

E.3.2.2 Informe sobre la extracción enzimática de compuestos bioactivos

Alternativa integral para la explotación de macroalgas en la zona del Galicia y Portugal

ALGALUP

0558_ALGALUP_6_E

Junho 2022

Contenido

1. Introdução	3
1. Materiais e métodos	4
1. MATERIAIS	4
1. MÉTODOS ANALÍTICOS	4
1.1. EXTRACÇÃO	6
Figura 1 Imagen del proceso de hidrólisis enzimática, llevado a cabo con el alga Codium	7

1. Introdução

As macroalgas marinhas representam uma rica fonte de compostos bioativos que podem ser incorporados em diversos produtos alimentares, cosméticos e farmacêuticos e que constituem benefícios para a saúde. Nos últimos anos, estudos têm mostrado que os compostos bioativos, como polifenóis, polissacarídeos, carotenóides e ácidos gordos ω -3 possuem bioatividades (Nova et al., 2020) .

A extração desses compostos bioativos pode ser realizada por métodos convencionais ou por métodos alternativos amigos do ambiente. Estes métodos alternativos, muitas vezes classificadas como métodos verdes, mostraram vários benefícios em relação aos métodos convencionais, incluindo quantidades reduzidas de solvente usado, menor tempo de extração e desempenho em temperaturas mais baixas. Além disso, são métodos mais seletivos para o isolamento dos compostos desejados, evitando a formação de subprodutos e reações indesejadas durante a extração (Duarte et al., 2014). Diferentes extrações conduzem a disparidades na estrutura entre as diferentes classes de compostos bioativos alvo e suas fontes naturais, bem como nas suas propriedades físicas e químicas(Cikoš et al., 2018). Portanto, é impreterível encontrar métodos de extração eficientes de compostos bioactivos alvo e otimizar o procedimento de extração.

Os solventes de extração mais utilizados são o metanol e o etanol, embora outros solventes com características diferentes também sejam utilizados com sucesso. Hoje em dia, as novas técnicas de extração líquido-líquido e sólida-líquido mais aplicadas são: técnicas supercríticas, ultrassom, micro-ondas, enzimáticas, alta pressão e técnicas de extração de campos elétricos pulsados. A este respeito, é desejável a combinação de tecnologias verdes e solventes amigos do ambiente e seguros para obter uma extração eficiente de compostos bioativos, preservando as suas propriedades biológicas e abrindo a porta à sua implementação nas indústrias alimentares, cosméticas e farmacêuticas. Uma vez que os compostos-alvo são eficientemente bem extraídos, os extratos resultantes podem ser incorporados em diferentes produtos (Coelho et al., 2020).

Neste projeto optou-se por fazer extração enzimática para extrair polissacarídeos. Assim sendo, o remanescente desta extração foi utilizado para verificar as bioatividades. Além disso, para o projeto não estar parado, foi utilizado métodos convencionais, já utilizados e validados no CBQF. Todas as metodologias vão abaixo descritas

1. Materiais e métodos

1. MATERIAIS

A ANFACO utilizou dois tipos diferentes de macroalgas, *Codium* e *Laurencia*, ambos adquiridos a seco de uma empresa de marketing, posicionados no mercado de consumo de alimentos humanos. Os materiais estão descritos no informe E 32.1.

As amostras de algas colhidas pela FCUP e pela U. Vigo foram analisadas pela ESB. Em primeiro trituraram-se as amostras num processador de alimentos (bimby TM5), estas farinhas foram utilizadas para formulações de snacks salgados (Figura 1). As amostras foram secas a 55°C durante 48h. O perfil nutricional foi avaliado, bem como as bioatividades.



Figura 1- Aspecto da alga *Codium* spp. (A) após triturar (B).

1. MÉTODOS ANALÍTICOS

A humidade foi determinada pelo peso constante e a diferença gravimétrica durante a secagem a 105°C, de acordo com o método AOAC. O teor de cinzas foi determinado gravimetricamente por calcinação da amostra seca a 550°C.

A determinação da proteína foi efetuada através da determinação do azoto pelo método de Kjeldhal Total (NTK), aplicando um fator de conversão de 6,25. A análise do NTK foi realizada através da digestão da amostra a 400 °C durante 4 horas, em meio ácido, utilizando o cobre como catalisador. Posteriormente, a amostra digerida foi colhida para o meio alcalino (adicionando NaOH) e titulado. O procedimento baseia-se nos métodos **!Error! Marcador no definido..** Para realizar a determinação, foi utilizado um digestivo e destilador da marca Seleta, padronizado para a determinação da NTK.

A quantificação de gorduras e óleos foi realizada com éter etílico. Para a extração com éter, foi utilizado um equipamento de extração Seleta, modelo Det. 4000842 de grama. O procedimento seguido é descrito nos Métodos Padrão AOAC.

A fibra dietética foi determinada por um procedimento interno acreditado, baseado no método 985.29 dos Métodos Padrão AOAC.

Capacidade antioxidante e conteúdo fenólico totais

A atividade antioxidante total (AA) foi determinada utilizando o método ABTS, tal como descrito por Gião et al. (2007). Os resultados foram dados em equivalente ácido ascórbico.

O conteúdo compostos fenólicos totais (TPC) nos extratos foi avaliado através do método espectrofotométrico Folin – Ciocalteu, descrito por Singleton & Rossi J A Jr. (1965) e expresso como miligrama de equivalente ácido gálico.

Carotenóides totais

Os Carotenóides Totais (TC) foram determinados usando uma análise espectrofotométrica, como descrito por Kimura, Rodriguez-Amaya, & Godoy (1990) e são expressos em equivalente b-caroteno.

Análise por HPLC

Os perfis qualitativos e quantitativos dos compostos fenólicos foram realizados de acordo com o método proposto por Oliveira, Ferreira, & Silva (2015), com ligeiras modificações. A análise foi realizada no HPLC-DAD (Série 600 de Águas). Mildford MA. EUA). Foi utilizada uma coluna simetria® C18, 250 x 4,6 mm i.d. 5 µm de tamanho de partícula e 125 poros com coluna de guarda (águas), e a eluição de solventes consistia em solvente A – Acetonitrile (100%) com 0,2 % TFA; Solvente B: acetonitrilo/água (5:95 v/v) (Merck de grau puro e água pura) com 0,2% TFA (Sigma-Aldrich, Alemanha); As amostras foram analisadas em triplicado. As curvas de calibração foram obtidas num comprimento de onda de deteção de 280 nm. Foram preparadas soluções de normas sobre a gama de concentração de 0,10 a 100,00 mg/L para a identificação e quantificação dos seguintes compostos: rutina, naringenina e Kaempferol (Sigma, Sintra, Portugal) expressas em µg por mL de biomassa de alga (FW) de peso seco. Todas as curvas de calibração foram lineares sobre as gamas de concentração testadas, com coeficientes de correlações de 0,999.

O conteúdo dos carotenóides também foi analisado pela HPLC-DAD (coluna C-18 Vydac 201TP54, 250 mm - 4,6 mm), equipada com um pré-coluna C-18.

A separação cromatográfica foi realizada como descrito por Oliveira et al., (2004). Solvente A com acetato de etilo (grau puro Merck) e solvente B 90:10 acetonitrilo:água (Merck de qualidade pura e água pura, 1,0 ml/min caudal, à temperatura ambiente.

O detetor UV-vis foi definido entre 270 e 550 nm. Os carotenóides individuais foram quantificados e a partir de uma curva de calibração construída com padrões puros: β -Caroteno, licopeno, zeaxantina e luteína (Extrassíntese, Genay Cedex, França) e expressos em miligramas por quilograma de produto seco.

1.1. EXTRACÇÃO

Após triturar e homogeneizar as amostras foram realizados testes de hidrólise enzimática num reator de vidro termóstato de 5l, a explicação em detalhe está na entregable 3.2.1.

Relativamente aos métodos convencionais a extração de compostos fenólicos foi com metanol:água e para os carotenoides foram utilizados solventes lipofílicos conforme descritos abaixo.

Extração convencional de compostos fenólicos

A extração de compostos fenólicos foi realizada de acordo com Oliveira et al. (2016), com ligeiras modificações. As algas (2,5 g) foram homogeneizadas com uma ultra-turrax (IKA, T18, Wilmington, EUA) durante 2 min com 25 mL de metanol (80%, v/v) à temperatura ambiente, seguido de 30 min (300 rpm) mexidos e centrifugados a 8000 x g, a 4°C, durante 5 min. O sobrenadante resultante (fração líquida) foi analisado em termos de atividade antioxidante, conteúdo total de fenólicos e perfil quantitativo fenólico. A fração sólida também foi analisada para fenólicos ligados, nomeadamente ligados à fibra. Ambos os extratos, frações líquidas e sólidas, foram armazenados a -80 °C.

Extração convencional de carotenóides

Foi realizado um método convencional de extração de carotenóides para comparar e caracterizar os carotenóides presentes nas algas. Resumidamente, 2,5 g de algas foram suspensos em 5 mL de etanol frio e homogeneizados a 14000 x g durante 3 min aplicando um ultra-turrax. Hexane (4 mL) foi adicionado ao homogeneizado, e a mistura resultante foi homogeneizada por mais 2 min e, em seguida, centrifugada por 10 min a 8000 x g. A camada de hexano contendo os carotenóides foi transferida para um tubo de polipropileno. Foi adicionada uma solução de cloreto de sódio saturado (2,5 mL) e um adicional de 4 mL de hexano, e a mistura resultante foi homogeneizada durante 1 min. A mistura foi centrifugada como descrito no passo anterior, e a segunda camada de hexano

foi recuperada e misturada com a primeira camada de hexano (Oliveira et al., 2015). Os extratos (fração líquida) e o restante (fração sólida) foram armazenados a -80 °C. O extrato líquido foi analisado para o teor total de carotenóides e um perfil carotenóide por espectrofotométrico e HPLC UV/VIS DAD. Todos os extratos e as análises foram realizados em triplicado.

Os resultados obtidos estão no Entregable 3.2.3 – bioatividades.

BIBLIOGRAFIA

- Cikoš, A.-M., Jokić, S., Šubarić, D., & Jerković, I. (2018). Overview on the Application of Modern Methods for the Extraction of Bioactive Compounds from Marine Macroalgae. *Marine Drugs*, 16(10), 348. <https://doi.org/10.3390/md16100348>
- Coelho, M. C., Pereira, R. N., Rodrigues, A. S., Teixeira, J. A., & Pintado, M. E. (2020). The use of emergent technologies to extract added value compounds from grape by-products. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 106, pp. 182–197). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.028>
- Duarte, K., Justino, C. I. L., Pereira, R., Freitas, A. C., Gomes, A. M., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. A. P. (2014). Green analytical methodologies for the discovery of bioactive compounds from marine sources. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 3–4, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2014.11.001>
- Nova, P., Pimenta-Martins, A., Laranjeira Silva, J., Silva, A. M., Gomes, A. M., & Freitas, A. C. (2020). Health benefits and bioavailability of marine resources components that contribute to health—what’s new? In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1704681>