

## ESTUDO DOS MÉTODOS EXTRATIVOS PARA A RECUPERAÇÃO DA FICOCIANINA DE *ARTHROSPIRA (SPIRULINA) PLATENSIS*

Clarissa R. de Souza<sup>1,2</sup>; Graziela da S. Almeida<sup>1,2</sup>; Victor H. A. Gonçalves<sup>1,2</sup>; Pedro C. D. Rodrigues<sup>1,3</sup>; Yollanda C. S. F. Vançato<sup>1</sup>; Cláudia M. L. L. Teixeira<sup>1</sup>

1 Instituto Nacional de Tecnologia, Laboratório de Biotecnologia de Microalgas (LABIM), Av. Venezuela, 82 - Saúde, Rio de Janeiro - RJ.

2 Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – Campus Nilópolis, R. Lúcio Tavares, 1045 - Centro, Nilópolis - RJ.

3 Universidade Federal Fluminense – Campus Centro, R. Dr. Mario Vianna, 523 - Santa Rosa, Niterói – RJ.

**Palavras-Chave:** Microalga, pigmento, processo extrativo.

### Introdução

A cianobactéria *Arthrospira (Spirulina) platensis* destaca-se por possuir uma ampla variedade de compostos, oferecendo propriedades nutricionais, farmacológicas, entre outras (de Almeida; Camargo; Seno, [s. d.]). É constituída por cerca de 70% de proteínas em sua biomassa, sendo fonte de diversos aminoácidos, além de ácidos graxos essenciais e outros lipídeos, minerais, vitaminas e pigmentos como  $\beta$ -caroteno e ficobiliproteínas, despertando, assim, interesse para diversas aplicações em biorrefinaria (Araújo *et al.*, 2021; Pessoa, 2010).

Dentre esses bioativos, a ficocianina, acessório fotossintético da cianobactéria, é o mais relevante para uso comercial. Na indústria, pode ser utilizada como corante natural em cosméticos, alimentos e tecidos. Além de possuir função terapêutica devido sua ação antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, antitumoral, antidiabética, hepatoprotetora e neuroprotetora, sendo visada também pela indústria farmacêutica (Athiyappan; Chaudhuri; Balasubramanian, 2024; Capelli; Cysewski, 2010).

O processo de extração da ficocianina é realizado por meio da ruptura celular da *Spirulina* e a utilização de um solvente adequado. Pispas e colaboradores (2024) atestaram que a escolha do solvente extrativo é fundamental para promover maior estabilidade para a molécula ou até mesmo aumentar a pressão osmótica no meio, que facilita a quebra da parede celular devido à ocorrência do processo de homeostase pela alta concentração de sais. Ademais, o tipo de processo de extração também desempenha um papel crucial na eficiência da recuperação desse composto. Em relação ao processo, foi demonstrado que o congelamento-descongelamento (C/D) da biomassa é um procedimento simples e eficaz (Pispas *et al.*, 2024), mas que em escala industrial, pode aumentar o uso de energia elétrica, se tornando um processo custoso.

É de extrema importância a otimização da recuperação de ficocianina para tornar a produção deste composto economicamente viável. Contudo, processos verdes devem ser considerados, visando o uso de solventes e técnicas de rompimento celular mais sustentáveis. Estudos utilizando micro-ondas, tratamento enzimático, campo elétrico pulsado e ultrassom (US) têm se mostrado alternativas eficazes (Berrouane *et al.*, 2022). Scheffler (2019) verificou que o uso do C/D da biomassa úmida com tampão fosfato de sódio (PB), promoveu uma maior recuperação de ficocianina quando comparado ao uso de ultrassom. Já Athiyappan, Chaudhuri e Balasubramanian (2024), ao utilizarem as mesmas condições de extração, obtiveram maior rendimento do bioativo quando aplicaram US. O uso de US é uma alternativa viável à indústria, e há diferentes resultados descritos na literatura. Outra questão a ser investigada é o tipo de solvente que gera maior eficiência de recuperação. A água pura pode ser uma escolha bastante razoável pela eficiência já demonstrada e pelo fato de não se ter gasto extra com a aquisição de sais (Wachda *et al.*, 2019).

Sendo assim, este estudo tem como objetivo avaliar a extração da ficocianina da biomassa da *Arthrospira (Spirulina) platensis*, cultivada em fotobiorreator por meio do uso de congelamento-

descongelamento, banho ultrassônico e ambos os métodos conjugados, com o uso de água como solvente, visando a máxima recuperação deste biocomposto no contexto de biorrefinaria.

## Material e Métodos

### Cultivo

Foi utilizada *Arthrospira (Spirulina) platensis* (coleção Elizabeth Aidar, Departamento de Biologia Marinha, Universidade Federal Fluminense) que vem sendo mantida no Laboratório de Biotecnologia de Microalgas (LABIM), do Instituto Nacional de Tecnologia. O cultivo foi realizado em meio de cultivo Zarrouk modificado, sob luz LED branca em reator de sistema fechado de 240 L com bombeamento de ar, em sala a 25°C durante 10 dias. Ao final do cultivo, a biomassa foi recuperada por filtração e posteriormente liofilizada.

### Extração de ficocianina

A extração de ficocianina (FC) da biomassa foi realizada com a utilização de água destilada como solvente extrativo. O estudo foi realizado em duas etapas: 1) determinação da razão de massa/volume adequada para um maior rendimento na recuperação do bioativo; 2) comparação da influência do uso de diferentes métodos extrativos no teor do pigmento e na pureza do extrato.

Inicialmente, a biomassa foi submetida a 5 ciclos de C/D adotando-se concentrações de 2, 25 e 48 g/L. Em seguida, utilizando a concentração de 25 g/L, foi realizada extração do bioativo em banho ultrassônico (USC-1800, Unique, Brasil) com sistema projetado pelo nosso grupo para manutenção da temperatura em 28°C, durante 120 minutos (US120). Após a quantificação da recuperação de ficocianina por US120, a amostra foi submetida ao C/D para potencializar a recuperação do pigmento (US120 + C/D).

Depois da aplicação dos métodos extrativos, C/D, US120 e US120 + C/D, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos, a 10°C; o *debris* celular foi separado e, a partir do sobrenadante recolhido, foi realizada a quantificação da ficocianina extraída.

### Análise de ficocianina

O extrato foi analisado via espectrofotômetro UV-Vis (G10S UV-Vis, Thermo Scientific, USA). Para quantificar a ficocianina presente na biomassa, foi utilizada a equação 1, estabelecida por Bennett & Bogorad (1973).

$$[\text{Ficocianina}] = \left( \frac{(A_{615} - 0,474) \times A_{652}}{5,34} \right) \frac{V}{m} \quad \text{Equação 1}$$

Onde  $A_{615}$  é a absorbância no comprimento de onda 615 nm; e  $A_{652}$  é a absorção da amostra no comprimento de onda 652 nm,  $V$  é o volume de extração e  $m$  é a massa de biomassa utilizada.

### Testes estatísticos

Foram realizadas análises estatísticas utilizando o software Statistica, versão 7.0 (Statsoft., 2004). Para as comparações em ambas as etapas, realizou-se ANOVA e Tukey para 95% de nível de confiança.

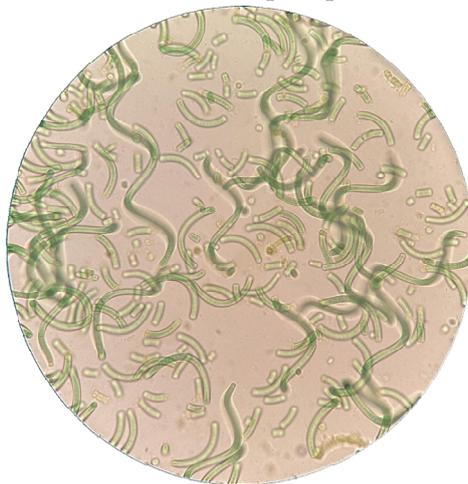
## Resultados e Discussão

### Estudo 1

Nesta etapa do estudo, foi avaliada a recuperação da ficocianina utilizando diferentes concentrações (biomassa/solvente) via ciclos de congelamento-descongelamento (C/D), em triplicata. Ao todo, foram realizados 5 ciclos, onde verificou-se que há diferença significativa no teor do bioativo em relação ao número de vezes que o extrato é submetido aos ciclos de C/D (Tabela 1 e gráfico 1).

Isso ocorre porque, ao congelar os extratos, é favorecida a formação de poros na parede celular da cianobactéria e posterior rompimento celular quando do descongelamento. Quanto maior o número de ciclos, maior a extensão do rompimento, facilitando ao solvente extrator a solubilização dos metabólitos intracelulares (Scheffler, 2019).

**Figura 1:** Amostra de suspensão de biomassa de *Spirulina* submetida a 4 ciclos de congelamento-descongelamento, vista ao microscópio óptico. Aumento de 1000X.



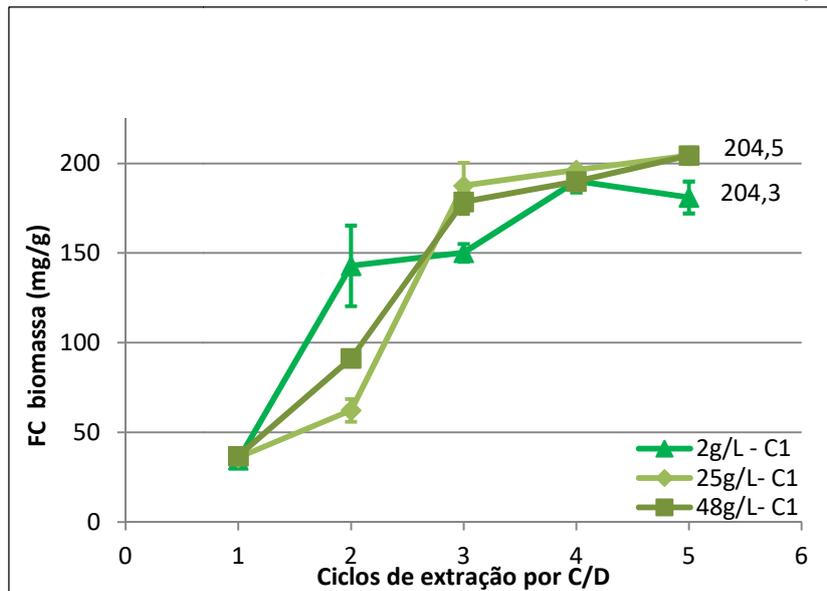
Na tabela 1, são mostrados os valores obtidos a cada etapa do processo de extração, onde observou-se que 2 g/L extraiu alto teor de ficocianina em número de ciclos reduzido, tendo sido alcançado rendimento de 142,9 mg/g em apenas 2 ciclos. Entretanto, as concentrações de 25 e 48 g/L são superiores à utilização de 2 g/L, alcançando teores de até 204,3 mg/g e 204,5 mg/g, respectivamente, de ficocianina na biomassa. Além disso, nas maiores concentrações foram observados teores similares no 5º ciclo de extração. Portanto, foi selecionada a razão m/v de 25 g/L para a continuação do estudo de diferentes métodos extrativos.

**Tabela 1:** Teores de ficocianina na biomassa de *Spirulina* em diferentes concentrações a partir do processo de congelamento-descongelamento.

Teor de ficocianina recuperado da biomassa de <i>Spirulina</i> (mg/g)*			
Ciclos	2 g/L	25 g/L	48 g/L
1	34,5 ± 0,35 <sup>a</sup>	35,9 ± 1,66 <sup>a</sup>	36,7 ± 1,21 <sup>a</sup>
2	142,9 ± 22,5 <sup>b</sup>	62,3 ± 6,32 <sup>c</sup>	91,3 ± 1,75 <sup>d</sup>
3	150,2 ± 5,02 <sup>c</sup>	187,6 ± 12,8 <sup>f</sup>	178,6 ± 6,28 <sup>f</sup>
4	190,2 ± 6,37 <sup>g,1</sup>	196,4 ± 1,52 <sup>g</sup>	190,0 ± 4,87 <sup>g</sup>
5	181,1 ± 8,87 <sup>i</sup>	204,3 ± 4,63 <sup>h</sup>	204,5 ± 3,54 <sup>h</sup>

\*Média ± desvio padrão; resultados com a mesma letra não apresentam diferenças significativas entre si.

**Gráfico 1:** Rendimento de ficocianina em diferentes ciclos de extração.



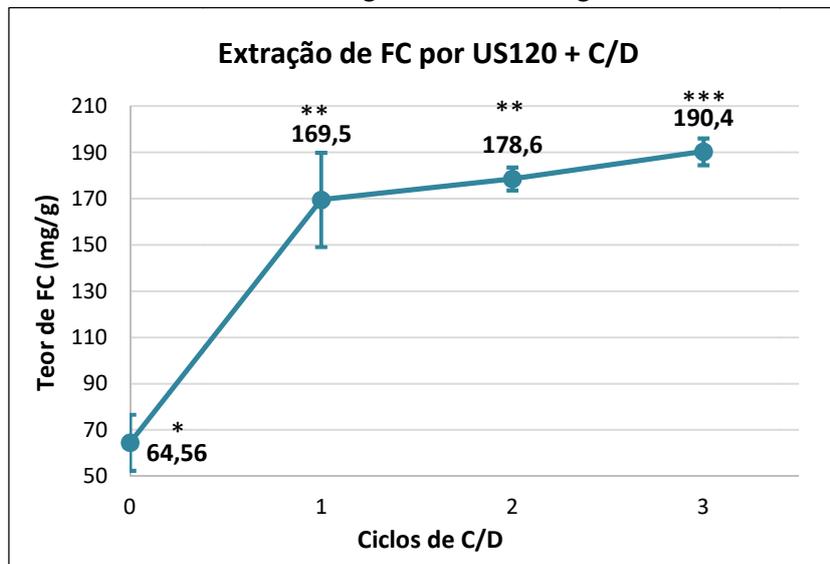
Wachda e colaboradores (2019) não identificaram diferenças significativas ao utilizar diferentes concentrações de biomassa de *Spirulina* em água destilada, no método extrativo de congelamento-descongelamento. Em seu estudo, afirmaram que o aumento da concentração do extrato não influenciou no rendimento da recuperação da ficocianina. Esse resultado foi diferente da presente pesquisa, visto que ao aumentar a massa de biomassa utilizada, foi possível observar um aumento no rendimento da extração, comprovada estatisticamente.

## Estudo 2

A fim de avaliar diferentes métodos de extração de ficocianina e otimizar a recuperação da ficocianina, primeiramente, 6 replicatas de suspensão de biomassa em água, a 25 g/L, foram levadas ao banho ultrassônico, durante 120 minutos, com temperatura controlada a 28°C. O Gráfico 2 mostra que este processo promoveu uma recuperação de 64,6 mg/g de FC na biomassa de *Spirulina*. Esse resultado indicou uma baixa eficiência do processo quando comparado ao método de congelamento-descongelamento, obtendo uma eficiência de apenas 31,6% considerando o maior valor obtido no processo de C/D.

Com o intuito de avaliar a eficiência da utilização dos métodos em conjunto, a fim de maximizar a extração da ficobiliproteína, foram aplicados ciclos de C/D posteriormente ao US120. Ao todo, foram realizados 3 ciclos, onde observou-se que houve um aumento significativo na recuperação da ficocianina já no 1º ciclo (169,5 mg/g  $\pm$  20,4), em comparação ao uso de apenas US120 (64,6 mg/g) ou 1 ciclo de C/D (35,9 mg/g) (Tabela 1). Foi atestada a otimização do processamento da biomassa pela diminuição do número de ciclos e, por conseguinte, do tempo total de extração, visto que o 3º ciclo de C/D se mostrou bastante eficaz, alcançando um rendimento de até 190,3 mg/g na recuperação de ficocianina da biomassa, e uma eficiência de 93,1% levando em conta ao teor obtido no Estudo 1. Os resultados podem ser visualizados no Gráfico 2, que indica o crescimento na eficiência de extração após cada ciclo de C/D.

**Gráfico 2:** Rendimento em ficocianina alcançado por 120 minutos de banho ultrassônico em conjunto de 3 ciclos de congelamento-descongelamento

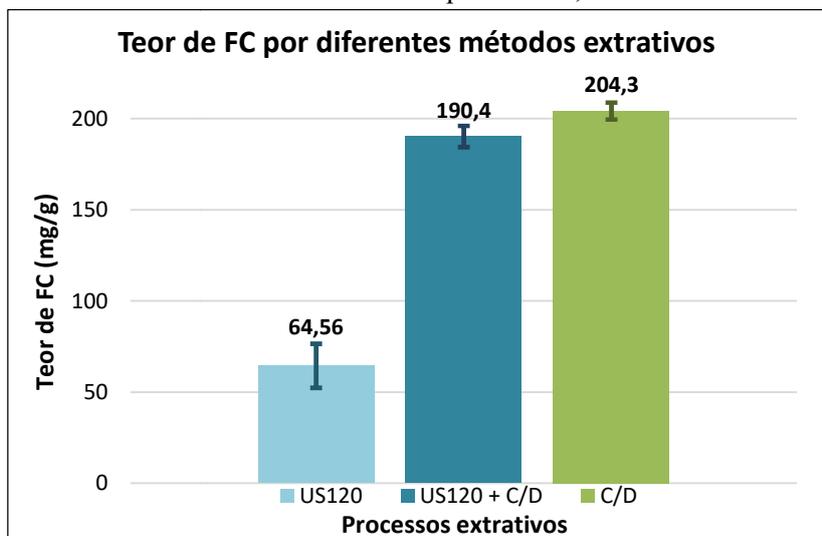


\*Resultados não apresentam diferenças significativas entre si.

Ademais, embora o uso de US120 + C/D tenha apresentado vantagens na diminuição do tempo de processamento frente ao método clássico, sendo necessários apenas 3 ciclos de C/D do extrato para se equiparar com o máximo extraído, foi constatado que o uso de C/D foi mais eficiente para a recuperação da ficocianina.

Tavanandi e colaboradores (2018) relataram que ao utilizarem 1,5 minutos de ultrassom de sonda seguidos por 2 ciclos de C/D, extraíram cerca 109 mg/g de ficocianina, obtendo uma eficiência de 92% e diminuindo o tempo de processamento dos métodos. Ainda, constataram um aumento no rendimento na recuperação de ficocianina quando comparado ao ultrassom e a ciclos de C/D sozinhos, o que também não foi visto no presente trabalho. Desta forma, percebe-se que há ainda a necessidade de melhorias no processo. Entretanto, os valores alcançados demonstram a relevância do uso, principalmente do ultrassom em novos estudos.

**Gráfico 3:** Rendimento em ficocianina extraída por US120, US120 + C/D e 5 ciclos de C/D.



### Conclusões

O método de congelamento-descongelamento utilizado revelou que o uso das concentrações de 25 e 48 g/L promoveram a extração de ficocianina com rendimentos similares, 204,3 e 204,5 mg/g,

respectivamente, e maiores que 2 g/L, 190,2 mg/g. Notou-se que, a razão massa/volume influenciou no rendimento da extração de ficocianina. Além disso, ao comparar os métodos extrativos, o uso de banho ultrassônico não se mostrou eficaz, mas a inserção da etapa de C/D aumentou significativamente na recuperação do bioativo, alcançando uma eficiência de 93,1% e diminuindo o tempo de processo do C/D para 3 ciclos. Ainda, o congelamento-descongelamento se destaca pelo rendimento de extração, embora seja um processo pouco viável à indústria. Esses dados, não só aprofundam a compreensão da extração do pigmento na biomassa da *A. platensis*, mas também oferecem informações acerca do potencial uso de diferentes métodos extrativos, a fim de maximizar e otimizar a recuperação da ficocianina para aplicações em biorrefinaria.

### Agradecimentos

Ao Instituto Nacional de Tecnologia (INT) pela disponibilidade da infraestrutura e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro pelo apoio financeiro (bolsas de Iniciação Tecnológica).

### Referências

- ARAÚJO, R. et al. Current Status of the Algae Production Industry in Europe: An Emerging Sector of the Blue Bioeconomy. **Frontiers in Marine Science**, v. 7, 27 jan. 2021.
- ATHIYAPPAN, K. D.; CHAUDHURI, R.; BALASUBRAMANIAN, P. Enhancing phycocyanin yield from *Spirulina* sp. under salt stress using various extraction methods. **Archives of Microbiology**, v. 206, n. 6, p. 258, jun. 2024.
- BENNETT, A.; BOGORAD, L. COMPLEMENTARY CHROMATIC ADAPTATION IN A FILAMENTOUS BLUE-GREEN ALGA. **Journal of Cell Biology**, v. 58, n. 2, p. 419–435, 1 ago. 1973.
- BERROUANE, N. E. H. et al. Freeze–thaw-, enzyme-, ultrasound- and pulsed electric field-assisted extractions of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* dry biomass. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 16, n. 2, p. 1625–1635, abr. 2022.
- CAPELLI, B.; CYSEWSKI, G. R. Potential health benefits of spirulina microalgae\*: A review of the existing literature. **Nutrafoods**, v. 9, n. 2, p. 19–26, abr. 2010.
- DE ALMEIDA, V. I.; CAMARGO, F.; SENO, L. CIANOBACTÉRIA *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*: [s.d.].
- PESSOA, J. Produção de biomassa de *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) para alimentação humana. 2010.
- PISPAS, K. et al. Optimizing Phycocyanin Extraction from Cyanobacterial Biomass: A Comparative Study of Freeze–Thaw Cycling with Various Solvents. **Marine Drugs**, v. 22, n. 6, p. 246, 28 maio 2024.
- SCHEFFLER, M. L. Extração de proteínas e ficocianinas da *Spirulina platensis*: um estudo comparativo entre diferentes métodos. [s.d.].
- TAVANANDI, H. A. et al. Simple and efficient method for extraction of C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*. **Algal Research**, v. 31, p. 239–251, abr. 2018.
- WACHDA et al. Production of antioxidant C-phycocyanin using extraction process of *Spirulina platensis* in large scale industry. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 633, n. 1, p. 012025, 1 out. 2019.