



AVALIAÇÃO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E CITOTOXICIDADE DA FICOCIANINA COMO SUBSTRATO DA *Arthrospira platensis*: UM ESTUDO *in vitro*

Geovana Bezerra Brum Lima¹
geovana.brum@upe.br
Denilma Lima da Silva¹
lima.denilma@gmail.com
Luiza Rayanna Amorim de Lima¹
luiza.amorim@upe.br
Daniela de Araújo Viana Marques²
daniela.viana@upe.br

¹Universidade de Pernambuco - Campus Garanhuns

²Universidade de Pernambuco – Instituto de Ciências Biológicas

INTRODUÇÃO

O câncer é um grave problema de saúde pública, considerada atualmente a segunda principal causa de morte no mundo, 29,9% de incidência. Tratamentos convencionais: cirurgia, quimioterapia e radioterapia propiciam complicações subsequentes pulmonares, cardíacas, urinárias e musculoesqueléticas. Neoplasia Maligna Cavidade Oral (CID - 10 - C060), sendo 90% os Carcinomas de Células Escamosas, estima-se 15.100 novos casos a cada ano no Brasil, mais de 40% de mortalidade. Além do custo médio total para manejo terapêutico de baixa e alta intensidade do câncer (R\$ 370mi e R\$ 1bi) pelo SUS. (INCA, 2023; FIOCRUZ, 2023; WANG, 2007).

As microalgas são grupos de microrganismos fotossintetizantes e fermentadores de fácil cultivo em ambientes salinos e alcalinos. A *Arthrospira platensis* (A.p.), alga azul-esverdeada é uma das espécies do grupo das cianobactéria, intercessão entre plantas verdes e bactérias fotossintetizantes. Pertence à família *Cyanophyceae*; rica fonte de proteínas, 70% da sua biomassa como ficobiliproteínas, vitaminas E e B12, ácidos graxos como o ácido gama-linoleico e pigmentos como β -caroteno (BORBA & FERREIRA, 2018; MAIA, 2018).

Destaca-se, entre elas, a Ficocianina (FC) purificada com efeitos antineoplásicos como agente radioprotetor e terapêutico na ativação linfocitária em resposta imunológica. Sua citotoxicidade previne e inibe diferenciação e proliferação celular dose-dependente, baixo potencial agressor à célula saudável (AMBROSI *et al.*, 2018; SBARDELOTTO, 2013).

Desenvolver, portanto, compostos naturais com FC como substrato aquoso extraído da A.p para uso como antineoplásico de baixo custo (aquisição e extração), cultivo rápido e contínuo, fácil administração e boa aceitação metabólica, já comprovada, torna-se alternativa válida para analisar melhores métodos de extração e avaliar seu potencial anticâncer *in vitro* na linhagem SCC-9 de Carcinoma de Células Escamosas Orais (DERNER, 2006, CARLOS, 2020).

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta da Biomassa

Arthrospira platensis (A.p.) obtidas da coleção da Universidade do Texas serão cultivadas em meios padronizados (SCHLÖSSER, 1982) em frascos de Erlenmeyers com capacidade de 400 mL, aeração e iluminação constantes, concentração celular inicial de 50mg/L, temperatura 28 ± 2 °C e iluminância de 45 ± 5 μmol fótons $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Coleta da biomassa será por filtração em malha 60 μm , ao fim da fase de crescimento exponencial, será lavada com água destilada para remoção do sal e congelada (-20 ± 2 °C por 24 h) para posterior extração da Ficocianina (FC). (LISBOA, 2015)

Métodos de Extração



O primeiro método de extração foi de homogeneização da biomassa em solução contendo 1,5% de CaCl₂, agitação magnética 7000 rpm, em banho de gelo por 15 min. O segundo método, a biomassa será diluída em solução tampão de fosfato de sódio, pH 7,4 e Sonicada a 40 kHz por 15 min.

Quantificação da Ficocianina Extraída

A concentração FC da Ficocianina será definida pela leitura da absorbância Espectrofotômetro 615 e 652nm e da determinação da biomassa:

$$FC = \frac{A_{615} - 0,474 \times A_{652}}{5,34} \left(\frac{mg}{ml} \right) \quad (1)$$

O grau de pureza do extrato de FC. PE = pureza do extrato; Abs₆₁₅ = leitura da amostra a 615nm e Abs₂₈₀ = leitura da amostra a 280nm:

$$PE = \frac{A_{615}}{A_{280}} \quad (2)$$

O rendimento de FC para os diferentes métodos de extração foi calculado: R, rendimento (mg/g), CF concentração de FC extraída (mg/mL); V volume do solvente (mL) e BD biomassa peso seco (g):

$$R \left(\frac{mg}{g} \right) = \frac{CF \cdot V}{BD} \quad (3)$$

Ensaio Clonogênico

Para a realização do experimento, 2x10³ células foram incubadas com Ficocianina como substrato da *A. platensis* em PBS 0,1M por 48h. As células são retiradas dos poços e incubadas em placa de 24 poços (100 células/poço). O meio foi trocado sem estímulo a cada três dias por 14 dias. Logo após, as células serão fixadas com metanol e acetona 1:1, lavadas com PBS 0,1M e coradas com cristal violeta 1% para, finalmente, realizar a contagem manual das colônias.

Análises Estatísticas

Realizou-se 3 experimentos independentes, em triplicata, cada ensaio o resultado expresso em média ± erro padrão da média (EPM) e analisada estatística com o Test T ou a análise de variância (ANOVA) com pós-teste. Resultados significativos apresentaram p < 0,05. Os dados foram analisados em programa GraphPad Prism versão 9.5.1 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do apresentado quanto às possibilidades e fatores benéficos no uso da FC como extrato da *A.p.*, esperou-se comprovar efeitos positivos em sua aplicação como terapia antineoplásica. Os resultados não só confirmam a literatura quanto ao método de Sonicação estabilizar a extração proteica, mas traz rendimento e pureza acima do realizado em outros estudos de mesmo tampão, sendo a concentração FC, rendimento e pureza com CaCl₂ por Sonicação o mais eficiente. Ademais, caso a pureza, na razão Abs⁶²⁰/Abs²⁸⁰, for < 1, pode ser usado nas indústrias de alimentos e cosméticos, se ≥ 4 na indústria farmacêutica. Assim, os extratos obtidos neste trabalho podem ser utilizados para ambas as indústrias. (REIS *et al.*, 1998; GUAN *et al.*, 2016).

Tabela 1. Melhores resultados do processo de extração da ficocianina de *A. platensis* em diferentes métodos e solventes de extração com.

Tipo de Solvente	Método de Extração	Concentração (mg/mL)	Rendimento (mg/g)	Pureza (A ₆₁₅ /A ₂₈₀)
PBS	Homogeneização	9,13	91,34	0,99
TRIS-HCL		7,54	75,39	0,75
CaCl ₂		4,13	41,26	1,50
CaCl ₂	Sonicação	18,50	184,98	4,08
TRIS-HCL		13,65	136,54	2,81
PBS		6,84	68,36	2,95

Fonte: Próprio Autor, 2023.



Entretanto para as etapas seguintes de investigação da viabilidade celular e avaliação do efeito antineoplásico se utilizou do extrato obtido por homogeneização no solvente PBS, pois já foi evidenciado por nosso grupo de pesquisa que tem baixa toxicidade em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) *in vitro*. Resultou em 100% de inibição nas células da linhagem SCC-9 nas concentrações 41,83; 83,33 e 166,66µg/mL (IC50 de 26µg/mL).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Assim, a possibilidades de ampliar terapêuticas alternativas de baixo custo e menor grau lesivo no manejo terapêutico do Câncer no Brasil pode conduzir melhor prognóstico e qualidade de vida dos pacientes. O processamento técnico e administrativo, a compra de materiais de uso único e contínuo, de substratos e células necessárias, foi suprido e bem aproveitado por equipe de alto rendimento, alcançando resultados favoráveis aos objetivos propostos. Ademais, o vigente trabalho consolidou o eixo de pesquisa científica e trouxe perspectivas comerciais futuras favoráveis na indústria alimentícia e farmacêutica a baixos custos.

PALAVRAS-CHAVE: Carcinoma de Células Escamosas Oral, Ficocianina, Antineoplásicos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio da agência de fomento Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) nº processo: IBPG-0482-4.00/22, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que permitiram o desenvolvimento a interiorização das atividades de pesquisa.

Referências

- AMBROSI, M. A. *et al.* **Propriedades de saúde de Spirulina spp.** 2008. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2008.
- BORBA, V. I. A. & FERREIRA, C. L. S. **Cianobactéria Arthrospira (Spirulina) Platensis: Biotecnologia e Aplicações.** 2018. Centro de Pós-graduação, Pesquisa e Extensão Oswaldo Cruz, 2018, 23 p.
- CARLOS, T. A. V. **Extração pressurizada de ficobiliproteínas da microalga Arthrospira platensis e avaliação da sua atividade antioxidante e citotoxicidade in vitro em linhagens cancerígenas.** 2020.
- DERNER, R. B. *et al.* **Microalgas, produtos e aplicações.** 2006, 1959 p.
- FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (Brasil). **Quanto custa o câncer?** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2023.
- GUAN, S. **Extracting phycocyanin from spirulina and hydrothermal liquefaction of its residues to produce bio-crude oil.** 2016.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **Câncer: Números de Câncer.** Rio de Janeiro: INCA, 2023.
- LISBOA, F. C. *et al.* **Viabilidade técnica e análise de custos de diferentes meios para o cultivo de Arthrospira platensis.** 2015.
- MAIA, H. D. **Potencial bioativo de extratos da microalga Arthrospira platensis.** Fortaleza: Centro de Ciências Agrárias, 2018.
- REIS, A. *et al.* **Production, extraction and purification of phycobiliproteins from Nostoc sp. Bioresource technology.** 1998. 181 p.
- SCHLÖSSER, U. G. S. V. A. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft.** 1982. 181 p.
- WANG, H. *et al.* **The recombinant β subunit of C-phycocyanin inhibits cell proliferation and induces apoptosis.** 2007. Cancer letters, 2007, 150 p.