

# ESTUDO DO COMPORTAMENTO DOS MICRO E MACRONUTRIENTES EM MEIO DE CULTIVO DA MICROALGA *Scenedesmus sp.* PARA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS

W. S. BORGES<sup>1</sup>, B. S. A. ARAÚJO<sup>1</sup>, L. G. MOURA<sup>1</sup>, M.M. RESENDE<sup>1</sup> e V. L. CARDOSO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química  
E-mail para contato: wesley.itb@gmail.com

**RESUMO** – As microalgas apresentam metabolismos distintos. As características metabólicas das microalgas fazem delas uma importante fonte de recursos a serem exploradas. Para o cultivo de microalgas há diversas formulações que contemplam as suas necessidades nutricionais, necessitando de macronutrientes, micronutrientes e vitaminas. A concentração de cada nutriente é exigida em quantidades variadas, dependendo da exigência dos processos metabólitos. O zinco participa da estrutura de enzimas como co-fator. Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de lipídeos das células da microalga *Scenedesmus sp.* em meio Guillard quando há a alteração de seus micro e macronutrientes, otimizando as melhores condições de cultivo. Os resultados mostram que a melhor concentração dos micronutrientes é quando se trabalha com 0,06 g/L de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  e 0,5 g/L  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ , chegando a um teor de lipídeos 47,5% e concentração de biomassa 0,0966g/L. Já a alteração da concentração dos macronutrientes não é viável.

## 1. INTRODUÇÃO

Para o cultivo de microalgas há diversas formulações que contemplam as suas necessidades nutricionais, necessitando basicamente de macronutrientes, micronutrientes e vitaminas. Os macronutrientes apresentam a função de constituir as estruturas do meio intracelular, participando do processo de troca de energia e regulando atividades metabólicas, enquanto os micronutrientes participam da estrutura e atividade enzimática. Já as vitaminas, como a tiamina e biotina agem, respectivamente, como coenzima e transportadora de dióxido de carbono (Lourenço, 2006). A concentração de cada nutriente – elemento – é exigida em quantidades variadas, dependendo da exigência dos processos metabólitos das algas. Segundo Lourenço (2006), os nutrientes se dividem em macronutrientes e micronutrientes.

O zinco apresenta papéis metabólicos semelhante aos apresentados para o manganês, que atua na síntese de ácidos graxos. O zinco participa da estrutura de enzimas como co-fator e também é um componente estrutural da enzima anidrase carbônica, que é uma enzima crítica ao transporte e fixação de  $CO_2$ . Geralmente o zinco é adicionado na forma de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , que é uma de suas formas solúveis. O manganês atua como co-fator de enzimas que participam da síntese de ácidos graxos e também do Ciclo de Krebs. Tem importância fundamental no transporte de elétrons do fotossistema, atua na manutenção da estrutura das membranas dos

cloroplastos e também é um componente da enzima superóxido-dismutase, que é a enzima que remove radicais superóxidos tóxicos das células. O manganês é exigido em concentrações mais baixas que as do ferro.

Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de lipídeos células da microalga *Scenedesmus sp.* em meio Guillard quando há a alteração de seus micro e macronutrientes, otimizando as melhores condições de cultivo.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Microalga

A cepa da microalga *Scenedesmus sp.* foi gentilmente cedidas pelo Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre RS. A microalga *Scenedesmus sp.* foi coletada na “Lagoa de Cota Cota“, em La Paz (Bolívia) e isolada no laboratório de IIDEPROQ - UMSA (Instituto de Investigación y Desarrollo de Procesos Químicos) da Universidad Mayor de San Andres. A microalga foi mantida em incubadora dotada de fotoperíodo de 12h luz / 12 h escuro, com temperatura a  $22,5\text{ C}^{\circ}\pm 0,5$  e repiques de manutenção feitos a cada 15 dias, posteriormente armazenadas até utilização nos experimentos.

### 2.2. Unidade experimental e meio de cultivo

As microalgas foram mantidas em ambiente climatizado a  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$  com iluminação artificial com 3 lâmpadas fluorescentes de 20 W, submetidas a fotoperíodo de 12 horas, cultivadas em reatores verticais em acrílico e reatores abertos em formato de bandejas, com volume útil de 3 litros. Os fotobiorreatores foram construídos seguindo os critérios básicos de cultivo de microalgas de Muñoz e Guieysse (2006): alta elevada eficiência na utilização da energia luminosa, facilidade no controle de aeração, adequado sistema de mistura, facilidade em aumento de escala e reduzido estresse hidrodinâmico das células. Utilizou-se o meio Guillard (1975) modificado, sem a adição de vitaminas.

### 2.3. Métodos analíticos

Determinação do peso seco: Após os cultivos, a amostra foi centrifugada em uma centrífuga modelo *Heraeus Megafuge 16*, marca *Thermo Fischer Scientific*, 4800 rpm (correspondente a um campo centrífugo relativo de 7808 g) por 5 minutos. A massa da centrifugação foi colocada em béquer previamente pesado e levado para secagem em estufa a  $80^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. Posteriormente as amostras filtradas foram colocadas em um dessecador por 30 minutos e estas foram pesadas após o período, determinando a biomassa seca final, sendo a concentração de células expressas em g/L (Lourenço, 2006; Gris, 2010).

Teor lipídeos: Utilizou-se o método de Folch (1975) com banho ultrassônico

Estudo da variação das concentrações dos micronutrientes na influência do teor de lipídeos: Foram testadas diferentes concentrações dos micronutrientes no meio de cultivo da microalga

*Scenedesmus sp.* Para cada experimento, todas as soluções-estoque para a preparação do meio de cultivo foram utilizadas, conforme o meio Guillard (1975) modificado. Quando ocorre a variação de um deles, por exemplo no  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , a concentração dos demais mantém-se a mesma já adotada pela literatura. Os experimentos também foram realizados utilizando 10% do volume de meio de cultivo como inóculo, intensidade luminosa de 5000 lux, aeração de 0,7 vvm nos reatores e volume útil 3 litros. Após o teste com os micronutrientes acima, os micronutrientes que apresentaram algum comportamento relevante na alteração de teor de lipídeos e biomassa foram testados novamente para reproduzir os resultados utilizando as concentrações de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  já otimizadas por meio de um Planejamento Composto Central. As melhores condições da concentração dos micronutrientes foram utilizadas para prosseguir os testes para o estudo com os macronutrientes.

Estudo da variação das concentrações dos macronutrientes: Semelhante aos testes com concentrações dos micronutrientes, os macronutrientes foram submetidos à diferentes concentrações de forma a buscar a melhor performance para a produção lipídica. As condições operacionais foram semelhantes às adotadas para o teste com micronutrientes. Nos testes com os macronutrientes, foram utilizadas as concentrações otimizadas dos micronutrientes  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  de modo a verificar se algum macronutriente, quando combinado com a melhor concentração dos micronutrientes acima, podem apresentar alguma melhoria na produção lipídica.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Estudo da variação das concentrações dos micronutrientes na influência no teor de lipídeos

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos para o teor de lipídeos extraído das células e biomassa seca da microalga *Scenedesmus sp.* para os experimentos com alteração as concentrações dos micronutrientes  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .

Pelos resultados apresentados na Tabela 1 verifica-se que nos experimentos em que ocorreu alteração nas concentrações de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  e  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  não ocorreu elevação no teor de lipídeos, quando comparados com os do ponto “Normal”, em que as concentrações destes no experimento foram as mesmas fornecidas pela literatura. Nota-se que quando há alteração nas concentrações de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  e  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , seja na redução ou aumento da concentração destes, há redução teor de lipídeos. Para a concentração de  $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , quando reduz-se sua concentração para a metade, a produção lipídica chega a 30,83% das células, sendo maior que o valor encontrado de 30,41% no ponto com as concentrações descritas pela literatura. A Tabela 1 mostra que um aumento de  $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  não é bom para a produção de lipídeos, e sim somente se o foco for a produção de biomassa. O estudo sobre a concentração dos micronutrientes foi essencial para verificar qual micronutriente interfere diretamente no teor de lipídeos. Neste ponto, foi selecionado que para as concentrações de  $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  estas poderiam ser reduzidas pela metade, sendo utilizadas soluções estoque com 1,575 g/L de  $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  e 0,006 g/L de  $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , porém caso a alteração fosse somente nestas, independentes

Tabela. 1 – Resultados para o teor de lipídeos e biomassa para cada experimento com alteração nas concentrações dos micronutrientes.

Micronutriente	Condição	Concentração na solução-estoque (g/L)	Biomassa (g/L)	Teor de Lipídeos extraído das células (%) g/g
Na <sub>2</sub> EDTA	Sem adição	0	0,0767	4,35
	Metade	2,18	0,0810	4,11
	Normal	*	0,0739	30,41
	Dobro	8,72	0,0533	18,75
	Quíntuplo	21,8	0,065	5,10
FeCl <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O	Sem adição	0	0,0789	21,12
	Metade	1,575	0,0973	30,83
	Normal	*	0,0739	30,41
	Dobro	6,3	0,1028	25,92
	Quíntuplo	15,75	0,0741	17,99
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	Sem adição	0	0,0712	9,36
	Metade	0,006	0,0736	18,11
	Normal	*	0,0739	30,41
	Dobro	0,024	0,0855	3,90
	Quíntuplo	0,06	0,0508	6,56
CoCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	Sem adição	0	0,0633	15,78
	Metade	0,006	0,0827	24,16
	Normal	*	0,0739	30,41
	Dobro	0,024	0,0788	25,36
	Quíntuplo	0,06	0,04723	7,06

\* refere-se à experimento realizado em que as concentrações dos micronutrientes foram as mesmas fornecidas pela literatura, sem alterações nesta.

Um teste de reprodutibilidade utilizando as melhores concentrações de FeCl<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O e CoCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (metade da concentração na solução-estoque) e também as condições otimizadas pelo PCC para concentração de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,06 g/L) e MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (0,5 g/L) foi efetuado visando confirmar deve-se trabalhar com a metade de FeCl<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O e CoCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, aliado com os pontos ótimos das concentrações de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O. Pelo teste de reprodutibilidade foi verificado que quando há uma alteração na concentração dos reagentes FeCl<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O e CoCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O com ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, não há melhora significativa no teor de lipídeos, sendo abaixo de 47,5%, valor do teor de lipídeos que foi encontrado somente com a alteração em ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, em que a biomassa esteve em 0,0966 g/L. Nesse aspecto, conclui-se que dentre os micronutrientes, não é viável a alteração destes quando for utilizar 0,06 g/L de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e 0,5 g/L MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O

### 3.2. Estudo da variação das concentrações das concentrações do macronutrientes

Os resultados para os experimentos com alterações nas concentrações dos macronutrientes e utilizando as concentrações de zinco e manganês otimizadas, são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultado para o teor de lipídeos e biomassa para cada experimento com alteração nas concentrações dos macronutrientes.

Macronutriente	Condição	Concentração na solução-estoque (g/L)	Biomassa (g/L)	Teor de Lipídeos extraído das células (%) g/g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Sem adição	0	0,075	26,77
	Metade	18,38	0,150	40,79
	Dobro	73,52	0,225	7,41
MgSO <sub>4</sub>	Sem adição	0	0,057	11,72
	Metade	9,02	0,120	40,49
	Dobro	36,08	0,138	36,22
NaHCO <sub>3</sub>	Sem adição	0	0,064	10,47
	Metade	6,3	0,110	30,21
	Dobro	25,2	0,064	26,01
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	Sem adição	0	0,001	0,00
	Metade	5,705	0,010	34,25
	Dobro	22,82	0,230	4,34
NaNO <sub>3</sub>	Sem adição	0	0,127	39,37
	Metade	42,55	0,155	32,17
	Dobro	170,02	0,150	26,68

Com base nos resultados apresentados na Tabela 2, nota-se que quando se utilizou a metade da concentração de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O e metade de MgSO<sub>4</sub> o teor de lipídeos foi próximo de ao encontrado no melhor ponto, quando se utilizou as condições otimizadas dos micronutrientes (teor de lipídeos 47,5% e concentração de biomassa 0,0966g/L). Este fato mostra que também poderia reduzir a concentração destes macronutrientes, no mesmo meio em que já é utilizado as melhores condições dos micronutrientes. Assim, como individualmente, o CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O e MgSO<sub>4</sub> quando utilizados em metade de suas concentrações, também produziram elevadas concentrações de óleo, semelhante ao ponto em que há o teor de lipídeos de 47,5% na combinação otimizada dos micronutrientes fontes de zinco e manganês, foi efetuado um experimento combinando junto as diferentes concentrações de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O e metade de MgSO<sub>4</sub>. Quando se combina as diferentes concentrações de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O e MgSO<sub>4</sub> não se consegue superar a produção de lipídeos quando o experimento é cultivado apenas com a alteração nas concentrações de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (teor de lipídeos: 47,5%). Assim, não é viável proceder com nenhuma alteração nos macronutrientes

#### 4. CONCLUSÕES

Não é viável a alteração dos micro e macronutrientes do meio de cultivo da *Scenedesmus* sp, com exceção ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O e MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O. Para os macronutrientes: a redução para a metade

da concentração de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{MgSO}_4$  pode até ser viável em um determinado momento, porém só quando esta alteração é feita somente em um destes, e não simultaneamente.

## **5. AGRADECIMENTOS**

Agradecimento ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (Processo PCE-00089-14), VALE S.A, CAPES, CNPq – Brasil e à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia.

## **6 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.**

- FOLCH, J; LEES, M. STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, v. 22, p. 497-509, 1975.
- GRIS, Lara Regina Soccol. *Produção de microalga Nannochloropsis oculada em fotobiorreatores Airlift*. Porto Alegre, Universidade Federal de Rio Grande do Sul. 148 p. 2010.
- GUILLARD, R. R. L. Culture of marine invertebrate animals. Plenum, New York, USA, p. 29-6. 1975.
- LOURENÇO, S. de O. *Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações*. Brasil: Rima, 2006.
- MUÑOZ, R. T.; KÖLLNER, C.; GUIEYSSE, B.; MATTIASSON, B. Photosynthetically oxygenated salicylate biodegradation in a continuous stirred tank photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. n.87. p.797-803, 2006.