

EXTRAÇÃO DE FICOCIANINA A PARTIR DE DIFERENTES BIOMASSAS DE *Spirulina* sp.

PHYCOCYANIN EXTRACTION FROM DIFFERENT BIOMASSES OF *Spirulina* sp.

Caroline Costa Moraes¹; Janaína Fernandes de Medeiros Burkert²; Jorge Alberto Vieira Costa²; Susana Juliano Kalil^{2*}

RESUMO

Spirulina é uma cianobactéria de cor verde azulada, da classe das cianofíceas que cresce espontaneamente em águas fortemente alcalinas. Possui propriedades nutracêuticas, podendo ser utilizada na formulação de alimentos, visando assim o enriquecimento protéico, vitamínico e mineral. Dentro de sua célula possui um pigmento protéico denominado ficocianina, um biocorante natural azul, que pode apresentar uma variedade de propriedades farmacológicas, sendo de grande importância industrial. O presente trabalho teve por finalidade comparar os extratos de ficocianina obtidos a partir de biomassas de *Spirulina platensis* cultivadas em meio mixotrófico e autotrófico com os das biomassas obtidas comercialmente, avaliando a concentração, a pureza do extrato e o rendimento de extração de ficocianina. Para tal procedimento a ficocianina foi extraída sob agitação e temperatura constantes. A biomassa proveniente do cultivo autotrófico forneceu melhores resultados de concentração de ficocianina, pureza e rendimento de extração quando comparada com a biomassa do cultivo mixotrófico e biomassas comerciais.

Palavras-chave: cianobactéria, autotrófico, mixotrófico

ABSTRACT

Spirulina is a blue-green cyanobacterium of the class Cyanophyceae, which grows spontaneously in highly alkaline waters. It shows nutraceutical properties and can be used in food formulations, aimed at protein, vitamin and mineral enrichment. Within its cell it contains a protein pigment called phycocyanin, a natural blue bio-dye that can present a variety of pharmacological properties of great industrial importance. The objective of the present study was to compare phycocyanin extracts obtained from *Spirulina platensis* biomasses produced by cultivation in mixotrophic and autotrophic media, with commercially obtained biomasses, evaluating the concentration, extract purity and extraction yield of the phycocyanin. The phycocyanin was extracted under constant agitation and temperature. The biomass obtained from the autotrophic culture provided the best results with respect to the concentration, purity and extraction yield of phycocyanin, as compared to the biomasses obtained from the mixotrophic culture and the commercial biomasses.

Key-words: cyanobacteria, autotrophic, mixotrophic

(Recebido para Publicação em 28/11/2005, Aprovado em 23/09/2007)

TEXTO

Uma grande parte da energia luminosa usada por um organismo fotossintético é captada por uma diversidade de pigmentos acessórios, uma vez que a clorofila *a* absorve energia luminosa somente em uma região luminosa do espectro solar. A energia de excitação é posteriormente transferida para os centros de reação localizados nas membranas fotossintéticas, provocando o processo fotossintético. Em cianobactérias, os pigmentos fotossintéticos são a clorofila *a*, os carotenóides e as ficobiliproteínas, estas últimas atuando como pigmentos acessórios na fotossíntese (REIS et al., 1998), sendo a atividade fotossintética essencial para a produção destes pigmentos (MARQUEZ et al., 1995). As principais ficobiliproteínas são a ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina (HENRIKSON, 1994).

Quando extraídas, as ficocianinas têm sido usadas principalmente como biocorante de alimentos, ou em pequenas quantidades são usadas como traçadores de imunoenaios devido às suas propriedades fluorescentes (VONSHAK, 1997). Também podem ser usadas como agentes anti-tumorais (REDDY et al., 2003), anti-inflamatórios e anti-oxidantes (BHAT & MADYASTHA, 2001; ESTRADA et al., 2001).

Dentre os organismos produtores deste biocorante, destaca-se a *Spirulina platensis*, uma cianobactéria capaz de produzir quantidades elevadas deste pigmento (CHEN & ZHANG, 1996). Este organismo foi recentemente

reconhecido por utilizar substratos de carbono orgânico, como glicose, para cultivos heterotróficos e mixotróficos (ZHANG et al., 1998). Entretanto, algumas espécies podem crescer autotroficamente na luz usando dióxido de carbono e heterotroficamente no escuro usando compostos orgânicos como fonte de energia e carbono (MARQUEZ et al., 1995). Os resultados mostraram que biomassa algal e fotopigmentos produzidos mixotroficamente com 2 g dm⁻³ de glicose foram aproximadamente 1,5 a 2 vezes maior que durante cultivos autotróficos.

Estudos em cianobactérias têm sido restritos e há pouca informação sobre a utilização de fontes orgânicas de carbono. Tendo em vista as propriedades do biocorante ficocianina e a pouca literatura existente sobre seu conteúdo em células de *Spirulina platensis* cultivadas autotrófica e mixotroficamente, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o conteúdo de ficocianina nas biomassas de *Spirulina platensis* cultivadas autotroficamente e mixotroficamente, comparando-as com duas biomassas comerciais de *Spirulina*.

Para a realização dos experimentos foram utilizadas duas cepas de *Spirulina* sp. adquiridas no comércio (denominadas Com A e Com B) e a cepa LEB-52 de *Spirulina platensis* (COSTA et al., 2004), mantida em meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) 20% (v/v). Para a *Spirulina platensis* LEB 52 realizaram-se quatro ensaios, onde variou-se a concentração de meio Zarrouk e de glicose (ANDRADE et al., 2004), conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Meios de cultivo utilizados para os ensaios realizados com *Spirulina platensis* LEB 52

Ensaio	Meio de cultivo
I	Cultivo mixotrófico com 0,5g L ⁻¹ de glicose e 20% de meio Zarrouk
II	Cultivo mixotrófico com 0,25 g L ⁻¹ de glicose e 10% de meio Zarrouk
III	Cultivo mixotrófico com 0,25 g L ⁻¹ de glicose e 20% de meio Zarrouk
IV	Cultivo autotrófico com 20% de meio Zarrouk

Os cultivos com *Spirulina platensis* LEB 52 foram iniciados com cerca de 0,15 g L⁻¹ de inóculo e foram conduzidos na cidade de Rio Grande (32,05 °S; 52,11 °W), em fotobiorreatores abertos, com volume útil de 450 L, cobertos por estufa de hidroponia sob agitação. Os cultivos duraram aproximadamente 40 dias, até a fase estacionária, e foram realizados em condições ambientais. O e o acompanhamento do crescimento de biomassa foi feito através da medida da densidade ótica a 670 nm diariamente.

A biomassa seca e congelada proveniente dos cultivos autotrófico e mixotrófico e as biomassas comerciais A e B,

também secas e congeladas, foram maceradas até a obtenção de um diâmetro de partícula inferior a 0,149 mm. A extração foi realizada conforme condições previamente otimizadas por SILVEIRA et al. (2007), que utilizaram solvente aquoso adicionado a biomassa sob agitação e temperatura controladas. Após a extração, as amostras em triplicata foram centrifugadas e a absorbância do sobrenadante foi medida a 280, 620 e 652 nm.

A concentração de ficocianina foi calculada através do método espectrofotométrico usando a Equação 1, descrita por BENNET & BOGORAD (1978):

$$CF = \frac{(A_{620} - 0,474 (A_{652}))}{5,34} \quad (1)$$

Onde:

CF é a concentração de ficocianina em mg mL⁻¹

A₆₂₀ é a absorbância a 620 nm

A₆₅₂ é a absorbância a 652 nm

A pureza do extrato de ficocianina foi monitorada pela

taxa $\frac{A_{620}}{A_{280}}$ (ABALDE et al., 1998). Absorbância a 620

nm é o comprimento de onda onde a absorção de ficocianina

atinge o valor máximo, enquanto que a 280 nm indica a concentração de proteínas totais na solução (LIU et al., 2005)

O rendimento de extração foi calculado conforme a Equação 2.

$$R = \frac{CF \cdot V}{BS} \quad (2)$$

Onde:

R – Rendimento de extração (mg g^{-1})

V – volume do extrato (mL)

BS – biomassa seca (g)

A avaliação das respostas foi feita através de uma Análise de Variância (ANOVA) a $p < 0,05$, onde verificou-se que as respostas de concentração, pureza e rendimento de extração de ficocianina das diferentes biomassas diferiam estatisticamente entre si. Desta forma, optou-se pela realização de um teste de diferença de médias (teste de Tukey) para cada resposta.

A Figura 1 apresenta a concentração e pureza médias obtidas em cada ensaio, onde letras iguais representam respostas estatisticamente iguais a $p < 0,05$. Os valores mais altos de concentração e pureza são encontrados para a ficocianina extraída de biomassa proveniente do cultivo autotrófico (ensaio IV), no qual se atingiu uma concentração igual a $3,55 \text{ mg mL}^{-1}$ e uma pureza de 0,67.

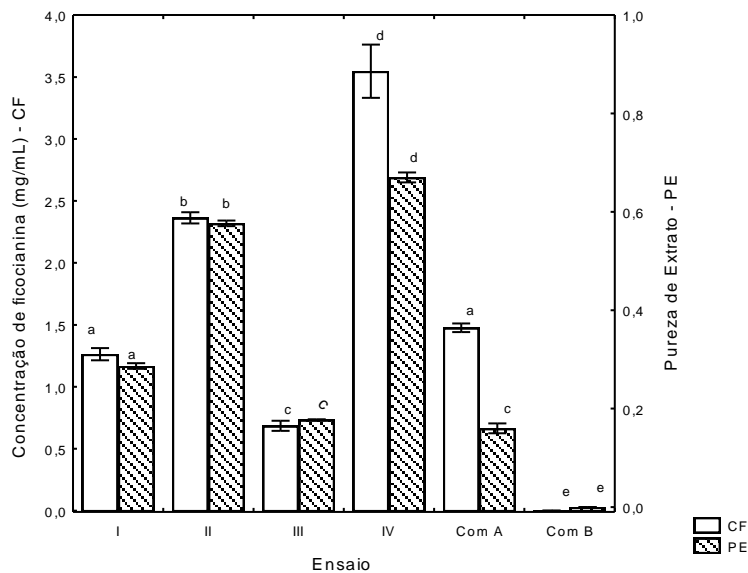


Figura 1. Médias e desvio padrão para concentração de ficocianina e pureza de extrato.

Quanto à comparação entre os cultivos desenvolvidos no laboratório e as biomassas obtidas no comércio, é possível explicar o baixo conteúdo de ficocianina na biomassa chamada de COM B de duas formas. A primeira sugere que a ficocianina pode ter sido extraída previamente, já que a embalagem informava a presença de células de *Spirulina*, sem mencionar se houve ou não extração do biocorante de altíssimo valor agregado (aproximadamente US\$ 6 o miligrama). Além disso, outro fato que explica o baixo teor de ficocianina são as prováveis condições inadequadas de secagem, uma vez que estudos sobre sua

estabilidade térmica verificaram que a ficocianina é estável até temperaturas inferiores a 45°C (SARADA et al., 1999). Portanto, se as células de *Spirulina* foram secas a temperaturas superiores a estas, pode ter havido uma degradação do biocorante.

A Figura 2 apresenta as respostas obtidas para o rendimento de extração de ficocianina de cada biomassa estudada, sendo que letras iguais significam respostas iguais a $p < 0,05$. Observa-se que a resposta mais satisfatória foi atingida quando se utilizou cultivo autotrófico (ensaio IV), no

MORAES et al. Extração de ficocianina a partir de diferentes biomassas de *Spirulina* sp. qual obteve-se um rendimento de 44,4 mg g⁻¹, ou seja, no mínimo 40% maior que para os demais experimentos.

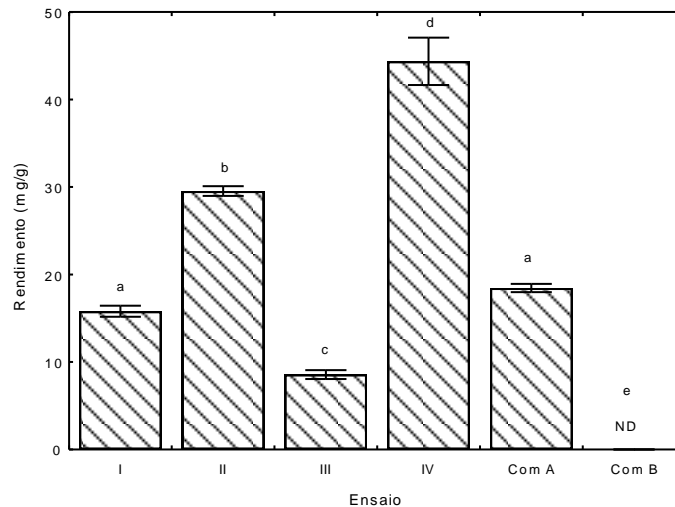


Figura 2. Médias e desvio padrão para rendimento de extração.

ND – Não detectável

Embora MARQUEZ et al. (1995) tenham obtido melhores resultados quando utilizaram cultivos mixotróficos, CHEN & ZANG (1997) num estudo que compara o cultivo autotrófico e o mixotrófico, observaram que o cultivo autotrófico é melhor que o mixotrófico, em relação ao rendimento de extração. Na cultura fotoautotrófica, o conteúdo de ficocianina foi constante em aproximadamente 140 mg g⁻¹ de células secas ao longo do tempo de cultivo. Já nos cultivos mixotróficos o conteúdo de ficocianina atingiu um máximo de 108 mg g⁻¹.

Diante dos resultados apresentados é possível afirmar que a melhor condição para a obtenção de um extrato de ficocianina foi utilizando-se biomassa proveniente do cultivo autotrófico com 20% de meio Zarrouk. Obteve-se uma concentração de ficocianina de 3,55 mg mL⁻¹, pureza de extrato 0,67 e um rendimento de extração de 44,4 mg g⁻¹, valores superiores aqueles com o extrato de ficocianina proveniente da biomassa dos cultivos mixotróficos e das biomassas de marcas comerciais. Estes resultados concordam com os de CHEN & ZANG (1997).

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABALDE, J.; BETANCOURT, L.; TORRES, E.; et al. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. **Plant Science**, v. 136, p. 109-120, 1998.
- ANDRADE, M.R.; RADMANN, E.M.; CERQUEIRA, V.; et al. Mixotrophic cultivation of Optimization of *Spirulina platensis* in different photobioreactor configurations. In: INTERNACIONAL SYMPOSIUM: CYANOBACTERIA FROM HEALTH, SCIENCE AND DEVELOPMENT, 2004, Embiez. **Abstracts...** França, 2004.
- BENNETT, A. & BOGORAD, L. Complimentary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 58, p. 419-435, 1973.

- MORAES et al. Extração de ficocianina a partir de diferentes biomassas de *Spirulina* sp. macrophages . **Biochemical and Biophysical Research Communications** . v.304, p.385-392, 2003.
- BHAT, V.B. & MADYASATHA, K.M. Scavenging of Peroxynitrite by Phycocyanin and Phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection Against Oxidative Damage to DNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 285, p.262-266. 2001.
- CHEN, F.; ZHANG, Y; GUO, S. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 18, n.5, p. 603-608, 1996.
- CHEN, F. & ZHANG, Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, . v.20. p. 221-224, 1997.
- COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M.; DUARTE FILHO, P.F. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.92, p.237 – 241, 2004.
- ESTRADA, J.E.P.; BESCÓS, P.B.; FRESNO, A.M.V. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **IL Farmaco**. v. 56, p. 497-500. 2001.
- HENRIKSON, R., **Microalga Spirulina: Superalimento del futuro**. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, 1994, 222p.
- LIU, L.; CHEN, X.; ZHANG, X.; et al. One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.116, p.91-100, 2005.
- MARQUEZ, F.J.; NISHIO, N.; NAGAI, S. Enhancement of biomass and pigment production during growth of *Spirulina platensis* in mixotrophic culture. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, London, v. 62, p. 159-164, 1995.
- REDDY, C. M.; SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S.V.K.; et al C- phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7
- REIS, A.; MENDES, A.; LOBO-FERNANDES, H.; et al.. Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 66, p.181 – 187, 1998.
- SARADA, R.; PILLAI, M. G.; RAVISHANKAR, G. A. Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. **Process Biochemistry**, Essex, v. 34, p. 795 - 801, 1999
- SILVEIRA, S.T.; BURKERT, J.F.M.; COSTA, J.A.V., et al. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v.98, p.1629-1634, 2007.
- ZHANG, X.W.; ZHANG, Y.M.; CHEN, F. Kinetic models for phycocyanin production by high cell density mixotrophic culture of the microalga *Spirulina platensis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v.21. p.283-288, 1998.
- VONSHAK, A. **Spirulina platensis (Arthrospira) – Physiology, cell biology and biotechnology**. Ed. Taylor & Francis, 1997. p. 196 - 198.
- ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthèse de Spirulina maxima Geitler**. 1966. Ph.D.Thesis, University of Paris.