

DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE A PARTIR DE EXTRATOS DE FICOCIANINA E FENÓIS OBTIDOS DA BIOMASSA DE *SPIRULINA* sp. LEB 18

LETÍCIA SCHNEIDER FANKA¹; DENISE DA FONTOURA PRATES²; MILENE TEIXEIRA BARCIA³; ELISANGELA MARTHA RADMANN⁴; JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA⁵

¹Universidade Federal do Rio Grande – leeschneiderf@gmail.com

²Universidade Federal do Rio Grande – denisefpratees@gmail.com

³Universidade Federal do Rio Grande – milenebarcia@ig.com.br

⁴Universidade Federal do Rio Grande – emradmann@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal do Rio Grande – jorgealbertovc@terra.com.br

1. INTRODUÇÃO

A *Spirulina* é uma cianobactéria que vem sendo amplamente estudada por diversos fatores, dentre eles pela presença de compostos com potencial atividade biológica, em sua biomassa (MARCO et al., 2014). Á exemplo desses compostos citam-se os compostos fenólicos e a ficocianina, que são de grande interesse tanto para área alimentícia quanto farmacológica.

Os compostos fenólicos são compostos oriundos do metabolismo secundário de plantas e de algumas algas. Nos últimos anos, os estudos acerca desses metabólitos tem aumentado devido à capacidade de promover benefícios à saúde humana, como a diminuição de doenças cardiovasculares, redução de hipertensão e diabetes, assim como a prevenção de alguns tipos de câncer. Parte destes efeitos benéficos atribuídos aos compostos fenólicos pode ser relacionados a sua atividade antioxidante (KEPEKÇI et al., 2013).

A ficocianina é um complexo proteína-cromóforo de cor azul pertencente a família das ficobiliproteínas e está entre os principais pigmentos fotossintéticos acessórios produzidos por *Spirulina*, podendo ser empregado em alimentos e cosméticos. Assim como os compostos fenólicos, a ficocianina vem merecendo ser estudada, visto que possui diversos benefícios para a saúde humana, sendo comprovado seu efeito anti-inflamatório, anticancerígeno e também possuir potencial antioxidante (GANTAR et al., 2012).

É sabido que o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) podem gerar estresse celular, e causar diversos danos ao organismo humano, danificando componentes de grande importância nas células, como proteínas, lipídios e DNA, e assim pode estar relacionado a diversas doenças degenerativas, como o Alzheimer e Parkinson (PLEONSIL; SOOGARUN; SUWANWONG, 2013).

Neste contexto, a perspectiva da biomassa de espécies de microalgas isoladas da região Sul serem fontes naturais de compostos com potencial ação bioativa merece ser exploradas. Para isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade antioxidante de extratos de ficocianina e fenóis, extraído da cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18.

2. METODOLOGIA

Para o presente estudo utilizou-se a cianobactéria *Spirulina* sp. LEB 18 (MORAIS et al., 2008), pertencente ao Banco de microalgas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB). Seu cultivo foi realizado em Santa Vitória do Palmar – RS, município em que o LEB da Universidade Federal do Rio Grande

(FURG), mantém uma Planta Piloto de produção de *Spirulina* às margens da Lagoa Mangueira. A biomassa foi seca, triturada e homogeneizada para realização das análises posteriores.

Na extração de compostos fenólicos, foi utilizado 2 g de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18, e adicionado de 10 mL de metanol, levado ao shaker por 60 min, a 200 rpm e 25 °C, após finalizado o tempo, foi deixado o extrato em repouso por 15 min, e adicionou-se 10 mL de metanol e repetiu-se o procedimento. Logo após, a amostra foi filtrada para funil de separação, onde efetuou-se três lavagens com 20 mL de hexano, até obter a separação das fases. Foi coletada a parte inferior em tubo de centrífuga, onde foi adicionado 5 mL de hidróxido de bário 0,1 M e 5 mL de sulfato de zinco 5% e deixando em repouso por 20 min, após esgotado o tempo, o extrato foi centrifugado a 6000 rpm. O sobrenadante foi coletado para balão volumétrico de 25 mL e o volume foi completado com metanol.

A extração de ficocianina foi realizada utilizando 0,08 g de biomassa para 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,9, após foi levado ao banho ultrassônico durante 15 minutos e centrifugado por 10 min a 6000 rpm. O sobrenadante foi retirado, adicionou-se 1mL de tampão e repetiu-se o procedimento por mais duas vezes, totalizando 3 extrações (SILVEIRA et al., 2007). Após, os sobrenadantes obtido nas extrações foram misturados e lidos em espectrofotômetro digital a 620 nm e 652 nm. O cálculo para a concentração de ficocianina é feito a partir da equação 1 (BENNETT; BOROAGAD 2007).

$$C = \frac{\text{Abs } 620 - (0,474 * \text{Abs } 652)}{5,34} \quad (1)$$

A determinação de compostos fenólicos seguiu o protocolo proposto por Singleton, Orthofer, Lamuela-Ravetos (1999), onde foi utilizado 0,5 mL do extrato, adicionou-se 2,5 mL de Folin-Ciocalteu (diluído 10 vezes), esperou-se reagir por 5 min, adicionou-se 2 mL de carbonato de sódio 7,5% e deixou-se reagir no escuro por 2 h. A amostra foi lida em espectrofotômetro digital a 760 nm. Para esta determinação, utilizou-se uma curva padrão de ácido gálico, com uma faixa de 10 mg L⁻¹ a 78 mg L⁻¹.

A capacidade antioxidante foi determinada pelo método de ORAC foi realizado segundo Dávalos, Gómez-Cordovés, Batolomé (2004). Para a reação, foi utilizado 20µL do extrato, obtido da análise de fenóis e obtido da análise de ficocianina,. Na microplaca, foi adicionado o extrato e 120 µL de fluoresceína (0,387mg/L), mantida por 15 minutos a 37°C, após adicionado 60 µL de radical AAPH (0,108g/L). 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 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 equivalente Trolox por g de amostra seca. Para o cálculo de concentração foi utilizada a equação 2.

$$\text{AUC} = 1 + f1/f0 + f2/f0 + f3/f0 + f4/f0 + fn/f0 \quad (2)$$

Onde:

AUC = Área abaixo da curva, formada no gráfico, onde x corresponde ao tempo e y ao decaimento de fluorescência.

F0 = Leitura da fluorescência no tempo 0 minuto

f1 = Leitura da fluorescência no tempo 1 minuto

f2 = Leitura da fluorescência no tempo 2 minutos

fn = Leitura da fluorescência no tempo 80 minutos

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 1, onde a concentração de fenóis foi $97,096 \pm 6,698 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$, possuindo uma atividade antioxidante de $14,41 \pm 1,91 \text{ } \mu\text{M TE g}^{-1}$, e a concentração de ficocianina sendo de $167,08 \pm 3,24 \text{ mg g}^{-1}$, com a atividade antioxidante de $420,99 \pm 19,95 \text{ } \mu\text{M TE g}^{-1}$.

TABELA 1 – Concentração de compostos fenólicos e ficocianina e atividade antioxidante dos extratos

Extrato	Concentração*	ORAC ($\mu\text{M TE g}^{-1}$)**
Fenóis	$97,10 \pm 6,70$	$14,41 \pm 1,91$
Ficocianina	$167,08 \pm 3,24$	$420,99 \pm 19,95$

*Concentração de compostos fenólicos em mg de ácido gálico 100g^{-1} e concentração de ficocianina em mg g^{-1} ; ** μM equivalente Trolox por grama de amostra seca.

Na literatura não foram encontrados muitos trabalhos com compostos fenólicos em cianobactérias, como a *Spirulina* sp., o que pode estar correlacionado a sua baixa concentração na biomassa produzida. Este dado pode explicar os resultados obtidos neste trabalho, e conseqüentemente a atividade antioxidante apresentada pelo extrato de compostos fenólicos obtidos da biomassa de *Spirulina* sp.

Por outro lado, pode-se verificar que a *Spirulina* sp LEB 18 possui além dos fenóis, o pigmento ficocianina, apresentando-se como uma fonte de moléculas com ação antioxidante, o que confirma essa biomassa como uma fonte natural de compostos que podem ser benéficos a saúde.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a biomassa da microalga *Spirulina* LEB 18 possui compostos bioativos com possível capacidade antioxidante, propiciando sua utilização em aplicação alimentícia ou farmacológica com propriedade funcional.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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; GÓMEZ-COROVÉS,.-C.; BATOLOMÉ B. Extending Applicability of the Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC–Fluorescein) Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.52, p. 48–54, 2004.

GANTAR, M.; SIMOVIC, D. DJILAS, S.; GONZALES, W.; MIKSOVSKA, J. Isolation characterization and antioxidative of c-phycoocyanin from *Limnospira* sp. Strain 37-2-1. **Journal of Biotechnology**, v. 159, p. 21-26, 2012.

KEPEKÇI, R. A.; POLAT, S.; ÇELİK, A.; BAYAT, N.; SAYGIDEGER, S. D. Protective effect of *Spirulina platensis* enriched in phenolic compounds against hepatotoxicity induced by CCl₄. **Food Chemistry**, v. 141, p.1972–1979, 2013.

MARCO, E. R. de; STEFFOLANI, M. E.; MARTÍNEZ, C. S.; LEÓN, A. E. Effects of *Spirulina* biomass on the technological and nutritional quality of bread wheat pasta. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, p. 102–108, 2014.

MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.63, p. 144-150, 2008.

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.

SIGLETON, V. L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTUS, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidations Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152, 1993.

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.