

Influência dos métodos de recuperação da biomassa na concentração das clorofilas *a* e *b* de *Chlorella* sp. cultivada em fotobiorreatores de 60 L desenvolvidos em escala laboratorial.

LEONARDO WERNER¹; DIEGO SERRASOL DO AMARAL²
ALEXIA IOLANDA GONÇALVES DA SILVA²; LETÍCIA MACHADO FARIAS²;
CLAUDIO MARTIN PEREIRA DE PEREIRA³

¹Universidade Federal de Pelotas – leonardower1@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – diegos.amaral@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas – alexiafalcao2003@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – lelefarias268@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – claudiochemistry@gmail

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, as microalgas têm atraído crescente interesse científico devido ao seu potencial biotecnológico como fonte sustentável de biomassa, rica em lipídios, carboidratos, proteínas, pigmentos e outros metabólitos de interesse industrial (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Dentre esses compostos, pigmentos como clorofila e carotenoides são amplamente utilizados em formulações de suplementos alimentares, corantes naturais, cosméticos e insumos farmacêuticos (VAZ et al., 2016; MENDES et al., 2024). Nesse contexto, espécies do gênero *Chlorella* apresentam rápido crescimento, capacidade de adaptação a diferentes ambientes, alta produtividade e teor elevado de clorofila, tornando-as modelos para estudos de otimização de cultivo e processamento da biomassa (SAFI et al., 2014).

A clorofila, além do valor comercial, é utilizada como parâmetro de produtividade e condição fisiológica das microalgas (MALAPASCUA et al., 2014). Sua estabilidade, entretanto, depende de fatores de cultivo e dos métodos de recuperação da biomassa (HOSIKIAN et al., 2010; DA SILVA FERREIRA; SANT'ANNA, 2016), exigindo técnicas eficazes que preservem as propriedades bioativas e sejam viáveis economicamente (RIZWAN et al., 2018).

Tendo em vista a comercialização desses compostos, o cultivo de microalgas em fotobiorreatores é uma alternativa eficiente de produção em condições controladas, possibilitando maior padronização dos parâmetros de temperatura, luminosidade e aeração (AHMAD et al., 2021). No entanto, a etapa de recuperação da biomassa ainda representa um desafio em termos de eficiência e custo, visto que a filtração, floculação, centrifugação, sedimentação e eletrocoagulação, apresentam vantagens e limitações, as quais impactam diretamente na viabilidade econômica da produção, portanto é necessário avaliar o impacto desses processos no produto final (MEHARIYA; VERMA, 2023).

Em razão disso, o objetivo deste trabalho foi cultivar *Chlorella* sp., em fotobiorreatores de 60 L, desenvolvidos em escala laboratorial, avaliando parâmetros físico-químicos do cultivo (pH, condutividade, absorbância, sólidos totais dissolvidos, salinidade e oxigênio dissolvido) para obtenção de biomassa. Posteriormente, comparar os níveis de clorofila *a* e *b* na biomassa obtida após a aplicação de processos de filtração, floculação e eletrocoagulação, com a finalidade de identificar a alternativa para a recuperação da biomassa microalgal que melhor preserva a integridade desse pigmento. Este estudo integra uma linha de pesquisa dedicada à biomassa algal e à análise de parâmetros relacionados ao seu cultivo e processamento (AMARAL et al., 2024).

2. METODOLOGIA

2.1 Cultivo e processamento da microalga

O cultivo da microalga *Chlorella* sp. foi realizado em meio de cultura Basal Bold Medium (BBM) utilizando um fotobiorreator cilíndrico anular com volume de 60 litros desenvolvido pelo grupo de pesquisa, submetido à aeração contínua com bombas de diafragma. As condições de cultivo incluíram temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo de 16:8 horas (claro:escuro) e irradiância de aproximadamente 100 $\mu\text{mol fôtons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, durante 30 dias de cultivo. A taxa de crescimento (u) foi avaliada pela equação:

$$u = ((\ln(\text{Abs final}) - (\ln(\text{Abs inicial}))) / \text{tempo de cultivo})$$

Ao final do período de cultivo, a biomassa foi processada por quatro métodos de recuperação: (1) filtração utilizando malha de 22 μm ; (2) floculação com 500 mg.L^{-1} de sulfato de alumínio (ZHU; LI; HILTUNEN, 2018), seguida de centrifugação a 3000 $\times g$ por 10 minutos; (3) eletrocoagulação empregando eletrodos de 6 cm (Fe-Fe) com corrente de 12V durante 2 horas; e (4) filtração com malha de 22 μm após floculação com 1 g/L de sulfato de alumínio (ZHU; LI; HILTUNEN, 2018). Após a recuperação, a biomassa foi lavada três vezes com água destilada e centrifugada a 8.000 $\times g$ para remover possíveis contaminantes e sais. Por fim, a biomassa foi seca em estufa a 35°C .

2.2 Extração e quantificação das clorofilas

A extração e determinação da concentração das clorofilas *a* e *b* foram realizadas através do método descrito por Jeffrey & Humphrey (JEFFREY; HUMPHREY, 1975). Para isso, 20 mg de cada biomassa foram ressuspensos em 5 mL de acetona 90% (v/v), seguido de agitação em vórtex por 3 minutos e posterior centrifugação por 3 minutos a 4000 rpm. Após a primeira extração, mais duas extrações com 2,5 mL de acetona 90% foram feitas utilizando o mesmo pellet. Ao final, todos os extratos foram combinados e o volume total foi ajustado para 10 mL com a mesma solução de acetona. As clorofilas foram quantificadas no extrato final por espectrofotometria UV-VIS a 647 nm, 664 nm, 750 nm e as concentrações de clorofila foram calculadas usando as seguintes equações (JOHAN et al., 2014):

$$Cla (\mu\text{g.mL}^{-1}) = 11,93 (A664-A750) - 1,93 (A647-A750)$$

$$\text{Clorofila a (mg.g}^{-1}) = (Cla \times v) / (p \times L)$$

$$Clb (\mu\text{g.mL}^{-1}) = 20,36 (A647-A750) - 5,50 (A664-A750)$$

$$\text{Clorofila b (mg.g}^{-1}) = (Clb \times v) / (p \times L)$$

onde:

Cla = concentração de clorofila *a* em $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Clb = concentração de clorofila *b* em $\mu\text{g.mL}^{-1}$

v = volume de acetona em mililitros

L = caminho da luz na cubeta em centímetros

p = peso da amostra

A664 = absorbância em 664 nm,

A647 = absorbância em 647 nm,

A750 = absorbância em 750 nm.

2.3 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no software *Graphpad Prism* 8 utilizando RM ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivo de *Chlorella* sp. no fotobiorreator apresentou crescimento considerável, com pH oscilando entre 7,26 e 10,02. A condutividade manteve-se entre 730 e 971 $\mu\text{S.cm}^{-1}$, já os sólidos totais dissolvidos variaram de 360 a 540 mg.L^{-1} . A produtividade de biomassa avaliada pela absorbância em 680nm iniciou em 0,200 e finalizou o cultivo em 1,938, representando uma taxa de crescimento (u) igual a 0,0688. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o método de recuperação da biomassa microalgal influencia significativamente ($p < 0,05$) o teor de clorofila na biomassa de *Chlorella* sp. Conforme apresentado na Tabela 1, todas as técnicas avaliadas diferiram estatisticamente entre si, indicando que a escolha do processo impacta diretamente a preservação dos pigmentos.

Tabela 1: Concentração de clorofila a, b e total na biomassa de *Chlorella* sp. após diferentes métodos de recuperação

Método	Clorofila a (mg.g^{-1})	Clorofila b (mg.g^{-1})	Clorofila total (mg.g^{-1})	Clorofila total % (m/m)
Filtração inicial ^a	$11,64 \pm 0,51$	$9,38 \pm 0,62$	$21,02 \pm 0,97$	2,10
Flocação ^b	$11,10 \pm 0,09$	$7,53 \pm 0,61$	$18,63 \pm 0,04$	1,86
Eletrocoagulação ^c	$3,26 \pm 0,01$	$2,34 \pm 0,04$	$5,60 \pm 0,43$	0,56
Filtração final ^d	$5,81 \pm 0,01$	$2,98 \pm 0,05$	$8,79 \pm 0,15$	0,88

Conforme os dados apresentados, a filtração inicial resultou no maior teor de clorofila total ($21,02 \pm 0,97 \text{ mg.g}^{-1}$). Este método, por ser puramente mecânico e não envolver a adição de químicos ou estresses eletroquímicos, minimiza a degradação de pigmentos, preservando a integridade celular e o conteúdo intracelular (DA SILVA FERREIRA; SANT'ANNA, 2016).

A flocação com sulfato de alumínio (500 mg.L^{-1}) promoveu uma redução moderada, porém estatisticamente significativa ($p < 0,05$), no conteúdo de clorofilas, resultando em um teor total de $18,63 \text{ mg.g}^{-1}$. Esta diminuição pode estar associada ao estresse oxidativo causado pelo alumínio, que pode comprometer a estrutura dos cloroplastos e induzir a degradação enzimática dos pigmentos. Tendo em vista que o aumento da concentração do coagulante para 1 g.L^{-1} , no tratamento de *Filtração final* (flocação seguida de filtração), a redução foi ainda mais expressiva, com teor de clorofila total de apenas $8,79 \text{ mg.g}^{-1}$ (AMERI et al., 2023).

Os tratamentos que utilizaram o método de eletrocoagulação apresentaram menores níveis de clorofila a e b. Isso condiz com a literatura, que atribui a degradação dos pigmentos a fatores como estresse oxidativo, alterações de pH e liberação de íons durante o processo (DA SILVA FERREIRA; SANT'ANNA, 2016). No entanto, os resultados obtidos neste estudo contrastam com os de Fayad et al. (2017), que observaram que a eletrocoagulação com eletrodos de (Al-Fe), aplicada por uma hora sob tensão variando entre 14,0 e 29,5 V, não afetou significativamente o conteúdo de pigmentos na biomassa de *Chlorella vulgaris*. Essa divergência entre os resultados, podem estar associada a condições experimentais como o tempo de exposição ao processo de eletrocoagulação, intensidade da corrente elétrica, oxidação por luz, variações de pH, salinidade do meio e também o tipo de eletrodo (FAYAD et al, 2017).

4. CONCLUSÕES

Este trabalho demonstrou que o processo de recuperação da biomassa microalgal exerce influência direta na preservação do conteúdo de clorofilas *a* e *b*. Entre os tratamentos avaliados, a filtração foi a técnica mais eficiente para a manutenção da integridade dos pigmentos, enquanto processos físico-químicos como a floculação e a eletrocoagulação, resultaram em reduções significativas no teor de clorofila. A partir desses resultados, é possível observar a importância de considerar a eficiência de recuperação em conjunto da preservação dos metabólitos de interesse industrial durante o processamento, otimizando assim, sua utilização sustentável em setores como suplementos alimentares, cosméticos, farmacêuticos e bioenergia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010. doi:10.1016/j.rser.2009.07.020
- VAZ, B. DA S. et al. Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 73–77, fev. 2016.
- MENDES, A. R. et al. Chemical Compounds, Bioactivities, and Applications of Chlorella vulgaris in Food, Feed and Medicine. **Applied Sciences**, v. 14, n. 23, p. 10810–10810, 22 nov. 2024.
- SAFI, C. et al. Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 265–278, jul. 2014.
- MALAPASCUA, J. et al. Photosynthesis monitoring to optimize growth of microalgal mass cultures: application of chlorophyll fluorescence techniques. **Aquatic Biology**, v. 22, p. 123–140, 20 nov. 2014.
- HOSIKIAN, A. et al. Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2010, p. 1–11, 2010.
- DA SILVA FERREIRA, V.; SANT'ANNA, C. Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 1, 1 dez. 2016.
- RIZWAN, M. et al. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, p. 394–404, set. 2018.
- AHMAD, I. et al. Evolution of Photobioreactors: A Review based on Microalgal Perspective. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 1142, n. 1, p. 012004, 1 abr. 2021.
- MEHARYA, S., & Verma, P.. **Algae Refinery: Up- and Downstream Processes**. 1st ed., 2023. CRC Press. Disponível em: <<https://doi.org/10.1201/9781003455950>>
- AMARAL, D. S. DO et al. Algal Biosensors for Detection of Potentially Toxic Pollutants and Validation by Advanced Methods: A Brief Review. **Chemosensors**, v. 12, n. 11, p. 235, 13 nov. 2024.
- ZHU, L.; LI, Z.; HILTUNEN, E. Microalgae Chlorella vulgaris biomass harvesting by natural flocculant: effects on biomass sedimentation, spent medium recycling and lipid extraction. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, 28 jun. 2018.
- JEFFREY, S. W.; HUMPHREY, G. F. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c1* and *c2* in higher plants, algae and natural phytoplankton. **Biochemie und Physiologie der Pflanzen**, v. 167, n. 2, p. 191–194, 1975.
- JOHAN, F. et al. Laboratory measurement: **Chlorophyll-a concentration measurement with acetone method using spectrophotometer**. Acessado em: 18 ago 2025 Disponível em: <<https://ieeexplore.ieee.org/document/7058737>>.
- AMERI, M. et al. Characterization of the aluminum-resistant microalgae by screening industrial wastewater microorganisms. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 22, n. 1, p. 178–195, 2023.
- FAYAD, N. et al. Harvesting of microalgae Chlorella vulgaris using electro-coagulation-flocculation in the batch mode. **Algal Research**, v. 25, p. 1–11, jul. 2017.