

Prospecção de compostos químicos de valor agregado em amostras de glicerina de palma e de soja biotransformadas por microrganismos

Augusto Lopes Souto¹, Andréia Aparecida Jacomassi Carneiro², Rodrigo Wesley Nascimento de Melo³, José Antônio de Aquino Ribeiro⁴, Patrícia Pinto Kalil Goncalves Costa⁵, Thaís Fabiana Chan Salum⁶, Thaís Demarchi Mendes⁷, Léia Cecília de Lima Fávaro⁸, Mônica Caraméz Triches Damaso⁹, Patrícia Verardi Abdelnur¹⁰, Clenilson Martins Rodrigues¹¹

Resumo

A glicerina, coproduto da produção de biodiesel, pode ser obtida por processos de transesterificação de óleos de plantas como soja e palma. Com o aumento mundial da produção de biodiesel, torna-se importante prospectar novas aplicações tecnológicas para agregar valor ao coproduto gerado. A proposta deste trabalho foi avaliar, com o uso de técnicas de espectrometria de massas e cromatografia líquida, o desempenho de fungos filamentosos quanto à bioconversão de glicerina de soja e palma em compostos químicos de valor agregado. Amostras de diferentes tipos de glicerina bioconvertidas foram analisadas por *fingerprinting* MS utilizando-se a técnica de espectrometria de massas por infusão direta (DIMS) e por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a detector evaporativo de espalhamento de luz (UHPLC-ELSD) para identificação e quantificação dos compostos químicos formados. Para interpretação dos dados obtidos pela análise espectrométrica, foi realizada a análise multivariada de dados, utilizando-se como método estatístico, a análise de componente principal. Dessa forma, pôde-se detectar de maneira eficiente,

¹ Farmacêutico, doutor em Produtos Naturais, Universidade Federal da Paraíba, augusto.souto@colaborador.embrapa.br

² Bióloga, doutora em Microbiologia Aplicada, Universidade Estadual Paulista, andrea.jacomassi@colaborador.embrapa.br

³ Graduando em Química, Universidade Católica de Brasília, rodwesley1995@gmail.com

⁴ Farmacêutico, mestre em Ciências Farmacêuticas, analista da Embrapa Agroenergia, jose.ribeiro@embrapa.br

⁵ Química, mestre em Química Orgânica, analista da Embrapa Agroenergia, patricia.costa@embrapa.br

⁶ Farmacêutica, doutora em Ciências (Bioquímica), pesquisadora da Embrapa Agroenergia, thais.salum@embrapa.br

⁷ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, analista da Embrapa Agroenergia, thais.demarchi@embrapa.br

⁸ Bióloga, doutora em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, leia.favaro@embrapa.br

⁹ Engenheira química, doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, monica.damaso@embrapa.br

¹⁰ Química, doutora em Química Orgânica, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.abdelnur@embrapa.br

¹¹ Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, clenilson.rodrigues@embrapa.br

fungos produtores de compostos de valor agregado, como polióis do tipo C6. Porém, quando as amostras foram analisadas por UHPLC-ELSD, não foi possível confirmar a produção dos polióis, embora após 10 dias de cultivo, todo o glicerol, fonte de carbono, tenha sido consumido, independentemente da glicerina utilizada. Portanto, acredita-se que os fungos o tenham utilizado, principalmente, para crescimento, e que a quantidade de polióis produzida seja inferior aos limites de detecção e quantificação do método cromatográfico aplicado.

Introdução

O biodiesel é um biocombustível obtido a partir de reação de transesterificação de óleos vegetais ou gordura animal com metanol na presença de um catalisador. Nessa reação, há a produção do coproduto conhecido como glicerina (SILVA et al, 2009). A produção de glicerina tem aumentado em virtude do crescimento da produção de biodiesel no mundo, o que proporcionou uma redução no preço desse coproduto no mercado (DHAMARDI et al., 2006). A fim de incrementar a cadeia de produção do biodiesel, estudos na área biotecnológica têm abordado diferentes estratégias para biotransformar a glicerina em produtos de valor agregado (BOZELL; PETERSEN, 2010).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi utilizar técnicas analíticas instrumentais para prospectar microrganismos capazes de biotransformar a glicerina em compostos químicos de alto valor agregado, assim como avaliar a influência de glicerina de diferentes procedências nessa biotransformação, a partir da análise dos compostos gerados via espectrometria de massas e análise multivariada de dados.

Material e métodos

Bioconversão utilizando gliceras brutas

Neste trabalho, foram utilizados dois tipos de glicerina bruta: (a) glicerina gerada na Embrapa Agroenergia, proveniente da produção de biodiesel de óleo de palma; (b) glicerina proveniente da produção de biodiesel de óleo de soja, gentilmente cedido pela empresa Cesbra.

Os experimentos de bioconversão foram realizados em frascos *Erlenmeyers* de 250 mL, contendo 50 mL de meio de Mandels e Weber (1969), sem adição de Tween 80, e glicerina bruta de palma ou de soja (3%) como única fonte de

carbono. O pH dos meios foi ajustado para 6,0 e foram esterilizados a 121 °C por 20 minutos. Os meios foram inoculados com 4 discos de 0,8 cm de diâmetro, contendo os fungos filamentosos crescidos em meio de adaptação (constituído de Yeast Nitrogen Base 6,7 g/L, ágar 15,0 g/L e glicerina 4%, v/v), e em seguida incubados em agitador rotatório a 120 rpm e 30 °C, por 10 dias, em triplicata. Foram utilizados 7 fungos para inoculação com glicerina de soja e 8 fungos para inoculação com glicerina de palma, os quais foram selecionados obedecendo a critérios como: o valor do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) em meios de cultivo contendo glicerina como única fonte de carbono e pela diversidade das espécies. Alíquotas (1 mL) dos experimentos e dos controles (sem o inóculo), foram retiradas no 5º e no 10º dia de cultivo e centrifugadas por 5 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante foi utilizado para as análises cromatográficas e de espectrometria de massas, visando avaliar a produção de químicos de valor agregado.

Espectrometria de massas por infusão direta

As amostras de bioconversão da glicerina de palma e de soja (Cesbra) por diferentes fungos filamentosos foram primeiramente homogeneizadas em vortex por 10 segundos, em seguida, as amostras foram diluídas mil vezes em metanol:água (1:1) e analisadas por espectrometria de massas por infusão direta (DIMS – *direct infusion mass spectrometry*), utilizando um espectrômetro de massas com fonte de ionização por *electrospray* e analisador TOF (*time of flight*) (Maxis 4G, Bruker Daltonics). As análises foram realizadas em modo de ionização positivo (ESI(+)-MS) utilizando formiato de sódio 1 mmol/L como calibrante. As amostras foram injetadas em triplicata para verificar a reprodutibilidade das análises. O tempo total de análise de cada amostra, incluindo o branco, calibrante e amostra, foi de 5 minutos por injeção. O pré-processamento dos dados de espectrometria de massas das amostras analisadas foi executado pelo software “*Profyle Analysys*” 2.1 (Bruker Daltonics), com calibração por HPC (*High Precision Calibration*) e normalização pelo maior valor do *bucket* analisado. A faixa de íons de interesse explorado foi de m/z 70 a 1.000, os quais foram analisados entre 1,3 e 3,5 minutos de corrida cromatográfica. Os dados tratados foram exportados no formato ASCII para o software “*The Unscrambler*” 10.0 (CAMO Process), a fim de realizar a quimiometria por meio da análise de componente principal (PCA).

Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a detector evaporativo de espalhamento de luz (UHPLC-ELSD)

Para identificação e quantificação dos compostos de valor agregado produzidos pelos microrganismos, assim como para o monitoramento do consumo de glicerol pelos microrganismos, foi utilizado um cromatógrafo a líquido, modelo Acquity H-Class UHPLC (WATERS[®]), com coluna Acquity BEH amida (1,7 μm , 2,1 x 150 mm), acoplado a detector evaporativo de espalhamento de luz (UHPLC-ELSD). Como método de eluição, foi utilizado o modo gradiente, com água e ácido trifluoracético (0,05%) representando a fase aquosa, e acetonitrila, a fase orgânica.

Resultados e discussão

Após a aquisição das análises das amostras de bioconversão dos diferentes tipos de glicerina por DIMS, foi realizado o PCA dos dados obtidos, a fim de encontrar os microrganismos mais promissores, ou capazes de biotransformar a glicerina em compostos químicos de valor agregado. A partir da confirmação de produção, feita analisando os espectros obtidos, foi realizada a confirmação e quantificação dos compostos-alvo, por experimento de coinjeção com padrões utilizando a técnica de UHPLC-ELSD.

De acordo com o PCA realizado com os dados espectrais das amostras de biotransformação de glicerina de palma, foi possível explicar 83% dos dados. Ao comparar o gráfico de *loadings* com o gráfico de *scores* (Figura 1), verificou-se que dentre as 8 linhagens estudadas, a linhagem 4 (*Trichoderma harzianum*), após 5 dias de cultivo, se destacou por produzir o íon m/z 205,0680 com maior intensidade em relação a mesma linhagem com inoculação de 10 dias (Figura 2), e que ambas demonstraram esse íon com maior intensidade em relação às demais linhagens.

Acerca do PCA das amostras de bioconversão de glicerina bruta de soja por 7 diferentes tipos de fungos, foi possível explicar 89% dos dados (Figura 3), em que as linhagens 4 e 6, ambas identificadas como *T. harzianum*, (10 dias de cultivo) se destacaram, por produzir o íon m/z 205,0680, com maior intensidade em relação às demais. A base de dados pública de metabolômica (KEGG, ChEBI, ChemSpider) indicou que o íon m/z 205,0680 é um poliol do tipo C6.

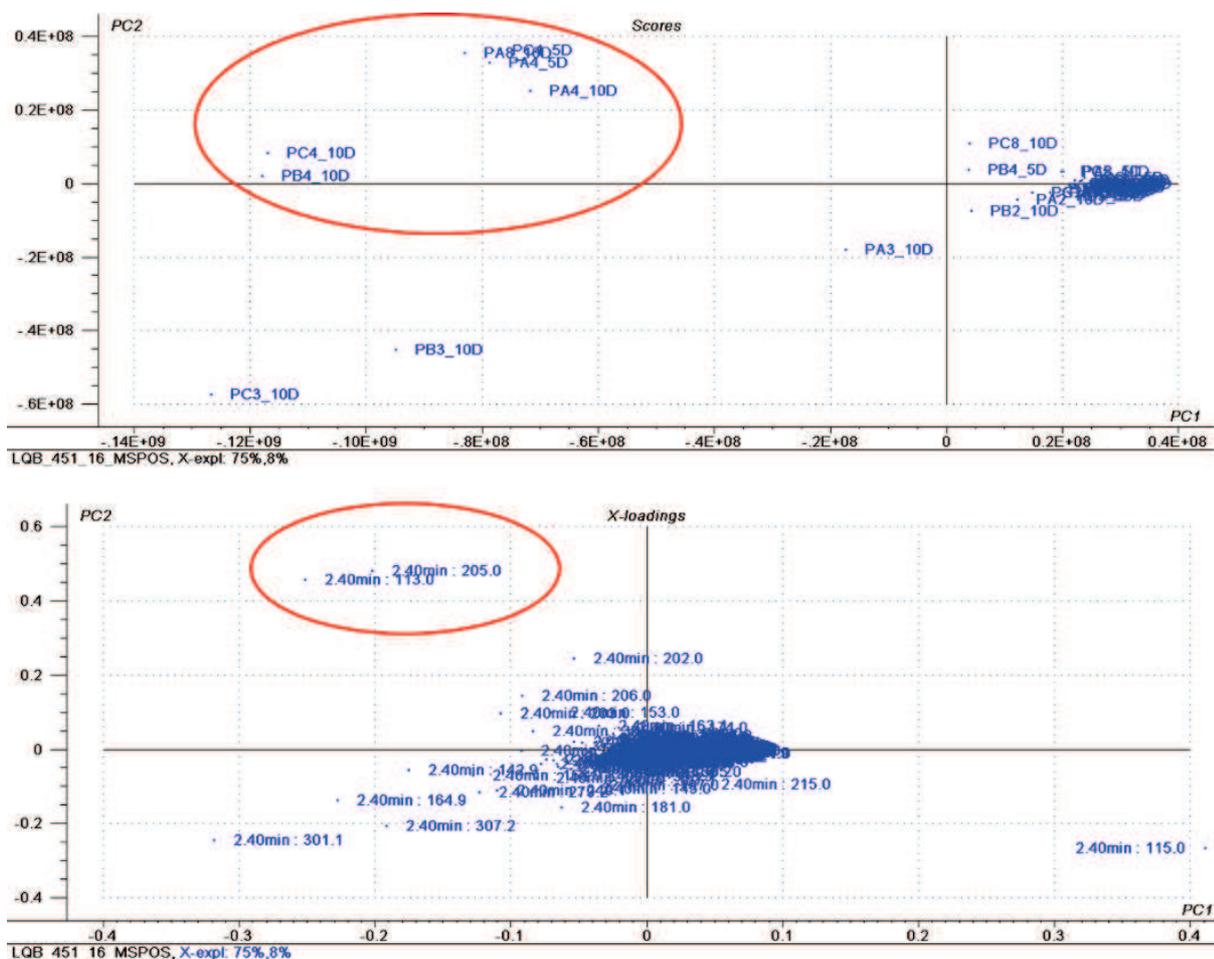


Figura 1. Gráfico de *scores* e *loadings* das amostras de bioconversão de glicerina de palma por fungos filamentosos. P: Glicerina de palma. A: Réplica A; B: Réplica B; C: Réplica C; 1: Linhagem 1; 2: Linhagem 2; 3: Linhagem 3; 4: Linhagem 4; 5: Linhagem 5; 6: Linhagem 6; 7: Linhagem 7; 5D: 5 dias de cultivo; 10D: 10 dias de cultivo.

Experimentos de quantificação, utilizando a técnica de UHPLC-ELSD não detectou glicerina nas amostras bioconvertidas pelas linhagens mais promissoras cultivadas por 10 dias, representadas pela linhagem 4, inoculada com glicerina de palma, e as linhagens 4 e 6 inoculadas com glicerina de soja, demonstrando que houve total consumo desse substrato por parte dos microrganismos. Em contrapartida, não pôde ser quantificado nenhum polioliol do tipo C6, possivelmente, em decorrência do fato de o detector de espalhamento de luz ser muito menos sensível que o detector de espectrometria de massas. Adicionalmente, isso também indica que houve uma baixa eficiência na conversão da glicerina em polioliol C6, a qual, provavelmente, foi utilizada para o crescimento dos microrganismos.

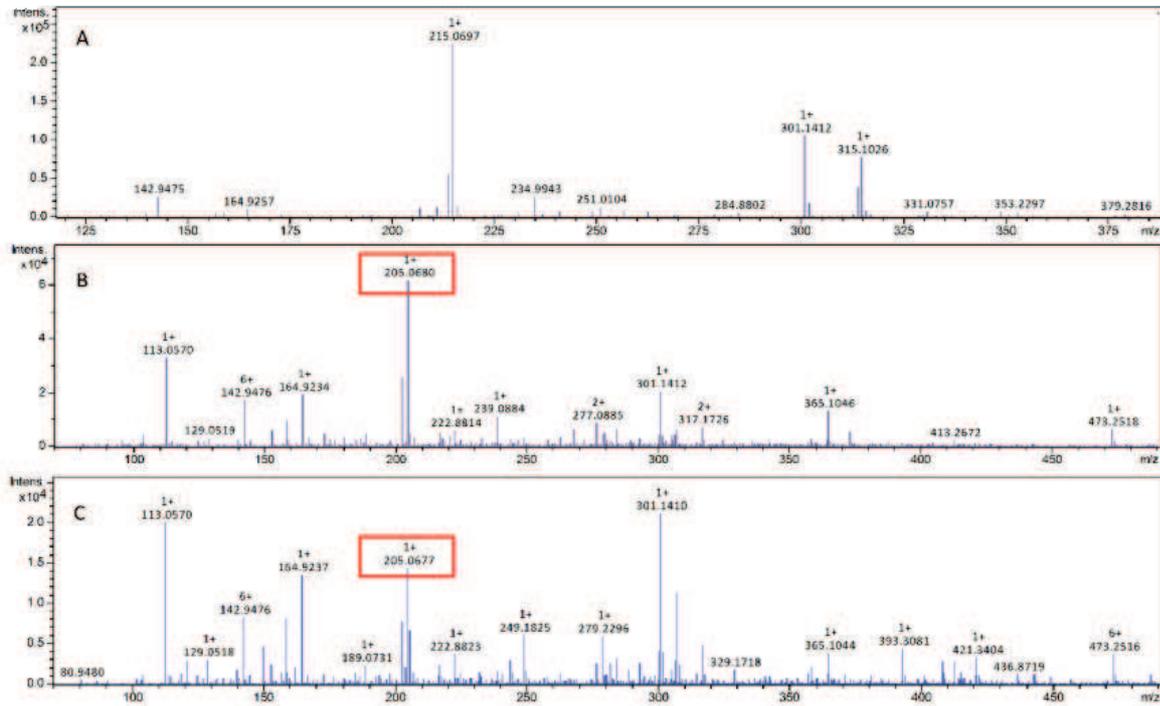


Figura 2. Espectro de massas das amostras de bioconversão de glicerina de palma por fungos filamentosos. A: Meio de cultura (branco, sem inóculo); B: Linhagem 4 com 5 dias de cultivo; C: Linhagem 4 com 10 dias de cultivo.

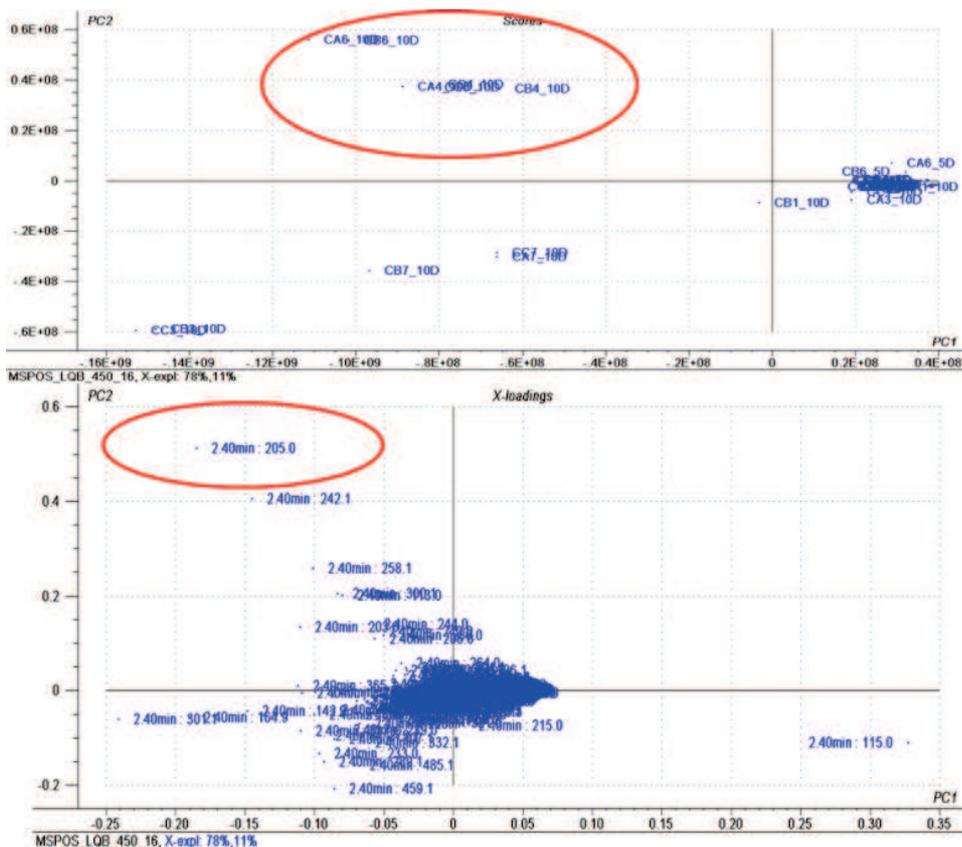


Figura 3. Gráfico de *scores* e *loadings* das amostras de bioconversão de glicerina de soja por fungos filamentosos. C: Glicerina de soja; A: Réplica A; B: Réplica B; C: Réplica C; 1: Linhagem 1; 2: Linhagem 2; 3: Linhagem 3; 4: Linhagem 4; 5: Linhagem 5; 6: Linhagem 6; 7: Linhagem 7; 5D: 5 dias de cultivo; 10D: 10 dias de cultivo.

Conclusões

O método de análise de componente principal (PCA) aplicado à análise de dados de DIMS obtidos de amostras de bioconversão de glicerina de palma e de soja possibilitou demonstrar a produção de polióis por parte dos fungos avaliados. O uso do PCA, aliado às técnicas de espectrometria de massas e UHPLC-ELSD, torna-se muito útil para a prospecção de microrganismos promissores, assim como para identificação de compostos-alvo em experimentos que envolvem bioconversão de blocos de construção, como a glicerina.

Agradecimentos

À Capes, pela bolsa de pós-doutorado; ao CNPq, pelo apoio financeiro, e à Embrapa, pela estrutura laboratorial fornecida.

Referências

- BOZELL, J. J.; PETERSEN, G. R. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates: the US Department of Energy's "Top 10" revisited. **Green Chemistry**, Cambridge, v. 12, n. 4, p. 539–554, 2010.
- DHAMARDI, Y.; MURARKA, A.; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic for metabolic engineering. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 94, n.5, p. 821–829, 2006.
- MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry**, Washington, DC, v. 95, p. 394-414, 1969.
- SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 30-39, 2009.