

## EXTRAÇÃO VIA FLUIDO SUPERCRÍTICO DE COMPOSTOS DE ALTO VALOR COMERCIAL DE *Spirulina platensis*

D. FILÓCOMO<sup>1</sup>, V. C. N. SANTANA<sup>2</sup>, P. C. N. TEIXEIRA<sup>3</sup> e G.L.V. COELHO<sup>4</sup>

<sup>1,2,4</sup> Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Química.

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Tecnologia, Divisão de Energia.

E-mail para contato: diegofilocomo@hotmail.com

**RESUMO** – Este trabalho teve como objetivo a avaliação preliminar de duas condições de extração de clorofila-a e carotenoides provenientes da biomassa de *Spirulina platensis* através da extração via fluido supercrítico. A extração foi conduzida sob as condições de temperatura de 40 e 60 °C, pressão de 150 e 180 bar, e granulometria da amostra de 48 mesh. Os compostos obtidos foram avaliados por técnica espectrofotométrica e comparados com aqueles obtidos via extração por solvente convencional utilizando acetona 90%, de modo a se avaliar a eficiência do método empregado. Os resultados obtidos mostraram que a extração supercrítica apresentou maior seletividade na extração da clorofila-a, e que esta foi favorecida à medida que se aumentou a pressão e temperatura. Já o método de extração com acetona 90% apresentou maior seletividade na extração de carotenoides totais, apresentando concentração de 1,6 mg/L<sup>-1</sup> enquanto que para a clorofila-a, o valor alcançado foi de 0,1mg/L<sup>-1</sup>.

### 1. INTRODUÇÃO

Microalgas são organismos unicelulares caracterizados pela sua capacidade fotossintética, processo em que a energia solar é convertida em energia química. Quanto à sua composição, a presença de diversos compostos de alto valor comercial tem despertado cada vez mais interesse, devido à aplicabilidade destes nos mais diversos tipos de segmentos (Vonshak, 1990). Em especial as microalgas do gênero *Spirulina* sp, têm mostrado um grande potencial conferido por seu alto valor nutricional (Belay, 2002), através da elevada síntese de proteínas (Ciferri & Tiboni, 1985), aminoácidos essenciais (Tanticharoen *et. al.*, 1994),  $\beta$ -caroteno e vitaminas, inclusive a vitamina B<sub>12</sub> (Vonshak & Richmond, 1988). Além disso, essas cianobactérias apresentam uma série de propriedades terapêuticas: aumentam a eficiência do sistema imune em animais (Qureshi *et. al.*, 1996; Al-Batshan *et. al.*, 2001), reduzem a hipercolesterolemia (Hosoyamada *et. al.*, 1991; Rammamoorthy & Premakumari, 1996) e atuam como antivirais (Hayashi *et. al.*, 1996) e antitumorais (Liu *et. al.*, 2000). Aliado a essas qualidades nutricionais e terapêuticas, a *Spirulina* também produz compostos de alto valor comercial, tais como a ficocianina, o ácido  $\gamma$ -linolênico (ômega 6) (Cohen *et. al.*, 1993), o  $\beta$ -caroteno e a clorofila.

Como alternativa para a extração destes valiosos compostos, destaca-se o processo de extração supercrítica (SFE), considerado uma técnica sustentável por não fazer uso de solventes danosos ao meio ambiente, além de ser uma técnica de execução relativamente

rápida e mais limpa, do ponto de vista ambiental, se comparada aos métodos de extração convencionais com solventes. Aliado a isso, tem-se o alto poder de seletividade associado à extração dos compostos, o que torna viável e eficiente a utilização deste método para a extração.

O processo de extração supercrítico utiliza como solvente, um fluido à temperatura e pressão acima do ponto crítico. Nestas condições é possível formar uma fase, com o fluido apresentando a compressibilidade de um gás e a densidade de um líquido (Sawangkeaw, Bunyakiat & Ngamprasertsith, 2010). Em condições supercríticas, a densidade pode ser alterada com pequenas variações de temperatura e/ou pressão (Carrilho *et. al.*, 2001).

O dióxido de carbono é o solvente mais utilizado neste processo de extração, pois possui características que tornam este processo interessante para indústria de alimentos (Meireles, 1997), como: nula toxicidade, fácil obtenção atingindo altos níveis de pureza, não inflamável, inércia química em relação à matéria prima, baixa temperatura crítica (31,2°C) e moderada pressão crítica (73,4 bar). Diante do exposto, o presente estudo pretende avaliar através de técnica espectrofotométrica, ainda que de forma preliminar, a eficiência da extração por fluido supercrítico da clorofila-a e de carotenoides, de uma biomassa de *Spirulina platensis*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados na unidade de extração do Laboratório de Processos de Separação (LPS), Figura 1. O solvente utilizado foi o dióxido de carbono CO<sub>2</sub> em condições supercríticas.

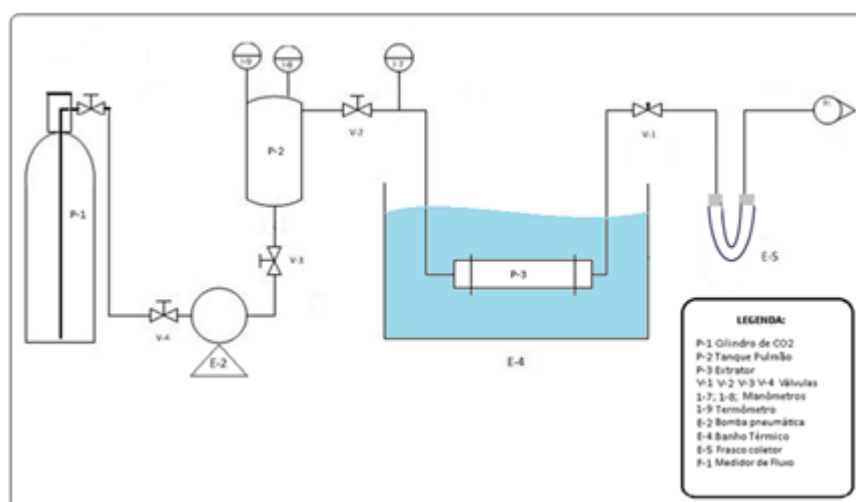


Figura 1 – Esquema ilustrativo da unidade de extração supercrítica do LPS – UFRRJ.

Primeiramente, a biomassa seca da microalga *Spirulina platensis*, foi moída e posteriormente, peneirada em peneira de 48 mesh, para garantir a homogeneidade da amostra.

Foi utilizado um extrator com capacidade de 2,67ml tendo em média 0,8 g de biomassa empacotada. O leito formado teve as suas extremidades preenchidas com uma camada de 0,5 cm de micro esferas de vidro com tamanho de 10 mesh.

Posteriormente, a unidade de extração foi ajustada dentro dos parâmetros desejados conforme a Tabela 1. Após o tempo de estabilização de 1 hora, foi ajustada a vazão mássica por meio de uma válvula micrométrica e um bolhômetro manual acoplados ao final da linha de extração.

Tabela 1 – Condições experimentais durante o processo de extração supercrítica

| Experimento | Vazão mássica (L/h) | Pressão (bar) | Temperatura (°C) |
|-------------|---------------------|---------------|------------------|
| 01          | 2                   | 150           | 40               |
| 02          | 20                  | 180           | 60               |

O período de duração das extrações foi de 4 h e para a recolha dos extratos foi utilizado um tubo de vidro em formato de “U” conectado à válvula de expansão, conforme mostra a Figura 1.

Durante o processo, o tubo em “U” permaneceu revestido com papel alumínio para garantir a preservação dos pigmentos extraídos. Após o término da extração, o tubo em “U” foi lavado com 10 ml de acetona 90% para recolher o extrato. Da solução de lavagem do tubo, foram separados 2,6 ml para a leitura imediata em espectrofotômetro e avaliação do conteúdo de carotenoides totais e clorofila-a através das equações 1 e 2, respectivamente.

$$\text{Carotenoides totais } (\mu\text{g L}^{-1}) = [7,6 \times A_{480\text{nm}} - (3,0 \times A_{750\text{nm}}) - 1,49 \times A_{510\text{nm}} - (2,0 \times A_{750\text{nm}})] \times v / (V \times c) \quad (1)$$

$$\text{Clorofila-a } (\mu\text{g L}^{-1}) = [11,85 \times A_{664\text{nm}} - 1,54 \times A_{647\text{nm}} - 0,08 \times A_{630\text{nm}}] \times v / (V \times c) \quad (2)$$

Extrações de carotenóides e clorofila-a com acetona 90% foram realizadas seguindo o protocolo descrito por Strickland & Parson (1968), como um método comparativo em relação a extração supercrítica. Neste protocolo, biomassa seca e granulada de *Spirulina* foi reduzida a um pó bem fino com o auxílio de um grau e uma peneira de pequena gramatura.

Uma porção de 0,4g deste pó fino de biomassa foi reservada e sobre ela adicionado 500ml de água destilada, para promover a ressuspensão da biomassa. Após a obtenção dos extratos, foram feitas leituras em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 480, 510 e

750 nm para quantificação dos carotenóides totais e 630, 647, 664, e 750 nm para a quantificação da clorofila-a. Tanto os dados da extração via fluido supercrítico quanto os dados obtidos a partir da extração com acetona 90% foram trabalhados e plotados com o auxílio do programa ORIGIN PRO 8.0.

### 3. RESULTADOS

A partir dos processos de extração de pigmentos via fluido supercrítico, via solvente convencional (acetona 90%) e das avaliações via técnicas de espectrofotometria foram gerados o Gráfico 1, representando as condições sob as quais foram conduzidos os experimentos de extração supercrítica e a concentração dos extratos obtidos através das duas metodologias; o Gráfico 2 representando os dados de uma análise de varredura espectrofotométrica na faixa entre 400 e 750nm do extrato obtido via extração com acetona 90% , e o Gráfico 3 representando uma análise de varredura espectrofotométrica na faixa entre 400 e 750nm, feita a partir do filtrado que foi gerado no processo de filtração por membrana após a ressuspensão, em água destilada, da biomassa e seca triturada.

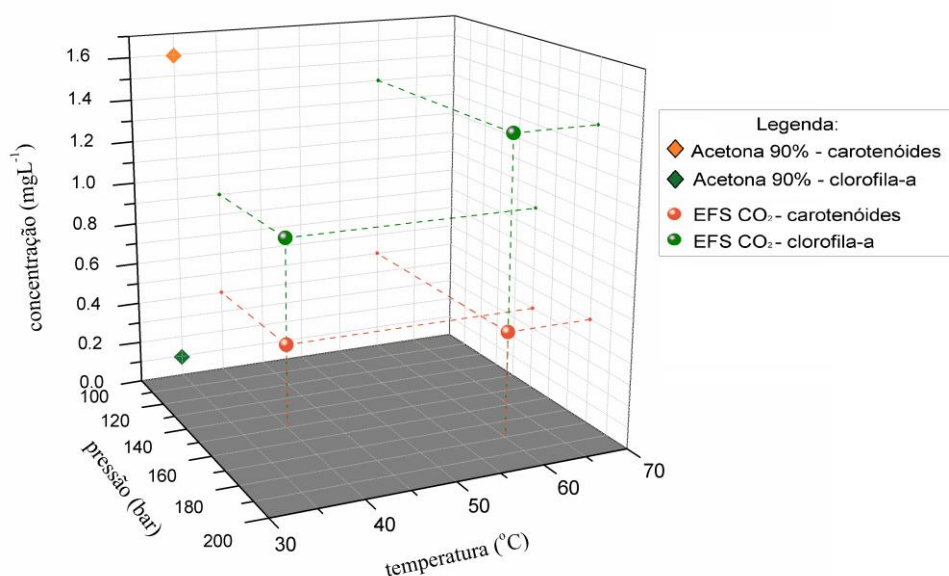


Gráfico 1 – Condições de extração supercrítica, resultados obtidos após 4h de extração e representação dos resultados obtidos via extração com acetona 90%.

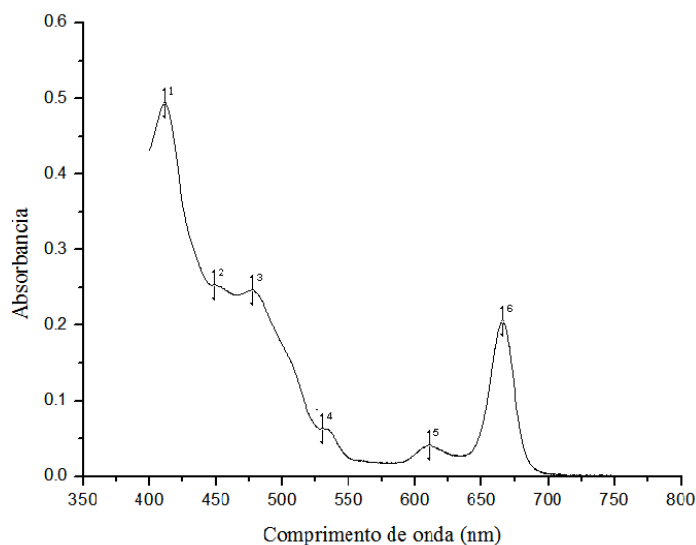


Gráfico 2 – Varredura do extrato obtido através da extração com acetona 90%. Picos característicos de carotenóides: 2 e 3. Picos característicos da clorofila-a: 1, 4, e 6. Pico característico da ficocianina: 5.

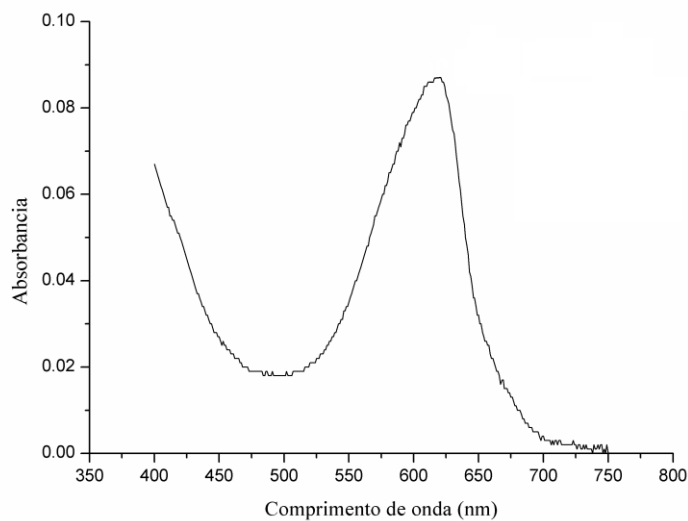


Gráfico 3 – Varredura do material filtrado para extração após a ressuspensão em água destilada. Pico característico da ficocianina.

## 4. DISCUSSÃO

Ao avaliarmos o Gráfico 1, podemos perceber que a extração conduzida sob pressão de 150 bar e 40 °C apresentou menores valores de concentração dos pigmentos desejados quando comparada a extração realizada sob pressão de 180 bar e 60°C. Este gráfico também nos

permite dizer que as condições supercríticas testadas, foram mais eficientes na solubilização da clorofila-a do que na dos carotenóides, este fato pode estar relacionado com a diferença de solubilidade entre os compostos, uma vez que a literatura aponta pressões entre 200 e 300bar como sendo favoráveis à solubilidade dos carotenoides.

Ainda neste gráfico, fica notório que o método de extração por solventes convencionais utilizando acetona 90% tem alta seletividade de extração para carotenóides, apresentando como valores de concentração de carotenóides totais de  $1,6 \text{ mg/L}^{-1}$  enquanto que para clorofila-a os valores ficam restritos a  $0,1 \text{ mg/L}^{-1}$ . Esta seletividade fica clara quando olhamos para o Gráfico 2 e verificamos que apesar da biomassa apresentar-se rica em clorofila-a, após a extração por acetona, os resultados de concentração de carotenóides totais foram muito superiores aos de clorofila-a.

Após a filtração com membrana, da biomassa ressuspensa em água destilada, o filtrado apresentou uma coloração azulada. Uma análise espectrofotométrica foi realizada e o resultado está apresentado no Gráfico 3, evidenciando espectralmente a presença de pico característico da ficocianina, que provavelmente, devido a sua característica hidrofílica, após o processo de trituração e ressuspensão da amostra em água destilada, foi extraída

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram que a extração supercrítica apresentou maior seletividade na extração da clorofila-a, e que esta foi favorecida à medida que se aumentou a pressão e temperatura, diferentemente do método de extração com acetona 90%, que apresentou maior seletividade na extração de carotenoides totais. No entanto, novos experimentos devem ser realizados com o objetivo de avaliar o rendimento do processo de extração supercrítica em diferentes condições, já que a literatura indica que carotenoides apresentam maior solubilidade em temperaturas e pressões mais elevadas.

## 6. NOMENCLATURA

$A_{480\text{nm}}$  = Absorbância com comprimento de onda de 480nm

$A_{510\text{nm}}$  = Absorbância com comprimento de onda de 520nm

$A_{630\text{nm}}$  = Absorbância com comprimento de onda de 630nm

$A_{647\text{nm}}$  = Absorbância com comprimento de onda de 647nm

$A_{664\text{nm}}$  = Absorbância com comprimento de onda de 664nm

$c$  = Caminho óptico da cubeta

$v$  = Volume de solvente utilizado para a extração dos pigmentos

$V$  = Volume filtrado de amostra

## 7. REFERÊNCIAS

- AL-BATSHAN, H. A.; AL-MUFARREJ, S. I.; AL-HOMAIDA, A. A.; QURESHI, M. A. Enhancement of chicken macrophage phagocytic function and nitrite production by dietary *Spirulina platensis*. *Immunopharmacol Immunotoxicol.*, v. 23, p. 281-289, 2001.
- BELAY, A. The potential of *Spirulina* (Arthrospira) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *J. Amer. Nutraceutical Association*, v. 5, p. 27-48, 2002.
- CARRILHO, E. Fluidos Supercríticos Em Química Analítica. I. Cromatografia Com Fluido Supercrítico: Conceitos Termodinâmicos. *Química Nova*, v. 24, p. 509-515, 2001.
- CIFERRI, O.; TIBONI, O. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. *Ann. Rev. Microbiol.*, v. 39, p. 503-526, 1985.
- COHEN, Z.; REUNGJITCHACHAWALI, M.; SIANGDUNG, W.; TANTICHOROEN, M. Production and partial purification of  $\gamma$ -linolenic acids and some pigments from *Spirulina platensis*. *J. Appl. Phycol.*, v. 5, p. 109-115, 1993.
- HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; KOJIMA, I. A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: in vivo and ex vivo evaluation of anti-*Herpes simplex* virus and anti-human immunodeficiency virus activities. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. 12, p. 1463-1471, 1996.
- HOSOYAMADA, Y.; TAKAI, T.; KATO, T. Effects of water-soluble and insoluble fractions of *Spirulina* on serum lipid components and glucose tolerance in rat. *J. Jpn Soc. Nutr. Food Sci.*, v., 44, p. 273-277, 1991.
- LAWS, E. A.; TERRY, K. L. ; WICKMAN, J.; CHALUP, M. S. Simple algal production system design to utilize the flashing light effect. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 25, p. 2319-2336, 1983.
- LIU, Y.; XU, L.; CHENG, N.; LIN, L.; ZHANG, C. Inhibitory effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on the growth of human leukemia K562 cell- *J. Appl. Phycol.*, v. 12, p. 125-130, 2000.
- MEIRELES, M. A. A. Extração supercrítica de óleos essenciais de condimentos usando dióxido de carbono. *Boletim da SBCTA*, v. 31, p. 9-14, 1997.
- MOLINA GRIMA, E.; ACIÉN FERNANDEZ, F. G.; GARCIA CAMACHO, F.; CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scaleup. *J. Biotechnol.*, v. 70, p. 231-247, 1999.
- MORITA, M.; WATANABE, Y.; SAIKI, H. Investigation of photobioreactor design for enhancing the photosynthetic productivity of microalgae. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 69, p. 693-698, 2000.



PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 57, p. 287-293, 2001.

QURESHI, M. A.; GARLICH, J. D.; KIDD, M. T. Dietary *Spirulina platensis* enhances humoral and cell-mediated immune functions in chickens. *Immunopharmacol Immunotoxicol.*, v. 18, p. 465-76, 1996.

RAMAMOORTHY, A.; PREKUMARI, S. Effect of supplementation of *Spirulina* on hypercholesterolemic patients. *J. Food Sci. Technol.*, v. 33, p. 124-128, 1996.

SAWANGKEAW, R.; BUNYAKIAT, K. & NGAMPASERTSITH S. A review of laboratory-scale research on lipid conversion to biodiesel with supercritical methanol (2001–2009). *J. of Supercritical Fluids.*, v. 55, p. 1-13, 2010.

TANTICHAROEN, M.; REUNGJITCHACHAWALI, M.; BUNNAG, B.; VONKTAVEESUK, P.; VONSHAK, A.; COHEN, Z. Optimization of  $\gamma$ -linolenic acid (GLA) production in *Spirulina platensis*. *J. Appl. Phycol.*, v. 6, p. 295-300, 1994.

TERRY, K.; RAYMOND, L. P. System design for the autotrophic production of microalgae. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 7, p. 474-487, 1985.

VONSHAK, A. Recent advances in microbial biotechnology. *Biotech. Adv.*, v. 8, p. 709-727, 1990.

VONSHAK, A.; Richmond, A. Mass production of *Spirulina*- an overview. *Biomass.*, v. 15, p. 233-248, 1988.

YOSHIDA, A.; TAKAGAKI, Y.; NISHIMUNE, T. Enzyme immunoassay for phycocyanin as the main component of spirulina color in foods. *Biosci Biotechnol. Biochem.*, v. 60, p. 57-60, 1996.