



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

Atividade Antioxidante de Ficocianina Extraída de *Spirulina* Cultivada com LEDs

**Denise da Fontoura Prates¹, Milene Teixeira Barcia¹, Letícia Schneider Fanka¹,
Elisangela Martha Radmann¹, Cristiano Augusto Ballus², Helena Teixeira Godoy² e
Jorge Alberto Vieira Costa¹**

¹Universidade Federal do Rio Grande – Escola de Química e Alimentos
Av. Itália Km 8 Bairro Carreiros – CEP 96203-900 Rio Grande – RS - E-mail:(jorgealbertovc@terra.com.br)

²Universidade Estadual de Campinas – Departamento de Ciência de Alimentos
Rua Monteiro Lobato, 80 – Cidade Universitária Zeferino Vaz – 13083-862 Campinas – SP

RESUMO

Ficocianina é um complexo proteína-pigmento com potencial ação anti-oxidante. A concentração de ficocianina, presente na microalga Spirulina, pode ser aumentada por LEDs de diferentes cores. Diante disso, objetivou-se avaliar o potencial antioxidante de ficocianina obtida do cultivo de Spirulina sp. LEB 18 utilizando LEDs de comprimento de onda na região do vermelho (620-645 nm) em diferentes fotoperíodos. Foram realizados 3 ensaios: (1) 12 h fluorescente: 12 h escuro, (2) 12 h fluorescente: 6 h LED: 6 h escuro e (3) 12 h fluorescente: 12 h LED. A maior concentração de biomassa ($1,82 \text{ g L}^{-1} \pm 0,10$) e atividade antioxidante ($420,09 \pm 19,08 \mu\text{M TE g}^{-1}$) obteve-se com iluminação integral (ensaio 3). No entanto, a maior produção de ficocianina ($153,98 \pm 3,5 \text{ mg g}^{-1}$) obteve-se com iluminação parcial (ensaio 2). Então, evidencia-se que cultivos envolvendo LEDs de comprimento de onda específico podem promover a maximização na produção de biocompostos com atividade biológica in vitro de interesse.

Palavras-chave: Microalga, LEDs, Ficocianina, Antioxidante, ORAC

INTRODUÇÃO

As ficocianinas são um complexo proteína-pigmento de coloração azul intensa, com potencial antioxidante, que se encontram em grandes proporções nas cianobactérias (GANTAR et al., 2012), especialmente nas do gênero *Spirulina* (SILVEIRA et al., 2007). Essas proteínas concentram-se nos ficobilissomas, alojadas nas membranas externas dos tilacóides e participam como pigmentos acessórios nas coletas de luzes, nas reações de fotossíntese (KUDDUS et al., 2013).

A quantidade dos pigmentos acessórios é uma característica inerente a cada espécie microalgal, no entanto pode ser foto-estimulada em cultivos fotoautotróficos. Segundo Markou (2014) a produção de ficocianina por microalgas pode ser conseguida com o uso de luzes de comprimento de onda específico. Os LEDs que são diodos emissores de luz com baixo consumo de energia e apresentam faixa estreita de comprimento de onda (NHUT; NAM, 2010), mostram-se como fontes luminosas promissoras para estudos em cultivos microalgais.

O acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou perda da capacidade para desintoxicar os sistemas biológicos resulta em estresse oxidativo. Posteriormente, essas espécies reativas podem causar danos aos componentes das células, incluindo DNA, frações membranosas,



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

lipídios, proteínas, podendo implicar em doenças, tipo Parkinson, aterosclerose, cancro e Alzheimer (PLEONSIL; SOOGARUN; SUWANWONG, 2013).

O aumento na produção de compostos naturais, que possuem atividade antioxidante e que possam minimizar os possíveis malefícios causados por espécies reativas despertam o interesse da comunidade científica. Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial antioxidante de ficocianina obtida do cultivo de *Spirulina* sp. LEB 18 utilizando LEDs de comprimento de onda na região do vermelho (620-645 nm) em diferentes fotoperíodos.

MATERIAL E MÉTODOS

A microalga utilizada neste estudo foi *Spirulina* sp. LEB 18, pertence ao banco de cepas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

Os cultivos foram conduzidos em fotobiorreatores verticais tubulares de 2 L, com volume útil de 1,8 L, com agitação contínua através da injeção de ar estéril. A concentração inicial de inóculo foi 0,2 g L⁻¹ e o meio de cultivo foi Zarrouk (ZARROUK, 2006). Os cultivos foram realizados em câmara termostata a 30 °C.

Foram realizados 3 ensaios com diferentes condições de fotoperíodo, ensaio 1: *Spirulina* sp. LEB 18 (12 h fluorescente: 12 h escuro), ensaio 2: iluminação parcial de 18 h (12 h fluorescente: 6 h LED vermelho: 6 h escuro) e ensaio 3: iluminação integral de 24 h (12 h fluorescente: 12 h LED vermelho). Sabendo que o dia tem 24 h, as primeiras 12 h nos 3 ensaios foram fornecidas por lâmpadas fluorescentes à 3200 lux. Os ensaios 2 e 3 tiveram seus fotoperíodos incrementados com a iluminação de LEDs, com comprimento de onda específico na cor vermelha, na faixa de 620-645 nm.

A concentração de biomassa (X, g L⁻¹) foi determinada a cada 24 h durante os 10 d de cultivo. Essa determinação foi realizada, a partir das leituras de absorbância a 670 nm em espectrofotômetro, das alíquotas retiradas assepticamente dos cultivos, relacionando-as com prévia curva padrão (SCHIMIDEL et al., 2001). A concentração de biomassa máxima (X_{máx}) definiu-se a partir do maior valor atingido de X (g L⁻¹) em cada cultivo (SCHIMIDEL et al., 2001).

Ao término dos cultivos, os mesmos foram centrifugados e a biomassa foi liofilizada para posterior realização das extrações de ficocianina.

A extração de ficocianina foi realizada segundo metodologia adaptada de Silveira et al., (2007). As amostras de biomassa microalgal liofilizadas (0,08 g) foram imersas em 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,9) e mantidas em banho ultrassônico durante 15 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm por 10 min, e o sobrenadante recolhido. A biomassa foi submetida a mais 2 extrações sucessivas, da mesma forma que a primeira. As alíquotas dos 3 sobrenadantes foram misturadas, e imediatamente analisadas. O conteúdo de ficocianina foi calculado utilizando a Equação 1 (BENNET; BOGORAD, 1973), e expressos em mg.g⁻¹ de amostra.

$$\text{Ficocianina} = (A_{620} - 0,474 A_{652}) / 5,32 \quad (1)$$

Para determinação da atividade antioxidante, foi utilizado o método de Dávalos, Gómez-Cordovés, Batolomé (2004). Para a reação, foi utilizado 20 µL do extrato obtido da análise de ficocianina, o qual foi diluído 20 vezes em tampão fosfato. Na microplaca, foi adicionado o extrato e 120 µL de fluoresceína (0,387mg L⁻¹), mantida por 15 min a 37 °C, após adicionado 60 µL de AAPH (0,108 g L⁻¹). A microplaca foi incubada em microleitora BMG Labtech (37 °C) por 80 min. A leitura de fluorescência foi realizada a cada 1 min, utilizando detector de fluorescência



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

com comprimento de onda de excitação em 485 nm e emissão 520 nm. Na determinação foi utilizada curva padrão de Trolox e os resultados expressos em μM equivalente Trolox por g de amostra seca.

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram tratados por análise de variância seguida pelo teste de Tukey, adotando nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados os resultados de concentração máxima de biomassa e teor de ficocianina quando *Spirulina* sp. LEB 18 foi cultivada em diferentes condições de fotoperíodo. A partir dos dados apresentados percebe-se que a produção de ficocianina foi aumentada em ambos os ensaios que utilizaram LEDs vermelhos em comparação com o ensaio que somente teve iluminação por lâmpadas fluorescentes e o fotoperíodo de 12 h com fluorescente: 12 h escuro.

Tabela 1 - Concentração de biomassa máxima (X_{\max}), teor de ficocianina (mg g^{-1}) e atividade antioxidante de *Spirulina* sp. LEB 18 em diferentes condições de iluminação

Ensaio	Condições de iluminação	X_{\max} (g L^{-1})	Ficocianina (mg g^{-1})	Atividade antioxidante $\mu\text{M TE g}^{-1}$
1	12 h fluoresc: 12 h escuro	$1,25 \pm 0,07^b$	$35,87 \pm 0,49^c$	$301,49 \pm 4,78^{ab}$
2	12 h fluoresc: 6 h LED: 6 h escuro	$1,37 \pm 0,07^b$	$153,98 \pm 3,5^a$	$252,06 \pm 7,92^b$
3	12 h fluoresc: 12 h LED	$1,82 \pm 0,10^a$	$60,74 \pm 1,11^b$	$420,09 \pm 19,08^a$

Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença estatística significativa ($p > 0,05$). $\mu\text{M TE g}^{-1}$: μM equivalente Trolox por g de amostra seca.

A maior concentração de biomassa foi obtida no ensaio 3, quando a *Spirulina* sp. LEB 18 foi cultivada com iluminação integral (12 h fluorescente: 12 h LED vermelho). No entanto, o maior conteúdo de ficocianina foi alcançado no cultivo com iluminação parcial de LED vermelho (12 h fluorescente: 6 h LED vermelho: 6 h escuro).

No estudo de Samuelson et al. (1985), *A. nidulans* teve o seu teor de biocorante (célula^{-1}) alterados para maior, quando houve mudança na cor branca para vermelha e para uma intensidade luminosa menor. Em baixa intensidade de luz vermelha, as ficobiliproteínas transferem a energia para clorofila *a* que permanece transferindo energia para o complexo fotossintético I, que mantém a produção de NADPH, podendo promover o crescimento.

A atividade antioxidante mais elevada entre os ensaios 2 e 3 que utilizaram LEDs vermelhos, foi obtida da ficocianina extraída do ensaio 3 com iluminação integral (12 h fluorescente: 12 h LED vermelho). A ficocianina do ensaio 3 exibiu atividade de $420,09 \pm 19,08 \mu\text{M TE g}^{-1}$ de amostra seca, comparada a atividade de $252,06 \pm 7,92 \mu\text{M TE g}^{-1}$ do ensaio 2, que teve iluminação parcial de LED vermelho (12 h fluorescente: 6 h LED vermelho: 6 h escuro).



V SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 05 a 07 de agosto de 2015, Londrina – PR

Patel et al. (2006) indica que existem diferenças na agregação entre subunidades da ficocianina, provenientes de cultivos diferentes de cianobactérias e tem sido sugerido que este pode alterar as propriedades bioquímicas da ficocianina.

A ficocianina obtida no ensaio 1, apresentou atividade antioxidante de $301,49 \pm 4,78 \mu\text{M TE g}^{-1}$ e não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) dos demais ensaios.

Com base nos resultados apresentados, percebe-se que a variação no fotoperíodo e a utilização de LEDs de comprimento específico na região do vermelho alteraram a concentração de biomassa, produção de ficocianina e atividade antioxidante. Esses resultados são importantes, em vista de se ter conseguido aumentar a concentração de um composto natural com atividade antioxidante.

CONCLUSÕES

O uso de LEDs de comprimento de onda na região do vermelho em diferentes fotoperíodos fotoestimularam os cultivos da microalga *Spirulina sp.* LEB 18. O cultivo com iluminação integral (12 h fluorescente: 12 h LED vermelho) promoveram um incremento na concentração de biomassa de *Spirulina sp.* LEB 18 e na atividade antioxidante da ficocianina. Todavia, o cultivo com iluminação parcial de LED vermelho (12 h fluorescente: 6 h LED vermelho: 6 h escuro) fotoestimulou a microalga a concentrar sua produção de ficocianina.

Agências de Fomento: CAPES

REFERÊNCIAS

- BENNETT, A.; BOGORAD, L., Complimentary Chromatic Adaptation in a Filamentous Blue-Green Alga. **The Journal of Cell Biology**, n. 2, v. 58, p. 419, 1973.
- DÁVALOS, A.; GOMEZ-CORDOVES, C.; BARTOLOME, B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC-Fluorescein) Assay. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 52, p. 48-54, 2004.
- GANTAR, M.; SIMOVIC, D. DJILAS, S.; GONZALES, W.; MIKSOVSKA, J. Isolation characterization and antioxidative of c-phycoyanin from *Limnothrix sp.* Strain 37-2-1. **Journal of Biotechnology**, v. 159, p. 21-26, 2012.
- KUDDUS M., SINGH, P.; THOMAS, G.; AL-HAZIMI, A. Recent Developments in Production and Biotechnological Applications of C-Phycocyanin. **BioMed Research International**, v. 1, p.1-9, 2013.
- MARKOU, G. Effect of Various Colors of Light-Emitting Diodes (LEDs) on the Biomass Composition of *Arthrospira platensis* Cultivated in semi-continuous Mode. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 172, p. 2758-2768, 2014.
- NHUT, D.T.; NAM, N.B. **Light-emitting diodes (LEDs):An artificial lighting source for biological studies.** Proceedings of the 3rd International Conference on the Development of BME, 133- 138, 2010.
- PATEL, G., CHETHANA, S., SRIDEVI, A.S., RAGHAVARAO, K.S.M.S. Method to obtain C-phycoyanin of high purity. **Journal Chromatography**. v.1127, p.76–81, 2006.
- PLEONSIL, P.; SOOGARUN, S.; SUWANWONG, Y. Anti-oxidant activity of holo- and apo-c-phycoyanin and their protective effects on human erythrocytes. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.60, p.393–398, 2013.
- SAMUELSON, G.; LÖNNEBORG, A.; ROSENQVIST, E.; GUSTAFSSON, P.; ÖQUIST, G. Photoinhibition and reactivation of photosynthesis in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. **Plant Physiology**, v. 79, p. 992-995, 1985.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: E. Blücher, v. 2, p. 254, 2001.
- SILVEIRA, S. T.; BURKERT, J. F. M.; COSTA, J. A. V.; BURKERT, S. J.; KALIL, S. J. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1629-1634, 2007.
- ZARROUK, C. **Contribution a Letude Dune Cyanophyce, Influence de Divers Facteurs physiques et Chimiques sur la Croissance et photosynthese de Spirulina maxima geitler.** Ph.D. Thesis University of Paris. 1966.