

COMPOSTOS FENÓLICOS PRODUZIDOS A PARTIR DE MICROALGAS

D. P. WEBER¹, T.C. NASCIMENTO¹, M. T. BARCIA¹, 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 – As microalgas tem despertado cada vez mais atenção pela sua capacidade em sintetizar inúmeros metabólitos bioativos de interesse. Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar o conteúdo fenólico bem como o potencial antioxidante de *Scenedesmus obliquus* CPCC05 e *Phormidium autumnale*. As biomassas foram produzidas em fotobiorreator de coluna de bolhas acoplado a uma plataforma de iluminação, operando de forma intermitente com alimentação de 1,5 L de meio BG11, concentração inicial de inóculo de 100 mg.L⁻¹, temperatura de 25 °C, aeração de 1 volume de ar por volume de meio por minuto (VVM) através da injeção de ar enriquecido com 15,0% de dióxido de carbono (v/v), a relação volume de meio circundante na plataforma de iluminação e área escura foi de 20% e intensidade luminosa de 13000 Lux. O conteúdo fenólico foi extraído das biomassas por meio de agitação orbital com metanol e determinado através de reagente de Folin-Ciocalteu. A atividade antioxidante foi estabelecida através da capacidade do extrato fenólico em desativar espécies reativas de oxigênio. Com base nos resultados obtidos, a microalga *Scenedesmus obliquus* CPCC05 apresentou maior conteúdo fenólico total (871,2 µg EAG.g⁻¹) bem como maior potencial antioxidante (23,5 µMol TE.g⁻¹) em relação a *Phormidium autumnale* (552,6 µg EAG.g⁻¹ e 16,3 µMol TE.g⁻¹). Deste modo, sugere-se que essa microalga pode ser explorada como uma via natural de produção compostos fenólicos.

1. INTRODUÇÃO

As microalgas são micro-organismos promissores, uma vez que são constituídas por uma variedade de biomoléculas de interesse comercial, tais como aminoácidos, ácidos graxos, carotenoides, clorofila e compostos fenólicos (Zepka *et al.*, 2008; Jacob-Lopes *et al.*, 2007; Klejdus *et al.*, 2010; Queiroz *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.* 2014; Maadane *et al.*, 2015; Maroneze *et al.*, 2016).

Dentre esses microrganismos as clorofíceas e cianobactérias estão entre as linhagens que tem sido fortemente exploradas em função do seu potencial produção de biomassa associado a esses valiosos compostos celulares, os quais podem ser amplamente aplicados como insumos intermediários e produtos finais de processos relacionados à bioenergia, alimentação e farmacêuticos (Zepka *et al.*, 2008; Jacob-Lopes *et al.*, 2010; Zepka *et al.*, 2010; Queiroz *et al.*, 2011; 2014; Rodrigues *et al.* 2015; Santos *et al.*, 2016; Maroneze *et al.*, 2016).

Muitas pesquisas tem sido amplamente direcionadas para exploração de biocompostos microalgais (Zepka *et al.*, 2008; Jacob-Lopes *et al.*, 2007; Queiroz *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*

2014; Rodrigues *et al.* 2015; Maroneze *et al.*, 2016), no entanto compostos fenólicos ainda são pouco explorados, embora sua presença em biomassa microalgal já tenha sido considerada há algum tempo (Klejdus *et al.*, 2009).

Compostos fenólicos são uma classe importante de antioxidantes, uma vez que são capazes de impedir a oxidação lipídica por eliminação direta de espécies reativas de oxigênio entre outras funções, por conta disso assumem importante papel em termos de saúde humana ou aplicações tecnológicas (Pietta, 2000).

Com base no exposto, o presente estudo teve por objetivo avaliar o conteúdo compostos fenólicos totais presente nas biomassas de *Scenedesmus obliquus* CPCC05 e *Phormidium autumnale*, bem como determinar seu potencial antioxidante.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismos, meio de cultura e produção de biomassa

Culturas axênicas de *Scenedesmus obliquus* CPCC05 e *Phormidium autumnale* foram propagadas e mantidas em meio de BGN sintético contendo ágar-ágar solidificado (20 g.L⁻¹) (Rippka *et al.*, 1979). As condições de incubação utilizadas foram de 25°C e intensidade luminosa constante de 1000 Lux.

A produção de biomassa foi realizada em fotobiorreator (Jacob-Lopes *et al.*, 2014) integrando duas unidades principais de reação: um fotobiorreator de coluna de bolhas acoplado a uma plataforma de iluminação. O fotobiorreator operou em regime intermitente, alimentado com 1,5 L de meio BGN (Ripka *et al.*, 1979). As condições experimentais foram: concentração inicial de inóculo de 100 mg.L⁻¹, temperatura de 25 °C ± 1, aeração de 1 volume de ar por volume de meio por minuto (VVM), através da injeção de ar enriquecido com 15,0% de dióxido de carbono (v/v). A relação entre o volume de meio circundante na plataforma de iluminação e área escura foi de 20%, além disso a intensidade luminosa de 13000 Lux permaneceu constante.

2.2. Extração e quantificação dos compostos fenólicos totais

A extração de compostos fenólicos foi realizada conforme metodologia proposta por Souza *et al.*, (2011), com adaptações. 0,2 g de biomassa liofilizada foram homogeneizadas com 2 mL de metanol em agitador orbital a 25 °C durante 60 min a 200 rpm. A agitação foi interrompida aos 45 minutos, após foram adicionados 2 mL de metanol e a agitação foi retomada por mais 60 min. O extrato foi filtrado e lavado três vezes com 10 mL de hexano para fins de purificação. O extrato purificado foi clarificado para eliminação de proteínas com hidróxido de bário 0,1 M e sulfato de zinco 5%, após submetido a centrifugação durante 10 min a 3000 rpm. O sobrenadante foi removido, filtrado através de membrana de 0,22 µm (Millipore) e a concentração ajustada em balão volumétrico. Em seguida, os extratos foram encaminhados para determinação do conteúdo total de fenólicos bem como sua capacidade antioxidante.

O teor de fenólicos totais foi estimado pelo método de Folin-Ciocalteu adaptado de Singleton *et al.* (1999). 2,5 mL de amostra foram adicionados a 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu diluído (1:10). Após 5 min, adicionou-se 2 mL de carbonato de sódio a 7,5%. Decorridas 2 h de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, mediu-se a absorbância a 760 nm. A quantificação foi feita por calorimetria, por meio de curva de calibração de sete

pontos, construída com ácido gálico (170,1 mM). Os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico por grama de peso seco de microalga (mg GAE.g⁻¹) e referem-se ao valor médio de três repetições.

2.3. Potencial antioxidante dos extratos fenólicos totais

A capacidade antioxidante dos extratos fenólicos determinada conforme o método proposto por Ou et al., 2013 para amostras hidrofílicas, com adaptações. 25 µL de extrato fenólico ou tampão fosfato (branco) foram colocados em microplaca de 96 poços contendo 150 µL de fluoresceína (81 mM) em tampão fosfato (75 mM e pH 7,4). A mistura foi pré-incubada durante 10 min a 37 ° C seguida da adição de 25 µL de AAPH (19 mM). O sinal de fluorescência foi registrado cada minuto até 80 min num SpectraMax M5 (Molecular Devices Corp, Los Angeles-CA USA) ou até atingir 0,5% do sinal de fluorescência inicial. A fluorescência foi monitorizada no comprimento de onda de emissão de 520 ± 20 nm com excitação de 485 ± 20 nm. Registrou-se a fluorescência relativa em função do tempo e calculou-se a área sob curva (AUC) da amostra e do branco. Os resultados foram expressos em µmol trolox equivalente por grama de peso seco de biomassa microalgal (µmol TE.g⁻¹) e referem-se ao valor médio de três repetições.

2.4. Análise estatística

A análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey (p <0,05) foram utilizados para verificar as diferenças entre as microalgas. As análises foram realizadas com o software Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa-OK, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O conteúdo de fenólicos das biomassas microalgais está apresentado na Tabela 1. Os teores diferiram significativamente (p <0,05), a microalga *Scenedesmus obliquus* CPCC05 (871,20 µg EAG.g⁻¹) exibiu maior teor de fenólicos quando comparada a *Phormidium autumnale* (552,6 µg EAG.g⁻¹). No entanto, o conteúdo encontrado para as duas microalgas foi inferior ao relatado para a maioria das microalgas analisadas em estudo realizado por Goiris et al. 2012 (1090 a 4570 µg EAG.g⁻¹).

A ausência de proteínas nos extratos fenólicos do presente estudo pode justificar o limiar mínimo destes compostos em comparação com a literatura, uma vez que a estrutura química das proteínas através de reações de redução sob o reagente de Folin–Ciocalteu produz um composto que apresenta absorção máxima na faixa de 760 nm, a qual é mesma faixa de absorção para fenólicos (Agbor et al., 2014).

Tabela 2. Potencial antioxidante dos extratos fenólicos microalgais.

Microalgae	µMol TE.g ⁻¹
<i>Scenedesmus obliquus</i> CPCC05	23,5 ^a ± 0,1
<i>Phormidium autumnale</i>	16,3 ^b ± 0,0

As médias com diferentes sobrescritos são significativamente diferentes (p <0,05) pelo teste de Tukey.

A capacidade de eliminação das espécies reativas de oxigênio (EROs) no presente estudo foi medida por monitoramento do efeito de antioxidantes sobre o decaimento da fluorescência, o qual é causado pela oxidação da sonda de fluoresceína induzida por EROs geradas pela decomposição térmica de AAPH à 37 °C (OU *et al.* 2013). Diante disso, pode-se observar na Figura 1 que o extrato fenólico da *S. obliquus* foi capaz de manter a fluorescência da sonda mais estável quando comparado ao extrato da *P. autumnale*, evidenciando assim maior potencial antioxidante ($23,48 \pm 0.13 \mu\text{Mol TE.g}^{-1}$) conforme é demonstrado na Tabela 2, além disso o teste de Tukey ($p < 0,05$) mostrou uma diferença significativa entre os teores de fenólicos encontrados para as duas algas estudadas. Este resultado corrobora com o conteúdo fenólico encontrado nas microalgas (Tabela 1).

De acordo com estudos realizados por Cai *et al.* (2004), amostras que apresentarem os valores médios de atividade antioxidante acima de $10 \mu\text{g EAG.g}^{-1}$, podem ser consideradas ricas em antioxidantes. Com isso, os valores obtidos no presente estudo evidenciam o potencial antioxidante destes compostos na biomassa das microalgas exploradas.

Figura 1. Decaimento da fluorescência de fluoresceína induzida por radicais peroxil na presença de extrato fenólico de *Scenedesmus obliquus* CPCC05 e *Phormidium autumnale*.

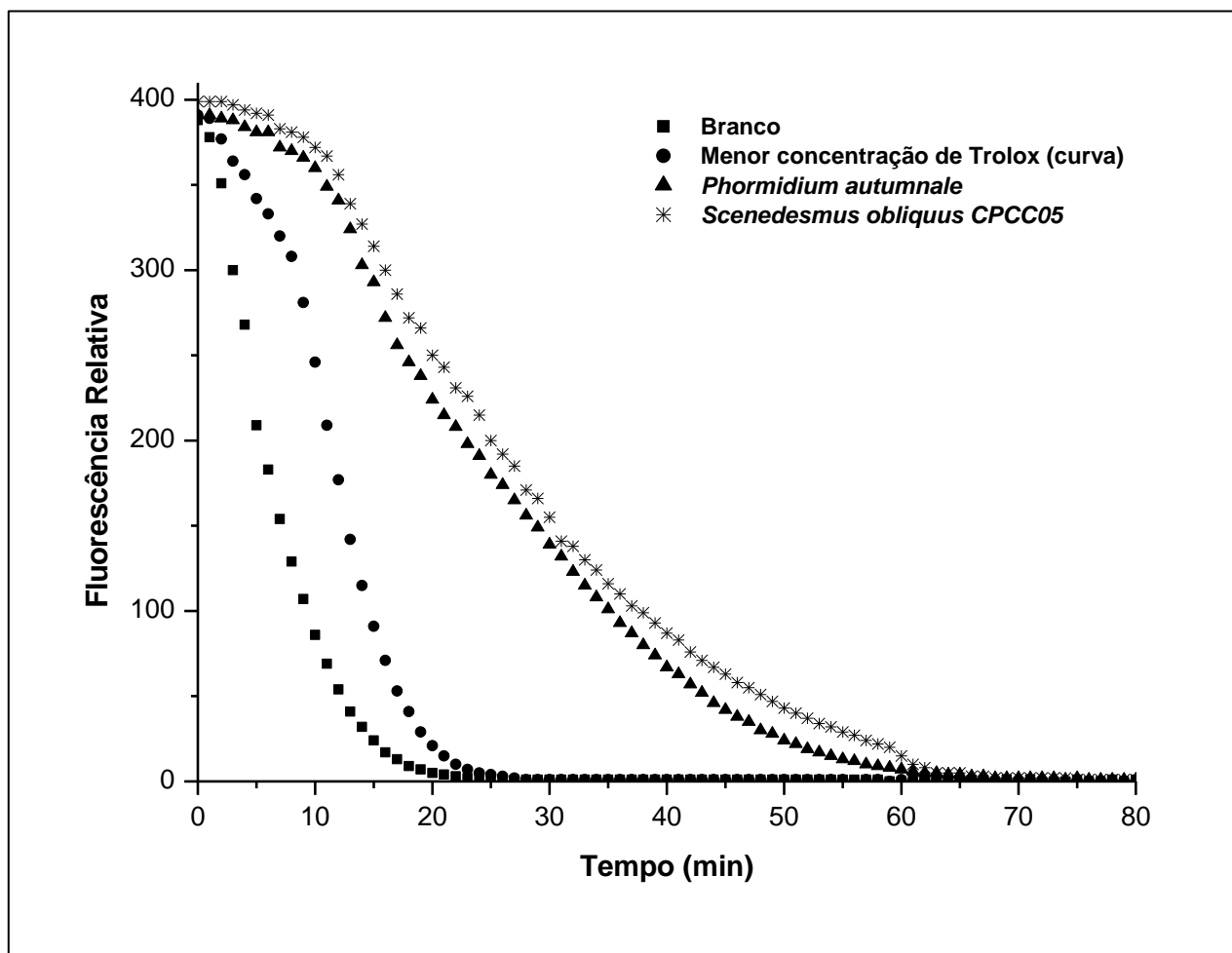


Tabela 2. Potencial antioxidante dos extratos fenólicos microalgais.

Microalgae	$\mu\text{Mol TE.g}^{-1}$
<i>Scenedesmus obliquus</i> CPCC05	23,5 ^a \pm 0,1
<i>Phormidium autumnale</i>	16,3 ^b \pm 0,0

As médias com diferentes sobrescritos são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, a microalga *Scenedesmus obliquus* CPCC05 apresentou maior conteúdo de fenólicos totais bem como maior potencial antioxidante quando comparada a *Phormidium autumnale*.

5. REFERÊNCIAS

- AGBOR, G. A.; VINSON, J. A.; DONNELLY P. E. Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *Int. J Food Sci, Nutr and Diet*, v.3, n.8, p.147–156.
- CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci*, v.74, p.2157–2184, 2004.
- GOIRIS, K.; MUYLAERT. K.; FRAEYE, I.; FOUBERT, I.; DE BRABANTER, J.; DE COOMAN, L. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *J. Appl. Phycol.*, v. 24, p.1477–1486, 2012.
- JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q.; PINTO, L.A.A.; QUEIROZ, M.I. Characteristics of thin-layer drying of the cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli. *Chem. Eng. Process*, v. 46, p. 63–69, 2007.
- JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C. H. G.; QUEIROZ, M. I.; FRANCO, T. T. Biotransformations of carbon dioxide in photobioreactors, *Energy Convers. Manage*, v. 51, p. 894–900, 2010.
- JACOB-LOPES, E. et al. Bioprocess for the conversion of carbon dioxide from industrial emissions, bioproducts, uses thereof and hybrid photobioreactor. BR Pat. 041028. 15 sep. 33p. 2014.
- KLEJDUS, B.; KOPECKÝB, J.; BENEŠOVÁ, L.; VACEKA, J. Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. *J. Chromatogr. A*, v.1216, n.5, p.763–771, 2009.
- MAADANE, A.; MERGHOUB, N.; AINANE, T.; EL ARROUSSI, H.; BENHIMA, R.; AMZAZI, S.; BAKRI, Y.; WAHBY, I. Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. *J. Biotechnol.*, v.215, n.10 p.13–19, 2015.
- MARONEZE, M. M.; SIQUEIRA, S. F.; VENDRUSCOLO, R. G.; WAGNER, R.; MENEZES, C. R.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E. The role of photoperiods on photobioreactors - A potential strategy to reduce costs. *Bioresour. Technol.*, v.219, p.493–499, 2016.

- OU, B.; CHANG, T.; HUANG, D.; PRIOR, R.L. Determination of Total Antioxidant Capacity by Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using Fluorescein as the Fluorescence Probe: First Action 2012.23. *J. AOAC Int.*, v. 96, n. 6, p.1372–1376, 2013
- PIETTA P. G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, v.63, p.1035–1042, 2000.
- QUEIROZ, M. I.; HORNES, M. O.; SILVA-MANETTI, A. G.; JACOB-LOPES, E. Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. *Applied Energy*, v.88, n.10, p.3438–3443, 2011.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B.; HERDMAN, M.; STAINER, R. Y. Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, v. 111, n. 1, p.1–61, 1979.
- RODRIGUES, D. B.; MENEZES, C.R.; MERCADANTE, A. Z.; LOPES, E.J.; ZEPKA, L. Q. Bioactive pigments from microalgae *Phormidium autumnale*. *Food Res Int*, v.77, n.2, p.273–279, 2015.
- 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 Res Int*, v.65, p.144–148, 2014.
- SANTOS, A. B.; FERNANDES, A. S.; WAGNER, R.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q. Biogenesis of volatile organic compounds produced by *Phormidium autumnale* in heterotrophic bioreactor. *J. Appl. Phycol*, v.28, n.2, p.1561–1570, 2016.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, v.299, p.152–178, 1999.
- SOUZA, M. M.; PRIETTO L.; RIBEIRO, A. C.; SOUZA, T. D.; BADIALE-FURLONG, E. Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*, v.35, n.6, p.1050–1058, 2011.
- ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; GOLDBECK, R.; QUEIROZ, M.I. Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica* Nägeli submitted to different drying conditions. *Chem. Eng. Process*, v. 47, n. 8, p. 1311-1316, 2008.
- ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; GOLDBECK, R.; SOUZA- SOARES, L.A.; QUEIROZ, M.I. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. *Bioresour. Technol.*, v.101, n.18, p.7107–7111, 2010.