



**Nayara Araújo Cardoso
Renan Rhonalty Rocha
Maria Vitória Laurindo
(Organizadores)**

**As Ciências Biológicas e da
Saúde na Contemporaneidade 2**

Atena
Editora
Ano 2019

Nayara Araújo Cardoso
Renan Rhonaly Rocha
Maria Vitória Laurindo
(Organizadores)

As Ciências Biológicas e da Saúde na Contemporaneidade 2

Atena Editora
2019

2019 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Natália Sandrini e Lorena Prestes

Revisão: Os autores

Conselho Editorial

- Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Profª Drª Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

C569 As ciências biológicas e da saúde na contemporaneidade 2 [recurso eletrônico] / Organizadores Nayara Araújo Cardoso, Renan Rhonalty Rocha, Maria Vitória Laurindo. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2019. – (As Ciências Biológicas e da Saúde na Contemporaneidade; v. 2)

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: World Wide Web.

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-7247-216-6

DOI 10.22533/at.ed.166192803

1. Ciências biológicas. 2. Biologia – Pesquisa – Brasil. 3. Saúde – Brasil. I. Cardoso, Nayara Araújo. II. Rocha, Renan Rhonalty. III. Laurindo, Maria Vitória. IV. Série.

CDD 574

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

2019

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

APRESENTAÇÃO

A obra “As Ciências Biológicas e da Saúde na Contemporaneidade” consiste de uma série de livros de publicação da Atena Editora, em seus 22 capítulos do volume II, apresenta a importância do desenvolvimento de novas pesquisas nos âmbitos da saúde e da natureza e ainda a relevância da busca de novas terapias para o tratamento de variadas patologias.

O desenvolvimento de pesquisas no campo da saúde representa uma ferramenta importante para a busca de novas estratégias para o diagnóstico, acompanhamento do curso e tratamento de doenças. É na área da saúde que a biotecnologia encontra algumas de suas aplicações mais benéficas e abrangentes. Por meio de diferentes vertentes biotecnológicas, como a produção e atuação de organismos geneticamente modificados; a engenharia genética, que permite qualquer tipo de alteração em nível de DNA e experimentos empregando espécies vegetais e/ou compostos isolados para o desenvolvimento de terapias alternativas e aprimoramento das terapias convencionais.

Atualmente a busca por novos compostos com atividade terapêutica é feita majoritariamente através da experimentação de produtos naturais, uma vez que muitos destes têm comprovadas cientificamente suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, antineoplásicas, analgésicas, entre outras.

Desse modo, este volume II apresenta artigos que tratam: das propriedades antioxidantes de espécies vegetais como o alecrim e o chá verde; estudos microbiológicos e de toxicidade de espécies vegetais e animais; caracterização de ácidos nucleicos e proteínas; emprego da engenharia genética para elucidação de mecanismos de ação e desenvolvimento e experimentação de alimentos funcionais. Assim, esta obra é dedicada aos pesquisadores da área de saúde, que buscam reciclar seus conhecimentos por meio de pesquisas relevantes e se atualizar perante às novas tecnologias e descobertas científicas e biotecnológicas aplicadas às áreas da saúde.

Portanto, esperamos que este livro possa estimular outros estudantes e profissionais de saúde ao desenvolvimento de pesquisas e estudos a fim de incorporar à literatura referências atualizadas e possibilitar a aplicabilidade dos resultados dessas pesquisas às práticas profissionais diárias.

Nayara Araújo Cardoso
Renan Rhonalty Rocha
Maria Vitória Laurindo

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
A BIOLOGIA SINTÉTICA E ENGENHARIA METABÓLICA PARA DESENVOLVIMENTO DE SOLUÇÕES EM BIOTECNOLOGIA	
Mauricio Schiavo Gabriel Dall'Alba Mauricio Moura da Silveira Sergio Echeverrigaray	
DOI 10.22533/at.ed.1661928031	
CAPÍTULO 2	18
A CONSTRUÇÃO DE MODELOS DIDÁTICOS DA ESTRUTURA DO DNA COM MATERIAIS ALTERNATIVOS: CRIANDO E APRENDENDO	
Maria da Conceição dos Reis Leal João Gabriel Rangel Gonçalves	
DOI 10.22533/at.ed.1661928032	
CAPÍTULO 3	28
ALECRIM (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.): EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES E SUA IMPORTÂNCIA NO CONTROLE DA DOENÇA MANCHA FOLIAR EM PLANTAS DE CEVADA	
Fernando Luquis Brenda Mery Santos de Godoy Cristiane Santana Garcia Victor Alves Franklin Luciana Leite Oliveira Nilsa Sumie Yamashita Wadt Vinicius de Oliveira Cardoso Erna Elisabeth Bach	
DOI 10.22533/at.ed.1661928033	
CAPÍTULO 4	37
ALELOPATIA DE EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Eragrostis lugens</i> Nees. NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE <i>Oryza sativa</i> L	
Daniela Sponchiado Jéssica Cezar Cassol Douglas de Lima Righi Lucas Menezes Jorge Eduarda Mena Barreto Juçara Terezinha Paranhos	
DOI 10.22533/at.ed.1661928034	

CAPÍTULO 5 45

AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE *COMBRETUM LEPROSUM MART.*: TESTE *ALLIUM CEPA*

Raidan Costa Rodrigues
Valéria Moura de Carvalho
Jadielson da Silva Santos
Brenda Lois Barros dos Santos
Andressa Jordanne Pereira Ramos
Cairo Hilbert Santos de Melo
Juliane Moreira Ramos
Elizângela de Carvalho Nunes
Sâmya Katya Barros Guimarães
Wanderson Ferreira Martins
Adão Correia Maia
Kelly Maria Rêgo da Silva
Mateus Sávio Amorim
Antonio Lima Braga

DOI 10.22533/at.ed.1661928035

CAPÍTULO 6 50

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE ALECRIM (*ROSMARINUS OFFICINALIS*) E CHÁ VERDE (*CARMELLIA SINENSIS*) EM LINGUIÇAS FRESCAL BOVINA

Thaísia Cidarta Melo Barbosa
Juliana Nobrega Clemente
Karina da Silva Chaves
Sthelio Braga da Fonseca
Bruno Raniere Lins de Albuquerque Meireles

DOI 10.22533/at.ed.1661928036

CAPÍTULO 7 61

AVALIAÇÃO DO USO DE AÇÚCAR NA TERAPIA TÓPICA DE FERIDAS

Ingrid dos Santos Farias
Emanuelle Karine Frota Batista
Hebelys Ibiapina da Trindade
Janayna Batista Barbosa de Sousa Muller
Maria José Lima Nascimento
Evanita da Rocha Luz
Maria do Carmo de Souza Batista

DOI 10.22533/at.ed.1661928037

CAPÍTULO 8 71

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA VITAMINA C SOBRE A DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA NA FASE AGUDA DA DOENÇA DE CHAGAS EM CAMUNDONGOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM A CEPA QM2 DE *Trypanosoma cruzi*

Patrícia Milani de Moraes
Bruna de Lima Pereira
Ludmyla Toller Cocco
Luciamare Perinetti Alves Martins

DOI 10.22533/at.ed.1661928038

CAPÍTULO 9 84

AValiação DOS ÍndICES DE REGENERAÇÃO HEPÁTICA NO MODELO EXPERIMENTAL DE HEPATECTOMIA A 70%

Luz Marina Gonçalves de Araujo Oliveira
Pedro Luiz Squilacci Leme
Maria Cristina Chavantes

DOI 10.22533/at.ed.1661928039

CAPÍTULO 10 94

BIOTECNOLOGIA NO CONTROLE DE MOSQUITOS TRANSMISSORES DE ARBOVIROSES: BIOENSAIOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA EM MOSQUITOS ADULTOS

Fabíola da Cruz Nunes
Louise Helena Guimarães de Oliveira
Patrícia Alexandria Paiva Silva de Sousa
Hyago Luiz Rique

DOI 10.22533/at.ed.16619280310

CAPÍTULO 11 103

COMPOSTOS BIOATIVOS E POTENCIAL NUTRACÊUTICO DO FRUTO DE BURITI (*Mauritia flexuosa* L) NA TERAPIA COADJUVANTE EM PORTADORES DE DISLIPIDEMIA

Joilane Alves Pereira-Freire
Vivianne Rodrigues Amorim
Fernanda Maria de Carvalho Ribeiro
Stella Regina Arcanjo Medeiros
Jurandy do Nascimento Silva
Paulo Michel Pinheiro Ferreira

DOI 10.22533/at.ed.16619280311

CAPÍTULO 12 116

DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO PARA IMOBILIZAÇÃO DE *Chlorella vulgaris*

Felipe de Albuquerque Santos
Eduardo Bittencourt Sydney
Alessandra Cristine Novak Sydney

DOI 10.22533/at.ed.16619280312

CAPÍTULO 13 127

DESENVOLVIMENTO DE PÃO DE FORMA CONTENDO FARINHA MISTA DE MARACUJÁ E JABUTICABA

Jamilly Salustiano Ferreira Constantino
Julice Dutra Lopes

DOI 10.22533/at.ed.16619280313

CAPÍTULO 14 143

DETERMINAÇÃO DO EHL (EQUILÍBRIO-HIDROFÍLICO LIPOFÍLICO) DO ÓLEO DE ABACATE

Laíssa Aparecida Praxedes dos Reis
Alessandra Cristine Novak Sydney

DOI 10.22533/at.ed.16619280314

CAPÍTULO 15 150

ESTUDO DA TOXICIDADE DE *Combretum leprosum* Mart.: TESTE *ALLIUM CEPA*

Valéria Moura de Carvalho
Raidan Costa Rodrigues
Kelly Maria Rêgo da Silva
Elizângela de Carvalho Nunes
Sâmya Katya Barros Guimarães
Brenda Lois Barros dos Santos
Cairo Hilbert Santos de Melo
Juliane Moreira Ramos
Wanderson Ferreira Martins
Gabrielle Costa Bento Campos
Adão Correia Maia
Antonio Lima Braga
Jadielson dos Santos

DOI 10.22533/at.ed.16619280315

CAPÍTULO 16 155

ESTUDO E MODELAGEM CINÉTICA HETEROGÊNEA DA REAÇÃO DE CETALIZAÇÃO DO GLICEROL COM ACETONA UTILIZANDO ZEÓLITAS DO TIPO H-BEA E H-FER COMO CATALISADORES

Vinicius Rossa
Gisel Chenard Díaz
Yordanka Reyes Cruz
Sibele Berenice Castellã Pergher
Donato Alexandre Gomes Aranda

DOI 10.22533/at.ed.16619280316

CAPÍTULO 17 171

ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS DAS FOLHAS DA *Eugenia uniflora* Linn. (PITANGA)

Giovanna Gabrielly Alves da Silva Fraga
Maria Gabrielle de Oliveira Tabosa
Emilay Lira de Freitas
Leticia Vieira dos Santos Beserra
Arquimedes Fernandes Monteiro de Melo
Risonildo Pereira Cordeiro

DOI 10.22533/at.ed.16619280317

CAPÍTULO 18 177

NEW PROCESS FOR OBTAINING NANOCHITOSAN / BURITI OIL (*Mauritia flexuosa*) BIOCOMPOSITE: A BIOMATERIAL FOR REGENERATIVE MEDICINE AND TISSUE ENGINEERING

Júlia Silveira Broquá
Luciano Pighinelli
Magda Comoretto Gall
Jader Figueiredo
Giovani André Piva
Lucas Eduardo Lopes
Machado, Pamela Persson
Anderson Rockenbach
Renata Pospichil
Luan Rios Paz
Fernando Guimarães
Gabrielle Zanin
Marzena Kmiec Pighinelli

DOI 10.22533/at.ed.16619280318

CAPÍTULO 19 192

PORPHYROMONAS GINGIVALIS NA PERIODONTITE: POR QUE ESTUDAR SEUS FATORES DE VIRULÊNCIA COM FERRAMENTAS *IN SILICO*?

Ellen Karla Nobre dos Santos-Lima
Larissa de Mattos Oliveira
Michelle Miranda Lopes Falcão
Manoelito Coelho dos Santos Junior
Márcia Tosta Xavier
Soraya Castro Trindade

DOI 10.22533/at.ed.16619280319

CAPÍTULO 20 211

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR *Bacillus subtilis* A PARTIR DO EXTRATO AQUOSO DA ALGAROBA [*Prosopis juliflora* (SW) DC] COMO SUBSTRATO NÃO CONVENCIONAL

Adrielly Silva Albuquerque de Andrade
Emanuele Cardoso Dias
Napoleão José de Oliveira Neto
Graciana Clécia Dantas
Adna Cristina Barbosa de Sousa
Andréa Farias de Almeida

DOI 10.22533/at.ed.16619280320

CAPÍTULO 21 224

SUPLEMENTAÇÃO COM DIFERENTES NUTRACÊUTICOS ATENUA PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS CARACTERÍSTICOS DO TRANSTORNO DO ESPECTRO AUTISTA

Ana Olívia Martins Laurentino
Naiana da Rosa
Tamires Mateus Gomes
Eduardo de Medeiros Peretti
Fabiana Durante de Medeiros
Jucélia Jeremias Fortunato

DOI 10.22533/at.ed.16619280321

CAPÍTULO 22 231

USO DO EXTRATO DE *Ganoderma lucidum* NO CONTROLE DA MANCHA FOLIAR EM PLANTAS DE CEVADA PROTEGENDO O MEIO AMBIENTE

Ricardo Zanirato da Costa Fernandes
Lorena de Cássia Barboza Pires
Jessica Pojato da Silva
Joseanne Meira Cambuí
Edgar Matias Bach Hi
Vinicius de Oliveira Cardoso
Erna Elisabeth Bach

DOI 10.22533/at.ed.16619280322

SOBRE OS ORGANIZADORES..... 239

DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO PARA IMOBILIZAÇÃO DE *Chlorella vulgaris*

Felipe de Albuquerque Santos

Universidade Tecnológica Federal do Paraná,
Ponta Grossa – Paraná

Eduardo Bittencourt Sydney

Universidade Tecnológica Federal do Paraná,
Ponta Grossa – Paraná

Alessandra Cristine Novak Sydney

Universidade Tecnológica Federal do Paraná,
Ponta Grossa – Paraná

RESUMO: A microalga *Chlorella vulgaris* é amplamente estudada e comercializada. Os custos de produção de microalgas devem ser continuamente reduzidos, visando aumentar a sua competitividade. O objetivo do presente estudo foi analisar a viabilidade de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*, aspirando diminuir os custos com a recuperação das suas células, que poderiam ser simplesmente filtradas ao invés de centrifugadas (método convencional). Uma das alternativas para recuperação das células é o método de imobilização celular. Dentre os métodos de imobilização, o método de gelificação iônica é baseado no gotejamento de alginato de sódio sobre solução de cloreto de cálcio, formando alginato de cálcio, que produz uma estrutura em rede tridimensional. A estabilidade, rigidez e esfericidade adequadas das partículas são condições fundamentais para o fluxo de nutrientes entre o meio e as células.

O procedimento foi realizado em fluxo laminar com uma bomba peristáltica a 31 rpm, com saída da solução para gotejamento por ponteira de micropipeta de 200 μ L, inclinada 45° sobre a solução de cloreto de cálcio 125mM, e fluxo de ar proveniente do biorreator com vazão de 10L. min⁻¹. Depois de encapsuladas, as partículas obtidas foram colocadas em frasco Erlenmeyer contendo meio de cultivo (MBM – Meio Bristol modificado), e outro frasco, contendo apenas células livres e meio de cultivo, foi utilizado como controle. Os cultivos foram mantidos a 25°C, em fotoperíodo 12h:12h durante 7 dias. O desenvolvimento de micropartículas para imobilização de *Chlorella vulgaris* possibilita estudos sobre a aplicação da mesma no tratamento de resíduos, suplementação alimentar e produção de energia.

PALAVRAS-CHAVE: Imobilização, *Chlorella vulgaris*, Downstream.

ABSTRACT: The microalgae *Chlorella vulgaris* is widely studied and commercialized. The costs of producing microalgae should be continuously reduced in order to increase their competitiveness. The objective of the present study was to analyse the viability of growth of the microalga *Chlorella vulgaris*, in order to reduce the costs of recovering its cells, which could be simply filtered instead of centrifuged (conventional method). One of the alternatives

for cell recovery is the cell immobilization method. Among the immobilization methods, the ionic gelling method is based on the drip of sodium alginate on calcium chloride solution, forming calcium alginate, which produces a three-dimensional network structure. Suitable stability, stiffness and sphericity of the particles are fundamental conditions for the flow of nutrients between the medium and the cells. The procedure was carried out in laminar flow with a peristaltic pump at 31 rpm, with solution outlet for dripping by a micropipette tip of 200 μ L, inclined 45° on the solution of calcium chloride 125mM, and air flow from the bioreactor at 10 L.min⁻¹. After encapsulation, the obtained particles were placed in a flask containing culture medium (MBM), and another flask, containing only free cells and culture medium, was used as a control. Cultures were maintained at 25°C, in photoperiod 12h: 12h for 7 days. The development of microparticles for immobilization of *Chlorella vulgaris* enables studies on its application in waste treatment, food supplementation and energy production.

KEYWORDS: Immobilization, *Chlorella vulgaris*, Downstream.

1 | INTRODUÇÃO

A biotecnologia consiste em um vasto campo que estuda a utilização de sistemas e constituintes celulares para serem aplicados na indústria e, posteriormente, em produtos do cotidiano das pessoas. Dessa maneira, torna-se um ramo essencial no desenvolvimento econômico¹.

Acada dia que passa, aumenta-se a necessidade do uso de ativos biotecnológicos para diversos fins, seja para tratamento de efluentes, fixação de CO₂ proveniente de termoelétricas, produção de biocombustíveis, suplementos nutritivos, utilização de microrganismos geneticamente modificados, dentre outros. Porém, esses ativos são muitas vezes perdidos durante os processos, ou então têm baixo reaproveitamento devido às dificuldades de se trabalhar com os microrganismos livres. Devido a esse fato, busca-se novos meios de reutilizar os ativos biotecnológicos e, por isso, é necessário desenvolver e aplicar técnicas eficazes de reaproveitamento desses ativos, sem que haja danos aos mesmos.

Dentre os ativos biotecnológicos em evidência atualmente, encontra-se a microalga *Chlorella vulgaris*. Possui alto potencial econômico, pois é utilizada para produção de suplementos alimentares ricos em ferro e no tratamento de resíduos abundantes em nitrogênio e fósforo. Particularmente, a *Chlorella vulgaris* é uma espécie unicelular de água doce pertencente à classe *Chlorophyceae*, ordem *Chlorococcales* e família *Oocystaceae*. Pode acumular pigmentos como clorofila a e b, β -caroteno e xantofilas². Visto que a microalga em estudo é amplamente comercializada, um dos grandes desafios é reduzir os custos de sua obtenção para aumentar sua competitividade no mercado.

O método tradicional de obtenção *Chlorella vulgaris* é por meio da centrifugação. Entretanto, esse é um método relativamente dispendioso. Além disso, apresenta

reaproveitamento baixo, pois há perda de biomassa durante o processo.

Um dos meios alternativos de obtenção e reaproveitamento da *Chlorella vulgaris* é através da imobilização celular. O processo de imobilização é caracterizado pela restrição da mobilidade do ativo em um espaço confinado, suportando assim altas concentrações celulares, implicando em maiores velocidades de processamento ³. Algumas vantagens da imobilização celular são a eliminação do uso de métodos de ciclos externos para obtenção do ativo, possibilitando, por exemplo, ciclos simples como a filtração. Além disso, há maior proteção das células de estresse ambiental, como altas concentrações de pH, substrato e cisalhamento ⁴. A imobilização de células consiste no contato entre o material imobilizador e as células vivas, sob condições controladas. Existem basicamente três métodos de imobilização celular: adsorção, ligação covalente e envolvimento.

Devido ao baixo custo e menor complexidade, o método de imobilização mais utilizado é por envolvimento. Este método fundamenta-se no princípio de gotejamento de uma solução polimérica acrescida de células vivas sobre uma solução de CaCl_2 ⁴.

Dentre as soluções poliméricas, também chamadas de suporte, encontra-se o alginato. O alginato é um polímero natural e, atualmente, um dos mais utilizados para encapsulamento de células vivas. Não possui toxicidade, é biocompatível e apresenta elevada resistência mecânica ⁵. O alginato comercial é extraído de algas marrons, principalmente de diferentes espécies do gênero *Laminaria* (*L. hyperborea*, *L. digitata*, *L. japonica*) e do gênero *Sargassum* (*Macrocystis pyrifera*, *Ascophillum nodosum*, *Lesonia negrescens*). O alginato de sódio é um polímero linear composto por ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulorônico (G). M e G são as unidades monoméricas. Os monômeros se agrupam em séries de MM, GG e MG ⁶.

Quando a solução de alginato contendo células de *Chlorella vulgaris* cai sobre a solução de CaCl_2 , formam-se gotas insolúveis em água e de alta viscosidade. Apesar disso, as condições de sobrevivência do ativo imobilizado são mantidas, visto que há o fluxo de substâncias e a conservação metabólica ⁷.

Quando as estruturas gulorônicas reagem com íons Ca^{2+} , forma-se uma espécie de caixa de ovos. Essa espécie de “egg-box” foi assim denominada por Grant, seu descobridor ⁸. O alginato modifica sua forma linear ao reagir com íons cálcio divalentes, gerando uma rede tridimensional, ampliando a possibilidade de mais íons cálcio reagirem com o alginato, formando estruturas cada vez mais complexas, assim como representado na figura 1.

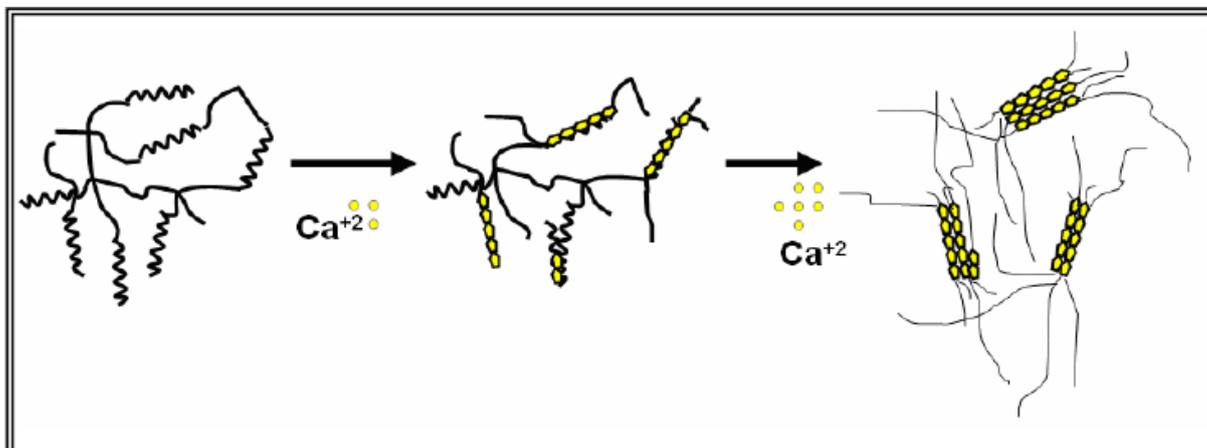


Figura 1. Modelo “egg-box” do alginato.

Fonte: Bressel, 2007.

Entretanto, sabe-se que quanto menor a partícula, mais organizada torna-se essa estrutura tridimensional ⁹. Portanto, há melhor fluxo de nutrientes do meio de cultura para as células e maior sobrevivência das mesmas. Daí decorre a importância em desenvolver micropartículas capazes de assegurar o crescimento celular, uma vez que a faixa de tamanhos de micropartículas oscila de $1\mu\text{m}$ a $999\mu\text{m}$ ¹⁰.

O desenvolvimento de micropartículas não é simples, visto que a solução de alginato acrescida de células é altamente viscosa, além do que, requer materiais sofisticados e caros. Portanto, adaptou-se um sistema gerador de micropartículas utilizado em uma tese de doutorado da UFRGS ⁶, com algumas modificações a fim de produzir micropartículas para imobilizar a microalga *Chlorella vulgaris*.

Com o intuito de desenvolver micropartículas estáveis e uniformes, vários fatores precisam ser levados em consideração, como: concentração do alginato, altura de gotejamento, diâmetro da ponteira, fluxo de gotejamento da bomba peristáltica ¹¹. O fluxo de ar constante é outro fator que influencia na formação de micropartículas ⁶.

O objetivo principal desse estudo é desenvolver partículas de alginato de cálcio entre $1\mu\text{m}$ a $999\mu\text{m}$ capazes de permitirem o desenvolvimento celular da microalga *Chlorella vulgaris*. Os objetivos particulares do estudo são: propor uma altura de gotejamento adequada para formação de partículas esféricas; formular, baseado na literatura, a concentração ideal da mistura alginato de sódio e cloreto de cálcio para formar esferas rígidas; demonstrar o crescimento do cultivo do ativo imobilizado.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no laboratório de Fermentações na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, câmpus Ponta Grossa.

Cultivo de cultura de células. As células da microalga *Chlorella vulgaris* foram cultivadas em MBM (Meio Bristol Modificado) à temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$, sob iluminação de 2 lâmpadas fluorescentes de 15W, fluxo luminoso de 788,8 lux cada, em uma sala

do laboratório de Fermentações da UTFPR, câmpus Ponta Grossa em um erlenmeyer de 6L.

Centrifugação das células de *Chlorella vulgaris*. No fluxo laminar, foi retirada uma alíquota de 800mL de um Erlenmeyer contendo 6L do cultivo de cultura inicial. Essa alíquota foi distribuída em 16 tubos Falcon e centrifugada a 5000 rpm durante 30 minutos. Esse método foi baseado na literatura, com a diferença no tempo de centrifugação¹². Descartou-se o sobrenadante, deixando 12,5mL em cada tubo Falcon. De cada tubo, retirou-se uma amostra de 6,25mL para adicionar na solução de 100mL de alginato 3%, totalizando uma solução de alginato acrescida do ativo 1,5%. Ainda foram misturados 6,25mL restantes do ativo de cada tubo Falcon a 100mL de água destilada. Dessa maneira, preparou-se a solução para produzir micropartículas e a solução de controle.

Preparação de micropartículas com *Chlorella vulgaris* imobilizada. No fluxo laminar, foi montado um sistema contendo uma solução 1,5% de alginato acrescida de células de *Chlorella vulgaris* à uma altura de 33cm que passava pela mangueira da bomba peristáltica à 31rpm e caía sobre uma solução de CaCl_2 125mM, através de uma ponteira de micropipeta 200 μL inclinada a 45° e inserida dentro do tubo de fluxo de ar proveniente do biorreator. A distância da mangueira proveniente do biorreator até o béquer contendo a solução de CaCl_2 é de 1,5m. A altura da seringa até a superfície da solução de CaCl_2 foi de 3cm. O esquema do sistema foi baseado na literatura⁶ e está representado na figura 2. A montagem do sistema está apresentado na figura 3.

As microalgas encapsuladas foram deixadas em banho iônico (CaCl_2) por 30 minutos para cura¹³. Posteriormente, as micropartículas foram filtradas com peneira metálica, lavadas com água destilada para remover CaCl_2 não-ligado e colocadas em 750mL de MBM.

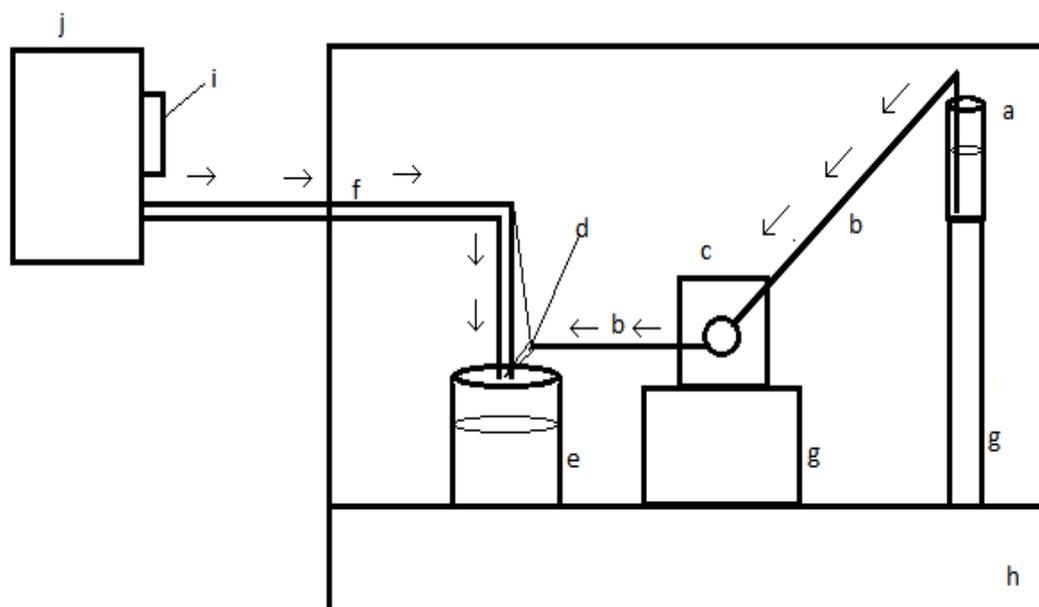


Figura. 2. Sistema gerador de micropartículas. a) Solução de alginato de sódio acrescida de *Chlorella vulgaris* (1,5%). b) Mangueira da bomba peristáltica. c) Bomba peristáltica Watson-

Marlow modelo 120S. d) Ponteira de micropipeta 200 μ L. e) Solução de CaCl₂ 125mM. f) Mangueira de 1,5m provinda do biorreator. g) Suportes auxiliares. h) Câmara de fluxo laminar. i) Rotâmetro. j) Biorreator.



Figura 3. Montagem do sistema gerador de micropartículas.

Cultivo das micropartículas imobilizadas e da solução de controle. As micropartículas foram filtradas com auxílio de uma peneira metálica autoclavada e colocadas em um Erlenmeyer contendo 750mL de MBM. A solução de controle (100mL de células livres + 100mL de água destilada) foi adicionada em outro Erlenmeyer contendo 750mL de MBM. Ambas as amostras foram expostas às mesmas condições: temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$, sob iluminação de 2 lâmpadas fluorescentes de 15W, fluxo luminoso de 788,8 lux cada, em uma sala do laboratório de Fermentações da UTFPR, câmpus Ponta Grossa.

Redissolução das micropartículas. As células de *Chlorella vulgaris* imobilizadas foram redissolvidas com citrato de sódio 50mM⁹ e centrifugadas durante 30 minutos à 5000rpm para posterior realização de contagem do número de células.

Contagem do número de células. A contagem de células foi realizada na Câmara de Neubauer através do microscópio óptico com aumento final de 400x durante 7 dias.

Medição do tamanho das micropartículas. A medição do diâmetro médio das partículas foi feita com o auxílio de um micrômetro digital Western MC-3.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para realizar a imobilização da microalga, baseou-se no sistema gerador de microcápsulas da fig. 2, porém com algumas mudanças.

O sistema montado na literatura⁶ propõe a altura do suporte 50cm acima da bomba peristáltica. No presente estudo, posicionou-se o copo de béquer contendo

alginate de sódio acrescido de *Chlorella vulgaris* à uma altura de 33cm acima da bomba peristáltica, devido às limitações físicas da câmara de fluxo laminar. Entretanto, verificou-se um fluxo constante da solução até a bomba peristáltica.

Outra mudança foi a ponteira de gotejamento. A literatura sugere a utilização de agulhas de 22G (0,7mm) ¹⁴ à 25G (0,5mm) ⁶. No entanto, notou-se que a utilização de uma ponteira autoclavada de micropipeta de 200 μ L deixaria o sistema mais rígido e com a mesma eficiência do uso de uma agulha, pois o diâmetro da ponteira usada foi de 0,65mm, estando dentro dos diâmetros sugeridos pela literatura.

No sistema proposto por ⁶, utilizou-se um cilindro de ar comprimido conectado a uma agulha com distância de 80cm entre esses. Neste estudo, utilizou-se fluxo de ar proveniente do biorreator disponível no laboratório de Fermentações da UTFPR - câmpus Ponta Grossa, com uma distância de saída da mangueira do biorreator até o local de gotejamento de 150cm.

Foram realizados alguns testes experimentais para analisar as melhores condições de formação de micropartículas esféricas e estáveis. Para propósitos práticos, considera-se que micropartículas rígidas são indicadas para imobilização de células vivas ⁷. A necessidade de produzir micropartículas esféricas e estáveis reside no fato de que há melhor distribuição de células e melhor difusão de oxigênio. Quando não há distribuição uniforme de oxigênio, as células da superfície migram para o meio externo, ocasionando o rompimento da matriz ¹⁵.

Sabe-se que a altura da ponteira até a superfície da solução de CaCl₂ influencia no formato da partícula ¹⁶. Foram realizadas três tentativas de alturas diferentes para definir a micropartícula mais esférica.

A tabela 1 apresenta a esfericidade das partículas de acordo com a altura de gotejamento (desde a extremidade da ponteira até a superfície da solução de CaCl₂).

Altura de gotejamento (cm)	Esfericidade
7	Partícula achatada
5	Partícula com cauda
3	Partícula esférica

Tabela 1. Esfericidade da micropartícula em função da altura do bico gotejador.

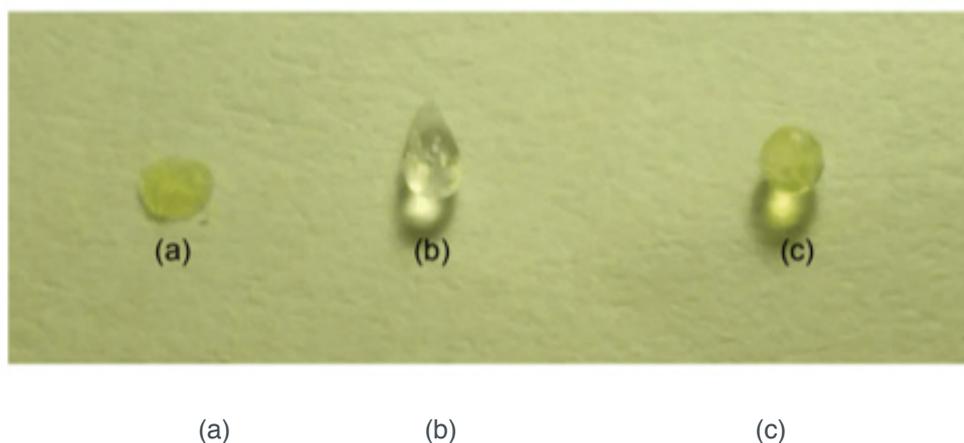


Figura. 4. Micropartículas com diferentes alturas de gotejamento: (a) com altura de 7cm; (b) com altura de 5cm; (c) com altura de 3cm.

A micropartícula (b) da figura 4 foi produzida sem microalga imobilizada para melhor representação da cauda produzida. Os resultados demonstram que quanto maior a altura da ponteira, mais irregular o formato da micropartícula. Isso pode ser explicado pelo fato de que quanto maior a altura, maior a velocidade de impacto da gota com a superfície de CaCl_2 ¹⁶.

No presente estudo, a esfericidade ideal da micropartícula foi encontrada a uma altura de 3cm desde a ponteira até a superfície da solução de CaCl_2 .

O fluxo da bomba peristáltica é outro fator influencia diretamente no formato das micropartículas ¹⁶. Quanto maior o fluxo da bomba peristáltica, mais irregulares se tornam as micropartículas ¹³. Foram realizados testes anteriores e decidiu-se utilizar o fluxo constante de 140 mL.h^{-1} na bomba peristáltica como uma média dos fluxos sugeridos por ¹³. Intercalou-se diferentes fluxos de ar provenientes do biorreator para analisar a esfericidade das micropartículas.

A tabela 2 mostra as combinações testadas do fluxo de ar e fluxo da bomba peristáltica.

Fluxo de ar (L.min^{-1})	Fluxo da bomba peristáltica (mL.h^{-1})	Esfericidade das micropartículas
8,0	140	Micropartículas com cauda
8,5	140	Micropartículas com cauda
9,0	140	Micropartículas com leve formato de gota
9,5	140	Micropartículas com leve formato de gota
10,0	140	Micropartículas esféricas

Tabela 2. Relação do fluxo de ar e da bomba peristáltica com a esfericidade das micropartículas.

A literatura sugere testar fluxos de ar de até 15 L.min^{-1} ¹³, porém o biorreator utilizado neste estudo tem um fluxo de ar máximo de 10 L.min^{-1} . Portanto, não foram testadas vazões volumétricas acima desse valor.

O fluxo constante de 140 mL.h^{-1} foi utilizado porque notou-se que ao aumentar o fluxo da bomba peristáltica acima de 140 mL.h^{-1} , as partículas começaram a assumir formato achatado e irregular. Além disso, pelo esquema proposto, ao ultrapassar a vazão de 140 mL.h^{-1} , começa-se respingar alginato no tubo de fluxo de ar. Isso pode ocasionar a secagem e acúmulo do alginato na saída do tubo durante o tempo de produção das micropartículas, ocasionando diferenças significativas no tamanho e na forma das mesmas.

Outro ponto fundamental a ser analisado para obtenção de partículas esféricas e rígidas foi a utilização de diferentes combinações de concentrações de alginato

de sódio e cloreto de cálcio ¹⁶. Concentrações de alginato de 1% até 4% em água são sugeridas e para CaCl₂ concentrações de 0,05M a 0,5M ⁴. Decidiu-se fixar a concentração de 125mM para o CaCl₂ e testar diferentes concentrações de alginato de sódio. A resistência das micropartículas consta na Tabela 3.

Concentração de Alg. De sódio (%)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)	Resistência
1%	0,125	Micropartículas muito frágeis
2%	0,125	Micropartículas Estáveis
3%	0,125	Micropartículas resistentes

Tabela 3. Combinações de concentração de Alginato de sódio e Cloreto de Cálcio.

Três soluções distintas de alginato 1%, 2% e 3% foram preparadas e deixadas em três Erlenmeyer distintos contendo NaCl 5% durante 10 dias. Notou-se que as micropartículas contendo alginato 1% e 2% rompiam-se mais facilmente do que a solução de alginato 3% ao aplicar pressão mecânica. Isso se deve ao fato de que concentrações mais elevadas de alginato tornam a micropartícula mais rígida devido à formação de redes tridimensionais mais complexas ¹⁷.

Retirou-se uma amostra com 100 micropartículas. Realizou-se uma média aritmética, que resultou no diâmetro médio de 890µm.

Para comprovar a eficácia da técnica de imobilização, foram realizadas contagens diárias de células durante 7 dias. Foram contadas células das micropartículas, células da microalga livre e possíveis células do meio de cultivo ao qual estavam inseridas as micropartículas.

O gráfico comparativo da concentração de células pelo tempo da microalga imobilizada com a microalga livre está expresso logo abaixo na Figura 5.

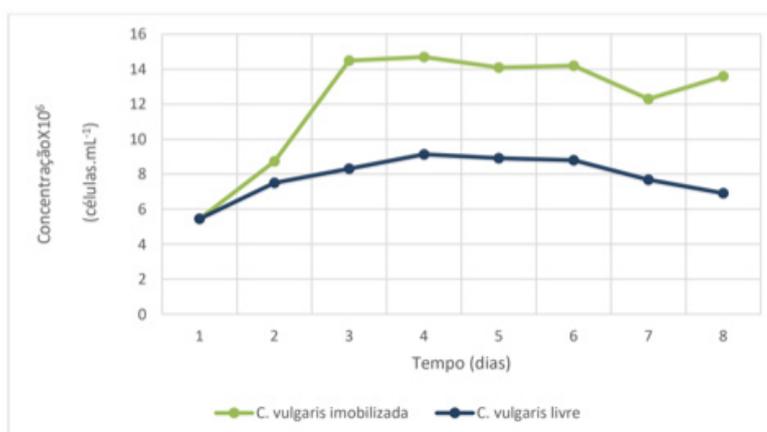


Figura. 5. Gráfico comparativo da microalga imobilizada com a microalga livre.

Nota-se através da Figura 5 que a partir do mesmo inóculo, as microalgas imobilizadas apresentaram maior crescimento celular em relação às microalgas livres. No último dia de contagem, as microalgas imobilizadas apresentaram valor de 1,36 x

10^7 células.mL⁻¹, enquanto que na contagem das microalgas livres foram contabilizadas $6,91 \times 10^6$ células.mL⁻¹. Esse fato corrobora a transferência adequada de nutrientes e de oxigênio do meio para as micropartículas.

Além disso, foi analisado macro e microscopicamente o meio de cultivo das células imobilizadas, e não foi constatada nenhuma célula livre, o que evidencia que as partículas de alginato aprisionaram corretamente as células, não permitindo o seu escape pelos poros.

O pH ideal de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* fica em torno de 5,5 a 8,0 e qualquer mudança afeta diretamente na sua curva de crescimento². O pH medido do meio de cultivo foi 7,0. O resultado da curva seguiu a tendência de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* inserida em um meio com esse pH.

4 | CONCLUSÕES

De maneira geral, as micropartículas produzidas obtiveram o tamanho de diâmetro médio de $890\mu\text{m}$, estando dentro da faixa de $1\mu\text{m}$ a $999\mu\text{m}$. A busca de uma concentração de alginato e cloreto de cálcio, além de uma altura de gotejamento ideal, permitiram a formação de micropartículas esféricas e rígidas e proporcionaram o correto crescimento da microalga. A comprovação desse fato está no crescimento da microalga imobilizada.

O método de imobilização da microalga *Chlorella vulgaris* foi eficaz para sua obtenção e reutilização, visto que as micropartículas puderam ser facilmente peneiradas sem custos além dos materiais utilizados. Nessa perspectiva, o uso deste método propicia a aplicação da microalga imobilizada para fins de tratamento de resíduos, nutricionais, produção de energia, dentre outros, com custos mais baixos, pois o custo de obtenção e reutilização do microrganismo é significativamente menor.

REFERÊNCIAS

1 BORZANI, W.; SCHMIDELL, W; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**. V.1. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

2 **Avaliação do crescimento da *Chlorella vulgaris* em diferentes pH objetivando sua inserção na matéria-prima do biodiesel**. XVII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2017.

3 GUISAN, J. M. **Immobilization of Ezymes and Cells**. Totowa: Humana Press: p.1-13. 2006.

4 BORZANI, W.; SCHMIDELL, W; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**. V.2. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

5 LIMA, A. M. F.; ANDREANI, L.; SOLDI, V. **Influência da adição de plastificante e do processo de reticulação na morfologia, absorção de água e propriedades mecânicas de filmes de alginato de sódio**. Química Nova, v. 30, No. 4, p. 832-837, 2007.

- 6 BRESSEL, T.A.B. **Sistema gerador de microcápsulas de alginato. Tese de Doutorado em Genética e Biologia Molecular** – UFRGS. Porto Alegre, p. 56, 2007.
- 7 MARTINSEN, A.; SKJÄK-BRAEK, G.; SMIDSRØD, O. **Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 33, p. 79 – 89, 1989.
- 8 GRANT, G.T.; MORRIS, E.R.; REES, D.A.; SMITH, P.J.C.; THOM, D.. **Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model.** *FEBS Letters*, v. 32, p. 195-198, 1973.
- 9 SIMPSON, N. E.; GRANT, S. C.; BLACKBAND, S. J.; CONSTANTINIDIS I. **NMR properties of alginate microbeads.** *Biomaterials*, v. 24, p. 4941-4948, 2003.
- 10 DIAS, J. A. C. **Nanopartículas poliméricas com aplicação na administração pulmonar de proteínas.** Dissertação em Ciências Farmacêuticas – Universidade do Algarve. Faro, p. 20, 2013.
- 11 FUNDUEANU, G., NASTRUZZI, C., CARPOV, A., DESBRIERES, J., RINAUTO, M.. **Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods.** *Biomaterials*, v. 20, p. 1427-1435, 1999.
- 12 MARCON, A. E. **Remoção de coliformes fecais com microalgas (*Chlorella*) imobilizadas em matriz de alginato de cálcio.** Dissertação em Engenharia Sanitária – UFRN. Natal, p. 31, 2005.
- 13 COSTA, B. S. **Micropartículas produzidas por gelificação iônica recobertas com gelatina de peixe e isolado proteico de soja.** Dissertação em Engenharia de Alimentos – UNICAMP. Campinas, p. 49, 2014.
- 14 **Esferas (Beads) de Alginato como Agente Encapsulante de Óleo de *Croton zehntneri* Pax et Hoffm.** *Polímeros*, vol. 20, nº 2, p. 112-120, 2010.
- 15 GIESE, E. C. **Potencial Biotecnológico do Uso de Micro-organismos Imobilizados em Gel de Alginato de Cálcio.** CETEM/MCTI : Rio de Janeiro, 2015.
- 16 TEIXEIRA, V. F. T. **Estudo da obtenção de biocatalisadores com matrizes de alginato de cálcio visando a produção de biodiesel.** Dissertação em Ciências e Tecnologias Agropecuárias – UENF. Campos dos Goytacazes, p.15, 2011.
- 17 ZIMMERMANN, A. L. S. **Desenvolvimento e avaliação de micropartículas contendo microrganismos viáveis utilizados como bioinseticida.** Tese de doutorado em Produção e Controle Farmacêuticos – USP. São Paulo, p.14, 2001.

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-216-6

