

**Rotas de extração de compostos de interesse comercial**

**da microalga *Spirulina platensis***

Letícia M. P. Bignon [[1]](#footnote-2)

Mônica R. C. Marques [[2]](#footnote-3)

Claúdia M. L. L. Teixeira [[3]](#footnote-4)

**Tecnologia Ambiental**

**Resumo**

Microalgas são serem unicelulares fotossintetizantes encontrados na natureza, elas são capazes de produzir alguns compostos de interesse comercial, como as ficocianinas, lipídios e os carotenóides. A relevância comercial desses compostos já esta bem estabelecida, podem ser empregados em diversos setores, como a indústria farmacêutica, nutracêutica, na produção de biodiesel, aditivos alimentares etc. Porém esses produtos são encontrados no interior das células da microalga, sendo de extrema importância um processo de extração eficiente. Nesse sentido, o presente estudo tem como objetivo propor duas rotas de extração seriadas na *Spirulina platensis* e avaliar a mais eficiente em relação a rendimento dos compostos. De acordo com os resultados obtidos a ordem de extração com maior rendimento dos compostos, de maior relevância comercial, foi a ordem assim determinada: Lipídios; carotenóides; Ficocianina.

.

**Palavras-chave**: Extração; *Spirulina platensis*; Ficocianina; Lipídios; Carotenóides.

**INTRODUÇÃO**

As cianobactérias são capazes de produzir metabólitos valiosos como proteínas, ácidos graxos e carboidratos para serem utilizados em diversas indústrias, como a industria alimentar e farmacêutica. Entre as cianobactérias filamentosas, a *Spirulina platensis* tem sido amplamente utilizada por possuir várias vantagens como alto rendimento de biomassa devido a sua taxa de crescimento e fácil recuperação de biomassa (Zhai *et al*, 2017). Outra vantagem é que devido ao seu crescimento ser em meio alcalino, o risco de contaminação por outros microorganismos é menor (AK, 2011).

Um dos produtos produzidos pelas microalgas são as ficocianinas, que são produtos naturais de alto valor com aplicações biotecnológicas reais em indústrias nutracêuticas e farmacêuticas, de alimentos, cosméticos e aplicações em pesquisas. O seu uso tem ganhado importância mundial devido à toxicidade e a carcinogenicidade potencial dos corantes alimentares sintéticos, já que a ficocianina é um corante natural, não tóxico e não cancerígeno (Manirafasha *et al*, 2016). Ainda dentre o grupo de corantes naturais tem também os carotenoides que, além de dar cor, podem proporcionar atividade biológica, trazendo benefícios à saúde. O que tem sido favorável ao aumento do uso de carotenoides não somente na indústria de alimentos, como também nas indústrias farmacêutica, nutracêutica (Martin *et al*, 2017). As Microalgas também são capazes de acumular níveis altos de lipídios (55-70%) quando cultivados em condições adequadas (Vitova *et al*, 2015) e podem ser usados na indústria de biocombustiveis para a produção de biodiesel.

Os compostos nas microalgas são intracelulares, portanto, processos de ruptura celular é uma etapa de grande importância para a liberação desses compostos. Nesse contexto, esse trabalho tem por objetivo estudar a extração seriada de três compostos (carotenoides, lipídios e ficocianina) produzidos pela *Spirulina platensis.*

**METODOLOGIA**

1. Cultivo

Para esse estudo foi cultivada *Spirulina platensis*, cedida pela Universidade Federal Fluminense e mantida em meio sintético Zarrouk modificado por George (1976). O cultivo foi realizado em garrafão de 4L aerados continuamente, com intensidade luminosa de 630 -730 uEin.m-2.s-1 e duração de 15 dias. A temperatura foi de 25ºC ± 2ºC. Foram avaliadas duas rotas de extrações sucessivas de fitoprodutos em uma mesma biomassa microalgal (rota A e rota B – Figura 1). Rota A: extração dos lipídios, seguida da extração dos carotenóides e por fim da Ficocianina. Rota B: extração da ficocianina seguida das extrações dos carotenóides e por fim dos lipídios. As metodologias de extração são as mesmas nas duas rotas, diferenciando apenas a ordem das extrações dos produtos.

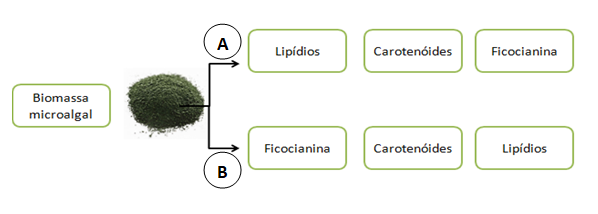


Figura 1: Ordens de extração dos compostos.

As concentrações (mg/g) desses compostos foram determinadas para avaliar a melhor ordem de extração.

B. Extração e quantificação de carotenóides totais

Para a extração dos carotenóides totais presentes na biomassa, 100mg de biomassa liofilizada foi ressuspendida em 1 ml de acetona (grau de pureza P.A.), agitada no vortéx AP59 Phoenix, sonicada em ultrassom UNIQUE Ultra Sonic Clearier durante 5 minutos e deixada no congelador durante 2 horas. Após esse período, as amostras foram submetidas à centrifugação em centrifuga Hettich ROTIXA 50RS. A biomassa residual foi ressuspendida com acetona por mais três vezes para maior extração dos carotenóides. Os sobrenadantes foram transferidos para uma cubeta e lidos em dois comprimentos de onda (470 nm e 661,6 nm) para quantificação dos carotenóides totais~~,~~ no espectrofotômetro GENESYS 10S.

Após esse procedimento a biomassa residual foi deixada em capela de exaustão por 24h para evaporação do solvente residual utilizado na extração, após esse período a biomassa foi utilizada para extração de outros compostos.

A estimativa da concentração de clorofila *a (Chla)* e carotenóides (CarT) foi realizada segundo as equações 1 a 3, descritas por Lichtenthaler (1987).

(Equação 1)

(Equação 2)

Onde ABS661,6 é a absorbância no comprimento de onda de 661,6nm e ABS470 é a absorbância no comprimento de onda de 470nm.

(Equação 3)

Onde é o teor de carotenóides em mg/L, é o teor de carotenóides em mg/g, o é o volume, em L, de solvente utilizado na extração e mBiom é a quantidade, em mg, de biomassa utilizada.

C. Extração e quantificação de lipídios

Segundo o procedimento descrito por Montes D’Oca (2011), foram utilizados 0,1g de biomassa seca residual da extração anterior para cada 5mL de hexano, sendo a mistura submetida ao ultrassom UNIQUE Ultra Sonic Clearier por 20min em temperatura ambiente de 25°C. Na sequência, a biomassa foi separada por centrifugação, na centrifuga Hettich ROTIXA 50RS, a 2.000 rpm durante 5min. A fase orgânica foi cuidadosamente transferida para um balão de fundo redondo, previamente pesado, e levado ao rotaevaporador FISATOMcom temperatura de 40ºC para evaporação do solvente, até peso constante. Após esse procedimento a biomassa residual foi deixada em capela de exaustão por 24h para evaporação do solvente residual utilizado na extração, posteriormente a biomassa foi utilizada para extração de outros compostos.

Ao final, o percentual de lipídios (%*L*) foi determinado através da equação (4)

*%L = (Equação 4)*

Onde é a massa final (g) do balão após a evaporação do solvente, é a massa inicial (g) do balão e (g) é a quantidade de biomassa utilizada para a extração de lipídios.

A quantidade de lipídios em mg/g foi determinada através da equação 5.

(Equação 5)

Onde, LT representa os lipídios totais (mg) e mBiom é a biomassa utilizada na extração (g).

D. Extração e quantificação de ficocianina

A determinação da ficocianina (FC) foi feita pelo método de congelamento/descongelamento com o intuito de promover o rompimento da parede e da membrana celular, para liberação do conteúdo intracelular, onde as ficocianinas estão contidas. Assim, foram pesados 20mg de biomassa residual da extração anterior em tubo Falcon de 50 ml e adicionados 20 ml de água destilada, a mistura foi agitada em vortéx AP59 Phoenix e levada ao congelador por 24 horas. Foram feitos 2 ciclos de congelamento/descongelamento. As amostras foram centrifugadas (4.500 rpm /20 minutos /10°C) em centrífuga Hettich Rotixa 50RS. O sobrenadante, foi lido em dois comprimentos de onda 615nm e 652nm no espectrofotômetro GENESYS 10S. A estimativa da concentração de ficocianina (FC), em mg/L, foi calculada a partir da equação 6 e a quantidade de FC em mg/g através da equação 9 descritas por Bennett & Bogorad (1973).

FC (mg/ml)= (Equação 6)

Onde, ABS615 é a absorbância no comprimento de onda de 615nm, ABS652 é a absorbância no comprimento de onda 652nm e d é o a diluição feita para leitura da amostra.

(Equação 7)

Onde, Vol é o volume (ml) de solvente utilizado e mbiom é a quantidade de biomassa (g).

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 1), a ordem A foi a melhor com as seguintes concentrações: Lipídios – 23,5 mg/g, carotenóides – 1,30 mg/g e ficocianina – 153,02 mg/g, pois apresentou maior resultado em concentração de ficocianina. Por ter apresentado uma diferença grande de valor na concentração de ficocianina, maior concentração na ordem A, e por ser um composto de alto valor agregado, a rota de extração A, pode ser considerada a melhor a ser seguida. A concentração de lipídio não sofreu grande alteração, porém pode-se observar que se obtém um valor um pouco maior quando sua extração ocorre por último.

Tabela 1: Concentração dos compostos nas extrações. Ordem de extração - A: lipidios, carotenóides e ficocianinas; B: ficocianinas, carotenóides e lipídios

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Ordem de extração** | **Ficocianina (mg/g)** | **Carotenóides (mg/g)** | **Lipídios (mg/g)** |
| A | 153,0 | 1,30 | 23,5 |
| B | 59,3 | 5,35 | 27,0 |

A concentração de carotenóides sofreu uma diminuição considerável quando a extração foi antecedida pela extração de lipídios. Este resultado já era esperado considerando que o solvente utilizado na extração dos lipídios foi o hexano, um solvente apolar, que pode ter solubilizado também uma parte dos carotenóides junto com os lipídios neutros.

De acordo Dos Santos *et al* (2019), que avaliaram a produção dos compostos da *Spirulina platensis* cultivada sob diferentes concentrações de nitrogênio, na condição semelhante a utilizada no presente trabalho, obtiveram um valor em concentração de carotenóide de 2,5 mg/g, um valor coerente com o encontrado nesse estudo. Levando em consideração a ordem B de extração, pode-se afirmar que uma extração prévia, dependendo do solvente utilizado, pode aumentar a concentração dos carotenóides. Marzorati *et al* (2020) alcançaram um valor de 3,5 mg/g em concentração de carotenóides, um valor abaixo do encontrado na melhor ordem de extração encontrada no presente experimento, ressaltando mais uma vez a vantagem da extração seriada, pois com a célula já rompida o solvente tem mais contato com o composto, aumentando assim a concentração final.

Em relação à ficocianina, por ser um composto de alto valor agregado, a ordem de extração com maior concentração de ficocianina é a mais atraente em relação a valor de mercado. Julanti *et al* (2019) testaram métodos de otimização de extração da ficocianina em biomassa de *Spirulina platensis,* no método de congelamento/descongelamento e quando utilizada água como solvente eles obtiveram uma concentração de 26,4 mg/g de ficocianina. Nesse estudo eles concluíram que o método mais eficiente foi o de congelamento/descongelamento, porém utilizando o tampão fosfato 0,1M e ainda assim alcançaram uma concentração de 37,3 mg/g, um valor abaixo do encontrado no presente estudo que foi até 4 vezes maior, atingindo uma concentração de 153,02 mg/g. Dos Santos *et al* (2019) realizaram também cultivos com *Spirulina platensis* e extrações de ficocianina, em cultivos com condições semelhantes ao presente estudo, foi obtido um valor de concentração de 72,1 mg/g, um valor abaixo do encontrado na ordem A de extração, mostrando que quando a célula está parcialmente rompida, o composto fica mais acessível e o solvente tem maior contato, aumentando a concentração final da ficocianina.

Na extração de lipídios as ordens não causaram alterações significativas nas concentrações, sendo a concentração na ordem A de 23,5 mg/g e na ordem B de 27,0 mg/g. Na ordem B, os carotenóides já foram extraídos e a célula já está rompida, o valor da concentração é maior e não sofre a influência dos carotenóides. Pohndorf *et al* (2016) testaram diversos métodos de extração de lipídios da *Spirulina sp.*, e com o método semelhante ao utilizado nesse estudo a concentração de lipídios alcançada foi de 17,2 mg/g, valor abaixo do encontrado nas duas ordens de extração, o que reforça a vantagem da extração seriada para aumento de concentração dos compostos de interesses microalgais.

**CONCLUSÕES**

O resultado da extração sucessiva se mostrou eficiente para aumentar a concentração dos compostos oriundos da biomassa microalgal, levando em consideração que é possível também fazer um cultivo em meio alternativo e aplicar essa técnica de extração para aumentar o rendimento do composto, se torna mais interessante ainda a aplicação dessa técnica, pois além de reduzir o custo de produção (com meios alternativos) há a possibilidade de aumentar o rendimento nas extrações. De acordo com os resultados obtidos nesse estudo a rota de extração mais eficiente foi a ordem A, pela concentração final dos compostos ter sido a considerada mais eficiente em questão de rendimento.

**REFERÊNCIAS**

AK, I. Effect of an organic fertilizer on growth of blue-green alga *Spirulina platensis*. **Aquacult Int.** 2012

BENNETT, A. & BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **The journal of cell biology.** Vol. 58. 1973. pp 419 -435.

D’OCA, M.G.M., VIÊGAS, C.V., LEMÕES, J.S., MIYASAKI, E.K., MORÓN-VILLARREYES, J.A., PRIMEL, E.G., ABREU, P.C. Production of FAMEs from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. **Biomass and bioenergy.** 2011.

DOS SANTOS, R.R., CÔRREA, P.S., DANTAS, F.M.L., TEIXEIRA, C.M.L.L. Evaluation of the co-production of total carotenoids, C-phycocyanin and polyhydroxyalkanoates by *Arthrospira platensis*. **Bioresource Technology Reports**. 2019.

JULIANTI, E., SUSANTI, SINGGIH, M., MULYANI, L.N. Optimization of Extraction Method and Characterization of Phycocyanin Pigment from *Spirulina platensis.* **J. Math. Fund. Sci**. Vol. 51, No. 2. 2019.

LICHTENTHALER, H.K. **Methods in enzymology**. pp 350-382. 1987.

MANIRAFASHAA,E., MURWANASHYAKAA,T., NDIKUBWIMANAC, T., AHMEDA, N.R., LIUA, J., LUA, J., ZENGD, X., LINGA, X., JINGA, K. Enhancement of cell growth and phycocyanin production in *Arthrospira (Spirulina) platensis* by metabolic stress and nitrate fed-batch. **Bioresource Technology.** 2018.

MARTÍN, A., MATTEA, F., GUTIERREZ, F., COCERO, M.J.Co-precipitation of carotenoids and bio-polymers with the supercritical anti-solvent process. **J. of Supercritical Fluids.** 2007.

MARZORATI, S., SCHIEVANO, A., IDÀB, A., VEROTTA, L. Carotenoids, chlorophylls and phycocyanin from *Spirulina*: supercritical CO2 and water extraction methods for added value products cascade. **Green Chem.** 2020.

POHNDORF, R.S., CAMARA, A.S., LARROSA, A.P.Q., PINHEIRO, C.P., STRIEDER, M.M., PINTO, L.A.A. Production of lipids from microalgae *Spirulina sp*.: Influence of drying, cell disruption and extraction methods. **Biomass and bioenergy.** 2016.

VÍTOVÁ, M., BISOVÁ, K., KAWANO, S., ZACHLEDER, V. Accumulation of energy reserves in algae: From cell cycles to biotechnological applications. **Biotechnology Advances.** 2015.

ZHAI, J., LI, X., LI, W., RAHAMAN, M.H., ZHAO, Y., WEI, B., WEI, H. Optimization of biomass production and nutrients removal by *Spirulina platensis* from municipal wastewater. **Ecological Engineering**. 2017.

1. *Aluna Doutorado Letícia Moraes Pereira Bignon – PPGMA, UERJ, leticia@bignon.com* [↑](#footnote-ref-2)
2. *Prof. Dr. Mônica Regina da Costa Marques - UERJ – Campus Maracanã, Departamento de química, monicamarquesuerj@gmail.com.* [↑](#footnote-ref-3)
3. *Dr. Claúdia Maria Luz Lapa Teixeira – Instituto Nacional de Tecnologia, claudiateix@gmail.com.* [↑](#footnote-ref-4)