

DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS MICROALGAIS EM FUNÇÃO DA CURVA CINÉTICA DE CRESCIMENTO

PINHEIRO, P. N.¹; VIEIRA, K. R.¹; NEUENFELDT, N. H.¹; JACOB-LOPES, E.¹; ZEPKA, L. Q.¹

¹ Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Ciência e Tecnologia em Alimentos
e-mail para contato: lqz@pq.cnpq.br

RESUMO – O objetivo do trabalho foi investigar o comportamento da fração volátil em diferentes fases de crescimento celular durante o cultivo heterotrófico de *Phormidium autumnale*. Os experimentos foram realizados em biorreator descontínuo com aeração contínua e ausência de luminosidade. Os compostos orgânicos voláteis foram isolados por microextração em fase sólida no headspace, analisados por cromatografia gasosa acoplada a um detector de massas (SPME-GC-MS). A amostragem foi realizada a cada 24 horas no período de 144 horas correspondendo às fases de crescimento microalgal. A análise dos resultados cinéticos apresentaram uma densidade máxima celular de 1050 mg.L⁻¹ obtendo uma produtividade de biomassa de 13,19 mg.L⁻¹.h⁻¹, com uma velocidade específica máxima de crescimento celular 0,02h⁻¹. Foram identificados 44 compostos ao longo das fases exponenciais, estacionária e de declínio, sendo que os majoritários foram Benzotiazol (28,78 µ.L⁻¹; 29,18 µ.L⁻¹; 44,38 µ.L⁻¹), Ftalato de diisobutilo (17,58 µ.L⁻¹; 12,88 µ.L⁻¹; 25,98 µ.L⁻¹) e o 2-Nonanone (1,1 µ.L⁻¹; 4,77 µ.L⁻¹; 7,74 µ.L⁻¹).

1. INTRODUÇÃO

As microalgas produzem uma vasta gama de metabólitos secundários de grande importância econômica, o cultivo dessas espécies está associado à diversidade da composição química, o potencial de crescimento em um biorreator com condições controladas e a sua capacidade de produzir estes metabólitos ativos em resposta ao estresse induzido por condições extremas de exposição (Plaza *et al.*, 2009).

A *Phormidium autumnale* é apontada como uma espécie em potencial no tratamento de efluentes em sistemas que empregam microalgas, devido a sua tolerância a determinadas condições como temperaturas extremas e concentrações elevadas de nutrientes (SU *et al.*, 2012), estas condições podem conferir estresse as microalgas levando-as produzir metabólitos secundários e excretá-las no meio (Shipin & Meiring, 2005).

Compostos orgânicos voláteis (COV) são metabólitos secundários obtidos a partir de microalgas que poderiam ser usados como fonte alternativa de produtos farmacêuticos, aromas e fragrâncias a baixo custo (Havel & Weuster-Botz, 2006), a utilização plena da fração volátil da biomassa microalgal pode representar uma melhor oferta de produtos para os diferentes tipos de indústrias (Santos *et al.*, 2016).

Um volume considerável de informações a respeito dos metabólitos de microalgas tem sido gerado por décadas, porém pouco se relata sobre os eventos metabólicos complexos durante o crescimento e desenvolvimento das microalgas. Assim o objetivo do trabalho foi

investigar o comportamento da fração volátil em diferentes fases de crescimento celular durante o experimento microalgal quando cultivada em água residuária.

2. MATERIAL E MÉTODOS

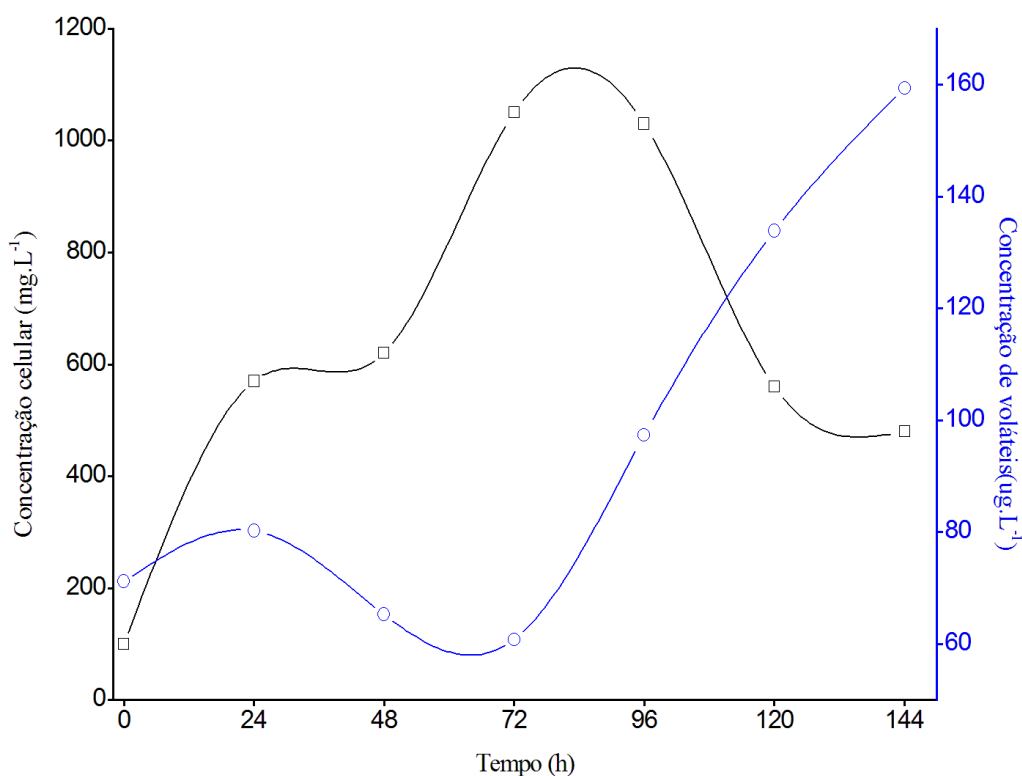
A microalga utilizada foi a *Phormidium autumnale* adaptada e mantida em água residuária diluída com meio sintético BG11 (Rippka *et al.*, 1979), solução 1:1. A condição de manutenção utilizada foi de 25°C com intensidade luminosa constante de 1klux. O experimento foi realizado em reator de coluna de bolhas. O sistema foi construído de vidro de borosilicato com diâmetro externo de 12,5 cm e altura de 16 cm, com razão altura/diâmetro proporção igual a 1,28 e um volume nominal de 2,0L, a dispersão do reator consistiu em um difusor de ar com 2,5 centímetros de diâmetro localizado no interior do biorreator. O fluxo de ar controlado pelo medidor de fluxo (KI-Key Instruments®,Trevose,PA, EUA) e a entrada de ar e a saída de gases foi filtrado com unidades filtrantes constituídas de membrana de polipropileno, com um diâmetro de poro de 0,22 μm e o diâmetro total de 50 mm (Millex FG[®], Billerica, MA, EUA). O biorreator juntamente com as unidades filtrantes, foi esterilizado em autoclave a 121°C durante 20 minutos. O experimento foi realizado em biorreator com regime de batelada, alimentado com 2,0 L de água residuária, oriundas do abate e processamento de aves e suínos. As condições experimentais foram as seguintes: concentração inicial do inóculo de 100 mg.L⁻¹, a temperatura de 25°C, o pH ajustado para 7,6, aeração de 1 VVM (volume de ar por volume de meio por minuto), ausência de luz e relação C/N (carbono/nitrogênio) de 30. A amostragem foi realizada no tempo zero e a cada 24h durante o crescimento celular totalizando um tempo de residência celular de 144h. A concentração celular foi determinada gravimetricamente por filtração de um volume conhecido de cultura através de um filtro de membrana de 0,45 μm (MILLEX FG, BILLERICA-MA, EUA) e secagem a 60°C. As experiências foram realizadas em duplicada. Portanto, os dados referem-se ao valor médio das repetições. Os compostos voláteis formados no bioprocessamento foram isolados pela técnica de micro extração em fase sólida aplicada em headspace (HS-SPME). A fibra de SPME de revestimento misto empregada foi a DVB/Car/PDMS (50/30 μm ×20 mm, Supelco Bellefonte, PA, USA), pré-condicionada conforme as recomendações fornecidas pelo fabricante. A temperatura de extração de 40°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 foram feitas em coluna capilar de sílica fundida DB-Wax, com 60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,25 μm de espessura de película (Chrompack Wax 52- CB). O gás de arraste utilizado foi o hélio com vazão constante de 1,6 ml.min⁻¹. A temperatura inicial da coluna de 35°C, permanecendo por 5 minutos, após elevada até 220°C com gradiente de temperatura de 5°C/min, mantendo-se isotermicamente por 5 minutos. A interface GC/MS e da fonte de ionização foram mantidos a 250°C. O detector de massas foi operado no modo de ionização por elétrons, com feixe de elétrons a +70 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 por comparação dos seus espectros de massa com os dados da biblioteca do GC-MS (NIST MS Search 2.0), paralelo à comparação dos índices de Retenção Linear calculados.

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra a curva de crescimento celular durante o cultivo heterotrófico, as fases exponencial (0h-96h), estacionária (96h-120h) e de declínio (120h-144h). Os dados cinéticos obtidos durante o experimento foram, densidade máxima celular de 1050 mg.L^{-1} obtendo uma produtividade de biomassa de $13,19 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, com uma velocidade máxima específica de crescimento celular $0,02\text{h}^{-1}$.

A Figura 1 também mostra a concentração total dos compostos orgânicos voláteis (COVs) formados durante as fases de crescimento celular no decorrer do experimento. A formação dos compostos voláteis foi observada a partir da fase exponencial apresentando a maior concentração durante a fase de declínio, isso pode sugerir que a concentração e disponibilidade de nutrientes do meio externo pode afetar o metabolismo secundário das microalgas (Xu *et al.*, 2017).

Figura 1 - Curva de crescimento celular correlacionado com a concentração dos compostos voláteis ao longo do experimento.



Concentração celular da biomassa microalgas (cor preta); concentração de COVs (cor azul).

A queda na produção dos voláteis observada na transição de fase exponencial para estacionária poderia ser explicada com um descompasso metabólico com o estado nutricional

(Vidoudez & Pohnert, 2012; Kolber *et al.*, 1988) e a eficiência na formação voltou após a adaptação do metabolismo celular.

Durante o experimento foi identificado 44 compostos, os que apresentam maior interesse comercial estão listados na Tabela 1, que mostra os valores quantitativos em função da fase de crescimento do microorganismo.

Tabela 1 - Compostos voláteis detectados por GC / MS com seus índices de kovats e o seu interesse industrial.

Composto	Índice de kovats	Fase Exponencial [μ/L]	Fase Estacionária [μ/L]	Fase Declínio [μ/L]	Classe	Aplicação industrial
Limoneno	1182	81,78	14,81	-	Terpeno	Biosolvente
2-Nonanone	1272	1,1	4,77	7,74	Cetona	Fragrância
Mentol	1642	17,20	9,97	5,12	Álcool	Aromatizante
Benzotiazol	1896	28,78	29,18	44,38	Nitrogenado	Farmacêutica
Benzofenona	2437	10,05	7,21	6,63	Cetona	Fragrância
Ftalato de diisobutilo	2477	17,58	12,88	25,98	Ester	Plastificante

A cinética de formação dos voláteis durante as diferentes etapas de crescimento foi bastante diferenciada entre si. Taxas elevadas de terpenos foram observadas durante o crescimento exponencial e um declínio acentuado na fase de crescimento estacionário, esse fato pode sugerir que houve a interrupção na formação de certos compostos desta classe, isso pode estar envolvido no esgotamento do precursor que não pode ser sintetizado no escuro (Juttner *et al.*, 1983).

4. CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que as principais fases de crescimento celular para a formação dos compostos orgânicos voláteis em biorreator heterotrófico com água residuária foram à fase exponencial e de declínio.

5. REFERÊNCIAS

- HAVEL, J. AND WEUSTER-BOTZ, D. Comparative study of cyanobacteria as biocatalysts for the asymmetric synthesis of chiral building blocks. *Eng Life Sci*, 6, p.175–179, 2006.
- JUTTNER, F. L. AND MOHREN, S.; Environmental Factors Affecting the Formation of Mesityl oxide, Dimethylallylic Alcohol and Other Volatile Compounds Excreted by *Anabaena cylindrica*. *Journal of General Microbiology*, 129, p.407- 412, 1983.
- PLAZA, M.; HERRERO, M.; CIFUENTES A. A.; IBÁÑEZ, E. Innovative natural functional ingredients from microalgae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (16), p.7159-7170, 2009.

- POHNERT, G. AND VIDOUEZ, C.; Comparative metabolomics of the diatom *Skeletonema marinoi* in different growth phases. *Metabolomics*, 8, p.654- 669, 2012.
- RIPPKA, R.; DERUELES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STANIER, R.Y. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal of General and Microbiology*, 111, p.1-61, 1979.
- SANTOS, A.B.; FERNANDES, A.F.; WAGNER, R.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q. Biogenesis of volatile organic compounds produced by *Phormidium autumnale* in heterotrophic bioreactor. *Journal of Applied Phycology* 1, p.1-10, 2016.
- SHIPIN, O. AND MEIRING, P. Pond(s) integrated with trickling filter and activated sludge processes. *Pond Treatment Technology*, London, 2005.
- SU, Y.; MENNERICH, A.; URBAN, B. Comparison of nutrient removal capacity and biomass settleability of four high-potential microalgal species. *Bioresource Technology*, 124, p.157-162, 2012.
- XU, Q. ; YANG, L. ; YANG, W. ; BAI, Y. ; HOU, P. ; ZHAO, J. ; ZHOU, L. ; ZUO, Z. Volatile organic compounds released from *Microcystis flos-aquae* under nitrogen sources and their toxic effects on *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 135, p.191–200, 2017.