OTIMIZAÇÃO DO APROVEITAMENTO DE BIOMASSA MICROALGÁCEA POR PROCESSOS FÍSICOS PELO MÉTODO DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

FREITAS, A. N. S.[1]; SENRA, T. M.[1]; LIMA BARIZÃO, A.C [2]; MORO, L. B. [2]; OLIVEIRA, J. P.[1,2]; Cassini, S. T.[1,2.]

[1]Universidade Federal do Espírito Santo
[2]Centro de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação

Palavras-chave: Ruptura Celular. Ultrassom. Moagem. Microalga.

INTRODUÇÃO

O cultivo de microalgas recebe atenção estratégica pelos pesquisadores, pois as mesmas requerem nutrientes comuns e em pouca quantidade para produzir biomassa suficiente para aproveitamento (Williams and Laurens, 2010; Raja et al., 2014). Entretanto, a presença de parede celular em microalgas dificulta o acesso aos metabólitos. A ruptura celular de microalgas interessa aos pesquisadores pois o uso e a quantificação de moléculas alvo dependem de sua liberação da célula para o meio em boas condições de preservação com menor requerimento energético (Postma et al., 2015; Nunes et al., 2023). Diante disso, destaca-se o pré-tratamento de microalga a partir de processos físicos, pois apresenta satisfatória eficiência energética e baixo impacto sobre as macromoléculas (Nunes et al., 2023).

Baseado nisto, o presente estudo propôs investigar o rendimento da ruptura celular de *Chlorella* sp. (L06) pela combinação de diferentes condições de processos físicos por meio de um planejamento fatorial de modo a revelar (1) quais variáveis influenciam a eficiência de ruptura celular e (2) encontrar o ponto ótimo de aproveitamento da biomassa microalgácea pelo método de superfície de resposta.

METODOLOGIA

A triagem feita pela literatura permitiu selecionar três processos físicos: massa de microesferas (MM), tempo de moagem (TM) e tempo de ultrassom (TU). Os níveis das três variáveis foram determinados por estudo preliminar. A partir disso, montou-se um planejamento fatorial com três variáveis e três níveis igualmente distantes (−, 0, +): MM (400 mg, 800 mg, 1200 mg), TU (0 min, 10 min, 20 min) e TM (5 min, 15 min, 35 min).

A microesfera de sílica de 0,5 mm foi adquirida pela Scientific Industries, Inc.© com de acordo com a especificação contida no manual do Disruptor gene. Scientific industries ©. A massa de microesfera e o tempo de moagem foram duas variáveis testadas pelo mesmo método: moagem. Esse método consiste na ruptura mecânica das células pelo atrito entre as esferas de vidro e as células provocado pelo movimento rotacional na câmara de moagem. O tempo de ultrassom foi testado no Ultra-som bioLogics Inc. © modelo 300v/T com frequência de X e com 20% da potência.

Foram realizados trinta ensaios randomizados com três repetições do ponto central com a coleta 200 µL do sobrenadante após centrifugação de 3.000 rpm por 10 minutos para leitura da absorbância clorofila livre em espectrofotômetro Leitor Elisa com monocromador EPOCH (Fig. 1). Os resultados do processamento físico foram interpretados pelo programa Statistica no qual foi produzido o Diagrama de Pareto para análise de influência das variáveis e seus níveis e feito a seleção do ponto ótimo para aproveitamento de biomassa microalgácea pelo método de superfície de resposta (RSM).

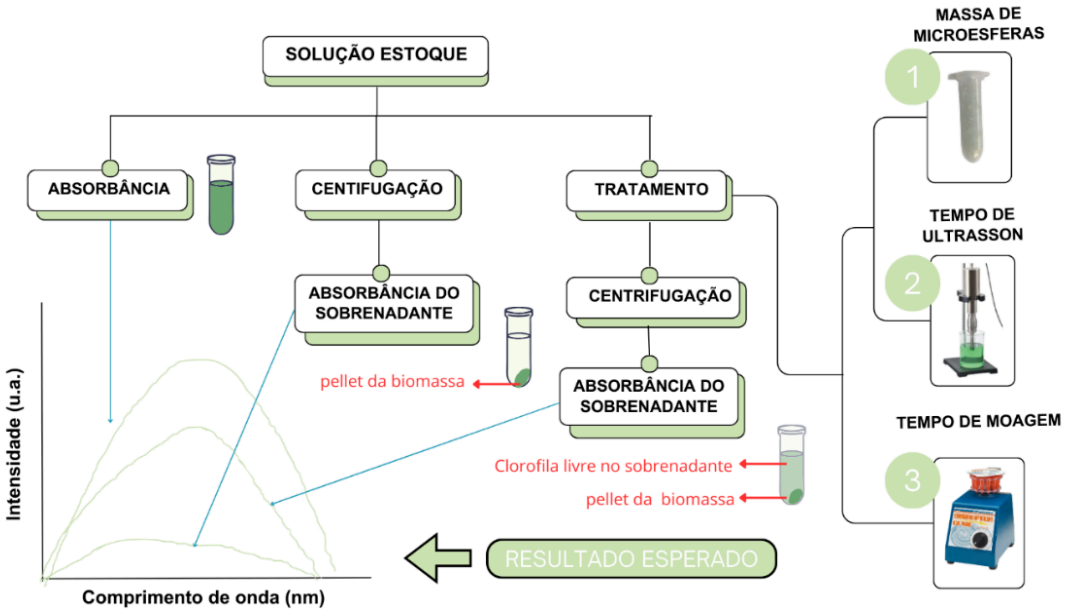


Figura 1. Fluxograma da metodologia aplicada no estudo.

RESULTADO E DISCUSSÃO

O impacto de três variáveis foi testado por meio do fatorial completo 3^3 para determinar quais as variáveis mais significativas na ruptura celular pelo processamento físico. O Diagrama de Pareto revelou que TU e TM ultrapassaram a linha de significância (p> 0.005) com efeito negativo (Fig. 1). Dessa forma, conforme aumenta-se os níveis dos fatores estudados menores é a quantidade de clorofila a livre presente no sobrenadante. A variação na massa de microesferas de vinho não apresentou influência significativa na quantidade de clorofila *a* no sobrenadante.

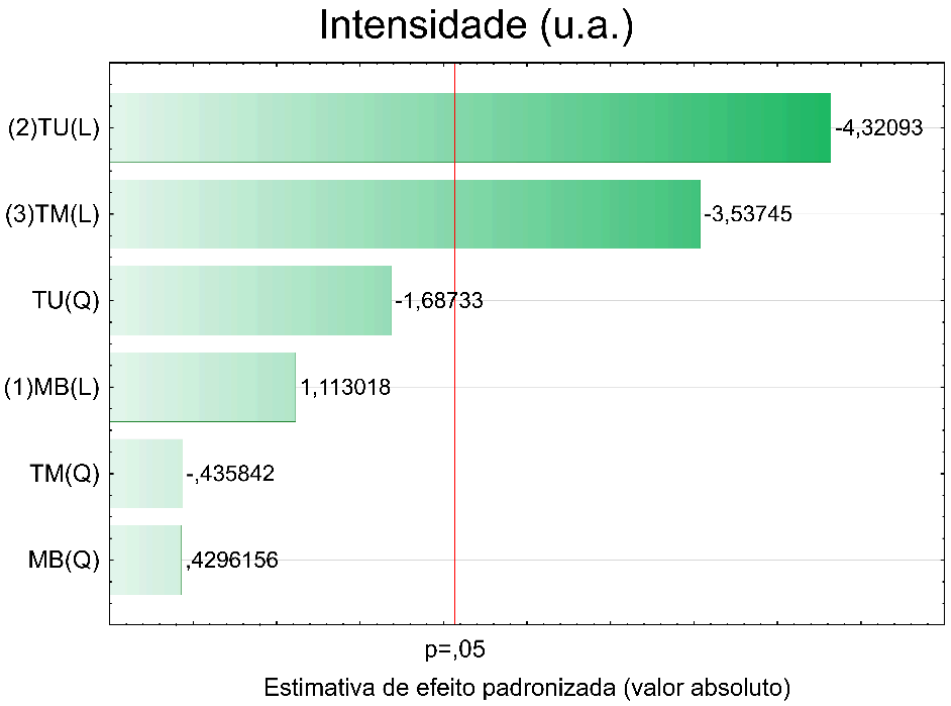


Figura 2. Diagrama de Pareto referente ao fatorial completo 3^3.

Em seguida, os dados foram avaliados pelo RSM combinando os diferentes níveis de ultrassom e moagem para cada massa de microesferas de vidro (Fig. 2a, 2b e 2c). Os três cenários experimentais descrevem a condição ótima pela superfície de resposta da clorofila próxima ao menor nível de TU e TM (Fig. 2a, 2b e 2c). Os ensaios 800 mg e 1200 mg de microesfera e com menor nível de TU (0 minutos) e TM (5 minutos) apresentaram maior absorbância da clorofila a, portanto, maior rendimento de ruptura celular: 57,4% e 53,75% respectivamente. Diante disso, a melhor combinação é aquela com menor massa, pois com 1/3 a menos de esferas alcançou-se rendimento próximo. Ademais, o gráfico de superfície concordou com Diagrama de Pareto ao elucidar MM como dispersível à clorofila livre no sobrenadante, uma vez que a mesma condição de TU e TM em diferentes condições

de MM gerou resposta muito próxima (Fig. 3a, 3b e 3c). Duas hipóteses são consideradas nesse cenário: (1) a menor massa de microesfera foi capaz de romper o máximo de células pelo menor tempo de moagem e (2) o efeito muito significativo e negativo do TU e TM ocultaram a real contribuição da MM pela sobreposição das variáveis. As duas respostas ótimas mais o ponto central foram selecionadas para testar a reprodutibilidade do modelo. O modelo experimental mostrou-se reprodutível, pois as três combinações reproduzidas apresentaram resposta próxima à descrita no modelo experimental (Fig. 2e, 2f e 2g).

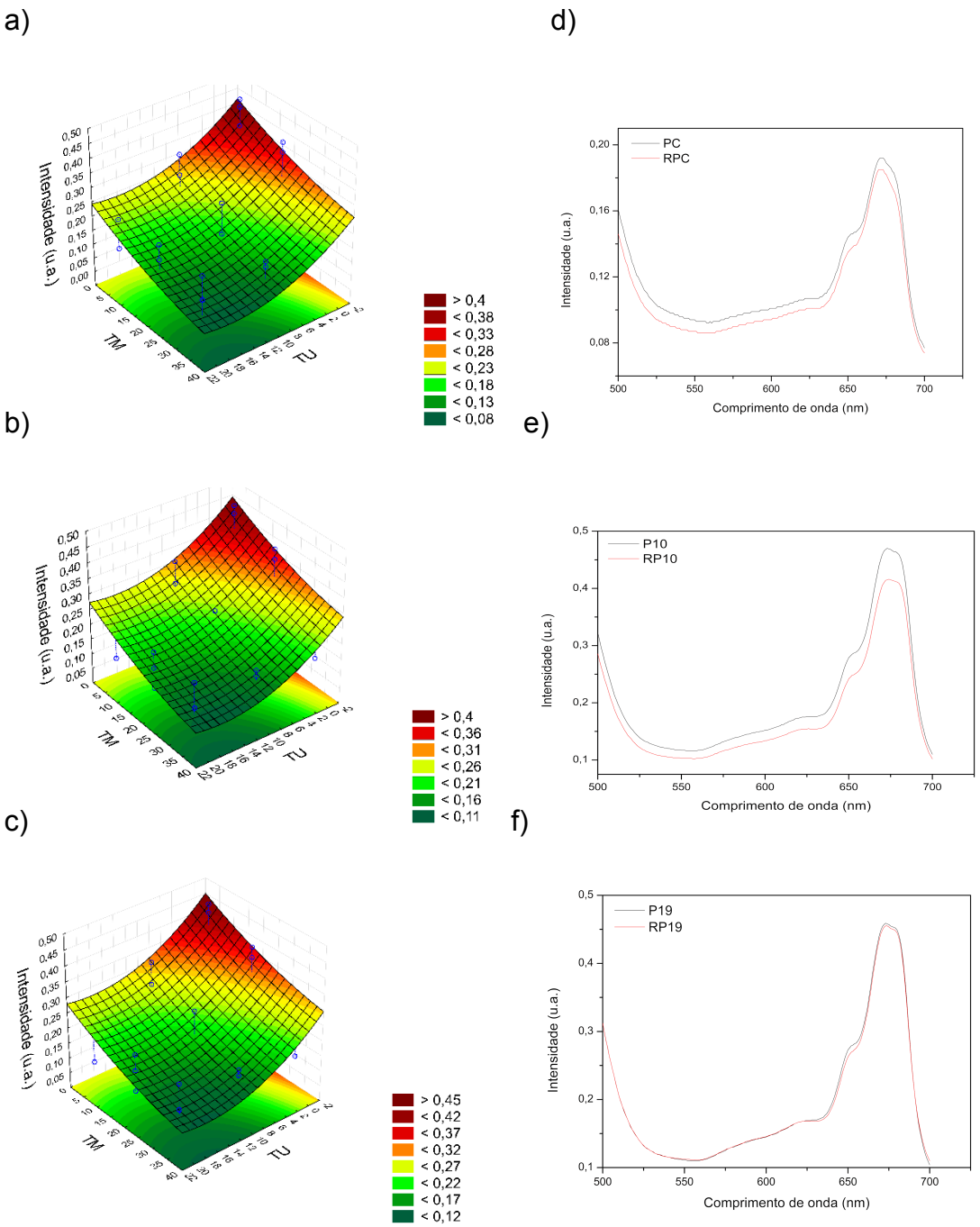


Figura 3. RSM do Planejamento Fatorial Completo 3^3: a) RSM 400 mg (b) RSM 800 mg e (c) RSM 1200 mg. Gráficos de reprodutibilidade: (d) ponto central (PC), (e) P10: (400 mg MM, 0 minutos TU, 5 minutos TM) e (f) P19 (800mg MM, 0 minutos TU, 5 minutos TM).

Contudo, espera-se que maior esforço para ruptura celular apresenta melhor resposta. Dessa forma, maior teor de clorofila *a* livre no sobrenadante é esperado conforme aumenta-se os níveis das variáveis. A partir disso, realizou-se análise da eletromicrografia dos para caracterizar o impacto dos processos físicos na ruptura celular. Foi observado na micrografia células inteiras invés de rompidas para menores níveis das três variáveis (Fig.4a). O impacto do ultrassom na ruptura celular foi bem documentado (Fig. 4c). É possível observar dois tipos de ruptura celular:

células estouradas com a parede celular estirada conforme a seta branca da figura 4c e células colapsadas com parede celular muito enrugada conforme a seta vermelha da figura 4c. A moagem, por outro lado, apresentou células rompidas com parede celular fissurada, comprimida e/ou fragmentada (Fig. 4d).

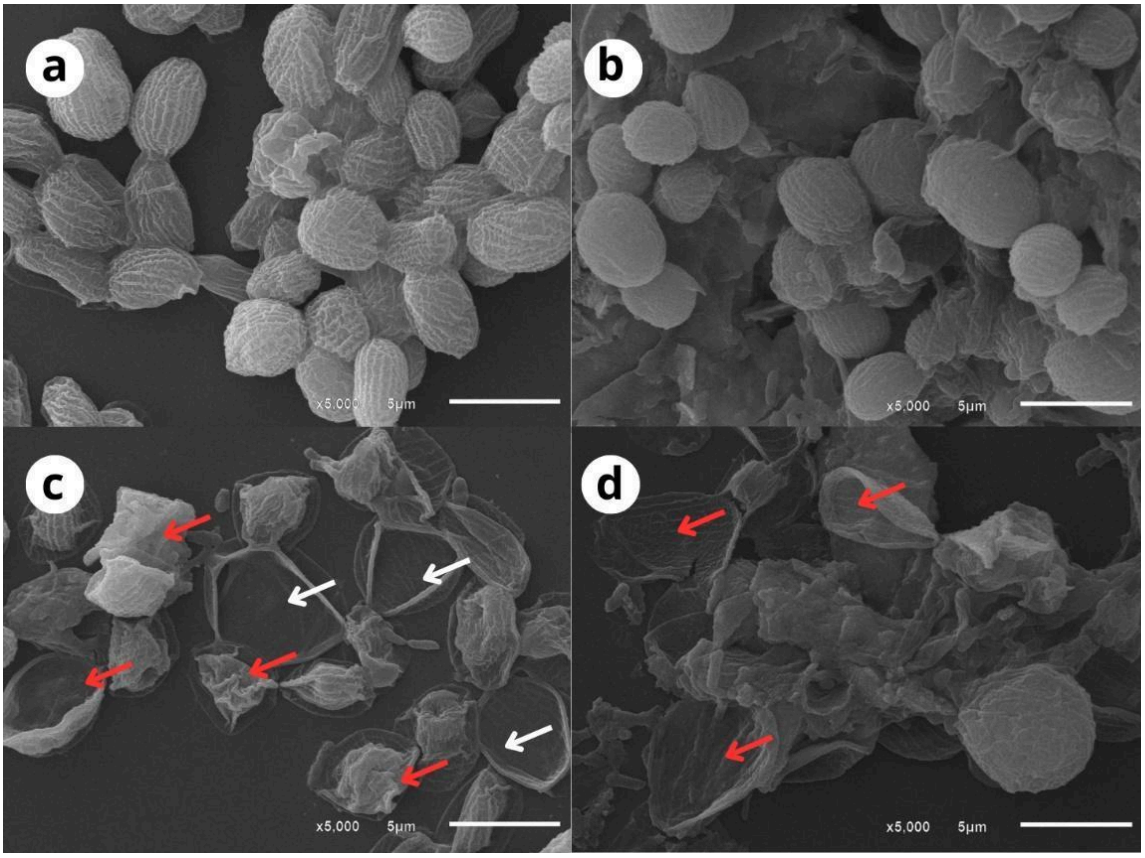


Figura 4. Eletromicrografia do impacto na ruptura celular de *Chlorella* sp.. a) amostra controle. b) 0 minutos de ultrassom e 5 minutos de moagem. C) 20 minutos de ultrassom. D) 35 minutos de moagem.

A partir da eletromicrografia é possível afirmar o efeito positivo das variáveis na ruptura celular da microalga. No entanto, ao final do processamento físico a absorbância da clorofila coletada para indicar a ruptura celular foi reduzida sugerindo redução no rendimento conforme ampliou-se o esforço energético. Em virtude disso, sugere-se que o processamento físico da amostra levou ao comprometimento da clorofila a. O possível comprometimento da clorofila *a* no processo físico de ruptura celular de *Chlorella* sp. em maiores tempos de ultrassom e moagem indica que há um falso negativo quanto a ruptura celular.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O planejamento fatorial da ruptura celular de *Chlorella* sp. por processos físicos por meio da interpretação do Diagrama de Pareto revelou a influência significativa e negativa TU e TM na clorofila *a*. O método de superfície de resposta descreveu o

perfil de clorofila livre no sobrenadante conforme as variáveis foram combinadas. A faixa ótima de clorofila livre no sobrenadante foi identificada em curto tempo de ultrassom e tempo de moagem. Embora o ponto ótimo (P10) para aproveitamento da biomassa microalgácea apresentado pelo planejamento fatorial indique ruptura celular superior a 50% o modelo experimental baseado em clorofila *a* não indica adequadamente o rendimento da ruptura celular na presença de tempo de ultrassom e moagem prolongado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

NUNES, A. L. F. et al. Cell disruption of microalgae: advances and perspectives. Ciência Rural, v. 54, n. 5, 2024.

POSTMA, P. R. et al. Mild disintegration of the green microalgae Chlorella vulgaris using bead milling. Bioresource Technology, v. 184, p. 297–304, maio 2015.

RAJA, R. et al. Biomass from microalgae: an overview. Oceanography, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2014.

WILLIAMS, Peter J. le B.; LAURENS, Lieve ML. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. Energy & environmental science, v. 3, n. 5, p. 554-590, 2010.