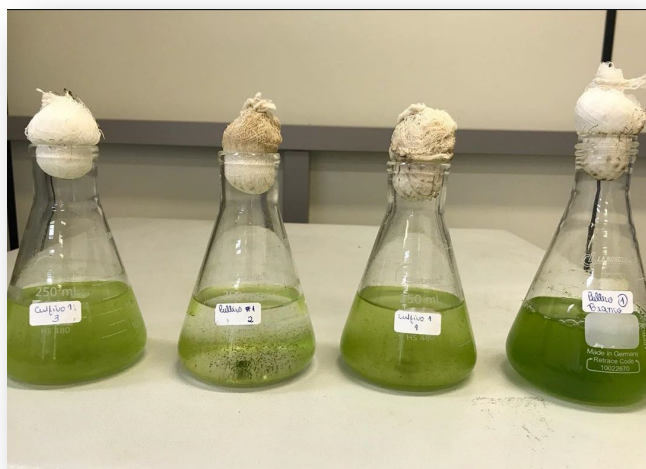
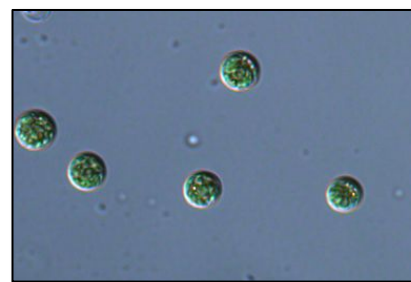
**Kayza Maria Campos Américo, Larissa Sthefany Da Silva, Leonardo Corrêa de Freitas, Luana Rodrigues Alves**

**Supervisor:** Prof. Dr. Leonardo Vasconcelos Fregolente

**Monitoras:** Dr<sup>a</sup> Luisa Fernanda Ríos Pinto e Gabriela Filipini Ferreira

### INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

**As microalgas:** São seres microscópicos, unicelulares, fotossintetizantes, aquáticos, heterogêneos, procariontes (cianobactérias) ou eucariontes, com imensa biodiversidade e versatilidade metabólica. Capazes de produzir quantidades significativas de biomassa, pigmentos e lipídios. Portanto, são muito valorizadas no mercado industrial e científico.



Neste projeto, utilizou-se a espécie de microalga *Chlorella* sp., cultivada em meio aquoso denominado “BG11 com estresse”, e a cada cultivo realizado, foram expostas diferentes condições, mudando as variáveis como nível de: fósforo, nitrogênio e pH dos cultivos, assim avaliou-se como a concentração desses nutrientes afetam a produção de biomassa e o acúmulo de lipídios, o esperado é que o aumento no acúmulo de lipídios, reduza a produção de biomassa.





## METODOLOGIA

No esquema a seguir é apresentado o passo-a-passo do processo realizado com as microalgas, com objetivo final sendo a análise do nível de estresse apropriado para maior produção de lipídios.

Inoculação do Cultivo	Análise de Crescimento	Rompimento Celular	Secagem da Biomassa	Extração de Lipídios.
Cepa é adicionada ao meio de cultivo e em seguida é mantida em um shaker a 20°C por 15 dias.	São retiradas amostras para análise no microscópio e espectrofotômetro UV.	O cultivo é levado para a centrífuga e logo em seguida para a autoclave a 121°C por 5 minutos.	Mantido em estufa (40 °C) por 96 horas.	É usado o método Bligh&Dyer onde são adicionados solventes, seguido da agitação (vórtex), separação e secagem.

No cultivo realizado com a microalga *Chlorella* sp., foi estudado o nível de estresse da célula, diante da falta ou do aumento de certos nutrientes como N (Nitrogênio), P (Fósforo) e variação do pH. Para isso, foi realizado o planejamento de experimentos em triplicata, conforme tabela ao lado.

**Tabela** Planejamento de experimentos

Experimento	pH	[N] (g/L)	[N] (% BG-11)	[P] (g/L)	[P] (% BG-11)
1	7	0,000	0%	0,000	0%
2	7	0,000	0%	0,002	50%
3	7	0,124	50%	0,000	0%
4	7	0,124	50%	0,002	50%
5	9	0,000	0%	0,000	0%
6	9	0,000	0%	0,002	50%
7	9	0,124	50%	0,000	0%
8	9	0,124	50%	0,002	50%





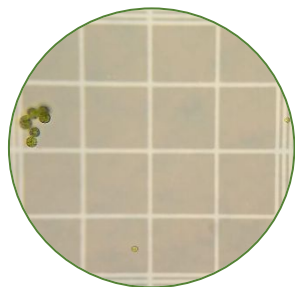
## RESULTADOS – PARTE I

**Tabela** Principais pontos do planejamento de experimentos

Experimento	pH	[N] (g/L) (BG-11)	[P] (g/L) (BG-11)
2	7	0,000 (0%)	0,002 (50%)
3	7	0,124 (50%)	0,000 (0%)
5	9	0,000 (0%)	0,000 (0%)
7	9	0,124 (50%)	0,000 (0%)

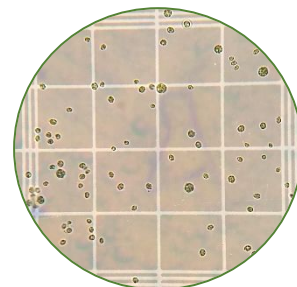
A partir de imagens retiradas, periodicamente, da contagem de células em microscópio observou-se melhores resultados quanto a quantidade de células nos cultivos 2 e 3, porém sem grandes mudanças em seu tamanho. Observe a figura Cultivo 2 e as condições do segundo cultivo na tabela Planejamento de experimentos.

Legenda: [N] = concentração de nitrogênio e [P] = concentração de fósforo.



**Figura** Cultivo 5

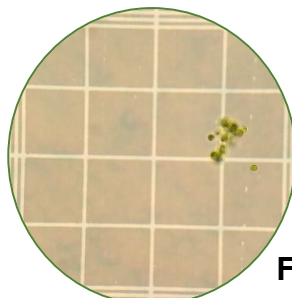
Comparação das condições com imagens das células no microscópio (cultivos de melhores resultados)



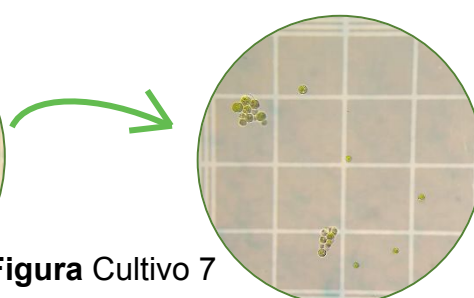
**Figura** Cultivo 2

Nos cultivos 5 e 7 é notável um crescimento no tamanho das células e uma redução no número das mesmas, essa condição ocorre pela manipulação dos nutrientes – nitrogênio, fósforo e variação do pH – o que gera o acúmulo lipídico e faz com que as células engordem. Observe a figura Cultivo 5 e as condições do quinto cultivo na tabela Planejamento de experimentos.

O crescimento no tamanho celular se dá desde o início do cultivo, onde se comparado ao cultivo branco, o tamanho inicial do cultivo com estresse é um pouco maior e aumenta gradativamente até se manter estável no fim do cultivo.



Primeiro dia



**Figura** Cultivo 7

Último dia



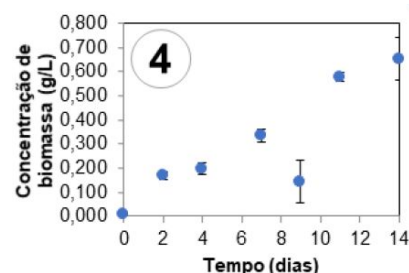


## RESULTADOS – PARTE II

Construção das curvas de crescimento e comparação dos resultados

**Tabela** Concentração final de biomassa e de células e porcentagem de lipídeos na biomassa seca.

#	Concentração de biomassa final (g/L)	Densidade celular final (g/L)	Porcentagem de lipídeos (%m)	Porcentagem de lipídeos do controle (%m)
1	0,11 ± 0,06	3,38.10 <sup>6</sup> ± 2,20.10 <sup>6</sup>	<b>48,06 ± 13,75</b>	12,74
2	0,35 ± 0,06	2,30.10 <sup>7</sup> ± 3,72.10 <sup>6</sup>	14,10 ± 1,62	12,88
3	0,26 ± 0,01	3,76.10 <sup>7</sup> ± 0,65.10 <sup>7</sup>	13,03 ± 1,68	11,42
4	<b>0,65 ± 0,08</b>	<b>4,34.10<sup>7</sup> ± 0,73.10<sup>7</sup></b>	10,33 ± 4,48	10,77
5	0,18 ± 0,00	6,80.10 <sup>6</sup> ± 1,05.10 <sup>6</sup>	19,89 ± 0,00*	10,46
6	0,43 ± 0,02	3,10.10 <sup>7</sup> ± 2,54.10 <sup>7</sup>	15,12 ± 1,24	11,02
7	0,17 ± 0,02	5,56.10 <sup>6</sup> ± 3,35.10 <sup>6</sup>	23,74 ± 11,00	11,02
8	0,19 ± 0,04	6,98.10 <sup>6</sup> ± 2,31.10 <sup>6</sup>	10,65 ± 3,10	12,55



**Figura** Concentração x tempo (exemplo: ponto 4)

## CONCLUSÕES – PARTES I e II

★ Máxima concentração de biomassa e densidade celular: condições de pH 7, nitrogênio a 0,124 g/L e fósforo a 0,002 g/L;

★ Máxima porcentagem de lipídios: condições de pH 7 e ausência de nutrientes;

Conclui-se que o **estresse submetido à biomassa aumentou o acúmulo de lipídeos**, o que foi observado também no microscópio.

Todos os **objetivos** iniciais do projeto, discutidos no planejamento, foram **alcançados** apesar da pandemia da COVID-19, devido a excelente planejamento, frequência e desempenho da equipe.





## ESCALONAMENTO DO CULTIVO EM RACEWAY (ESTUDO TEÓRICO)

Para assegurar-se de uma produção bem sucedida de algas, as mesmas devem estar sempre em constante movimento para evitar aglomerações de algas e o efeito conhecido como sombreamento, no qual as algas de cima bloqueiam a passagem de luz para as algas em baixo, impedindo-as de realizar fotossíntese, bem como o ambiente na qual elas residem não deve apresentar cantos vivos para evitar a aglomeração de algas e logo o impedimento das mesmas de se movimentar, o que as leva a apodrecer; sendo o design apropriado um meio cilindro, de altura e profundidades adequadas para permitir a entrada máxima de luz ao ambiente interno, com uma barreira de baixa espessura ao meio seguindo o comprimento da construção, com as extremidades livres, efetivamente criando um caminho para a água se movimentar em um ciclo fechado, tendo uma semelhança á uma pista de corrida de carros, logo o nome de Raceway Pond.