

CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA DE C-FICOCIANINA PURIFICADA

A. R. C. BRAGA¹, F. S. FIGUEIRA¹, J. T. SILVEIRA¹, J. G. GETTENS¹, P. B. M. SILVA¹,
S. J. KALIL¹

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

RESUMO – C-ficocianina (C-FC) é um corante natural azul encontrado em certas cianobactérias, que pode ser utilizado em fármacos, alimentos e cosméticos, desde que possua um grau de pureza adequado. Os processos de purificação utilizando ultrafiltração e cromatografia de troca iônica são utilizados para obtenção de C-FC com grau alimentício (pureza maior que 0,7) e analítico (pureza superior a 4,0). Um problema que tem sido evidenciado no uso da C-ficocianina seria sua excessiva descoloração durante o processamento térmico o que pode comprometer sua comercialização. O objetivo deste trabalho foi comparar a cinética de degradação térmica da C-FC de grau alimentar e analítico. C-FC foi submetida a diferentes temperaturas (50 - 75 °C) e os valores de K_d e meias-vidas ($t_{1/2}$) para C-FC foram determinados. Os valores de meia-vida variaram entre 49,5-11552,5 s e 7,9-34657,4 s para C-FC de grau alimentar e analítico, respectivamente, diminuindo com o aumento da temperatura de análise.

1. INTRODUÇÃO

Principal componente da família das ficobiliproteínas, C-ficocianina (Patil e Raghavarao, 2007) é um pigmento acessório fotossintético azul que pode ser utilizado como corante em alimentos e em cosméticos, mas também apresenta muitas propriedades que tornam seu uso adequado na indústria médica e farmacêutica (Soni et al., 2006). C-ficocianina (C-FC) é encontrada geralmente no interior das células de cianobactérias como as do gênero *Spirulina* (Arthrospira). Quando purificada, C-ficocianina apresenta ação antioxidante frente aos radicais hidroxílicos e radicais peróxidos. Tem sido também avaliada sua capacidade como agente antitumoral e anti-inflamatório. Estudos têm mostrado que a C-ficocianina age como um estimulante do sistema imunológico, aumentando a contagem de leucócitos, cuja função principal é manter a saúde dos órgãos do corpo, proteger contra o câncer e úlceras (Gantar et al., 2012; Ichimura et al., 2013).

A razão de pureza é dada pela relação entre a absorção máxima visível e a absorção a 280, quando esta é superior a 4,0, ficocianina apresenta grau analítico, no entanto, quando este valor é superior a 0,7, este pigmento pode ser utilizado como um biocorante na indústria de alimentos e cosméticos (Abalde et al., 1998; Patil et al., 2006).

A bioseparação de proteínas, que se refere à recuperação e purificação de produtos protéicos,

oriundos de várias correntes biológicas de obtenção, é uma importante operação unitária na indústria de alimentos, farmacêutica e biotecnológica. Entre os métodos de purificação de proteínas, métodos de separação por membranas destacam-se por serem de fácil ampliação de escala e relativa facilidade de operação. Para a purificação de C-ficocianina, a técnica de ultrafiltração pode ser utilizada com grande sucesso (Figueira, 2014).

A tendência atual de usar pigmentos naturais tornou C-FC um bioproduto atraente. Na Europa, a busca de corantes naturais é crescente desde os corantes artificiais são geralmente considerado tóxico ou de alguma forma perigosa. A cor é um atributo importante relacionado com o apelo visual e com a qualidade produtos de nutritivos. Assim excessiva perda de cor durante o processamento térmico compromete comercialização. Os parâmetros cinéticos, tais como constante de desnaturação térmica e meia-vida podem fornecer informações importantes na alteração da qualidade de um alimento que ocorrem durante o processamento térmico (Antelo et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi comparar a cinética de degradação térmica da C-FC de grau alimentar e analítico, avaliando K_d e $t_{1/2}$ em diferentes temperaturas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Biomassa, Extração e Quantificação de C-ficocianina

A cianobactéria foi cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG. Ao término do cultivo, a biomassa foi recuperada por filtração, seca e congelada. A biomassa foi moída conforme Moraes *et al.* (2010).

A extração da C-ficocianina a partir da biomassa seca e moída foi realizada de acordo com Moraes *et al.* (2010), que determinaram uma proporção de 0,16 g de biomassa em pó por mL de água, utilizada como solvente extrator, deixado em repouso por 1 h em temperatura ambiente. Foi calculada a concentração de C-ficocianina utilizando a Equação 1, descrita por Bennett e Bogorad (1973):

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

2.2. Purificação de C-ficocianina

Purificação até grau alimentar: Foi realizada por ultrafiltração 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).

Purificação até grau analítico: Foi realizada primeiramente purificação utilizando precipitação, onde a C-FC foi fracionada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido à temperatura ambiente, com 0-20%/20-50% de saturação. Sulfato de amônio foi adicionado à solução contendo C-FC, até 20% de saturação. A solução foi mantida durante a noite e, em seguida, centrifugada. O precipitado foi descartado e o sulfato de amônio adicionado ao sobrenadante até 50% de saturação. A solução foi mantida durante a noite e, em seguida, centrifugada. O precipitado foi dissolvido em tampão fosfato de sódio 0,05 M e pH 7,0, com uma relação volume inicial/volume final de 0,52, e dialisado contra o mesmo tampão conforme Silva *et al.* (2009). Após, foi realizada a etapa de purificação por cromatografia de troca iônica em leito fixo. O extrato de C-ficocianina obtido na etapa de precipitação foi alimentado em uma coluna Q-Sepharose Fast Flow previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,025 M, pH 7,5 a 40 cm/h (Silveira et al., 2008). As proteínas não adsorvidas foram removidas por lavagem com o mesmo tampão de equilíbrio. A eluição foi efetuada utilizando um gradiente linear de 0-1 M de NaCl com um gradiente de volume de 50 mL em tampão Tris-HCl 0,025 M e pH 5,0 (Moraes et al., 2009).

2.3. Determinação da Cinética de Degradação 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

Amostras de C-ficocianina (C-FC) foram submetidas a diferentes temperaturas (50, 55, 60, 65, 70 e 75 °C), para a obtenção da constante de desnaturação térmica (K_d) e das meia-vidas ($t_{1/2}$) sob cada condição proposta (C-FC purificada pela técnica de ultrafiltração, com pureza de 0,95 e C-FC

purificada por cromatografia de troca iônica, com pureza de 4,0).

De acordo com a literatura consultada, diversos pesquisadores tem estudado o uso do modelo de primeira ordem para descrever a degradação de cor em produtos alimentícios (Antelo *et al.*, 2008; Ávila e Silva, 1999; Corzo *et al.*, 2006). Usando as equações 2 e 3, o K_d e a meia-vida foram determinados e estão apresentados na Tabela 1. Verificou-se que a degradação da ficocianina ou a degradação fracção de proteína desse biocorante, seguiu um modelo de cinética de primeira ordem, como mostrado pelas elevadas correlações de entre 0,96 e 0,99 obtidos para a determinação constante cinética.

Verificou-se também que a C-FC foi desnaturada mais rapidamente a temperaturas mais elevadas, uma vez que os valores de meia-vida (o tempo necessário para a ficocianina inicial concentração de ser reduzida para metade) diminuiu à medida que aumentou a temperatura de trabalho. As meias-vidas, considerando a C-ficocianina de grau alimentar, variaram de 49,5 a 9902,1 s, enquanto que a C-FC de grau analítico apresentou valores de meias-vidas entre 7,9-34657,4.

Tabela 1 – Constante de degradação térmica (K_d), respectivo coeficiente de correlação (r^2) e meias-vidas ($t_{1/2}$) de C-FC de grau alimentar e de grau analítico.

Temperatura (°C)	C-FC grau alimentar			C-FC grau analítico		
	K_d (s ⁻¹)	r^2	$t_{1/2}$ (s)	K_d (s ⁻¹)	r^2	$t_{1/2}$ (s)
50	0,00007	0,98	9902,1	0,00002	0,97	34657,4
55	0,0002	0,99	3465,7	0,00008	0,99	8664,3
60	0,0010	0,98	693,1	0,0019	0,97	364,8
65	0,0036	0,98	192,5	0,0037	0,98	187,3
70	0,011	0,98	63,0	0,047	0,96	14,7
75	0,014	0,98	49,5	0,088	0,99	7,9

Através da Tabela 1 pode-se ainda observar que nas duas temperaturas mais baixas (50 e 55 °C) a meia-vida da C-ficocianina de grau analítico é bem maior do que a C-FC de grau alimentar, no entanto, quando se utiliza temperaturas mais altas a C-FC de grau alimentar é mais estável termicamente.

A C-ficocianina de grau alimentar apresenta maior número de contaminantes que dependendo da temperatura trabalhada podem contribuir para a desnaturação ou proteger o composto alvo. Caso estejam presentes proteases, estas podem ter uma atuação catalítica na hidrólise da parte protéica da C-ficocianina, com seu efeito mais pronunciado nas temperaturas menores, 50-55 °C, porém em temperaturas elevadas estas enzimas não atuam, não ocasionando a mesma desnaturação, deste modo a C-ficocianina de grau analítico apresentaria maiores valores de $t_{1/2}$ nestas temperaturas. Já em temperaturas mais elevadas, os componentes presentes podem ter um efeito protetor na molécula alvo, de modo que a C-ficocianina de grau alimentar teria maior estabilidade na faixa de 60 a 65 °C.

4. CONCLUSÕES

As meia-vidas variaram entre 49,5-11552,5 s e 7,9-34657,4 s para C-FC de grau alimentar e analítico, respectivamente, diminuindo com o aumento da temperatura de análise. Dependendo da temperatura de processo ao qual esse biocorante será submetido, pode-se escolher o melhor processo de purificação para aplicação da C-FC em um determinado produto.

5. AGRADECIMENTOS

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

6. REFERÊNCIAS

- ABALDE, J.; BETANCOURT, L.; TORRES, E.; CID, A.; BARWELL, C. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. *Plant Sci.*, v. 136, p. 109-120, 1998.
- 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.
- 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.
- FIGUEIRA, 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.
- MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Strategy for a protein purification design using C-phycocyanin

extract. *Bioresour. Technol.*, v. 100, p. 5312-5317, 2009.

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.

PATIL, G.; CHETHANA, S.; SRIDEVI, A. S.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Method to obtain C-phycocyanin of high purity. *J. Chromatogr. A*, v. 1127, p. 76-81, 2006.

PATIL, G.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycocyanin. *Biochem. Eng. J.*, v. 34, p. 156-164, 2007.

REDDY, M. C.; SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S. V. K.; BHAT, V. B.; SRINIVAS REDDY, P.; KIRANMAI, G.; MADYASTHA, K. M.; REDDANNA, P. C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 304, n. 2, p. 385-392, 2003.

SILVA, L. A.; KUHN, K. R.; MORAES, C. C.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Experimental design as a tool for optimization of c-phycocyanin purification by precipitation from *Spirulina platensis*. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 20, p. 5-12, 2009.

SILVEIRA, S. T.; QUINES, L. K. D. M.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Separation of phycocyanin from *Spirulina platensis* using ion exchange chromatography. *Bioproc. Biosyst. Eng.*, v. 31, p. 477-482, 2008.

SONI, B.; KALAVADIA, B.; TRIVEDI, U.; MADAMWAR, D. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata* from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. *Process Biochem.*, v. 41, p. 2017-2023, 2006.