

OBTENÇÃO DE BIOPRODUTOS DE UMA ALGA SUB-ANTÁRTICA VISANDO UTILIZÁ-LA COMO UMA REFINARIA BIOTECNOLÓGICA

MICHELLE DIAS HORNES DA ROSA¹; ROSINEI SILVA SANTOS²; LUIZA RIBEIRO SANTANA³; CAREM PERLEBERG⁴; NEFTALI LENIN VILLARREAL CARRENO⁵; CLAUDIO MARTIN PEREIRA DE PEREIRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – micha.hornes@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – rosineicaxias@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – luizasantanari@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – caremperleberg222@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – nlv.carreno@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – claudiochemistry@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As algas são organismos de ambientes aquáticos ou úmidos pertencentes ao reino protista. As macroalgas marinhas, ou *seaweeds*, foco deste estudo, são divididas em três filos: algas verdes (Chlorophyta), vermelhas (Rhodophyta) e marrons (Ochrophyta). Registros do banco de dados SCOPUS de 2012-2021 geraram um rank que classificou o Brasil como o 7º país que mais publicou artigos envolvendo macroalgas entre 2012 e 2021, então pode-se dizer que esta é uma área de pesquisa que o Brasil já possui certo impacto internacional (ARIAS et al., 2023).

A carragenana é um polissacarídeo de alto peso molecular à base de galactose encontrado na parede celular de macroalgas vermelhas (JONSSON et al., 2020). Para a indústria, sua obtenção é natural, diretamente extraída das algas, não sendo obtida por via sintética, sendo utilizada principalmente como gelificante em indústrias de cosméticos e alimentos. O polímero também se destaca pelas suas propriedades antimicrobiana, antiviral, antioxidante e anti-inflamatória (ISMAIL et al., 2020).

Os lipídios são metabólitos presentes em porcentagem menor em relação aos polissacarídeos como a carragenana, estando presentes de 0,2 a 8% de seu peso seco a depender da espécie da alga (LOPES et al., 2020). A celulose é um polissacarídeo composto por cadeias formadas por unidades de D-glucopiranosil não ramificadas com excelentes propriedades mecânicas, tais como: alta resistência à tração e flexão, resistência térmica, biodisponibilidade e biodegradabilidade, sendo um polímero natural renovável alternativo aos à base de petróleo (OMRAN et al., 2021).

Diante do exposto, dentro do que envolve um pré-projeto de doutorado submetido anteriormente junto ao programa de pós-graduação em biotecnologia desta universidade com tema geral de “biotecnologia de algas”, inicia-se aqui um estudo preliminar com objetivos de: 1) Verificar a possibilidade de enquadrar a macroalga marinha vermelha *Sarcopeltis skottsbergii* como biorrefinaria, ou seja, sua capacidade de resultar mais de um produto – sendo: carragenana, ácidos graxos e celulose – partindo de um mesmo lote de biomassa, em extrações sequenciais; 2) Quantificar rendimentos dos três produtos para discutir a viabilidade do processo da biorrefinaria; 3) Desempenhar caracterizações químicas dos bioprodutos individualmente.

2. METODOLOGIA

De forma geral, dentro do âmbito da biotecnologia azul – área da biotecnologia que estuda o ecossistema marinho –, a partir de um mesmo lote de biomassa previamente coletada e identificada de macroalgas vermelhas da espécie *Sarcopeltis skottsbergii*, foram realizadas três extrações sequenciais: 1) carragenana; 2) ácidos

graxos totais; e 3) celulose. De cada uma das extrações foi quantificado o rendimento para qualificação posterior do processo de biorrefinaria e performedo uma caracterização química individual de cada bioproduto, sendo FT-IR ou GC-MS.

2.1 Coleta e pré-tratamento da biomassa algal

Amostras da macroalga vermelha *Sarcopeltis skottsbergii* foram previamente coletadas na região subantártica do Chile (53° 07' 33" S 71° 21' 12" W) em agosto de 2018. Após a coleta, as algas foram preparadas conforme SANTOS et al (2019) e secas em estufa a 35 °C por 24 h. Em seguida, as amostras foram moídas em moinho de facas e armazenadas a 20 °C em embalagens isentas de umidade e luz. A identificação morfológica foi realizada pelo Laboratório de Ecossistemas Marinhos Antárticos e Subantárticos do Chile.

2.2 Extração da carragenana

Para a extração da carragenana, inicialmente 2 g da alga seca foram pesadas em triplicata e diluídas em 100 mL de água destilada em balões volumétricos para então permanecer por 1 h sob agitação a 90 ° C. Após este período o volume dos balões foi dividido em falcons para centrifugar a 3500 rpm por 15 minutos. Os sobrenadantes (extrato) foram vertidos para outro recipiente onde foram adicionados de etanol 95% 1:1 (v/v) para precipitação *overnight* em geladeira, e os pellets (biomassa residual) também foram reservados, congelados e liofilizados para as posteriores extrações.

2.3 Extração dos ácidos graxos e esterificação

A alga seca foi pesada 1 g em triplicata para a extração, que seguiu o método de BLIGH & DYER (1959) com modificações. O método consiste basicamente em uma extração pelos solventes clorofórmio e metanol a temperatura ambiente. Os lipídios totais extraídos da biomassa algal foram então convertidos aos seus respectivos ésteres metílicos de ácidos graxos seguindo a metodologia modificada de MOSS et al. (1974) para poderem ser analisadas em GC-MS QP 2010S.

2.4 Extração da celulose

A extração de celulose da macroalga *S. skottsbergii* seguiu o método BAR-SHAH et al. (2021) modificado, onde 5 g da alga (em triplicata) foram colocadas em banho de acetona a 60°C por 60 min a 20% (p/v) por 4 vezes. Logo após as amostras ficaram em banho de tampão acetato contendo 1,17 g de clorito de Sódio (NaClO₂) (20% p/v) a 60 °C por 6–8 h, seguido de uma neutralização de pH por lavagem com água destilada. Após isso houve uma alquilação em banho de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 M (20% p/v) a 60 °C por 8 h. Após o tratamento alcalino o pH foi novamente neutralizado por lavagem com água destilada para depois ser acidificado com banho de HCl 5% (v/v) a 100 °C por 10 min (20% p/v) e deixado em repouso *overnight* sob temperatura ambiente. No dia seguinte as amostras foram enxaguadas repetidamente com água destilada até atingir pH neutro, congeladas e liofilizadas.

2.5 Caracterizações

Os rendimentos de todas extrações foram quantificados em porcentagem de peso seco relativo à massa inicial pesada no início do processo. Para realizar as análises de espectroscopia de infra-vermelho com transformada de fourier (FT-IR) foi utilizado equipamento SHIMADZU IRspirit (Japão) com 45 varreduras na faixa de 400 a 4000 cm⁻¹ e resolução de 4 cm⁻¹.

Os ácidos graxos foram analisados em cromatógrafo a gás acoplado a detector de massas modelo GC-MS-QP 2010SE (Shimadzu, Japão) equipado com auto-injetor AOC-20i com coluna capilar ELITE-WAX 30m x 0,25 mm x 0,25 μ m (PerkinElmer, EUA), com as seguintes condições: temperatura inicial de 100°C subindo a 7 °C/min até 165 °C passando a 5 °C/min até 230 °C por 10min; volume injetado: 1 μ L; interface: 200°C; temperatura do injetor: 230 °C; gás de arraste: hélio; fluxo linear de gás: 1,20 mL/min; split: 1:25; corrida em modo scan; faixa de massa 40 a 700 m/z e voltagem do filamento 70 eV. As identificações foram feitas utilizando padrão FAME Mix 37 (Sigma-Aldrich) e biblioteca NIST 8 do próprio GC-MS.

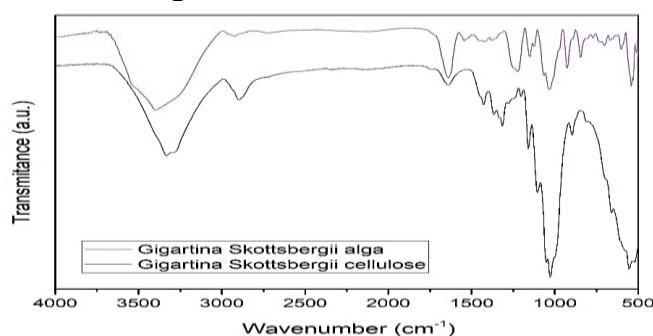
2.6 Análises e estatística

Não houve necessidade de utilização de nenhum software de estatística específico para análise dos dados deste trabalho. Os dados gerados foram as médias dos valores das triplicatas mais desvio padrão para os cálculos de rendimentos; ou valores que geraram picos a analisar diretamente nos softwares dos próprios equipamentos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da primeira extração da biomassa da macroalga *S. skottsbergii* foi possível extrair carragenana a um rendimento de 55 $\pm$ 9,6% somada da biomassa residual resultante do processo. A biomassa residual permitiu a realização da segunda extração para obter os ácidos graxos, que renderam 0,8 $\pm$ 0,5% + biomassa residual, que na terceira extração resultou celulose a 1,5 $\pm$ 1%. Os rendimentos da segunda e terceira extração podem ser considerados baixos em comparação com plantas terrestres, mas estão de acordo com valores reportados para ácidos graxos e celulose: 3,32 $\pm$ 0,14% (ác. graxos) e 0,97 $\pm$ 0,09% (celulose) para *Durvillaea antarctica*; 3,82 $\pm$ 0,13% (ác. graxos) e 5,43 $\pm$ 0,26% (celulose) para *Ulva lactuca* (FILHO et al., 2023).

Figura 3. FT-IR da celulose



O espectro de FT-IR (Figura 3) para a celulose de *S. skottsbergii* mostra um ombro na faixa entre 3700–3000 cm^{-1} e 1635–1655 cm^{-1} , indicando a presença de grupos O–H. Há na celulose um pico em 2926 cm^{-1} relacionado à presença de ligações C–H nos grupos –CH, –CH₂ e –CH₃ (HALIB et al., 2012; ZIEBA-PALUS et al., 2017). De forma geral os picos obtidos neste espectro concordam com os obtidos por FILHO et al. (2023) para as celuloses de *Durvillaea antarctica* e *Ulva lactuca*, portanto, consideramos a extração realizada com sucesso. Importante ressaltar que até onde pudemos verificar não há registros na literatura de estudos de caracterização de celulose para a espécie *S. skottsbergii*.

Na Figura 4 é possível visualizar a listagem dos picos identificados pela biblioteca do software do equipamento GC-MS-QP 2010SE. Pela análise do cromatograma puderam ser identificados 4 ácidos graxos, sendo todos saturados, 1

hidrocarboneto e 2 ésteres de ácidos graxos. Pela ordem dos tempos de retenção, identificou-se: 1) ácido mirístico C14:0; 2) ácido láurico C12:0; 3) o hidrocarboneto heptadecano; 4) o éster metílico do ácido mirístico; 5) ácido palmítico C16:0; 6) ácido esteárico C18:0; e 7) o éster metílico do ácido esteárico.

Figura 4. Listagem de picos do cromatograma gerado no GC-MS

Peak#	R.Time	Area%	Mark	Name
1	9.527	10.18	MI	Tetradecane
2	13.546	16.06	V	Dodecanoic acid, methyl ester
3	15.996	6.56	MI	Heptadecane
4	20.324	14.82	V	Methyl tetradecanoate
5	26.901	16.82	SV	Hexadecanoic acid, methyl ester
6	32.232	19.77	V	9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)-
7	33.045	15.79	V	Methyl stearate
		100.00		

O ácido graxo com maior pico de concentração no cromatograma foi o ácido palmítico, o que está de acordo com relatórios anteriores que avaliaram o teor de ácidos graxos em algas coletadas no Chile (SANTOS, 2013).

4. CONCLUSÕES

Este trabalho propôs uma nova perspectiva de uso para a espécie de macroalga vermelha *Sarcopeltis skottsbergii* como biorrefinaria biotecnológica, pelo motivo de ter sido verificada sua possibilidade de produção de mais de um bioproduto em sequência, partindo de um só processo (mesmo lote de biomassa) ainda que a baixos rendimentos, a ser: um polissacarídeo carragenana, um pool de ácidos graxos totais e um polissacarídeo celulose, ainda a confirmar se micro ou nanocelulose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARIAS, A.; FEIJOO, G.; et al. Macroalgae biorefineries as a sustainable resource in the extraction of value-added compounds. **Algal Research**, 2023.
2. BAR-SHAI, N.; SHARABANI-YOSEF, O.; et al. Seaweed cellulose scaffolds derived from green macroalgae for tissue engineering. **Scientific Reports**, v.11, 2021.
3. BLIGHT, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, 1959.
4. FILHO, A. V.; SANTANA, L. R.; et al. Extraction of fatty acids and cellulose from the biomass of algae *Durvillaea antarctica* and *Ulva lactuca*: An alternative for biorefineries. **Algal Research**, 2023.
5. HALIB, N.; AMIN, M.C.I.M.; et al. Physicochemical properties and characterization of Nata de coco from local food industries as a source of cellulose. **Sains Malaysiana**, v.41, 2012.
6. ISMAIL, M. M.; ALOTAIBI, B. S.; et al. Therapeutic uses of red macroalgae. **Molecules**, v.25, 2020.
7. JONSSON, M.; ALLAHGHOLI, L.; et al. Extraction and modification of macroalgal polysaccharides for current and next generation applications. **Molecules**, v.25, 2020.
8. LOPES, D.; MELO, T.; et al. Valuing bioactive lipids from green, red and brown macroalgae from aquaculture to foster functionality and biotechnological applications. **Molecules**, v.25, 2020.
9. MOSS, C. W.; LAMBERT, M. A.; MERWIN, W. H. Comparison of rapid methods for analysis of bacterial fatty acids. **Appl Microbiol.** v.28, n.1, p.80–85, 1974.
10. OMRAN, A.A.B.; MOHAMMED, A.A.B.A.; et al. Micro- and Nanocellulose in Polymer Composite Materials: A Review. **Polymers** v.13, 2021.
11. SANTOS, M.A.Z.; DE FREITAS, S. C.; et al. Pigment concentration, photosynthetic performance, and fatty acid profile of sub-Antarctic brown macroalgae in different phases of development from the Magellan region, Chile. **Journal of Applied Phycology**, v.31, 2019.
12. SANTOS, M.A.Z. **Análise de ácidos graxos poliinsaturados em macroalgas vermelhas da Antártica por Cromatografia Gasosa**. 2013. 74f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção) - Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Pelotas.
13. ZIEBA-PALUS, J. The usefulness of infrared spectroscopy in examinations of adhesive tapes for forensic purposes. **Forensic Science and Criminology**, v.2, 2017.