



## Simpósio Nacional de Instrumentação Agropecuária

São Carlos, 18 a 20 de novembro 2014

# USO DE ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS E DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X NA IDENTIFICAÇÃO DE FICOCIANINA EM MICROALGAS

*A. Manrich<sup>1</sup>, B.C. Mermeljo<sup>1,2</sup>, J.C. Moraes<sup>1,2</sup>, J.E. Oliveira<sup>3</sup>, L.H.C. Mattoso<sup>1</sup>, M.A. Martins<sup>1</sup>*

(1) Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, 13560-970, São Carlos, SP, anny@daad-alumni.de, luiz.mattoso@embrapa.br, maria-alice.martins@embrapa.br

(2) Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, Rodovia Washington Luís, km 235, SP-310, 13565-905, São Carlos, SP, beatriz.cruzmermejo@gmail.br, jheyecristina@hotmail.com

(3) Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, julianoufmg@yahoo.com.br

**Resumo:** A *Spirulina platensis* é uma microalga de crescente interesse comercial devido a sua aplicabilidade nas áreas de nutrição, alimentos e farmácia. Dentre as diversas biomoléculas encontradas em sua composição, destaca-se a ficocianina (PC), estrutura protéica responsável pelo mecanismo de absorção da luz para conversão em biomassa. A PC é uma biliproteína com propriedade de fluorescência que a permite ser empregada em ensaios imunológicos e biomédicos. Realizou-se neste trabalho um estudo para identificação da PC na microalga seca em pó através das técnicas de espectroscopia de UV-Vis e difratometria de raios X. Os resultados mostraram que com a utilização destas técnicas apesar de não se encontrar isolada, a PC pode ser identificada na composição da microalga seca, após simples preparação de amostra. Isso demonstra que não há necessidade de prévia purificação da *Spirulina* para a identificação da PC na sua composição.

**Palavras-chave:** espectroscopia de UV-Vis, difratometria de raios X, *Spirulina platensis*, ficocianina, biliproteína.

## USE OF UV-VIS SPECTROSCOPY AND X-RAY DIFFRACTOMETRY IN THE IDENTIFICATION OF PHYCOCYANIN FROM MICROALGAE

**Abstract:** Commercial interest in exploiting the microalga *Spirulina platensis* is growing, due to its applicability in the areas of nutrition, food and pharmacy. Phycocyanin (PC) is one of the biomolecules found in the composition of *Spirulina*, a protein structure responsible for the transformation of light into biomass. PC has fluorescence properties that allow them to be used in immunoassays and other biomedical assays. In this work two techniques were used to identify the PC in the dry powdered microalga: UV-Vis spectroscopy, and X ray diffraction. The results showed that by using these techniques it is possible to identify the PC in the composition of microalgae dry, after simple sample preparation.

**Keywords:** UV-Vis spectroscopy, X-ray diffractometry, *Spirulina platensis*, phycocyanin, biliprotein.

### 1. Introdução

Além de ser uma fonte de proteínas, contendo entre 50 e 70% em massa, a microalga *Spirulina platensis* possui em sua composição lipídeos, minerais e vitaminas considerados importantes para o organismo de animais e humanos (MORAES, et al. 2010; PATEL, et al. 2005). Esta microalga tem despertado interesse não apenas para utilização como ingrediente nutricional e como corante natural para alimentos e cosmético, mas também por causa de suas propriedades positivas em tratamentos terapêuticos de doenças como Alzheimer e Parkinson e na prevenção de cânceres orais e cutâneos (CHEN, et al. 2006). A microalga *Spirulina* pertence ao grupo Cianobactéria, de microalgas azuis, unicelulares capazes de se agrregar formando filamentos. É facilmente cultivável em água, e comercialmente pode ser usada como uma fonte barata de biliproteínas (MORENO, et al. 1997; MORAES, et al. 2010).

O pigmento denominado ficocianina (PC) é responsável pela cor verde-azulada da *Spirulina*, e encontra-se conjugado a proteínas, ficobiliproteínas (PBP), responsáveis pelo mecanismo de absorção da luz para conversão em biomassa (PATEL, et al. 2005; MORAES, et al. 2010). As PBP são solúveis em água, por conseguinte, podem ser facilmente isolados (PATEL, et al. 2005), e são organizadas em estruturas uniformes compactas, os ficobilisomos (PBS), que são dispostos de maneira regular sobre a superfície exterior das lamelas fotossintéticas. A PC é eficiente em absorver comprimentos de onda na região do vermelho, amarelo, laranja e verde e tem propriedade de fluorescer, sendo por isso útil em aplicações biomédicas como marcador químico através da sua ligação com anticorpos e em numerosas aplicações em citometria de fluxo, histoquímica, ensaios imunológicos e de detecção de espécies reativas de oxigênio (MORAES, et al. 2010; MORENO, et al. 1997, BENEDETTI, et al. 2006; SWE-

ET, et al. 1977). A Figura 1 apresenta a estrutura da PC. A PC tem um alto valor agregado, e sua produção pode ser considerada um empreendimento atraente (MORAES, et al. 2010).

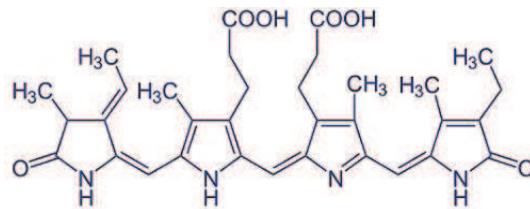


Figura 1. Estrutura da Ficocianina. (Fonte: Wikipedia.org).

A identificação deste pigmento pode ser realizada por espectroscopia de UV-Vis, pois se sabe que possui um máximo de absorção em 620 nm e; devido a sua estrutura, pode ser cristalizada, e com isso também pode ser identificada através de difratometria de raios X (BENEDETTI, et al. 2006; SWEET, et al. 1977).

Difração de raios-X é uma técnica analítica não destrutiva, que fornece informações detalhadas sobre a estrutura interna de substâncias cristalinas, que podem ser moléculas simples ou polímeros, solidificados em condições específicas. É muito empregada para a identificação de estruturas de proteínas (KATRIONA, 2001). A espectroscopia de UV-Vis por sua vez é empregada como técnica analítica para determinação da pureza da PC, avaliando-se a razão da absorção em  $\lambda=280$  nm e  $\lambda=620$  nm (PATEL, et al. 2005; CHEN, et al. 2006).

Neste trabalho, foram utilizadas essas duas técnicas de caracterização para a identificação do pigmento PC em Spirulina comercial de cultivo brasileiro (Fazenda Tamanduá, PB). O objetivo foi verificar se a determinação da PC pode ser realizada sem o prévio processamento e purificação da Spirulina, desta forma estas técnicas foram utilizadas para identificação qualitativa.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Espectroscopia de UV-Vis

Amostras de *Spirulina* em pó comercial obtida da Fazenda Tamanduá (PR) foram suspensas em 100 mM de tampão fosfato de sódio pH 7 nas concentrações de 0,5, 1,0, 1,5 e 5% (m/v), e homogeneizados num banho de ultra-sons durante 15 minutos. Depois disso, a suspensão foi filtrada usando papel de filtro de porosidade de 25  $\mu$ m e os espectros de absorção das soluções foram obtidos em um equipamento de UV-Vis Shimadzu UV-160 IPC em cubetas de quartzo, e 1 cm do caminho ótico.

### 2.2. Difratometria de Raios X

A caracterização de *Spirulina* por difratometria de raios X foi realizada através de um ensaio à temperatura ambiente com ângulos  $2\theta$  entre 5 e 40 ( $0,5^\circ\text{min}^{-1}$ ). O equipamento utilizado foi Shimadzu XRD-6000, operando a 30 kV e 30 mA com Cu Ka radiação de 0,154 nm.

## 3. Resultados e Discussão

Difratometria de raios X da *Spirulina* foi feita para investigar a formação cristalina da PC. O difractograma (Figura 2) mostra uma grande proeminência amorfa com valor máximo de  $2\theta$  de 20,5°. Essa estrutura amorfa está relacionada com a composição predominante hemicelulósica e menos celulósica de carboidratos das algas verde-azulandas (DOMOZYCH, et al., 1980). Em adição a isto, existe uma pequena elevação em  $2\theta$  de 10,5° e um pico acentuado definido em  $2\theta$  de 28,5°. Este pico agudo em 28,5° está provavelmente relacionado com as formações cristalinas da PC conjugada com a PBP na *Spirulina*, concordando com a literatura relata que a PC de muitas espécies de algas verde-azulandas pode ser isolada e cristalizada, inclusive a da *Spirulina platensis* (MORENO et al., 1997; SWEET, 1977). Na *Spirulina* estudada neste trabalho, esta proteína PBP pode ter sido cristalizada no tratamento de secagem desta *Spirulina* comercial, que é vendida para a suplementação de alimentos em forma de pó seco.

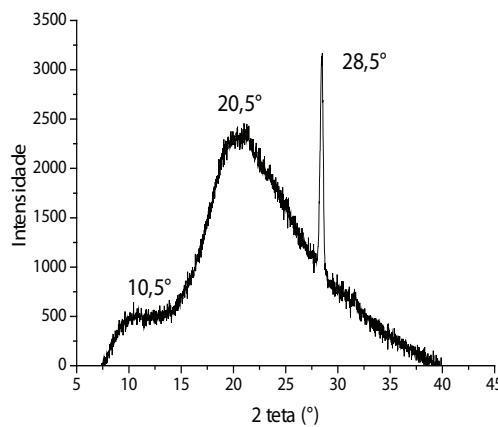


Figura 2. Difratometria de raios X da *Spirulina platensis*.

Os espectros de absorção de soluções com concentrações crescentes de *Spirulina* são mostrados na Figura 3. A forte capacidade de absorção da PC a 620 nm é relacionada com a cor verde-azulada de proteínas solúveis que são subunidades da PC. Além do pico característico de PC em 620 nm, fortes picos de absorbância inferiores a 300 nm confirmam a presença de muitas outras proteínas celulares (PATEL et al., 2005; CHEN et al., 2006).

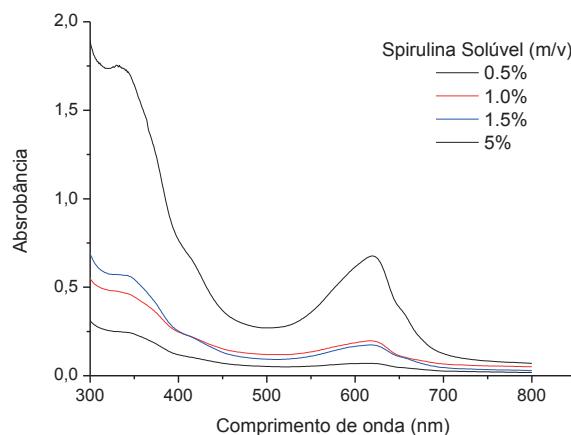


Figura 3. Caracterização por UV-Vis da *Spirulina platensis*.

#### 4. Conclusões

A proteína ficocianina, de importante valor comercial e diversas aplicações, foi identificada em *Spirulina platensis* comercial em pó, sem ser previamente isolada ou purificada de seu extrato bruto em pó. Foram utilizadas as técnicas de espectroscopia de UV-Vis e difratometria de raios X, qualitativamente. Isso demonstra que não há necessidade de prévia purificação do composto para a identificação de PC.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem ao Projeto MP1 Rede Agronano – Embrapa, à Capes, ao CNPq e FINEP.

#### Referências

- BENEDETTI, S.; RINALDUCCI, S.; BENVENUTI, F.; FRANCOGLI, S.; PAGLIANARI, S.; GIORGIO, L.; MICHELONI, M.; D'AMICI, G.M.; ZOLLA, L.; CANESTRARI, F. Purification and characterization of phycocyanin from the blue-green algae *Aphanizomenon flos-aquae*. *Journal of Chromatography B*, v. 833, p. 12-18, 2006.
- CHEN, T.; WONG, Y-S.; ZHENG, W. Purification and characterization of selenium-containing phycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis*. *Phytochemistry*, v. 67, p. 2424-2430, 2006.
- DOMOZYCH, D.S.; STEWART, K.D.; MATTOX, K.R. The comparative aspects of cell wall chemistry in the green algae (Chlorophyta). *Journal of Molecular Evolution*, v. 15, p. 1-12, 1980.
- KATRIONA, K. High-throughput protein crystallography. *Chemical Innovation* v.31, n.3, p. 22-27, 2001.

- MORENO, A.; BERMEJO, r.; TALAVERA, E.; ALVAREZ-PEZ, J.M.; SANZ-APARICIO, J.; ROMERO-GARRIDO, A. Purification, crystallization and preliminary X-ray Diffraction studies of C-Phycocyanin and Allo-phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Acta Cryst. v. D53*, p. 321-326, 1997.
- MORAES, C.C.; BURKERT, J.F.M.; KALIL, S.J. C-Phycocyanin extraction process for large-scale use. *Journal of Food Biochemistry v.34*, p.133-148, 2010.
- PATEL, A.; MISHRA, S.; PAWAR, R.; GHOSH, P.K. Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expression and Purification, v. 40*, p. 248-255, 2005.
- SWEET, R.M.; FUCHS, H.E.; FISCHER, R.G.; GLAZER, A.N. Preliminary crystallographic investigations of two phycobiliproteins. *The Journal of Biological Chemistry v. 252*, p. 8258-8260, 1977.