



Extração de ficocianinas de *Spirulina platensis*: opções metodológicas

Extraction of phycocyanins from *Spirulina platensis*: methodological options

Jefferson Pablo de Sousa Saboya*, José Ariévilto Gurgel Rodrigues & Wladimir Ronald Lobo Farias

Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará - UFC

*Email: jeffersonpesca@yahoo.com.br

Recebido: 7 de dezembro de 2016 / Aceito: 22 de maio de 2017 / Publicado: 12 de junho de 2017

Resumo *Spirulina platensis* é uma cianobactéria rica em compostos comerciais, dentre eles as ficocianinas. Entretanto, as condições de cultivo podem afetar seu rendimento e pureza. Avaliou-se o rendimento e a pureza de ficocianinas extraídas com dois solventes diferentes da biomassa cultivada sob condições de temperatura e iluminação diferentes em laboratório. Os cultivos foram realizados em garrações (14 L) a partir de inóculos, sendo o primeiro submetido a iluminação constante e temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e o segundo com fotoperíodo (16 h-claro; 8 h-escuro) e temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, os quais foram acompanhados à 680 nm. Pigmentos foram extraídos com acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) e fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0) sob agitação constante durante 48 h a temperatura ambiente. Extratos brutos liofilizados foram analisados quanto ao rendimento (RE), grau de pureza do extrato (PE) e concentração de ficocianinas (CF) e, em seguida, fracionados em coluna de troca-iônica (DEAE-celulose) utilizando NaCl em concentrações diferentes, cujas frações eluídas foram monitoradas à 280, 615 e 652 nm. A condição primeira de cultivo apresentou crescimento logarítmico mais acelerado do que na segunda ao término de 25 dias, cuja temperatura determinou o metabolismo do sistema. O RE foi 3,94 vezes maior com acetato de sódio, bem como apresentando CF e PE maiores comparados aos obtidos com fosfato de sódio da biomassa cultivada nas duas temperaturas. Os perfis cromatográficos revelaram três frações (F I; F II e F III) eluídas com 0,5; 1,5 e 2 M de NaCl, respectivamente, das quais as frações F I detiveram às maiores presenças de proteínas totais, c-ficocianina e aloficocianina. O aumento da molaridade de NaCl resultou em uma drástica redução nas absorvâncias. Portanto, tanto as condições físico-químicas de cultivo quanto o solvente de extração empregado se mostraram determinantes para obtenção de ficocianinas de *S. platensis*.

Palavras-chave: cianobactéria, pigmentos proteicos, análises quantitativas.

Abstract *Spirulina platensis* is a cyanobacterium rich in commercial compounds, as phycocyanins. However, their yield and purity can be affected by cultivation conditions. This study evaluated the yield and purity of phycocyanins extracted with two different solvents of the biomass cultured under different temperature and light conditions in laboratory. Cultivations were performed in recipients (14 L) from inocula, being the first one submitted to constant light and temperature of $28 \pm 2^\circ\text{C}$ and the second one from photoperiod (16 h-light; 8 h-dark) and temperature of $24 \pm 2^\circ\text{C}$, which were accompanied at 680 nm. Pigments were extracted with 0.1 M sodium acetate (pH 5.0) and 0.1 M sodium phosphate (pH 7.0) under constant stirring during 48 h at room temperature. Lyophilized crude extracts were analyzed in terms of yield (Y), degree of purity of the extract (PE) and phycocyanin concentration (PC) and, fractionated then by anion-exchange on DEAE-cellulose column utilizing different NaCl concentrations, whose eluted fractions were monitored at 280, 615 and 652 nm. The first condition of cultivation presented more rapid logarithmic growth than the second one in the end of 25 days, whose temperature determined the metabolism of the system. The Y was 3.94-fold higher with sodium acetate, as well as presenting high PC e PE compared with those obtained with sodium phosphate from biomass cultured in the two temperatures. The chromatographic profiles revealed three fractions (F I, F II and F III) eluted with 0.5; 1.5 and 2 M of NaCl, respectively, of which the fractions F I had the highest presences of total proteins, c-phycocyanins and alophycocyanins. The increase of the molarity of NaCl resulted in a reduction drastic in the absorbances. Therefore, such the physical-chemical conditions of cultivation as the solvent of extraction employed showed determinants for obtaining of phycocyanins from *S. platensis*.

Keywords: cyanobacterium, protein pigments, quantitative analyses.

Trabalho de conclusão de curso do primeiro autor, realizado com auxílio financeiro da Capes/CNPq/MCT/MS/Funcap.



Introdução

A cianobactéria marinha, *Spirulina (Arthrospira) platensis*, é uma espécie filamentosa fotossintética planctônica que apresenta morfologia helicoidal provida de tricomas cilíndricos multicelulares de até 1 mm de comprimento (Vonshak, 1997) possuindo importância biotecnológica (Belay, Ota, Miyakawa & Shimamatsu, 1993; Ramamoorthy & Premakumari, 1996). Esse organismo procarioto cresce macivamente em corpos de águas tropicais e subtropicais com tolerância a metais (Maheswari & Bagirath, 2008), suportando variações extremas de salinidade, temperatura, radiação solar e nutriente (Raven, 1988; Vonshak, 1997), tornando-a também de fácil adaptação ao cultivo (Soletto, Binaghi, Lodi, Carvalho & Converti, 2005; Alencar et al., 2011). No ano de 1996, um volume estimado de 1.000 toneladas foi produzido dessa cianobactéria em pó, aparecendo a China como maior produtor mundial (Liang, Liu, Chen, & Chen, 2004). É fonte de proteínas (até 70% do peso seco) para uso suplementar na alimentação humana, segundo o FDA (*Food and Drug Administration*) (Henrikson, 1994), e animal (Moreira, Martins & Farias, 2011), além de favorecer a obtenção de outros produtos derivados do metabolismo, citando-se pigmentos (carotenóides, ficocianinas e clorofila), pró-vitaminas, minerais, ácidos graxos poli-insaturados (Henrikson, 1994; Cohen, Reungjitchachawali, Siangdung & Tanticharoen, 1993) e polissacarídeos sulfatados (conhecidos como cálcio "spirulan") (Majdoub, Mansour, Chaubet, Roudesli & Maaroufi, 2009; Beky, Baz & Latife, 2013) para aplicações diversas nas indústrias alimentícias e farmacêuticas (Cardozo et al., 2007).

As ficobiliproteínas, em especial, representam uma classe de pigmentos proteicos (grupos prostéticos tetrapirrole lineares) divididas em três outras subclasses distintas quanto às suas estruturas químicas, a saber: ficoeritrinas, ficocianinas e aloficocianinas (Bermejo et al., 2003). Apresentam massas moleculares baixas de 44 kDa para c-ficocianina e 38 kDa para aloficocianina e coeficientes específicos de extinção molar de 73 e 58 para c-ficocianina e aloficocianina, respectivamente (Boussiba & Richmond, 1979), cujas ficocianinas são os pigmentos principais ocorrentes na periferia celular (Gantt, 1981) e os mais utilizados em alimentos e, em pequenas quantidades, em testes de imunoensaios devido à sua capacidade fluorescente (Vonshak, 1997), além da sua importância como agentes anticancerígenos (Iijima & Shimatzo, 1982), antioxidantes (Bhat & Madyastha, 2000), anti-inflamatórios (Reddy et al., 2003) e neuroprotetivos (Penton-Rl et al., 2011). Condições físico-químicas de cultivo (por exemplo, temperatura, pH e iluminação), bem como o método de rompimento celular e o solvente utilizado, além da relação entre o peso da biomassa e o volume do solvente e do tempo de extração são fatores que podem influenciar no crescimento de *S. platensis* e no grau de pureza das ficocianinas (Abalde, Betancourt, Torres, Cid & Barwell, 1998; Reis, Mendes, Lobo-Fernandes, Empis & Novais, 1998), constituindo-se fatores relevantes frente a demanda crescente por corantes naturais (Bhat & Madyastha, 2000; Reddy et al., 2003). Otimização de extração de ficocianinas presentes em *S. platensis* pode também ser realizado usando desenho fatorial e técnica de superfície de resposta, tomando-se a temperatura e a proporção solvente-biomassa como parâmetros para avaliação das condições ideais (Silveira, Burkert, Costa, Burkert & Kalil, 2007).

O uso de cianobactérias para obtenção de biomateriais com ações biológicas é relatado na literatura. Por exemplo, na realização de cultivos unialgal e axênico utilizando 14 espécies de cianobactérias (*Anabaena flos-aquae* Brébisson ex Bornet et Flahault, *A. cylindrica* Lemmermann, *Anacystis marina* Drouet et Dailey, *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Lemmermann, *M. holsatica* Lemmermann, *M. viridis* (A. Brown) Lemmermann, *M. wessenbergii* Komárek, *Nostoc linckia* Bornet ex Bornet et Flahault, *N. commune* Vaucher ex Bornet et Flahault, *Oscillatoria agardhii* Gmont, *O. laetevirens* Gomont, *O. tenuis* Agardh ex Gomont, *P. foveolarum* Gomont and *Tolypothrix tenuis* Kützing ex Bornet et Flahault), Sato, Murakami, Miyazawa & Hori (2000) observaram que a espécie dulcícola *O. agardhii* deteve uma lectina hemaglutinante (uma classe de proteínas que desempenha papéis importantes no reconhecimento de moléculas dentro uma célula, entre células ou entre organismos devido a capacidade de ligação à carboidratos) homóloga aquelas lectinas isoladas de macroalgas do gênero *Eucheuma* e aquela hemaglutinina da bactéria *Myxococcus xanthus*, quando crescida ao longo de 15 dias em meio comercial "CB" a 25°C. Usando bioreatores em sistema aberto sob condições não controladas, a cianobactéria *S. platensis* foi cultivada por suplementação com meio sintético "Zarrouk" a 20% (Zarrouk, 1966) para obtenção de ficocianinas usando desenho fatorial, partindo-se de uma concentração de biomassa inicial de 0,15 g L⁻¹ (Silveira, Burkert, Costa, Burkert & Kalil, 2007). Majdoub, Mansour, Chaubet, Roudesli & Maaroufi (2009) revelaram à obtenção de polissacarídeos sulfatados (conhecidos como cálcio "spirulan") com ação anticoagulante de *S. platensis* crescida em meio velho de 30 dias (pH 12) comercializado na Tunísia. Outros estudos documentaram, também, que o emprego de abordagens diferentes na extração e condições de cultivo influencia a obtenção e qualidade de pigmentos



protéicos de cianobactérias (Tomaselli, Giovannetti & Torzillo, 1993; Reis et al., 1998; Minkova et al., 2003; Cardozo et al., 2007; Patil, Chethana, Madhusudhan & Raghavarao, 2008).

Este estudo avaliou o rendimento e o grau de pureza de ficocianinas extraídas da cianobactéria *S. platensis*, quando cultivada em condições físico-químicas diferentes, utilizando dois tipos de solventes.

Material e Métodos

PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS E MEIO DE CULTIVO

Cepas de *S. platensis* foram obtidas do laboratório de Planctologia do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal de Ceará. O cultivo da cianobactéria foi baseado em Moreira, Martins & Farias (2011) realizado em meio alternativo utilizando cloreto de sódio (30 g L^{-1}), bicarbonato de sódio (10 g L^{-1}) e fertilizantes agrícolas (NPK - 1 g L^{-1} ; superfosfato triplo - $0,1 \text{ g L}^{-1}$). Depois de misturados, os reagentes foram dissolvidos em 10 L de água clorada, a qual foi submetida a uma forte aeração durante 24 horas e, posteriormente, decantada. A partir de um cultivo unicelular, foram obtidos os inóculos iniciais, transferindo-se 300 mL do cultivo pré-estabelecido para dois erlenmeyers de 1 L. A cada dois dias, foi adicionado novo meio de cultivo até completar o volume útil dos recipientes, sendo um deles mantido sob iluminação constante de 1.000 Lux e temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e o outro submetido a um fotoperíodo de 16 h de claro e 8 h de escuro e temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, de acordo com Alencar et al. (2011). Finalmente, o conteúdo de cada erlenmeyer foi utilizado para inocular dois garrafões de 14 L, para iniciar os cultivos em maior escala.

CULTIVO E OBTENÇÃO DA BIOMASSA DE *Spirulina platensis*

Os cultivos foram realizados segundo Alencar et al. (2011) utilizando condições diferentes de temperatura e iluminação, além da medição do pH no início e ao final dos experimentos. No primeiro, dois garrafões de 14 L foram mantidos sob iluminação artificial constante fornecida por uma lâmpada fluorescente de 40 W e temperatura ambiente de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, enquanto os outros dois garrafões de 14 L foram mantidos sob fotoperíodo (16 h claro; 8 h escuro) e temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Ambos os cultivos receberam aeração constante e foram monitorados, a cada dois dias, por espectrofotometria (680 nm), utilizando amostras de 1 mL. A coleta da biomassa da cianobactéria foi realizada por filtração em malha de $60 \mu\text{m}$, no final da fase de crescimento exponencial (Moreira, Martins & Farias, 2011; Alencar et al., 2011). Durante o esvaziamento dos garrafões, foi realizada uma limpeza das paredes dos mesmos com detergente neutro, seguida de enxágüe, sendo o filtrado retornado aos garrafões a fim de iniciar novos cultivos. A biomassa úmida coletada nos cultivos foi lavada com água destilada para remoção do sal e congelada (-20°C ; 24 h) para posterior extração da ficocianina.

EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA FICOCIANINA EM COLUNA DE DEAE-CELULOSE

A extração e purificação da ficocianina da biomassa congelada de ambos os cultivos foi realizada no laboratório de Bioquímica Marinha do Departamento de Engenharia de Pesca. A biomassa foi inicialmente descongelada em temperatura de resfriamento (4°C), sendo em seguida, liofilizada para obtenção da matéria desidratada. Para a extração, três gramas foram hidratadas com 125 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) e a mistura foi deixada sob agitação constante por 48 horas em temperatura ambiente. Após esse período, o extrato foi centrifugado (13.000 rpm ; 30 min; 4°C) e o sobrenadante dialisado exaustivamente contra água destilada e liofilizado. O mesmo procedimento também foi realizado para a extração da ficocianina em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0). A purificação da ficocianina foi realizada em uma coluna de troca-iônica de DEAE-celulose acoplada a um coletor de frações. Inicialmente, a coluna foi equilibrada com o respectivo tampão de extração (acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) ou fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0)) e, em seguida, foi aplicada uma solução de 1 mg mL^{-1} de cada extrato no topo do gel. A eluição da coluna foi realizada, passo a passo, com os respectivos tampões contendo diferentes concentrações de NaCl (0,5; 1,50 e 2,0 M) com fluxo ajustado em 60 mL h^{-1} , sendo coletadas frações de 1 mL. As frações foram monitoradas quanto à presença de proteína total (280 nm), c-ficocianina (615 nm) e aloficocianina (652 nm), como descrito por Silveira, Burkert, Costa, Burkert & Kalil (2007). A comparação das quantidades de pigmentos eluídos nas condições diferentes de cultivo e extração foi realizada calculando-se a integral das áreas das frações obtidas nas cromatografias, utilizando o programa Origin 3.5.



DETERMINAÇÃO DO GRAU DE PUREZA DO EXTRATO, CONCENTRAÇÃO DE FICOCIANINA E RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO

A determinação do grau de pureza do extrato (PE) (Abalde, Betancourt, Torres, Cid & Barwell, 1998), a concentração de ficocianina (CF) (Bennett & Bogorad, 1973) e o rendimento da extração (RE) foram calculadas a partir das equações descritas abaixo:

$$PE = \text{ABS}_{615}/\text{Abs}_{280}^1; CF = ((\text{Abs}_{615} - 0,474(\text{Abs}_{652}))/5,34^2); R(\%) = CF \cdot V/BS^3$$

¹ PE = grau de pureza do extrato; Abs_{615} = leitura da amostra a 615 nm e Abs_{280} = leitura da amostra a 280 nm.

² CF = concentração de ficocianina (mg mL^{-1}); Abs_{615} e Abs_{652} = leituras das amostras a 615 nm e a 652 nm.

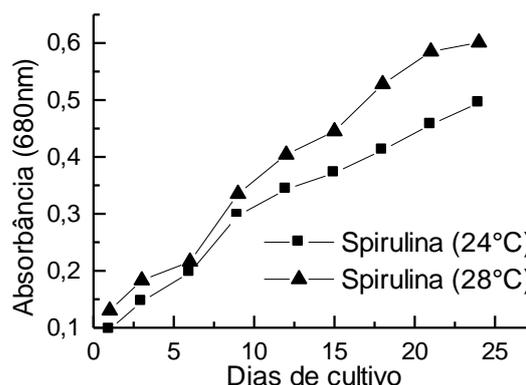
³ R = rendimento da extração em %; CF = concentração de ficocianina (mg mL^{-1}); V = volume do tampão (mL) e BS = biomassa seca.

Resultados e Discussão

CULTIVO DA CIANOBACTÉRIA

A figura 1 mostra as curvas de crescimento de *S. platensis*, expressas em valores de absorvância de 680 nm, obtidas quando a microalga foi submetida às condições diferentes de temperatura e iluminação. Observou-se que a cianobactéria cultivada sem fotoperíodo e na temperatura de 28°C apresentou crescimento logarítmico mais acelerado, atingindo a fase exponencial em aproximadamente 20 dias de cultivo, enquanto que, a cianobactéria sujeita a temperatura de 24°C e sem fotoperíodo, ainda se encontrava na fase de crescimento exponencial. Nesses experimentos, o pH médio no início e ao final foi de 8,5 e 9,0, respectivamente, configurando condição alcalina segundo Beky, Baz & Latife (2013).

Figura 1 Curvas de crescimento de *Spirulina platensis* cultivada em condições diferentes de temperatura e luminosidade.



Culturas de cianobactérias crescidas em diferentes meios podem ser realizadas em laboratório. Sato, Murakami, Miyazawa & Hori (2000) realizaram cultivos unicianobactéria e axênico de 14 cianobactérias (*Anabaena flos-aquae* Brébisson ex Bornet et Flahault, *A. cylindrica* Lemmermann, *Anacystis marina* Drouet et Dailey, *Microcystis aeruginosa* (Kützting) Lemmermann, *M. holsatica* Lemmermann, *M. viridis* (A. Brown) Lemmermann, *M. wesenbergii* Komárek, *Nostoc linckia* Bornet ex Bornet et Flahault, *N. commune* Vaucher ex Bornet et Flahault, *Oscillatoria agardhii* Gmont, *O. laetevirens* Gomont, *O. tenuis* Agardh ex Gomont, *P. foveolarum* Gomont and *Tolypothrix tenuis* Kützting ex Bornet et Flahault), das quais a espécie de cianobactéria dulcícola *O. agardhii* resultou em melhor crescimento ao longo de 15 dias em meio comercial "CB" a 25°C. Por meio do uso de bioreatores em sistema aberto sob condições não controladas em laboratório, Silveira, Burkert, Costa, Burkert & Kalil (2007) cultivaram *S. platensis* suplementada com o meio sintético "Zarrouk" 20% (Zarrouk, 1966), utilizando uma concentração de biomassa inicial de 0,15 g L^{-1} . Enquanto, Majdoub, Mansour, Chaubet, Roudesli & Maaroufi (2009) cultivaram em laboratório a cianobactéria *S. platensis* usando meio velho de 30 dias (pH 12) comercializado na Tunísia. Soletto, Binaghi, Lodi, Carvalho & Converti (2005) testaram sulfato de amônio e uréia como fontes de nitrogênio para avaliar o crescimento de *S. platensis* em sistemas "batch" e "fed-batch". Os autores descobriram que o uso uréia como sendo mais eficaz para decrescer o custo de produção da referida cianobactéria. A cianobactéria *S. platensis* é capaz de se desenvolver até em cumes de vulcões, utilizando o enxofre como fonte de carbono, demonstrando a sua versatilidade de sobrevivência em ambientes diferentes (Raven, 1988).

Este estudo apontou a temperatura como parâmetro relevante na indução do crescimento unicianobactéria no sistema de cultivo utilizado, ocasionando um melhor aproveitamento dos nutrientes (fertilizantes agrícolas) presentes na água pela cianobactéria durante a fase exponencial. De acordo com Lourenço (2006), a primeira fase de um cultivo é do tipo estacionário, quando ocorre uma fase de adaptação ou de indução ao crescimento, também chamada de *lag*, um anglicismo e ocorre quando as células recém-transferidas (inóculo) para o meio de cultura fresco sofrem defasagem para iniciar o crescimento, devido adaptação das



células ao novo ambiente de cultivo. A segunda fase do cultivo é a fase exponencial ou logarítmica, geralmente sucede a fase de adaptação, mas em certas situações ela pode ser iniciada logo após a inoculação das células no meio de cultura, quando há ausência da fase de indução do crescimento. A duração desta fase depende principalmente da disponibilidade de nutrientes e de luz. Ao longo da fase de crescimento logarítmico há um aumento da excreção de compostos orgânicos no meio de cultura e, ao término dessa fase, a biomassa tende a seguir ordens de grandeza maior que o início dos cultivos. A terceira fase é de redução do crescimento ou de transição, é marcada pelo decréscimo relativo da taxa de crescimento, pela redução das concentrações dos nutrientes dissolvidos e, geralmente pelo aumento dos efeitos do auto-sombreamento, quando se trata de culturas densas. Portanto, o presente modelo de cultivo de *S. platensis* se revela como uma boa alternativa para produção de biomassa unicelular em laboratório (Soletto, Binaghi, Lodi, Carvalho & Converti, 2005).

FICOCIANINA: RE, CF E PE

O rendimento dos extratos brutos liofilizados baseados na matéria seca, usando-se tampões diferentes e condições de temperatura no cultivo de *S. platensis*, apresentou variação, como observado na tabela 1.

Tabela 1 Rendimento (%), concentrações de ficocianina (CF) e grau de pureza do extrato (PE) das extrações usando dois solventes em pH diferentes e condições de cultivos da cianobactéria *Spirulina platensis*.

Solventes de extração	CF (mg mL ⁻¹)	PE	Rendimentos
Acetato de sódio pH 5,0 (28°C)	7,001	4,53	29,17
Acetato de sódio pH 5,0 (24°C)	3,720	2,65	15,50
Fosfato de sódio pH 7,0 (24°C)	2,032	1,96	8,46
Fosfato de sódio pH 7,0 (28°C)	1,776	1,31	7,40

Verificou-se que a extração com tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0), a partir do cultivo a 24°C, foi a que apresentou um maior rendimento total, seguida da extração com tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) a 28°C e da extração, com o mesmo tampão, quando o cultivo foi realizado a 24°C, as quais, praticamente não apresentaram diferenças nos rendimentos totais. O menor rendimento observado foi o obtido através da extração com tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0), quando a cianobactéria *S. platensis* foi cultivada a 28°C. Essa diferença de pelo menos 3,94 vezes maior no rendimento oriundo da extração com acetato de sódio (pH 5,0; 28°C) sobre a quantidade total alcançada com o uso do solvente-tampão fosfato de sódio (pH 7,0; 28°C) demonstrou a eficácia do primeiro solvente no rompimento celular da cianobactéria para produzir e obter proteínas, resultando em valores de CF e PE também maiores (Abalde, Betancourt, Torres, Cid & Barwell, 1998; Reis, Mendes, Lobo-Fernandes, Empis & Novais, 1998).

Cultivo em meio alcalino à temperatura constante (25°C) de *S. platensis* Hanna & El-Baky (2003) demonstraram uma condição ideal para produzir ficocianinas. Tomaselli, Giovannetti & Torzillo (1993) observaram que variações bruscas de temperatura (de 30 para 40°C) no cultivo da cianobactéria *S. platensis* ocasionaram decréscimo de 13,6% no conteúdo de proteínas, enquanto acréscimos de 8,4 e 4,1% foram obtidos quanto aos teores de carboidratos e lipídios, respectivamente.

Esta pesquisa mostrou concentrações de ficocianinas superiores ao alcançado por Abalde, Betancourt, Torres, Cid & Barwell (1998), que obtiveram uma concentração de 27 µg mL⁻¹ de ficocianinas a partir da microalga *Synechococcus* sp. e aos obtidos por Minkova et al. (2003) que, ao extraírem ficocianinas da biomassa fresca de *Spirulina fusiformis*, obtiveram uma concentração de 1,28 mg mL⁻¹.

Os resultados apresentados na tabela 1 usando o tampão fosfato se mostraram inferiores aos descritos por Silveira, Burkert, Costa, Burkert & Kalil (2007), que detiveram uma concentração de 4,20 mg mL⁻¹ após a extração de ficocianinas de *S. platensis*, utilizando tampão fosfato 0,01 M a pH 7,0. No entanto, quando os autores utilizaram tampão acetato de sódio 0,01 M (pH 5,0) recuperaram apenas 1,84 mg mL⁻¹, uma concentração de ficocianinas inferior a obtida neste estudo. Essas interpretações combinadas, também, reforçaram que, independente da temperatura (24 ou 28°C) empregada nesta pesquisa, o rendimento se mostrou ótimo com a utilização tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0).

CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA (DEAE-CELULOSE) DOS EXTRATOS BRUTOS DE FICOCIANINAS

Os perfis cromatográficos, em coluna DEAE-celulose, dos extratos brutos liofilizados de *S. platensis* cultivada a 28°C apresentaram diferenças quantitativas nos pigmentos obtidos, dependendo do solvente

utilizado. A maior quantidade (c-ficocianina + aloficocianina) foi encontrada na fração F1 eluída com 0,5 M de NaCl, quando a extração foi realizada com acetato de sódio 0,1 M a pH 5,0 (Figura 2A).

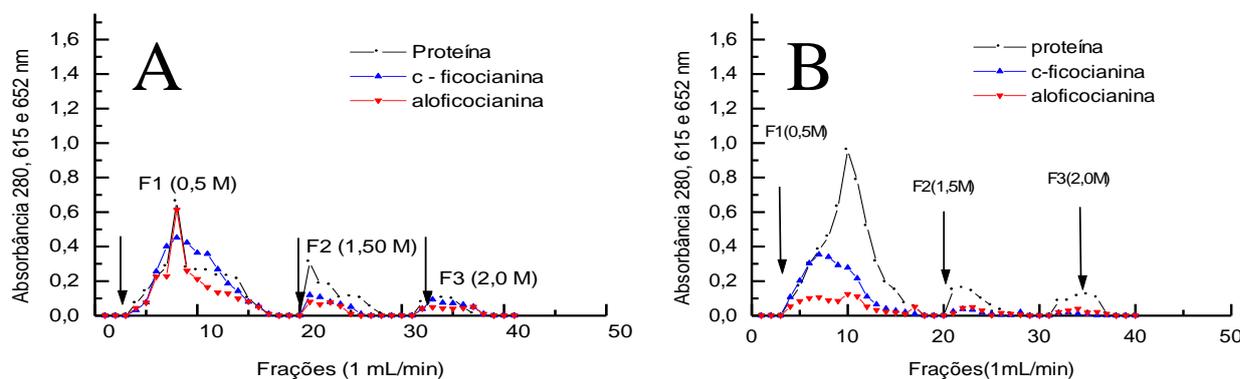


Figura 2 Cromatografia de troca-iônica em coluna de DEAE-celulose dos extratos brutos obtidos de *Spirulina platensis*, por meio de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) (A) e de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0) (B), quando a microalga foi cultivada na temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob iluminação constante.

No caso da extração realizada com fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0) a quantidade desses pigmentos eluídos se mostrou 43,8% inferior, a partir da área integrada das frações (Figura 2B). Essa tendência foi também observada com a aplicação de concentrações maiores de NaCl na eluição dos pigmentos adsorvidos à coluna, quando as leituras das absorvâncias relativas aos pigmentos presentes nas frações foram comparativamente menores entre as duas extrações.

De maneira semelhante, a quantidade de pigmentos obtidos na fração F1 da coluna de DEAE-celulose, oriundos dos extratos brutos dos cultivos realizados a 24°C , também variou de acordo com o solvente utilizado. Assim, o maior teor de pigmentos (c-ficocianina + aloficocianina) foi encontrado a partir da extração com solvente acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) (Figura 3), cuja quantidade desses pigmentos foi 21,2% maior baseada na área integrada dos cromatogramas.

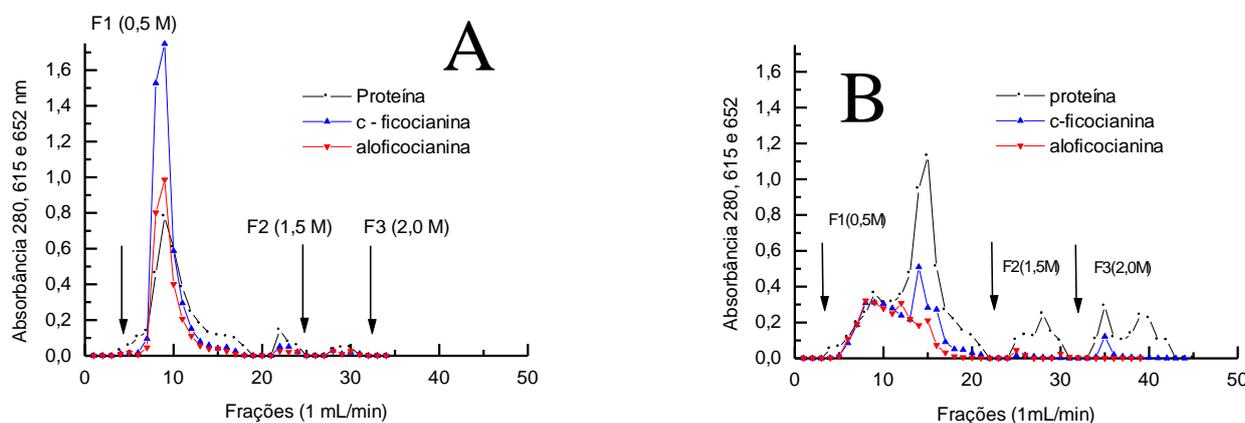


Figura 3 Cromatografia de troca-iônica em coluna DEAE-celulose dos extratos brutos obtidos de *Spirulina platensis*, por meio de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) (A) e de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0) (B), quando a microalga foi cultivada na temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob um fotoperíodo de 16 h de claro e 8 h de escuro.

Patil, Chethana, Madhusudhan & Raghavarao (2008) separaram c- e alo-ficocianinas, da biomassa fresca de *S. platensis*, por extração aquosa em duas fases com polietileno glicol (PEG 4000) e fosfato de potássio. Além de elevar o grau de purificação desses pigmentos para 3,20 e 1,80 vezes frente àquelas percentagens encontradas no extrato bruto contendo c-ficocianinas e alo-ficocianina, respectivamente. Quando por extração múltipla, verificou-se purificação de c-ficocianina 3,41 vezes maior, exceto da alo-ficocianina, cujo pigmento alcançou 3,66 vezes maior somente por separação salina (PEG 4000 e fosfato de potássio), por meio de ultracentrifugação usando membrana de 30 kDa.

Dessa forma, a coluna de DEAE-celulose se mostrou eficaz no fracionamento de extratos brutos contendo



pigmentos ocorrentes em *S. platensis*, demonstrando o tampão acetato de sódio como melhor solvente para obter ficocianinas, independente das condições de cultivo da microalga. Resultados revelaram, ainda, superiores aos alcançados por Abalde, Betancourt, Torres, Cid & Barwell (1998), que obtiveram uma concentração de $27 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ficocianina utilizando um tampão alcalino, empregando-se a resina do butil-sefaroze para a cromatografia hidrofóbica da interação e 0,05 M Tris-HCl (pH = 7) contendo 10% de etanol para a eluição de ficocianinas a partir da cianobactéria *Synechococcus* sp..

Minkova et al. (2003) extraíram ficocianinas com rivanol (10:1; v/v), seguido por saturação de 40% com o sulfato de amônia. Após a remoção do rivanol pelo gel de filtração em Sefadex G-25, a biomassa fresca de *Spirulina fusiformis* resultou em uma concentração de $1,28 \text{ mg mL}^{-1}$. Portanto, os resultados em conjunto desta investigação estão em concordância ao estudo de Tomaselli, Giovannetti & Torzillo (1993), que documentaram o uso de temperatura menores no cultivo de *S. platensis* como parâmetro físico não afetante da biossíntese de ficocianinas, tendo em vista os cromatogramas observados dos extratos brutos liofilizados (Figuras 2 e 3). Estudos subseqüentes, no que tangem à caracterização físico-química/molecular e mecanística de cunho farmacológico, analisando as ficocianinas obtidas desta investigação, sugerem ser desenvolvidos (Hanna & El-Baky, 2003; Cardozo et al., 2007).

Conclusão

O cultivo da cianobactéria *Spirulina platensis* em condições físico-químicas controladas, com fotoperíodo (16 h claro; 8 h escuro) e temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, apesar de ter um crescimento mais lento, resultou em uma maior quantidade de pigmentos purificados (c-ficocianina + aloficocianina) a partir do fracionamento em coluna de troca-inônica DEAE-celulose, pela extração realizada com o tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0). Desta forma, tanto as condições de cultivo quanto o(s) solvente(s) utilizados na extração se mostram alternativos para extração das ficocianinas em laboratório.

Referências

- Abalde, J., Betancourt, L., Torres, E., Cid, A. & Barwell, C. (1998). Purification and characterization of phycocyanin from marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. *Plan. Sci.*, 136(1): 109-120.
- Alencar, D. B., Pires-Cavalcante, K. M. S., Saboya, J. P. S., Sousa, M. B., Farias, W. R. L. & Saker, S. S. (2011). Teores de β -caroteno em suplementos e biomassa de *spirulina*. *Rev. Cien. Agron.*, 35(2): 386-391.
- Belay, A., Ota, Y., Miyakawa, K. & Shimamatsu, H. (1993). Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *J. Appl. Phycol.*, 5(2): 235-241.
- Beky, A. E., Baz, H. E. & Latife, E. (2013). Induction of sulfated polysaccharides in *Spirulina platensis* as response to nitrogen concentration and its biological evaluation. *Aquacul. Res. Develop.*, 5(1): 1-8.
- Bennett, A. & Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *J. Cell Biol.*, 58(2): 419-435.
- Bermejo, R., Acien, F.G., Ibanez, M.J., Fernandez, J.M., Molina, E. & Alvavez-Pez, J.M. (2003). Preparative purification of B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by expanded-bed adsorption chromatography. *J. Chromatogr. B - Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 720(1-2): 317-325.
- Bhat, V.B. & Madyastha, K.M. (2000). C-phycoerythrin: a potent peroxyl radical scavenger *in vivo* and *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 275(1): 20-25.
- Boussiba, S. & Richmond, A.E. (1979). Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Arch. Microbiol.*, 120(2): 155-159.
- Cardozo, K. H. M., Guaratini, T., Barros, M. P., Falcão, V. R., Tonon, A. P., Lopes, N. P., Campos, S., Torres, M. A., Souza, A. O. & Pinto, E. (2007). Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Physiol. Part C - Toxicol. Pharmacol.*, 146(102): 60-78.
- Cohen, Z., Reungjitchachawali, M., Siangdung, W. & Tanticharoen, M. (1993). Production and partial purification of α -linolenic acid and some pigments from *Spirulina platensis*. *J. Appl. Phycol.*, 5(1): 109-115.
- Gantt, E. (1981). Phycobilisomes. *Ann.Rev. Plan.Physiol. Plan. Molecul. Biol.*, 32: 327-347.
- Hanna, H. & El-Baky, A.B.B. (2003). Over production of phycocyanin pigment in blue green alga *Spirulina* sp. and its inhibitory effect on growth of ehrlich ascities carcinoma cells. *J. Med. Sci.*, 3(4): 314-324.
- Henrikson, R. (1994). *Microalga Spirulina: superalimento del futuro*. Barcelona: Ediciones S.A.
- Iijima, N. & Shimamatsu, H. (1982). Antitumor agent and method of treatment therewith. US patent



pending. Ref P1150-726-A82679, 15.

- Liang, S.Z., Liu, X.M., Chen, F. & Chen, Z.J. (2004). Current microalgal health food R & D activities in China. *Hydrobiol.*, 512(1-3): 45-48.
- Lourenço, S.O. (2006). *Cultivo de Microalgas Marinhas: princípios e aplicações*. São Carlos: Editora Rima.
- Majdoub, H., Mansour, M.B., Chaubet, F., Roudesli, M.S. & Maaroufi, R.M. (2009). Anticoagulant activity of a sulfated polysaccharide from the green alga *Arthrospira platensis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1790(10): 1377-1381.
- Minkova, K.M., Tchernov, A.A., Tchornbadjieva, M.I., Fournadjieva, S.T., Antova, R.E. & Busheva, M.C. (2003). Purification of c-phycoyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. *J. Biotechnol.*, 102(1): 55-59.
- Maheswari, S. & Bagirath, G. (2008). Biosorption of cadmium by live and immobilized cells of *Spirulina platensis*. *Int. J. Environ. Res.*, 2(3): 307-312.
- Moreira, R.L., Martins, R.R.O. & Farias, W.R.L. (2011). Utilização de *Spirulina platensis* como suplemento alimentar durante a reversão sexual da tilápia-do-nylo (var. Chitralada) em água salina. *Ci. Anim. Bras.*, 12(1): 76-82.
- Patil, G., Chethana, S., Madhusudhan, M. C., & Raghavarao, K. S. M. S. (2008). Fractionation and purification of the phycobiliproteins from *Spirulina platensis*. *Biores. Technol.*, 99(15): 7393-7396.
- Ramamoorthy, A. & Premakumari, S. (1996). Effect of supplementation of *Spirulina* on hypercholesterolemic patients. *J. Food Sci. Technol.*, 33(2): 124-127.
- Raven, J. A. (1988). Limits to growth. In: M. A. Borowitzka & L. J. Borowitzka (Eds). *Micro-algal biotechnology*. (pp. 331-356). Cambridge: Cambridge University.
- Reddy, M.C., Sublihashini, J., Mahipal, S.V.K., Bhat, V.B., Reddy, P.S., Kiranmi, G., Madyastha, K.M. & Reddanna, P. (2003). C-phycoyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 304(2): 385-392.
- Reis, A., Mendes, A., Lobo-Fernandes, H., Empis, J.A. & Novais, J.M. (1998). Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp., *Biores. Technol.*, 66(3): 181-187.
- Penton-Rl, G., Marin-Prida, J., Pardo-Andreu, G., Martinez-Sánchez, G., Acosta-Medina, E.F., Valdivia-Acosta, A., Lagumersindrez-Denis, N., Rodriguez-Jiménez, E., Llópiz-Arzuaga, A., López-Saura, P., Guillén-Nieto, G. & Pentón-Arias, E. (2011). C-phycoyanin is neuroprotective against global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils. *Br. Res. Bull.*, 86(1-2): 42-52.
- Sato, Y., Murakami, M., Miyazawa, K. & Hori, K. (2000). Purification and characterization of a novel lectin from a freshwater cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, 125(2): 169-177.
- Silveira, S.T., Burkert, J.F.M., Costa, J.A.V., Burkert, C.A.V. & Kalil, S.J. (2007). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Biores. Technol.*, 98(8): 1629-1634.
- Soletto, D., Binaghi, L., Lodi, A., Carvalho, J.C.M. & Converti, A. (2005). Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. *Aquaculture*, 243(1-4): 217-224.
- Tomaselli, L., Giovannetti, L. & Torzillo, G. (1993). Physiology of stress response in *Spirulina* spp. In: F. Doumenge, H. Durand-Chastel & A. Toulemon (Eds). *Spiruline Algue de Vie* (pp. 65-75). Bulletin de L'Institut Océanographique.
- Vonshak, A. (1997). *Spirulina: growth, physiology and biochemistry*. In: A. Vonshak (Ed.). *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*. (pp. 43-66). London: Taylor & Francis.
- Zarrouk, C. (1966). Contribution à l'étude d'une Cyanophycée: influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima*. Thesis (Ph.D). Paris (FR): Université Des Paris.