

## **Extração de Bioprodutos Microalgais Utilizando Ruptura Ultrassônica**

**Luisa Sala<sup>1</sup>, Alexandre da Silva Fagundes<sup>1</sup>, Fernanda Ferreira Núñez<sup>1</sup>, Caroline Costa Moraes<sup>2</sup>, Susana Juliano Kalil<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal do Rio Grande – Escola de Química e Alimentos –  
CEP 96203-900 Rio Grande – RS – dqmsjk@furg.br\*

<sup>2</sup>Universidade Federal do Pampa – Engenharia de Alimentos –  
CEP 96413-170 Bagé – RS

### **RESUMO**

*O potencial biotecnológico das microalgas vem despertando interesse devido a possibilidade de obtenção de diversos bioprodutos, destacando-se a C-ficocianina, aloficocianina e anidrase carbônica (AC). Para obtenção destes biocompostos faz-se necessário uma etapa de ruptura celular. A influência do tempo de ruptura celular (4, 6, 8, 10, 12 e 14 min) utilizando o homogeneizador ultrassônico na extração dos bioprodutos C-ficocianina, aloficocianina e AC (em termos de esterase e hidratase) foi avaliada em duas concentrações de *Spirulina platensis* LEB-52 (0,2 e 23 g.L<sup>-1</sup>). Os maiores rendimentos de extração da AC (em termos de esterase), C-ficocianina e aloficocianina, com concentração de biomassa de 0,2 g.L<sup>-1</sup>, foram obtidos com tempo de extração de 12 min, sendo esses de 14,7 U.g<sup>-1</sup>, 132,8 mg.g<sup>-1</sup>, 79,5 mg.g<sup>-1</sup>, respectivamente. Enquanto que, para concentração celular de 23 g.L<sup>-1</sup>, o tempo de extração foi de 8 min obtendo-se rendimentos de extração da AC (em termos de hidratase e esterase) de 140,9 U.g<sup>-1</sup> e 8,9 U.g<sup>-1</sup>, respectivamente.*

**Palavras-chave:** esterase, hidratase, anidrase carbônica, C-ficocianina, aloficocianina.

### **INTRODUÇÃO**

A *Spirulina platensis* é uma cianobactéria que apresenta uma grande variedade de compostos que podem ser utilizados nas indústrias de alimentos e fármacos (PRABUTHAS et al., 2011), destacando-se a enzima anidrase carbônica (AC) e os pigmentos C-ficocianina (C-FC) e aloficocianina (AFC). A C-FC e AFC são pigmentos fotossintéticos acessórios os quais estão envolvidos na captação da luz por cianobactérias (VISKARI; COLYER, 2003), enquanto que a AC catalisa a reação reversível de hidratação do CO<sub>2</sub> em íons bicarbonato (BADGER; PRICE, 1994).

Para a obtenção destes bioprodutos é necessária uma etapa de ruptura celular. Um método potencial de ruptura celular de *Spirulina* é secar, congelar e moer a biomassa (MORAES; BURKERT; KALIL, 2010). Este método é útil quando se deseja a obtenção em larga escala, porém durante o acompanhamento de cultivos é desejável um método de ruptura rápido, que utilize baixas concentrações de biomassa e pequenos volumes de amostra. O uso de ondas ultrassônicas tem sido aplicado para ruptura celular de microalgas (ORES, 2014; PRABUTHAS et al., 2011). Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do tempo de ruptura utilizando o homogeneizador ultrassônico na extração da AC (em termos de esterase e hidratase), C-FC e AFC a partir de *Spirulina platensis* LEB-52 em duas concentrações de biomassa (0,2 e 23 g.L<sup>-1</sup>).

### **MATERIAL E MÉTODOS**

A cianobactéria *Spirulina platensis* LEB-52 foi cultivada em Erlenmeyer de 2 L (volume útil de 1,8 L) por 30 dias em meio Zarrouk 20% (v/v) (ORES, 2014). Ao término do cultivo, a biomassa foi separada por centrifugação e a mesma destinada para extração simultânea dos bioprodutos AC, C-FC e AFC.

A influência do tempo de ruptura na extração foi avaliada utilizando-se o homogeneizador Sonic Ruptor 250 (Omni International Inc., EUA) com frequência de 20 kHz e potência de 60 W. A suspensão celular (0,2 e 23 g.L<sup>-1</sup>) foi submetida ao tratamento ultrassônico em banho de gelo e alíquotas foram retiradas ao longo do tempo (4, 6, 8, 10, 12 e 14 min). O sobrenadante, livre de células, foi utilizado para determinação da atividade enzimática de AC e concentração de C-FC e AFC. Os experimentos foram realizados em triplicata. O processo de ruptura celular foi avaliado em termos de rendimento (atividade ou concentração.g de biomassa<sup>-1</sup>).

A atividade enzimática da AC foi monitorada através das reações: hidratase e esterase. A reação de hidratase consistiu em 6 mL de tampão Tris-HCl (20 mM e pH 8,3), 0,4 mL de enzima e 4 mL de solução saturada de CO<sub>2</sub>. A reação enzimática foi mantida a 4°C. Uma unidade de atividade enzimática Wilbur-Anderson (U) é definida como  $[(T_0/T)-1]$ , onde  $T_0$  e  $T$  são os tempos para que ocorra a mudança do pH de 8,0 para 7,0 na ausência ( $T_0$ ) e na presença da enzima ( $T$ ), nas condições do ensaio (WILBUR; ANDERSON, 1948). A atividade de esterase consistiu em 1,8 mL de tampão Tris-SO<sub>4</sub> (50 mM e pH 7,4), 0,2 mL de solução enzimática e 1 mL de solução 3 mM de *p*-nitrofenil acetato. Após a adição do substrato, foi registrado o aumento da absorvância à 400 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto, sob as condições do ensaio (POCKER; STONE, 1967).

As concentrações de C-ficocianina (C-FC, Equação 1) e aloficocianina (AFC, Equação 2) foram calculadas como descrito por Bennett e Bogorad (1973) com pequenas modificações na densidade óptica.

$$C - FC = \frac{(DO_{620} - 0,474 DO_{652})}{5,34} \quad (\text{Eq. 1}) \quad AFC = \frac{(DO_{652} - 0,208 DO_{620})}{5,09} \quad (\text{Eq. 2})$$

A concentração de biomassa foi determinada por leitura da densidade óptica a 670 nm (COSTA et al., 2002).

Os experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, a fim de verificar diferenças significativas entre as condições estudadas ( $p < 0,05$ ).

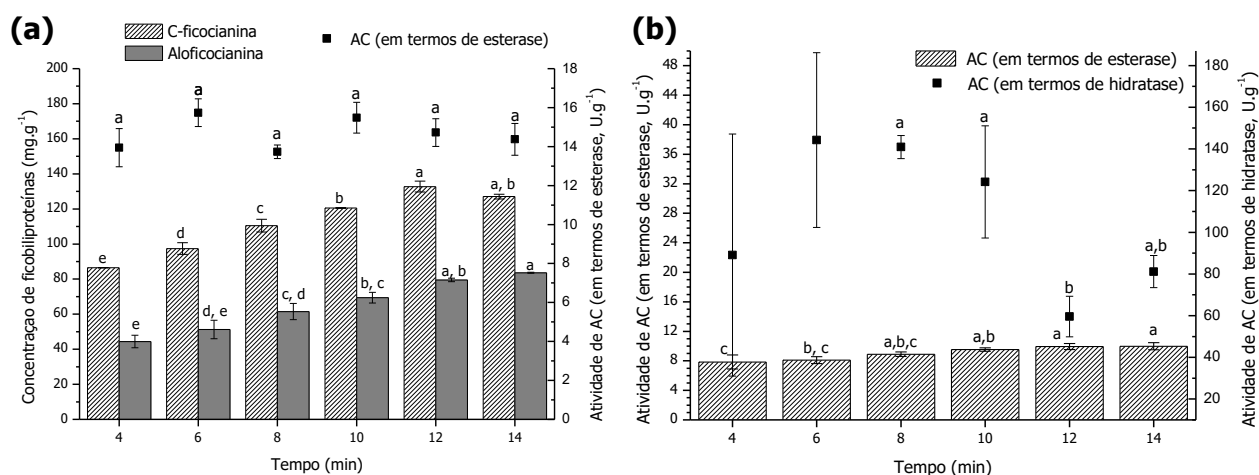
### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Para extrair a anidrase carbônica (em termos de esterase), C-ficocianina e aloficocianina durante o acompanhamento do cultivo de *Spirulina platensis* LEB-52 foi utilizada baixa concentração de biomassa (0,2 g.L<sup>-1</sup>) (ORES, 2014). No entanto, nesta concentração de biomassa não foi possível detectar a presença da AC em termos de hidratase. Assim, foram realizados testes para determinar a concentração de biomassa necessária (resultados não mostrados) para detectar a presença da AC (em termos de hidratase), sendo esta de 23 g.L<sup>-1</sup>. Desta forma, as concentrações de 0,2 e 23 g.L<sup>-1</sup> foram escolhidas para avaliar o tempo de ruptura necessário para extração dos bioprodutos.

O rendimento de extração da AC (em termos de esterase) foi afetado quando se utilizou diferentes concentrações de biomassa (Figuras 1a e 1b), onde uma maior concentração de

biomassa ( $23 \text{ g.L}^{-1}$ ) diminuiu o rendimento do processo. No tempo de 8 min de extração, o rendimento diminuiu cerca de 35,2% ao aumentar a concentração de biomassa de 0,2 para  $23 \text{ g.L}^{-1}$ . Medeiros (2008) verificou uma diminuição no rendimento de extração da enzima  $\beta$ -galactosidase ao aumentar a concentração de biomassa de 20 para  $50 \text{ g.L}^{-1}$ . O rendimento de extração da AC (em termos de esterase) não foi influenciado estatisticamente quando a concentração de biomassa foi igual a  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$  (Figura 1a). No entanto, com  $23 \text{ g.L}^{-1}$ , o rendimento de extração da AC (em termos de esterase) foi influenciado pelo tempo de ruptura celular (Figura 1b), onde os melhores resultados foram obtidos a partir de 8 min.

Os rendimentos de extrações de C-FC e AFC (Figura 1a) com concentração de biomassa de  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$  foram afetados positivamente pelo tempo de extração, onde a partir de 12 min de ruptura tem-se os maiores rendimentos sendo estes de  $132,8 \text{ mg.g}^{-1}$  e  $79,5 \text{ mg.g}^{-1}$ , respectivamente. Os resultados obtidos na extração de C-FC com o homogeneizador ultrassônico foram comparados com o método de ruptura aplicado por Moraes, Burkert e Kalil (2010) que encontraram rendimento de extração de  $82,5 \text{ mg.g}^{-1}$  para C-FC com concentração de biomassa igual a  $160 \text{ g.L}^{-1}$ . Os resultados obtidos no presente trabalho apresentaram rendimentos de extração de C-FC superiores aos obtidos por Moraes, Burkert e Kalil (2010). Ao secar a biomassa, perdas significativas de C-FC podem ocorrer, provavelmente devido a posição periférica dos ficobilissomos na membrana tilacoide e devido a sensibilidade destes pigmentos à temperatura (SARADA; PILLAI; RAVISHANKAR, 1999).



**Figura 1** – Influência do tempo de extração na **(a)** concentração de ficobiliproteínas e atividade enzimática da AC (em termos de esterase) com concentração de biomassa de  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$  e na **(b)** atividade enzimática da AC (em termos de esterase e hidratase). Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias.

A atividade enzimática da AC (em termos de hidratase, Figura 1b) é muito instável ao tempo e/ou temperatura após sua liberação para o meio extracelular, principalmente nos tempos iniciais de extração (4 e 6 min), resultando em elevados desvios-padrões, provavelmente relacionados a extração heterogênea (MEDEIROS, 2008). Desta forma, estes dois tempos foram excluídos do tratamento estatístico. Nos tempos de extração de 8 e 10 min, o rendimento de

extração ( $\text{U.g}^{-1}$ ) não é alterado, caindo após os 10 min. Com base no exposto, o tempo de ruptura celular de 8 minutos é ideal para a extração da AC com concentração de biomassa igual a  $23 \text{ g.L}^{-1}$ , e assim determinar a sua atividade por ambas reações, esterase e hidratase.

### CONCLUSÕES

Os bioprodutos AC (em termos de esterase), C-FC e AFC podem ser extraídos de *S. platensis* LEB-52 com concentração de biomassa de  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ , e os maiores rendimentos de extração foram obtidos com tempo de extração de 12 min, sendo estes de  $14,7 \text{ U.g}^{-1}$ ,  $132,8 \text{ mg.g}^{-1}$ ,  $79,5 \text{ mg.g}^{-1}$ , respectivamente.

**Agências de Fomento:** FAPERGS, CNPq, CAPES, PET/MEC

### REFERÊNCIAS

- BADGER, M. R.; PRICE, G. D. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 45, p. 369-392, 1994.
- BENNETT, A. BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **The Journal of Cell Biology**, v. 58, n. 2, p. 419-435, 1973.
- COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; FILHO, P. D.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n.7, p. 603-607, 2002.
- MEDEIROS, F. O. **Adsorção e purificação da enzima beta-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CTT 7082 através de cromatografia de troca iônica**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil, 2008.
- MORAES, C. C.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J. C-phycocyanin extraction process for large-scale use. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 133-148, 2010.
- ORES, J. C. **Produção e extração da enzima anidrase carbônica e de ficobiliproteínas a partir de microalgas**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil, 2014.
- POCKER, Y.; STONE, J. The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase. III. Kinetic studies of the enzyme-catalyzed hydrolysis of p-nitrophenol acetate. **Biochemistry**, v. 6, n. 3, p. 668-678, 1967.
- PRABUTHAS, P.; MAJUMDAR, S.; SRIVASTAV, P.; MISHRA, H. Standardization of rapid and economical method for nutraceuticals extraction from algae. **Journal of Stored Products and Postharvest Research**, v. 2, n. 5, p. 93-96, 2011.
- SARADA, R.; PILLAI, M. G.; RAVISHANKAR, G. A. Phycocyanin from *Spirulina* sp.: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 8, p. 795-801, 1999.
- VISKARI, P.J. & COLYER, C.L. Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. **Analytical Biochemistry**, v. 319, n. 2, p. 263-271, 2003.
- WILBUR, K. M.; ANDERSON, N.G. Eletrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 176, n.1, p. 147-154, 1948.