



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA**

**EXTRAÇÃO DE FICOCIANINAS DA MICROALGA *Spirulina platensis* COM
DIFERENTES TAMPÕES, A PARTIR DE CULTIVOS REALIZADOS EM
DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E ILUMINAÇÃO**

JEFFERSON PABLO DE SOUSA SABOYA

**Monografia apresentada ao Departamento de
Engenharia de Pesca do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal do Ceará,
como parte das exigências para a obtenção
do título de Engenheiro de Pesca**

**FORTALEZA - CEARÁ – BRASIL
JANEIRO/ 2007**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Wladimir Ronald Lobo Fárias, D.Sc.
Orientador

Prof^a Silvana Saker Sampaio, Ph.D.
Membro

Márcia Barbosa de Sousa, M.Sc.
Membro

VISTO:

Prof. Moisés Almeida de Oliveira, D.Sc
Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

Prof. Raimundo Nonato de Lima Conceição, D.Sc
Coordenador do Curso de Engenharia de Pesca

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S122e Saboya, Jefferson Pablo de Sousa.

Extração de ficocianinas da microalga *Spirulina platensis* com diferentes tampões, a partir de cultivos realizados em diferentes condições de temperatura e iluminação / Jefferson Pablo de Sousa Saboya. – 2007.

29 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2007.

Orientação: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias.

1. Microalga (Planta aquática) - Cultivo. 2. Microalga (Planta aquática) - Extração de ficocianinas. 3. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

**“As dificuldades devem ser usadas para crescer,
não para desencorajar.
O espírito humano cresce forte no conflito.”
William Channing**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proteger pelo fortalecimento nos momentos difíceis, pela fé e pelos caminhos mostrados.

A meus pais Carlos e Ivoneide e Stephane minha irmã, agradeço por tudo principalmente pela paciência, carinho e atenção durante todos esses anos de estudo e ausências.

Ao meu orientador Professor Wladimir Ronald Lobo Farias, agradeço tudo que me ensinou e continua ensinando, pela amizade e paciência na execução desse trabalho.

A professora Silvana Saker Sampaio, por sua amizade, atenção e força para realização desta monografia através de artigos.

Aos Engenheiros de Pesca José Ariévilto Gurgel Rodrigues e Kelma Maria dos Santos Pires, um agradecimento especial, além da amizade e agradável companhia, são responsáveis pelo desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas de curso Daniel Barroso de Alencar, Rômulo Malta Nascimento e a Engenheira de Pesca, na época estudante de graduação, Francisca Ivone Coelho Ribeiro, agradeço por sua ajuda, amizade e convivência que torna cada dia de trabalho mais agradável.

Aos professores do Departamento de Engenharia de Pesca pelos conhecimentos, amizade e aprendizados adquiridos durante todo o curso de graduação.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	6
2.1. Obtenção da microalga <i>Spirulina platensis</i>	6
2.2. Preparo do meio de cultivo	6
2.3. Preparo do inóculo	6
2.4. Cultivo da microalga <i>Spirulina platensis</i>	7
2.5. Coleta das microalgas	7
2.6. Extração de ficocianina da microalga <i>Spirulina platensis</i>	7
2.7. Determinação do grau de pureza do extrato (PE), da concentração de ficocianina (CF) e do rendimento da extração (R)	8
2.8. Cromatografia do extrato protéico total em coluna de DEAE- celulose	9
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
3.1. Cultivo de <i>Spirulina platensis</i> em diferentes condições físico- químicas	10
3.2. Extração de ficocianinas de <i>Spirulina platensis</i> cultivadas em diferentes condições físico-químicas	12
3.3. Cromatografia em DEAE-celulose dos extratos brutos de ficocianinas obtidos com diferentes tampões e em diferentes condições de cultivo	14
4. CONCLUSÕES	18
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Curvas de crescimento de <i>Spirulina platensis</i> cultivadas em diferentes condições de temperatura e luminosidade.	10
Figura 2: Rendimentos totais dos extratos brutos obtidos de <i>Spirulina platensis</i> , utilizando diferentes condições de cultivo e extração.	13
Figura 3: Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose do extrato bruto obtido de <i>Spirulina platensis</i> com solução tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0, quando a microalga foi cultivada na temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob iluminação constante.	15
Figura 4: Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose do extrato bruto obtido de <i>Spirulina platensis</i> com solução tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0, quando a microalga foi cultivada na temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob iluminação constante.	15
Figura 5: Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-celulose do extrato bruto obtido de <i>Spirulina platensis</i> com solução tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0, 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.	16
Figura 6: Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-celulose do extrato bruto obtido de <i>Spirulina platensis</i> com solução tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0, 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.	17

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Resultados das concentrações de ficocianina (CF) do grau de pureza do extrato (PE) e dos rendimentos obtidos durante a extração com diferentes tampões e condições de cultivos.	13

RESUMO

A microalga *Spirulina platensis* tem sido comercializada e estudada pelo seu potencial nutricional devido ao seu elevado conteúdo de proteínas, pró-vitaminas, ácidos graxos insaturados e também, por apresentar potencial terapêutico no tratamento de algumas doenças. A demanda do consumidor por alguns alimentos naturais, que trazem benefícios à saúde, aumentou nos últimos anos. Em consequência desta tendência, o uso de pigmentos naturais em produtos alimentícios está sendo preferido. O objetivo do presente trabalho foi cultivar a microalga *S. platensis* em diferentes condições de temperatura e iluminação e avaliar o teor de ficocianina na biomassa liofilizada, através da extração com diferentes tampões. O cultivo da microalga *S. platensis* foi realizado em duas condições diferentes. Na primeira, dois garrafões de 14 L foram mantidos sob iluminação constante e temperatura ambiente de $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Na segunda forma de cultivo, outros dois garrafões de 14 L foram mantidos submetidos a um fotoperíodo de 16 h de claro e 8 h de escuro e temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Para a extração de ficocianina da microalga *S. platensis*, a biomassa úmida foi dialisada e liofilizada. A partir de 3 g, obtidas em ambas as condições de cultivo, foram realizadas duas extrações, sendo uma com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 e a outra com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0. Os extratos obtidos foram submetidos a uma cromatografia em coluna DEAE-celulose equilibrada com os respectivos tampões de extração. Com relação ao cultivo, quando as microalgas foram cultivadas na temperatura de 28°C , elas atingiram mais rapidamente a fase de diminuição do crescimento relativo. A extração realizada com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 resultou em um maior rendimento do extrato bruto, principalmente a 28°C . Por outro lado, as quantidades de ficocianina e de aloficocianina, purificadas, foram maiores na extração realizada com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 quando o cultivo foi realizado a 24°C . Assim, é possível concluir que tanto o tampão de extração quanto as condições de cultivo foram importantes para a purificação dos pigmentos de *S. platensis*.

EXTRAÇÃO DE FICOCIANINAS DA MICROALGA *Spirulina platensis* COM DIFERENTES TAMPÕES, A PARTIR DE CULTIVOS REALIZADOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E ILUMINAÇÃO

JEFFERSON PABLO DE SOUSA SABOYA

1. INTRODUÇÃO

As microalgas apresentam vários pigmentos que absorvem luz incluindo a clorofila, os carotenóides e as ficobiliproteínas, estes últimos são encontrados nas algas azuis e funcionam como pigmentos acessórios. Além disso, possuem grande versatilidade metabólica e ecofisiológica, podendo ser cultivadas em diversos sistemas de produção, por serem capazes de se adaptar a condições ambientais extremas como variações de salinidade, temperatura, radiação solar e nutrientes (REIS et al., 1998; ROSALES et al., 2005).

Segundo RADMER; PARKER (1994), nas microalgas existem três atributos que são de fundamental importância e podem ser transformados em vantagens técnicas e comerciais: (1) representam um grupo de organismos geneticamente muito diverso com várias características fisiológicas e bioquímicas, portanto naturalmente capazes de produzir gorduras, açúcares, compostos bioativos diferentes e incomuns; (2) podem incorporar os isótopos estáveis (C^{13} , N^{15} e H^2) em sua biomassa e em vários compostos que produzem; e (3) compreendem um grupo grande e inexplorado de organismos que fornecem uma vasta fonte de produtos.

A relação entre as algas e o homem vem de origem remota desde quando elas eram usadas em sopas, temperos e molhos, constituindo-se de importante fonte de nutrientes (COZZA, 1999).

A *Spirulina platensis* é uma cianobactéria filamentosa fotossintética planctônica que constitui populações maciças nos corpos de água tropicais e subtropicais com elevados níveis de carbonato e bicarbonato e valores de pH alcalinos de até 11. Esta cianobactéria é reconhecida pela principal característica morfológica do gênero, isto é, o arranjo de tricomas (seqüência linear de células) cilíndricos multicelulares ao longo do comprimento dos filamentos com até 1,0 mm de comprimento, formando uma hélice no sentido anti-horário (VONSHAK, 1997). As cianobactérias ou algas azuis apareceram na Terra há cerca de 3.500 bilhões de anos (DESMORIEUX; DECAEN, 2006). Por séculos, os povos nativos coletavam *S. platensis* dos lagos Chad na África e Texcoco no México para ser utilizada como a principal fonte de alimentação (VONSHAK, 1997).

A composição química da *Spirulina* é responsável por seu alto valor nutricional devido aos elevados níveis de nutrientes essenciais, tais como pró-vitaminas, minerais, proteínas e ácidos graxos poliinsaturados, como por exemplo, o ácido graxo gama-linolênico (GLA) (MIRANDA et al., 1998). Esta cianobactéria se destaca das demais devido ao seu alto conteúdo protéico que pode alcançar até 70% de seu peso seco (VONSHAK, 1997), possuindo também um elevado teor de aminoácidos (62%) e sendo a maior fonte mundial de vitamina B₁₂ (PIÑERO-ESTRADA et al., 2001).

O fato de a *Spirulina* crescer em lagos alcalinos, onde outros microrganismos têm pouca ou nenhuma chance de sobrevivência, torna seu uso seguro pelas escassas possibilidades de contaminação (COZZA, 1999). Sua segurança para o consumo humano foi estabelecida também através de numerosos estudos toxicológicos (QURESHI; ALI, 1996).

O gênero *Spirulina* tem sido objeto de estudos devido suas propriedades terapêuticas (BELAY et al., 1993) e a presença de ficobiliproteínas e compostos fenólicos que possuem propriedades antioxidantes (MIRANDA et al., 1998; PIÑERO-ESTRADA et al., 2001). A ocorrência de compostos fenólicos nas plantas é bem documentada, mas as características antioxidantes em microalgas e cianobactérias ainda são pouco estudadas. Além de suas propriedades antioxidantes, a microalga *S. platensis* também possui atividade imunoestimulante

e hipocolesterolêmica. Níveis decrescentes de colesterol sanguíneo tem sido relatados em pacientes com hipercolesterolemia, alimentados com *Spirulina* (QURESHI; ALI, 1996; RAMAMOORTHY; PREMAKUMARI, 1996;).

O cultivo da microalga *S. platensis* pode ser uma boa alternativa para os seres humanos como fonte de proteína suplementar na alimentação e ainda com a possibilidade de se obter outros produtos como os pigmentos (carotenóides, ficocianina e clorofila), além de vitaminas e lipídios. A biomassa obtida pode ser introduzida diretamente na dieta e ser usada nos casos de subnutrição diante de seu potencial nutricional (PELIZER et al., 2003).

Atualmente, cerca de vinte e duas companhias no mundo produzem biomassa de *Spirulina*, e o principal destino de seus produtos são lojas de alimentos naturais e farmácias, onde a biomassa seca é vendida como suplemento alimentar (BELAY, 1997). Em 1996, a produção de *Spirulina* em pó chegou a atingir 1.000 t e a China é, atualmente, o maior produtor dessa microalga no mundo (LIANG et al., 2004).

A influência das condições de cultivo no crescimento e na composição química desta cianobactéria foi estudada por muitos pesquisadores com a finalidade de otimizar o interesse na produção de compostos de alto valor econômico, especialmente GLA e a ficocianina (COHEN et al., 1993; TANTLCHAROEN et al., 1994). Embora o uso da *Spirulina* para a extração de ficocianina, como pigmento natural, pareça ser comercialmente viável, a produção de GLA a partir desta cianobactéria apresenta um custo mais elevado quando comparado com outras fontes de produção (COHEN et al., 1993).

A *S. platensis* também é uma fonte atrativa de clorofila, um pigmento verde da célula usado na alimentação, na indústria farmacêutica e de cosméticos, sendo também rica em outros componentes importantes para a célula. Além disso, ao contrário de outras microalgas cultivadas, pode ser facilmente recuperada do meio de cultivo através de filtragem (SOLETTI et al., 2005).

Os carotenóides correspondem a uma importante fonte de corantes naturais, distribuída extensamente na natureza, dos quais mais de 600 pigmentos com estruturas variadas já foram identificados (OLSON; KRINSKY, 1995). Esses

compostos são sintetizados pelas bactérias, fungos, algas e plantas superiores (ARMSTRONG, HEARST, 1996). Já os animais só podem obter esses compostos através da ingestão de alimentos (ASTORG, 1997). Os carotenóides são usados pela indústria alimentícia para conferir cor aos alimentos e bebidas (como por exemplo, suco de laranja) e ainda são precursores de muitos produtos químicos importantes responsáveis pelo sabor dos alimentos e da fragrância das flores (GOUVEIA; EMPIS, 2003). Embora os carotenóides possuam diferentes propriedades biológicas, eles exibem propriedades físico-químicas similares e tendem a se acumular no tecido adiposo, particularmente no fígado, mas também em quantidades menores, nos rins, órgãos genitais e pele (ARMSTRONG, 1997).

Uma outra fonte de corantes naturais são as ficobiliproteínas, que são proteínas fluorescentes solúveis em água, derivadas das cianobactérias e algas eucarióticas. Nestes organismos, elas funcionam como pigmentos fotossintéticos acessórios captando luz e absorvendo energia em faixas do espectro visível (450-650nm) que são pouco utilizadas pela clorofila e, através da transferência de energia fluorescente, transportam a energia para a clorofila (ARAD; YARON, 1992).

As ficobiliproteínas são divididas em três classes principais de acordo com sua estrutura: ficoeritrinas, ficocianinas e aloficocianinas (BERMEJO et al., 2003). A c-ficocianina e a aloficocianina são as duas principais ficobiliproteínas presentes na microalga verde-azul *S. platensis*. Essas moléculas apresentam baixos pesos moleculares, sendo de 44 kDa para a c-ficocianina e 38 kDa para a aloficocianina e coeficientes específicos da extinção molar de 73 e 58 para a c-ficocianina e aloficocianina, respectivamente (BOUSSIBA; RICHMOND, 1979).

A obtenção de ficocianina com alto grau de pureza é interessante, pois atualmente a demanda por corantes naturais tem aumentado consideravelmente (BHAT; MADYASTHA, 2000; REDDY et al., 2003; BENEDETTI et al., 2004). Esta ficobiliproteína é utilizada, principalmente, como corante em alimentos, além disso, pequenas quantidades são utilizadas em imunoenaios bioquímicos devido as suas propriedades fluorescentes (VONSHAK, 1997), ganhando importância no desenvolvimento de sondas de ficofluór para imunodiagnósticos (KRONIK;

GROSSMAN, 1983). Outros trabalhos mostraram que a ficocianina apresenta propriedades antioxidantes, anticancerígenas, imunomoduladora e antiinflamatória. Entretanto, os mecanismos de ação envolvidos nestas atividades ainda não são compreendidos claramente (IIJIMA, SHIMATZO, 1982; REDDY et al., 2003).

As ficobiliprotéínas são organizadas dentro das células das cianobactérias em partículas chamadas de ficobilissomos, os quais são dispostos regularmente na superfície externa das membranas dos tilacóides. Os ficobilissomos consistem em núcleos de aloficocianina cercados por unidades de ficocianina localizados na periferia das células. A ficocianina é o pigmento principal enquanto a aloficocianina funciona como um pigmento secundário, construindo uma ponte entre os ficobilissomos e a lamela fotossintética (GANTT, 1981).

Além de ser utilizada como um corante em vários produtos alimentícios, tais como goma de mascar e produtos derivados do leite como iogurtes, a ficocianina também é utilizada em cosméticos como no batom e em maquiagem para os olhos no Japão, na Tailândia e na China (DAINIPPON INK AND CHEMICALS, 1985).

Diversos fatores podem influenciar na extração da ficocianina a partir de cianobactérias como a *Spirulina*, sendo os mais importantes, o método do rompimento celular, o tipo de solvente utilizado, a relação entre a biomassa e o solvente e o tempo de extração (ABALDE et al., 1998; REIS et al., 1998), mas de uma maneira geral, a cianobactéria *S. platensis* é uma excelente fonte de ficocianina, a qual pode alcançar até 20% do total de proteína nesse organismo (VONSHAK, 1997).

O objetivo deste trabalho foi extrair e avaliar o rendimento da ficocianina presente na cianobactéria *S. platensis*, cultivada em diferentes condições físico-químicas, utilizando dois tipos de tampões com valores de pH diferentes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção da microalga *Spirulina platensis*

As cepas da microalga *S. platensis*, utilizadas no experimento, foram obtidas no laboratório de Planctologia do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal de Ceará, onde também foram realizados os cultivos.

2.2. Preparo do meio de cultivo

Para o preparo do meio de cultivo, foram utilizados os reagentes, cloreto de sódio (30 g/L), bicarbonato de sódio (10 g/L) e os fertilizantes agrícolas NPK (1 g/L) e superfosfato triplo (0,1 g/L). Após serem pesados e macerados, eles foram, gradativamente, adicionados e dissolvidos dentro de um recipiente plástico contendo 10 L de água da torneira. Em seguida, a água foi submetida a uma aeração constante por 24 horas para homogeneizar bem a mistura, onde posteriormente, ocorreu a decantação.

2.3. Preparo do inóculo

A partir de um cultivo de *S. platensis* mantido no laboratório de Planctologia, foi obtido um inóculo inicial, transferindo-se 300 mL do cultivo pré-estabelecido para um erlenmeyer de 1 L. Em seguida, foi adicionado, a cada dois dias, meio de cultivo até completar o volume do recipiente. O inóculo foi mantido sob iluminação constante de 1.000 Lux e temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Sendo diariamente agitado manualmente até que a densidade celular alcançasse valores semelhantes à do cultivo pré-estabelecido. Após este período, o inóculo foi transferido para um garrafão de 14 L, sendo novamente adicionado meio de cultivo, iniciando o cultivo em larga escala. Durante todo o trabalho, foram sempre utilizados dois inóculos de 1 L e, quatro garrafões de 14 L para a produção da microalga.

2.4. Cultivo da microalga *Spirulina platensis*

O cultivo da microalga *S. platensis* foi realizado em duas condições diferentes. Na primeira, dois garrafões de 14 L foram mantidos em uma sala do laboratório sob iluminação constante fornecida por uma lâmpada fluorescente de 40W e temperatura ambiente de $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Na segunda forma de cultivo, outros dois garrafões de 14 L foram mantidos em uma outra sala do laboratório e submetidos a um fotoperíodo de 16 horas de claro e 8 horas de escuro, e temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Em ambas as formas de cultivo, os garrafões receberam aeração constante. O monitoramento do cultivo foi feito por espectrofotometria, sendo coletada uma amostra de 1 mL para a leitura da absorbância a 680nm, o comprimento de onda onde ocorre a maior absorção da luz pela clorofila.

2.5. Coleta das microalgas

A separação das microalgas do meio de cultivo foi realizada por filtração em malha de 60 μm através de sifonamento, deixando a cultura fluir do garrafão, através da malha para um tubo de PVC.

Imediatamente após o esvaziamento dos garrafões foi realizada uma limpeza, a qual consistia na escovação das paredes com detergente neutro, seguida de um enxágüe com bastante água da torneira.

2.6. Extração de ficocianina da microalga *Spirulina platensis*

Esse procedimento foi realizado no laboratório de Bioquímica Marinha do Departamento de Engenharia de Pesca.

Para a extração de ficocianina da microalga *S. platensis*, a biomassa úmida, coletada em ambas as condições de cultivo, foi lavada com água destilada, para eliminar o sal e congelada a -21°C por 24 horas. Após esse período, a biomassa foi descongelada em temperatura de geladeira (4°C) e transferida para um balão de liofilização, sendo congelada e liofilizada para obtenção da matéria seca. Em

seguida, 3 g do material seco foram pesados e hidratados com 125 mL de solução tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. Para a extração, a mistura foi deixada sob agitação constante por 48 horas em temperatura ambiente. Após a extração, a mistura foi então centrifugada (13.000 rpm; 30 min; 4°C). Após a centrifugação, o sobrenadante foi dialisado exaustivamente contra água destilada e liofilizado. Todo esse procedimento também foi realizado para a extração da ficocianina em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0.

2.7. Determinação do grau de pureza do extrato (PE), da concentração de ficocianina (CF) e do rendimento da extração (R)

A concentração de ficocianina nos extratos foi determinada de acordo com BENNETT; BOGORAD (1973) utilizando a equação:

$$CF = \frac{(Abs_{615} - 0,474.(Abs_{652}))}{5,34}$$

onde: CF = concentração de ficocianina (mg.mL^{-1}); Abs_{615} = leitura da amostra a 615_{nm} e Abs_{652} = leitura da amostra a 652_{nm} .

O grau de pureza do extrato de ficocianina foi determinado de acordo com (ABALDE et al., 1998), através da relação:

$$PE = \frac{Abs_{615}}{Abs_{280}}$$

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

O rendimento da extração foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$R(\%) = \frac{CF \times V}{BS}$$

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

2.8. Cromatografia do extrato protéico total em coluna de DEAE-celulose

A purificação da ficocianina extraída da microalga *S. platensis* 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 0,1 M, pH 5,0 ou fosfato 0,1 M, pH 7,0) e, em seguida, foi aplicada uma solução de 1 mg/mL de cada extrato no topo do gel. A eluição da coluna foi realizada, passo a passo, com tampões contendo diferentes concentrações de NaCl (0,5; 1,50 e 2,0 M) com fluxo ajustado de 60 mL/min, sendo coletadas frações de 1 mL. As frações foram monitoradas a 280 nm para proteína total, a 615 nm para a c-ficocianina e a 652 nm para a aloficocianina, como descrito por SILVEIRA et al (*in press*). A comparação das quantidades de pigmentos eluídos nas diferentes condições de extração e cultivo foi realizada utilizando a integral (programa Origin) das frações obtidas nas cromatografias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Cultivo de *Spirulina platensis* em diferentes condições físico-químicas

A Figura 1 mostra as curvas de crescimento de *S. platensis*, expressas em valores de absorvância a 680 nm, obtidas quando as microalgas foram cultivadas em diferentes condições de temperatura e iluminação. De acordo com a figura, as microalgas cultivadas a 28°C, sob iluminação constante, apresentaram um desenvolvimento mais rápido, atingindo a fase de diminuição do crescimento relativo após 20 dias de cultivo, enquanto que, após este mesmo período, as microalgas cultivadas a 24°C, com fotoperíodo, ainda se encontravam na fase de crescimento exponencial.

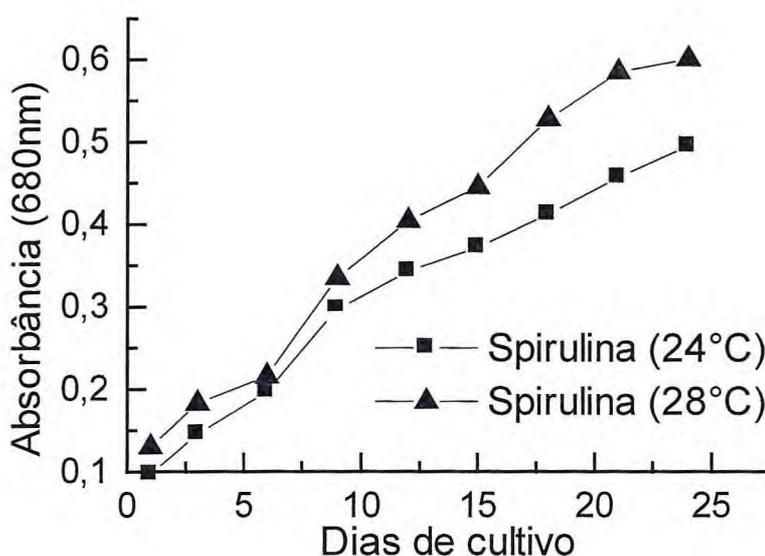


Figura 1. Curvas de crescimento de *Spirulina platensis* cultivadas em diferentes condições de temperatura e luminosidade.

Segundo PELCZAR et al. (1996), a primeira fase de um cultivo do tipo estacionário é a fase lag ou de indução, na qual não existe grande aumento da cultura, devido a adaptação das células ao novo ambiente de cultivo. A segunda fase do cultivo é fase exponencial ou log, na qual as células estão se dividindo

sucessivamente em intervalos regulares de tempo, sendo esse o momento ideal para a transferência das culturas e extração de substâncias biologicamente ativas. A terceira fase é de diminuição do crescimento relativo, consequência da diminuição de nutrientes no meio, do acúmulo de metabólitos tóxicos e da redução da fotossíntese. Portanto, a repicagem e filtragem das microalgas devem ser feitas neste momento para garantir o sucesso da produção, já que a partir desse ponto, a cultura entra na fase estacionária onde as taxas de crescimento e mortalidade se equilibram, passando rapidamente para fase de morte da cultura, que é o resultado da depleção de nutrientes e ocorrência de níveis tóxicos elevados de metabólitos.

O cultivo de cianobactérias é realizado para diversas finalidades, como a aplicação em alimentos humanos ou rações animais, devido ao seu alto teor de proteínas, vitaminas, sais minerais, lipídios e pigmentos. A *Spirulina* está legalmente autorizada como alimento ou complemento alimentar na Europa, Japão e costa asiática do Pacífico. Nos Estados Unidos, o FDA (Food and Drug Administration) determinou, em 1981, que a *Spirulina* constitui-se fonte de proteína e contém várias vitaminas e minerais, podendo ser comercializada legalmente como suplemento alimentício sendo capaz de suprir as necessidades nutritivas, energéticas e até curativas do ser humano, com baixo custo (HENRIKSON, 1994).

As principais exigências para que microrganismos possam ser usados em alimentação humana são a composição adequada em relação à concentração e qualidade dos nutrientes, ausência de substâncias tóxicas e/ou alérgicas e a palatabilidade (SGARBIERI, 1996).

No Brasil, a *Spirulina* tem sido empregada basicamente, na produção de cápsulas destinadas à dieta de emagrecimento. De acordo com os fabricantes, o efeito de controlar o apetite ocorre se ingerida uma ou duas horas antes da refeição, devido a presença dos aminoácidos essenciais em quantidades balanceadas, bem como sua composição rica em proteína (HENRIKSON, 1994).

A liofilização pode ser considerada como um método de secagem de referência para as cianobactérias, devido o produto sofrer mínimas alterações em suas propriedades nutricionais, sensoriais e físico-químicas, sendo o produto

liofilizado o que mais se assemelha à biomassa fresca (MORIST et al., 2001). Nesse trabalho tanto a biomassa da microalga como a ficocianina foram liofilizados, garantindo assim toda a sua integridade.

NAYLOR et al. (1993) descreveram que a secagem por liofilização da microalga *Chlorella vulgares* afetar a composição celular da biomassa. SARADA et al. (1999) relataram que diversas técnicas são utilizadas na secagem de *Spirulina*, incluindo “spray dryer” e secadores convectivos, os quais resultam na perda de aproximadamente 50% da ficocianina presente na biomassa.

DESMORIEUX; DECAEN (2005) estudaram a secagem de *S. platensis* em secadores convectivos após a filtragem da biomassa como uma alternativa frente à secagem por “spray dryer”, devido ao baixo custo e facilidade operacional.

3.2. Extração de ficocianinas de *Spirulina platensis* cultivadas em diferentes condições físico-químicas

O rendimento dos extratos brutos, utilizando diferentes tampões e diferentes condições de cultivo, apresentou uma certa variação (Figura 2). Como é possível observar, 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 *S. platensis* foi cultivada a 28°C. Com relação ao teor de ficocianinas, as extrações com tampão acetato sódio 0,1 M, pH 5,0 foram mais eficientes, principalmente quando o cultivo foi realizado a 28°C (Tabela 1). Já com relação às extrações com tampão fosfato, a partir de microalgas cultivadas em ambas as temperaturas, estas praticamente não apresentaram diferenças no rendimento de ficocianinas.

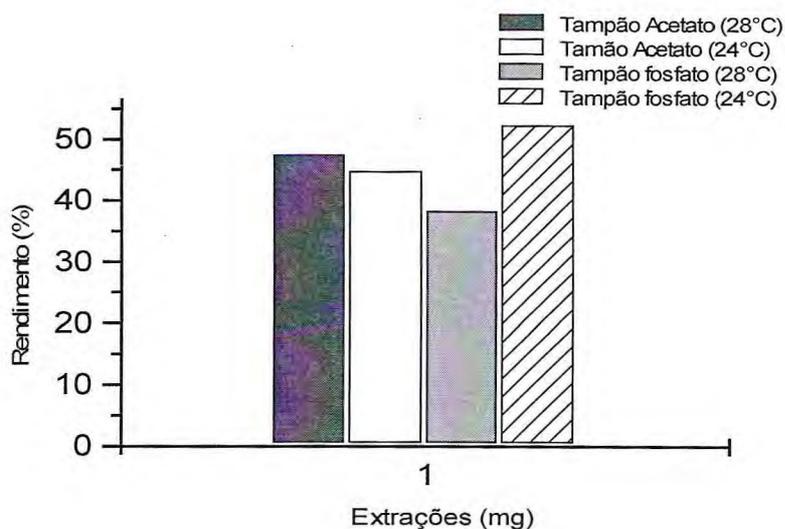


Figura 2. Rendimentos totais dos extratos brutos obtidos de *Spirulina platensis*, utilizando diferentes condições de cultivo e extração.

Tabela 1. Resultados das concentrações de ficocianina (CF) do grau de pureza do extrato (PE) e dos rendimentos obtidos durante a extração com diferentes tampões e condições de cultivos da microalga.

Tampões/ Temperatura de cultivo da <i>S. platensis</i>	Ficocianina (mg/mL)	Grau de pureza do extrato	Rendimento (%)
Acetato pH 5,0 (28°C)	7,001	4,53	29,17
Acetato pH 5,0 (24°C)	3,720	2,65	15,50
Fosfato pH 7,0 (24°C)	2,032	1,96	8,46
Fosfato pH 7,0 (28°C)	1,776	1,31	7,40

Estudos realizados por HANNA; EL-BAKY (2003) demonstraram que a melhor forma de se produzir ficocianina é cultivar a microalga *S. platensis* a 25°C, em meio alcalino e com iluminação constante. Por outro lado, vários fatores podem influenciar na extração da ficocianina, sendo o tipo de solvente utilizado, um dos mais importantes (ABALDE et al., 1998; REIS et al., 1998).

A variação da temperatura de cultivo de *Spirulina*, de 30 para 40°C, promoveu um decréscimo de 58,6% para 45,0% do conteúdo de proteínas. Por

outro lado, o conteúdo de carboidratos aumentou de 29,9% para 38,3% e o de lipídios totais de 7,4% para 11,5% (TOMASELLI et al., 1993).

No presente trabalho, ficou evidente que tanto o tampão de extração quanto a temperatura de cultivo são importantes para a otimização do rendimento em extratos de ficocianinas.

Estes resultados foram superiores aos relatados por ABALDE et al. (1998) que obtiveram uma concentração de $27 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ficocianina a partir da microalga *Synechococcus* sp e aos obtidos por MINKOVA et al. (2003) que, ao extraírem ficocianina da biomassa fresca de *Spirulina fusiformis*, obtiveram uma concentração de $1,28 \text{ mg.mL}^{-1}$. Por outro lado, os resultados obtidos neste trabalho com tampão fosfato foram inferiores aos relatados por SILVEIRA et al (*in press*), que obtiveram uma concentração de $4,20 \text{ mg.mL}^{-1}$ após a extração de ficocianina de *S. platensis*, utilizando tampão fosfato 0,01 M, pH 7,0. No entanto, quando os autores utilizaram tampão acetato de sódio 0,01 M, pH 5,0, obtiveram apenas uma concentração de $1,84 \text{ mg.mL}^{-1}$, resultado inferior ao obtido neste trabalho (Tabela 1).

3.3. Cromatografia em DEAE-celulose dos extratos brutos de ficocianinas obtidos com diferentes tampões e em diferentes condições de cultivo

A cromatografia feita em coluna DEAE-celulose preparada com o extrato bruto obtido de *S. platensis* cultivada na temperatura de 28°C apresentou diferenças na quantidade de pigmentos quando extraídos com diferentes tampões.

A maior quantidade de pigmentos (c-ficocianina + aloficocianina) foi encontrada na fração eluída com 0,5 M de NaCl (F1) a partir da extração realizada com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 (Figura 3). No caso da extração realizada com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0, a maior quantidade desses pigmentos também foi eluída com 0,5 M de NaCl (F1), no entanto foi 43,8% menor (Figura 4).

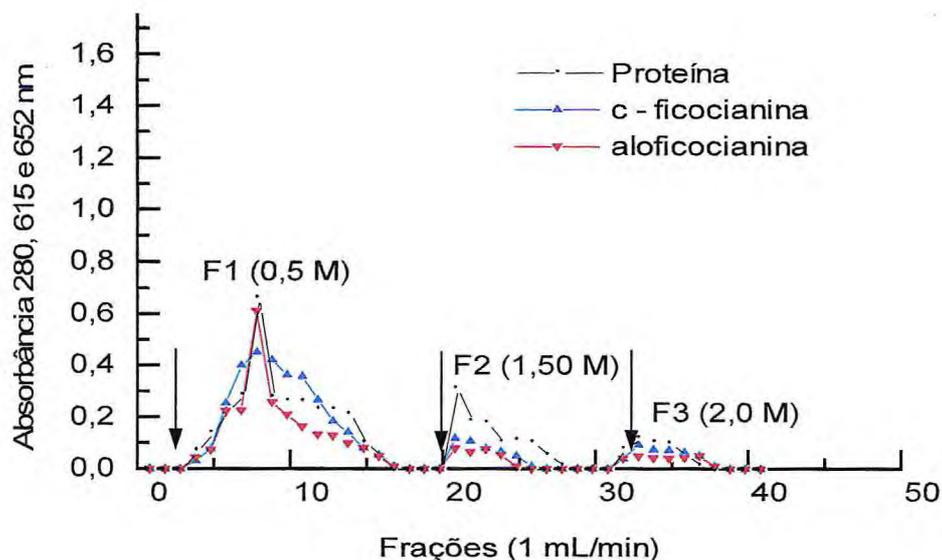
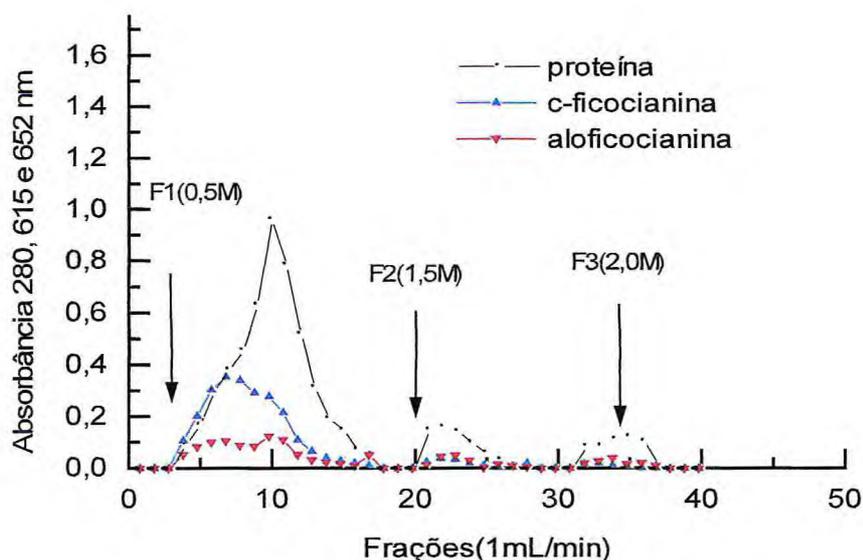


Figura 3. Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose do extrato bruto obtido de *Spirulina platensis* com solução tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, quando a microalga foi cultivada na temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob iluminação constante.



Figura

4.

Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose do extrato bruto obtido de *Spirulina platensis* com solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0, quando a microalga foi cultivada na temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob iluminação constante.

A cromatografia em coluna DEAE-celulose preparada com o extrato bruto obtido *S. platensis* cultivada na temperatura de 24°C também apresentou diferenças na quantidade de pigmentos, quando extraídos com diferentes tampões. Mais uma vez a maior quantidade de pigmentos (c-ficocianina + aloficocianina) foi encontrada na fração eluída com 0,5 M de NaCl (F1) a partir da extração realizada com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 (Figura 5).

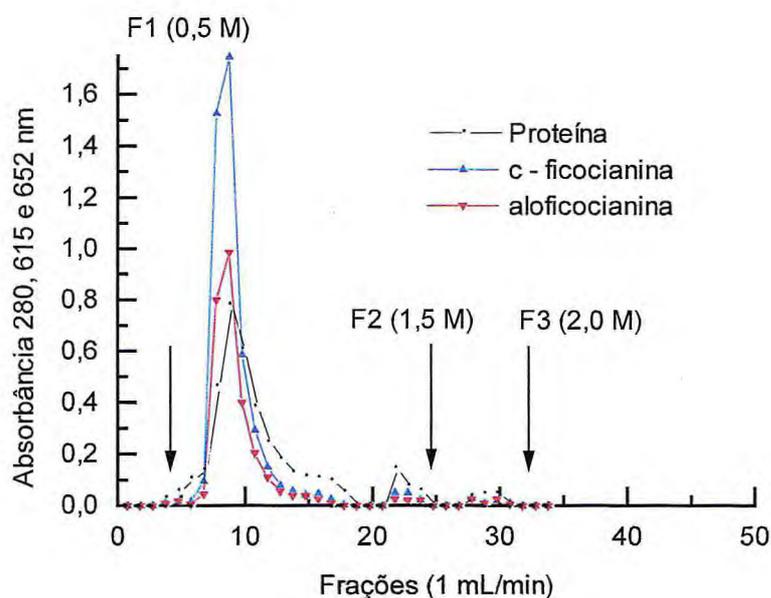


Figura 5.

Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-celulose do extrato bruto obtido de *Spirulina platensis* com solução tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0, quando a microalga foi cultivada na temperatura de 24°C \pm 2°C, sob um fotoperíodo de 16 h de claro e 8 h de escuro.

No caso da extração realizada com tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0, a maior quantidade desses pigmentos também foi eluída com 0,5 M de NaCl (F1), no entanto foi 21,2% menor (Figura 6).

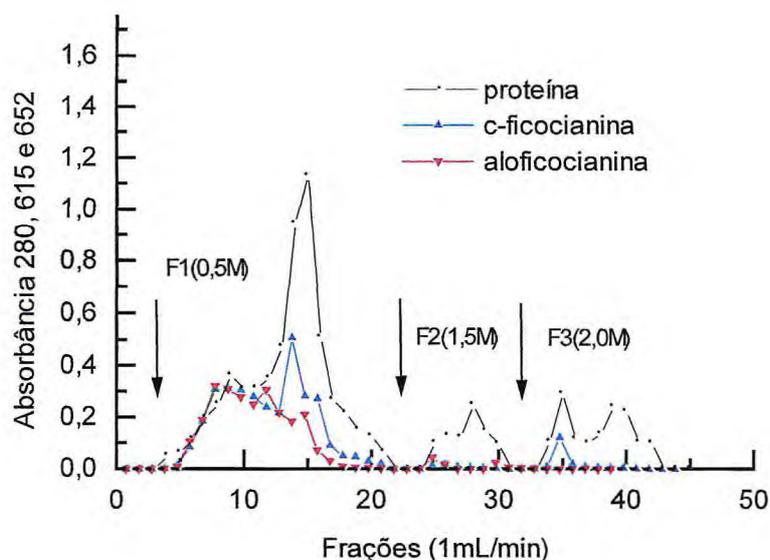


Figura 6. Cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-celulose do extrato bruto obtido de *Spirulina platensis* com solução tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0, quando a microalga foi cultivada na temperatura de $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob um fotoperíodo de 16 h de claro e 8 h de escuro.

Dessa forma, o tipo de tampão utilizado também foi importante na quantidade de pigmentos eluídos no fracionamento do extrato bruto de ficocianinas, com o tampão acetato de sódio demonstrando ser o melhor para a extração de ficocianina, independente das condições de cultivo da microalga *S. platensis*.

4. CONCLUSÃO

Com a realização deste trabalho foi possível concluir que o cultivo de *S. platensis* na temperatura de 24°C com fotoperíodo de 16 h de claro e 8 h de escuro apresentou crescimento mais lento, mas uma maior quantidade de pigmentos purificados foi obtida pela extração com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0. Dessa forma, tanto as condições de cultivo quanto o tampão utilizado na extração são importantes para a produção das ficocianinas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALDE, J.; BETANCOURT, L., TORRES, E.; CID, A.; BARWELL, C. Purification and characterization of phycocyanin from marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. **Plant Science**, Clare, v.136, n.1, p.109-120, Aug 1998.

ARAD, S.M.; YARON, A. Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v.3, p.92–97, 1992.

ARMSTRONG, G.A. Genetics of eubacterial carotenoid biosynthesis: a colorful tale. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 51, p. 629-659, 1997.

ARMSTRONG, G.A.; HEARST, J.E. Carotenoids 2. Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. **FASEB Journal**, Bethesda, v.10, n.2, p.228-237, Feb 1996.

ASTORG, P. Food carotenoids and cancer prevention: an overview of current research. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v.8, n.12, p.406-413, Dec 1997.

BELAY, A. Mass culture of *Spirulina* in outdoors. The Earthrise Farms experience. In: ***Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-Biology and Biotechnology***. VONSHAK, A. (ed.). London: Taylor & Francis. 254p. 1997. pp.131-158.

BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v.5, n.2, p.235-241, Apr 1993.

BENEDETTI, S.; BENEVENUTI, F.; PAGLIARANI, S.; FRANCOGLI, S.; SCOGLIO.; CANESTRARI, F. Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. **Life Sciences**, Oxford, v.75, n.19, p.2353-2362, Sep 2004.

BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **Journal of Cell Biology**, New York, v.58, n.2, p.419-435, 1973.

BERMEJO, R.; ACIEN, F.G.; IBANEZ, M.J.; FERNANDEZ, J.M.; MOLINA, E.; ALVAPEZ-PEZ, J.M. Preparative purification of B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by expanded-bed adsorption chromatography. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v.720, n.1-2, p.317-325, Jun 2003.

- BHAT, V.B.; MADYASTHA, K.M. C-phycoyanin: a potent peroxy radical scavenger *in vivo* and *in vitro*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v.275, n.1, p.20-25, Aug 2000.
- BOUSSIBA, S.; RICHMOND, A.E. Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. **Archives of Microbiology**, New York, v.120, n.2, p.155-159, 1979.
- COHEN, Z.; REUNGJITCHACHAWALI, M.; SIANGDUNG, W.; TANTICHAROEN, M. Production and partial purification of γ -linolenic acid and some pigments from *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v.5, n.1, p.109-115, Feb 1993.
- COZZA, K. L. ***Spirulina platensis* em meios naturais e sintéticos: fatores nutricionais e custos experimentais**. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos. Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, 1999.
- DAINIPPON INK AND CHEMICALS. Lina blue A (**Natural blue colorant of *Spirulina* origin**). Technical information. Tokyo, Japan: Dainippon Ink and Chemicals, 1985.
- DESMORIEUX, H., DECAEN, N. Convective drying of *Spirulina* in thin layer. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.77, n.1, p.64-70, Nov 2006.
- GANTT, E. Phycobilisomes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.32, p.327-347, 1981.
- GOUVEIA, L.; EMPIS, J. Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: effect of storage conditions. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.4, n.2, p.227-233, Jun 2003.
- HANNA, H.; EL-BAKY A.B.B. Over production of phycocyanin pigment in blue green alga *Spirulina* sp. and its inhibitory effect on growth of ehrlich ascities carcinoma cells. **Journal of Medical Science**, v.3, n.4, p.314-324, Jul-Aug 2003.
- HENRIKSON, R. **Microalga *Spirulina*: superalimento del futuro**. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, 1994.
- IJIMA, N.; SHIMAMATSU, H. (inventors; Dainippon Ink and Chemicals assignee). Antitumor agent and method of treatment therewith. **US patent pending. Ref P1150-726-A82679**, 15 Sep 1982.
- KRONIK, M.N.; GROSSMAN, P.D. Immunoassay techniques with fluorescent phycobiliprotein conjugates. **Clinical Chemistry**, Washington, v.29, n.9, p.1582-1586, 1983.

LIANG, S.Z.; LIU, X.M.; CHEN, F.; CHEN, Z.J. Current microalgal health food R & D activities in China. **Hydrobiologia**, Dordrecht, v.512, n.1-3, p.45-48, Jan 2004.

MINKOVA, K.M.; TCHERNOV, A.A.; TCHORBADJIEVA, M.I.; FOURNADJIEVA, S.T.; ANTOVA, R.E.; BUSHEVA, M.C. Purification of c-phycoyanin from *Spirulina* (*Arthospira*) *fusiformis*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.102, n.1, p.55-59, Apr 2003.

MIRANDA, M.S.; CINTRA, R.G.; BARROS, S.B.M.; MANCINI, J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.31, n.8, p.1075-1079, Aug 1998.

MORIST, A.; MONTESINOS, J.L.; CUSIDO, J.A.; GODIA, F. Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. **Process Biochemistry**, Oxford, v.37, n.5, p.535-547, Dec 2001.

NAYLOR, C.; BRADLEY, M.C.; CALOW, P. Freeze-dried *Chorella vulgaris* as food for *Daphnia magna* Straus in toxicity testing. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v.25, n.2, p.166-172, Apr 1993.

OLSON, J.A.; KRINSKY, N.I. The colorful fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators. **FASEB Journal**, Bethesda, v.9, n.15, p.1547-1550, Dec 1995.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: Editora Makron Books, 2 edição, v.1, cap.6, p.179-182, 1996.

PELIZER, L.H.; DANESI, E.D.G.; RANGEL, C.D.; SASSANO, C.E.N.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S.; MORAES, I.O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.56, n.4, p.371-375, Mar 2003.

PIÑERO-ESTRADA, J.E.; BERMEJO-BESCÓS, P.; VILLAR DEL FRESNO, A.M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **II Farmaco**, v.56, n.5-7, p.497-500, Jul 2001.

QURESHI, M.A.; ALI, R.A. *Spirulina platensis* exposure enhances macrophage phagocytic function in cats. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, New York, v.18, n.3, p.457-463, 1996.

RADMER, R.J.; PARKER, B.C. Commercial applications of algae: opportunities and constraints. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v.6, n.2, p.93-98, Apr 1994.

RAMAMOORTHY, A.; PREMAKUMARI, S. Effect of supplementation of *Spirulina* on hypercholesterolemic patients. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v.33, n.2, p.124-127, Mar-Apr 1996.

REDDY, M.C.; SUBLIHASHINI, J.; MAHIPAL, S.V.K.; BHAT, V.B.; REDDY, P.S.; KIRANMI, G.; MADYASTHA, K.M.; REDDANNA, P. C-phycoyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v.304, n.2, p.385-392, May 2003.

REIS, A.; MENDES, A.; LOBO-FERNANDES, H.; EMPIS, J.A.; NOVAIS, J.M., Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp., **Bioresource Technology**, Oxford, v.66, n.3, p.181-187, Dec 1998.

ROSALES, N.; ORTEGA, J.; MORA, R.; MORALES, E. Influence of salinity on the growth and biochemical composition of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. **Ciências Marinas**, Baja California, v.31, n.2, p. 349-355, Jun 2005.

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**, Oxford, v.34, n.8, p. 795-801, Oct 1999.

SCARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações**. São Paulo, SP: Editora e Livraria Varela, 1996.

SILVEIRA, S.T.; BURKERT, J.F.M.; COSTA, J.A.V.; BURKERT, C.A.V.; KALIL, S.J. Otimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bioresource Technology**, *in press*.

SOLETTI, D.; BINAGHI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J.C.M.; CONVERTI, A. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. **Aquaculture**, Amsterdam, v.243, n.1-4, p.217-224, Jan 2005.

TANTICHAROEN, M.; REUNGJITCHACHAWALI, M.; BOONAG, B.; VONKTAVEESUK, P.; VONSHAK, A.; COHEN, Z. Optimization of γ -linolenic acid (GLA) production in *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v.6, n.3, p.295-300, Jun 1994.

TOMASELLI, L.; GIOVANNETTI, L.; TORZILLO, G. Physiology of stress response in *Spirulina* spp. In: DOUMENGE, F.; DURAND-CHASTEL, H. & TOULEMONT, A. (eds). **Spiruline Algue de Vie**. Bulletin de L'Institut Océanographique, Monaco, n.12, p. 65-75, 1993.

VONSHAK, A. *Spirulina*: growth, physiology and biochemistry. In: ***Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology***.
VONSHAK, A. (ed.). London: Taylor & Francis. 254p. 1997. pp. 43-66.