

TEHNOLOGIE DE OBȚINERE A COMPLEXULUI DE FOSFOLIPIDE ESENȚIALE DIN BIOMASA DE SPIRULINĂ

acad. Valeriu RUDIC*,
conf. cercet. Ludmila RUDI*,
conf. cercet. Valentina BULIMAGA**,
conf. cercet. Liliana CEPOI*,
conf. cercet. Tatiana CHIRIAC*,
conf. cercet. Angela COJOCARI*,
cercet. șt. Vera MISCU*,
cercet. șt. Iulia IAȚCO*

*Institutul de Microbiologie și Biotehnologie al AȘM,

**Univeristatea de Stat din Moldova

*In ultimii ani, în screeningul de noi surse terapeutice sunt incluse materiile vegetale non-convenționale – microalgele și cianobacteriile. Cianobacteria *Spirulina platensis* este un obiect biotehnologic bine cunoscut, cele circa 250 de studii cu o vastă arie de cercetare confirmând beneficiile terapeutice pozitive înregistrate la utilizarea ei. Principiile active din spirulină, prin efectele lor determinate, sunt eficiente în prevenirea și combaterea alergiilor, anemiei, cancerului, hepatotoxicității, maladiilor cardiovasculare, hiperglicemiei, imunodeficienței, proceselor inflamatorii și în terapia antiretrovirală. Din spectrul vast de substanțe bioactive al spirulinei, o secțiune aparte o formează fosfolipidele esențiale: fosfatidilinozitolul și fosfatidilcolina – principii active polifuncționale, având ca proprietăți forte efectele normolipemiant și antiaterogenice. Originea non-toxică, lipsa efectelor adverse la utilizarea compușilor activi din spirulină, precum și posibilitatea operării cu modele biotehnologice originale, permite procesarea biomasei în vederea obținerii remediilor polivalente noi.*

Ateroscleroza este o patologie polietologică ce determină cardiopatia ischemică și accidentele cerebrovasculare, acestea constituind consecințele cele mai grave și prezentând cea mai frecventă cauză a mortalității de pe glob. La apariția stărilor aterosclerotice contribuie esențialmente diferitele fracții de lipoproteine. Se știe că lipoproteinele de densitate înaltă, care constau din aproximativ 50% de fosfolipide, posedă capacitatea de a înlătura colesterolul din pereții vaselor sangvine și țesuturi și de a-l transporta spre ficat pentru catabolizarea lui ulterioară.

Fosfolipidele esențiale își realizează efectul pozitiv în dinamica aterosclerozei datorită capacității lor de a ameliora fluiditatea membranelor și de a activa sistemele enzimactice în reticulul endoplasmatic și mitocondrii. Fosfolipidele previn adhezia și agregarea trombocitelor și eritrocitelor, fenomene induse de acumulări excesive ale colesterolului în membrane și/sau ale lipidelor oxidate. De asemenea, fosfolipidele activează lipoproteinlipaza, ceea ce conduce la scindarea

majoră intravasculară a hilomicronilor și lipoproteinelor cu densitate joasă (LDL) și, în consecință, la scăderea nivelului colesterolului și trigliceridelor. Drept urmare, din fragmentele de lipoproteine scindate se sintetizează lipoproteinele cu densitate înaltă (HDL). Parte componentă a monostratului superficial al HDL, fosfolipidele, amplifică proprietățile acceptoare ale acestora – capacitatea de acaparare a colesterolului din plasma sangvină, prin care reglează transportul invers al colesterolului [1, 3, 5, 9].

Terapia antisclerotică este polivalentă și acționează eficient asupra tuturor componentelor de risc: dislipidemia, disfuncția endotelială, tromboza ș.a., prin reducerea nivelului de colesterol, stabilizarea plăcilor aterosclerotice, prevenirea ruperii acestora, precum și prin restabilirea funcției endoteliale.

Tratamentul contemporan al aterosclerozei pledează pentru terapia combinată cu utilizarea remediilor care diminuează nivelul colesterolic prin alte mecanisme decât inhibarea sintezei lui în ficat [2, p.161-178]. În calitate de astfel de remedii în terapia complexă a aterosclerozei pot interveni preparatele pe bază de fosfolipide esențiale: fosfatidilcolina și fosfatidilinozitolul, extrase prin tehnologii originale de procesare a biomasei de spirulină, bine cunoscută drept o sursă importantă de principii active polifuncționale.

Scopul cercetărilor l-a constituit elaborarea unei tehnologii eficiente de obținere a complexului de fosfolipide esențiale: fosfatidilinozitolul și fosfatidilcolina din biomasa de spirulină în vederea explorării lor în calitate de principii active ale unor noi remedii medicamentoase antiaterogenice.

MATERIALE ȘI METODE

Materii prime:

- 1) Biomasa nativă de spirulină, cultivată în condiții de stimulare a lipidogenezei [7] și
- 2) Biomasa pulbere de spirulină.

Metode de cercetare:

Extragerea lipidelor din biomasa de spirulină (materia primă 1 și 2) cu utilizarea amestecului de solvenți cloroform:etanol în raport de 2:1 pentru biomasa nativă și cu amestecul de solvenți cloroform-etanol:apă în raport de 2:1:0,8 pentru biomasa liofilizată. Ulterior solvenții s-au înlăturat și s-a determinat gravimetric cantitatea de lipide [4].

Separarea fosfolipidelor cu acetonă. La 1 g lipide s-a adăugat 2 ml cloroform și 200 ml acetonă. Sedimentarea lipidelor polare s-a efectuat la 4°C timp de 24 de ore. Cantitatea lor s-a determinat gravimetric [10].

Separarea fosfolipidelor s-a realizat prin cromatografie în strat subțire pe plăci de silufol cu utilizarea amestecului eluent n-hexan: eter dietilic:acid acetic glacial în raport 35:15:2 (v/v/v). Fosfolipidele rămase la linia de start, $R_f=0$, s-au resolubilizat în cloroform și cantitatea lor s-a determinat gravimetric [12].

Determinarea fosfolipidelor prin cromatografie în strat subțire (Nzai, 1998). S-a utilizat amestecul de eluare cloroform:metanol:apă 75:25:3 (v/v/v). Developarea cromatogramelor s-a efectuat cu vapori de iod. Identificarea fosfolipidelor s-a realizat prin utilizarea standardelor de fosfatidilcolină P3556 SIGMA și fosfatidilinozitol P5766 SIGMA.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pentru obținerea complexului de fosfolipide sunt utilizate un șir de procedee tehnologice, care prevăd extragerea lor din creier de bovine sau din peliculele de inserare a icrelor de sturion [11, 13].

În primul caz, tehnologia prevede omogenizarea materiei prime cu acetonă răcită, extragerea complexului cu cloroform, filtrarea extractului și resuspendarea sedimentului în acetonă, filtrarea repetată, apoi solubilizarea sedimentului în amestec de cloroform cu etanol și sedimentarea ulterioară a fosfolipidelor din amestec cu acetonă (în raportul de 1,5-2,0:1). Însă, din cauza executării procesului tehnologic în mai multe etape, durata totală a manipulărilor se apropie de 20 de ore, iar consumul de reagenți, în special al acetonei, este mare.

Tehnologia de obținere a complexului de fosfolipide din peliculele de inserare a icrelor de sturion include înghețarea-dezghețarea biomasei, omogenizarea ei, extragerea cu alcool etilic, prelucrarea extractului cu hexan, filtrarea și uscarea produsului final. Conform tehnologiei în cauză, pentru a spori randamentul și a reduce cantitatea de impurități, extragerea se realizează la început cu apă fierbinte (60-80°C) în proporții de 1:2-3 timp de 1-2 ore, iar după răcirea acesteia până la 2-8°C extragerea se repetă cu alcool etilic răcit (4-8°C) și acidulat până la pH 3,0-3,5. Tehnologia poate fi utilizată, însă, pentru materii prime ce conțin cantități înalte de lipide (cel puțin 10%).

Biomasa de spirulină conține până la 7% lipide, dintre care până la 5% revin fosfolipidelor. Fosfolipidele din spirulină constau în principal din fosfatidilcolină și cantități minime de fosfatidil-etanolamină, însă tulpina de spirulină selectată pentru studii conține și fosfatidilinozitol, care de asemenea este un principiu activ normolipemiant și antiaterogen forte și care formează până la 1% din suma lipidelor determinate în biomasă [6, 8].

În vederea stabilirii tipului de materie primă destinată valorificării biotehnologice, au fost selectate două variante de biomasă de spirulină: nativă și liofilizată. Extragerea lipidelor s-a efectuat cu amestecul extractant cloroform:etanol, iar separarea fosfolipidelor – prin cromatografie în strat subțire. De asemenea, prin cromatografie în strat subțire s-a realizat și identificarea fosfolipidelor, iar dezvoltarea s-a efectuat cu vapori de iod. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 1.

Tabelul 1

**Conținutul de fosfolipide în diverse variante de biomasă
a tulpinii *Spirulina platensis* CNM CB-01**

Materia primă	Conținutul de fosfolipide (% Lipide)	Fosfolipidele componente (% lipide)	
		Fosfatidil-colina (% Lipide)	Fosfatidil-inozitol (% Lipide)
Biomasa nativă de spirulină	4,2 – 4,8%	2,6 - 3,0%	0,8 – 1%
Biomasa liofilizată de spirulină	3,6 – 4,0%	2,8 – 3,2%	0,6 – 0,8%

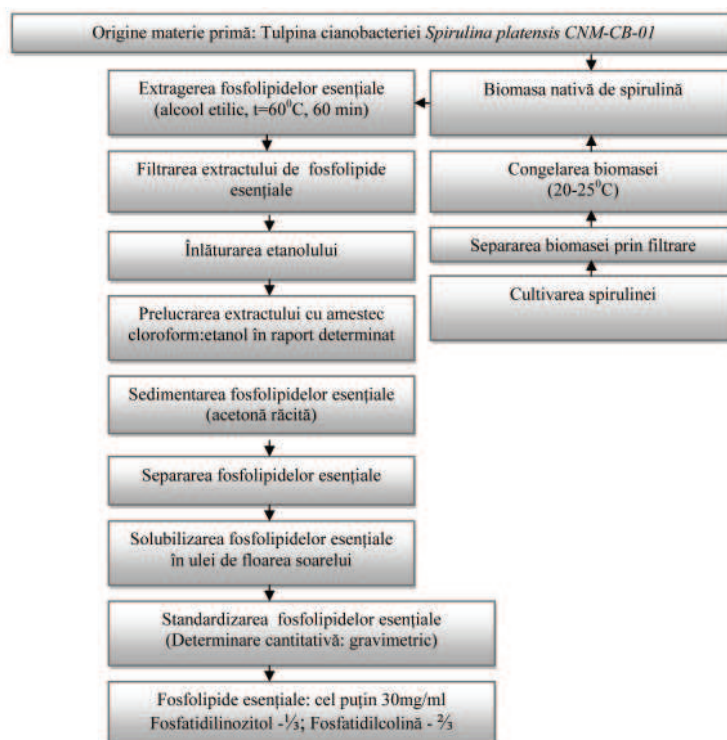


Fig. 1. Schema fluxului tehnologic de obținere a fosfolipidelor esențiale din biomasa de spirulină

Aplicarea tehnologiei este avantajoasă economic, datorită utilizării principiului extragerii solventului în combinație cu temperatura înaltă, ceea ce asigură extragerea eficientă a lipidelor polare din materia primă. Utilizarea pentru sedimentare a acetonei răcite la temperatura de 0°C asigură obținerea unui complex fosfolipidic lipsit de alte ingrediente, inclusiv pigmenții care se extrag cu etanol. De asemenea, datorită unui grad facil de exploatare, tehnologia poate fi încadrată în fluxurile tehnologice de producere industrială farmaceutică și biotehnologică a materiilor prime și principiilor active cu proprietăți terapeutice determinate.

(Cercetările au fost realizate în cadrul Programului de Stat „**Elaborarea și implementarea preparatelor farmaceutice în baza utilizării materiei prime locale**”, conducător: dr. hab. în farm., prof. univ. Victor Ghicavii).

Bibliografie

1. BURGESS, J.W., JBOUCHER, J., TRACEY, A.M. et al. *Phosphatidylinositol promotes cholesterol transport and excretion*. Journal of Lipid Research, 2003, vol. 44, p. 1355-1362.
2. CARAGIA, S. Homeostaza lipidelor, proteinelor, glucidelor sangvine și funcția sistemului reproductiv masculin sub influența preparatelor BioR de origine algală. P.161-178. În cartea: RUDIC, V. BioR - Studii biomedicale și clinice. Chișinău, 2007, 386 p.

3. HOLUB, B.J. *Metabolism and function of myo-inositol and inositol phospholipids*. Ann. Rev. Nutr. 1986, v. 6, p. 563–597.
4. KATES, M. *Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids*. Amsterdam (The Netherlands): Elsevier Science Publishers (1986).
5. NOFER, J.R., FOBKER, M., HOBDEL, G., VOSS, R., et al. *Activation of phosphatidylinositol-specific phospholipase C by HDL-associated lysosphingolipid. Involvement in mitogenesis but not in cholesterol efflux*. Biochemistry. 2000, vol. 39, p. 15199–15207.
6. RAMADAN, M., ASKER, M., IBRAHIM, Z. *Funcțional bioactive compounds and biological activities of Spirulina platensis*. Czech. J. Food Sci., 2008, vol. 26, p. 211-222.
7. RUDI, L. *Sinteza orientată a acizilor grași de către cianobacteria Spirulina platensis (Nordst.) Geitl. CNM-CB-01 și microalga roșie Porphyridium cruentum (Nag) CNM-AR-01 și procedee de obținere a preparatelor lipidice*: Autoref. tezei dr. șt. biologice. Chișinău, 2003, 24 p.
8. SAJILATA, M.G., SINGHAL, R.S., KAMAT, M.Y. *Fractionation of lipids and purification of gamma-linolenic acid (GLA) from Spirulina platensis*. Food Chemistry, 2008, p. 3-9.
9. STAMLER, C.J., BREZNAN, T.A. NEVILLE, F.J. et al. *Phosphatidylinositol promotes cholesterol transport in vivo*. J. Lipid Res. 2000, vol. 41, p. 1214–1221.
10. TROPIS, M., BARDOU, F., BERSCH, B. et al. *Composition and phase behaviour of polar lipids isolated from Spirulina maxima cells grown in a perpetuated medium*. Biochimica et Biophysica Acta, 1996, p. 196-202.
11. ЕФРЕМЕНКО, В.И., ОВЕРЧЕНКО, В.В., МИСЕТКОВА, Л.М. и др. *Способ получения комплекса фосфолипидов*. Патент Российской Федерации (2002) RU 2 192 265 C2 A 6t1 K 35/30.
12. ПРОХОРОВА, М. *Методы биохимических исследований*. 1982, 272 с.
13. СТЕКОЛЬНИКОВ, Л.И., РЫЛЬЦЕВ, В.В., КУТУКОВА, И.М. *Способ получения фосфолипидов из животного сырья*. Патент Российской Федерации (1991) КГ 2018318С1.

REZUMAT

De mai mult de două decenii cianobacteriile și microalgele constituie un subiect de cercetare biotehnologică. Valorificarea cu succes a biomasei microalgale în calitate de materie primă non-convențională pentru industria biotehnologică și farmaceutică vine cu soluții deliberate noi în crearea remediilor cu proprietăți terapeutice determinate. Șirului de principii active de origine microalgală cu astfel de proprietăți i se asociază fosfolipidele esențiale: fosfatidilcolina și fosfatidilinozitolul, compuși cu activitate normolipemiantă și antiaterogenică. Se propune o tehnologie de obținere a complexului de fosfolipide esențiale pe baza biomasei native de spirulină care, datorită unui grad facil de exploatare, poate fi încadrată în fluxurile tehnologice de producere industrială farmaceutică și biotehnologică a materiilor prime și principiilor active cu proprietăți terapeutice determinate.

ABSTRACT

For over two decades microalgae and cyanobacteria are the subject of biotechnological research. Successful use of microalgal biomass as nonconventional feedstock for biotechnological and pharmaceutical industry brings new deliberate solutions in the creation of remedies with specific therapeutic properties. The string of active microalgal principles with such properties is joined by the essential phospholipids: phosphatidyl cholin and phosphatidyl inositol, compounds with normolipimiant and antiaterogenic activity. It is proposed a technology for obtaining essential phospholipid complex on native biomass of Spirulina, which due to high level of exploitation may be placed in the technological flows of industrial and biotechnological pharmaceutical production of raw materials and active principles with specific therapeutic properties.

РЕФЕРАТ

На протяжении более двух десятилетий цианобактерии и микроводоросли являются предметом биотехнологических исследований. Успешное освоение биомассы микроводорослей в качестве нетрадиционного сырья в биотехнологической и фармацевтической промышленности приносит новые решения в создании терапевтических лекарственных средств. Предлагается технология получения комплекса общих фосфолипидов на основе биомассы спироулины, которая, благодаря легкому использованию, может быть внедрена в технологические потоки промышленного производства фармацевтического и биотехнологического сырья и активных компонентов с терапевтическими свойствами.