

Efeito de nanopartículas de carbono fluorescentes (Krill A32) no crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* Embrapa | LBA#39

*Daniela Flavia Machado Turati*¹, *Samuel Nunes Limberger*², *Lorena Costa Garcia Calsing*³, *Rogério Gomes Faria*⁴, *Marcelo Oliveira Rodrigues*⁵, *Luiz Fernando Roncaratti Júnior*⁶, *Rossano Gambetta*⁷, *Leticia Jungmann Cançado*⁸

Resumo

As microalgas são organismos fotossintetizantes de elevado interesse biotecnológico. Visando ao aumento da produção de sua biomassa e bioprodutos derivados, muitas estratégias são desenvolvidas e citadas na literatura. Uma abordagem promissora é o uso de nanopartículas de carbono fluorescentes. Neste trabalho, investigou-se o efeito de diversas concentrações do Cdot Krill A32 no crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* Embrapa | LBA#39 cultivada em microplacas de 96 poços. As concentrações avaliadas foram: 0, 10, 50, 100, 150, 300 e 600 ng/L; 10, 50, 100, 150, 300 e 600 µg/L; e 10, 50, 100, 150, 300 e 600 mg/L. A 50 ng/L o Cdot promoveu aumento do crescimento da microalga em 6%, sendo que as demais concentrações não promoveram alterações estatisticamente significativas ou acarretaram em diminuição do crescimento da microalga, provavelmente devido à indução de estresse oxidativo.

Palavras-chave: microalga, *Chlorella sorokiniana*, nanopartículas de carbono fluorescentes, curva de crescimento.

Introdução

Microalga é um termo genérico usado para se referir a um grupo diverso de microrganismos fotossintéticos que são os principais produtores da vida na Terra (Singh et al., 2015). São organismos ubíquos, encontrados em oceanos, águas doces, fontes termais, lagos salgados e na superfície de todos os tipos de solo (Tomaselli, 2004). Estes microrganismos são interessantes do ponto de vista biotecnológico por apresentarem estrutura relativamente simples, produzirem biomassa e grande variedade de metabólitos, fixarem gás carbônico durante seu crescimento e apresentarem maior produtividade por metro quadrado do que outras culturas, sem competir com terras destinadas à agricultura. Além disso, a água doce pode ser economizada no cultivo de microalgas, usando-se água de resíduo ou água salgada (Schenk et al, 2008). Em termos

¹ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Campus Rio Claro/SP, daniela.flavia@colaborador.embrapa.com

² Graduando em Química, Universidade de Brasília, samuel.limberger@colaborador.embrapa.br

³ Engenheira de Alimentos, doutora em Engenharia de Alimentos, analista da Embrapa Agroenergia, lorena.garcia@embrapa.br

⁴ Engenheiro químico, doutorando em Química Inorgânica, Universidade de Brasília, rogerio.faria@unb.br

⁵ Químico, doutor em Química, professor-adjunto da Universidade de Brasília, marcelo.rodrigues@nottingham.ac.uk

⁶ Físico, doutor em Química, professor-adjunto da Universidade de Brasília, lz@fis.unb.br

⁷ Engenheiro Químico, doutor em Engenharia Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, rossano.gambetta@embrapa.br

⁸ Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leticia.jungmann@embrapa.br

de aplicações biotecnológicas, a biomassa microalgal e seus derivados podem ser utilizados para diversos fins, dentre eles: produção de biocombustíveis, biofertilizantes, alimentação animal, suplementação humana, nutracêuticos, pigmentos naturais e cosméticos (Gupta et al., 2013).

No entanto, a produção de biomassa microalgal em grandes escalas ainda enfrenta alguns gargalos que precisam ser solucionados para garantir sua viabilidade econômica. Nesse sentido, pesquisas atuais com microalgas envolvem: a seleção ou bioengenharia de cepas altamente produtivas; o desenvolvimento de sistemas de cultivo de microalgas aprimorados; a redução do custo dos meios de cultivo; o aumento da produtividade de biomassa; e o desenvolvimento de novas tecnologias de colheita da biomassa produzida (Fernández et al., 2019). Com base nesse cenário, alguns estudos demonstram que o uso de nanopartículas fluorescentes pode resultar em aumento da eficiência no crescimento de microalgas, destacando-se como uma possibilidade promissora para atingir a viabilidade econômica desse tipo de cultura.

As nanopartículas de carbono, também conhecidas por pontos quânticos de carbono, CQD (do inglês, *carbon quantum dots*) ou Cdots, são pequenas estruturas esféricas com diâmetro variando entre 1 e 100 nm (Dias, 2015). Os Cdots emitem fluorescência quando excitados com determinados comprimentos de onda, característica que os torna interessantes para o estudo com microalgas, as quais utilizam energia fotoquímica para o processo de fotossíntese.

O presente trabalho avaliou o efeito dos Cdots Krill A32 no crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA#39 cultivada em microplacas de 96 poços. Partiu-se da hipótese de que as nanopartículas promoveriam aumento do crescimento da microalga, com base em dois principais mecanismos propostos na literatura: 1) os fótons de fluorescência emitidos pelas nanopartículas seriam usados na fotossíntese pelas microalgas, aumentando a eficiência desse processo metabólico; 2) o processo de degradação das nanopartículas de carbono forneceriam substrato para o crescimento, alterando o metabolismo para o foto-heterotrófico.

Material e Métodos

Preparo do pré-inóculo da microalga *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA#39: em condições estéreis, adicionou-se 15 mL de cultivo de microalga em 135 mL de meio BG11, em Erlenmeyer de 250 mL. O Erlenmeyer foi incubado em shaker a 25 °C, 110 rpm, 4000 lux, fotoperíodo 12:12h, durante 7 dias.

Uma solução de 1,2 g/L de Cdots foi preparada, pesando-se 120 mg de Cdots em pó e diluindo o conteúdo para um volume final de 100 mL com meio BG11, em balão volumétrico. Esta solução foi filtrada em filtro de 0,22 µm e autoclavada antes de ser adicionada ao cultivo com microalga.

A fim de se avaliar o efeito de diversas concentrações de Cdots no crescimento da microalga *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39, o cultivo foi realizado em microplacas de 96 poços. Para tal, adicionou-se em cada poço o pré-inóculo, a solução de Cdots e o meio BG11. As concentrações finais de Cdots foram: 0, 10, 50, 100, 150, 300 e 600 ng/L; 10, 50, 100, 150, 300 e 600 µg/L; e 10, 50, 100, 150, 300 e 600 mg/L; avolumados para 100 µL com meio BG11. Ademais, adicionou-se mais 100 µL de pré-inóculo, totalizando 200 µL por poço. Foram preparadas desta maneira 3 placas e cada concentração foi

testada em triplicata dentro de uma mesma placa, resultando em 9 réplicas de cada concentração avaliada. Também foram preparadas outras 3 placas com as mesmas concentrações finais de Cdots, mas sem a adição das microalgas, a fim de acompanhar a variação na absorbância a 750 nm das soluções de Cdots expostas à luz. Neste caso, os 200 µL foram completados com meio BG11, sem a adição de pré-inóculo. As placas foram incubadas a 25 °C, 4000 lux, fotoperíodo 12:12h, durante 21 dias. Periodicamente, o crescimento da microalga *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 foi acompanhado pela leitura em espectrofotômetro a 750 nm.

Resultados e Discussão

O crescimento da microalga *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 na presença de Cdots foi acompanhado durante 21 dias e as curvas de crescimento são apresentadas nas figuras 1, 2 e 3.

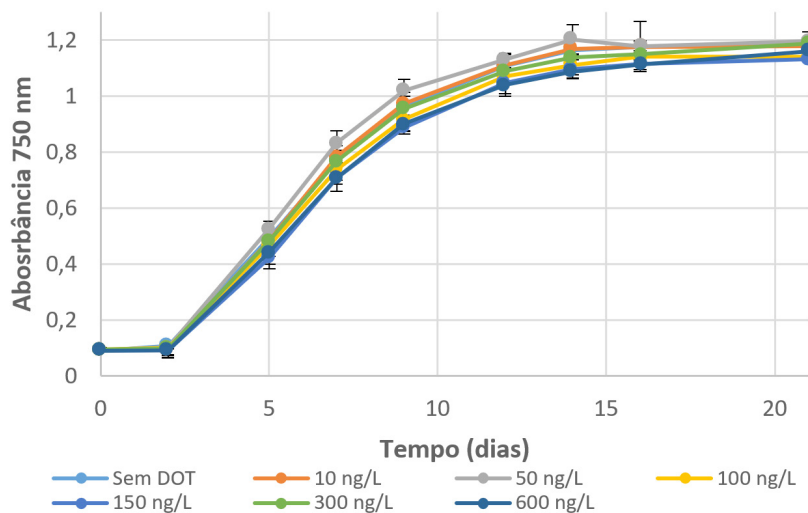


Figura 1. Curvas de crescimento da microalga *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 na presença de Cdots em concentrações finais de 0, 10, 50, 100, 150, 300 e 600 ng/L.

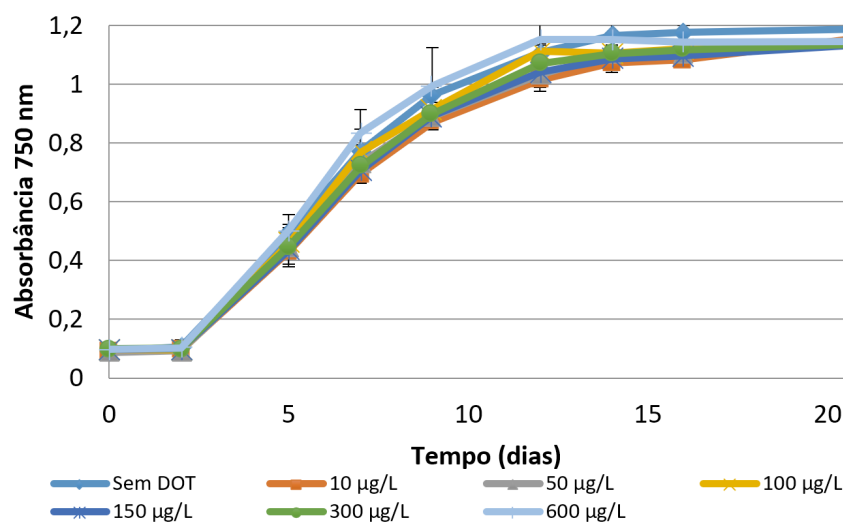


Figura 2. Curvas de crescimento da microalga *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 na presença de Cdots em concentrações finais de 0, 10, 50, 100, 150, 300 e 600 µg/L.

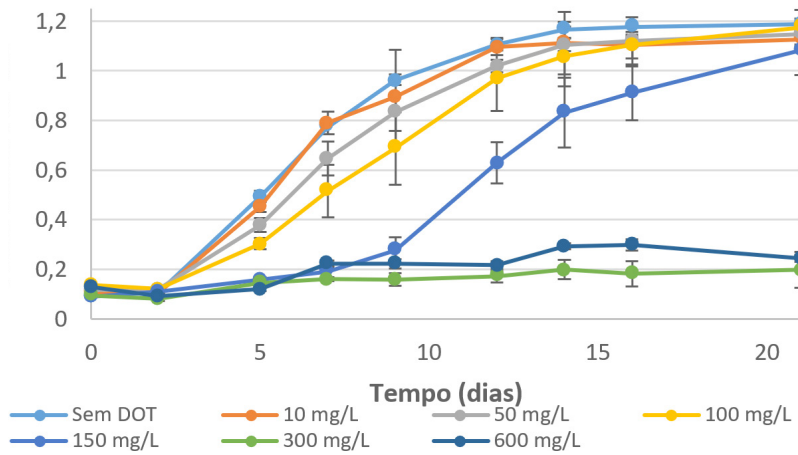


Figura 3. Curvas de crescimento da microalga *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 na presença de Cdots em concentrações finais de 0, 10, 50, 100, 150, 300 e 600 mg/L.

A partir da observação das Figuras 1 a 3 é possível verificar que o crescimento da microalga é muito semelhante com concentrações de Cdots nas ordens de ng/L e µg/L, com leve aumento observado para as concentrações de 50 ng/L e 600 µg/L. Já para a ordem de mg/L, observou-se diminuição do crescimento com o aumento da concentração de Cdot. Para verificar se as variações observadas são estatisticamente significativas, realizou-se uma ANOVA de um fator com nível de significância de 5% seguida de teste de Tukey, para o 9º dia de cultivo (final da fase exponencial de crescimento). Os resultados das análises estatísticas são apresentados nas Figuras 4, 5 e 6.

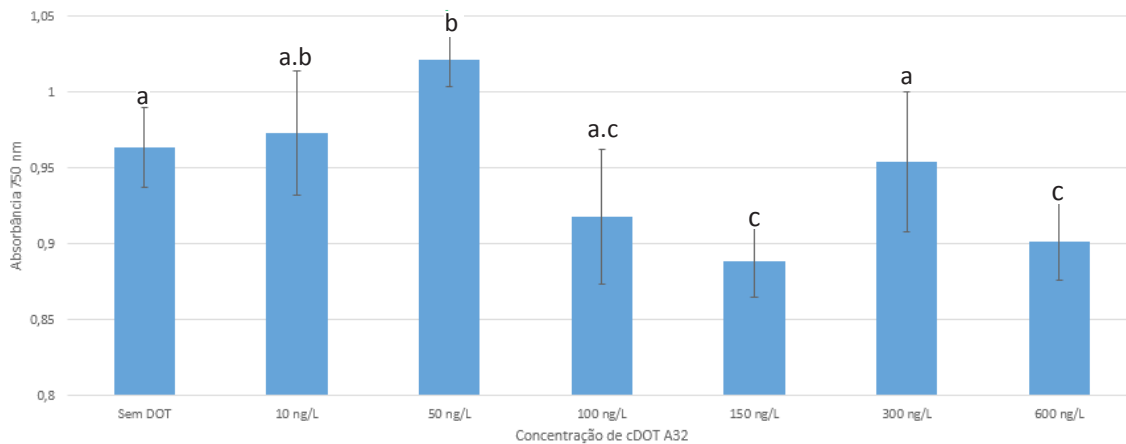


Figura 4. Crescimento da microalga *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 no 9º dia de cultivo, na presença de Cdots em concentrações finais de 0, 10, 50, 100, 150, 300 e 600 ng/L. Letras iguais não diferem estatisticamente, enquanto letras diferentes diferem com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

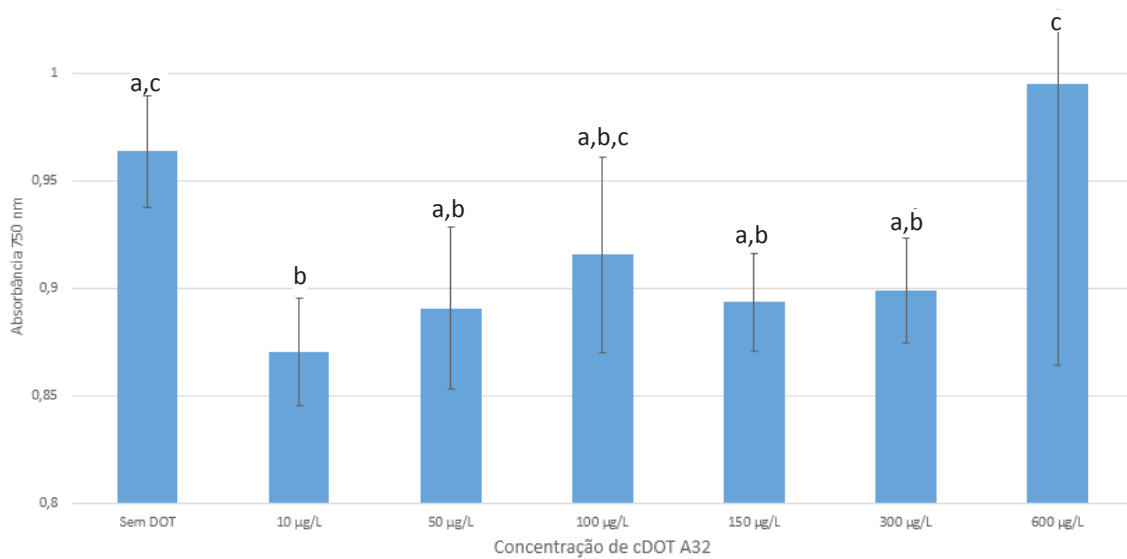


Figura 5. Crescimento da microalga *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 no 9º dia de cultivo, na presença de Cdots em concentrações finais de 0, 10, 50, 100, 150, 300 e 600 µg/L. Letras iguais não diferem estatisticamente, enquanto letras diferentes diferem com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

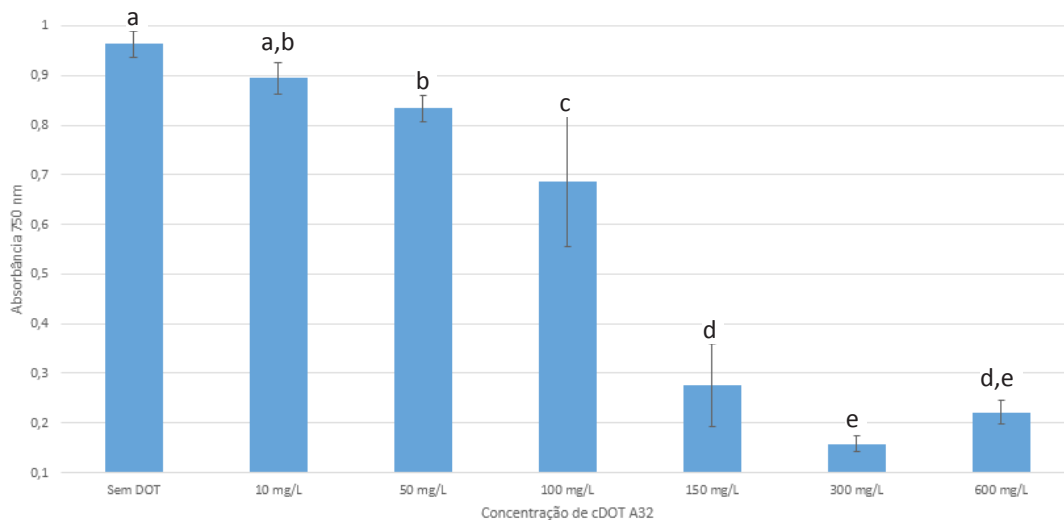


Figura 6. Crescimento da microalga *C. sorokiniana* Embrapa|LBA#39 no 9º dia de cultivo, na presença de Cdots em concentrações finais de 0, 10, 50, 100, 150, 300 e 600 mg/L. Letras iguais não diferem estatisticamente, enquanto letras diferentes diferem com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

É possível observar que apenas a concentração de 50 ng/L promoveu aumento estatisticamente significativo no crescimento da microalga, sendo este aumento da ordem de, aproximadamente, 6%. As demais concentrações não influenciaram no crescimento ou promoveram diminuição no crescimento da microalga, possivelmente pela indução de estresse oxidativo.

Considerações Finais

Os Cdots são uma maneira promissora de aumentar o crescimento de microalgas. No presente estudo, foram avaliados os efeitos de diversas concentrações do Cdot Krill A32 no crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* Embrapa|LBA#39. A concentração de 50 ng/L promoveu incremento de 6% no crescimento da microalga. Experimentos complementares em escalas maiores serão efetuados para validar este incremento e avaliar o mecanismo envolvido neste fenômeno.

Referências

BICUDO, C.E. de M., MENEZES, M. **Gêneros de Algas de Águas Continentais no Brasil** - Terceira Edição, 2017.

DIAS, J. H. **Síntese e caracterização de nanopartículas de carbono**. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015.

FERNÁNDEZ, F.G.A, J.M. FERNÁNDEZ SEVILLA, FRIMA, E. M. **Costs analysis of microalgae production**, Second Edi, Elsevier B.V., 2019. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64192-2.00021-4>.

GUPTA, V.; RATHA, S. K.; SOOD, A.; CHAUDHARY, V.; PRASANNA, R., New insights into the biodiversity and applications of cyano- bacteria (blue-green algae)—prospects and challenges. **Algal Research**. 2, 79–97, 2013. DOI: 10.1016/j.algal.2013.01.006.

TOMASELLI, L. The microalgal cell, in: A. Richmond (Ed.), **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**, Blackwell Publishing Ltd, 2004, pp. 3-19.

SINGH, P., S. K. GUPTA, A. GULDHE, I. RAWAT, F. BUX. Microalgae isolation and basic culturing techniques, in: S. Kim (Ed.), **Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances**, Academic Press, Elsevier, pp. 43-54, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00004-2>.

SCHENK, P. M., S.R. THOMAS-HALL, E. STEPHENS, U.C. MARX, J.H. MUSSGNUG, C. POSTEN, O. KRUSE, B. HANKAMER, Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production, **BioEnergy Res**. 1, 20–43, 2008. <https://doi.org/10.1007/s12155-008-9008-8>.