

## PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS (COV's) POR *Phormidium* sp. EM BIORREATORES HETEROTRÓFICOS

A. B. SANTOS<sup>1</sup>, A. S. FERNANDES<sup>1</sup>, M. B. FAGUNDES<sup>1</sup>, S. R. KACHUK-SILVA<sup>1</sup>, R. WAGNER<sup>1</sup>, E. JACOB-LOPES<sup>1</sup>, L. Q. ZEPKA<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Maria, Departamento Tecnologia e Ciência dos Alimentos  
E-mail para contato: lqz@pq.cnpq.br

**RESUMO** – A elucidação da fase gasosa do sistema de cultivo heterotrófico é importante na consolidação da tecnologia para a exploração industrial. O objetivo do trabalho foi avaliar a produção de COV's pela microalga *Phormidium* sp. em cultivo heterotrófico empregando glicose como fonte de carbono. Os experimentos foram realizados em biorreator descontínuo com aeração contínua e ausência de luminosidade. Os COV's foram isolados por microextração em fase sólida (fibra DVB/Car/PDMS), analisados por cromatografia gasosa acoplada a um detector de massas (SPME-GC-MS). A amostragem foi realizada a cada 24 horas no período de 7 dias correspondendo as fases de crescimento. Foram identificados 54 compostos, como álcoois (36,7%), cetonas (28,6%), e aldeídos (6,2%), sendo os picos majoritários identificados como acetaldeído, 3-hidroxi-2-butanona e 3-metil-1-butanol.

### 1. INTRODUÇÃO

As microalgas são importantes recursos biológicos devido seu grande potencial para aplicações biotecnológicas e isolamento de produtos naturais bioquimicamente ativos (Borowitzka, 2013; Burja *et al.*, 2001). O gênero *Phormidium* sp. é uma cianobactéria filamentosa não ramificada que pode ser encontrada em solos, rochas úmidas, lamas, plantas aquáticas e algumas espécies em ambientes extremos como os solos de desertos (Guiry & Guiry, 2013; Thomazeu *et al.*, 2010). Estes microrganismos são principalmente fotoautotróficos, mas um grande número deles possuem a habilidade de manter sua estrutura na ausência de luz, sendo assim capaz de crescer heterotroficamente, mantendo-se a partir da assimilação de substratos orgânicos (Wen & Chen, 2003). A cianobactéria em questão, faz parte deste grupo com potencial de exploração do metabolismo heterotrófico.

A utilização do cultivo heterotrófico elimina requisitos de luminosidade e pode aumentar consideravelmente as taxas de crescimento de massa celular, além de permitir a utilização de qualquer fermentador como um biorreator o que possibilita uma significativa redução de custos para a maioria dos processos devido a simplicidade de operação (Morales-Sánchez *et al.*, 2013; Cheng *et al.*, 2009; Perez-Garcia *et al.*, 2011). A habilidade das microalgas em utilizar substratos orgânicos para manutenção da existência representa uma alternativa no direcionamento da obtenção de compostos

não obtidos em cultivos convencionais fotossintéticos, além de vantagens como a simplificação de operações unitárias do processo. Esse tipo de produção é suportada por carboidratos como glicose, frutose e sacarose (Perez-Garcia *et al.*, 2011; Minerdi *et al.*, 2009). As características qualitativas e quantitativas dos compostos orgânicos voláteis em microalgas são altamente influenciadas pelos parâmetros do sistema de cultivo.

É conhecido a partir de estudos ecofisiológicos que as microalgas produzem uma grande variedade de COVs que podem influenciar o aroma da biomassa (Draaisma *et al.*, 2013). A técnica de extração por SPME é considerada eficaz e têm sido amplamente aplicada para a extração de compostos orgânicos voláteis e semivoláteis de amostras biológicas e produtos alimentares (Durme *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2009). A caracterização da fração volátil dos biorreatores pode contribuir para o estabelecimento das rotas de bioconversão dos substratos, além de possibilitar a identificação de aplicações potenciais dos bioprodutos formados (Jacob-Lopes *et al.*, 2010). O trabalho teve por objetivo avaliar a produção de COV's pela microalga *Phormidium* sp. em cultivo heterotrófico empregando glicose como fonte de carbono.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Micro-organismo, meio de cultura, manutenção e propagação do inóculo.

A cianobactéria utilizada foi a *Phormidium* sp., isolada do Deserto Cuatro Sierras no México (26°59' N 102°03 W). As culturas reservas foram mantidas e propagadas em agar-agar solidificado (20g.L<sup>-1</sup>) com meio sintético BG11 (RIPPKA *et al.*, 1979) que possui a composição: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.03g.L<sup>-1</sup>), MgSO<sub>4</sub> (0.075g.L<sup>-1</sup>), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0.036g.L<sup>-1</sup>), citrato de amônio e ferro (0.0006g.L<sup>-1</sup>), Na<sub>2</sub>EDTA (0.001 g.L<sup>-1</sup>), NaCl (0.00072g.L<sup>-1</sup>), NaNO<sub>3</sub> (0.015g.L<sup>-1</sup>), ácido cítrico (0.0006g.L<sup>-1</sup>), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.5g.L<sup>-1</sup>), metais traços [H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0.0028g.L<sup>-1</sup>), MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (0.0018g.L<sup>-1</sup>), ZnSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O (0.00022g.L<sup>-1</sup>), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (0.00039g.L<sup>-1</sup>), CoSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O (0.00004g.L<sup>-1</sup>)]. As condições de manutenção usadas foram 25°C e intensidade luminosa constante de 1klux.

### 2.2 Cultivo Heterotrófico Microalgal

Os experimentos foram realizados em um reator de coluna de bolhas. O sistema foi construído de vidro de borosilicato com diâmetro externo de 12.5 centímetros e altura de 16 centímetros, com razão altura/diâmetro proporção igual a 1.28 e um volume nominal de 2.0L. O sistema de dispersão do reator consistiu em um difusor de ar com 2.5 centímetros de diâmetro localizado no interior do bioreator. O fluxo de ar controlado pelo medidor de fluxo (KI-Key Instruments®, Treviso, PA, EUA) e a entrada de ar e a saída de gases serão filtrados com unidades filtrantes constituídas de membrana de polipropileno, com um diâmetro de poro de 0.22 µm e o diâmetro total de 50mm (Millex FG®, Billerica, MA, EUA).

O biorreator, incluindo unidades filtrantes foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 40 minutos. Os experimentos foram realizados em biorreatores em regime de batelada, alimentado com 2.0L de meio de cultura. As condições experimentais foram as seguintes: concentração inicial do inóculo de 100 mg/L, a temperatura de 26°C, o pH ajustado para 7.6, aeração de 0,1 VVM (volume de

ar por volume de cultura por minuto) em ausência de luz. A concentração de glicose foi ajustada a concentração de  $12,5\text{gL}^{-1}$ .

### 2.3 Determinação de Compostos Orgânicos Voláteis

Os compostos voláteis formados no bioprocessamento foram isolados pela técnica de microextração em fase sólida aplicada em headspace (HS-SPME). A amostragem realizada no tempo zero e a cada 24h durante o crescimento celular. A fibra de SPME de revestimento misto empregada foi a DVB/Car/PDMS (divinilbenzeno/Carboxen/polidimetilsiloxano;  $50/30\mu\text{m} \times 20\text{ mm}$ , Supelco Bellefonte, PA, USA), pré-condicionada conforme as recomendações fornecidas pelo fabricante. A temperatura de extração de  $40^\circ\text{C}$ , com um tempo de equilíbrio de 5 minutos, após exposição da fibra por 45 minutos. A análise dos compostos voláteis foi realizada em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC/MS Shimadzu QP-2010 Plus). As separações cromatográficas em coluna Chrompack WAX 52-CB ( $60\text{ m} \times 0,25\text{ mm d.i.} \times 0,25\mu\text{m}$  de diâmetro de fase estacionária). O gás de arraste utilizado foi o hélio com vazão constante de  $1,6\text{ mL min}^{-1}$ . A temperatura inicial da coluna de  $35^\circ\text{C}$ , permanecendo por 5 minutos, após elevada até  $220^\circ\text{C}$  com gradiente de temperatura de  $5^\circ\text{C/min}$ , mantendo-se isotermicamente por 5 minutos. A interface GC/MS e da fonte de ionização foram mantidos a  $250^\circ\text{C}$ . O detector de massas foi operado no modo de ionização por elétrons, com feixe de elétrons a  $+70\text{ eV}$ . O analisador de massas do tipo quadrupolos foi utilizado no modo de varredura na faixa de 35 a 350 m/z. Os compostos foram identificados primeiramente por comparação dos seus espectros de massa com os do banco de dados espectral da própria biblioteca do GC-MS (NIST MS Search 2.0). A identificação foi confirmada por comparação dos Índices de Retenção Linear calculados.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os COVs identificados estão expressos na Tabela 1, juntamente com seus índices de retenção e porcentagem da área relativa dos picos. Foram identificados, na fase gasosa dos biorreatores heterotróficos microalgais, um total de 54 compostos, distribuídos entre aldeídos, álcoois, cetonas, éteres, ésteres e hidrocarbonetos. O tempo de residência de 96h corresponde ao período das maiores taxas de formação destas biomoléculas.

Tabela 1 - Compostos orgânicos voláteis (COVs) detectados por GC/MS, índices de retenção linear (IR) e área relativa dos picos (%).

Pico	Composto	IR	Área Relativa (%)		
			0h	96h	144h
01	Éter Dietílico	612	36,0	6,4	1,6
02	Éter metil-terc-butílico	635	6,7	2,4	0,9
03	Acetoaldeído	648	*nd	1,4	1,3
04	Octano	806	0,8	0,1	0,1
05	Isobutanal	826	*nd	0,1	0,1
06	Butanal	895	*nd	0,1	0,1

07	Acetato de Etila	905	2,4	1,3	1,3
08	2-Butanona	921	1,3	1,1	1,2
09	3-Metil-2-butanona	933	*nd	0,1	0,1
10	Álcool Isopropílico	948	*nd	2,1	2,8
11	2-Pentanona	996	2,4	4,9	7,5
12	2,3-Butanodiona	1002	1,3	1,9	1,9
13	4-Metil-2-pentanona	1025	*nd	0,2	0,1
14	Acetonitrila	1027	*nd	0,9	1,2
15	Trimetilsilanol	1039	1,8	0,1	0,1
16	Isobutanol	1115	1,9	2,8	3,6
17	Acetato de Isoamila	1134	*nd	0,1	0,1
18	2,3-Hexanodiona	1149	*nd	0,1	*nd
19	2-Pentanol	1151	*nd	0,4	1,7
20	2-Heptanona	1193	*nd	0,1	0,1
21	Álcool Isoamílico	1228	2,1	0,6	*nd
22	3-Octanona	1263	2,0	0,3	4,2
23	3-metil Butenol	1269	*nd	2,1	1,8
24	3-Hidroxi 2-butanona	1411	*nd	12,0	7,0
25	1-Hidróxi 2-Propanona	1435	*nd	0,4	*nd
26	6-metil 5-Hepten-2-ona	1451	0,9	0,4	1,2
27	Hexanol	1466	1,8	0,5	0,9
28	Metil 2-Hidroxi isovalerato	1516	*nd	1,3	1,1
29	2-Butoxietanol	1520	0,8	0,4	0,4
30	2-Metil-3(2H)Furanona	1536	*nd	19,0	16,0
31	Heptanol	1569	1,1	0,8	0,7
32	Ácido Acético	1572	*nd	9,9	7,8
33	2 Etil Hexanol	1601	5,6	2,4	1,8
34	Decanal	1616	3,4	2,7	2,0
35	Etil 3-hidroxibutirato	1645	*nd	0,6	1,3
36	Mercaptoetanol 2-etil	1662	*nd	1,1	1,5
37	Octanol	1675	1,9	0,8	0,6
38	Ácido Propanóico 2-metil	1686	*nd	1,8	2,8
39	Ácido Butanóico	1751	*nd	4,9	10,0
40	D-Neoisomentol	1762	1,6	0,8	0,2
41	Nonanol	1779	2,9	1,6	0,9
42	Ácido Isovalérico	1790	*nd	2,4	6,1
43	Acetofenona	1796	9,0	1,3	1,2
44	Heptadecano	1810	4,2	0,6	0,8
45	Decanol	1882	1,0	*nd	*nd
46	2-Fenilisopropanol	1890	1,8	0,8	0,9

<b>47</b>	Formamida,N,N,dibutil	1918	0,9	0,2	0,4
<b>48</b>	Acetato de Fenetila	1945	*nd	0,9	0,9
<b>49</b>	Álcool Benzílico	2005	0,8	0,3	0,1
<b>50</b>	Dodecanol	2059	1,4	0,6	0,6
<b>51</b>	Benzotiazol	2081	0,6	0,2	0,1
<b>52</b>	3-Buten-2-ona 4-(2,2,6-trimetil)	2096	0,8	0,1	*nd
<b>53</b>	Álcool Fenetílico	2102	0,9	0,3	0,4
<b>54</b>	Ácido Hexanodióico	2330	*nd	1,4	0,7

\*não detectado.

A ocorrência da maior parte dos produtos voláteis pode ser atribuída a composição da biomassa microalgal. Do total de compostos identificados, as principais classes de compostos foram álcoois (37,04%), cetonas (25,92%), ácidos (9,26%) e aldeídos (7,41%). Inicialmente, foram detectados 30 compostos, sendo o éter dietílico, éter metil-terc-butílico e acetofenona os compostos de maior área respectivamente. Em 144 horas, ao fim do experimento, foram encontrados 49 compostos, desses os majoritários foram 2-metil-3(2H) furanona, os ácidos butanoico e acético.

Durante as análises, vinte e quatro compostos foram formados ao longo de 144h, destacaram-se as cetonas (29,17%), ácidos (20,83%) e álcoois (16,67%). Cinco compostos desapareceram, sendo esses: 1-decanol, álcool isoamílico, 2,3-hexanodiona, 1-hidroxi-2-propanona e 2-buten-2-ona-4(2,2,6-trimetil). Durme et al. (2013) avaliaram a composição volátil de microalgas e como compostos predominantes encontraram aldeídos, cetonas e álcoois, mostrando-se assim similar aos resultados obtidos dos biorreatores heterotróficos de *Phormidium* sp.. A caracterização volátil de biorreatores microalgais é de grande importância não somente para a elucidação das rotas metabólicas, bem como para a obtenção de biomoléculas que podem ter amplo uso em diversos segmentos industriais.

## CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos foi possível observar elevadas taxas de produção de álcoois, cetonas, ácidos e aldeídos em cultivos heterotróficos microalgais. A identificação destes compostos contribui para o conhecimento do metabolismo microalgal, abrindo possibilidades de exploração comercial destes metabólitos secundários.

## 5. REFERÊNCIAS

- BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*, v. 25, p. 743-756, 2013.
- BURJA, A. M; BANAIGS, E. B.; MANSOUR, A.; BURGESS, J. G.; WRIGHT, P. C. Marine Microalgae: a prophetic source of natural products. *Tetrahedron*, v. 57, p. 9347-9377, 2001.
- CHENG, Y.; ZHOU, W.; GAO, C.; LAN, K.; GAO, Y.; WU, Q. Biodiesel production from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tuber by heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*. *Journal of Chemistry and Technology Biotechnology*, v. 84, p. 777-781, 2009.

- DRAAISMA, R. B.; WIJFFELS, R. H.; SLEGERS, P. M.; BRENTNER, L. B., ROY, A.; BARBOSA, M. S. Food commodities from microalgae. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 24, p. 169-177, 2013.
- DURME, J. V.; GOIRIS, K.; DE WINNE, A.; DE COOMAN, L.; MEYLAERT, K. Evaluation of the volatile composition and sensory properties of five species of microalgae. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 61, p. 10881-10890, 2013.
- GUIRY, M. D.; GUIRY, G.M. *AlgaeBase*. World-wide eletronic publication, National University of Ireland, Galway, 2013. <http://www.algaebase.org>; pesquisa realizada em 09 de dezembro de 2013.
- JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C. H. G.; QUEIROZ, M. I.; FRANCO, T. T. Biotransformations of carbon dioxide in photobiorreactors. *Energy Conversion and Management*, v. 51, p. 894-900, 2010.
- MINERDI, D.; BOSSI, S.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Volatile organic compounds; a potential direct long distance mechanism for antagonistic action of *Fusarium oxysporum* strain MAS 35. *Environmental Microbiology*, v. 11, p. 844-854, 2009.
- MORALES-SÁNCHEZ, D.; TINOCO-VALENCIA, R.; MARTINEZ, A. Heterotrophic growth of *Neochloris oleoabundandans* using glucose as a carbon source. *Biotechnology for Biofuels*, v. 6, p. 1-12, 2013.
- PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, v. 45, p. 11-36, 2011.
- THOMAZEU, S.; HOUDAN-FOURMONT, A.; COUTÉ, A.; DUVAL, C.; COULOUX, A.; ROSSEAU, F.; BERNARD, C. The contribution of sub-Saharan African strains to the phylogeny of cianobacteria focusing on the Nostocaceae (*Nostocales*, *cyanobacteria*). *Journal of Phycology*, v.46, p. 564-579, 2010.
- WEN, Z.Y.; CHEN, F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances*, v. 21, p. 273-294, 2003.
- ZHANG, Z.; LI, T.; WANG, D.; ZHANG, L.; CHENG, G. Study on the colatile profile characteristics of oyster *Crassostrea gigas* during storage by a combination sampling method coupled with GC/MS. *Food Chemistry*, v. 115, p. 1150-1157, 2009.