

RECUPERAÇÃO DA BIOMASSA DA MICROALGA *Chlorella sorokiniana* POR AGENTES FLOCULANTES SINTÉTICOS E NATURAIS

Fernanda S. Soares^{1*}, Mônica Ansilago², Nathaskia da Silva Pereira², Emerson M. de Carvalho³

1. Estudante de Biotecnologia da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais/FCBA-UFGD
2. Estudante de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental na Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia/FACET-UFGD
3. Professor da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais/FCBA-UFGD

Resumo

As microalgas têm sido foco de diversos estudos visto a sua ampla aplicação biotecnológica, sendo utilizadas em processos industriais, seja na suplementação alimentar, produção de fármacos, entre outros. Como o cultivo de microalgas é realizado em meio aquoso, é preciso investir no melhor processo de separação e recuperação da biomassa na etapa final de produção. Assim, a presente pesquisa buscou avaliar a performance de floculação da microalga *Chlorella sorokiniana* por meio da adição de floculantes sintéticos e naturais. Para avaliar a floculação foram utilizados os seguintes agentes: cloreto férrico (FeCl_3); sulfato de alumínio $\text{Al}_2(\text{SO}_4)$; quitosana; carboximetilcelulose (CMC); semente de *Moringa oleifera*; FeCl_3 + quitosana; e FeCl_3 + CMC. Os resultados demonstraram uma maior eficiência de recuperação de biomassa algal por meio de floculantes orgânicos como a Quitosana, FeCl_3 + CMC e a *M. oleifera*, obtendo valores de recuperação máximos de 80,38, 88,96 e 100%, respectivamente.

Palavras-chave: Chlorophyceae; Polímeros Orgânicos; Floculação.

Apoio financeiro: Fundect/CNPq

Introdução

As microalgas pertencem a um grupo diverso de organismos unicelulares, compreendendo protistas, eucariotas, cianobactérias procarióticas e algas azuis-verdes (VIDOTTI, ROLLEMBERG, 2004). Suas numerosas características têm sido utilizadas em diferentes aplicações biotecnológicas. Estes microrganismos são promissoras matérias-primas renováveis para fornecer uma ampla variedade de compostos com interesse comercial, como lipídios, proteínas, pigmentos e carboidratos (LEE ET AL., 2017). As células das microalgas têm carga superficial negativa, densidade próxima ao meio de cultivo e encontra-se em estado disperso. Este sistema estável resulta em sedimentação natural lenta da própria microalga.

Dentre as diversas microalgas estudadas, a *Chlorella* sp. possui vantagem sobre demais microalgas dulcícolas, pelo fato de apresentarem dominância nos ambientes em que estão presentes (ÁLVAREZ-DÍAZ et al., 2017). Dentre estas microalgas, uma que vem ganhando destaque é a espécie *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae), microalga termofílica, de formato circular, parede celular lisa, com tamanho pequeno (2 – 4,5 μm de diâmetro) (WARBURG, 1920). Em um estudo realizado por MATSUKAWA et al. (2000), foi possível obter a partir da biomassa de *C. sorokiniana* 68,5 % de proteína, 11,9% de carboidratos e 10% de lipídeos. No entanto, a sua produção em larga escala é limitada pelos insumos de alta energia necessários para a obtenção da biomassa algal (UMMALYMA et al., 2017). O custo da separação da biomassa pode atingir de 20 a 30% do custo total da produção de microalgas (VAN DEN HENDE et al., 2011).

Várias abordagens para a separação sólido-líquido vêm sendo investigadas, incluindo técnicas de aderência usando coagulação, floculação e flotação, além de aplicações de força como centrifugação e filtração (BARROS et al., 2015). A aplicação destas tecnologias não é simples, devido às propriedades físicas e químicas do meio onde as microalgas estão suspensas. Na separação por floculação são usados agentes floculantes polieletrólitos, que podem ser naturais (polissacarídeos, como a quitosana) e sintéticos (poliacrilamida e sais metálicos, por exemplo) (CHEN et al., 2011). Os floculantes atuam neutralizando ou reduzindo a carga superficial das células microalgais, fazendo com que estas se aglutinem em flocos (GRIMA et al., 2003). Assim, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar a performance de floculação da biomassa algal de *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae) por meio da adição de aditivos floculantes sintéticos e naturais.

Metodologia

O ensaio para avaliação da performance de floculação da biomassa algal foi realizado com a espécie *Chlorella sorokiniana* (cedida pela Fundação André Tosello - Ref. 211-32). A microalga *C. sorokiniana* foi cultivada durante 30 dias em água mineral enriquecida com fertilizante químico NPK, em garrafas de polietileno tereftalato com capacidade de 5 litros. O cultivo foi realizado no laboratório do Centro de Pesquisa em Biodiversidade (CPBio) na Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, com sistema de cultivo estático não axênico, aeração constante, temperatura ambiente e fotoperíodo (12 h luz / 12 h escuro). Na preparação da solução inicial foi utilizada uma proporção entre de 80% e 20% (v/v) do meio de cultivo e o inóculo de microalga, respectivamente. Para suplementação foi adicionado 1% da solução estoque de NPK que foi preparada com 0,70 g L^{-1} de adubo químico N:P:K (20-5-20 g L^{-1}) para cada 1000 mL (SIPAUBA-TAVARES; ROCHA, 2003; CARVALHO et al., 2012; ANSILAGO et al., 2016).

Nos experimentos para avaliar o desempenho da floculação para recuperação da biomassa algal foram utilizados os seguintes materiais/polímeros:

- 1) Semente de *Moringa oleifera* seca e triturada (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 g L⁻¹);
- 2) Quitosana diluída em ácido acético a 1% (2,5; 5; 7,5; 10 ml L⁻¹);
- 3) Carboximetilcelulose (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 g L⁻¹);
- 4) Cloreto férrico (FeCl₃) (0,5; 0,75; 1 g L⁻¹);
- 5) Sulfato de alumínio (Al₂(SO₄)₃) (0,5; 0,75; 1 g L⁻¹);
- 6) FeCl₃+ CMC (0,5+ 0,5 g L⁻¹); (0,75+ 1,0 g L⁻¹); (1,0+ 1,5 g L⁻¹); (1,25+ 2,0 g L⁻¹);
- 7) FeCl₃+ Quitosana (0,5 g L⁻¹ + 2,5 ml L⁻¹); (0,75 g L⁻¹ + 2,5 ml L⁻¹); (1,0 g L⁻¹ + 2,5 ml L⁻¹); (1,25 g L⁻¹ + 2,5 ml L⁻¹).

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e com adição do tratamento controle, sem adição de floculante. Após a adição do floculante foi promovida uma agitação por 60 segundos a 50 RPM. Em seguida as amostras foram mantidas em repouso por 30 minutos para que os flocos formados sedimentassem. As amostras foram filtradas e foi realizado monitoramento da absorbância OD 685nm (RASHID et al., 2013). Também foi analisado pH com auxílio de aparelho portátil. A eficiência de floculação foi calculada como segue (adaptado de PAPAZI et al., 2010):

$$EF\% = \left(1 - \frac{A - B}{C}\right) \times 100$$

onde: A = amostra final filtrada;
B = branco (floculante+água destilada);
C = controle.

Resultados e Discussão

O aspecto visual do meio que continha a microalga em suspensão com todos os produtos avaliados pode ser observado na Figura 1. É possível visualizar a eficiência da *M. Oleifera* (semente) e da quitosana quando comparados ao controle e aos demais produtos floculantes avaliados.

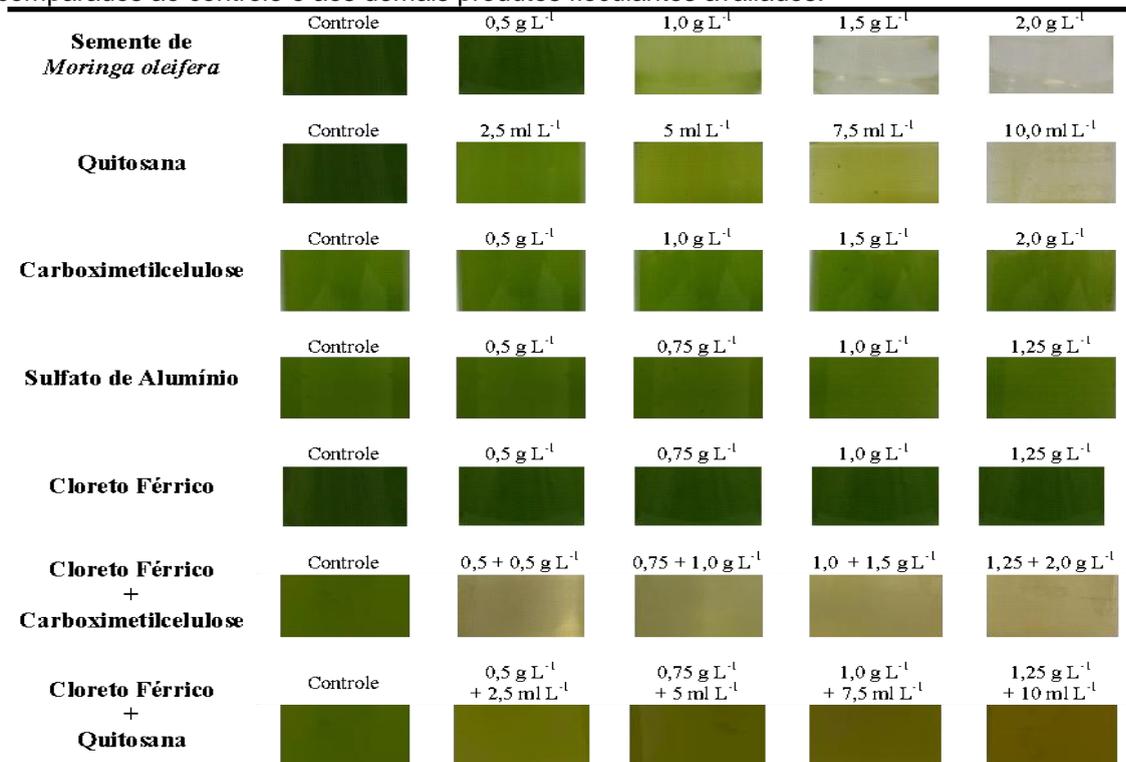


Figura 1. Aspecto visual do meio de cultivo frente aos diferentes polímeros (controle + tratamento 1, 2, 3 e 4, respectivamente).

Na Tabela 1 pode ser observado o percentual da eficiência de floculação de cada material/polímero avaliado. O percentual de eficiência de floculação obteve melhores resultados para a semente de *Moringa Oleifera*, FeCl₃ associado ao CMC e quitosana, obtendo valores percentuais de até 100, 88,96 e 80,38%, respectivamente.

Tabela 1. Percentual da eficiência de floculação dos polímeros ± erro padrão.

	0,5 g L ⁻¹	1,0 g L ⁻¹	1,5 g L ⁻¹	2,0 g L ⁻¹	p	F
Semente de <i>M. oleifera</i>	3,56 ^c ±1,8	68,41 ^b ±9,61	100 ^a ±0	92,91 ^a ±0,56	<0,05	81,929
	2,5 ml L ⁻¹	5,0 ml L ⁻¹	7,5 ml L ⁻¹	10,0 ml L ⁻¹	p	F
Quitosana	15,21 ^b ±1,62	30,67 ^b ±1,12	80,38 ^a ±7,97	80,29 ^a ±2,16	<0,05	47,82

CMC	0,5 g L ⁻¹	1,0 g L ⁻¹	1,5 g L ⁻¹	2,0 g L ⁻¹	p	F
	0,52 ^{ns} ±0,52	0 ^{ns} ±0	0 ^{ns} ±0	2,46 ^{ns} ±2,46	1	0,7479
Sulfato de Alumínio	0,5 g L ⁻¹	0,75 g L ⁻¹	1,0 g L ⁻¹	1,25 g L ⁻¹	p	F
	3,83 ^{ns} ±0,96	4,25 ^{ns} ±1,27	3,61 ^{ns} ±2,01	3,83 ^{ns} ±2,04	100	0,2103
Cloreto Férrico	0,5 g L ⁻¹	0,75 g L ⁻¹	1,0 g L ⁻¹	1,25 g L ⁻¹	p	F
	21,19 ^{ns} ±4,78	20,38 ^{ns} ±3,56	17,35 ^{ns} ±0,99	14,45 ^{ns} ±2,47	100	0,6144
Cloreto Férrico + CMC	0,5 + 0,5 g L ⁻¹	0,75 + 1,0 g L ⁻¹	1,0 + 1,5 g L ⁻¹	1,25 + 2,0 g L ⁻¹	p	F
	83,04 ^{ns} ±2,97	84,46 ^{ns} ±2,08	87,81 ^{ns} ±1,58	88,96 ^{ns} ±2,73	9,0524	3,0765
Cloreto Férrico + Quitosana	0,5 g L ⁻¹ + 2,5 ml L ⁻¹	0,75 g L ⁻¹ + 2,5 ml L ⁻¹	1,0 g L ⁻¹ + 2,5 ml L ⁻¹	1,25 g L ⁻¹ + 2,5 ml L ⁻¹	p	F
	11,18 ^{ab} ±2,84	4,91 ^b ±2,80	10,85 ^{ab} ±0,11	11,46 ^a ±0,64	<0,05	4,1604

A quitosana é um polissacarídeo catiônico solúvel em água feito de quitina. As cargas opostas proporcionam uma atração eletrostática, que promove a adsorção, mas existe também a possibilidade de neutralização da carga reduzindo a estabilidade do colóide. Yunos et al. (2017) obtiveram 98% de eficiência de floculação de *Chlorella* sp. utilizando 30 mg L⁻¹ de quitosana diluída a HCl 1%. A semente da *M. oleifera* também vem sendo empregada como (bio)floculante, atingindo uma taxa de floculação de até 95% com o gênero *Chlorella* sp. (HAMID et al., 2014). A capacidade floculante da *M. oleifera* pode ser atribuída à interação entre as partículas carregadas negativamente presentes na água e as moléculas de proteína positivamente carregadas nos ingredientes ativos das sementes. Os compostos químicos utilizados não obtiveram valores percentuais de floculação satisfatórios. No entanto, a utilização do cloreto férrico foi satisfatório para a espécie de microalga *Scenedesmus* sp., obtendo 95% de recuperação utilizando 150 mg L⁻¹ do composto químico (SCHERER, 2016).

Na Tabela 2 pode ser observado os valores de pH de cada material/polímero avaliado. Apenas os ensaios com a semente de *M. Oleifera* e CMC não obtiveram mudança de pH com relação do controle.

Tabela 2. Potencial hidrogeniônico (pH) de cada tratamento após processo de floculação ± erro padrão.

	Controle	0,5 g L ⁻¹	1,0 g L ⁻¹	1,5 g L ⁻¹	2,0 g L ⁻¹	p	F
Semente de <i>M. oleifera</i>	6,64 ^a ±0,08	6,35 ^b ±0,40	6,10 ^{bc} ±0,04	5,92 ^{cd} ±0,04	5,71 ^d ±0,03	<0,05	44,4642
Quitosana	Controle	2,5 ml L ⁻¹	5,0 ml L ⁻¹	7,5 ml L ⁻¹	10,0 ml L ⁻¹	p	F
	5,90 ^a ±0,09	2,31 ^b ±0,01	2,18 ^b ±0,01	2,08 ^c ±0,01	2,02 ^c ±0,0a	<0,05	1525,50
CMC	Controle	0,5 g L ⁻¹	1,0 g L ⁻¹	1,5 g L ⁻¹	2,0 g L ⁻¹	p	F
	4,16 ^c ±0,08	4,15 ^c ±0,00	4,29 ^{bc} ±0,03	4,40 ^{ab} ±0,02	4,55 ^a ±0,08	<0,05	18,0186
Sulfato de Alumínio	Controle	0,5 g L ⁻¹	0,75 g L ⁻¹	1,0 g L ⁻¹	1,25 g L ⁻¹	p	F
	5,11 ^a ±0,03	4,24 ^{ab} ±0,63	3,34 ^b ±0,02	3,25 ^b ±0,09	3,12 ^b ±0,02	<0,05	8,8616
Cloreto Férrico	Controle	0,5 g L ⁻¹	0,75 g L ⁻¹	1,0 g L ⁻¹	1,25 g L ⁻¹	p	F
	6,80 ^a ±0,05	2,83 ^b ±0,12	2,58 ^{bc} ±0,08	2,54 ^{bc} ±0,02	2,48 ^c ±0,02	<0,05	743,4591
Cloreto Férrico + CMC	Controle	0,5 + 0,5 g L ⁻¹	0,75 + 1,0 g L ⁻¹	1,0 + 1,5 g L ⁻¹	1,25 + 2,0 g L ⁻¹	p	F
	6,46 ^a ±0,11	2,43 ^b ±0,02	2,31 ^{bc} ±0,01	2,23 ^{bc} ±0,01	2,19 ^c ±0,01	<0,05	1333,183
Cloreto Férrico + Quitosana	Controle	0,5 g L ⁻¹ + 2,5 ml L ⁻¹	0,75 g L ⁻¹ + 2,5 ml L ⁻¹	1,0 g L ⁻¹ + 2,5 ml L ⁻¹	1,25 g L ⁻¹ + 2,5 ml L ⁻¹	p	F
	6,46 ^a ±0,11	2,23 ^b ±0,02	2,04 ^{bc} ±0,01	1,92 ^c ±0,02	1,84 ^c ±0,01	<0,05	1468,441

No ensaio contendo quitosana pode-se observar uma redução nos valores de pH quando comparados ao controle (5,90). Isso se deve ao fato da influência do ácido acético, utilizado para diluir a quitosana (RASHID et al., 2013). Os compostos químicos também tiveram influência na diminuição do pH, chegando até 3,25 e 2,53, para o sulfato de alumínio e o cloreto férrico, respectivamente. Estes baixos valores podem ter influenciado a capacidade de floculação destes sais, visto que alguns estudos mostram maior capacidade de coagulação/floculação quando o pH do meio se encontra entre 7 e 8 (MATOS et al., 2007). Estudos de floculação utilizando diferentes espécies mostram que alguns fatores influenciam no sucesso da recuperação da biomassa algal, como por exemplo, o floculante utilizado, a espécie de microalga, o formato e o tamanho da célula, a carga superficial da célula algal, a força iônica do meio de cultivo e a concentração de células presentes no meio (CHATUNGNOEN, CHISTI, 2016).

Conclusões

Foi constatado um percentual de 100% de eficiência de floculação com a *M. oleifera*, mostrando ser um polímero com potencial floculante para recuperação da biomassa da microalga *C. sorokiniana*. Os outros polímeros que obtiveram sucesso de floculação foram a quitosana e o cloreto férrico associado ao CMC.

Porém, a semente de *M. oleifera*, além de ser um polímero completamente orgânico, não necessitou do ajuste de pH, sendo ideal para recuperação da biomassa da microalga *C. sorokiniana*.

Referências bibliográficas

- ÁLVAREZ-DÍAZ, P. D.; RUIZ, J.; ARBIB, Z.; BARRAGÁN, J.; GARRIDO-PÉREZ, M. C.; PERALES, J. A. (2017). Freshwater microalgae selection for simultaneous wastewater nutrient removal and lipid production. *Algal Res*, v. 24, p. 477-485.
- ANSILAGO, M.; OTTONELLI, F.; CARVALHO, E. M (2016). Cultivo da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* em escala de bancada utilizando meio contaminado com metais pesados. *Eng Sanit Amb*, v. 21, n. 3, p. 603 – 608.
- BARROS, A. L.; GONÇALVES, M. S.; SIMÕES, M.; PIRES, J. C. M (2015). Harvesting techniques applied to microalgae: a review. *Renew Sustain Energy Rev*, v. 41, p. 1489-1500.
- CARVALHO, E. M.; OTTONELLI, F.; ANSILAGO, M.; GODOY, H.C.; NAKAGAKI, J.M.; RAMIRES, I (2012). Growth kinetics of the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (*Chlorophyceae*) in natural water enriched with NPK fertilizer. *Biochem Biotec Report*, v.1, n.2, p.14-18.
- CHATSUNGNOEN, T.; CHISTI, Y. (2016). Harvesting microalgae by flocculation–sedimentation. *Algal Research*, v. 13, p. 271–283.
- CHEN, C.Y.; YE, K.L.; AISYAH, R.; LEE, D.J.; CHANG, J.S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresour Technol* v. 102, p. 71–81.
- HAMID, S. H. A.; LANANAN, F.; DIN, W. N. S.; LAM, S. S.; KHATOON, H.; ENDUT, A.; JUSOH, A. (2014). Harvesting microalgae, *Chlorella sp.* by bio-flocculation of *Moringa oleifera* seed derivatives from aquaculture wastewater phytoremediation. *Int Biodeter Biodegr*, v. 95, p. 270-275.
- LEE, S.Y.; SHOW, P.L.; LING, T.C.; CHANG, J. S.(2017). Single-step disruption and protein recovery from *Chlorella vulgaris* using ultrasonication and ionic liquid buffer aqueous solutions as extractive solvents. *Biochem Eng J*, v.124, p. 26–35.
- MATOS, A. T; CABANELLAS,C.F.G; CECON, P. R; BRASIL, M.S; MUDADO, C.S. (2007). EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE COAGULANTES E DO pH DA SOLUÇÃO. *Eng. Agríc., Jaboticabal* , p. 544-551.
- MATSUKAWA, R., HOTTA, M., MASUDA, Y., CHIHARA, M., & KARUBE, I. (2000). Antioxidants from carbon dioxide fixing *Chlorella sorokiniana*. *Journal of applied phycology*, v. 12, n. 3-5, p. 263-267.
- PAPAZI, A.; MAKRIDIS, P.; DIVANACH, P. (2016). Harvesting *Chlorella Minutissima* using cell coagulants. *J Appl Phycol*, v. 22, p. 349-355.
- RASHID, N.; REHMAN, S. U.; HAN, J.I. (2013). Rapid harvesting of freshwater microalgae using chitosan. *Process Biochem*, v. 48, n. 7, p. 1107–1110.
- RUSSEL, J. B. Química Geral. 2ª ed. v.1. São Paulo: Makron Books, 1994.
- SCHERER, M.D.; PERREIRA, M. C.; MARIANO, A. B.; VARGAS, J. V. C. Avaliação da Eficiência de Flocculação e Ambiental: A Recuperação da Biomassa de Microalgas Cultivadas em Biorreatores Compactados Industriais. *R gest sust ambient.*, Florianópolis, v. 5, n. 1, p. 92–118 , abr./set. 2016.
- SIPAUBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos. 2ª ed. São Carlos: Rima, 2003.
- TAWAN, C; YUSUF, C. (2016). Harvesting microalgae by flocculation–sedimentation. *Algal Research* , p.271-283.
- UMMALYMA, S. B.; GNANSOUNOU, E.; SUKUMARAN, R. K.; SINDHU, R.; PANDEY, A.; SAHOO, D. (2017). Bioflocculation: An alternative strategy for harvesting of microalgae– An overview. *Bioresource technology*, v. 242, p. 227-235.
- VAN DEN HENDE, S., VERVAEREN, H., DESMET, S., BOON, N., 2011. Bioflocculation of microalgae and bacteria combined with flue gas to improve sewage treatment. *New Biotechnol*. 29 (1), 23–31.
- VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E (2004). Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. *Química Nova*, v. 27, n. 1, P. 139-145.
- WARBURG, O. On the reduction of nitrite acid in green cells. *Natural Sciences*, v. 8, 1920.
- YUNOS FHM, NASIR NM, JUSOH HHW, KHATOON H, LAM SS AND JUSOH A. (2017). Harvesting of microalgae (*Chlorella sp.*) from aquaculture bioflocs using an environmental-friendly chitosan based bio-coagulant. *Int Biodeter Biodeg.*, v. 124, p. 243-249.