

## **Extração de polissacarídeos sulfatados da microalga *Chlorella vulgaris* produzida em efluente gerado pela piscicultura**

### **Extraction of sulfated polysaccharide from microalgae *Chlorella vulgaris* produced in effluent generated by pisciculture**

DOI:10.34117/bjdv7n11-067

Recebimento dos originais: 12/10/2021

Aceitação para publicação: 05/11/2021

#### **Liange Reck**

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Estadual do Ceará  
Pesquisadora na empresa Biotrade Biotecnologia Ambiental. RST 287, KM 100, 1502  
Linha Santa Cruz, Santa Cruz do Sul, RS. CEP: 96822-700  
E-mail: liareck@hotmail.com

#### **Francisco Regivânio Nascimento Andrade**

Mestre em Biotecnologia em Recursos Naturais pela Universidade Federal do Ceará  
Doutorando em Biotecnologia em Recursos Naturais pela Universidade Federal do Ceará. Av. Mister Hull, s/n. Campus do Pici. BioMar-Lab – Departamento de Engenharia de Pesca, Fortaleza, CE. CEP: 60440-970  
E-mail: regivanio-nascimento@hotmail.com

#### **Hudson Damasceno Maia**

Mestre em Engenharia de Pesca pela Universidade Federal do Ceará  
Doutorando em Engenharia de Pesca pela Universidade Federal do Ceará  
Rua Júlio Ibiapina, 64, Cedecam. Meireles, Fortaleza, CE. CEP: 60170-220  
E-mail: hudsondmaia@gmail.com

#### **Danilo Cavalcante da Silva**

Acadêmico em Engenharia de Pesca pela Universidade Federal do Ceará.  
Av Mister Hull, s/n, Campus do Pici. Ceibiaqua, Fortaleza, CE. CEP: 60440-970.  
E-mail: danilocpesca@gmail.com

#### **Ana Luzia Assunção Cláudio de Araújo**

Mestre em Engenharia de Pesca pela Universidade Federal do Ceará  
Professora Substituta no Instituto Federal do Acre. Estrada da APADEQ, 1192, Cruzeiro do Sul - AC. CEP: 69980-000  
E-mail: analuzia\_aca@hotmail.com

#### **Katiany do Vale Abreu**

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Estadual do Ceará.  
Professora de Química na rede Estadual de Ensino do Ceará - SEDUC-CE. Av. General Afonso Albuquerque Lima, s/n, Cambeba. Fortaleza, CE. CEP: 60.822-325  
E-mail: katianyabreu@yahoo.com.br

#### **Jéssica Leal Batista**

Graduada em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pela Universidade Estadual do Rio Grande do Sul

Engenheira de bioprocessos e biotecnologia na empresa Biotrade Biotecnologia Ambiental. RST 287, KM 100, 1502. Linha Santa Cruz, Santa Cruz do Sul, RS. CEP: 96822-700  
E-mail: jessica.batista013@gmail.com

**Kelma Maria dos Santos Pires Cavalcante**

Doutora em Engenharia de Pesca pela Universidade Federal do Ceará  
Professora Adjunta na Universidade Federal do Ceará. Av. Mister Hull, s/n, Campus do Pici. Cebiaqua, Fortaleza, CE. CEP: 60440-970  
E-mail: kelmapires@gmail.com

**RESUMO**

Polissacarídeos sulfatados (PS) são polímeros complexos que têm despertado interesse na área biotecnológica. Objetivou-se extrair, fracionar e purificar os polissacarídeos sulfatados totais (PST) da microalga *Chlorella vulgaris* produzida a partir da biorremediação de efluente gerado pelo cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). A extração enzimática foi através de cisteína 5mM, em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, contendo 5 mM de EDTA. Após isso, os PS foram precipitados utilizando volumes crescentes de álcool e, posteriormente, fracionados em cromatografia de troca iônica (DEAE-Sepharose) usando diferentes concentrações de NaCl. No fracionamento, foram obtidas 3 frações polissacarídicas majoritárias com atividade metacromática (0,9, 1,2 e 1,6 M). A biomassa de *C. vulgaris* produzida em efluente gerado pela piscicultura, possui polissacarídeos sulfatados que podem ser usados na indústria.

**Palavras-chave:** Carboidratos, Fração polissacarídica, Biorremediação, *Chlorophyta*.

**ABSTRACT**

Sulphated polysaccharides (SP) are complex polymers that have aroused interest in the biotechnological area. The objective was to extract, fractionate and purify the total sulfated polysaccharides (PST) of the microalgae *Chlorella vulgaris* produced from the bioremediation of effluent generated by culture of tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). The enzymatic extraction was done through 5mM cysteine, in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0, containing 5 mM EDTA. After that, the SP was precipitated using increasing volumes of alcohol and, subsequently, fractionated in ion-exchange chromatography (DEAE-Sepharose) using different concentrations of NaCl. In fractionation, 3 major polysaccharide fractions with metachromatic activity (0.9, 1.2, and 1.6 M) were obtained. The biomass of *C. vulgaris* produced in effluent generated by pisciculture has sulfated polysaccharides that can be used in industry.

**Keywords:** Carbohydrates, *Polysaccharides fraction*, Bioremediation, *Chlorophyta*.

**1 INTRODUÇÃO**

Os polímeros de carboidratos sulfatados, também chamado de polissacarídeos sulfatados (PS), são moléculas carregadas negativamente por apresentar grupos hidroxilas substituídas por radicais sulfatos. Esses compostos são encontrados em bactérias, animais, plantas, macroalgas e microalgas (CÁSSARO; DIETRICH, 1977; AQUINO et al., 2005; RAPOSO et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2015; dos SANTOS et al., 2019)

e possuem grande interesse na indústria alimentícia, farmacêutica e biomédica, tendo em vista as suas propriedades espessantes, estabilizantes, emulsificantes (PRAJAPATI et al., 2014) e atividades biológicas, incluindo anticoagulante, antiviral, imunestimulante, antioxidante e antitumoral (RAPOSO et al., 2015).

A literatura reporta muitos estudos quanto ao potencial de PS encontrados nas macroalgas, principalmente na área médica (AMORIM et al., 2012; SHI et al., 2013; KOLSI et al., 2016; WU et al., 2016), entretanto a extração das mesmas pode gerar impactos na vida marinha e causar uma diminuição do recurso em seu banco natural (SOUZA, 2011).

Por outro lado, as microalgas apresentam vantagem devido a facilidade de cultivar e a colheita não depender do clima ou da estação. Logo, têm sido alvo de estudos para extração de PS como verificado nas espécies *Chorella stigmatophora* (GUZMAN et al., 2003), *Porphyridium* sp (GERESH; ARAD, 1991), *Tetracelmis gracilis* e *Dunaliella* sp. (ARAÚJO, 2009), *Arthospira platensis* (RADONIC et al., 2010), *Navicula* sp. (FIMBRES-OLIVARRIA et al., 2018), *Dixoniella grisea* e *Porphyridium aeruginosum* (LIBERMAN et al., 2020).

A aquicultura é uma atividade em expansão e apesar de gerar benefícios econômicos, é potencial poluidor devido produzir efluentes ricos em nutrientes, principalmente, compostos nitrogenados e fosfatados (AHMED; THOMPSON, 2019). Entretanto, estes efluentes são ideais para o cultivo de microalgas, que são capazes de utilizá-los em sua nutrição e crescimento através de seus processos fisiológicos (LOUREÇO, 2006).

O presente trabalho teve como objetivo extrair, fracionar e purificar os PS da biomassa seca da microalga *C. vulgaris* produzidas a partir da biorremediação de efluente piscícola de *O. niloticus* em sistema aberto e cultivo semicontínuo.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 CULTIVO E OBTENÇÃO DA BIOMASSA

A cepa de *C. vulgaris* foi cultivada em meio de cultura Guillard f/2, segundo Lourenço (2006). Em condições laboratoriais foi adaptada ao meio orgânico em biorreatores (1 L → 2 L → 5 L → 14 L → 28 L e 56 L). Em seguida, passou para um cultivo *outdoor* em tanques de 1.000 L (em triplicata, Figura 1), utilizando volumes intermediários (250 → 500 L), onde neste sistema de produção foi utilizado efluente gerado pelo cultivo de *O. niloticus*, ou seja, a biomassa produzida é oriunda de processo

de biorremediação. A biomassa foi separada do meio de cultivo utilizando uma tela de nylon, e em seguida, seca em estufa com circulação de ar.

Figura 1 - Cultivo de *C. vulgaris* em efluente de *O. niloticus* em biorreator e sistema controlado (A) e sistema aberto e cultivo semicontínuos (B).



## 2.2 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS

A extração dos PST foi realizada conforme a metodologia descrita por Farias et al. (2000) com algumas modificações, onde 2 g de biomassa seca que foram hidratadas em tampão acetato de sódio 0,1 M + 5 mM de cisteína + 5 mM de EDTA, pH 5,0 e, posteriormente, incubadas com papaína bruta (30 mg/mL) em banho-maria a 60 °C por 24 h. Após a digestão enzimática a mistura foi filtrada, centrifugada (756 x g; 5 min) e adicionados ao sobrenadante volumes crescentes de álcool etílico absoluto (2:1 v/v) permanecendo em repouso para a precipitação dos PST, por um período de 24h a 4°C. Logo após a precipitação, a mistura foi centrifugada e as amostras foram, congeladas, liofilizadas e quantificadas.

Os PST foram fracionados em coluna de troca iônica DEAE-Sephaore acoplada a um coletor de frações. A coluna foi equilibrada com o tampão de extração, aplicado uma solução de PST (1 mg.mL<sup>-1</sup>) e eluída com soluções contendo concentrações crescentes de NaCl (0,30; 0,60; 0,90; 1,20; 1,50; 1,80; e 2,1 M). O fluxo da coluna foi ajustado em 1 mL.min<sup>-1</sup> e coletadas frações de 1 mL. A presença dos PS nas frações foi evidenciada

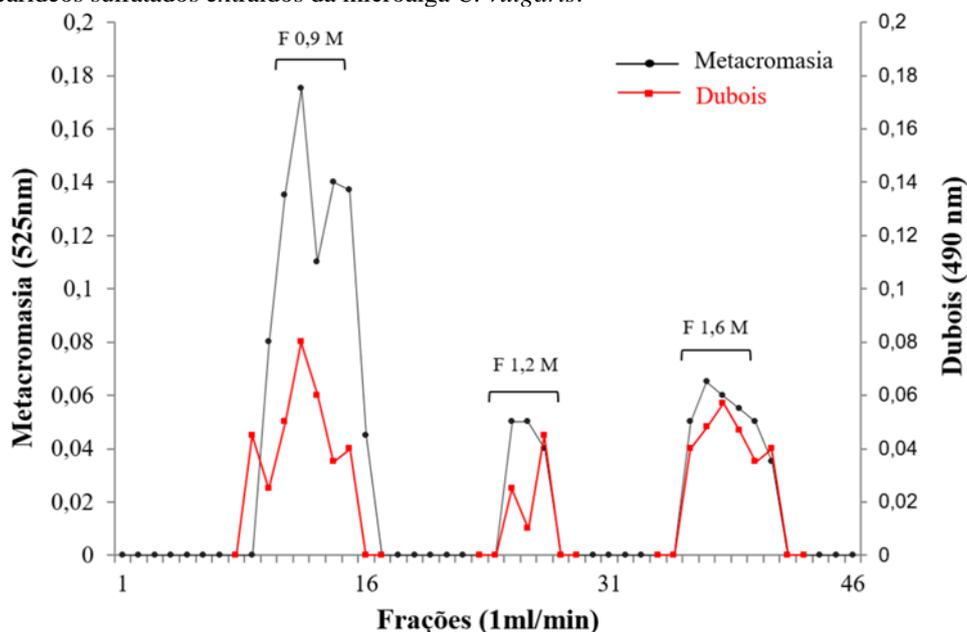
pela reação metacromática com azul dimetil-dimetileno (DMB) segundo Farndale et al. (1986). O conteúdo de carboidrato total nas frações foi determinado pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento de PST obtido da microalga *C. vulgaris* cultivada em efluente foi de 0,307g ou 15,03 %, mostrando-se acima da média quando comparado com microalgas cultivadas em volumes menores e sob condições controladas. Araújo et al. (2009) extraíram os PS de *Dunaliella* sp. produzida em meio Guillard f/2 e obteve um rendimento de 2,0 %. Já Cruz et al. (2011) obteve um rendimento médio de 2,0% de PS extraídos de *Chaetoceros muelleri* cultivada em iluminação e aeração constantes. Fimbres-Olivarria et al. (2018) cultivando *Navicula* sp. em meio "F" de Guillard e Ryther (1962), utilizando os comprimentos de ondas branco, vermelho e azul, obtiveram taxas de rendimento de 3,4, 3,9 e 4,4 % respectivamente.

O fracionamento mostrou três frações majoritárias eluídas com 0,9, 1,2 e 1,6 M de NaCl. As frações apresentaram uma baixa quantidade de carboidratos totais quando submetidas ao teste de DUBOIS, porém uma considerável metacromasia (Figura 2).

Figura 2. Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose equilibrada e eluída com tampão acetato de sódio 100 Mm, pH 5, contendo cisteína e EDTA 5 Mm, e perfil de carboidratos totais dos polissacarídeos sulfatados extraídos da microalga *C. vulgaris*.



Os PS de microalgas podem ser fracionados e purificados utilizando matrizes trocadoras aniônicas. Guzmán, Gato e Calleja (2003) fracionaram os PS das microalgas

*Chlorella stigmatophora* e *Pheodactylum tricornerutum* em coluna de DEAE-Celulose eluída com KCl. Andrade et al. (2009) fracionou os PS de microalgas de água doce em coluna de DEAE-Celulose resultando em cinco frações com atividade metacromática.

Baseado nos resultados obtidos, existe a possibilidade de aumentar a metacromasia e teor de carboidratos totais dos PS obtidos desta microalga, com base na mudança das diferentes condições de cultivo, já que a literatura reporta que a disponibilidade de nutrientes, temperatura, pH, salinidade e intensidade de luz podem afetar a composição centesimal de microalgas (MATSUDO *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2012; COCA *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2019) e conseqüentemente, os grupos funcionais e substâncias por elas produzidas. Nesse sentido, é possível potencializar ainda mais a produção de PS pelas microalgas através do meio de cultura utilizado.

Utilizar microalgas para produzir PS é interessante, pois apresentam elevada produtividade por hectare, podem ser cultivadas em água do mar e ainda podem ser colhidas continuamente ao longo do ano sem período de entressafra (EMBRAPA, 2016).

O Brasil possui área e insolação altamente favoráveis ao cultivo de microalgas, sendo a região Nordeste que apresenta maior disponibilidade energética, proveniente de irradiação solar. O Estado do Ceará possui características climáticas que proporcionam uma intensidade solar média superior a 3.000 horas anuais (ALVES, 2018) o que possibilita desenvolver fazendas de microalgas com baixo custo.

#### **4 CONCLUSÃO**

Conclui-se com os estudos deste trabalho que a biomassa da microalga *C. vulgaris* produzida em efluente piscícola de *O. niloticus* produzem polissacarídeos sulfatados que podem ser extraídos e purificados em coluna de DEAE-Sepharose. Trabalhos futuros se fazem necessários variando as condições de cultivo desta microalga, para melhor otimizar as características químicas e produção dessas moléculas.

## REFERÊNCIAS

ALVES, A.F. Energia Solar Fotovoltaica. Faculdade de Engenharia de Bauru – UNESP. São Paulo. Disponível em: [http://www4.feb.unesp.br/dee/docentes/alceu/2379teo\\_arquivos/03%20Aula%20Energia%20Solar%20FV.pdf](http://www4.feb.unesp.br/dee/docentes/alceu/2379teo_arquivos/03%20Aula%20Energia%20Solar%20FV.pdf). Acessado em 25.05.2018.

AMORIM, R. D. N. D. S.; RODRIGUES, J. A. G.; HOLANDA, M. L.; QUINDERÉ, A. L. G.; PAULA, R. C. M. D.; MELO, V. M. M.; BENEVIDES, N. M. B. Antimicrobial effect of a crude sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria ornata*. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 55, n. 2, p. 171-181, 2012.

ANDRADE, F.R.N.; RODRIGUES, R.S.; MOREIRA, T.S.M.; MACIEL, R.L.; ARAÚJO, G.S.; FARIAS, W.R.L. Otimização da extração e fracionamento dos polissacarídeos sulfatados de microalgas de água doce. In: XVI Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca, Anais XVI CONBEP, p. 634 -638, 2009.

AHMED, N.; THOMPSON, S. The blue dimensions of aquaculture: a global synthesis. Science of the Total Environment, v. 652, n. 1, p. 851-861, 2019.

AQUINO, R.S.; FERDANDEZ, A.M.L.; VALENTE, A.P.; ANDRADE, L.R.; MOURÃO, P.A.S. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. Glycobiology, v. 1, p. 11-20, 2005.

ARAÚJO, G.S.; TORRES, V.M.; MARREIRO, F.M.; LAVOR, A.M.C.; FARIAS, W.R.L. Cultivo de micro e macroalgas marinhas em condições controladas e extração de polissacarídeos sulfatados. Arquivos de Ciências do Mar, v. 42, p. 94-100, 2009.

CÁSSARO, C.M.F.; DIETRICH, C.P. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in vertebrates, Bethesda. Journal of Biological Chemistry, v. 7, p. 2254-2261, 1977.

COCA, M.; BARROCAL, V.M.; LUCAS, S.; BENITO, G.G.; GARCÍA-CUBERO, M.T. Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. Food and Bioproducts Processing, v. 94, p. 306–312, 2015.

CRUZ, P.R.; BARROS, M.U.G.; MOREIRA, R.T.; ANDRADE, F.R.N.; FARIAS, W. R.L. Obtenção de polissacarídeos sulfatados de *Chaetoceros muelleri* Lemmermann após extração lipídica. Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica, p.38 - 39, 2011.

DUBOIS, M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, v.3, 350-356, 1956.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, AGROENERGIA (EMBRAPA). Microalgas. Agroenergia em Revista. Ano IV, nº 10, dezembro de 2016.

FARIAS, W.R.; VALENTE, A.P.; PEREIRA, M.S.; MOURÃO, P.A. Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates. The Journal of Biology Chemistry, v.275, n.38, p.29299-29307, 2000.

FARNDALE, R.W.; BUTTLE, D.J.; BARRETT, A.J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochimistry et Biophysica Acta*, v. 2, p. 173-177, 1986.

FERREIRA, L.S.; RODRIGUES, M.S.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J.C.M. *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation in tubular photobioreactor: Use of no-cost CO<sub>2</sub> from ethanol fermentation. *Applied Energy*, v. 92, p. 379–385, 2012.

FIMBRES-OLIVARRIA, D.; CARVAJAL-MILLAN, E.; LOPEZ-ELIAS, J.A.; MARTINEZ-ROBINSON, K.G; MIRANDA-BAEZA, A.; MARTINEZ-CORDOVA, L.R.; ENRIQUEZ-OCAÑA, F.; VALDEZ-HOLGUIN, J.E. Caracterização química e atividade antioxidante de polissacarídeos sulfatados de *Navicula* sp. *Food Hydrocolloids*, v.75, p. 229-236, 2018.

GERESH, S.; ARAD, S.M. The extracellular polysaccharides of the red microalgae: Chemistry and rheology. *Bioresource Technology*, v.38, p. 195–201, 1991.

GUZMAN, S.; GATO, A.; LAMELA, M.; FREIRE-GARABAL, M.; CALLEJA, J.M. Anti-Inflammatory and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytotherapy reseach*, v. 17, p. 665–670, 2003.

KOLSI, R.B.; FAKHFAKH, J.; KRICHEN, F.; JRIBI, I.; CHIARORE, A.; PATTI, F.P.; BLECKER, C.; ALLOUCHE, N.; BELGHITH, H.; BELGHITH, K.; Structural characterization and functional properties of antihypertensive *Cymodocea nodosa* sulfated polysaccharid. *Carbohydrate Polymers*, v. 151, p. 511-522, 2016.

LIBERMAN, G.N.; OCHBAUM, G.; MEJUBOVSKY-MIKHELIS, M; BITTON, R.; ARAD, S. Physico-chemical characteristics of the sulfated polysaccharides of the red microalgae *Dixoniella grisea* and *Porphyridium aerugineum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 145, n. 15, p. 1171-1179, 2020.

LOURENÇO, S.O. *Cultivo de Microalgas Marinhas: princípios e aplicações*. São Carlos: Editora Rima, v. 1, 606 p., 2006.

MATSUDO, M. C.; BEZERRA, R. O.; SATO, S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J. C. M. Repeated fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* using urea as nitrogen source. *Biochemical Engineering Journal*, v. 43, p. 52-57, 2009.

OLIVEIRA, I.B.R.; SILVA, A.C.T.; SANTOS, S.F.M.; LOPES, D.N.M.; FREITAS, M.C.O.; MACIEL, R.L.; MELO, I.M.; SILVA, J.W.A. Influence of the depletion of the nitrogen source in the culture media on the biomass income of *Nannochloropsis oculata*. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v. 6, n. 2, p. 5670-5675, 2019.

PRAJAPATI, V. D.; MAHERIYA, P. M.; JANI, G. K.; SOLANKI, H. K. Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carbohydrate polymers*, p.97-112, 2014.

RADONIC, A.; THULKE, S.; ACHENBACH, J.; KURTH, A.; VREEMANN, A.; KÖNIG, T.; WALTER, C.; POSSINGER, K.; NITSCHKE, A. Anionic polysaccharides from phototrophic microorganisms exhibit antiviral activities to *Vaccinia* virus. *Jornal Antiviral and Antiretrovirals*, v. 2, p. 51–55, 2010.

RAPOSO, M.F.J.; MORAIS, A.M.B.; MORAIS, R.M.S.M. Marine Polysaccharides from Algae with Potential Biomedical Applications. *Marine drugs*. v. 13, p. 2967-3028. Março 2015.

SANTOS, M.R.; ZIMMER, F.C.; SOUZA, A.H.P.; STEINMACHER, N.C.; DETONI, E.; RODRIGUES, A.C. Addition of hydrocolloids in gluten-free breads followed by enrichment with avocado pulp (*Persea americana* Mill). *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v. 5, n. 7. p. 8018-8061, 2019.

SHI, J.; CHENG, C.; ZHAO, H.; JING, J.; GONG, N.; LU, W. In vivo anti-radiation activities of the *Ulva pertusa* polysaccharides and polysaccharide-iron (III) complex. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 60, p. 341–346, 2013.

SOUZA, G.C.C.F. Algas marinhas, Dossiê Técnico. Instituto de Tecnologia do Paraná TECPAR. 27 p. 2011.

VASCONCELOS, A.G.; ARAÚJO, K.V.; SANTANA, L.A. Polissacarídeos extraídos de algas marinhas e suas aplicações biotecnológicas: uma revisão. *Revista brasileira de inovação tecnológica em saúde*, v. 5, n.3. pg 27- 51, 2015.

WU, G.J.; SHIUB, S. M.; HSIEH, M. C.; TSAI, G.J. Anti-inflammatory activity of a sulfated polysaccharide from the brown alga *Sargassum cristaefolium*. *Food Hydrocolloids*, v. 53, p. 16-23, 2016.