

PERFIL DE CAROTENOIDES DA MICROALGA *Chlorella vulgaris* EM CULTIVO FOTOTRÓFICO

D. P. WEBER¹, P. CAETANO¹, A. S. FERNANDES¹, E. JACOB-LOPES¹, L.Q. ZEPKA¹

¹ Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Ciência e Tecnologia em alimentos.
E-mail para contato: lqz@pq.cnpq.br

RESUMO – Microalgas têm sido sistemicamente estudadas devido ao potencial biotecnológico que está associado com a produção de biocompostos de interesse industrial, tais como pigmentos. Em face disso, foram determinados o perfil de carotenoides na biomassa microalgal de *Chlorella vulgaris*. A microalga foi cultivada em fotobiorreatores operando em regime intermitente, alimentadas com 2,0L de meio BG11. O perfil de carotenoides foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector fotoarranjo de díodos de espectrômetro de massas (HPLC-PDA-MS/MS). Dezoito carotenoides foram identificados na biomassa microalgal, dentre esses destacam-se os majoritários: all-*trans*-equinenona (452.63 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), all-*trans*- β -caroteno (352.29 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), 9-*cis*-equinenona (263.20 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), all-*trans*-zeaxantina (271.01 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), all-*trans*-mixoxantofila (129.89 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

1. INTRODUÇÃO

Microalgas pertencem a uma classe extremamente diversificada de microrganismos fotossintéticos que apresentam uma grande diversidade em sua composição química e, portanto, isso os torna extremamente atraente para a bioprospeção e potencial exploração como fontes comerciais de uma vasta gama de biomoléculas, incluindo carotenoides (Borowitzka, 2013; Rodrigues et al., 2014). Por estas razões, as microalgas têm sido direcionadas como foco dos processos de biorefinaria economicamente viáveis, visto que, todos os componentes gerados a partir da biomassa de microalgas possuem alto valor para a geração de produtos aplicáveis em diversos setores industriais (Herrero et al., 2015; Suganya et al., 2016; Chew et al., 2017).

Além disso, esses microrganismos são capazes de sintetizar biomoléculas com características estruturais únicas comparadas as obtidas por via química. Tais características estão relacionadas com a atividade antioxidante desses compostos naturais em particular, carotenoides acetilênicos, cetocarotenoides e carotenoides glicosilados (Grama et al., 2014; Rodrigues et al., 2015).

Os antioxidantes astaxantina, β -caroteno e seus derivados hidroxilo, luteína, licopeno, zeaxantina, equinenona e cantaxantina são os principais carotenoides de valor comercial provenientes de microalgas (Rodrigues et al., 2014; Gong & Bassi, 2016). Consequentemente, a corrente produção industrial de carotenoides naturais usando microalgas envolve, principalmente, duas espécies, *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis*, que produzem β -caroteno e astaxantina, respectivamente. Porém, estudos vem sendo elucidados na busca por

cultivos de microalgas alternativas que possam suplementar a produção de carotenoides (Přibyl et al., 2016).

Dentre as inúmeras espécies estudadas de microalgas a *Chlorella vulgaris*, que pertence ao filo das Chlorophyta, é uma alga verde com um diâmetro de 2-10 μm , amplamente distribuída em água doce, salobra e marinha e caracteriza-se por ter uma facilidade de cultivo, alta produtividade, alto teor de proteínas e outros componentes bioativos como os carotenoides. Por essas razões, apresenta um amplo potencial para uso em bioprocessos (Nurachman et al., 2015).

Desta forma, o objetivo do estudo foi determinar o perfil de carotenoides contidos na microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em fotobiorreator.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos e Meios de Cultura

A microalga utilizada foi a *Chlorella vulgaris*. As culturas de reserva foram propagadas e mantidas em ágar-ágar solidificado (20 g.L^{-1}) contendo meio BG11 sintético (Rippka et al., 1979). As condições de incubação utilizadas foram 25°C e intensidade luminosa constante 1klux.

2.2. Produção de Biomassa de Microalgas

A produção de biomassa foi realizada em fotobiorreator integrando duas unidades principais de reação: um fotobiorreator de coluna de bolhas acoplado a uma plataforma de iluminação, operando em regime intermitente com 1,5 L de meio BGN (Ripka et al., 1979). As condições experimentais foram: concentração inicial do inoculo de 100 mg/L , temperatura de 25°C , relação volume de meio circulante entre a plataforma de iluminação e a zona escura (VI/VE) de 20%, introdução de mistura de ar enriquecido com 15% de CO_2 a uma velocidade equivalente a 1 VVM (volume de ar por volume de meio) e intensidade de luz constante de 13000 Lux.

2.3 Extração dos Carotenoides

As extrações dos carotenoides foram realizadas de acordo com o Rodrigues et al., (2015). Os carotenoides foram exaustivamente extraídos com acetato de etila e metanol, transferidos em éter de petróleo/éter etílico, e saponificados overnight (16 horas) a temperatura ambiente com hidróxido de potássio (KOH) 10% em metanol. Os extratos saponificados foram lavados com água destilada para a remoção do álcali, posteriormente foram concentrados em evaporador rotatório (30°C). Todas as extrações foram realizadas em triplicata.

2.4 Análise dos Carotenoides em HPLC-PDA-MS

A identificação dos carotenoides extraídos da biomassa microalgal foi realizada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a espectrômetro de massas HPLC-PDA-

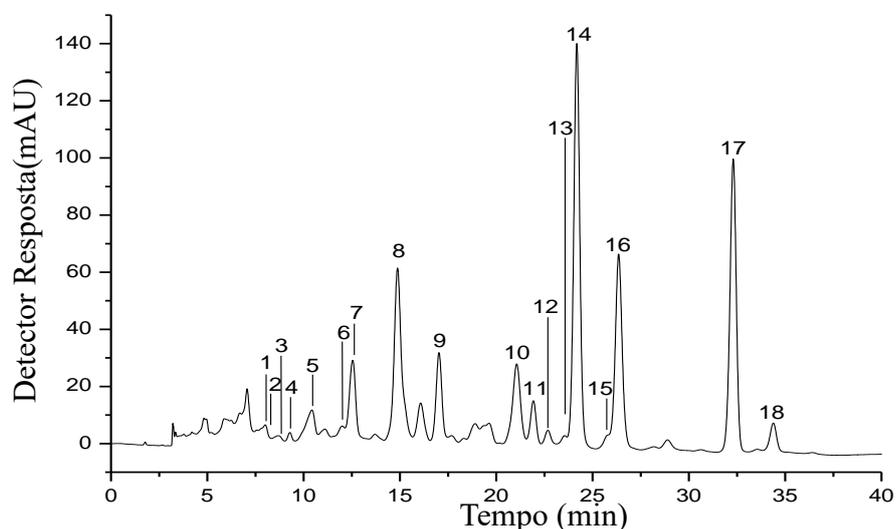
MS (Shimadzu, Japão), equipado com detector de arranjo de fotodiodos (PDA) (Shimadzu, Japão) e um espectrômetro de massa com um analisador de armadilha de íons e uma fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI) (modelo Esquire 4000, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) em coluna C30 YMC (5 µm, 250 x 4,6 mm). Fase móvel de um gradiente linear de metanol e metil terc-butil éter (TBME), de 95:5 para 70:30 em 30 min., para 05:95 em 20 min., permanecendo por 5 min. e retornando a 95:5, com fluxo de 0,9 mL/min (De Rosso & Mercadante, 2007).

A identificação dos carotenoides foi baseada nos parâmetros de ordem de eluição na coluna C30, características do espectro no UV-Visível ($\lambda_{\text{máx}}$, grau de estrutura fina e intensidade do pico *cis*) e através de comparação com bibliografia. A quantificação foi realizada por padronização externa, por meio de curva de calibração.

3. RESULTADOS E DISCUSSOES

Um total de 18 carotenoides diferentes foram separados no extrato da microalga *Chlorella vulgaris* (Figura 1). Os carotenoides separados foram identificados com base nas informações combinadas obtidas por eluição cromatográfica, co-cromatografia com padrões, características UV/visível e espectros de massa.

Figura 1: Cromatograma de extrato de carotenoides da biomassa *Chlorella vulgaris* obtido por HPLC-PDA-MS.



Identificação dos picos: (1) all-*trans* violaxantina (13.42 µg.g⁻¹); (2) 9-*cis*-neoxantina (20.53 µg.g⁻¹); (3) all-*trans* luteoxantina (17.39 µg.g⁻¹); (4) 13-*cis*-anteroxantina (18.57 µg.g⁻¹); (5) 15-*cis*-luteína (72.19 µg.g⁻¹); (6) all-*trans*-diatoxantina (21.66 µg.g⁻¹); (7) all-*trans*-luteína (111.26 µg.g⁻¹); (8) all-*trans*-zeaxantina (271.01 µg.g⁻¹); (9) all-*trans*-cantaxantina (104.01 µg.g⁻¹); (10) all-*trans*-mixoxantofila (129.89 µg.g⁻¹); (11) β-carotene-5,6-epóxido (49.23 µg.g⁻¹); (12) all-*trans*-β-criptoxantina (15.05 µg.g⁻¹); (13) all-*trans*-crocoxantina (8.09 µg.g⁻¹); (14) all-*trans*-equinenona (452.63 µg.g⁻¹); (15) 13-β-caroteno (17.17 µg.g⁻¹); (16) 9-*cis*-equinenona (263.20 µg.g⁻¹); (17) all-*trans*-β-caroteno (352.29 µg.g⁻¹); (18) 9-*cis*-β-caroteno (40.43 µg.g⁻¹).

Considerando o perfil quantitativo, o extrato mostrou um total de carotenoides de 1977.02 µg.g⁻¹, sendo all-*trans*-equinenona (pico 14) quantitativamente dominante no extrato seguido

de all-*trans*- β -caroteno (pico 17), 9-*cis*-equinenona (pico 16), all-*trans*-zeaxantina (pico 8), all-*trans*-mixoxantofila (pico 10) com teor de carotenoides 452.63 $\mu\text{g.g}^{-1}$, 352.29 $\mu\text{g.g}^{-1}$, 263.20 $\mu\text{g.g}^{-1}$, 271.01 $\mu\text{g.g}^{-1}$, 129.89 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente. Esse valor apresenta um teor substancial quando comparado aos carotenoides obtidos a partir da microalga *Phormidium autumnale* que apresentou um teor total de carotenoides de 714,3 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (Rodrigues et al., 2015).

Adicionalmente, entre todos os microrganismos capazes de sintetizar carotenoides, as microalgas são melhores produtores de certos materiais bioativos, porque têm um ciclo de vida e uma morfologia mais simples, levando a uma maior produtividade fotossintética (Johnson & Alric, 2013; Jeon et al., 2016).

5. CONCLUSÃO

A biomassa *Chlorella vulgaris* apresentou a capacidade de produzir um conteúdo significativo de carotenoides, sob condições fotoautotróficas, indicando o potencial como fonte desse pigmento, além de ser uma produção de baixo custo para obtenção de carotenoides. Demonstrando assim, ser consequentemente, uma alternativa viável para aplicação no mercado industrial.

6. REFERÊNCIAS

- BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology*, v. 25(3), p. 743-756, 2013.
- CHEW, K. W.; YAP, J. Y.; SHOW, P. L.; SUAN, N. H.; JUAN, J. C.; LING, T. C.; ... & CHANG, J. S. Microalgae biorefinery: high value products perspectives. *Bioresource Technology*, v. 229, p. 53-62, 2017.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, v. 36, p. 1959-1967, 2006.
- GONG, M., & BASSI, A. Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*, v. 34(8), p. 1396-1412, 2016.
- GRAMA, B. S.; CHADER, S.; KHELIFI, D.; STENUIT, B.; JEFFRYES, C., & AGATHOS, S. N. Characterization of fatty acid and carotenoid production in an *Acutodesmus* microalga isolated from the Algerian Sahara. *Biomass and Bioenergy*, v. 69, p. 265-275, 2014.
- HERRERO, M.; DEL PILAR SÁNCHEZ-CAMARGO, A.; CIFUENTES, A., & IBÁÑEZ, E. Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 71, p. 26-38, 2015.
- JOHNSON X, ALRIC J. Central carbon metabolism and electron transport in *Chlamydomonas reinhardtii*: metabolic constraints for carbon partitioning between oil and starch. *Eukaryot Cell*, v. 12, p. 776-793, 2013.

- 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 genus. *Extremophiles*, v. 15(1), p. 45-57, 2011.
- NURACHMAN, Z.; HARTINI, H.; RAHMANIYAH, W. R.; KURNIA, D.; HIDAYAT, R.; PRIJAMBOEDI, B.; ... & NURBAITI, S. Tropical marine Chlorella sp. PP1 as a source of photosynthetic pigments for dye-sensitized solar cells. *Algal Research*, v. 10, p. 25-32, 2015.
- RIPPKA, R. et al. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal General Microbiology*, v. 111, p.1-61, 1979.
- RODRIGUES, D. B.; FLORES, É. M.; BARIN, J. S.; MERCADANTE, A. Z.; JACOB-LOPES, E., & ZEPKA, L. Q. Production of carotenoids from microalgae cultivated using agroindustrial wastes. *Food Research International*, v. 65, p. 144-148, 2014.
- RODRIGUES, D. B.; MENEZES, C. R.; MERCADANTE, A. Z.; JACOB-LOPES, E., & ZEPKA, L. Q. Bioactive pigments from microalgae Phormidium autumnale. *Food Research International*, v. 77, p. 273-279, 2015.
- JEON, S.; JEONG, B. R., & CHANG, Y. K. Chemicals and Fuels from Microalgae. *Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Production of Fuels and Chemicals*, p. 1-21, 2016.
- PŘIBYL, P.; PILNÝ, J.; CEPÁK, V., & KAŠTÁNEK, P. The role of light and nitrogen in growth and carotenoid accumulation in *Scenedesmus* sp. *Algal Research*, v. 16, p. 69-75, 2016.
- DE ROSSO, V. V., & MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 55(13), p. 5062-5072, 2007.
- SUGANYA, T.; VARMAN, M.; MASJUKI, H. H., & RENGANATHAN, S. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 55, p. 909-941, 2016.