

## ***Valorização de subprodutos fermentativos através do crescimento de Chlorella vulgaris***

### ***Parte I: Crescimentos***

#### **Objetivos:**

- Preparar meios de cultivo contendo diferentes proporções de resíduos sólidos ou líquidos e avaliar a sua adequação para o crescimento da microalga.
- Monitorizar o crescimento de *Chlorella vulgaris* ao longo do tempo, comparando diferentes condições experimentais.
- Determinar a influência dos subprodutos fermentativos na produtividade e na qualidade do cultivo microalgal.
- Identificar limitações associadas à utilização destes resíduos e propor ajustes experimentais que favoreçam o crescimento da microalga.
- Desenvolver competências laboratoriais relacionadas com o cultivo de microalgas, tratamento de dados e interpretação de resultados.

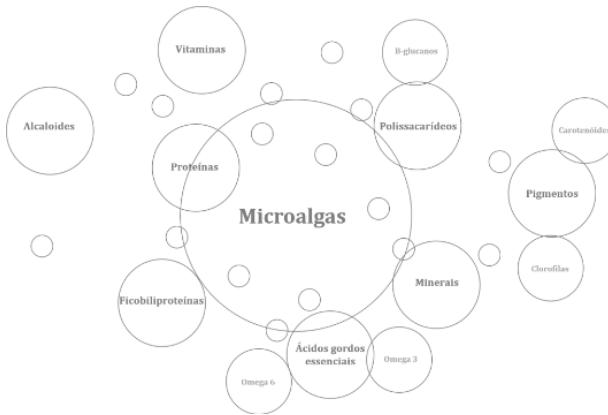
#### **1. Introdução Teórica**

A crescente preocupação ambiental e a necessidade de soluções sustentáveis para a gestão de efluentes industriais realçam a importância de investigar tecnologias inovadoras. Na produção de bebidas fermentadas, tanto a água utilizada na lavagem dos tanques como os resíduos sólidos gerados ao longo do processo constituem subprodutos que, se encaminhados para o sistema de tratamento convencional, podem causar transtornos devido ao seu elevado teor de açúcares, compostos orgânicos e outros nutrientes. Embora estas características dificultem o seu descarte direto, revelam simultaneamente um potencial de valorização, uma vez que podem ser aproveitados para enriquecer meios de cultura de microalgas, contribuindo para práticas alinhadas com os princípios da economia circular.

O cultivo de microalgas, como a *Chlorella vulgaris*, constitui uma estratégia promissora, permitindo transformar resíduos potencialmente problemáticos em recursos valiosos, promovendo

simultaneamente a sustentabilidade e a inovação. Este protocolo tem como objetivo avaliar a viabilidade de utilizar a água de lavagem dos tanques como meio de crescimento para a microalga, explorando o seu potencial nutricional e contribuindo para práticas de valorização de subprodutos industriais.

A relevância deste trabalho está em linha com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), particularmente o ODS 6 (Água Limpa e Saneamento) e o ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis). Ao propor estratégias para recuperar nutrientes de efluentes agroindustriais, este trabalho contribui para a gestão sustentável da água e incentiva práticas produtivas mais responsáveis e eficientes, alinhando-se com as metas globais de sustentabilidade.



No desenvolvimento deste trabalho experimental, destaca-se a importância das competências de colaboração e comunicação. Estas competências são amplamente valorizadas tanto no contexto académico como no profissional, facilitando a partilha de ideias, a construção de soluções conjuntas e a capacidade de articular resultados de forma clara e eficaz.

## 2. Contexto

Estudos prévios realizados em adegas onde ocorre a fermentação da uva demonstram que os efluentes líquidos da produção de vinho tinto têm potencial para serem utilizados no cultivo de *Chlorella vulgaris*. A sua composição inclui todos os micronutrientes essenciais ao crescimento da microalga, embora o pH se encontre abaixo do intervalo ideal e as concentrações de açúcares redutores e polifenóis totais excedam os valores recomendados. Verificou-se ainda que o nitrogénio está presente maioritariamente sob a forma de nitrato, mas em quantidades reduzidas. As melhores condições de crescimento foram observadas com a adição de 10% (v/v) de efluente, concentração que, contudo, requer suplementação com micronutrientes como ferro, zinco, cálcio, molibdénio e cobalto para assegurar produtividade e reproduzibilidade adequadas.

### **3. Desenho Experimental**

#### **3.1 Materiais e Equipamento**

Material e equipamento corrente de laboratório, destaca-se para o trabalho experimental:

- Erlenmeyers 250 mL;
- Câmara de fluxo laminar;
- Agitadora orbital.
- Pontas de micropipeta estéreis
- Micropipetas
- Filtros celulose
- Kitasatos
- Bomba de vácuo

#### **3.2 Reagentes:**

- Efluentes resultantes do trabalho prévio da fermentação
- Inóculo de *Chlorella vulgaris* (previamente preparado)

Soluções fornecidas e previamente esterilizadas

- Meio MCV (composição no Anexo)
- Efluente resultante da campanha vinícola de 2025
- Água destilada

#### **3.3 Ensaios**

Os crescimentos vão ocorrer em Erlenmeyers de 250 mL, contendo no total 100 mL de meio líquido nutritivo.

Antes de iniciar qualquer ensaio é necessário filtrar o efluente na Câmara de Fluxo Laminar em condições de assepsia e guardar no frio caso não seja usado no mesmo dia.

Branco:

Preparar em duplicado por turma:

<b>Volume (mL)</b>	<b>Branco +</b>
Meio MCV	90
Efluente (10% v/v)	0
H <sub>2</sub> O destilada estéril	0
Inóculo (10% v/v)	10
<b>Volume Total de Cultura:</b>	<b>100</b>

Ensaios:

Volume (mL)	Ensaio 1	Ensaio 2
Meio MCV	0	50
Efluente (10% v/v)	10	10
H <sub>2</sub> O destilada estéril	80	30
Inóculo (10% v/v)	10	10
<b>Volume Total de Cultura:</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

Cada grupo deverá de:

- Preparar cuidadosamente os reatores de acordo com o ensaio que irá desenvolver seguindo a ordem de colocação dos diferentes componentes, mas o inóculo será sempre o último a ser adicionado;
- Colocar os Erlenmeyers na agitadora orbital a 25°C e 150 rpm e determinar a intensidade luminosa (luz da incubadora ligada e leds)

**A amostragem é realizada na câmara de fluxo laminar**

- Retirar amostras de 1 mL diariamente, e colocar num eppendorf previamente esterilizado;
- Em todos os pontos, ler a **densidade ótica** a 600 nm em triplicado colocando 200 µL na placa de 96 poços (no 1º poço da placa colocar sempre água destilada (branco da leitura da DO)); medir o **pH**; e acompanhar o estudo de crescimento por **observação ao microscópio**;
- Os dados serão registados diariamente na folha de registo e na folha de cálculo do Excel fornecida.

#### 4. Tratamento dos resultados

- Representar as curvas de crescimento ln (DO) versus o tempo de crescimento em horas.
- Determinar as taxas de crescimento em h<sup>-1</sup>, ajustando a melhor reta aos valores da curva anterior (pelo menos 3 pontos de crescimento).
- Realizar uma análise crítica do crescimento de *Chlorella vulgaris* nos meios testados com diferentes composições.

## Bibliografia

- (1) Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 35, 265-278.
- (2) Abu Sepian, N. R., Mat Yasin, N. H., & Zainol, N. (2021). Evaluation of factors for cells growth of immobilized *Chlorella vulgaris* via factorial design approach. Chemical Engineering Communications, 208(5), 601-612.
- (3) REDWine Project. <https://redwineproject.eu/home>

## Anexos

### Composição do meio MCV (*Chlorella vulgaris* Standard Medium)

Componente	Concentração
KNO <sub>3</sub>	1,25 g/L
MgSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1 g/L
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,11 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25 g/L
NaHCO <sub>3</sub>	0,5 g/L
Sol. EDTA.Na.Fe	10 mL/L
Sol. ET	1 mL/L

- Composição da solução de EDTA:

EDTA.Na.Fe	0,9 g/L
------------	---------

- Composição da solução que contém os elementos traço (ET):

Componente	Concentração (g/L)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,54
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,22
CuSO <sub>4</sub>	0,05
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,06
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,08