

RESUMO EXPANDIDO – PRÓ-CIÊNCIA 2024/1

BIOPROCESSO PARA ESTIMULAR A SÍNTESE DE CLOROFILINA DE SÓDIO E COBRE (CSC) NA MICROALGA *Chlorella vulgaris*

Bernardo Miranda Pinto Lima Coimbra¹; Gabriele Marques dos Santos¹; Michelly Camyla Santos Almeida¹; Jamila Sueira de Jesus Silva³; (Dr.) Lucas Guimarães Cardoso^{1,2}.

¹ Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas, Salvador, Universidade, Salvador, Bahia, Brasil;

² Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química (PPEQ), Escola Politécnica, Federal Universidade da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil;

³ Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Reitor Miguel Calmon, Canela, Salvador, Bahia, Brasil.

E-mail para contato: guimaraes.lucas@animaeducacao.com.br

Resumo

Novas fontes para obtenção de CSC como microalgas, representam uma alternativa inovadora e promissora, visto a grande quantidade de espécies, facilidade das técnicas de cultivo, alta produção de biomassa, benefícios ambientais promovidos pelo seu cultivo, além dos diversos efeitos terapêuticos relatados para a saúde humana. Portanto, este trabalho tem como objetivo produzir, quantificar e caracterizar clorofilina de sódio cobre produzida por manipulação das culturas de *Chlorella vulgaris* submetidas a fotoperíodo contínuo (T24) e fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro (T12). A CSC foi extraída da biomassa de microalga seca e os grupamentos funcionais foram analisados através da Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). A produção de *C. vulgaris* apresentou aproximadamente.

Palavras-chave: Microalgas; Bioproductos; Clorofila

Introdução

A luz é um parâmetro chave no cultivo de microalgas, principalmente referente a intensidade, frequência e o fotoperíodo empregado, que influenciam na produtividade das microalgas, síntese de clorofila, e consequentemente na obtenção de CSC. A espécie *Chlorella vulgaris* apresenta grande potencial de utilização industrial, principalmente na indústria alimentícia e cosmética, pois produzem pigmentos (chl-a e chl-b) até 7% da biomassa seca, sendo comumente chamada de “alimento esmeralda” (Khanra et al., 2018).

A clorofila é o pigmento fotossintético mais abundante e primário responsável pela absorção de luz durante a fotossíntese. A sua estrutura molecular é constituída por quatro anéis pirrólicos, um átomo central de magnésio ligado a quatro átomos de



nitrogênio e uma longa cadeia lateral de isoprenóide, um álcool fitol esterificado. Em virtude de sua coloração verde, foram considerados como corantes naturais na indústria alimentícia por um tempo. (Hosikian et al., 2010).

Uma solução para isso pode ser encontrada explorando diferentes derivados de clorofila com maior estabilidade, entre os quais a Clorofilina de Sódio e Cobre (CSC) é amplamente aceita. O CSC é um derivado dietético da clorofila que pode ser produzido pelo tratamento do extrato natural de clorofila com etanol, hidróxido de sódio e o metal pesado cobre. É composto principalmente por componentes de clorina, ou seja, Cu-clorina e₄, Cu-clorina e₆ e Cu-clorina e₄ etílicos ésteres. CSC tem sido imensamente aplicado como agente anticancerígeno, corante alimentar e derivado dietético. Uma das principais vantagens do CSC sobre a clorofila natural é a sua natureza solúvel em água. Relatórios anteriores demonstraram que o CSC provou ser absorvível pelo corpo humano, indicando assim sua biodisponibilidade. Portanto, sendo eficiente, estável, absorvível, solúvel em água e resistente ao processamento térmico. Sendo, portanto, um candidato potencial para substituir o CSC de grau comercial que como um derivado da clorofila natural tem sido considerado um corante alimentar em países europeus e asiáticos, visto que o CSC de grau comercial foi aceito como um aditivo alimentar seguro de acordo com relatórios da União Europeia (CE - Comissão Européia, 1995) (FERRUZZI e BLAKESLEE, 2007; FERRUZZI e SCHWARTZ, 2005; SINGH et al. 2020). A preparação de CSC a partir de biomassa microalgal é comparativamente mais conveniente e fácil em contraste com a obtida de fontes vegetais. As células de microalgas são estruturalmente e metabolicamente mais simples, tendo menos complexidade e, portanto, acredita-se que sejam uma matéria-prima mais adequada para extração de pigmentos. No entanto, não há muitos relatos científicos sobre o CSC preparado utilizando como matérias-primas microalgas e cianobactérias, visto que são igualmente eficientes e possui todas as propriedades essenciais como a amostra de nível comercial. (PARAMESWARI & LAKSHMI, 2022).

Métodos

O cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* foi realizado em meio BG-11, enriquecido com elementos traços conforme Rippka et al. (1979), utilizando fotobioreatores tipo Erlenmeyer de 2 litros. As condições controladas incluíram aeração constante,



temperatura de 25°C e fotoperíodos de 12 horas claro-escuro (FT12) e 24 horas claro (FT24).

A biomassa foi quantificada utilizando a densidade ótica e o espectrofotômetro PerkinElmer Lambda 35 UV-VIS, com a biomassa obtida por centrifugação. A extração de Clorofilina de Sódio e Cobre (CSC) seguiu o protocolo de Humphrey (1980) e Singh (2020), utilizando hidróxido de sódio etanólico (etanol 100% + NaOH 1%), ácido clorídrico, sulfato de cobre e etanol 95%, com o objetivo de avaliar o rendimento de CSC nos diferentes fotoperíodos.

A Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) do CSC foi realizada no espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier modelo Spectrum 100 da PerkinElmer, por método de refletância total atenuada (ATR) com varredura entre 4000 e 600 cm⁻¹ (Cardoso et al. 2021).

Resultados e Discussões

Cultivo de *Chlorella vulgaris*:

O cultivo foi realizado em um fotobiorreator tipo Erlenmeyer com capacidade de 2 litros, sob condições controladas e aeração constante, temperatura de 25°C e um ciclo de luz de 12 horas claro-escuro (FT12) e outro de 24 horas claro (FT24). Observou-se um crescimento saudável da microalga, caracterizado pela coloração verde intensa (Fig. 1), indicando ausência de contaminação (Fig. 2).



Figura 1. Cultivo de *Chlorella vulgaris* em meio BG-11.



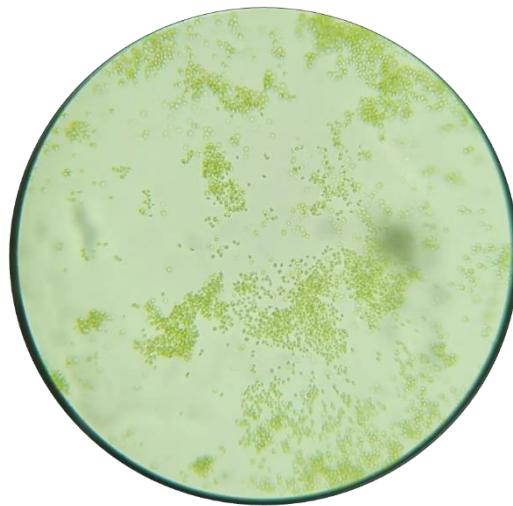


Figura 2. Cultivo de *Chlorella vulgaris* em meio BG-11 vista no microscópio.

Avaliação da cinética de crescimento:

A curva de crescimento da *Chlorella vulgaris* é apresentada na Figura 3, a maior produção foi do tratamento FT24 com seu máximo no 17º dia com produção máxima de $1,5\text{gL}^{-1}$ e o tratamento FT12 com produção máxima no 15º dia com $1,2\text{g L}^{-1}$. A influência do fotoperíodo também foi observado no estudo Madhubalajet al., (2019), onde, utilizando *C.vulgaris* obteve uma maior concentração no FT24 ($1,1\text{g L}^{-1}$) em comparação com FT12 ($0,4 \text{ g L}^{-1}$), em 6 dias de cultivo. A maior produção de biomassa em FT24 ocorreu devido a maior incidência de luz no cultivo, pois até o limite de fotoinibição, proporciona maior crescimento celular. Assim, a energia luminosa recebida e armazenada na forma de ATP e NADPH é importante para o metabolismo celular e para a concentração de biomassa, devido à capacidade que elas têm de fixar carbono (Fakhri et al., 2021).



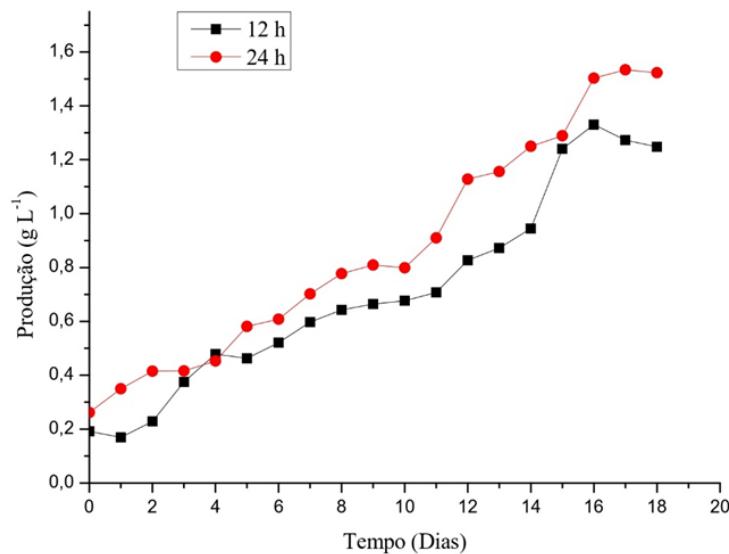


Figura 3. Produção de *Chlorella vulgaris* em meio BG-11 cultivada em fotoperíodo de 12-12h claro-escuro e 24h claro.

Produção e quantificação de CSC:

A extração de CSC apresentou rendimento de 0,3 g (Fig. 4) para ambos os fotoperíodos, desta forma, a utilização de um maior período de exposição luminosa parece não estimular ou aumentar a extração de CSC da biomassa. Possivelmente, porque se aumentar a incidência de luz nos cultivos, pode causar um determinado estresse e sob essas condições as microalgas sofrem degradação e redução de pigmentos (Yun et al., 2019).

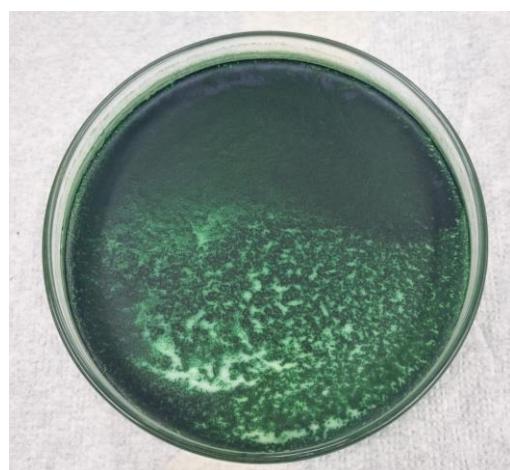


Figura 4. Clorofilina de Sódio Cobre (CSC) obtida da biomassa da *Chlorella vulgaris* cultivada em fotoperíodo 12-12h claro-escuro.

Espectroscopia de Absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR): A análise de FTIR da clorofilina de cobre sódio da biomassa de *Chlorella vulgaris* mostrou semelhança com a CSC comercial, com bandas de comprimento de onda em 2940 cm^{-1} , 2850 cm^{-1} , 1560 cm^{-1} , 1386 cm^{-1} , 1204 cm^{-1} e entre $880 - 700\text{ cm}^{-1}$.

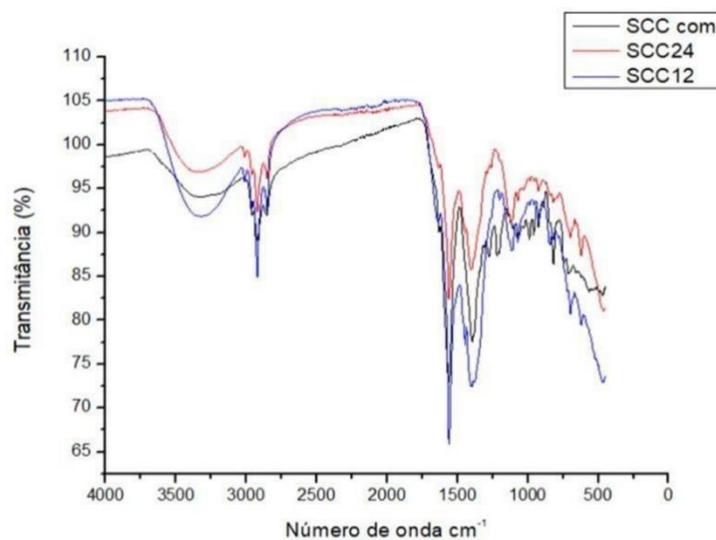


Figura 5. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier da clorofilina de cobre sódio de *Chlorella vulgaris*.

Conclusões

A pesquisa demonstrou que o fotoperíodo de 24 horas foi o mais eficaz para o crescimento da biomassa de *Chlorella vulgaris*, alcançando uma taxa de $1,5\text{ gL}^{-1}$ no 17º dia de cultivo. Contudo, a produção de Clorofilina de Sódio e Cobre (CSC) não foi significativamente influenciada pela variação do fotoperíodo, com rendimento constante de 0,3 g em ambas as condições. Esses resultados sugerem que, embora o fotoperíodo de 24 horas favoreça o crescimento da microalga, ainda é necessário otimizar o processo de obtenção do CSC para aumentar o seu rendimento.

Referências



HUMPHREY, A.M. Chlorophyll. *Food Chemistry*, v. 5, p. 57–67, 1980.

KRZEMIŃSKA, I. et al. Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. *Bioprocess and biosystems engineering*, v. 37, n. 4, p. 735–741, 2014.

MADHUBALAJI CK, SARAT CHANDRA T, CHAUHAN VS, SaradaSARADA R, Mudiar SN. Chlorella vulgaris cultivation in airliftphotobioreactorwithtransparent draft tube: effectofhydrodynamics, light andcarbon dioxideonbiochemical profile particularly ω -6/ ω -3 fattyacidratio. *J Food SciTechnol*. 2020.

MATOS, . P. The Impact of Microalgae in Food Science and Technology. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 94, n. 11, p. 1333–1350, 26 nov. 2017.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of general microbiology* 111, 1-61, 1979.

SUTHAR, S.; VERMA, R.; KUMAR, K. Production of Chlorella vulgaris under varying nutrient and abiotic conditions: A potential microalga for bioenergy feedstock. *Process Safety and Environmental Protection*, 2017.

SINGH, V. L., CHAKRAVARTY, S., CHANDRA, N., MALLICK, N. Production of sodium copper chlorophyllin from a green microalga Chlorella minutissima: a value-added co-product for sustainable microalgal refinery Agricultural and Food Engineer. *Food and Bioproducts Processing* 1 2 3, 322–334, 2020.

FAKHRI, M., Riyani, E., Ekawati, A. W., Arifin, N. B., Yuniarti, A., Widyawati, Y., Saputra, I. K., Samuel, P. D., Arif, M. Z., Hariati, A. M., 2021. Biomass, pigment production, and nutrient uptake of *Chlorella* sp. under different photoperiods. *Biodiversitas*, v. 22, n. 12, p. 5344-5349.

YUN, C. J., Hwang, K. O., Han, S. S., Ri, H. G., 2019. The effect of salinity stress on the biofuel production potential of freshwater microalgae *Chlorella vulgaris* YH703. *Biomass and Bioenergy* 127, 105277.

