

ANÁLISE DAS CONDIÇÕES DE ESTRESSE DA MICROALGA *CHLORELLA* SP.

Palavras-Chave: Planejamento de experimento, Lipídeos, Cultivo fechado.

Autores:

Andrey Dionisio dos Santos; Letícia Aguiar Gomes Nascimento; Bianca Ramos Estevam; Gabriela Filipini Ferreira; Luisa Fernanda Ríos Pinto

Prof. Dr. Leonardo Vasconcelos Fregolente (orientador)

Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas (FEQ/UNICAMP)

INTRODUÇÃO:

A microalga *Chlorella* sp. é de grande importância nas áreas comerciais e ecológicas, uma vez que é possível obter uma variedade de produtos com esta biomassa de elevada eficiência fotossintética (DERNER et al., 2006). Nesta pesquisa foram analisadas as condições que podem maximizar o crescimento de células e a porcentagem de lipídeos na *Chlorella* sp. Para isso, foi estudado o pH e as concentrações dos nutrientes nitrogênio e fósforo. Estes fatores foram selecionados visto que o pH tem forte influência na solubilidade dos nutrientes e do CO₂ no meio de cultivo (ARREDONDO-VEGA; VOLTOLINA, 2007); e as concentrações de nitrogênio e fósforo impactam diretamente o metabolismo da microalga, podendo direcioná-lo ao crescimento ou ao acúmulo de lipídeos (PENTEADO, 2010). A fim de trazer maior confiança aos resultados, foi realizado planejamento fatorial completo de dois níveis com três fatores (2³), trabalhando com 95 % de confiança. Assim, pode-se elucidar as condições que favorecem o crescimento e o acúmulo de lipídeos na espécie.

METODOLOGIA:

Os inóculos da microalga utilizada, *Chlorella* sp. (CCMA-UFSCar 085) foram cultivados em meio sintético BG-11 e pH 7,5 em frascos Erlenmeyer de 250 mL. Para o estudo de estresse fez-se variações no pH e na concentração de nitrogênio e de fósforo no meio em relação ao meio BG-11 original, conforme planejamento de experimentos detalhado na Tabela 1. Estes experimentos foram realizados em triplicata durante a vigência do PIBIC-EM 2019-2020 e na vigência atual foram analisados utilizando o software *Statistica* com 95 % de confiança e adotando erro puro. As respostas analisadas foram: concentração de biomassa, densidade de células e porcentagem de lipídeos.

Tabela 1: Planejamento fatorial completo 2³ para estresse da microalga.

Fator	Nível Inferior (-1)	Nível Superior (+1)
pH	7	9
Nitrogênio (%)	0	50
Fósforo (%)	0	50

Para acompanhar o crescimento da microalga, foi verificada a densidade de células e a concentração de biomassa. Para a densidade, foi feita a contagem de células por volume - utilizando câmara de Neubauer - por observação em microscópio óptico com aumento de 40 vezes. Já a

concentração de biomassa foi realizada por leitura da absorbância por espectrofotometria no ultravioleta visível (UV-VIS), usando uma curva de calibração previamente estabelecida. A extração de lipídeos foi realizada de acordo com o método Bligh e Dyer (1959) adaptado. Neste, foi utilizado água, metanol e clorofórmio, na proporção 3,6/4,0/2,0 mL, a fim de extrair os lipídios polares e apolares da microalga. A massa de lipídeo foi verificada gravimetricamente e então calculada a sua porcentagem na biomassa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Na Tabela 2, são apresentados os resultados obtidos em cada uma das condições de estresse aplicadas no cultivo da microalga. Os melhores resultados foram destacados em negrito. Estes resultados foram analisados de modo a identificar quais fatores foram significativos em cada uma das respostas (Tabela 3). Tanto para a concentração de biomassa quanto a densidade de células, os três fatores foram significativos (p-valor menor que 0,05), sendo o nitrogênio e o fósforo com efeito positivo e o pH com efeito negativo. Para a concentração de biomassa, as interações com o pH também foram significativas e tiveram efeito negativo. Para a densidade de células, as interações entre pH e nitrogênio e entre os dois nutrientes (nitrogênio e fósforo) foram significativas e de efeito negativo. Para a porcentagem de lipídeos, apenas as concentrações de nutrientes foram significativas, ambas com efeito negativo. Nota-se ainda que as interações do nitrogênio com o fósforo e com o pH foram significativas e de efeito positivo.

Tabela 2: Resultados do planejamento fatorial completo 2² para estresse da microalga.

Níveis dos Fatores			Respostas		
<i>pH</i>	<i>Nitrogênio</i>	<i>Fósforo</i>	<i>Concentração de Biomassa (g/L)</i>	<i>Densidade Celular (Células/mL)</i>	<i>Porcentagem de Lipídeos (%)</i>
-1	-1	-1	0,12 ± 0,06	3,38 10 ⁶ ± 2,20 10 ⁶	48,06 ± 13,75
-1	-1	1	0,35 ± 0,02	23,1 10 ⁶ ± 3,72 10 ⁶	14,10 ± 1,62
-1	1	-1	0,27 ± 0,02	37,7 10 ⁶ ± 6,53 10 ⁶	13,03 ± 1,19
-1	1	1	0,65 ± 0,09	43,5 10⁶ ± 7,31 10⁶	10,33 ± 4,48
1	-1	-1	0,18 ± 0,01	6,80 10 ⁶ ± 1,06 10 ⁶	19,89 ± 1,00
1	-1	1	0,44 ± 0,02	31,00 10 ⁶ ± 1,76 10 ⁶	15,12 ± 1,24
1	1	-1	0,18 ± 0,03	5,57 10 ⁶ ± 3,36 10 ⁶	23,74 ± 11,00
1	1	1	0,19 ± 0,04	6,98 10 ⁶ ± 2,31 10 ⁶	12,02 ± 1,17

A Tabela 4 apresenta a ANOVA do planejamento de experimentos 2³ para estresse da microalga. Pode-se observar que para todas as respostas do teste F, o F_{calculado} foi maior que o F_{tabelado}, confirmando que o modelo linear pode ser aplicado. Assim, em função dos fatores analisados neste estudo, pode-se utilizar a Equação 1 para prever a concentração de biomassa, a Equação 2 para verificar a variação da densidade de células e a Equação 3 para a analisar a porcentagem de lipídeos.

$$CB = 0.30 - 0.05 \cdot pH + 0,02 \cdot N + 0,11 \cdot P - 0,09 \cdot pH \cdot N - 0,04 \cdot pH \cdot P + 0,01 \cdot N \cdot P \quad (\text{Equação 1})$$

$$DC = 197,4 \cdot 10^5 - 71,54 \cdot 10^5 \cdot pH + 36,79 \cdot 10^5 \cdot N + 63,87 \cdot 10^5 \cdot P - 99,91 \cdot 10^5 \cdot pH \cdot N + 0,16 \cdot 10^5 \cdot pH \cdot P - 45,83 \cdot 10^5 \cdot N \cdot P \quad (\text{Equação 2})$$

$$L (\%) = 19,95 - 2,25 \cdot pH - 4,33 \cdot N - 6,22 \cdot P + 4,52 \cdot pH \cdot N + 2,10 \cdot pH \cdot P + 3,45 \cdot N \cdot P \quad (\text{Equação 3})$$

Em que: CB é a concentração de biomassa, DC é a densidade de células, L são os lipídeos, pH é o potencial hidrogeniônico, N é a concentração de nitrogênio e P a concentração de fósforo, sendo o pH, N e P utilizados em variáveis codificadas.

Tabela 3: Efeito dos fatores nas respostas

Resposta	Fator	Efeito	Desvio padrão	p-valor	Coefficiente
Concentração de biomassa	pH	-0,10	0,02	0,00003	-0,05
	nitrogênio (N)	0,05	0,02	0,01230	0,02
	fósforo (P)	0,22	0,02	0,00001	0,11
	Interação pH e N	-0,18	0,02	0,000001	-0,09
	Interação pH e P	-0,09	0,02	0,000173	-0,04
	Interação N e P	-0,02	0,02	0,224865	-0,01
Densidade de células	pH	-14,30 10 ⁶	3,0 10 ⁶	0,00023	-7,15 10 ⁶
	nitrogênio (%)	7,36 10 ⁶	3,0 10 ⁶	0,02772	3,67 10 ⁶
	fósforo (%)	12,70 10 ⁶	3,0 10 ⁶	0,00067	6,38 10 ⁶
	Interação pH e N	-19,98 10 ⁶	3,0 10 ⁶	0,000006	-9,99 10 ⁶
	Interação pH e P	0,03 10 ⁶	3,0 10 ⁶	0,991385	0,02 10 ⁶
	Interação N e P	-9,17 10 ⁶	3,0 10 ⁶	0,008199	-4,56 10 ⁶
Lipídeos	pH	-4,52	2,59	0,10029	-2,26
	nitrogênio (%)	-8,68	2,59	0,00406	-4,34
	fósforo (%)	-12,45	2,59	0,00019	-6,23
	Interação pH e N	9,05	2,59	0,003002	4,53
	Interação pH e P	4,20	2,59	0,124065	2,10
	Interação N e P	6,91	2,59	0,016885	3,45

Com os resultados obtidos (Tabela 2) e o gráfico de médias marginais (Figura 1) pode-se observar que o pH em condição neutra (nível -1) foi benéfico tanto para o crescimento como o acúmulo de lipídeos. Este parâmetro influencia na solubilidade dos minerais no meio, interferindo nas rotas metabólicas das microalgas (ARREDONDO-VEGA; VOLTOLINA, 2007). Para o crescimento, mensurado pela concentração de biomassa e pela densidade de células, nota-se que o melhor resultado é obtido utilizando os nutrientes no nível +1, concordando com a literatura que prevê que maior disponibilidade de nutrientes beneficia o crescimento e divisão celular (LOURENÇO, 2006). Vale ressaltar que no caso da densidade de células, os pontos em que o nutriente fósforo se encontra no +1 e -1 se sobrepõem dentro da faixa de desvio padrão, de modo que não é possível afirmar qual condição tem melhor resultado. Entretanto, considerando que este fator apresentou efeito positivo, tem-se uma

tendência ao melhor crescimento e divisão celular (aumentando a densidade de células) ao aplicar maiores concentrações de fósforo. Vale ressaltar que alguns estudos mostram que as microalgas podem continuar a crescer mesmo em níveis reduzidos de fósforo (LOURENÇO, 2006). Para a porcentagem de lipídeos, a maior resposta foi obtida ao manter o pH neutro e reduzir ambos os nutrientes. A redução do fósforo pode ocasionar uma queda na fotossíntese, fazendo com que o excesso de carbono seja convertido em ácidos graxos em detrimento da síntese de carboidratos (ARORA et al., 2016). Além disso, a redução de nitrogênio pode diminuir a biossíntese de proteínas, redistribuindo o uso de energia na célula para síntese de lipídeos (MANDOTRA et al., 2016). Assim, o metabolismo em condições limitadas de nutrientes é direcionado para maximizar a produção de lipídios e otimizar o uso de energia dentro da célula (HUSSAIN et al., 2020).

Tabela 4: ANOVA do planejamento fatorial completo 2^3 para estudo das condições de estresse da *Chlorella* sp.

Resposta	Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	R ²	Ajuste	
						F _{calculado}	F _{tabelado}
Concentração de biomassa	Regressão	0,664	7	0,094	0,9568	94,00	2,66
	Resíduo	0,030	16	0,001			
	Total	0,694	23	-			
Densidade de Células	Regressão	5,462E+15	7	0,780E+15	0,8603	14,18	2,66
	Resíduo	0,887E+15	16	0,055E+15			
	Total	6,349E+15	23	-			
Porcentagem de lipídeos	Regressão	3036,742	7	433,820	0,8250	10,77	2,66
	Resíduo	644,450	16	40,278			
	Total	3681,192	23	-			

Nota: SQ: Soma Quadrática, GL: Grau de Liberdade, MQ: Média Quadrática, $F_{cal} = MQ_{Regressão} / MQ_{Resíduo}$ e F_{tab} : valor tabelado correspondente a distribuição de Fisher-Snedecor.

Figura 1: Gráficos de médias marginais do estudo das condições de estresse adotando como resposta (A) concentração de biomassa, (B) densidade de células e (C) porcentagem de lipídeos.

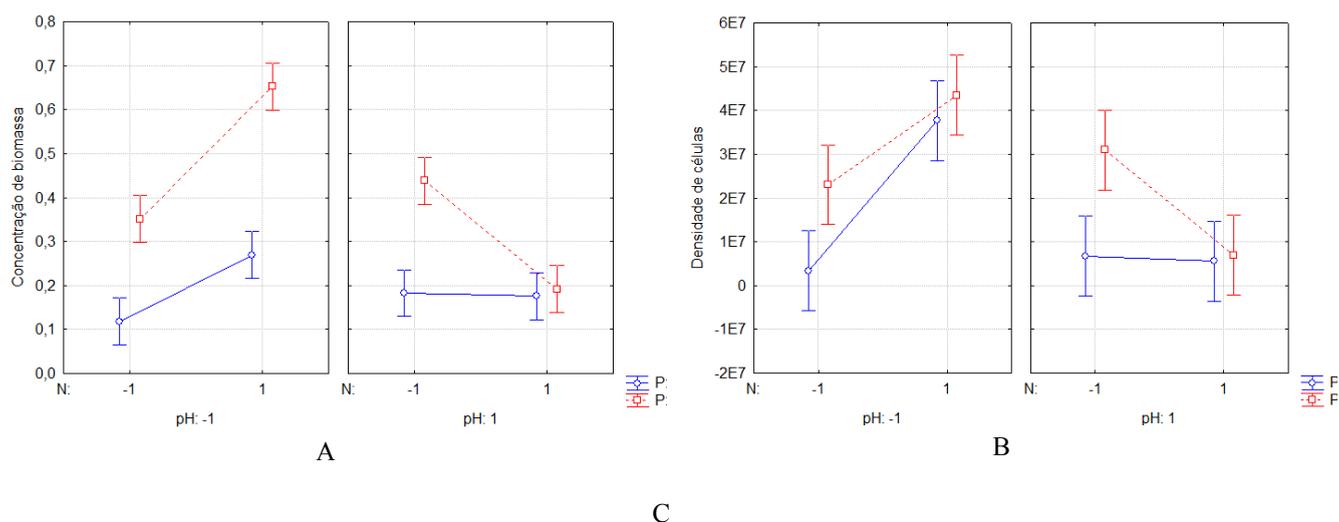
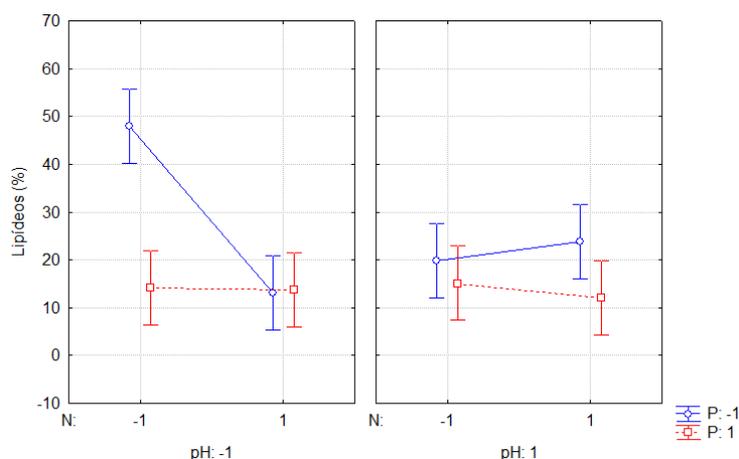


Figura 1 (continuação): Gráficos de médias marginais do estudo das condições de estresse adotando como resposta (A) concentração de biomassa, (B), densidade de células e (C) porcentagem de lipídeos.



CONCLUSÕES:

A análise das condições de estresse realizada nesta pesquisa mostrou-se válida pelo teste F e, portanto, a equação ajustada pode ser utilizada para prever a variação das respostas (concentração de biomassa, densidade de células e porcentagem de lipídeos) em função dos fatores (pH e concentração de nitrogênio e de fósforo). Neste estudo, foi observado que a maior concentração dos nutrientes e o pH neutro promoveram melhor crescimento da espécie, atingindo densidade de célula de $43,5 \cdot 10^6 \pm 7,31 \cdot 10^6$ células/mL e concentração de biomassa de $0,65 \pm 0,09$ g/L. A redução dos nutrientes aumentou o acúmulo de lipídeos, que também foi beneficiado com pH neutro. Obteve-se em média 48,06 % de lipídeos na biomassa nesta condição. Dessa forma, foi possível estabelecer as condições cujo metabolismo se reajusta para maximizar a produção de lipídios e otimizar o uso de energia dentro da célula. Assim, indica-se que o cultivo seja realizado em duas etapas, a primeira com nutrientes disponíveis para promover o crescimento, e a segunda reduzindo estes nutrientes para favorecer o acúmulo de lipídeos.

BIBLIOGRAFIA

- ARREDONDO-VEGA, B. O.; VOLTOLINA, D. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones del Noroeste – CIBNOR (México). La Paz 97 p. 2007.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, n. 8, p. 911–917, 1959. DOI: 10.1139/o59-099.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.
- PENTEADO, D. M. R... Estudos de otimização do meio de cultura para a microalga *Phaeodactylum tricorutum* para a produção de lipídios. 114 p. **Dissertação** (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- HUSSAIN, Javid; WANG, Xiaoqing; SOUSA, Leandro; ALI, Roshan; RITTMANN, Bruce E.; LIAO, Wei. Using non-metric multi-dimensional scaling analysis and multi-objective optimization to evaluate green algae for production of proteins, carbohydrates, lipids, and simultaneously fix carbon dioxide. *Biomass and Bioenergy*, v. 141, p. 105711, 2020. DOI: 10.1016/j.biombioe.2020.105711.
- MANDOTRA, S. K.; KUMAR, Pankaj; SUSEELA, M. R.; NAYAKA, S.; RAMTEKE, P. W. Evaluation of fatty acid profile and biodiesel properties of microalga *Scenedesmus abundans* under the influence of phosphorus, pH and light intensities. *Bioresource Technology*, v. 201, p. 222–229, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.11.042.