

IDENTIFICAÇÃO DE CAROTENÓIDES DA BIOMASSA DE *Phormidium autumnale* OBTIDOS ATRAVÉS DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DESTES COMPOSTOS, À PARTIR DE CULTIVO FOTOTRÓFICO

G. P. NOGARA¹, A. S. FERNANDES¹, B. MULLER¹, JACOB-LOPES¹ E L. Q. ZEPKA¹

¹ Universidade Federal de Santa Maria
E-mail para contato: lqz@pq.cnpq.br

RESUMO – A conversão da biomassa microalgal em bioprodutos estabelece um sistema de biorefinaria, onde as microalgas atuam como potenciais biocatalisadores em reações de conversão, gerando uma gama de bioprodutos de alto valor agregado, como os pigmentos naturais. Diante disso, o objetivo do trabalho foi identificar o perfil de carotenóides da biomassa de *Phormidium autumnale*, obtidos por extração assistida por ultrassom, e avaliar o potencial de produção de carotenóides a partir da biomassa de *Phormidium autumnale*, por de bioprocessos fototróficos. Os cultivos fototróficos foram realizados em bio-reactor de coluna de bolhas sob um regime intermitente, alimentados com 2,0 L de meio BGN. Os carotenóides foram obtidos através de extração assistida por ultrassom, utilizando acetona como solvente. Em seguida, o extrato foi transferido para éter de petróleo / éter dietílico, e saponificado à temperatura ambiente com 10% de KOH metanólico. O perfil de carotenóides a partir de microalgas *Phormidium autumnale* foi avaliada por HPLC-PDA. Um total de catorze carotenóides foram separados na biomassa a partir de bioprocessos, destacando-se como majoritários: all-trans- β -caroteno (216,9 $\mu\text{g/g}$), 9-cis- β -caroteno (150,9 $\mu\text{g/g}$) zeaxantina (108,45 $\mu\text{g/g}$), como os carotenoides predominantes. Com base nesses resultados, observou-se o potencial de *Phormidium autumnale*. para a produção de carotenóides de microalgas, através de bioprocessos fototróficos.

1. INTRODUÇÃO

No cenário atual, os recursos renováveis têm ganhado atenção como insumo para a indústria e tem estimulado o desenvolvimento de novas formas integradas de produção (BOUAID et al., 2010). Neste aspecto, a biorrefinaria representa uma nova abordagem na obtenção de matérias-primas e produtos renováveis em um processo integrado, de forma sustentável (CHERUBINI, 2010; OCTAVE; THOMAS, 2009).

A conversão da biomassa microalgal em bioprodutos estabelece um sistema de biorefinaria, onde as microalgas atuam como potenciais biocatalisadores em reações de conversão, gerando uma gama de bioprodutos de alto valor agregado. Tanto a biomassa microalgal quanto os demais produtos do seu metabolismo apresentam elevado potencial de reutilização em diversos segmentos industriais. (FENG et al., 2011; WU et al., 2012)

O cultivo de microalgas visando a produção de sua biomassa pode ser considerado biotecnologicamente favorável devido a seus metabólitos. Além da produção de biocombustíveis, podem servir para outras finalidades como tratamento de águas residuais e produção de compostos importantes em diversos setores industriais de alto valor comercial (MATA et al., 2010). Devido seu metabolismo diversificado, as microalgas tornam-se microrganismos atraentes para bioprospecção e exploração de fontes comerciais de alto valor, como os pigmentos naturais oriundos de seu metabolismo (BOROWITZKA, 2013; BRENNAN & OWENDE, 2010; DUFOSSE et al., 2005; JACOB-LOPES & FRANCO, 2013; OCTAVE & THOMAS, 2009; OHARA, 2003; QUEIROZ, HORNES, MANETTI, ZEPKA, & JACOB-LOPES, 2013; RODRIGUES et al., 2014).

Dentre os pigmentos naturais oriundos do metabolismo microalgal, podemos destacar os carotenoides. Estes compostos apresentam propriedades que os tornam importantes para a exploração biotecnológica de microalgas, com uma ampla gama de aplicações, incluindo corantes industriais, para aplicação em produtos alimentícios, ração para animais, cosméticos e suplementos (DEL CAMPO et al., 2007; PULZ; GROSS, 2004). Além disso, estas moléculas apresentam potencial bioativo, retardando danos fotooxidativos (DOMONKOS et al., 2013).

Neste sentido, para se obter a fração de pigmentos da microalga, a extração assistida por ultrassom é considerada uma técnica viável, melhorando os rendimentos de extração em períodos de tempo mais curtos e usando menores quantidades de solvente (VINATORO, 2001). A extração assistida por ultrassom utiliza alta potência, e ondas sonoras de baixa frequência, que se propagam pelo solvente, alternando ciclos de baixa e alta pressão, produzindo bolhas cavitacionais. A energia gerada a partir de colapso de bolhas cavitacionais proporciona maior penetração do solvente no material celular e melhorar a transferência de massa e a partir de interfaces de (KNORR, 2003).

O objetivo do trabalho foi identificar o perfil de carotenóides da biomassa de *Phormidium autumnale*, obtidos por extração assistida por ultrassom e avaliar o potencial de produção de carotenóides a partir da biomassa de *Phormidium autumnale*, por bioprocessos fototróficos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produção de biomassa microalgal

A produção de biomassa foi feita em cultivo fototróficas, utilizando BGN como meio de cultura. Os cultivos foram realizados num biorreator de coluna de bolhas em regime de batelada. O sistema foi construído de vidro de borossilicato com diâmetro externo de 12,5 centímetros e altura de 16 centímetros, com razão altura/diâmetro (h/D) proporção igual a 1,28 e um volume nominal de 2,0L. O sistema de dispersão do reator consiste em um difusor

de ar com 2.5 centímetros de diâmetro localizado no interior do bioreator. O fluxo de ar será controlado pelo medidor de fluxo (KI-Key Instruments®, Trevose, PA, EUA) e a entrada de ar e a saída de gases serão filtrados com unidades filtrantes constituídas de membrana de polipropileno, com um diâmetro de poro de 0.22 μm e o diâmetro total de 50mm (Millex FG®, Billerica, MA, EUA). O biorreator, incluindo unidades filtrantes foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C durante 40 minutos e, em seguida, durante 30 minutos, com o meio sintético.

2.2 Separação da Biomassa

A biomassa da microalga *Phormidium autumnale* foi obtida através de filtração de um volume conhecido de cultura, por meio de um filtro com membrana de 0,45 μm (Millex FG®, Billerica, MA, EUA), liofilizada e mantida a -35°C até o momento da análise.

2.3 Extração de carotenóides

Os carotenóides foram extraídos por extração assistida por ultra-som (UAE), utilizando um processador ultra-sônico (Sonics, Anaheim-CA, EUA) com uma sonda de 13 mm de diâmetro. As amostras secas foram colocadas num recipiente revestido, através do qual a água foi circulada a 20 °C para evitar a existência de pontos quentes. As extrações foram realizadas com acetona fria durante 20 minutos e a amplitude aplicada para a extração foi ajustado para 50% (61 nm aproximadamente). As amostras foram processadas em uma frequência constante de 20 kHz. A sonda de ultrassons foi submerso a uma profundidade de 25 mm na amostra. A suspensão da amostra foi centrifugada durante 10 min a 3000 rpm. O procedimento de extração foi repetido até que o sobrenadante ficou incolor. Os carotenóides foram transferidos para éter de petróleo / éter dietílico mistura [1: 1 (v / v)], e saponificada durante a noite com 10% (w / v) de KOH metanólico à temperatura ambiente. A fração alcalina foi removida por lavagem do extrato com água destilada e o extrato concentrado em evaporador rotativo ($T < 30^\circ\text{C}$).

2.4 Análises HPLC-PDA

Antes da análise por HPLC-PDA, o extrato de carotenóide foi solubilizado em MeOH: MTBE (70:30) e filtrou-se através de membranas Millipore (0,22 μm). Os carotenóides foram analisados por cromatografia líquida de alto desempenho HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com bombas quaternários (modelo LC-20AD), degaseificador on-line, e válvula de injeção com um loop de 20 mL (Rheodyne, Rohnert Park-CA, EUA). O equipamento foi ligado em série a um detector PDA (modelo SPD-M20A), disponíveis na literatura (Britton, Liaaen-Jensen & Pfander, 2004; De Rosso & Mercadante, 2007; Zepka & Mercadante, 2009; Van Breemen, Dong, & Pajkovic 2012).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cromatograma HPLC (Figura 1) demonstra a presença de 14 carotenóides, sendo 5 carotenóides majoritários no extrato da biomassa de *Phormidium autumnale*. Estes compostos foram identificados com base na informação obtida a partir de dados combinados da eluição

cromatográfica sobre uma coluna C30, co-cromatografia com padrões e características de UV-Vis.

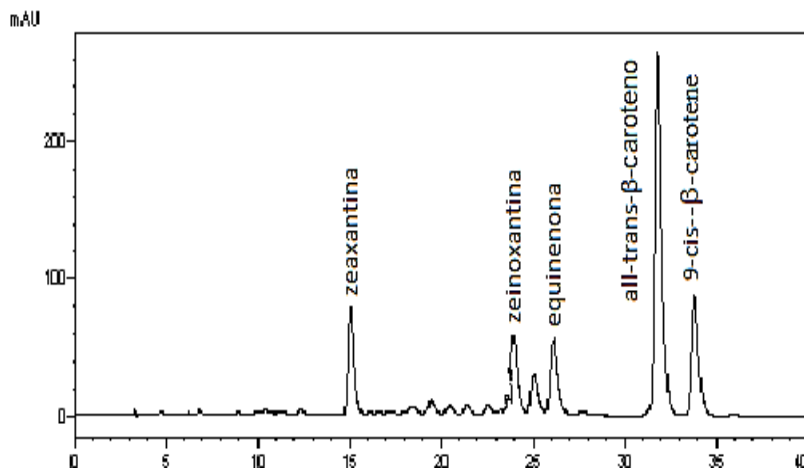


Figura 1 Perfil de carotenoides majoritários da biomassa de *Phormidium autumnale* obtidos por extração assistida por ultrassom a partir de cultivo fototrófico

Dentre os majoritários, (Tabela 1) o β -caroteno, também conhecido como provitamina A, destaca-se por ser utilizado para fins nutricionais, além de ser aplicado em larga escala como corante, no setor da indústria de alimentos (WU, SHI, 2007). A zeaxantina é classificada como uma xantofila, sendo tecnicamente aplicada para a coloração da pele de frangos (GRANADO-LORENCIO *et al*, 2009.; CARDOZO *et al*, 2007).

Tabela 1- Identificação dos dos carotenoide majoritários da biomassa de *Phormidium autumnale* obtidos por extração assistida por ultrassom a partir de cultivo fototrófico

Nome	TR	$\lambda_{\text{máx}}$	III/II
zeaxantina	15,6	428,448,475	20%
zeinoxantina	22,0	421,443,471	40%
equinenona	27,1	456	
all-trans- β -caroteno	33,0	425, 450,476	20%
9-cis- β -caroteno	35,2	341,420,445,471	20%

Cetocarotenoides como a equinenona que apresentam cromóforo com números superior de ligações duplas conjugadas que o all-trans- β -caroteno e característica estrutural semelhante a astaxantina é um carotenoide majoritário na biomassa microalgal e apresenta um apelo econômico promissor (ALBRECHT *et al*, 2000; KLASSEN; FOGHT, 2011). A astaxantina é responsável para a pigmentação de vários organismos aquáticos, tais como adicionais camarões, lagostas e outros crustáceos.

Dos 14 carotenóides separados na biomassa de *Phormidium autumnale* a partir de bioprocessos, os carotenoides majoritários foram identificados quantitativamente, mostrando-se: all-trans- β -caroteno (216,9 $\mu\text{g/g}$), 9-cis- β -caroteno (150,9 $\mu\text{g/g}$) zeaxantina (108,45 $\mu\text{g/g}$), como os carotenoides predominantes.

5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, podemos observar a composição dos carotenóides majoritários que compõem a biomassa de *Phormidium. autumnale* em cultivo fototrófico, extraídos de acordo com a técnica de extração assistida por ultrassom. Além disso, podemos observar a concentração destes compostos na biomassa de *Phormidium autumnale*.

6. REFERÊNCIA

- ALBRECHT, M. et al. Novel hydroxycarotenoids with improved antioxidative properties produced by gene combination in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 18, 843-846, 2000.
- BOROWITZKA, M.A. High-value products from microalgae-their development and commercialization. *Journal of Applied Phycology*, v. 25, 743-756, 2013.
- BOUAID, A.; MARTÍNEZ, M.; ARACIL, J. Biorefinery approach for coconut oil valorisation: A statistical study. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 11, p. 4006-4012, June 2010.
- BRENNAN, L., OWENDE, P. Biofuels from microalgae. A review of technologies coloured oil-in-water food emulsions with lutein and phycocyanin added to the for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. oil and aqueous phases. Food Hydrocolloids*, v.20, 44-52. *Renewable & Sustainable Energy Reviews Sustain.* V.14, 557-577, 2010.
- CHERUBINI, F. The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*, v. 51, n. 7, p. 1412-1421, July 2010.
- D. KNORR, Impact of non-thermal processing on plant metabolites, *J. Food Eng.* 56 (2003) 131-134.
- DEL CAMPO, J. A.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M.; GUERRERO, M. G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 74, n. 6, p. 1163-1174, Apr. 2007.
- DOMONKOS, I.; KIS, M.; GOMBOS, Z.; UGHY, B. Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. *Progress in Lipid Research*, v. 52, n. 4, p. 539-561, Oct. 2013.
- DUFOSSÉ, L., GALAUP, P., YARON, A., ARAD, S.M., BLANC, P., MURTHY, K. N. C., et al. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science & Technology*, v. 16, 389-406, 2005.
- F. GRANADO-LORENCIO, C. HERRERO-BARBUDO, G. ACIÉN-FERNÁNDEZ, E. MOLINA-GRIMA, J.M. FERNÁNDEZ-SEVILLA, B. PÉREZ-SACRISTÁN, I. BLANCO-NAVARRO, In vitro bioaccessibility of lutein and zeaxanthin from the microalgae *Scenedesmus almeriensis*, *Food Chem.* 114 (2009) 747-752.

- FENG, Y.; LI, C.; ZHANG, D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 1, p. 101–105, Jan. 2011.
- JACOB-LOPES, E., & FRANCO, T. T. From oil refinery to microalgal biorefinery. *Journal of CO₂ utilization*, v 2, 1-7, 2013
- K.H. CARDOZO, T. GUARATINI, M.P. BARROS, V.R. FALCÃO, A.P. TONON, N.P. LOPES, S. CAMPOS, M.A. TORRES, A.O. SOUZA, P. COLEPICOLO, E. PINTO, Metabolites from algae with economical impact, *Comparative Biochem. and Physiol. Part C: Toxicol. & Pharmacol.* 146 (1) (2007) 60–78.
- KLASSEN, J. L.; FOGHT, J. M. Characterization of *hymenobacter* isolates from Victoria Upper Glacier, Antarctica reveals five new species and substantial non-vertical evolution within this
- M. VINATORU, An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, *Ultrason. Sonochem.* 8 (2001) 303–313.
- MATA, T.M., MARTINS, A.A., CAETANO, N.S. Microalgae for biodiesel production and other applications: *Renewable & Sustainable Energy Reviews.* v.14, 217-232, 2010.
- OCTAVE, S., & THOMAS, D. Biorefinery: toward an industrial metabolism. *Biochimie*, v. 91, 659-664, 2009.
- OCTAVE, S.; THOMAS, D. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. *Biochimie*, v. 91, n. 6, p. 659-664, June 2009.
- OHARA, H. Biorefinery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 62, 474-477, 2003.
- PULZ, O. & GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 65, 635-648, 2004.
- QUEIROZ, M. I., HORNES, M.O., MANETTI, A. G. S., ZEPKA, L. Q., & JACOB-LOPES, E. Fish processing wastewater as a platform of the microalgal biorefineries. *Biosystems Engineering*, v.115, 195–202, 2013
- RODRIGUES, D.B.; FLORES, E.M.M.; BARIN, J.S.; MERCADANTE A.Z.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, Q.L. Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. *Food Research International*, 2014.
- WU, L. F.; CHEN, P. C.; HUANG, A. P.; LEE, C. M. The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater. *Bioresource Technology*, v. 113, special issue, p. 14–18, June 2012.
- Z. WU, X. SHI, Optimization for high-density cultivation of heterotrophic *Chlorella* based on a hybrid neural network model, *Lett. Appl. Microbiol.* 44 (2007) 13–18.