

Valorização de subprodutos fermentativos através do crescimento de Chlorella vulgaris

Parte II: Análises

Objetivos:

Determinação da produção de biomassa seca.

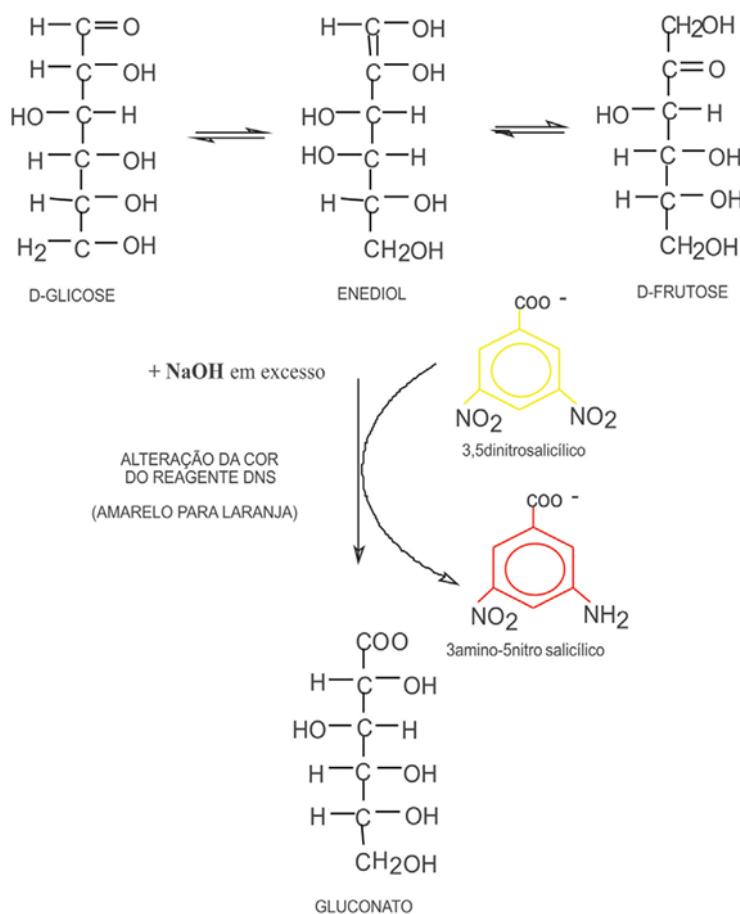
Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico.

Determinação da concentração de pigmentos (clorofilas e betacaroteno).

1. Introdução Teórica

Determinar a biomassa seca no final de ensaios de crescimento permite avaliar a eficiência dos processos biológicos subjacentes ao crescimento, permitindo inferir a eficácia na conversão de nutrientes, energia e outros recursos em biomassa. Além disso, a biomassa seca serve como uma métrica comum para comparar diferentes condições experimentais, tais como as estudadas neste trabalho experimental.

A determinação de açúcares redutores pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) é uma técnica bastante difundida na área da bioquímica, especialmente para a quantificação de açúcares que apresentam grupos redutores, tais como glucose e frutose. Essa abordagem utiliza como base a reação dos grupos redutores presentes nos açúcares com o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) em um meio ácido, o que resulta na formação de um complexo laranja.



A quantificação de pigmentos associados ao crescimento da *Chlorella vulgaris*, como a clorofila e os carotenoides, é fundamental para avaliar a saúde e a eficiência metabólica desta microalga. Estes pigmentos desempenham um papel crucial no processo fotossintético, influenciando diretamente a produção de biomassa e o seu potencial em aplicações biotecnológicas, como a produção de bioenergia, suplementos alimentares e compostos bioativos. Além disso, a monitorização dos pigmentos permite otimizar as condições de cultivo, identificar possíveis limitações nutricionais e compreender melhor a resposta da microalga a diferentes estímulos ambientais, promovendo o desenvolvimento sustentável de sistemas de produção baseados em microalgas.

Procedimento Experimental

Determinação da biomassa seca

Ensaio realizado em triplicado

- Pesar os filtros a usar
- Filtrar a vácuo 20 ml (ou 10 mL se o meio final estiver muito concentrado) do meio de cultura obtido no final
- Colocar os filtros na estufa a 100 °C durante uma hora
- Voltar a pesar os filtros
- Calcular o valor de biomassa seca por litro e por hora

Determinação dos açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método do uso do ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS), utilizado para a determinação de açúcares redutores.

Para este método foi utilizado 0,5 mL de amostra, ou amostra diluída de forma a obter valores de absorvância dentro da gama de valores da reta de calibração. A este volume de amostra adicionando 0,5 mL de reagente de DNS, tendo-se homogeneizado utilizando o vortex. De seguida, a mistura foi colocada, em banho-maria a 100°C, durante cinco minutos e final deste tempo colocou-se a mistura, durante dez minutos, a arrefecer até à temperatura ambiente. Após o arrefecimento, adicionou-se 5mL de água destilada, homogeneizando-se novamente a mistura em vortex para fazer a leitura da absorvância ao comprimento de onda de 540 nm.

A reta de calibração será determinada através do uso de soluções padrão de glucose, um açúcar redutor, com concentrações de 0,075 0,150 0,750 1,200 a 1,5 g/L, permitindo assim o cálculo dos valores de concentração das amostras.

Preparar uma solução mãe com 1,5 g/L de glucose (utilizar glucose anidra), dissolver em água destilada e perfazer até 50 mL em balão aferido.

Preparar as soluções da curva diluindo a solução mãe para um volume de solução de 2 mL de acordo com a tabela:

Concentração da solução padrão (g/L)	Volume de solução mãe	Volume de água destilada
0,075		
0,150		
0,750		
1,200		

Determinação da concentração final de pigmentos

1. Num tubo Falcon de 15 mL, colocar 0,5 mL de amostra de cultura líquida;
2. Adicionar 4,5 mL de acetona pura (utilizar pipetas de vidro, pois a acetona derrete alguns tipos de plástico);
3. Com ajuda de um eppendorf de 1,5 mL, colocar o equivalente a 0,5 mL de bolinhas de vidro (diâmetro 0,40-0,60 mm);
4. Colocar no vortex durante 1 minuto;
5. Centrifugar o extrato a 13000 rpm durante 3 minutos;
6. Numa cuvete de vidro (volume de 3 mL), fazer o espetro (de 380 a 700 nm) do branco (acetona a 90% (v/v)), e de seguida do extrato clarificado;
7. Calcular os pigmentos de acordo com as fórmulas, não esquecendo a subtração dos valores do branco:

$$\text{Clorofila a (Ca)} = 11,93 \times \text{Abs (664 nm)} - 1,93 \times \text{Abs (647 nm)}$$

$$\text{Clorofila b (Cb)} = 20,36 \times \text{Abs (647 nm)} - 5,50 \times \text{Abs (664 nm)}$$

$$\text{Beta-caroteno (C_carot)} = 4,1 \times \text{Abs (450 nm)} - 0,0435 \times \text{Ca} - 0,367 \times \text{Cb}$$

Tratamento dos Resultados

• Produtividade

O cálculo da produtividade em biomassa microalgal nos ensaios em descontínuo é calculada pela seguinte equação:

$$PX = (mf - mi) / (V \times t)$$

Onde:

Px – produtividade de biomassa (g/(L.h));

mf – biomassa final (g);

mi – biomassa inicial (g);

V – volume médio da cultura (L);

t – duração do ensaio (h).

Discussão

Analise os gráficos e compare os resultados dos dois ensaios que efetuou com o Branco da sua turma.

Relacione a produtividade com a taxa específica de crescimento e com a concentração de pigmentos

Construa uma análise SWOT (Forças, Fraquezas, Oportunidades e Ameaças) para conclusão final deste trabalho. No contexto deste trabalho, a análise SWOT será aplicada para sintetizar os principais resultados, refletir sobre os processos implementados e orientar possíveis ações futuras.