

Impactos do *Carbon Dot Krill A32* na produtividade de biomassa da microalga *Chlorella sorokiniana* (LBA#39)

Samuel Nunes Limberger¹, Letícia Araújo Silva², Alessa Garcia Bembom³, Marcelo Oliveira Rodrigues⁴, Letícia Jungmann Cançado⁵

Resumo

Há vários esforços para tornar o cultivo de microalgas economicamente viável. Isso porque esses organismos são fontes de diversas biomoléculas de valor econômico, como lipídios, proteínas e enzimas. Entretanto, há desafios na produção que dificultam a lucratividade da atividade. Alguns estudos indicam que tratamentos com *carbon quantum dots* podem incrementar a produtividade da biomassa microalgal produzida. Foram feitos três experimentos com diferentes concentrações do *Carbon Dot Krill A32*, que foram aplicadas em cultivos com a microalga *Chlorella sorokiniana* (LBA#39) para investigar os efeitos na produção de biomassa. Um teste inicial foi feito em biorreatores de 500 mL testando-se 500 µg/L e 500 ng/L da nanopartícula. O segundo foi uma varredura em um volume de 1,5 L em que as concentrações investigadas foram 10 mg/L; 1 mg/L; 500 µg/L; 100 µg/L; 10 µg/L; 1 µg/L e 500 ng/L da nanopartícula. O terceiro foi uma validação em reatores de 2 L utilizando concentrações de 100 µg/L e 10 µg/L da nanopartícula. Os resultados da curva de crescimento dos cultivos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Para os resultados de biomassa seca, com o aumento do volume de cultivo, os incrementos foram progressivamente menores e estatisticamente iguais ao controle. Os resultados sugerem que nas condições estudadas não há incremento na produtividade da biomassa. São necessárias análises sobre a qualidade da biomassa para melhor interpretação do observado.

Termos para indexação: *carbon quantum dots*, microalgas, biomassa.

Introdução

A emergência climática está relacionada com o grande consumo de combustíveis fósseis, na medida em que o aumento das emissões de gases do efeito estufa, como o CO₂, acarreta o aumento da temperatura média global. Produtos com valor agregado ainda são muito dependentes de derivados de petróleo e fontes não renováveis. A procura por fontes alternativas e renováveis de insumos para a indústria é imperativa. Nesse aspecto, biomassa de microalgas pode ser uma interessante alternativa, já que as microalgas contêm uma grande variedade de substâncias de interesse com as mais diversas aplicações, como lipídeos, carboidratos, pigmentos, antioxidantes, enzimas e proteínas. Sendo assim, os microrganismos são considerados verdadeiras biorrefinarias, e podem prover moléculas complexas sem a necessidade de procedimentos sintéticos ineficientes e dispendiosos de energia e de reagentes (Enzing et al., 2014).

Entre os benefícios do uso de microalgas, pode-se dizer: 1) que as emissões de CO₂ podem ser parcialmente compensadas pela fotossíntese algal; 2) que não há competição com terra arável para

¹ Químico, mestrando em Química Inorgânica, Universidade de Brasília, samuel.n.limberger@gmail.com

² Graduanda em Química, Universidade de Brasília, leticiadearaujo07@gmail.com

³ Biotecnologista, mestre em Eletrofisiologia, Universidade de Brasília, alessa.bembom@gmail.com

⁴ Químico, doutor em Química, Universidade de Brasília, marcelo.rodrigues@nottingham.ac.uk

⁵ Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, Embrapa Agroenergia, leticia.jungmann@embrapa.br

alimentos; 3) que microalgas podem ser cultivadas em estruturas verticalizadas, ocupando área inferior a culturas vegetais; e 4) que água potável pode ser preservada ao utilizar na cultura água salgada ou residual (Schenk et al., 2008).

Apesar das vantagens, alguns gargalos precisam ser recuperados na cultura de microalgas para viabilidade comercial. Cultivo, colheita e pós-tratamento de microalgas demandam muitos recursos financeiros. A literatura indica que o preço da biomassa algal varia entre 5 €/kg e 1 €/kg, mas para a viabilidade comercial. Portanto, preços abaixo de 1 €/kg devem ser obtidos (Fernández et al., 2019). Para a diminuir o custo da biomassa, aumentar a capacidade de produção e diminuir o impacto do preço dos nutrientes utilizados nos meios de cultivo, há um número crescente de estudos que indicam que o uso de pontos quânticos de carbono, *carbon quantum dots*, podem melhorar a qualidade e a produtividade da biomassa de microalgas (Zhang et al., 2018). Esse material unidimensional, de baixo custo, é fluorescente e pode realizar fenômenos de superfície com sais ou membranas. A interação desse tipo de material e desses microrganismos ainda precisa de muita elucidação. Não há um consenso sobre se o modo de atuação das partículas é causado pelas propriedades óticas ou por reações bioquímicas. Ainda também não há descrição das melhores maneiras de aplicação e de quais nanopartículas escolher.

A nanopartícula testada, o *Carbon Dot Krill A32*, foi desenvolvida em parceria com a Universidade de Brasília, a empresa Krilltech e a Embrapa. Essa tecnologia demonstrou resultados positivos em plantas, os ensaios atestaram aumento de eficiência na fotossíntese em cerca de 60%, aumento na eficiência do uso de água em 50% e aumento da massa radicular em 50% (Rodrigues et al., 2021). Para contribuir no entendimento da viabilidade de uso dessas partículas no cultivo de microalgas, no presente trabalho foram avaliados diferentes tratamentos com o *Carbon Dot Krill A32* em diferentes dosagens em uma microalga (*Chlorella sorokiniana* LBA#39) e foram avaliados os impactos na produtividade de biomassa.

Materiais e métodos

O preparo do pré-inóculo da microalga *C. sorokiniana* Embrapa (LBA#39) foi feito em condições estéreis, uma colônia isolada da microalga foi adicionada a um reator de 2 L com meio BG-11, que cresceu durante 14 dias com um fotoperíodo de 12 horas/12 horas e aeração de ar em um fluxo de 4 L/min antes de ser adicionada aos experimentos. O *Carbon Dot Krill A32* concentrado em solução foi fornecido pelo Laboratório de Inorgânica e Materiais da Universidade de Brasília em conjunto com a Empresa Krilltech. Foi feita uma solução diluindo-se 100 vezes as nanopartículas em água, que foi adicionada ao cultivo de acordo com a concentração desejada.

Para o experimento de teste inicial, aproximadamente 250 mL do inóculo da microalga LBA#39 em 4,25 L de meio BG-11 foram distribuídos para nove reatores de 500 mL, resultando em um volume de 500 mL por reator. O tratamento de cada concentração foi realizado em triplicata e foi feito um controle em triplicata. Foram escolhidas para os cultivos as concentrações de *carbon dots* 500 µg/L e 500 ng/L. Os reatores foram deixados sobre a aeração de 2 L/min de ar, sob um fotoperíodo de 12 horas/12 horas. O cultivo durou 21 dias.

Para o experimento de varredura de concentrações, foram adicionados aproximadamente 2 L de inóculo da microalga LBA#39 em 34 L de meio BG-11, que foram depois distribuídos em 24 reatores, resultando em um volume de 1,5 L por reator. O tratamento de cada concentração foi realizado em triplicata e foi feito um controle em triplicata. Foram escolhidas para os cultivos as seguintes concentrações de *carbon dots*: 10 mg/L; 1 mg/L; 500 µg/L; 100 µg/L; 10 µg/L; 1 µg/L e 500 ng/L. Os reatores foram deixados sobre a aeração de 4 L/min de ar, sob um fotoperíodo de 12 horas/12 horas. O cultivo durou 21 dias.

Para o experimento de validação, foram adicionados aproximadamente 500 mL de inóculo da microalga LBA#39 em 15,5 L de meio BG-11, que foram depois distribuídos em 16 reatores, resultando em um volume de 2 L por reator. Todos os testes, assim como o controle, foram conduzidos em quadruplicata. Foram escolhidas para os cultivos as concentrações de *carbon dots* 100 µg/L e 10 µg/L. Os reatores foram deixados sobre a aeração de 4 L/min de ar, sob um fotoperíodo de 12 horas/12 horas. O cultivo durou 21 dias.

Periodicamente, durante os experimentos, o crescimento da microalga foi acompanhado pela leitura de absorbância em espectrofotômetro a 750 nm por meio da amostragem de 200 µL de cada cultivo. Ao final de cada cultivo, a colheita foi realizada por centrifugação a 9.000 g por 5 minutos, seguida de liofilização para obtenção da biomassa seca, que foi pesada para obter os dados de produtividade.

Resultados e discussão

O crescimento da microalga nas condições estudadas pode ser visualizado nas curvas de crescimento retratadas na Figura 1.

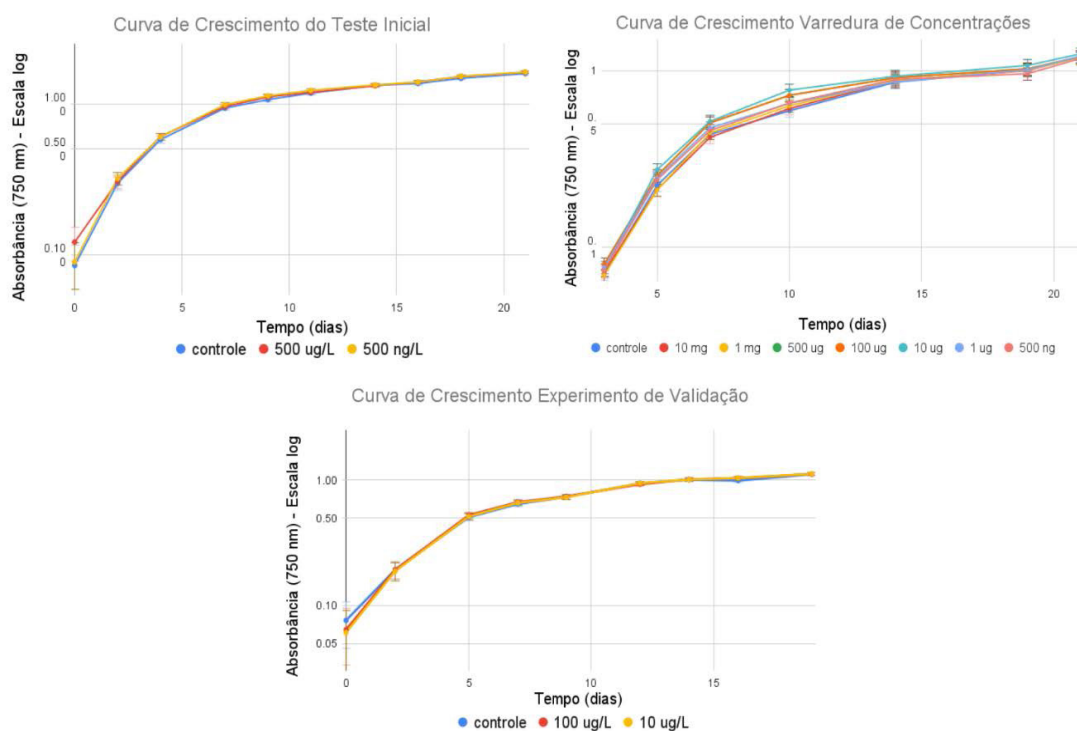


Figura 1. Curvas de crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* (LBA#39) com tratamento de *carbon dots* em diferentes concentrações nos diferentes experimentos.

Uma análise da Figura 1 indica que, independentemente do experimento, as absorbâncias obtidas são muito semelhantes, sendo quase impossível discernir uma curva de crescimento da outra. De fato, a Análise de Variância (ANOVA) com significância de 0,05 realizada entre as absorbâncias em qualquer um dos experimentos não mostra diferença estatisticamente significativa entre as condições estudadas em qualquer um dos experimentos. Isso sugere que os tratamentos não impactaram o crescimento do cultivo.

A produção da biomassa foi avaliada com base no peso seco de biomassa. Os dados de peso seco estão na Tabela 1, na Tabela 2 e na Tabela 3.

Tabela 1. Massas de peso seco de biomassa obtida no experimento de teste inicial (* indica tratamento estatisticamente distinto do controle).

	Controle	500 µg/L*	500 ng/L*
Média (g)	0,6275	0,7352*	0,7333*
Desvio Padrão (g)	0,0399	0,0209*	0,0475*

Tabela 2. Massas de peso seco de biomassa obtida no experimento de varredura de concentrações.

	Controle	10 mg/L	1 mg/L	500 µg/L	100 µg/L	10 µg/L	1 µg/L	500 ng/L
Média (g)	1,1458	1,1938	1,1505	1,2057	1,3182	1,3068	1,1700	1,1529
Desvio padrão (g)	0,0104	0,0762	0,0873	0,1339	0,0521	0,0567	0,0880	0,1568

Tabela 3. Massas de peso seco de biomassa obtida no experimento de validação.

	Controle	100 µg/L	10 µg/L
Média (g)	1,5051	1,5664	1,5638
Desvio padrão (g)	0,1048	0,0196	0,0840

No experimento de teste inicial, a ANOVA de uma via indicou que houve diferença estatisticamente significativa entre as médias [$F(2,6) = 7,973$; $p = 0,02$]. O teste post-hoc de Diferença Significativa das Médias de Tukey com significância de 0,05 indica que o controle é estatisticamente distinto do grupo que contém o tratamento de 500 µg/L e de 500 ng/L nos biorreatores de 500 mL. Esses resultados indicaram um incremento de biomassa nos tratamentos de aproximadamente 17%.

A partir dos dados promissores do primeiro experimento, foi feito o experimento de varredura de concentrações em um volume maior: 1,5 L. O teste de homogeneidade das variâncias indicou que não seria possível executar a ANOVA de uma via [$p = 0,03 < 0,05$]. Assim, foi realizada uma ANOVA de uma via com correção de Welch, que indicou que as médias são estatisticamente distintas [$F(7, 6,202) = 4,712$; $p = 0,037 < 0,05$]. Apesar disso, o teste post-hoc de Games-Howell com significância de 0,05 não conseguiu separar grupos estatisticamente distintos. Ou seja, a expectativa de que nas concentrações de 100 µg/L e 10 µg/L houvesse ocorrido cerca de 15% de incremento não se mostrou estatisticamente significativa.

Para confirmar esse resultado, um terceiro experimento de validação foi realizado, com mais replicatas e em volume maior ainda (2 L). O teste de homogeneidade das variâncias indicou que não seria possível executar a ANOVA de uma via [$p = 0,006 < 0,05$]. Assim, foi realizada uma ANOVA de uma via com correção de Welch, que indicou que as médias não são estatisticamente distintas [$F(2, 4,332) = 0,572$; $p = 0,602 > 0,05$]. Ou seja, apesar de os dados obtidos mostrarem aparente incremento na quantidade final de biomassa seca de aproximadamente 4%, em relação ao controle, a ANOVA mostrou que essa diferença não é estatisticamente significativa.

Conclusão

Os diferentes experimentos sugerem que o *Carbon Dot Krill A32* não impacta a produtividade de biomassa da microalga *Chlorella sorokiniana* (LBA#39) nas condições realizadas. O incremento no rendimento final de biomassa seca obtido no experimento inicial não foi confirmado nos experimentos de varredura de concentrações e de validação, o que demonstra a baixa reprodutibilidade

do incremento de biomassa com o tratamento do *Carbon Dot Krill A32* nos cultivos da microalga *C. sorokiniana*. Uma possível justificativa para esse fato foi o uso de volumes maiores de cultivo. Isso foi feito para diminuir os erros experimentais de pipetagem e de amostragem, que são mais representativos em volumes menores.

Se por um lado não houve incremento no rendimento final de biomassa nos experimentos realizados em volumes maiores, a quantidade de biomassa final obtida nessas condições permitirá a realização de ensaios de caracterização bioquímica dessas biomassas. Tratamentos com *carbon dots* podem também resultar em alteração na qualidade da biomassa por desempenharem um efeito bioquímico capaz de modular vias metabólicas distintas (Zhang et al., 2018). As próximas etapas do trabalho consistirão na avaliação dos teores de proteína, lipídios, carboidratos e carotenoides da microalga cultivada com Krill A32, bem como dos perfis lipídico, de carotenoides e de fitormônios. Somente após a conclusão dessas avaliações será possível determinar se a nanopartícula de carbono avaliada teve algum efeito sobre a qualidade das biomassas obtida nos cultivos, bem como a recomendação de avaliação dessas nanopartículas em processos de escalonamento do cultivo.

Referências bibliográficas

ENZING, C.; PLOEG, M.; BARBOSA, M.; SIJTSMA, L. **Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe**. Luxemburgo: Publications Office of the European Union, 2014.

FERNÁNDEZ, F. G. A.; SEVILLA, J. M. F.; GRIMA, E. M. Costs analysis of microalgae production. In: PANDEY, A.; CHANG, J.-S.; SOCCOL, C. R.; LEE, D.-J.; CHISTI, Y. **Biofuels from Algae**. Almería, Espanha: Elsevier, 2019. p. 551-566.

RODRIGUES, M. O.; FARIA, R. G.; SILVA, J.; SILVA, A. O.; BUSATO, G. B.; SOUZA, M. H.; RODRIGUES, C. V. S.; LIMA, C. E. P.; GUEDES, I. M. R.; BRAGA, M. B.; FONTENELLE, M. R. **Potencializador de fotossíntese baseados em nanopartículas híbridas de carbono, seu processo de obtenção e seu uso como nanobioestimulantes e nanofertilizantes em cultivos agrícolas**. Int. C01B 32/15. BR 102020002172-9 A2. 26 January 2021.

SCHENK, P. M.; THOMAS-HALL, S. R.; STEPHENS, E.; MARX, U. C.; MUSSGNUM, J. H.; POSTEN, C.; KRUSE, O.; HANKAMER, G. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production. **BioEnergy Research**, v. 1, n. 1, p. 20-43, 2008.

ZHANG, M.; WANG, H.; SONG, Y.; HUANG, H.; SHAO, M.; LIU, Y.; LI, H.; KANG, Z. Pristine carbon dots boost the growth of *Chlorella vulgaris* by enhancing photosynthesis. **ACS Applied Bio Materials**, v. 1, n. 3, p. 894-902, 2018.