

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de  
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

## EXTRAÇÃO DE FICOCIANINAS DA *SPIRULINA PLATENSIS* ASSISTIDA POR ULTRASSOM

D.P. Jaeschke<sup>1</sup>, M.L. Sheffler<sup>1</sup>, G.D. Mercali<sup>2</sup>, L. D. F. Marczak<sup>1</sup>

1- Departamento de Engenharia Química – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – CEP: 90035-007 – Porto Alegre – RS – Brasil, Telefone: 55 (51) 3308-5155 – e-mail: ([deborajaeschke@ufrgs.br](mailto:deborajaeschke@ufrgs.br); [moemals@hotmail.com](mailto:moemals@hotmail.com); [ligia@enq.ufrgs.br](mailto:ligia@enq.ufrgs.br)).

2- Departamento de Ciências dos Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – CEP: 91501-970 – Porto Alegre – RS – Brasil, Telefone: 55 (51) 3308-7862 – e-mail: ([giovana.mercali@ufrgs.br](mailto:giovana.mercali@ufrgs.br)).

**RESUMO** – A tecnologia de ultrassom foi avaliada como método de pré-tratamento de extração de ficocianinas a partir da microalga *Spirulina platensis*. O ultrassom foi aplicado por 5 min em diferentes intensidades (20, 50 e 80 %), seguido de uma etapa difusiva (30 min). Durante a etapa difusiva, alíquotas foram coletadas (0, 5, 10, 15, 20 e 30 min) para avaliação dos rendimentos de extração. Os extratos obtidos com o ultrassom foram comparados com os obtidos utilizando o congelamento e descongelamento como método de rompimento celular. Os resultados mostraram que a intensidade do ultrassom e a etapa difusiva não influenciaram significativamente os rendimentos de extração, sendo possível extrair até  $48,27 \pm 5,40 \text{ mg g}^{-1}$  de ficocianinas. Os extratos obtidos com o congelamento e descongelamento (3 ciclos, 60 h) apresentaram concentrações mais elevadas de ficocianinas ( $64,69 \pm 3,69 \text{ mg g}^{-1}$ ) e menor concentração de clorofilas.

**ABSTRACT** – Ultrasound was evaluated as a pre-treatment to the extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis*. The technology was applied for 5 min at different power intensities (20, 50 and 80 %), followed by a diffusive step (30 min). During the diffusive step, samples were withdrawn at different times (0, 5, 10, 15, 20 e 30 min). The extracts obtained with ultrasound were compared to the ones obtained with the freezing and thawing method. The results showed that ultrasound power intensity and the diffusive step did not significantly influenced the extraction yield, extracting up to  $48,27 \pm 5,40 \text{ mg g}^{-1}$  of phycocyanin. The extracts obtained with the freezing and thawing method (3 cycles, 60 h) presented higher phycocyanin and lower chlorophyll concentration.

**PALAVRAS-CHAVE:** pigmentos; tecnologias emergentes; microalgas.

**KEYWORDS:** pigments; emerging technologies; microalgae.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



[www.officeeventos.com.br](http://www.officeeventos.com.br)



## 1. INTRODUÇÃO

A *Spirulina platensis* é um microrganismo de interesse industrial devido à sua capacidade de síntese de proteínas e ficocianinas, compostos com aplicação nas indústrias de alimentos e farmacêutica. As ficocianinas são pigmentos azuis antioxidantes, cujo consumo está associado à redução do risco de doenças degenerativas, neuronais e renais. Para a utilização desses pigmentos pela indústria, é necessário realizar a extração desses compostos. Para tanto, os métodos convencionais de extração mais utilizados são o congelamento e descongelamento das células e o moinho de bolas (Ílter et al., 2018).

O rompimento das células pelo congelamento e descongelamento é utilizado somente em escala laboratorial, não sendo aplicável em larga escala. Diversos estudos avaliaram a utilização desse método para a extração de ficocianinas (Moraes et al., 2011; Sarada et al., 1999). Contudo, poucos pesquisadores descrevem a metodologia utilizada (número de ciclos, tempo e temperatura de congelamento e descongelamento), dificultando a reprodutibilidade dos resultados e o entendimento do método. O moinho de bolas, por outro lado, é conhecido pela elevada eficiência no rompimento das células e capacidade de processar grande quantidade de biomassa. Contudo, apesar dos altos rendimentos, esse método apresenta elevado gasto energético e baixa especificidade, uma vez que os extratos apresentam detritos celulares e outros compostos, como clorofila (Zinkoné et al., 2018).

Dessa forma, o ultrassom se apresenta como um método alternativo para promover o rompimento celular e a extração dos compostos intracelulares. O principal fenômeno que ocorre quando ondas de ultrassom são propagadas em meios líquidos é a cavitação; esse fenômeno é caracterizado pelo colapso de bolhas de ar, promovendo o rompimento de células devido a tensões locais de cisalhamento e formação de zonas de alta temperatura e pressão. Poucos estudos foram encontrados com relação à aplicação do ultrassom para a extração dos compostos intracelulares da *Spirulina platensis* (Pan-utai e Iamtham, 2018; Tavanandi et al., 2018). Esses estudos analisam somente o rendimento de extração, não apresentando uma avaliação da qualidade dos extratos obtidos pelos diferentes métodos de extração; essa avaliação é importante para a aplicação das ficocianinas, uma vez que é de interesse obter extratos purificados. Nesse contexto, o presente trabalho se propõe a avaliar a tecnologia de ultrassom para a extração de ficocianinas a partir da *Spirulina platensis*, comparando os resultados com os obtidos com o método convencional de extração de congelamento e descongelamento.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Cultivo da *Spirulina platensis*

Cepas da *Spirulina platensis* foram obtidas da SAG (*Sammlung von Algenkulturen Göttingen*, Alemanha). Os cultivos foram realizados em meio Zarrouk modificado (Aiba e Ogawa, 1977), utilizando 10 mL de inóculo prévio e 90 mL de meio de cultivo, permanecendo sob agitação (150 rpm) por 7 dias em uma cabine termostática (25 °C, 38  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Após 7 dias, realizou-se a centrifugação dos cultivos (12000 g, 10 min) para remoção do meio de cultura. A biomassa obtida foi utilizada nos experimentos de extração, conforme descrito a seguir.

### 2.2 Preparo da Solução de Extração

Após a centrifugação, à biomassa adicionou-se solução tampão de fosfato de sódio (pH 7,2). Para tanto, utilizou-se o mesmo volume de meio de cultivo que foi removido após a centrifugação da biomassa. Esse procedimento foi realizado para cada dia de experimentos de extração. Para cada solução preparada, realizaram-



se análises para determinação da concentração de biomassa da solução de extração ( $\text{g L}^{-1}$ ). Essas análises foram realizadas com 10 mL da solução de extração em cápsulas de alumínio previamente pesadas e mantidas em estufa *overnight* a  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A concentração de biomassa na solução foi calculada pela diferença de massa.

### 2.3 Experimentos de Extração

**Congelamento e descongelamento:** a extração via congelamento e descongelamento foi realizada utilizando-se 2 mL de solução de extração, mantidos em freezer ( $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por 22h. Posteriormente, essas amostras foram mantidas a temperatura ambiente ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) por 2 h, para o descongelamento. Após 3 ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras foram homogeneizadas em vórtex, centrifugadas (13000 rpm, 20 min) e o sobrenadante foi separado para análise.

**Ultrassom:** a metodologia de extração avaliada no presente trabalho consistiu em duas etapas: um pré-tratamento de 5 min, com a aplicação do ultrassom (VCX 750, *Sonics and Materials Inc.*, EUA, 20 kHz, 750 W); e uma etapa difusiva de 30 min, realizada sem a aplicação do ultrassom. O ultrassom foi aplicado no modo pulso (30 s com o ultrassom ativo e 10 s de pausa) em diferentes intensidades (20, 50 e 80 %, equivalente a  $9\text{ W cm}^{-2}$ ,  $28\text{ W cm}^{-2}$  e  $51\text{ W cm}^{-2}$ ). Os tratamentos foram realizados com 70 mL de solução de extração em uma célula de extração encamisada, conectada a banho termostático para que a temperatura da amostra não ultrapassasse  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para a avaliação dos rendimentos de extração, alíquotas foram coletadas em diferentes momentos da etapa difusiva: logo após o término da aplicação do ultrassom (0 min) e após 5, 10, 15, 20 e 30 min. As amostras coletadas foram imediatamente centrifugadas (13000 rpm, 20 min) para obtenção dos extratos (sobrenadantes).

### 2.4 Análises dos Extratos

**Determinação de ficocianinas:** a concentração de ficocianinas nos extratos foi calculada conforme as Equações 1 (Bennett e Bogorad, 1973) e 2, onde  $A_{620\text{nm}}$  e  $A_{652\text{nm}}$  são as absorbâncias em 620 (absorção máxima das ficocianinas) e 652 nm (absorção máxima das aloficocianinas), respectivamente, e  $C_{\text{extrato}}$  é a concentração de biomassa no extrato.

$$PC\ (\text{mg ml}^{-1}) = \frac{A_{620\text{nm}} - 0,474 A_{652\text{nm}}}{5,34} \quad (1)$$

$$PC\ (\text{mg g de biomassa}^{-1}) = \frac{PC\ (\text{mg ml}^{-1})}{C_{\text{extrato}}\ (\text{g ml}^{-1})} \quad (2)$$

**Varredura dos extratos:** para a verificação da qualidade dos extratos, realizaram-se varreduras das amostras em espectrofotômetro (400 – 750 nm). Essas varreduras foram realizadas com o objetivo de analisar a intensidade dos picos de absorção da clorofila *a* (400-500 nm e 650-700 nm), uma vez que a presença desse composto nos extratos pode ser utilizada como um indicador da pureza dos extratos.

## 2.5 Análise Estatística

Os resultados foram avaliados com o teste de Tukey com 95 % de confiança, utilizando o software *Statistica 13.0 (Dell, Inc., EUA)*. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Congelamento e Descongelamento

Após 3 ciclos de congelamento e descongelamento, foi possível extrair até  $64,69 \pm 3,69 \text{ mg g}^{-1}$  de ficocianinas. Apesar de ser considerado um dos métodos mais utilizados, informações sobre esse método de extração são contraditórias na literatura. Os resultados obtidos no presente trabalho foram superiores aos obtidos por outros pesquisadores (Moraes et al., 2011; Sarada et al., 1999), que obtiveram em torno de  $20 \text{ mg g}^{-1}$  de ficocianinas. Os autores não descrevem as condições de congelamento e descongelamento empregadas durante as extrações e o número de ciclos utilizados. Além de possíveis diferenças nas condições de extração utilizadas no presente trabalho e nos trabalhos citados, acredita-se que essas variações também possam estar relacionadas a diferenças nas condições de cultivo da microalga. Outros pesquisadores obtiveram resultados similares aos obtidos no presente trabalho ( $74 \text{ mg g}^{-1}$  de ficocianinas) (Tavanandi et al., 2018); os pesquisadores realizaram 6 ciclos de congelamento ( $-40 \text{ }^\circ\text{C}$  por 4 h) e descongelamento ( $27 \text{ }^\circ\text{C}$  por 1h), totalizando 30 h de tratamento. No presente trabalho, uma diminuição na intensidade da coloração dos extratos foi observada após 3 ciclos de congelamento e descongelamento, o que corresponde a 60 h de tratamento. Dessa forma, acredita-se que tratamentos longos (mais de 60 h) podem levar à degradação dos compostos e, portanto, devem ser evitados.

### 3.2 Ultrassom

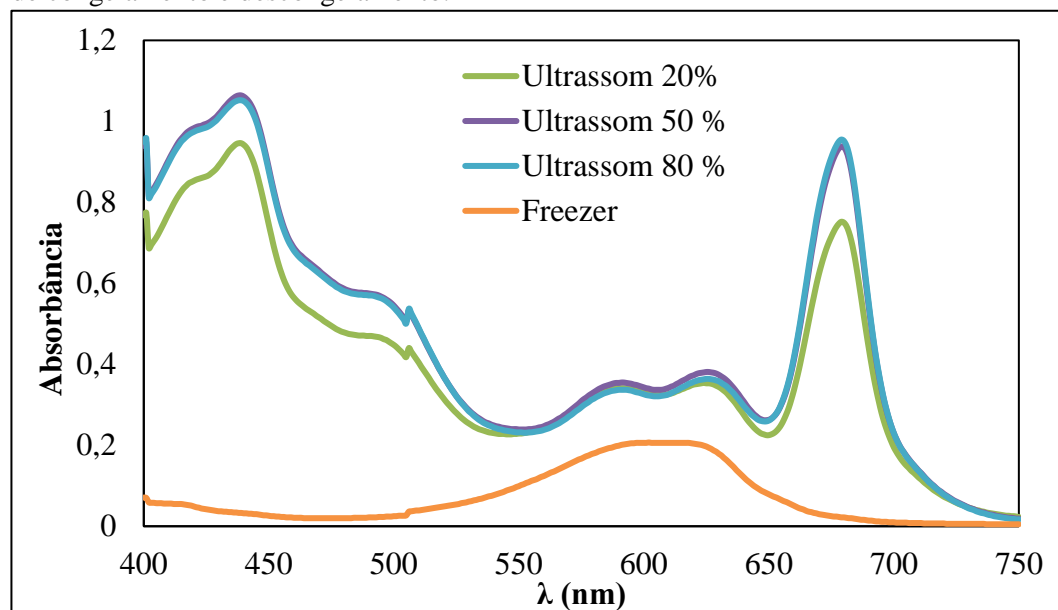
O ultrassom foi aplicado em diferentes intensidades por 5 min, seguido de uma etapa difusiva de 30 min. Os resultados mostraram que a intensidade do ultrassom não influenciou significativamente o rendimento de extração, sendo possível extrair até  $48,27 \pm 5,40 \text{ mg g}^{-1}$  de ficocianinas. Além disso, a etapa difusiva também não exerceu influência significativa na extração, uma vez que os rendimentos obtidos no início da etapa difusiva (tempo zero) e no final da mesma etapa não variaram significativamente. Esses resultados indicam que a ruptura das células ocorreu, possivelmente, durante os 5 min de aplicação do ultrassom. Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com os obtidos por Tavanandi et al. (2018). Os pesquisadores avaliaram a aplicação do ultrassom ( $102,7 \text{ W cm}^{-2}$ ) por 2,5 min, extraíndo  $51,5 \text{ mg g}^{-1}$  de ficocianinas. De acordo com os pesquisadores, o ultrassom não promoveu a extração total dos compostos, uma vez que após a maceração da amostra e congelamento e descongelamento foi possível obter  $119 \text{ mg g}^{-1}$  de ficocianinas. Pan-utai e Iamtham (2018) aplicaram o ultrassom por 5 min utilizando 50 % de amplitude no modo pulso (60 s ligado e 30 desligado) por 5 min. Os pesquisadores extraíram até  $60 \text{ mg g}^{-1}$  de ficocianinas, resultado superior ao encontrado no presente trabalho. Contudo, os autores não realizaram a extração com outro método de extração para a comparação dos resultados. Dessa forma, acredita-se que essas variações nos resultados podem estar associadas com variações na composição e estrutura celular da biomassa, que depende das condições de cultivo.

### 3.3 Comparação entre os Métodos de Extração

De acordo com os resultados apresentados previamente, as concentrações mais elevadas de ficocianinas foram obtidas pelo método de congelamento e descongelamento. Além disso, os extratos obtidos pelo congelamento e descongelamento apresentaram coloração azulada, enquanto que os extratos obtidos com o

ultrassom apresentaram coloração esverdeada; o ultrassom promoveu a extração de outros compostos intracelulares além das ficocianinas, como clorofilas, o que resultou em um extrato menos purificado. Esse resultado pode ser confirmado pela análise das espectroscopias de varredura dos extratos, apresentadas na Figura 1. Os extratos obtidos com o ultrassom apresentaram picos mais intensos na região de absorção das clorofilas (400-500 nm e 650-700 nm), se comparado aos extratos obtidos com o congelamento e descongelamento.

Figura 1 – Varredura dos extratos obtidos com o ultrassom nas intensidades de 20, 50 e 80 % e com o método de congelamento e descongelamento.



Apesar de o método de congelamento e descongelamento ter se mostrado vantajoso em termos de rendimentos de extração, a aplicação dessa tecnologia em larga escala é inviável. Ainda, embora a aplicação do ultrassom tenha resultado em extratos menos purificados, essa tecnologia proporcionou a obtenção de extratos concentrados em ficocianinas em apenas 5 min de tratamento. Acredita-se que o arraste das clorofilas para o extrato aquoso se deve pela intensidade do fenômeno de cavitação, que promove o rompimento das células de forma mais agressiva que o congelamento e descongelamento. Para que esses extratos possam ser aplicados pela indústria, no entanto, é necessário realizar a purificação para remoção dos compostos indesejados, principalmente, clorofila.

#### 4. CONCLUSÕES

No presente trabalho foram avaliados dois métodos de extração de ficocianinas a partir da *Spirulina platensis*: ultrassom e congelamento e descongelamento. Os extratos obtidos com o ultrassom (5 min, 9 W cm<sup>-2</sup>) apresentaram, aproximadamente, 74 % da concentração de ficocianinas obtida com o congelamento e descongelamento. Além disso, os extratos obtidos com o ultrassom apresentaram concentrações mais elevadas de clorofila, se comparado com os extratos obtidos com o congelamento e descongelamento (3 ciclos, 60 h). Esses resultados indicaram que o ultrassom proporcionou a obtenção de um extrato concentrado em ficocianinas utilizando um tempo reduzido de tratamento (5 min). Contudo, nas condições avaliadas, essa tecnologia não proporciona a obtenção de extratos purificados em ficocianinas.



## 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao apoio financeiro da FAPERGS, CNPq e CAPES.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aiba, S., & Ogawa, T. (1977). Assessment of Growth Yield of a Blue--green Alga, *Spirulina platensis*, in Axenic and Continuous Culture. *Journal of General Microbiology*, 102(1), 179–182.
- Bennett, A., & Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of cell biology*, 58(2), 419–35.
- İlter, I., Akyıl, S., Demirel, Z., Koç, M., Conk-Dalay, M., & Kaymak-Ertekin, F. (2018). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, 70, 78–88. Academic Press.
- Moraes, C. C., Sala, L., Cerveira, G. P., & Kalil, S. J. (2011). C-phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(1), 45–49.
- Pan-utai, W., & Iamtham, S. (2018). Physical extraction and extrusion entrapment of C-phycocyanin from *Arthrospira platensis*. *Journal of King Saud University - Science*, 31(4), 1535–1542.
- Sarada, R., Pillai, M. G., & Ravishankar, G. . (1999). Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry*, 34(8), 795–801.
- Tavanandi, H. A., Mittal, R., Chandrasekhar, J., & Raghavarao, K. S. M. S. (2018). Simple and efficient method for extraction of C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*. *Algal Research*, 31, 239–251.
- Zinkoné, T. R., Gifuni, I., Lavenant, L., Pruvost, J., & Marchal, L. (2018). Bead milling disruption kinetics of microalgae: Process modeling, optimization and application to biomolecules recovery from *Chlorella sorokiniana*. *Bioresource Technology*, 267, 458–465.