

Isolamento, cultivo e obtenção de extratos da microalga *Chlorella sorokiniana* para estudar suas propriedades bioativas de tanques de piscicultura

Cód/Nome	56 - Isolamento, cultivo e obtenção de extratos da microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> para estudar suas propriedades bioativas de tanques de piscicultura
Orientador	Emerson Machado de Carvalho
Campus	Jorge Amado
Área	Atividades acadêmicas (ensino/pesquisa/extensão) - ÊNFASE NA PESQUISA
Vagas	2
	emerson.carvalho@ufsb.edu.br

Resumo

Os compostos bioativos produzidos pelas microalgas podem variar de acordo com o meio em que é cultivada, apresentando uma diversa gama de atividades biológicas, como atividade anticancerígena, antioxidante e atividade antimicrobiana. Diante da relevância ecológica e da sua característica autotrófica, as microalgas vem sendo fonte de diversos estudos em aplicações ambientais. O objetivo do presente trabalho é isolar e cultivar a microalga *Chlorella sorokiniana* para produção de extratos. As técnicas empregadas para isolamento serão: diluição seriada e cultivo em ágar, manipulação química do meio de cultivo, coleta por microcapilares. Após o seu isolamento as microalgas serão cultivadas em meio sintético NPK no laboratório, em sistema estático não axênico, com aeração constante, temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ e fotoperíodo controlado (12 h luz / 12 h escuro). Com isso, pretende-se obter microalga isolada com potencial para utilização dos bioativos processos biotecnológicos.

Atividades dos bolsistas

Atividade 1 Isolamento das microalgas A microalga *Chlorella sorokiniana* será isolada de um mix de microalgas obtido da Universidade Federal da Grande Dourados. Para isolamento existem vários métodos e o seu emprego depende das condições do laboratório e do tipo de espécie que se quer isolar (flagelado, ciliado, diatomácea). Os métodos a serem utilizados serão: 1. O método de micromanipulação também será utilizado para o isolamento de células maiores, com o uso de microscópio invertido na tentativa de coletar uma única célula algal através de tubos microcapilares, que irão aspirar a célula e depois depositá-la em outra superfície de ágar ou em um meio líquido (meio sintético NPK). 2. Também será utilizado o método de diluição seriada, através de

diluições sucessivas, com o objetivo de terminar com uma única célula ou pelo menos células da mesma espécie num tubo. 3. Inoculação em placa de ágar será utilizada para células pequenas, menores de 10µm e consiste em inocular uma placa de Petri contendo o meio de cultivo + ágar e colocar na incubadora; quando estiver com colônias visíveis, deve-se resuspendê-las em meio. Aprendizagem Esperada: O bolsista deverá ser capaz de adquirir habilidades no manuseio de material microbiológico, bem como adquirir noções de biossegurança, microscopia e boas práticas em ambiente laboral controlado.

Atividade 2 Manutenção e identificação das microalgas Após o seu isolamento as microalgas serão cultivadas em meio sintético NPK (CARVALHO et al. 2012) e identificadas com o auxílio de chaves taxonômicas (BICUDO; MENEZES, 2005; SOUZA; MELO, 2011; SANT'ANNA et al., 2006). Para a preparação dos meios de cultivo, tanto do isolamento como do controle, será utilizado um meio sintético estoque preparado com a adição de 0,07 g de adubo químico N: P: K (20-5-20 g/L) em 2 L de água destilada, autoclavados a 121°C durante 20 minutos (SIPAUBA-TAVARES; ROCHA, 2003). As culturas serão mantidas em bancada com sistema de cultivo estático não axênico, aeração constante, temperatura de 25°C ± 1 e fotoperíodo controlado (12 h luz / 12 h escuro). Aprendizagem Esperada: O bolsista deverá ser capaz de adquirir habilidades na preparação de meios de cultivo, bem como utilização de balanças, autoclaves e preparação de ambientes controlados. Além disso, o bolsista deverá ser capaz de desenvolver estudos de cinética de crescimento das microalgas, utilizando-se de cálculos aritméticos e estatísticos para validação dos resultados.

Atividade 3 Obtenção da Biomassa da microalga Após os 40 dias de cultivo a biomassa de microalga será separada do sobrenadante pelo processo de floculação química com 0,75g de cloreto férrico (FeCl₃). A biomassa de microalga passará pelo processo de liofilização para preservação dos bioativos. Aprendizagem Esperada: O bolsista deverá ser capaz de avaliar os processos químicos envolvidos na floculação de biomassa algal, bem como estabelecer protocolos de floculação.

Atividade 4 Preparo dos extratos A biomassa liofilizada será utilizada para a preparação dos extratos, a partir da extração com diferentes solventes: etanol, metanol e água. O método de extração utilizado será a maceração por sete dias com agitação diária para o etanol e metanol, seguido de filtração e rotoevaporação, para retirada dos interferentes. E para a água será realizado o método por infusão, também seguida de filtração. Aprendizagem Esperada: O bolsista deverá ser capaz de utilizar métodos conhecidos na literatura para obtenção de extratos vegetais, de forma a reproduzi-los em ambiente laboratorial. O bolsista também deverá estabelecer critérios de boas práticas no manuseio de produtos químicos e equipamentos eletrônicos de laboratório.

Atividades semanais e carga horária

Atividades semanais a serem desenvolvidas pelo(a) bolsista • 4 horas em atividades laboratoriais, como isolamento de microalgas, preparação de meios de cultura, entre outras atividades descritas anteriormente. • 4 horas com leituras, discussões e participações de grupos de estudo envolvendo as aplicações biotecnológicas das microalgas.

Introdução

As microalgas são organismos unicelulares capazes de realizar fotossíntese, de forma mais rápida e eficiente que as plantas terrestres (CARVALHO et al., 2012). O estudo do seu cultivo torna-se importante para aumentar o conhecimento da biologia das diferentes espécies, favorecendo posterior produção em ambientes controlados (SIPAUBA-TAVARES et al., 2009). Estes organismos são utilizados para os mais diversos fins, pois possuem grande potencial biotecnológico e nos mais diversos campos (DERNER et al., 2006). Porém apesar da gama de aplicações, as microalgas ainda representam um grupo de microrganismos pouco estudado, sob o ponto de vista biotecnológico. O número exato de espécies de microalgas ainda é desconhecido, mas muitas já podem crescer em sistemas de cultivo. Alguns enfatizam que devido à enorme biodiversidade e aos avanços da engenharia genética, este grupo de micro-organismo representa uma das mais promissoras fontes de novos produtos e aplicações (PULZ; GROSS, 2004). Diante da relevância ecológica e da sua característica autotrófica, as microalgas também vem sendo fonte de diversos estudos em aplicações biotecnológicas. Como elas podem ser produzidas em meio de cultivo eficientes e de baixo custo, podemos associar este fator no tratamento de efluentes contaminados, na qual elas se mostram eficazes (CARVALHO et al., 2012; MOREIRA-SANTOS et al., 2004). Os compostos bioativos produzidos pelas microalgas, por exemplo, apresentam uma diversa gama de atividades biológicas, como atividade anticancerígena, antioxidante e atividade antimicrobiana (KATHARIOS et al., 2005, CHU, 2012). Estes compostos podem ser utilizados de forma isolada quando extraídos por determinados solventes e métodos de extração, dependendo de suas afinidades químicas (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007). Dessa forma, o presente estudo busca uma aplicação biotecnológica dos extratos obtidos da biomassa da microalga *Chlorella sorokiniana*. Neste contexto, torna-se relevante o investimento em pesquisa com o propósito isolamento – de forma a garantir rastreabilidade - e cultivo da microalgas – para garantir uma produção elevada a baixo custo - para inúmeros fins de estudar o potencial biológico dos seus bioativos.

Justificativa

Estudos da aplicação de microalgas em diferentes processos biotecnológicos vem se propagando um função da crescente necessidade por energias e alimentos alternativos. Além disso, já existem inúmeros estudos na literatura que demonstram potencialidades da microalgas para biorremediação, produção de biocombustíveis, fármacos utilizando seus bioativos, suplementação alimentar com sua biomassa, entre muitas outras aplicabilidades. Assim, o foco para este estudo é obter um protocolo de isolamento, cultivo e obtenção de biomassa da microalga *Chlorella sorokiniana* para produção do seu extrato. Através dos extratos será possível desenvolver vários outros estudos de forma a demonstrar a potencialidade da microalgas nas mais diversas aplicações biotecnológicas.

Objetivo Geral

Obtenção de extratos da microalga *Chlorella sorokiniana* para estudar os seus bioativos com potencialidades biotecnológicas

Objetivos Específicos

- Isolar a microalga *Chlorella sorokiniana* a partir de um mix de microalgas.
- Cultivar as microalgas isoladas em meio de cultivo NPK em escala de bancada.
- Obter biomassa da microalga *C. sorokiniana* através do seu cultivo em ambiente de laboratório.
- Obter os extratos da biomassa da microalga *C. sorokiniana* pelo processo aquoso, metanólico e etanólico.

Metodologia

Isolamento das microalgas A microalga *Chlorella sorokiniana* será isolada de um mix de microalgas obtido da Universidade Federal da Grande Dourados. Para isolamento existem vários métodos e o seu emprego depende das condições do laboratório e do tipo de espécie que se quer isolar (flagelado, ciliado, diatomácea). Os métodos a serem utilizados serão: 1. O método de micromanipulação também será utilizado para o isolamento de células maiores, com o uso de microscópio invertido na tentativa de coletar uma única célula algal através de tubos microcapilares, que irão aspirar a célula e depois depositá-la em outra superfície de ágar ou em um meio líquido (meio sintético NPK). 2. Também será utilizado o método de diluição seriada, através de diluições sucessivas, com o objetivo de terminar com uma única célula ou pelo menos células da mesma espécie num tubo. 3. Inoculação em placa de ágar será utilizada para células pequenas, menores de 10µm e consiste em inocular uma placa de Petri contendo o meio de cultivo + ágar e colocar na incubadora; quando estiver com colônias visíveis, deve-se resuspendê-las em meio. Manutenção e identificação das microalgas Após o seu isolamento as microalgas serão cultivadas em meio sintético NPK (CARVALHO et al. 2012) e identificadas com o auxílio de chaves taxonômicas (BICUDO; MENEZES, 2005; SOUZA; MELO, 2011; SANT'ANNA et al., 2006). Para a preparação dos meios de cultivo, tanto do isolamento como do controle, será utilizado um meio sintético estoque preparado com a adição de 0,07 g de adubo químico N: P: K (20-5-20 g/L) em 2 L de água destilada, autoclavados a 121°C durante 20 minutos (SIPAUBA-TAVARES; ROCHA, 2003). As culturas serão mantidas em bancada com sistema de cultivo estático não axênico, aeração constante, temperatura de 25°C ± 1 e fotoperíodo controlado (12 h luz / 12 h escuro). Obtenção da Biomassa da microalga Após os 40 dias de cultivo a biomassa de microalga será separa do sobrenadante pelo processo de floculação química com 0,75g de cloreto férrico (FeCl₃). A biomassa de microalga passará pelo processo de liofilização para preservação dos bioativos. Preparo dos extratos A biomassa liofilizada será utilizada para a preparação dos extratos, a partir da extração com diferentes solventes: etanol, metanol e água. O método de extração utilizado será a maceração por sete dias com agitação diária para o etanol e metanol, seguido de filtração e rotoevaporação, para

retirada dos interferentes. E para a água será realizado o método por infusão, também seguida de filtração.

Resultados esperados

Através deste estudo espera-se obter um protocolo de isolamento e cultivo da microalga *C. sorokiniana* em meio de cultivo de baixo custo (NPK), bem como os processos para obtenção de extratos para aplicação biotecnológica. Além disso, espera-se obter extrato suficiente para iniciar estudos sobre as propriedades dos bioativos das microalgas.

Referências

- BICUDO, C. E. de M.; MENEZES, M.; Gêneros de algas de águas continentais do Brasil. Chave para identificação e descrições. São Carlos: Editora Rima, 489 p. 2005.
- CARVALHO, E. M. de; OTTONELLI, F.; ANSILAGO, M.; GODOY, H. C.; NAKAGAKI, J. M.; RAMIRES, I. Growth kinetics of the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) in natural water enriched with NPK fertilizer. *Biochemistry And Biotechnology Reports*, v.01, n.02, p.14-18, jul-dez. 2012.
- CHU, W. L. Biotechnological applications of microalgae. *International e-Journal of Science, Medicine & Education*. v. 6 (Suppl 1). p. S24-S37, 2012
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. de; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, v.36, n.06, p.1959-1967, nov-dez. 2006.
- KATHARIOS, P.; PAPADAKIS, I.E.; PRAPAS, A. Mortality control of viral encephalopathy and retinopathy in 0+ grouper *Epinephelus marginatus* after prolonged bath in dense *Chlorella minutissima* culture. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*. v. 25, n.01, p. 28–31, 2005.
- MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae - Aplicação em Produtos Alimentícios, *Brazilian Journal Food Technology*, v. 10, n. 2, p. 96-103, 2007.
- MOREIRA-SANTOS, M.; SOARES, A. M. V. M.; RIBEIRO, R. An in situ bioassay for freshwater environments with the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.59, n.01, p. 164-173. 2004.
- PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology Biotechnology*. v.65, n.01, p.635-648. 2004.
- SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. de P.; AGUJARO, L. F.; CARVALHO, M. do C.; CARVALHO, L. R. de.; SOUZA, R. C. R. Manual Ilustrado para Identificação e contagem de Cianobactérias Planctônicas de águas continentais brasileiras. Rio de Janeiro: Interciência, 57 p. 2006.
- SIPAUBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos. 2 ed. São Carlos: RiMa. 2003.
- SIPAUBA-TAVARES, L. H.; IBARRA, L. C. C.; FIORESI, T. B. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (reisch) korsikov (chlorophyta) em laboratório utilizando meio chu12 e de macrófita com npk. *Boletim do Instituto de Pesca*. v.35, n.01, p. 111-118. 2009.
- SOUZA, K. F.; MELO, S.; Levantamento taxonômico de desmídias (Chlorophyta) do lago Novo (Amapá, Brasil): Gêneros *Staurastrum*, *Staurodesmus* e *Xanthidium*. *Acta Amazonica*. v.41, n.03, p.335-346, 2011.