

# RECUPERO DI ANTIOSSIDANTI DA *Arthrospira platensis* ESTRAZIONE DI POLIFENOLI MEDIANTE ALTE PRESSIONI E TEMPERATURE E SUCCESSIVA PURIFICAZIONE

Alessandro A. Casazza<sup>a</sup>, Pier F. Ferrari<sup>a</sup>, Bahar Aliakbarian<sup>a</sup>, Margherita Pettinato<sup>a</sup>, Federica Novelli<sup>b</sup>, Attilio Converti<sup>a</sup>, Patrizia Perego<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Università degli Studi di Genova, Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica e Ambientale, Via Opera Pia 15, Genova, Italia

<sup>b</sup> Università degli Studi di Genova, Dipartimento di Farmacia, Viale Benedetto XV 3, Genova, Italia

## Introduzione

I cianobatteri trovano impiego nel settore cosmetico, farmaceutico e nel campo dell'alimentazione animale ed umana in quanto rappresentano un'ottima fonte di proteine, vitamine, minerali e acidi grassi polinsaturi [1]. Tra i cianobatteri, *Arthrospira platensis* risulta essere quello maggiormente conosciuto per l'elevato contenuto di composti biologicamente attivi. Attualmente, *A. platensis* viene impiegata per la produzione di composti ad attività antiossidante, quali i polifenoli [2]. Questi composti sono fondamentali nella protezione dai radicali liberi. La produzione di radicali liberi avviene in seguito a reazioni enzimatiche endogene o esogene, come la fotolisi dell'acqua indotta dalle radiazioni ultraviolette (UV) e la fotocatalisi indotta dal biossido di titanio (TiO<sub>2</sub>). Tenendo in considerazione che le condizioni in cui viene fatto crescere il microorganismo possono significativamente modularne il metabolismo [3], diverse condizioni di stress sono state adottate per aumentare la produzione dei composti desiderati.

## Materiali e Metodi

*A. platensis* (UTEX, Texas, USA) è stata fatta crescere in un fotobioreattore da 3.5 L fino al raggiungimento dello stato stazionario, quindi la biomassa è stata suddivisa in più aliquote (0.5 L) e sottoposta a stress da raggi UV (3 h) o mantenuta in coltura per 5 giorni in presenza di TiO<sub>2</sub> (0.1 g/L).

La biomassa è stata recuperata per centrifugazione, essiccata e impiegata per l'estrazione dei polifenoli mediante reattore ad alte pressioni e temperature (180 °C, 90 min e 25 Atm) (PARR Instrument), impiegando come solvente la sola acqua. L'estratto è stato separato dalla biomassa esausta per centrifugazione e impiegato per le successive analisi.

Al fine di purificare l'estratto acquoso, quest'ultimo è stato sottoposto a rimozione delle proteine per coagulazione con HCl, saponificazione con KOH 2N per 20 h e idrolisi acida con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a caldo. Il contenuto fenolico totale dell'estratto è stato determinato mediante il saggio di Folin-Ciocalteu. L'estratto tal quale e dopo il processo di purificazione è stato caratterizzato impiegando una HPLC 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) con detector DAD e colonna C18 a fase inversa.

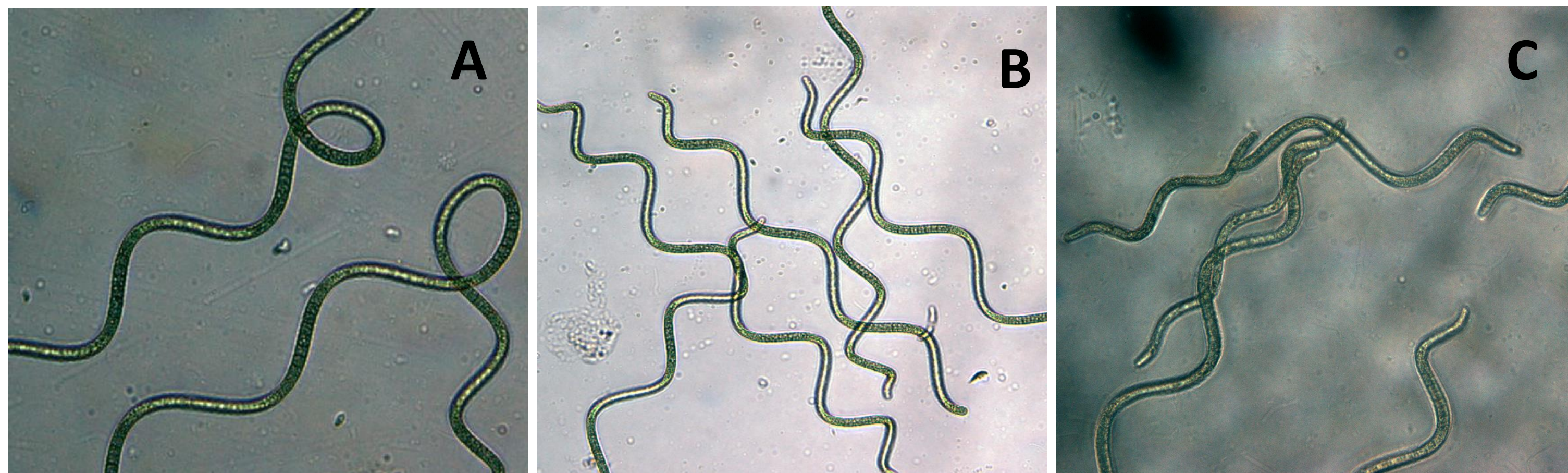


Figura 1. Immagini al microscopio ottico (100x) di *A. platensis*: controllo (A), in presenza di TiO<sub>2</sub> (B) e dopo esposizione a UV (C)

Tabella 1. Polifenoli totali negli estratti di *A. platensis* sottoposta a stress ossidativo

	Controllo	TiO <sub>2</sub>	UV
Polifenoli totali intracellulari (mg <sub>GAE</sub> /g <sub>biomassa secca</sub> )	35.1	34.3	24.9
Polifenoli totali extracellulari (mg <sub>GAE</sub> /L <sub>terreno</sub> )	135.6	202.2	164.5
Acido gallico (mg/L <sub>estratto</sub> )	119.0	15.4	9.3
Acido caffeico (mg/L <sub>estratto</sub> )	44.1	43.2	20.5
Acido ferulico (mg/L <sub>estratto</sub> )	15.9	27.2	25.1

Tabella 2. Area dei principali picchi identificati mediante HPLC nell'estratto di *A. platensis*.

Tempo di ritenzione (min)	N° picco	Controllo (Area)	TiO <sub>2</sub> (Area)	UV (Area)
7.2	1	-	2269	2863
8.1 (Acido gallico)	3	4923	458	214
9.1	4	594	863	449
10.4	5	1996	839	1034
13.1	9	2172	-	724
14.0	11	2756	-	-
14.6	12	2090	2169	1823
15.0	13	1772	-	-
16.8	15	2022	-	-
17.9	16	4200	1902	1151
18.0	17	-	1347	2254
19.0	19	-	3716	1592
19.5	20	3162	982	5226
22.3	21	3106	990	-
24.8 (Acido caffeico)	22	3113	1406	1073
25.1 (Acido ferulico)	23	657	990	1788

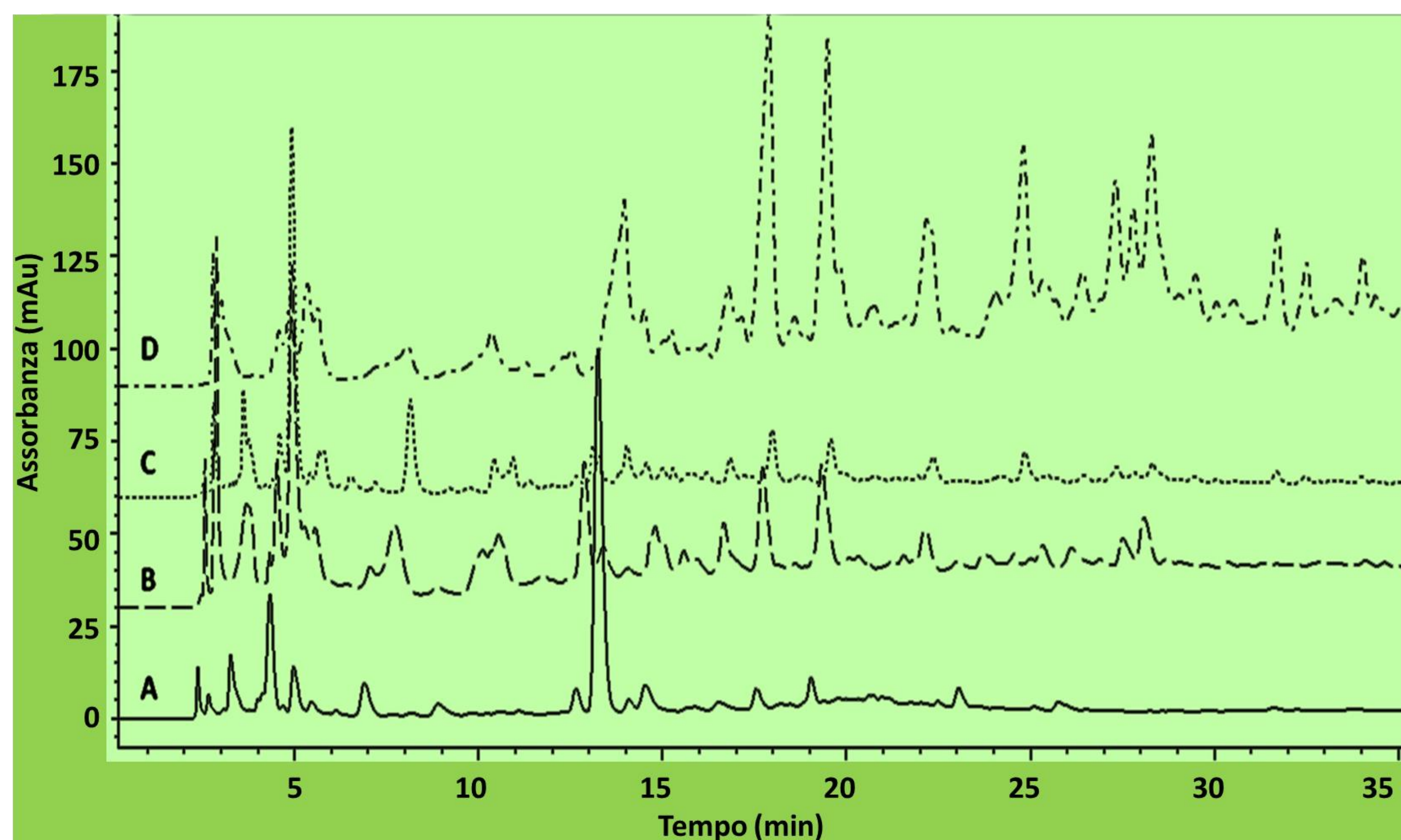


Figura 2. Cromatogrammi HPLC (280 nm) degli estratti fenolici di *A. platensis* dopo idrolisi acida (A) e basica (B), coagulazione con HCl (C) ed estrazione con acetato di etile (D).

## Risultati e discussioni

La crescita di *A. platensis* ha raggiunto dopo 8 giorni una concentrazione finale di biomassa pari a 4.8 g/L. Le condizioni di stress non hanno portato a sostanziali modifiche nella morfologia (Figura 1) e nella concentrazione microalgale. In Tabella 1 sono riassunti i risultati relativi alle estrazioni dei composti fenolici da *A. platensis*. Come si può vedere in Tabella 2, lo stress indotto da UV causa una parziale riduzione del contenuto fenolico mentre quello indotto da biossido di titanio mantiene quasi inalterato tale valore; inoltre, alcuni composti presenti nel controllo sono assenti negli estratti da biomassa trattata con UV e TiO<sub>2</sub> e viceversa. La concentrazione di acido gallico nell'estratto da biomassa non trattata (119 mg/L) è risultata maggiore rispetto a quella degli estratti ottenuti da biomassa sottoposta a stress ossidativo (15 e 9 mg/L rispettivamente per TiO<sub>2</sub> e UV). L'acido caffeico è presente in tutti gli estratti. La concentrazione di acido ferulico è risultata più elevata in entrambi gli estratti trattati rispetto al controllo. La tecnica di purificazione con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o KOH permette l'idrolisi di polifenoli acidi esterificati con molecole di glucosio (Figura 2). In particolare per la prova di idrolisi acida, mentre le concentrazioni di acido gallico e caffeico restano simili a quelle dell'estratto non trattato, si nota un'intensificazione del picco a 13.5 min. Questo corrisponde probabilmente a polifenoli agliconi presenti in piccole quantità o non presenti nell'estratto tal quale.

## Conclusioni

Nel presente lavoro è stata confermata la capacità di *A. platensis* di crescere in presenza di inteso stress ossidativo indotto da UV e TiO<sub>2</sub>. L'induzione di stress ossidativo, oltre a modificare la composizione fenolica, induce il cianobatterio a rilasciare polifenoli nel terreno di crescita. Le prove di coagulazione delle proteine ed estrazione con acetato di etile dell'estratto portano ad un campione contenente una frazione fenolica più concentrata

## Bibliografia

- [1] Rodrigues et al. 2012 "Metal biosorption onto dry biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis* and *Chlorella vulgaris*: multi-metal systems". Journal of Hazardous Materials, 217–218, 246–255
- [2] Klejdus et al. 2009 "Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species". Journal of Chromatography A, 121, 763–771.
- [3] Colla et al. 2007 "Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes". Bioresource Technology 98, 1489–1493.