



Área: Engenharia de Alimentos

CULTIVO DE *Scenedesmus obliquus* EM MEIO CONTENDO CAFEÍNA EFEITOS NO CRESCIMENTO CELULAR E COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA BIOMASSA

**Gabrielle Nadal Biolchi^{a*}, Samuel Teixeira Lopes, Júlia Pedó Gutkoski, Alan Rempel,
Luciane Maria Colla**

^a Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos, Curso de Engenharia Química, Universidade de Passo Fundo, RS.

*E-mail: gabbebiolchi@gmail.com

RESUMO – O objetivo do trabalho foi avaliar o crescimento e a composição bioquímica da microalga *Scenedesmus obliquus* cultivada na presença de cafeína. Três experimentos foram realizados, sendo um ensaio controle com ausência de cafeína e outros dois com concentrações de 20 mg.L⁻¹ e 40 mg.L⁻¹ do contaminante. Os ensaios foram realizados em mesa agitadora, durante um período de 20 dias, tendo um fotoperíodo de 12/12h claro/escuro e o acompanhamento do crescimento celular foi realizado via densidade óptica a 670 nm. O maior resultado de crescimento microalgal obtido foi no ensaio controle (0,730 mg.L⁻¹), apresentando diferença estatística ($p > 0,05$) frente aos outros ensaios. Os experimentos contendo 20 e 40 mg.L⁻¹ de cafeína não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) entre si (0,637 e 0,636 mg.L⁻¹, respectivamente). Além disso, as velocidades específicas máximas de crescimento não apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre o controle e os ensaios com adição 20 e 40 mg.L⁻¹ de cafeína (0,071; 0,072; 0,073 d⁻¹, respectivamente). Referente à composição bioquímica da *S. obliquus*, não ocorreu diferença estatística nos experimentos contendo cafeína frente ao controle. O teor de proteínas para o ensaio conduzido com 20 mg.L⁻¹ de cafeína foi de 42,946%±0,244%; para o ensaio contendo 40 mg.L⁻¹ de cafeína, 42,853%±2,640%; e, para o ensaio controle, 41,674%±0,477%. Para o teor de carboidratos, o ensaio com 20 mg.L⁻¹ apresentou uma média de 13,037%±0,910%; a média para o ensaio com 40 mg.L⁻¹ foi de 14,039%±0,741%; e, para o ensaio controle, 15,682%±1,149%. Com isso, conclui-se que a *S. obliquus* resistiu à concentrações de cafeína de até 40 mg.L⁻¹ e apresentou altos teores de proteínas, o que torna interessante o estudo da produção de biofertilizantes a partir de sua biomassa.

Palavras-chave: microalgas, concentração celular, contaminantes emergentes, toxicidade, composição celular.

1 INTRODUÇÃO

Os contaminantes emergentes se caracterizam por ser um grupo de poluentes que se encontram presentes no nosso cotidiano, como em cosméticos, retardadores de chama, pesticidas, hormônios sintéticos, desreguladores endócrinos, fármacos e etc. (GOGOI et al., 2018; BILAL et al., 2019). Dando um maior enfoque aos fármacos, devido ao seu uso ser indispensável nos dias de hoje, estes estão sendo quantificados nas estações de tratamento de águas residuárias em concentrações na ordem de ng.L⁻¹ e µg.L⁻¹ (PEÑA-GUZMÁN et al., 2019, RODRIGUEZ-NARVAEZ et al., 2017). Isso deve-se por conta de que o organismo humano, por algumas vezes, não metaboliza a totalidade desses medicamentos, visto que eventualmente são consumidos sem prescrição médica ou em doses maiores do que a necessária (REMPEL et al., 2021).

Um composto que recentemente vem sido estudado é a cafeína. Ela é um agente psicotrópico consumido há milhares de anos, pode ser encontrada em mais de 60 espécies de plantas, como no café, mate, chás, guaraná, grãos de cacau, entre outros (WILLSON, 2018). Seu consumo está cada vez mais decorrente e, desta forma, a quantidade de cafeína que entra no meio ambiente é maior do que a degradada (LI et al., 2020). Neste sentido, caracteriza-se como um composto pseudo-persistente, fazendo com que a cafeína e seus metabólitos sejam considerados indicadores de contaminação antropogênica em águas residuais (DAFOUZ et al., 2018; TAHERAN et al., 2018). Cerca de 10% da cafeína que é ingerida não é metabolizada pelo nosso organismo, logo essa substância acaba sendo encontrada em corpos de água (BELTRAME et al., 2018). Um estudo realizado no Brasil, coletou amostras de água em três diferentes pontos na bacia hidrográfica do rio dos Sinos e as concentrações do fármaco variaram de 41,67 ng.L⁻¹ a 0,028 mg.L⁻¹ (PETEFFI et al., 2018).

A cafeína, mesmo nas baixas concentrações em que é detectada, pode apresentar toxicidade para organismos vivos, chamando a atenção em muitos estudos devido à bioacumulação desse fármaco ao longo da cadeia trófica (PREVIŠIĆ et al., 2020). Esse problema ocorre devido à falta de opções eficientes de tratamento de águas residuárias para os contaminantes emergentes, já que as estações de tratamento de efluentes são projetadas para fazer a remoção da carga orgânica e patogênica e de nutrientes como fósforo e nitrogênio (RIVERA-UTRILLA et al., 2013; TAHERAN et al., 2018).

A biorremediação por microalgas surge como uma alternativa de pós-tratamento, já que as mesmas têm a capacidade de alternar seu metabolismo entre autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, podendo ser cultivadas em ambientes inóspitos (XIONG et al., 2018). As microalgas mixotróficas têm a possibilidade de metabolizar os



contaminantes emergentes por três mecanismos: a bioadsorção, bioacumulação e/ou biodegradação (XIONG et al., 2018). Entretanto, a presença desses compostos pode ocasionar na inibição de crescimento ou morte celular de organismos aquáticos, seja por exposição crônica ou aguda (ZARELLI et al., 2014), demandando estudos referentes à toxicidade de contaminantes emergentes para as microalgas. Ademais, a presença dessas substâncias pode ocasionar numa situação de estresse celular a estes microrganismos, podendo induzir alterações na sua composição bioquímica (proteínas, carboidratos, lipídeos, etc.). Também deve ser estudada a presença de traços destes contaminantes ou de seus compostos de degradação na biomassa microalgal após os cultivos, visto que pode acarretar na inviabilização de processos posteriores para a sua utilização (VIANCELLI et al., 2020).

Dentro desse contexto, o objetivo do trabalho foi analisar o crescimento celular da microalga *Scenedesmus obliquus* em meio contendo duas concentrações de cafeína e verificar a sua composição bioquímica em relação aos teores de proteínas e carboidratos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivos microalgais

A microalga *Scenedesmus obliquus* foi obtida no banco de cepas do Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos da Universidade de Passo Fundo. O inóculo foi cultivado utilizando meio padrão BG-11 (RIPKA et al., 1979) na concentração de 100%. O princípio ativo de cafeína com grau de pureza de 99,1% foi adquirido em farmácias de manipulação.

Para a realização dos ensaios, foram utilizados biorreatores de 300 mL com volume útil de 150 mL, com concentração celular inicial de 0,2 g.L⁻¹ e as concentrações de cafeína foram 20 mg.L⁻¹ e 40 mg.L⁻¹. Assim, foram realizados 3 ensaios em triplicata: 1) Controle, contendo apenas *S. obliquus* e meio de cultivo padrão; 2) 20 mg.L⁻¹ de cafeína, *S. obliquus* e meio de cultivo padrão; 3) 40 mg.L⁻¹ de cafeína, *S. obliquus* e meio de cultivo padrão.

Os cultivos foram mantidos em mesa agitadora a 170 rpm, temperatura controlada entre 25 e 30 °C, com fotoperíodo 12h/12h (claro/escuro) e luminosidade de 1800 lux fornecida por lâmpadas de LED durante um período de 20 dias ou até entrarem em fase estacionária ou morte celular.

2.2 Avaliação dos cultivos microalgais

O crescimento celular das microalgas foi acompanhado a cada 24 horas por método espectrofotométrico, em comprimento de onda de 670 nm com base em uma curva padrão de biomassa seca de *S. obliquus*. Ao final dos cultivos, foram avaliados os parâmetros de concentração final de biomassa (X_f, g.L⁻¹) e velocidade específica máxima de crescimento (μ_{máx}), calculada através da equação 1.

$$\mu_{máx} (d^{-1}) = \frac{1}{\Delta t} \cdot \ln \frac{X_f}{X_i}$$

(1)

Sendo X_i e X_f respectivamente, a concentração inicial e final de biomassa microalgal e Δt o intervalo de duração da fase log.

2.3 Separação da biomassa microalgal

Ao final dos cultivos a biomassa foi separada do meio de cultivo pelo método de centrifugação a 3500 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e a fração sólida foi seca em estufa com circulação de ar a 50 °C por um período de 24 horas.

2.4 Caracterização da biomassa microalgal

A ruptura celular foi realizada através de sonda ultrassônica, com 5 ciclos de 1 minuto de sonicação cada. A partir disso a biomassa foi caracterizada, em triplicata, quanto ao teor total de carboidratos pelo método de Dubois et al. (1956) e proteínas por Lowry et al. (1951), a fim de avaliar se a presença de cafeína apresentou influência sobre a composição bioquímica de *S. obliquus* em relação ao ensaio controle.

2.5 Análise estatística



Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e avaliação das médias pelo teste de Tukey. O grau de significância adotado foi de 95% ($p \leq 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta o crescimento celular e a velocidade máxima de crescimento da microalga *Scenedesmus obliquus*.

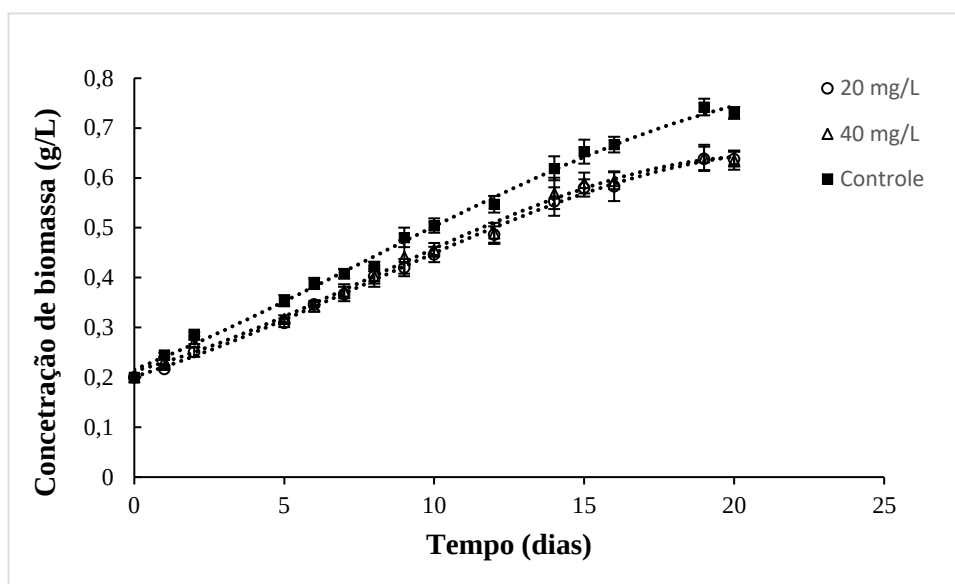
Tabela 1 - Velocidades máximas de crescimento e concentrações microalgais.

Ensaio	$\mu_{\text{máx}} (\text{d}^{-1})$	R^2	$[X]_{\text{máx}} (\text{mg.L}^{-1})$
Controle	$0,071 \pm 0,001^a$	0,985	$0,730 \pm 0,012^a$
20 mg.L^{-1}	$0,072 \pm 0,004^a$	0,989	$0,637 \pm 0,015^b$
40 mg.L^{-1}	$0,073 \pm 0,006^a$	0,993	$0,636 \pm 0,019^b$

Em cada coluna, as médias seguidas de letras iguais não mostram diferença significativa ao nível de confiança de 95% pelo teste de Tukey. (média $\pm$ desvio padrão).

A Figura 1 apresenta a concentração de biomassa microalgal dos três experimentos durante o tempo de 20 dias.

Figura 1 – Concentração de biomassa microalgal ao longo do tempo de cultivo.



De acordo com a Tabela 1 e a Figura 1, a microalga *Scenedesmus obliquus* conseguiu resistir às duas concentrações de cafeína analisadas. O ensaio que obteve um maior crescimento microalgal foi o ensaio controle, que não continha fármaco, enquanto os ensaios conduzidos com 20 e 40 mg.L^{-1} não apresentaram diferença estatística entre si, todavia, demonstraram um crescimento inferior ao ensaio controle. Segundo Tousova et al., (2018) isso pode ter ocorrido devido a cafeína ser um possível inibidor de crescimento microalgal, já que em seu estudo a cafeína inibiu o crescimento de algas em efluente de estações de águas residuárias.

Além disso, todos os resultados de velocidade específica foram estatisticamente iguais, o que nos mostra que a cafeína não apresentou um teor de toxicidade elevado para a *S. obliquus* no período de tempo avaliado (20 dias). Essa redução na concentração celular dos ensaios que continham a cafeína comparados ao ensaio controle, segundo Zarelli et al. (2014), pode ser explicada pela exposição aguda às altas doses de cafeína, o que ocasiona na inibição do crescimento de organismos aquáticos como microalgas.

Embora tenha sido notada uma redução na concentração celular da *S. obliquus* quando exposta à cafeína, a microalga apresentou potencial para ser utilizada no tratamento e/ou pós-tratamento de águas residuárias, visto que não ocorreu morte celular na presença de altas concentrações desse contaminante (até 40 mg.L^{-1}). Para efeitos de comparação, as concentrações de cafeína encontradas em efluentes estão na ordem de ng e $\mu\text{g.L}^{-1}$ (PEÑA-GUZMÁN et al., 2019). Entretanto, são necessários estudos que avaliem os níveis toleráveis de outros compostos que possam estar presentes nestes efluentes, como antibióticos, que são compostos já conhecidos por apresentarem inibição no crescimento microalgal (LENG et al., 2020). Além disso, nem todos os contaminantes bioacumulados na célula da microalga, quando este é o mecanismo de biorremediação, sofrem degradação e desta forma substâncias tóxicas podem permanecer na sua biomassa, afetando processos posteriores na sua aplicação (NIE et al., 2020).



Tabela 2 – Concentrações de proteínas e carboidratos na biomassa microalgal.

Amostras	PTN (%)	CHO (%)
Controle	41,674±0,477 ^a	15,682±1,149 ^a
20 mg.L ⁻¹	42,946±0,244 ^a	13,037±0,910 ^a
40 mg.L ⁻¹	42,853±2,640 ^a	14,039±0,741 ^a

Em cada coluna, as médias seguidas de letras iguais não mostram diferença significativa ao nível de confiança de 95% pelo teste de Tukey.

De acordo com a Tabela 2, a presença de cafeína não alterou a composição bioquímica de carboidratos e proteínas da *Scenedesmus obliquus*, visto que todos os ensaios realizados não apresentaram diferença estatística entre si. Afify et al. (2018) relataram que a microalga *Scenedesmus* possui cerca de 40% de proteínas, corroborando com o encontrado para nosso ensaio controle. Além disso, Rempel et al. (2021) testaram 7 concentrações de cafeína variando de 1 a 100 mg. L⁻¹ e concluíram que os ensaios conduzidos na presença deste contaminante não apresentaram diferença estatística quanto ao teor de carboidratos quando comparados ao ensaio controle.

Nesse sentido, observa-se que a *S. obliquus* apresentou um elevado teor proteico, podendo ser utilizada para a produção de ração animal e fertilizantes. Todavia, como ela foi cultivada em um meio contendo um composto potencialmente tóxico, pode haver resquícios do fármaco na biomassa resultante. Desta forma são necessários estudos que englobem qual o mecanismo de biorremediação pode ocorrer na presença de cafeína e se há traços do contaminante na biomassa microalgal após o término dos cultivos, para assim decidir qual o melhor caminho para a utilização dessa biomassa.

4 CONCLUSÃO

O cultivo de *Scenedesmus obliquus* com até 40 mg.L⁻¹ de cafeína não ocasionou morte celular, embora tenha atuado como um possível inibidor de crescimento. Além disso, o cultivo na presença do fármaco não apresentou alteração na composição bioquímica de proteínas e carboidratos na biomassa microalgal ao final dos cultivos. Desta forma observa-se que a microalga *S. obliquus* possui potencial para ser utilizada como biorremediadoras do contaminante em questão visto que resistiu à altas concentrações de cafeína, e a biomassa resultante pode ser utilizada para a produção de biocombustíveis, como o biometano dado o seu alto teor proteico.

5 REFERÊNCIAS

- AFIFY, A. E. M. M.; EL BAROTY, G. S.; EL BAZ, F. K.; ABD EL BAKY, H. H.; MURAD, S. A. *Scenedesmus obliquus*: Antioxidant and antiviral activity of proteins hydrolyzed by three enzymes. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 399-408, 2018.
- BELTRAME, K. K.; CAZETTA, A. L.; DE SOUZA, P. S. C.; SPESSATO, L.; SILVA, T. L.; ALMEIDA, V. C. Adsorption of caffeine on mesoporous activated carbon fibers prepared from pineapple plant leaves. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 64-71, 2018.
- BILAL, M.; ADEEL, M.; RASHEED, T.; ZHAO, Y.; IQBAL, H. M. Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation-a review. **Environment International**, v. 124, p. 336-353, 2019.
- DAFOUZ, R.; CACERES, N.; RODRIGUEZ-GIL, J. L.; MASTROIANNI, N.; DE ALDA, M. L.; BARCELÓ, D.; MIGUEL, A. G.; VALCARCEL, Y. Does the presence of caffeine in the marine environment represent an environmental risk? A regional and global study. **Science of the Total Environment**, v. 615, p. 632-642, 2018.
- GOGOI, A.; MAZUMDER, P.; TYAGI, V. K.; CHAMINDA, G. T.; AN, A. K.; KUMAR, M. Occurrence and fate of emerging contaminants in water environment: a review. **Groundwater for Sustainable Development**, v. 6, p. 169-180, 2018.
- LENG, L.; WEI, L.; XIONG, Q.; XU, S.; LI, W.; LV, S.; LU, Q.; WAN, L.; WEN, Z.; ZHOU, W. Use of microalgae based technology for the removal of antibiotics from wastewater: A review. **Chemosphere**, v. 238, p. 124680, 2020.
- LI S.; WEN, J.; HE, B.; WANG J.; HU, X.; LIU, J. Occurrence of caffeine in the freshwater environment: Implications for ecopharmacovigilance. **Environmental Pollution**, v. 263, p. 114371, 2020.
- NIE, J.; SUN, Y.; ZHOU, Y.; KUMAR, M.; USMAN, M.; LI, J.; SHAO, J.; WANG, L.; TSANG, D. C. Bioremediation of water containing pesticides by microalgae: mechanisms, methods, and prospects for future research. **Science of The Total Environment**, v. 707, p. 136080, 2020.
- PETEFFI, G. P.; FLECK, J. D.; KAEL, I. M.; GIRARDI, V.; BÜNDCHEN, R.; KRAJESKI, D. M.; DEMOLINER, M.; SILVA, F. P.; ROSA, D. C.; ANTUNES, M. V.; LINDEN, R. Caffeine levels as a predictor of Human mastadenovirus presence in surface waters—a case study in the Sinos River basin—Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 16, p. 15774-15784, 2018.
- PEÑA-GUZMÁN, C.; ULLOA-SÁNCHEZ, S.; MORA, K.; HELENA-BUSTOS, R.; LOPEZ-BARRERA, E.; ALVAREZ, J.; RODRIGUEZ-PINZÓN, M. Emerging pollutants in the urban water cycle in Latin America: A review of the current literature. **Journal of Environmental Management**, v. 237, p. 408-423, 2019.



- PREVIŠIĆ, A.; ROŽMAN, M.; MOR, J.; ACUÑA, V.; SERRA-COMPTE, A.; PETROVIĆ, M.; SABATER, S. Aquatic macroinvertebrates under stress: Bioaccumulation of emerging contaminants and metabolomics implications. **Science of the Total Environment**, v. 704, p. 135333, 2020.
- REMPEL, A.; BIOLCHI, G. N.; ANTUNES, A. C. F.; GUTKOSKI, J. P.; TREICHEL, H.; COLLA, L. M. Cultivation of microalgae in media added of emergent pollutants and effect on growth, chemical composition, and use of biomass to enzymatic hydrolysis. **BioEnergy Research**, v. 14, n. 1, p. 265-277, 2021.
- RIVERA-UTRILLA, J.; SÁNCHEZ-POLO, M.; FERRO-GARCÍA, M. Á.; PRADOS-JOYA, G.; OCAMPO-PÉREZ, R. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. **Chemosphere**, v. 93, p. 1268-1287, 2013.
- RODRIGUEZ-NARVAEZ, O. M.; PERALTA-HERNANDEZ, J. M.; GOONETILLEKE, A.; BANDALA, E. R. Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review. **Chemical Engineering Journal**, v. 323, p. 361-380, 2017.
- TAHERAN, M.; NAGHDI, M.; BRAR, S. K.; VERMA M.; SURAMPALLI, R. Y. Emerging contaminants: here today, there tomorrow! **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 10, p. 122-126, 2018.
- TOUSOVA, Z.; FROMENT, J.; OSWALD, P.; SLOBODNÍK, J.; HILSCHEROVA, K.; THOMAS, K. V.; TOLLEFSEN, K. E.; REID, M.; LANGFORD, K.; BLAHA, L. Identification of algal growth inhibitors in treated waste water using effect-directed analysis based on non-target screening techniques. **Journal of Hazardous Materials**, v. 358, p. 494-502, 2018.
- VIANCELLI, A.; MICHELON, W.; ROGOVSKI, P.; CADAMURO, R. D.; DE SOUZA, E. B.; FONGARO, G.; CAMARGO, A. F.; STEFANSKI, F. S.; VENTURIN, B.; SCAPINI, T.; BONATTO, C.; PRECZESKI, K. P.; KLANOVICZ, N.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. A review on alternative bioprocesses for removal of emerging contaminants. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, p. 1-13, 2020.
- WILKINSON, J.; HOODA, P. S.; BARKER, J.; BARTON, S.; SWINDEN, J. Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field. **Environmental Pollution**, v. 231, p. 954-970, 2017.
- WILLSON, C. The clinical toxicology of caffeine: A review and case study. **Toxicology reports**, v. 5, p. 1140-1152, 2018.
- XIONG, J. Q.; KURADE M. B.; JEON B. H. Can microalgae remove pharmaceutical contaminants form water?. **Trends in Biotechnology**, v.36(1), p. 30-44, 2018.
- ZARRELLI, A.; DELLAGRECA, M.; IESCE, M. R.; LAVORGNA, M.; TEMUSSI, F.; SCHIAVONE, L.; CRISCUOLO, E.; PARRELLA, A.; PREVITERA, L.; ISIDORI, M. Ecotoxicological evaluation of caffeine and its derivatives from a simulated chlorination step. **Science of the Total Environment**, v. 470, p. 453-458, 2014.