

C-FICOCIANINA INCORPORADA À NANOFIBRAS: DETERMINAÇÃO DE TERMOESTABILIDADE

A. R. C. BRAGA¹, F. S. FIGUEIRA¹, J. T. SILVEIRA¹, P. B. M. SILVA¹, M. G. MORAIS¹, J. A. V. COSTA¹, S. J. KALIL¹

¹ Universidade Federal de Rio Grande, Escola de Química e Alimentos
E-mail para contato: annarafaela@gmail.com

RESUMO – A C-ficocianina (C-FC) possui características importantes como: ser uma ficobiliproteína natural, de cor azul única, boa solubilidade em água, alta estabilidade na faixa de pH 5-7,5, fluorescência e propriedades terapêuticas, como atividades antioxidante e anti-inflamatória com aplicação em diagnósticos. É um pigmento natural, e pode ser utilizado na indústria de alimentos, como corante, em sucos e gomas e na indústria de cosméticos, substituindo corantes sintéticos. A incorporação de C-FC em nanofibras é extremamente promissora para sua aplicação em diferentes áreas da biotecnologia. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi determinar a cinética de degradação térmica da C-FC purificada incorporada à nanofibras. A C-ficocianina foi submetida a diferentes temperaturas (50-75 °C) e os valores de constantes de desnaturação térmica (K_d) e valores de meia-vida ($t_{1/2}$) para a ficobiliproteína em cada condição foram determinados. Os valores de meia-vida variaram entre 169,1 e 7701,6 s.

1. INTRODUÇÃO

As ficobiliproteínas são pigmentos captadores de energia luminosa, presentes em cianobactérias, responsáveis por cerca de 50% da captação de luz desses micro-organismos. Uma das ficobiliproteínas de particular interesse para a indústria de alimentos e cosméticos é a C-ficocianina; devido a sua vantajosa utilização como um corante natural azul nestes setores (Silveira *et al.*, 2007).

Dentre as fontes existentes deste biocorante, a cianobactéria *Spirulina platensis* recebe destaque, uma vez que a C-ficocianina pode constituir até 20% em peso seco das proteínas totais deste micro-organismo. Estudos demonstram que a C-ficocianina, além de ser um biocorante natural, possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatória e antitumoral, além de agir como estimulante do sistema imunológico aumentando assim, a contagem de leucócitos totais, cuja principal função é manter a saúde dos órgãos do corpo, proteger contra o câncer e úlceras (Gantar *et al.*, 2012; Ichimura *et al.*, 2013).

A fim de aumentar a utilização e proporcionar novas possibilidades de aplicação deste biocomposto em diferentes áreas, a incorporação de C-FC em nanofibras é potencialmente promissora. Em relação à formação de nanofibras existem diversas técnicas utilizadas para a elaboração das mesmas, no entanto, “*electrospinning*” é uma técnica que se destaca pois a mesma

apresenta uma abordagem simples formando nanofibras de comprimento excepcionalmente longo, com diâmetro uniforme e com composições diversificadas (Uyar e Besenbacher, 2009).

Para avaliar as características da C-FC incorporada a nanofibras, em termos de estabilidade térmica, a constante de reação de desnaturação (K_d) e a meia-vida ($t_{1/2}$) são parâmetros importantes, na literatura consultada até o presente momento, não há trabalhos que avaliem essas propriedades em nanofibras contendo C-FC. Portanto, nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi determinar os parâmetros da estabilidade térmica da C-FC purificada incorporada à nanofibras.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Biomassa, Extração e Quantificação de C-ficocianina

A cianobactéria *Spirulina platensis* LEB 52 foi cultivada e cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande. A partir da biomassa, C-ficocianina foi extraída de acordo com descrito por Moraes *et al.*, 2010. Após a extração, o caldo bruto contendo células foi centrifugado e ajustado o pH para 6,5. A concentração de C-ficocianina foi calculada utilizando a Equação 1, descrita por Bennett e Bogorad (1973):

$$C - PC = \frac{(OD_{620} - 4,74 \times (OD_{652}))}{5,34} \quad (1)$$

Onde, C-FC é a concentração de C-ficocianina e A₆₂₀ e A₆₅₂ são as absorvâncias em 620 e 652 nm, respectivamente.

2.2. Purificação por Ultrafiltração

A ultrafiltração foi realizada em célula laboratorial do tipo convencional, de volume útil de 200 mL, agitada por uma barra magnética suspensa, para simulação do escoamento em fluxo cruzado. Foi utilizada membrana de retenção nominal de 50 kDa de polietersulfona, temperatura de 25°C, pressão de 1,0 kgf/cm² e pH de 6,5. Foram utilizados 6 ciclos de diafiltração (ciclos de recarga de tampão na célula de ultrafiltração com tampão fosfato de sódio, pH 6,5), previamente a concentração do extrato. Foi alimentado ao sistema extrato clarificado de C-FC (Figueira, 2014).

2.3. Formação de Nanofibras

No processo de *electrospinning* as soluções foram injetadas através de capilar com diâmetro de 0,45 mm. O eletrodo de polaridade positiva foi conectado a extremidade do capilar e o isolamento foi conectado ao coletor de alumínio. A distância utilizada entre a extremidade do capilar e o coletor foi de 125 mm. O potencial elétrico aplicado foi de 24,3 kV. A vazão da solução foi de 2,5 µL.min⁻¹, controlada através de bomba ligada ao injetor (Figueira, 2014). Todos os experimentos foram conduzidos em temperatura ambiente e com umidade relativa do ar entre 50 e 60%.

2.4. Parâmetros de Estabilidade Térmica de C-ficocianina

Avaliou-se a cinética de degradação térmica de C-FC incorporada à nanofibras nas temperaturas de 50, 55, 60, 65, 70 e 75 ° C, de modo a obter K_d e $t_{1/2}$ para cada condição proposta. As amostras foram removidas periodicamente até que metade da concentração inicial de C-FC fosse atingida. O K_d (s^{-1}) de C-FC foi estimado pela regressão dos dados experimentais pelo tempo, assumindo uma cinética de reação de primeira ordem, K_d foi determinado de acordo com a Equação 2:

$$\frac{dC_F}{dt} = -K_d C \quad (2)$$

Onde C_F é a concentração de C-FC ($mg.mL^{-1}$), t é tempo (s) e K_d a constante de degradação térmica (s^{-1}). Os valores de meia-vida foram determinados de acordo com a Equação 3:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_d} \quad (3)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As nanofibras de óxido de polietileno incorporadas de C-ficocianina, obtidas neste trabalho, foram primeiramente desenvolvidas por Figueira (2014). Na Figura 1 é possível observar, através de microscopia óptica utilizando campo escuro, as nanofibras formadas nas quais se obteve um diâmetro médio de 542,1 nm e se mostraram homogêneas, sem presença de gotas em sua estrutura.

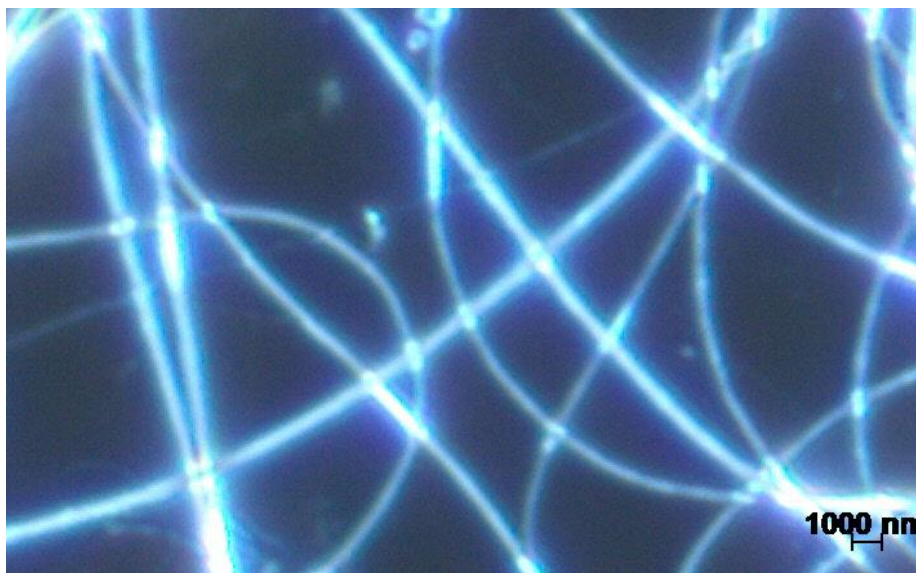


Figura 1: Nanofibras de óxido de polietileno contendo C-ficocianina obtidas a partir do processo de *electrospinning*

Diversos autores têm estudado a aplicação de modelos de primeira ordem para descrever a termodegradação de produtos coloridos. De acordo com Ávila e Silva (1999) e Corzo *et al.* (2006) a degradação térmica desses produtos podem ser descritas pelo modelo de primeira ordem. No presente trabalho, usando as equações 2 e 3, os valores de K_d e $t_{1/2}$ foram determinados para as diferentes temperaturas a que as nanofibras foram submetidas, esses resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Constante cinética de desnaturação (K_d) e seus respectivos coeficientes de correlação (r^2), valores de meia-vida ($t_{1/2}$) de C-FC incorporada em nanofibras para cada temperatura estudada

Temperatura (°C)	K_d (s ⁻¹)	r^2	$t_{1/2}$ (s)
50	0,00009	0,99	7701,6
55	0,0001	0,93	6931,5
60	0,0006	0,94	1155,2
65	0,0017	0,96	407,7
70	0,0035	0,96	198,0
75	0,0041	0,96	169,1

Ao avaliarmos a Tabela 1, pode-se observar que nas temperaturas de 50 e 55°C, as meia-vidas são superiores a 1 hora. A diminuição da meia-vida (de 7701,6 para 6931,5 s) quando aumentou-se a temperatura de análise de 50 para 55°C é bem mais suave do que quando altera-se a temperatura de 55 para 60°C (de 6931,5 para 1155,2 s). Esse comportamento também foi reportado por outros autores que estudaram a estabilidade da C-FC em solução e os mesmos explicam que essas diferenças ocorrem porque a desnaturação térmica desse bioproduto ocorre em diferentes estágios.

Chaiklahan *et al.* (2012) avaliaram a estabilidade de ficocianina de grau alimentar extraída de *Spirulina* sp. e identificaram três fases de degradação diferentes. Segundo estes autores, na primeira fase (26-43 °C), as soluções de ficocianina mostraram uma lenta taxa de degradação. Durante a segunda fase, a taxa de degradação aumentou drasticamente à medida que a temperatura de incubação foi aumentada de 47-64 °C. Novos aumentos na taxa de degradação foram mínimos durante a terceira fase, quando a temperatura foi maior que 64° C.

Verificou-se que a degradação da fração proteica da C-ficocianina incorporada em nanofibras seguiu um modelo de cinética de primeira ordem, esse fato pode ser comprovado pelos elevados coeficientes de correlações (de 0,93 a 0,99) obtidos para a determinação da constante cinética de desnaturação. Verificou-se também que a C-ficocianina foi desnaturada mais rapidamente a temperaturas mais elevadas, desde que os valores de meia-vida (tempo necessário para que a concentração inicial de C-FC seja reduzida para metade) diminuiu à medida que aumentou-se a temperatura de trabalho. O mesmo foi observado por Koca *et al.* (2007) para a clorofila de grãos de ervilha, em que a meia-vida do pigmento foi reduzida com o aumento da temperatura de trabalho. Antelo *et al.* (2008) também verificaram o mesmo comportamento para a cinética de degradação térmica do extrato bruto aquoso de C-ficocianina de *S. platensis*.

4. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos pode-se evidenciar a grande potencialidade de aplicação de C-ficocianina incorporada a nanofibras. As propriedades determinadas demonstram que nas temperaturas de 50 e 55 °C as nanofibras contendo C-FC permanecem os valores de meia-vida são maiores que uma hora.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro a este trabalho.

6. REFERÊNCIAS

ANTELO, F. S.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochem. Eng. J.*, v. 41, p. 43-47, 2008.

ÁVILA, I. M. L. B.; SILVA, C. L. M. Modelling kinetics of thermal degradation of colour in peach puree. *J. Food Eng.*, v. 39, p. 161-166, 1999.

BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *J. Cell Biol.*, v. 58, p. 419-435, 1973.

CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; BUNNAG, B. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochem.*, v. 47, p. 659-664, 2012.

CORZO, O.; BRACHO, N.; MARJAL, J. Color change kinetics of sardine sheets during vacuum pulse osmotic dehydration. *J. Food Eng.*, v. 75, p. 21-26, 2006.

FIGUERIA, F. S. Purificação de C-ficocianina e sua incorporação em nanofibras. Tese de Doutorado (Universidade Federal do Rio Grande), 2014.

GANTAR, M.; SIMOVI-Ç, D.; DJILAS, S.; GONZALEZ, W. W.; MIKSOVSKA, J. Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycocyanin from *Limnithrix* sp. strain 37-2-1. *J. Biotechnol.*, v. 159, p. 21-26, 2012.

ICHIMURA, M.; KATO, S.; TSUNEYAMA, K.; MATSUTAKE, S.; KAMOGAWA, M.; HIRAO, E.; MIYATA, A.; MORI, S.; YAMAGUCHI, N.; SURUGA, K.; OMAGARI, K. Phycocyanin prevents hypertension and low serum adiponectin level in a rat model of metabolic syndrome. *Nutr. Res.*, v. 33, p. 397-405, 2013.

KOCA, N.; KARADENIZ, F.; BURDURLU, H. S. Effect of pH on chlorophyll degradation and colour loss in blanched green peas. *Food Chem.*, v. 100, p. 609-615, 2007.

MORAES, C. C.; BURKERT, J. F.; KALIL, S. J. C-Phycocyanin extraction process for large-scale

use. *J. Food Biochem.*, v. 34, 2010.

SILVEIRA, S. T.; BURKERT, J. F. M.; COSTA, J. A. V.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresour. Technol.*, v. 98, p. 1629-1634, 2007.

UYAR, T.; BESENBACHER, F. Electrospinning of cyclodextrin functionalized polyethylene oxide (PEO) nanofibers. *Eur. Polym. J.*, v. 45, p. 1032-1037, 2009.