



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Estudo da Extração e Purificação de Ficocianina e Aloficocianina da Biomassa de *Arthrospira platensis*

RENATA KLÍCIA MENDES CAETANO

ORIENTADOR: Prof.º Dr.º Gabriel Luis Castiglioni

COORIENTADORA: Profa. Dra. Fernanda Freitas Ferreira

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

GOIÂNIA – 2018

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Renata klícia Mendes Caetano

Título do trabalho: Estudo da Extração e Purificação de Ficocianina e Aloficocianina da biomassa de *Arthrospira platensis*

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento **SIM** **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:

Assinatura do(a) orientador(a)
Prof. Gabriel Casagholini
Escola de Engenharia e
Engenharia de Alimentos

Data: 28 / 09 / 2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Versão atualizada em setembro de 2017.

² A assinatura deve ser escaneada.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Estudo da Extração e Purificação de Ficocianina e Aloficocianina da Biomassa de *Arthrospira platensis*

RENATA KLÍCIA MENDES CAETANO

ORIENTADOR: Prof.º Dr.º Gabriel Luis Castiglioni

COORIENTADORA: Profa. Dra. Fernanda Freitas Ferreira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, como requisito para a obtenção do título de mestre em Engenharia Química.
Área de concentração: Desenvolvimento de processos.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Caetano, Renata Klícia Mendes

Estudo da Extração e Purificação de Ficocianina e Aloficocianina da biomassa de *Arthrospira platensis* [manuscrito] / Renata Klícia Mendes Caetano. - 2018.

xxi, 82 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni; co orientadora Dra. Dra. Fernanda Ferreira Freitas.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Goiânia, 2018.

Bibliografia.

Inclui abreviaturas, símbolos, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Spirulina. 2. ficobiliproteínas. 3. polietilenoglicol 4000. 4. Polímeros catiônicos com baixo teor de cloro. I. Castiglioni, Prof. Dr. Gabriel Luis, orient. II. Título.

CDU 66.0



Universidade Federal de Goiás

Instituto de Química

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Ata da defesa de Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás.

Ao dia 29 (vinte e nove) de Agosto do ano de 2018 (dois mil e dezoito), com início às 08:30 hs (oito horas e trinta minutos) no Instituto de Química da UFG, reuniu-se a Banca Examinadora, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni, Profª. Drª. Fernanda Ferreira Freitas, Profª. Drª. Inti Doraci Cavalcanti Montano e Prof. Dr. Armando Garcia Rodriguez, sob a presidência do primeiro, para julgar a dissertação de Renata Klícia Mendes Caetano intitulada: "Estudo da Extração e Purificação de Ficocianina e Aloficocianina da biomassa de *Arthrospira platensis*" como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. O presidente da Banca Examinadora abriu a sessão prestando esclarecimentos sobre os trâmites da avaliação e, em seguida, passou a palavra à candidata para que a mesma fizesse uma exposição do seu trabalho. Terminada a exposição, a candidata foi arguida pelos membros da Banca Examinadora e, após as arguições, foi determinado um intervalo de tempo para que a banca, em sessão fechada, procedesse ao julgamento do trabalho. O resultado do julgamento foi o seguinte:

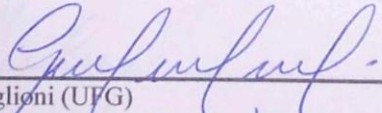
Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni: APROVADA
Profª. Drª. Fernanda Ferreira Freitas: Aprovada
Profª. Drª. Inti Doraci Cavalcanti Montano: Aprovada
Prof. Dr. Armando Garcia Rodriguez: APROVADO

A seguir, na presença do público e da candidata, o presidente da Banca Examinadora declarou que Renata Klícia Mendes Caetano, candidata ao título de Mestre em Engenharia Química foi:

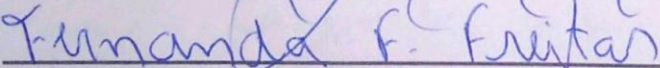
Aprovada (X); Reprovada ().

Este resultado deverá ser homologado pela Coordenadoria de Pós-Graduação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do IQ/UFG. Nada mais havendo a tratar, o Senhor Presidente cumprimentou a candidata e encerrou os trabalhos. E para constar, eu, Prof. Dr. Christian Gonçalves Alonso, lavrei a presente ata que segue assinada pelos membros da banca examinadora.

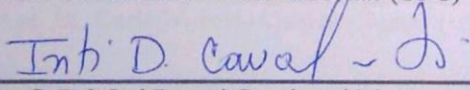
Goiânia, 29 de Agosto de 2018.



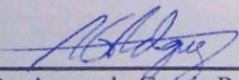
Prof. Dr. Gabriel Luis Castiglioni (UFG)



Profª. Drª. Fernanda Ferreira Freitas (UFG)



Profª. Drª. Inti Doraci Cavalcanti Montano (UFG)



Prof. Dr. Armando Garcia Rodriguez (UFG)

Para realizar grandes conquistas,
devemos não apenas agir, mas também
sonhar; não apenas planejar, mas
também acreditar.

Anatole France

Dedico primeiramente a Deus pela oportunidade de realizar este sonho.

Dedico ao meu primeiro e verdadeiro amor, minha Mãe Célia, por ter me ensinado e instruído sempre.

AGRADECIMENTOS

Obrigada primeiro a Deus que me possibilitou realizar este sonho, que nasceu e foi crescendo em meu coração e se tornando uma grande realização pessoal e profissional.

Obrigada à mulher mais incrível e inspiradora desta minha existência, minha mãe, que se mostrou uma guerreira deste que eu estava em seu ventre, e lutou incansavelmente por mim e pelos meus irmãos por todos os dias até hoje.

Agradeço ao meus irmãos, Heloísio e Frederico, que me inspiram a cada dia e me apoiam sempre fortalecendo minha confiança em mim.

Agradeço o incentivo recebido das minhas irmãs de coração, Kellen e Jacqueline, que sempre me apoiaram e se disponibilizaram a me ajudar.

Agradeço ao meu amigo, companheiro, namorado Wanderson, que esteve ao meu lado e sempre me ajudou a me levantar, mesmo quando eu mesma não acreditava ser possível.

Agradeço à minha amiga Raíza Cavalcante, que iniciou comigo este sonho e que me incentivou sempre a conquistar este objetivo.

Ao professor Gabriel Castiglioni, que me escolheu para ser sua aluna e que, ao longo desta jornada, me presenteou com sua paciência, seus conhecimentos, sua amizade e sua confiança, sempre estando ao meu lado e possibilitando ultrapassar todos os obstáculos que esta jornada apresentou.

À coordenadora Fernanda, que me deu o suporte necessário me ajudando a resolver as adversidades que apareciam. À empresa Brasil Vittal, situada na cidade de Anápolis/Goiás, que se disponibilizou e me ajudou neste projeto.

Agradeço aos professores do Programa PPGEQ pelas orientações durante esta jornada, pois foram de extrema importância para a concretização dos trabalhos.

Aos técnicos Msc. Bruno, Deives, Ana Paula, Dr.^a Aysha Jussara, Msc. Rodrigo, que sempre se disponibilizaram e me ajudaram com seus conhecimentos.

Agradeço à minha família PPGEQ, meus colegas de turma que se tornaram companheiros de luta, Lisie, Carla, Jarbas e Ivo. Agradeço à amiga e companheira

de horas de Laboratório, Julie, que me acompanhou e me ensinou e aprendeu comigo as lições desta jornada e deste mestrado.

Agradeço imensamente à minha amiga, irmã de mestrado, Julliana Paixão, que se tornou uma companheira de luta e uma amiga para todas as horas, levarei comigo esta amizade para toda a vida.

Agradeço ao amigo de longa data, Marcos Flávio, que sempre esteve ao meu lado nesta jornada e me ajudou a atravessar todos os obstáculos.

Agradeço à minha professora e amiga Caroline Winter, que foi de suma importância em vários momentos desta jornada do mestrado.

Agradeço aos meus amigos Maria Carolina e Pablo Duarte, que sempre se disponibilizaram a me ajudar com todas as minhas dúvidas e os meus anseios.

Agradeço aos amigos, Lorena, Grazielly, Lucilene, José Fernando, Janaina, que estiveram ao meu lado auxiliando-me, incentivando-me, dando-me suporte em vários momentos desta jornada.

Agradeço ao Professor Mamede e aos amigos da UEG/Pires do Rio, pois sem o apoio de vocês eu não teria conseguido alcançar este sonho.

Agradeço à minha professora/amiga e meu exemplo de pessoa e profissional Nastia Coelho, por me incentivar e acreditar em mim.

Agradeço aos meus queridos professores e amigos, professora Luciana Casaletti, Professor Flávio, Professora Valeria Maitan, Paulo Valverde, que se tornaram mestres e amigos nesta jornada profissional ao qual sigo.

Agradeço ao Pastor Amilton por confiar em mim e me fazer acreditar que eu conseguiria esse sonho tão almejado.

Agradeço a tantos os outros que passaram pela minha estrada nessa jornada e de alguma forma contribuíram para que esse sonho, essa realização pessoal fosse possível. Imensa gratidão a todos, muito muito obrigada por sonharem comigo e agora estarem realizando esta conquista juntamente comigo. Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xviii
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xix
RESUMO.....	xx
ABSTRACT.....	xxi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1.OBJETIVO GERAL.....	4
2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1.APLICAÇÕES DE MICRORGANISMOS EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS.....	5
3.2.CORANTES ARTIFICIAIS E CORANTES NATURAIS.....	11
3.2.1 Ficobiliproteínas.....	14
3.2.2 Ficocianina.....	15
3.2.3 Aloficocianina.....	17
3.3 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE FICOBILIPROTEÍNAS.....	18
3.3.1 Rompimento celular por ciclos de congelamento e descongelamento.....	19
3.3.2 Sistema Aquoso Bifásico – SAB.....	20
3.3.3 Polietilenoglicol.....	23
3.3.4 Polímero Catiônico com baixo teor de cloro - PBC.....	24
3.3.5 Sais Utilizados nos SABs.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1.OBTENÇÃO DA BIOMASSA DE Spirulina.....	27
4.2.CULTIVO DE Spirulina.....	27
4.3.DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR.....	28
4.4.EXTRAÇÃO DA FICOCIANIA BRUTA E PRÉ-PURIFICADA.....	29
4.5.DEFINIÇÃO DAS FAIXAS DE pH.....	29
4.5.1 Teste preliminar para definição do pH.....	29
4.5.2 Preparação das soluções de fosfato/PEG/PBC.....	30
4.6.EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA FICOCIANINA E ALOFICOCIANINA COM SAB.....	32

4.7. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	34
4.8. CONCENTRAÇÃO DA FICOCIANINA	36
4.9. CONCENTRAÇÃO DE ALOFICOCIANINA	36
4.10. DETERMINAÇÃO DE PUREZA	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
5.1. ESTUDO DO pH.....	38
5.2. PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS.....	39
5.2.1 Planejamento Fatorial 2⁴ para Extração de Ficocianina utilizando Extrato Pré-Purificado de ficocianina e Extrato bruto de <i>Spirulina</i>	39
5.2.2 Planejamento Fatorial 2⁴ para Extração de Alococianina com Extrato Pré-Purificado de ficocianina e Extrato bruto de <i>Spirulina</i>	49
5.2.3 Planejamento Fatorial 2⁴ para Pureza com Extrato Pré-Purificado de ficocianina e Extrato bruto de <i>Spirulina</i>	56
5.2.4 Planejamento Experimental DCCR 2² Extração Ficocianina com Extrato Pré-Purificado de ficocianina e Extrato bruto de <i>Spirulina</i>	65
5.2.5 Planejamento Experimental DCCR 2² Extração Alococianina com Extrato Pré-Purificado de ficocianina e Extrato bruto de <i>Spirulina</i>	67
5.2.6 Planejamento Experimental DCCR 2² para Pureza com Extrato Pré-Purificado de ficocianina e Extrato bruto de <i>Spirulina</i>.....	69
6. CONCLUSÕES.....	71
7. SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS.....	72
8. REFERÊNCIAS	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A cianobactéria <i>Spirulina</i>	9
Figura 2 - Diagrama de fase em coordenadas retangulares de um Sistema aquoso bifásico de um polímero e um sal.....	21
Figura 3 - Montagem sistema SAB para extração de ficobiliproteínas.	33
Figura 4 - Resultados dos testes preliminares para obtenção da melhor faixa de pH para extração de ficocianina e aloficocianina.	39
Figura 5 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e PEG para Concentração de Ficocianina com Extrato Pré-Purificado de Ficocianina.	42
Figura 6 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e PEG para Concentração de Ficocianina com Extrato Bruto de <i>Spirulina</i>	43
Figura 7 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PEG e pH para Concentração de Ficocianina com Extrato Pré-Purificado de Ficocianina.....	44
Figura 8 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PEG e pH para Concentração de Ficocianina com Extrato Bruto de <i>Spirulina</i>	44
Figura 9 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PEG e Volume Tampão para Concentração de Ficocianina com Extrato Pré-Purificado de Ficocianina.....	45
Figura 10 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PEG e Volume Tampão para Concentração de Ficocianina com Extrato Bruto de <i>Spirulina</i>	45
Figura 11 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e pH para Concentração de Ficocianina com Extrato Pré-Purificado de Ficocianina.....	46
Figura 12 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e pH para Concentração de Ficocianina com Extrato Bruto de ficocianina	46
Figura 13 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e Volume Tampão para Concentração de Ficocianina com Extrato Pré-Purificado de Ficocianina.....	47
Figura 14 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e Volume Tampão para Concentração de Ficocianina com Extrato Bruto de <i>Spirulina</i>	47
Figura 15 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação pH e Volume Tampão para Concentração de Ficocianina com Extrato Pré-Purificado de Ficocianina.....	48

Figura 16 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação pH e Volume Tampão para Concentração de Ficocianina com extrato bruto de <i>Spirulina</i>	48
Figura 17 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e PEG para Concentração de aloficocianina com Extrato Pré-Purificado de Ficocianina	50
Figura 18 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e PEG para Concentração de aloficocianina com Extrato Bruto de <i>Spirulina</i>	51
Figura 19 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PEG e pH para Concentração de aloficocianina com Extrato Pré-Purificado de Ficocianina	51
Figura 20 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PEG e pH para Concentração de aloficocianina com Extrato bruto de <i>Spirulina</i>	52
Figura 21 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PEG e Volume tampão para Concentração de aloficocianina com Extrato Pré-Purificado de Ficocianina	52
Figura 22 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PEG e Volume tampão para Concentração de aloficocianina com Extrato bruto de <i>Spirulina</i>	53
Figura 23 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e pH para Concentração de aloficocianina com Extrato Pré-Purificado de Ficocianina	53
Figura 24 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e pH para Concentração de aloficocianina com Extrato Bruto de <i>Spirulina</i>	54
Figura 25 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e Volume Tampão para Concentração de aloficocianina com Extrato pré-purificado de Ficocianina	54
Figura 26 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e Volume Tampão para Concentração de aloficocianina Extrato Bruto de <i>Spirulina</i>	55
Figura 27 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação pH e Volume Tampão para Concentração de aloficocianina com Extrato pré-purificado de Ficocianina	55
Figura 28 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação pH e Volume Tampão para Concentração de aloficocianina com Extrato bruto de <i>Spirulina</i>	56
Figura 29 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e PEG para Pureza com Extrato pré-purificado de Ficocianina	58

Figura 30 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e PEG para Pureza com Extrato Bruto de <i>Spirulina</i>	58
Figura 31 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PEG e pH para Pureza utilizando Extrato pré-purificado de Ficocianina	59
Figura 32 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PEG e pH para Pureza utilizando Extrato Bruto de <i>Spirulina</i> ..	59
Figura 33 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PEG e V. Tampão para Pureza utilizando Extrato pré-purificado de Ficocianina	60
Figura 34 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PEG e V. Tampão para Pureza utilizando Extrato Bruto de <i>Spirulina</i>	60
Figura 35 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e pH para Pureza utilizando Extrato pré-purificado de Ficocianina	61
Figura 36 - Superfície de Resposta da Relação PBC e pH para Pureza do Extrato utilizando Extrato Bruto de <i>Spirulina</i>	61
Figura 37 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e Volume Tampão para Pureza utilizando Extrato pré-purificado de Ficocianina	62
Figura 38 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e Volume Tampão para Pureza utilizando Extrato Bruto de <i>Spirulina</i>	62
Figura 39 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação pH e V. Tampão para Pureza utilizando Extrato pré-purificado de Ficocianina	63
Figura 40 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação pH e V. Tampão para Pureza utilizando Extrato Bruto de <i>Spirulina</i>	63
Figura 41 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e PEG para Pureza utilizando Extrato pré-purificado de Ficocianina para o DCCR ²	66
Figura 42 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e PEG para Pureza utilizando Extrato Bruto de <i>Spirulina</i> para o DCCR ²	66
Figura 43 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e PEG para concentração de Alococianina utilizando Extrato pré-purificado de Ficocianina para o DCCR ²	68
Figura 44 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e PEG para concentração de Alococianina utilizando Extrato Bruto de Ficocianina para o DCCR ²	68

Figura 45 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e PEG para Pureza utilizando Extrato pré-purificado de Ficocianina para o DCCR ²	70
Figura 46 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e PEG para Pureza utilizando extrato bruto de <i>Spirulina</i> DCCR ²	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação de composições gerais de alguns alimentos e Microalgas (% matéria seca)	10
Tabela 2 - Corantes Naturais, sintéticos, sintéticos idênticos aos Naturais e Corantes inorgânicos permitidos no Brasil.....	13
Tabela 3 - Massa molecular e comprimento de onda da Aloficocianina, Ficocianina e Ficoeritrina.....	14
Tabela 4 - Percentual de biomassa de ficobiliproteínas em espécies diferentes de cianobactérias.....	15
Tabela 5 - Composição do meio de cultivo para produção da <i>Spirulina platensis</i>	27
Tabela 6 - Tabela preparação da solução de fosfato.....	31
Tabela 7 - Matriz dos ensaios do Planejamento fatorial 2^4 com níveis codificados e reais das variáveis estudadas.....	35
Tabela 8 - Matriz dos ensaios do DCCR 2^2 com níveis codificados e reais das variáveis estudadas.....	35
Tabela 9 - Fatores do planejamento experimental 2^4 para extração e purificação de Ficocianina utilizando Extrato Pré-Purificado de Ficocianina	40
Tabela 10 - Fatores do planejamento experimental 2^4 para extração e purificação de Ficocianina utilizando Extrato Bruto de <i>Spirulina</i>	41
Tabela 11 - Fatores do planejamento experimental 2^4 para extração de Aloficocianina para extrato pré-purificado de Ficocianina	49
Tabela 12 - Fatores do planejamento experimental 2^4 para extração de Aloficocianina para extrato bruto de <i>Spirulina</i>	50
Tabela 13 - Fatores do planejamento experimental 2^4 para Pureza utilizando extrato pré-purificado de Ficocianina	57
Tabela 14 - Fatores do planejamento experimental 2^4 para Pureza utilizando o Extrato bruto de <i>Spirulina</i>	57
Tabela 15 - Parâmetros da Regressão da Concentração de Ficocianina para Extrato Pré-Purificado de Ficocianina para o Planejamento DCCR 2^2 ...	65
Tabela 16 - Parâmetros da Regressão da Concentração de Ficocianina para Extrato Bruto de <i>Spirulina</i> para o Planejamento DCCR 2^2	65
Tabela 17 - Parâmetros da Regressão da Concentração de Aloficocianina para Extrato Pré-Purificado de Ficocianina para o DCCR 2^2 -	67
Tabela 18 - Parâmetros da Regressão da Concentração de Aloficocianina para Extrato Bruto de <i>Spirulina</i> para o DCCR 2^2	67
Tabela 19 - Parâmetros da Regressão da Concentração de Pureza para Extrato Pré-Purificado de Ficocianina para o Planejamento DCCR 2^2 ...	69

Tabela 20 - Parâmetros da Regressão da Concentração de Pureza para Extrato Bruto de <i>Spirulina</i> DCCR2 ²	69
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Absorbância
AGL	Ácidos graxos Livres
ALO	Aloficocianina
ANOVA	Análises De Variância
C	Concentração ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)
$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$	Citrato de Sódio
CaCl_2	Cloreto de cálcio
COOH	Ácido carboxílico
DCCR	Delineamento composto central rotacional
FAO	Food And Agriculture Organization
FDA	Food and Drug and Administration
FE	Ficoeritrina
FeSO_4	Sulfato de ferro
FICO	Ficocianina
GRAS	Generally Recognized as Safe
H	Íon De Hidrogênio
H_3BO_3	Ácido bórico
CUSO_4	Sulfato de Cobre
K_2HPO_4	Fosfato de Potássio
K_2SO_4	Sulfato de potássio
MgSO_4	Sulfato de magnésio
MnCl_2	Cloreto de manganês
MoO_3	Trióxido de molibdênio
Na_2SO_3	Sulfito de sódio
Na_2SO_4	Sulfato de Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO_3	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
PBC/SBC	Polímero Catiônico com baixo teor de cloro/Polímero de Baixo catiônico
PEG	Poli(etil)enoglicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
PZ	Pureza
RDC	Resolução de diretoria colegiada
SAB	Sistema Aquoso Bifásico
ZNSO_4	Sulfato de zinco

LISTA DE SÍMBOLOS

-	Subtração
%	Porcentagem
% p/v	Porcentagem de massa em 100 mL de solução
% v/v	Porcentagem de volume em 100 mL de solução
/	Divisão
+	Soma
=	Igualdade
°C	Graus Celsius
atm	Pressão atmosfera
h	Horas
RPM	Rotação por minuto

Estudo da Extração e Purificação de Ficocianina e Aloficocianina da Biomassa de *Arthrospira platensis*

RESUMO

O crescente interesse por compostos bioativos de fontes naturais renováveis tem estimulado cada vez mais estudos que visam aumentar a oferta deste mercado. Um exemplo são as ficobiliproteínas, corantes utilizados em diversas áreas, como alimentícia, farmacológica e cosmética. A microalga *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) é um dos organismos que mais se destaca na produção destes corantes, produzindo a Aloficocianina e, principalmente, a Ficocianina, sendo estes dois corantes os que, hoje, mais têm demanda no mercado. Essas proteínas têm sua aplicação determinada a partir de seu grau de pureza, obtido com a relação da absorbância lida a 620 nm do extrato utilizado pela absorbância lida de 280 nm. Para utilização destes corantes na área alimentícia, deve-se obter valor de pureza maior que 0,7 e para sua utilização na área analítica, a pureza deve ser maior que 4,0. Tendo em vista a importância destes corantes e seu grau de pureza, a fim de se desenvolver meios de obtenção das ficobiliproteínas em um grau de pureza satisfatório para utilização em indústrias alimentícias, foram utilizadas técnicas de separação por fases em sistemas aquosos bifásicos (SAB) para avaliar a ação do pH, da concentração de sal fosfato, e da concentração dos polímeros catiônicos com baixo teor de cloro e polietilenoglicol 4000 (PEG 4000) na eficiência do processo de extração e purificação do extrato bruto da *Spirulina*, e também, em extrato pré-purificado de ficocianina obtido por processo de centrifugação. Para tal, realizou-se um primeiro experimento utilizando um planejamento fatorial 2^4 para a avaliação das variáveis que mais influenciaram na extração e purificação da ficocianina, da aloficocianina e da pureza do extrato. Foram atingidos valores de $2,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ para concentração de ficocianina, valor de $1,4 \text{ mg.mL}^{-1}$ para concentração de aloficocianina e $1,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ para a pureza do extrato. Foi observada a significância dos polímeros PEG 4000 e polímeros catiônicos com baixo teor de cloro para extração e purificação das ficobiliproteínas. Então foi realizado um segundo delineamento, sendo um DCCR - Composto Central Rotacional 2^2 , fixando as variáveis de sal fosfato e pH; e variando as concentrações de PEG 4000 e polímeros catiônicos com baixo teor de cloro. Ao final da extração, foi possível encontrar concentrações de $2,7 \text{ mg.mL}^{-1}$ para Ficocianina, $1,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ de Aloficocianina e 2,5 para pureza do extrato, evidenciando que as técnicas utilizadas são eficazes para o processo de extração e purificação das ficobiliproteínas; em que os níveis alcançados permitem sua utilização e aplicação em indústrias do setor alimentício.

Palavras-chave: *Spirulina*, ficobiliproteínas, polietilenoglicol 4000, polímeros catiônicos com baixo teor de cloro.

Study of the Extraction and Purification of Phycocyanin and Allophycocyanin from Biomass of *Arthrospira platensis*

ABSTRACT

The growing interest in bioactive compounds from renewable natural sources has stimulated more and more studies aimed at increasing the supply of this market. An example is phycobiliproteins, dyes used in various areas, such as food, pharmacological and cosmetic. The microalgae *arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) is one of the organisms that stands out most in the production of these dyes, producing allophycocyanin and phycocyanin; these two dyes are the ones that today have more demand in the market. These proteins have their application determined from their degree of purity obtained with the absorbance ratio read at 620 nm of the extract used for the absorbance read at 280 nm. For use of these dyes, in the food area, a purity value greater than 0.7 should be obtained, and for use in the analytical area, the purity should be greater than 4.0. In view of the importance of these dyes and their degree of purity, in order to develop means of obtaining phycobiliproteins in a purity satisfactory for use in food industries, phase separation techniques were used in aqueous biphasic systems (ABS) to evaluate the action of pH, phosphate salt concentration and the concentration of low chlorine content cationic polymer and polyethylene glycol 4000 (PEG 4000) on the efficiency of the extraction and purification process of *Spirulina* crude extract and also in the pre-purified extract of phycocyanin obtained by centrifugation. For this, a first experiment was carried out using a factorial design 2^4 to evaluate the variables that most influenced the extraction and purification of phycocyanin, allophycocyanin and purity of the extract. Values of 2.6 mg.mL^{-1} were reached for phycocyanin concentration, 1.4 mg.mL^{-1} for the allophycocyanin concentration and 1.6 for the purity of the extract. The significance of the PEG 4000 and PBC polymers was observed for extraction and purification of phycobiliproteins. Then, a second design was carried out, a Rotational Central Composite Design (RCCD) 2^2 , fixing the phosphate salt, pH and varying the PEG and low chlorine content cationic polymer concentrations. At the end of the extraction, it was possible to find concentrations of 2.7 mg.mL^{-1} for Phycocyanin, 1.3 mg.mL^{-1} of allophycocyanin and 2.5 for the purity of the extract, evidencing that the techniques used are effective for the extraction process and purification of phycobiliproteins, in which the levels achieved allow their use and application in food industry.

Keywords: *Spirulina*, phycobiliproteins, polyethylene glycol 4000, low chlorine content cationic polymer.

1. INTRODUÇÃO

Uma das características que mais influenciam na aceitação de um produto é sua coloração, aspecto importante que está associado ao apelo visual e à qualidade de um alimento (ANTELO et al., 2008). Por haver uma crescente conscientização, por parte da população, quanto ao uso de corantes em alimentos, podemos observar que, apesar da utilização de corantes naturais ainda possuírem algumas desvantagens como instabilidade a outros compostos químicos, luz, oxigênio e calor, os corantes não apresentam danos à saúde do consumidor (CONSTANTE et al., 2002) em contraste com alguns corantes sintéticos, como a eritrosina, de cor vermelha, que pode provocar hipertireoidismo, ou a tartrazina, de cor amarela, que foi relacionada com a insônia em crianças (FURTADO, 2018).

A biotecnologia, neste contexto, torna-se fundamental para o estudo e o desenvolvimento de corantes e pigmentos naturais, tendo as cianobactérias como fontes de estudos de pesquisadores do mundo inteiro, pois possuem potencial na utilização em alimentos, na indústria farmacêutica e no tratamento de efluentes (ANTELO, 2007). Dentre as cianobactérias mais estudadas está a Spirulina (*Arthrospira platensis*), uma microalga, de cor verde azulada, não ramificada com filamentos helicoidais, variando o tamanho conforme as condições de crescimento. Possui um elevado teor de proteína com 60% a 70%, com uma composição de aminoácidos essenciais (BENELHADJ et al., 2016; LIMA et al., 2018). A Spirulina pode ser uma importante fonte de pigmentos, de nome ficobiliproteínas, que se dividem em três grupos: ficoeritrinas, ficocianinas e aloficocianinas.

As ficocianinas são as mais abundantes dentre as ficobiliproteínas presentes na Spirulina. Segundo Antelo (2007), a ficocianina é hidrossolúvel e pode ser isolada como complexo proteína-pigmento, o que facilita os processos de extração e purificação. Possui coloração fluorescente e azulada, tendo máxima absorção no visível entre 615 nm e 620 nm e no máximo de emissão fluorescente em 652 nm (FIGUEIRA, 2014). Segundo Figueira (2014), o uso deste pigmento pode ser determinado de acordo com

a pureza obtida, sendo o valor de 0,7 utilizado para uso de grau alimentício, o valor de 3,9 é tido como ideal para uso de grau reativo e valores maiores que 4,0 são ideais para uso analítico. Apresenta, ainda, potencial antioxidante, anti-inflamatório e agente antitumoral. Já a aloficocianina possui coloração verde azulada, com absorção máxima de 650 nm e 652 nm (REIKSEN, 2008). É mais utilizada como marcador fluorescente em imunoenaios em microscopia de fluorescência devido ao seu grande coeficiente de absorção (YING e XIE, 1998).

A extração e a purificação destes pigmentos naturais são etapas complexas devido às várias características dos meios e das biomoléculas de interesse (ANTELO, 2007). Segundo Figueira (2014), a escolha das técnicas de separação a serem utilizadas são importantes, a fim de minimizar as perdas e aumentar o rendimento, sendo a recuperação e a purificação destas biomoléculas dependentes das suas propriedades físicas, químicas e funcionais. O processo de extração pode ser realizado por diferentes métodos, que combinam o rompimento das paredes celulares com a extração das ficobiliproteínas, utilizando-se de rompimento mecânico das células, tratamento enzimático, utilização de solventes, ciclo de congelamento e descongelamento da biomassa úmida, dentre outros (WALTER, 2011). Após a extração, torna-se necessária a purificação destas biomoléculas e, de acordo com Antelo (2007), os métodos mais usuais são precipitação, permeação em gel, adsorção e métodos cromatográficos, havendo, também, a descrição de extração por sistema aquoso bifásico – SAB.

Devido ao desafio destes processos de purificação da ficocianina e da aloficocianina, torna-se uma estratégia o uso do planejamento experimental como técnica de análise dos efeitos antagônicos e sinérgicos entre as variáveis. Os processos só podem ser verificados pela determinação dos efeitos de interação entre as variáveis através de um planejamento fatorial, para determinar as melhores condições dos fatores para possibilitar uma otimização do processo (KALIL et al., 2000).

Considerando as informações apresentadas anteriormente, neste trabalho serão realizadas a extração e a purificação de ficocianina e aloficocianina utilizando o método SAB (Sistema Aquoso Bifásico) com dois polímeros PBC (Polímero de Baixo Catiônico) e PEG (Polietilenoglicol) e Sal fosfato, buscando ampliar os estudos do processo de extração e purificação de Spirulina e, conseqüentemente, alcançar valores de concentração e pureza destas ficobiliproteínas satisfatórios para utilização em indústrias alimentícias, farmacológicas ou de cosméticos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Extração e purificação da ficocianina e da aloficocianina a partir de biomassa de *Arthrospira platensis*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o planejamento fatorial 2^4 para análise da influência do pH, concentração de sal fosfato, e da presença de polietilenoglicol e polímero de baixo catinônico na eficiência da extração e da purificação da ficocianina e da aloficocianina em extrato bruto de *Spirulina* e extrato pré-purificado de ficocianina;
- Realizar o planejamento DCCR 2^2 com as variáveis definidas no planejamento fatorial visando as melhores faixas de extração e purificação de ficocianina e aloficocianina da biomassa *Spirulina* bruta e na purificada.
- Avaliar o processo utilizado para a extração e a purificação de ficocianina e aloficocianina para o extrato bruto de *Spirulina* comparado ao processo utilizando o extrato pré-purificado de ficocianina.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. APLICAÇÕES DE MICRORGANISMOS EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

Em 1982, foi publicada pela Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico a definição para biotecnologia em que constava como “a aplicação de princípios científicos e técnicos ao tratamento de matérias por agentes biológicos para obtenção de bens e serviços” (BULL e LILLY, 1992). Para os agentes biológicos, pode-se definir os microrganismos como sendo células animais vegetais ou enzimas. Para os bens e serviços, pode-se definir os produtos das indústrias de alimentos, fármacos, biomedicina e bebidas, dentre outros. A biotecnologia vem alcançando todos os gerenciamentos de modificação de matérias-primas renováveis que podem ser úteis para a sociedade (MAYOR, 1992).

Podemos afirmar que a biotecnologia é um ramo da ciência com grande interdisciplinaridade, tendo como base disciplinas como biologia, química e engenharia, contudo, agregando e assimilando conhecimentos e aplicações nas áreas de microbiologia, genética, bioquímica, engenharia bioquímica e bioengenharia (DALTON e BULL, 1985).

Um processo biotecnológico pode consistir no crescimento de um determinado microrganismo industrial em condições pré-definidas obtendo, assim, um determinado produto comercial. Visando este objetivo, deve-se conhecer o microrganismo trabalhado e as condições de crescimento do mesmo para que se possa reproduzir seu crescimento e controlar em escalas industriais. Este procedimento pode ser feito em biorreatores, ou seja, reservatórios nos quais se controla todas as condições preestabelecidas, como, por exemplo, temperatura, pH, substratos e etc. (TREVAN *et al.*, 1990).

Estuda-se, cada vez mais, os microrganismos, pois eles estão cada vez mais presentes em diferentes áreas comerciais, por isso o interesse em microalgas, bactérias, fungos está cada vez maior (DERNER, 2006).

O estudo envolvendo microalgas resulta na relevância de sua utilização e em suas consideráveis possibilidades de aplicabilidade. As microalgas são capazes de enriquecer a composição nutricional de alimentos influenciando positivamente a saúde de seus consumidores, podendo ser humanos ou animais, devido à sua constituição química que tem proteínas, aminoácidos, carboidratos, vitaminas e pigmentos (SPOLAORE *et al.*, 2006).

As microalgas formam um grupo bastante diversificado de organismos, com isso a sua composição bioquímica também é bastante variada ocasionando uma influência tanto de fatores biológicos quanto químicos em seu crescimento (SILVA, 2008).

Utilizando-se da biotecnologia, o uso de microalgas está cada vez mais em alta devido às várias vantagens apresentadas por sua utilização, como seu baixo custo e seu crescimento em meio cada vez mais simples (DERNER, 2006).

Nos últimos anos, esse ramo adquiriu bastante relevância e uma crescente e significativa importância. Há dados de que a produção de cinco toneladas de biomassa seca de microalgas por mês teria um rendimento de, aproximadamente, U\$ 8 bilhões por ano. Para ter seu uso bem-sucedido, deve-se escolher a alga correta e conhecer as condições específicas desta microalga (OLAIZOLA, 2003; PULZ e GROSS, 2004).

Pesquisas vêm sendo realizadas em relação ao cultivo de microalgas para produção de biopolímeros, biofertilizantes, pesticidas, pigmentos e novos combustíveis, bem como uma enorme gama de outros bioativos que podem ser agregados em alimentos funcionais (SKULBERG, 2000; SKULBERG, 2004).

A exploração de estudos biotecnológicos colabora para o crescimento socioeconômico do país, pois, ao promover novos produtos que serão consumidos, proporcionam, também, novos empregos e novo rendimento para os diversos setores do país (VALLE, 2005).

Visando garantir o sucesso na manutenção de espécies de microalgas, precisa-se verificar alguns detalhes, como desenvolver um processo que viabilize a estabilidade das células por um período longo e dos métodos que preservam as células com equipamentos simples e práticos para execução (WALTER, 2001).

É importante destacar que não há uma legislação própria ou mesmo um regulamento para o mercado ou para os produtos oriundos das microalgas. O FDA (US Food And Drug Administration) ou a FAO (Food And Agriculture Organization of The United Nations) citam a utilização do uso do pó da *Spirulina* com o *status* GRAS, que reconhece o produto como seguro. Mas há um alerta do FDA sobre a toxicidade que algumas cianobactérias apresentam (WALTER, 2001).

Podemos dividir as algas em dois grupos: microalgas e macroalgas. As microalgas são microrganismos unicelulares, possuindo em várias delas características bem parecidas com as das bactérias, podem ser citadas, como exemplos, as cianofíceas ou algas azuis sendo também denominadas cianobactérias. São seres procariontes, isto é, não detém mitocôndrias, núcleo definido, retículo endoplasmático, ou seja, os tilacoides permanecem no citoplasma. Tendo sua cor azul-esverdeada proveniente de pigmentos Ficocianina e aloficocianina que, estão na membrana dos tilacoides (RAVEM *et al.*, 2007).

O interesse pelas microalgas aqui no Brasil é descentralizado e aconteceu bem depois de outros países, sendo estudadas por universidades e institutos que pesquisam a alimentação humana ou animal. Hoje há vários estudos em andamento sobre o potencial da utilização das microalgas, sendo subsidiadas pelo governo e por empresas privadas com interesse em diferentes áreas de atuação, como, por exemplo, bicompostíveis de terceira geração (FRANCISCO *et al.*, 2015).

As microalgas são, principalmente, aquáticas, e são localizadas em águas de ambiente estuário, ou seja, onde há o encontro de águas doces com salgadas, nascentes de rios e em superfícies úmidas, e sua distribuição

nessas regiões está ligada a condições químicas e físicas, como, por exemplo, temperatura da água, salinidade, luz disponível (RAVEN *et al.*, 1996).

Neste sentido, a cultura de cianobactérias tem tido um interesse grande por parte da área biotecnológica devido às várias características, como, por exemplo, a luz solar como sua fonte principal de energia e a alta eficiência de produtividade, ou seja, rápida multiplicação com impacto mínimo ao meio ambiente, características cada vez mais importantes e buscadas nas indústrias (JENSEN e KNUTSEN, 1993).

As cianobactérias são uma fonte alternativa de proteínas, pois estudos já demonstram essa característica através de condições industriais e experimentais. Pode ser uma alternativa com custos mais baixos se comparada à proteína de origem animal (BERTOLDI *et al.*, 2008).

Dentre as cianobactérias, destacam-se *Anabaena*, *Calothrix*, *Synechococcus*, *Nostoc* e *Spirulina*.

Segundo Niu *et al.*, (2007), a *Spirulina* é uma cianobactéria filamentosa em que estão inclusas treze espécies, como, por exemplo, *Spirulina crispum*, *Spirulina subsalsa*, *Spirulina weissii*, *Spirulina princeps* e *Spirulina platensis*. Essa cianobactéria cresce em águas alcalinas e constitui uma fonte abundante de proteína. A constituição de proteína desta microalga é de 60 – 70% (base seca), sendo considerada como a fonte natural mais rica em vitamina B₁₂, possuindo uma mistura natural de biopigmentos com características funcionais (PINERO ESTRADA *et al.*, 2001).

Alguns autores denominam *Arthrospira platensis* de *Spirulina* como sendo parte do reino Bactéria, divisão Cianobactéria, pertencente à classe Cianofíceas e da família Oscillatoriaceae, na qual neste gênero a espécie mais importante é a *Spirulina platensis* (Figura 1), em seguida *Spirulina fusiformes* e depois *Spirulina máxima*. Tendo um comprimento de, aproximadamente, 200-300 nm e com largura 5-10 nm em filamentos helicoidais, com tolerância a pH alcalino, o seu cultivo em larga escala é de

fácil manuseio e sua parede celular pode ser rompida com facilidade (CHRONAKIS *et al.*, 2000; RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004).

Figura 1 - A cianobactéria *Spirulina*



Fonte: (MACCOLL, 1998)

A *Spirulina* tem sua origem nos primeiros seres fotossintetizantes apresentando altos índices de produção de biomassa. Se compararmos a *Spirulina* como fonte de produtos e nutrientes que possam beneficiar a qualidade de vida do ser humano em relação a vegetais e animais, ela apresenta vantagens importantes, como, por exemplo, a rápida reprodução e o cultivo facilitado em regiões que não seriam próprios para a agricultura (COZZA, 1999).

Há espécies de cianobactérias que são tóxicas ao consumo humano, contudo não há relatos de efeitos tóxicos ao utilizar a microalga *Spirulina*, por isso seu uso é considerado seguro e nutritivo. Mas deve se atentar e prevenir, pois podem ocorrer contaminações a partir do contato da *Spirulina* com outras microalgas que possam causar prejuízos à saúde (HENRIKSON, 1994).

Há alguns fatores que devem ser levados em consideração que influenciam no crescimento da *Spirulina*, tais como: pH, luminosidade, temperatura, presença de contaminantes, salinidade, acúmulo de oxigênio e presença de íons de bicarbonato (COLLA, 2002).

A composição química da *Spirulina* é bem variada, com isso há uma produção enorme de compostos que são de interesse comercial, sendo possível alterar as condições de cultivo visando o aperfeiçoamento da produção dos elementos que tenham utilidade comercial (AMBROSI *et al.*, 2008). A utilização de microalgas vem crescendo, cada vez mais, para elaboração de elementos nutritivos, visto que as microalgas produzem vários nutrientes em quantidades maiores se comparados às fontes usuais. Na Tabela 1, pode-se observar a composição geral de várias fontes de alimentos e algumas microalgas. A *Spirulina* apresenta valores consideráveis de proteínas e carboidratos em sua composição se comparada a outras cianobactérias e a outras fontes de alimentos.

Tabela 1 – Comparação de composições gerais de alguns alimentos e Microalgas (% matéria seca)

Fonte de Alimentação	Proteína (%)	Carboidrato (%)	Lipídio (%)
<i>Spirulina</i>	60 - 71	13 – 16	6 – 7
<i>Chlamydomona srheinhardii</i>	48	17	21
<i>Chorelavulgaris</i>	51 – 58	12 – 17	14 – 22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Porphyridiumcr uentum</i>	28 – 39	40 – 57	9 – 14
<i>Scenedesmuso bliqus</i>	50 – 56	10 – 17	12 – 14
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11
Fermento de padeiro	39	38	1
Leite	26	38	28
Arroz	8	77	2
Soja	37	30	20

Fonte: Spolaore (2006), adaptado.

Segundo Becker (1994), a *Spirulina* possui pigmentos que favorecem a saúde, tais como clorofila, carotenóides, ficobiliproteínas.

Há várias cepas das cianobactérias que apresentam a capacidade de produção de pigmentos que são de interesse comercial, como, por exemplo, fonte de proteína para alimentação humana ou animal e seu uso varia de acordo com as características de cultivo de cada uma (LORETO *et al.*, 2003; PINOTTI e SEGATO, 1991). As cores das cianobactérias podem incluir amarelo-dourado-claro, pardo, vermelho, violeta, azul, verde esmeralda e azul escuro, pois há uma enorme quantidade de pigmentos, como carotenóides, clorofila e ficobiliproteínas (HENRIKSON, 1994).

Pigmentos naturais de origem microbiana podem apresentar vantagens se comparados com a produção de pigmentos que sejam extraídos de vegetais ou animais, pois o método utilizando microrganismos pode garantir rápida multiplicação e cultivo ininterrupto o que torna esse processo vantajoso e eficaz (JACOBSON, 1998).

3.2. CORANTES ARTIFICIAIS E CORANTES NATURAIS

Atualmente muitos alimentos possuem aditivos, sendo a grande maioria sintética, ou seja, desenvolvidos de modo artificial pela síntese de outros componentes. Quando tratamos de aditivos, estes podem ser corantes, conservantes, estabilizadores, emulsificantes, antioxidantes, espessantes, umectante, anti-umectantes, acidulantes, etc. (FIGUEIRA, 2014).

De acordo com o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, as substâncias ou misturas de substâncias são consideradas como aditivos para alimentos, agregado aos alimentos com o intuito de fornecer ou acentuar o aroma, a cor, o sabor ou alterar seu aspecto físico geral ou, ainda, evitar alterações indesejáveis ao produto final (BRASIL, 2008).

De acordo com Brasil (2008), os corantes aceitados pelo decreto compreendem os corantes naturais, sendo estes os que são extraídos de substâncias vegetais ou animais e o caramelo, que é obtido a partir do

aquecimento do açúcar a temperaturas superiores ao seu ponto de fusão. Consideram-se corantes artificiais aqueles obtidos a partir de componentes químicos através de processo de síntese.

Atualmente discute-se bastante o uso destes aditivos, principalmente dos corantes sintéticos, pois estes são mais utilizados na indústria. Há várias vantagens em sua utilização, como, por exemplo, alta estabilidade (luz, oxigênio, calor e pH), maior uniformidade em suas cores, contaminação microbiana baixa e seu custo de produção menor. Contudo os aditivos sintéticos permitidos vêm diminuindo gradativamente (CONSTANT *et al.*, 2002).

A legislação brasileira concorda com a FAO, que aprova oito corantes sintéticos e mais seis que são considerados idênticos aos naturais, conforme apresentado na Tabela 2. Porém, a permissão de sua utilização segue regras, como indicação nos rótulos sobre suas características e sobre a dose de ingestão diária admissível (FURTADO, 2018).

A permissibilidade do uso de corantes sintéticos não exclui possíveis efeitos prejudiciais à saúde de seus usuários, muito embora não seja divulgado nas embalagens dos produtos, contudo podemos encontrar estas informações em artigos científicos. Podemos citar, por exemplo, a eritrosina, um corante sintético vermelho que pode provocar hipertireoidismo quando seu consumo é utilizado de forma exagerada. Também temos o vermelho Ponceau, que pode ocasionar anemia e doenças renais, já o amarelo tartrazina foi relacionado com a insônia em crianças (FURTADO, 2018).

Segundo Constant *et al.* (2002), os corantes naturais possuem desvantagens em sua utilização pois alguns podem apresentar instabilidade à luz, ao calor e à temperatura, contudo vêm sendo utilizados há vários anos e não há comprovações de que sua utilização tenha gerado danos à saúde de seus consumidores. Algumas características destes corantes naturais os tornam susceptíveis para uma maior aceitação por parte dos usuários, características como solubilidade em óleo podem fornecer tonalidades

suaves proporcionando, assim, um produto final com apresentação mais natural.

Tabela 2 - Corantes Naturais, sintéticos, sintéticos idênticos aos Naturais e Corantes inorgânicos permitidos no Brasil

Corante Orgânico Natural	Corante orgânico Sintético artificial	Corante orgânico sintético idêntico ao natural	Corante Inorgânico
Curcumina	Amarelo Crepúsculo	Beta-Caroteno	Carbonato de Cálcio
Riboflavina	Indigotina	Beta-Apo-8'-Carotenal	Dióxido de Titânio
Cochonilha; Ácido Carmínico	Bordeaux S ou amaranto	Éster etílico do ácido beta-Apo-8' carotênico	Óxido e hidróxido de ferro
Urzela; orceína, orceína sulfonada	Tartrazina	Cantaxanteno	Alumínio
Clorofila	Azul brilhante FCF	Complexo cúprico da clorofila e clorofilina	Prata
Caramelo	Eritrosina	Caramelo amônia	Ouro
Carvão Medicinal	Ponceau 4 R	---	---
Alguns Carotenoides	Vermelho 40	---	---
Algumas Xantofilas	---	---	---
Vermelho de beterraba, Betanina	---	---	---
Algumas Antocianinas	---	---	---

Fonte: Brasil (2008), adaptado.

Uma característica de suma importância que está diretamente associada ao apelo visual e à qualidade de um alimento é a sua cor apresentada. Com isso, se um determinado alimento perde a cor no decorrer do processamento, isto implica em prejuízos à indústria, pois a venda deste produto será prejudicada (ANTELO *et al.*, 2008).

3.2.1 Ficobiliproteínas

Segundo Grossman (1993), as ficobiliproteínas formam a família de macromoléculas acessórias coletoras de luz, organizando-se em complexos supramoleculares que são denominados ficobilissomas, que atuam como componentes do aparelho fotossintético em cianobactérias e em parte de algumas algas eucarióticas. São utilizadas como marcadores fluorescentes de células em pesquisas biomédicas, terapêutica e em técnicas que são sensíveis à fluorescência (GLAZER, 1994).

Silva (2008) relata que na faixa de pH de 5,0 e 7,5 estas proteínas são estáveis e em temperaturas mais baixas esta estabilidade permanece por um tempo mais prolongado.

A partir da cor apresentada e suas propriedades espectrais, podemos dividir as ficobiliproteínas em: Ficocianina (FICO), aloficocianina (ALO), ficoeritrina (FE) (SUN *et al.*, 2009). Cada pigmento apresentado acima absorve apenas um comprimento de onda estabelecido (Tabela 3) (GROSSMAN *et al.*, 1993). A olho nu, as ficobiliproteínas apresentam cores distintas, a ficocianina tem uma variação de roxo ao azul, as ficoeritrinas apresentam cor vermelha e a aloficocianina apresenta cor azul esverdeada (BERMEJO *et al.*, 1997). Na Tabela 3, são apresentados o comprimento de onda e a massa molecular da Aloficocianina, da Ficocianina e da Ficoeritrina.

Tabela 3 - Massa molecular e comprimento de onda da Aloficocianina, Ficocianina e Ficoeritrina

Ficobiliproteína	Massa Molecular (Da)	λ_{max} (nm)
Aloficocianina	104000	652
Ficocianina	232000	620
Ficoeritrina	240000	565

Fonte: Viskari e Colyer (2002) adaptado.

A Ficocianina é tida como o pigmento principal das cianobactérias, pois pode chegar a 20% em massa seca da proteína celular da mesma. A sua utilização pode ser em alimentos e cosméticos, como, por exemplo, sorvetes, refrescos e produtos lácteos. A sua utilização nesses setores se dá pelo fato desta ficocianina poder ser usada como corante natural azul (VONSHAK, 1997; MINKOVA *et al.*, 2003). Estudos avaliaram as ficobiliproteínas em espécies de cianobactérias diferentes em que alguns resultados estão ilustrados na Tabela 4. Pode-se observar que a ficocianina apresenta valores consideráveis em todas as cianobactérias apresentadas. E quando analisamos o percentual de ficobiliproteínas, os maiores níveis encontrados estão concentrados na cianobactéria *Spirulina*.

Tabela 4 - Percentual de biomassa de ficobiliproteínas em espécies diferentes de cianobactérias

Cianobactéria	Ficocianina (%)	Aloficocianina (%)	Ficoeritrina (%)
<i>Spirulina sp.</i>	17,5	3,8	1,2
<i>Phormidiumsp</i>	4,1	1,0	0,3
<i>Lyngbyasp.</i>	3,9	0,8	0,4

Fonte: Patel *et al.*, (2005) adaptado.

3.2.2 Ficocianina

A ficocianina é uma ficobiliproteína de cor azul, apresentando características terapêuticas, como antioxidante, anticâncer, antiviral, antialérgico, antimutagênico, anti-inflamatório, relaxante de vasos sanguíneos e controle nos níveis de colesterol, sendo um ingrediente atrativo nos alimentos funcionais. Entretanto a sua utilização pode ser limitada devido à instabilidade à luz, à umidade, à temperatura, devido à degradação proteica (YAN *et al.*, 2014).

A ficocianina em sua composição contém uma parte protéica, ou seja, a carga líquida de superfície da biomolécula pode sofrer variação de acordo com o pH do meio. Quando o valor de pH está acima do ponto isoelétrico (PI), a biomolécula será carregada negativamente, e quando o pH está inferior ao ponto isoelétrico da biomolécula, então terá uma carga líquida positiva (FIGUEIRA, 2014).

A ficocianina apresenta grande importância como corante natural, contudo há estudos que relatam que ela apresenta propriedades terapêuticas. Podemos citar a atividade antioxidante já mencionada na qual a ficocianina é capaz de capturar radicais hidróxido e alcóxido. Há estudos que relatam que ela possui 20 vezes mais atividade antioxidante que o ácido ascórbico, sendo aplicada como anti-inflamatória e hepatoprotetora (SANTIAGO-SANTOS, 2004).

A extração da ficocianina pode ser afetada por vários fatores, podemos citar, como exemplo, a relação biomassa e solvente, o tempo utilizado para realização da extração, o tipo de solvente escolhido para ser feita a extração bem como o método de rompimento celular (SILVEIRA *et al.*, 2007).

A utilização da ficocianina está ligada ao seu grau de pureza, sendo este grau obtido através da relação de absorbâncias lidas nos seguintes comprimentos de onda A_{620} / A_{280} . A aplicação para uso alimentar é definida conforme os valores obtidos pela relação acima citada, sendo que o valor de 0,7 usado para grau reativo é o valor de 3,9 e para uso analítico o grau tem de ser superior a 4,0 (ANTELO, 2007).

A meia-vida da ficocianina pode ser afetada pela temperatura elevada e pelo pH ácido, esses fatores podem apressar drasticamente a degradação das proteínas (ANTELO, 2008).

3.2.3 Aloficocianina

A aloficocianina possui coloração verde azulada, com absorção no comprimento de onda de 650 a 65nm (REIKSEN, 2008).

Esse pigmento é mais adequado para estudos espectroscópicos, sendo mais utilizado como marcador fluorescente em imunoensaio e microscopia de fluorescência devido ao seu grande coeficiente de absorção (YING e XIE, 1998).

A aloficocianina compõe o núcleo do ficobilissomo, ela é o componente mais estável deste núcleo e é apontada como pigmento membrana (PEREIRA, 2009).

A aloficocianina possui propriedade antioxidante e anti-enterovirus, contudo a sua aplicação ainda é limitada por ser encontrada em menores quantidades nas cianobactérias e pela falta de métodos eficazes para sua purificação (FAN *et al.*, 2012).

Há poucos trabalhos que relatam a extração da aloficocianina. El-Mohsnawy (2013) realizou a extração da aloficocianina utilizando duas técnicas, a lisozima com alta pressão e com agitação em vórtex com pérolas de vidro utilizando a biomassa da cianobactéria *Thermosynechocuse longatus*. Para os ensaios em que foram utilizados vórtex com pérolas de vidro, foram obtidos os maiores resultados de extração de aloficocianina, pois com as pérolas houve maior liberação de aloficocianina.

Ores (2014) relata, em seu trabalho, que a *Spirulina sp* apresenta potencial para extração da ficobiliproteínas juntamente com a enzima anidrase carbônica utilizando homogeneizador ultrassônico no qual se obteve concentrações de 69,9 mg/g de aloficocianina.

3.3 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE FICOBILIPROTEÍNAS

Um dos pontos fundamentais considerados quando se trata da extração de ficobiliproteínas é a identificação e a caracterização das proteínas na cianobactéria. Ao lidarmos com a ficocianina que está no interior da célula, normalmente é preciso que seja feito o rompimento da célula para que se obtenha o produto (SILVA, 2008).

Há vários métodos de separação destes bioprodutos, que podem ser utilizados para se obter um produto com determinado grau de pureza e concentração preestabelecido. A escolha do método e a sequência de extração e purificação são de suma importância, pois deve-se verificar condições que diminuam perdas e que aumentem o rendimento, levando em consideração as informações como propriedades físicas, químicas e funcionais das proteínas, sendo algumas propriedades como carga, tamanho, função e forma (BELTER *et al.*, 1998).

Para o rompimento celular, a técnica mais usada é o choque osmótico, utilizando tampão fosfato, acetato ou água destilada. Pode-se realizar a extração com estes solventes ou combinando com métodos químicos e físicos, como, por exemplo, congelamento/descongelamento, maceração, digestão, homogeneização por pressão (PATEL *et al.*, 2005; PATIL *et al.*, 2006; CHEM *et al.*, 2005).

Um dos maiores desafios da purificação de proteínas é associar as melhores técnicas e o acerto da metodologia para produção em escala industrial, obtendo, assim, um produto final com todas as especificações necessárias para sua utilização (MILNE, 2011).

Há vários métodos descritos na literatura para purificação de ficobiliproteínas. Para purificação de produtos biotecnológicos, usualmente tem-se as etapas de precipitação, centrifugação, ultrafiltração, sistema aquoso bifásico - SAB, cromatografia, diálise, cromatografia em gel de filtração ou pode-se combinar uma ou mais técnicas (LING *et al.*, 2004; SILVA, 2008).

A Purificação por SAB é utilizada por vários autores visando os melhores resultados para esta etapa. Os fatores de pureza encontrados com este sistema foram superiores a outros sistemas, sendo satisfatórios e adequados ao uso alimentar, conforme descrito por Antelo (2007), alcançando valores de pureza superior a 0,7.

Para que seja feita a determinação do melhor método de extração e purificação, deve-se analisar qual microrganismo está utilizando e qual é o extrato de interesse final a ser obtido, qual a finalidade deste extrato obtido e qual o grau de pureza que se pretende alcançar. É indispensável a escolha correta do método a ser utilizado para a purificação visando não aumentar os custos do processo (PATIL e RAGHAVARAO, 2007).

3.3.1 Rompimento celular por ciclos de congelamento e descongelamento

Temos na literatura vários autores que utilizaram o método de congelamento e descongelamento em consecutivos ciclos para o rompimento de ficobiliproteínas, como, por exemplo, Soni *et al.*, (2006) e Patel *et al.*, (2005). A utilização do método de rompimento por congelamento e descongelamento se mostrou eficaz, de acordo com Sbeghen (2017), pois foi obtida a ficocianina utilizando esta técnica alcançando $1,38 \text{ mg.mL}^{-1}$ de concentração de Ficocianina. A utilização do método de congelamento/ descongelamento é relatada por Sone e Gimenes (2014), sendo utilizada para realizar um comparativo de processos para extração de sericina, sendo este um método efetivo por não alterar a estrutura da proteína trabalhada e obter um valor médio de 0,1309 gramas de sericina seca.

Podemos observar algumas desvantagens quando utilizado o método de congelamento e descongelamento, como, por exemplo, o tempo gasto para que aconteça o rompimento da célula e a energia consumida para o processo de congelamento e descongelamento. Porém, por outro lado, as vantagens deste processo implicam em uma boa reprodutibilidade, boa eficiência no processo de rompimento celular além da possibilidade de utilização de equipamentos, que são de fácil manuseio, e da praticidade

deste método. O rompimento por este processo é provocado pelo inchaço das células, ocasionando o rompimento causado pelos cristais de gelo que se formam durante o processo de congelamento e descongelamento (SONI *et al.*, 2006).

Deve-se observar o número de ciclos utilizados no processo de extração por congelamento e descongelamento, pois este parâmetro pode alterar e diferenciar os resultados obtidos (SILVA, 2008).

3.3.2 Sistema Aquoso Bifásico – SAB

Quando se trata de produção em escala comercial de algum produto biotecnológico, algumas características devem ser observadas e asseguradas, como, por exemplo, a pureza e a integridade química e física dos compostos presentes. Assegurar estas características pode transformar o processo ou as etapas do processo onerosas, com isso, ao longo do tempo, foi necessário desenvolver processos que possibilitassem preservar as exigências do mercado e as características do produto final (LIMA, 2002).

Com a finalidade de estratégias de purificação que sejam economicamente mais viáveis com processos mais rápidos que possibilitem a expansão da produção e o aumento do rendimento, ocorreu o surgimento de novas tecnologias visando propor técnicas alternativas para os processos convencionais, como os processos com Membranas, Sistema Aquoso Bifásico (SAB) e Imunopurificação (SAXENA *et al.*, 2003).

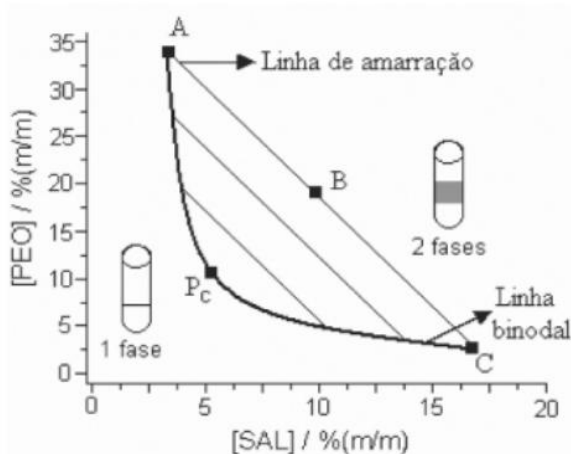
Considerando os processos de separação já mencionados, podemos destacar a extração líquido-líquido utilizando o Sistema Aquoso Bifásico (SAB), sendo a purificação resultante de uma partição diferenciada da molécula em estudo e impurezas presentes no meio das duas fases líquidas (PESSOA e KILIKIAN, 2005). Os SABs são processos de extração líquido-líquido que se caracterizam pela formação de duas fases aquosas diluídas, produzidas pela separação de dois solutos hidrofílicos imiscíveis geralmente formadores de fase. Essa formação de duas fases é o resultado de um processo de competição das interações entre os dois solutos e as moléculas

de água entre si. A formação destas duas fases pode ser resultado do ajuste de dois polímeros, dois sais ou um polímero juntamente com um sal (ALMEIDA *et al.*, 2014).

A separação que ocorre entre as sujidades e a parte a ser purificada ocorre por consequência das diferentes solubilidades que estes solutos apresentam em suas fases aquosas (KILIKIAN e PESSOA, 2003).

A composição das duas fases em equilíbrio termodinâmico é representada normalmente por um diagrama de fases (Figura 2). Este diagrama é de suma importância para se estudar partição, pois a partir dele desenvolve-se um processo de extração. A constituição dos elementos envolvidos no SAB é representada em porcentagem mássica, ou seja, a razão entre a massa do polímero na fase superior e a massa do sal que está na fase inferior. As respostas do equilíbrio são mostradas no diagrama levando em consideração temperatura e pressões constantes (SILVA *et al.*, 2006).

Figura 2 - Diagrama de fase em coordenadas retangulares de um Sistema Aquoso Bifásico de um polímero e um sal



Fonte: SILVA *et al.* (2006).

No diagrama de fase, o eixo da abscissa retrata a concentração de sal e o eixo da ordenada a concentração de polímero que está no complexo. No diagrama é mostrado qual composição do sistema é homogêneo e qual é heterogêneo, sendo separadas pela linha binodal (A/Pc/C), sua posição é

variada conforme o tipo e a massa molar do polímero usado e qual a constituição química do sal, da temperatura e do pH do sistema, sendo este fator relevante para a separação do diagrama de fases em duas regiões, nas quais acima da curva tem-se a região bifásica e abaixo da curva a região monofásica. Podemos observar no diagrama de fase as linhas de amarração A/B/C, em que para certa composição do sistema (ponto B) nos fornecerá a concentração dos solutos em equilíbrio no sistema, no qual temos o ponto A (fase superior) e o ponto C (fase inferior). Obter essas linhas de amarração é muito importante, pois, ao analisarmos as misturas com composições globais que pertençam a uma mesma linha de amarração, irá fornecer fases superiores com propriedades termodinâmicas idênticas (SILVA, *et al.*, 2006).

Em relação a outros processos, os SABs são tidos como favorecedores da estabilidade de moléculas que estão ativas biologicamente, evitando, assim, possíveis mudanças estruturais e, conseqüentemente, a perda de suas atividades biológicas (SILVA e LOH, 2006).

Temos uma enorme gama de SABs, contudo os mais utilizados para a extração líquido-líquido são formados por Polietilenoglicol (PEG)/Dextrana e Polietilenoglicol (PEG)/Sal (fosfato, sulfato, citrato) quando levados em consideração elementos importantes para a indústria, como o custo, a reciclagem de reagentes e o tempo gasto na separação das fases, a atoxidade e a faixa de aplicação. Por isso há estudos concentrados nesses dois sistemas, contudo o PEG/Sal é, geralmente, o mais utilizado, pois apresenta baixo custo e menor tempo para separação (KILIKIAN e PESSOA, 2003; MINAMI, 1997).

A utilização de SAB/sais é relatada por Padilha *et al.* (2011) em que foi utilizado PEG/fosfato de potássio por ser uma técnica favorável na purificação de biomoléculas com interesse industrial e laboratorial. Antelo *et al.* (2010) utilizou SAB com PEG/fosfato de potássio para purificar extrato de ficocianina de *Spirulina platensis* com resíduos e sem resíduos com variação da massa de PEG/sal.

Para obter uma purificação eficaz de proteínas, o resultado depende de alguns fatores, como: condições e propriedades do sistema, natureza e tipo dos formadores de fase, pH, temperatura etc., bem como o tipo de proteínas que se quer purificar (CAVALCANTI *et al.*,2006).

3.3.3 Polietilenoglicol

Os polímeros naturais ou sintéticos, sendo eles hidrofílicos e com capacidade de se misturar à água, podem ser usados para a separação de fases se misturados a outro polímero ou a outros sais. O diagrama de fases pode ser utilizado para representar a composição das fases e as concentrações de misturas polímero-polímero ou polímero-sal (CABRAL e AIRES-BARROS, 1993).

A massa do polímero usado está ligada à viscosidade que se formará nas fases, ou seja, quanto mais viscosas forem as duas fases maior será a massa molecular do polímero escolhido para o SAB (ALBERTSSON, 1986).

O Polietilenoglicol – PEG é um poliéster sintético neutro, com cadeia ramificada ou linear, sua obtenção é pela polimerização do óxido de etileno e pode ser encontrado em várias massas molares. Pode ser encontrado pelos nomes comerciais de Poliglicol E®, Carbovax® e Pluacol®. A sua solubilidade é em água e em solventes orgânicos (HARRIS, 1992).

A aplicação do PEG possui uma variedade de propriedades benéficas à sua utilização, tais como: não ser solúvel em água em temperaturas altas, formação de complexos com cátions metálicos, alta mobilidade com grande poder de volume excluído em água, agente precipitante de proteínas e ácidos nucleicos. Podemos, ainda, destacar que a Portaria nº 38, de 13 de janeiro de 1998, regulamenta seu uso na indústria de alimentos em sua utilização como veículos em adoçantes de mesa.

[...] Para efeito deste regulamento, entende-se como veículo (excipiente ou diluente ou solvente) o produto utilizado na formulação dos adoçantes com as propriedades de conferir volume e ou proporcionar diluição à concentração conveniente, facilitando o seu uso (BRASIL, 1998).

A Resolução - RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002, que rege em suplementos vitamínicos e/ou minerais (SILVA, 2007).

[...] É permitida a utilização dos aditivos, coadjuvantes de tecnologia e veículos nos mesmos limites previstos no Regulamento Técnico sobre o Uso dos Aditivos Alimentares, Coadjuvantes de Tecnologia e Veículos para Suplementos Vitamínicos e ou Minerais (BRASIL, 2002).

A Food And Drug Administration – FDA aprovou o PEG por ele não ser imunogênico e nem antigênico e sua utilização ser muito constante na indústria de alimentos, na indústria farmacêutica e na cosmética. O PEG não ocasiona a baixa de atividade celular e atividade protéica sendo ainda biodegradável não nocivo, por isso o grande interesse de sua utilização na biotecnologia (HARRIS, 1992).

O PEG é muito utilizado em SABs sendo eles PEG-Polímero ou PEG-Sal devido ao fato de que o aumento de sua massa molar não ocasionar a desnaturação protéica (SANTOS, 2011).

Silva (2009) relata a utilização de SAB utilizando PEG/Fosfato de potássio para purificação da enzima galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 utilizando massas molares variadas de PEG e faixas de pH também variadas obtendo resultados diferentes, conforme cada variação na qual os melhores resultados foram observados na faixa de 10% de sal, com PEG 8000, e o pH na faixa de 8,0 obtendo valor de purificação de 10.

3.3.4 Polímero Catiônico com baixo teor de cloro - PBC

De acordo com Diaz *et al.* (1999), ao utilizar coagulantes naturais, é possível economizar na utilização de produtos químicos. Para Bongiovani *et al.*, (2010), os coagulantes naturais são coagulantes químicos por serem biodegradáveis e não tóxicos. Estudos estão sendo desenvolvidos com

alguns tipos de coagulantes naturais. Os coagulantes que são de origem orgânico/naturais são compostos que possuem grandes cadeias moleculares com cargas positivas ou negativas (BORBA, 2001).

O polímero que opera como coagulante, floculante no tratamento de águas, é o que possui carga positiva, sendo chamado de catiônico por ter sua efetividade em uma ampla faixa de pH utilizados (MACEDO, 2007).

O Tanfloc é produzido pela empresa TANAC tendo sua sede na cidade de Montenegro no Estado do Rio Grande do Sul. A empresa TANAC produz cinco tipos de Tanfloc: Tanfloc SG, Tanfloc SG 1500, Tanfloc SG 1530, Tanfloc SL e Tanfloc SS. Neste trabalho foi utilizado o Tanfloc SG. O Tanfloc SG é um polímero orgânico catiônico, de baixo peso molecular ou polímero de baixo catiônico (PBC) e que atua como coagulante ou auxiliar na coagulação (CASTRO-SILVA *et al.*, 2004).

O TANFLOC SG age em sistemas de partículas coloidais, neutralizando cargas e formando pontes entre estas partículas, sendo este o processo responsável pela formação de flocos e consequente sedimentação. O TANFLOC SG da empresa TANAC pode ser utilizado em um grande espectro, mas cita-se que o produto é efetivo em uma faixa de pH que varia de 4,5 a 8,0 (TANAC, 1999).

3.3.5 Sais Utilizados nos SABs

Podemos citar alguns sais que podem ser constituintes das fases dos SABs, como, por exemplo, o sulfato de lítio, fosfato de potássio dibásico, sulfato de sódio, citrato de sódio (SILVA, 2007).

- O sulfato de lítio possui fórmula molecular Li_2SO_4 . Este sal é um elemento que desperta grande interesse tecnológico, pois pode ser usado em aplicações na detecção de radiação a laser, usado como elemento óptico de transmissão de imagens, usado na fabricação de cristais e também na indústria farmacêutica. Tem altos valores de condutividade iônica em altas temperaturas, o que possibilita seu uso no

armazenamento de energia e em sistemas de conversão (TABOADA, 2002).

- O fosfato de potássio dibásico tem fórmula molecular K_2HPO_4 . Este sal é branco, higroscópico, solúvel em água. A solução que se forma deste sal é levemente alcalina. O fosfato de potássio monobásico de fórmula molecular KH_2PO_4 também é branco e apresenta-se granulado. Este sal não é solúvel em álcool, mas é solúvel em água (SIGMA-ALDRICH, 2001). Os fosfatos são sais inorgânicos, sendo bastante utilizados em SABs do tipo polímero/sal. Apresentam um custo reduzido e maior facilidade de utilização na indústria (FORCINITI *et al.*, 1991).
- O sulfato de sódio, com fórmula molecular Na_2SO_4 , é um sal cristalino e branco, sendo solúvel em água. É bastante utilizado na indústria têxtil, de vidro, de papel e detergente. Ao contrário da maioria de outros compostos solúveis, a sua solubilidade diminui com o aumento da temperatura (QUIMIESP, 2018).
- O citrato de sódio tem fórmula molecular $C_6H_5Na_3O_7$, é apresentado na forma de cristais brancos sem cheiro e são estáveis ao ar. É um sal produzido do ácido cítrico por processo de neutralização, tendo uma alta pureza. Este sal mantém as características físicas de emulsões e suspensões, pode ser considerado estabilizante ou emulsificante. É utilizado em refrigerantes de limão, lima e cítricos pelo gosto ácido (GRASTRONOMYLAB, n.d).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO DA BIOMASSA DE SPIRULINA

A *Spirulina* foi cultivada na empresa Brasil Vittal situada na cidade de Anápolis/Goiás. A empresa realiza o cultivo desta microalga para aplicação em produtos alimentícios e cosméticos.

4.2. CULTIVO DE SPIRULINA

O meio de cultivo utilizado para produção da *Spirulina platensis* foi formulado a partir dos compostos da Tabela 5.

Tabela 5 - Composição do meio de cultivo para produção da *Spirulina platensis*

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)
Bicarbonato de Sódio -NaHCO ₃	15,15
Cloreto de Sódio - NaCl	0,92
Sulfato de Potássio - K ₂ SO ₄	1,0
Cloreto de Cálcio -CaCl ₂	0,05
Uréia - (NH ₂) ₂ CO	8,89
Sulfato de Ferro -FeSO ₄	1,0
Sulfato de Magnésio -MgSO ₄	0,25
Acido Bórico - H ₃ BO ₃	2,83
Sulfato de Zinco - ZnSO ₄	0,22
Cloreto de Manganês - MnCL ₂	4,10
Sulfato de Cobre - CuSO ₄	0, 079
Sulfito de Sódio - Na ₂ SO ₃	1,88
Trióxido de Molibdênio -MoO ₃	0,39

Fonte: Paoletti *et al.*, (1975), adaptado.

O cultivo da biomassa foi realizado em tanques *raceway* ou fotobiorreatores, também conhecido como sistema de fluxo, o qual é equilibrado quimicamente para que a microalga possa ter condições para o

seu crescimento. O cultivo foi mantido em fotoperíodo natural, sendo agitados por pás. Após oito dias de crescimento, obtêm-se a biomassa da *Spirulina*. Um tanque de, aproximadamente, 25 mil litros produz, aproximadamente, 20 kg de biomassa seca por semana. Após a biomassa atingir o nível de maturação, ela é encaminhada para a etapa de processamento em que foi coletada a biomassa utilizando filtros com porosidade de 30 μm . A biomassa, após a coleta, foi armazenada congelada.

4.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR

A concentração celular foi obtida realizando a retirada de amostras com intervalos de tempo preestabelecidos. A análise de absorvância foi realizada, como descrito por Silva (2008), no comprimento de 562nm utilizando espectrofotômetro. A partir desses valores, construiu-se uma curva de calibração, que foram convertidos em concentração celular.

Para a elaboração da curva de calibração, coletou-se 25 mL de uma amostra concentrada de células na fase de crescimento, que foi filtrada e lavada utilizando água destilada em uma membrana de acetato de celulose de 1,2 μm , inicialmente seca por 12 horas a 70 °C e pesada. A amostra foi colocada na estufa com temperatura de 100 a 150° até alcançar o peso constante. O peso da massa foi calculado pela subtração dos valores das massas das membranas antes e depois da filtração e dividido pelo volume filtrado para obter a concentração celular na suspensão. Utilizando desta mesma suspensão, foram preparadas soluções com diferentes concentrações. Utilizando de alíquotas destas diluições, foram realizadas leituras em espectrofotômetro para leitura da absorvância e com água destilada como branco, obtendo, assim, uma curva da relação celular com o logaritmo da transmitância. A curva construída forneceu a seguinte equação de reta $y(\text{concentração}) = -3329,2 \cdot x(\text{absorvância}) + 667$ com $R^2 = 0,998$, sendo utilizada na conversação dos valores em concentração celular.

4.4. EXTRAÇÃO DA FICOCIANINA BRUTA E PRÉ-PURIFICADA

A biomassa úmida foi separada em duas partes, sendo reservada uma parte que é o extrato bruto da *Spirulina*.

A outra parte da biomassa foi submetida a dois ciclos de congelamento e descongelamento. Posteriormente aos ciclos de congelamento e descongelamento, a biomassa foi centrifugada a 12.000 RPM por 4 minutos em centrífuga da marca EXCELSA®II, modelo 206 BL. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante, obtendo-se o extrato pré-purificado da ficocianina, sendo utilizado para as análises o extrato bruto da *Spirulina* e o extrato pré-purificado da ficocianina para a extração e purificação da ficocianina e aloficocianina de biomassa de *Spirulina*.

4.5. DEFINIÇÃO DAS FAIXAS DE PH

4.5.1 Teste preliminar para definição do pH

Para iniciar o processo de extração e purificação, foi preparado um sistema aquoso bifásico visando definir as melhores faixas de pH para a extração e purificação de biomassa de *Spirulina*. Foram analisados os pHs nas faixas de 4,5 a 8,0, para estabelecer os valores que melhor se enquadravam ao experimento de extração e purificação da ficocianina e aloficocianina. Foi utilizado o sistema SAB com 1,0mL de extrato bruto de *Spirulina*, 5,0 mL de PEG a 60% e 0,5 mL de volume tampão (fosfato), conforme pHs definidos.

Após estes testes, foram definidas as faixas de pH utilizadas nos experimentos visando, assim, os melhores resultados para a extração e a purificação da biomassa de *Spirulina* para as concentrações de ficocianina e aloficocianina.

4.5.2 Preparação das soluções de fosfato/PEG/PBC

Inicialmente foram preparadas duas soluções de volume Tampão (fosfato), adaptado de Sousa (2012), como descrito abaixo:

- Solução A: solução a 0,2 M de fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$). Foram pesados 27,8 gramas do componente em um béquer de 500 mL e adicionada água destilada até a metade do béquer, que foi misturado até a completa dissolução. Posteriormente, a mistura foi colocada em um balão volumétrico de 1000 mL. Foi colocada água no béquer para completa remoção de vestígios de fosfato de sódio monobásico. A água foi colocada no balão volumétrico e foi completado até a marca do pescoço com água destilada completando e homogeneizando a solução.
- Solução B: Solução a 0,2 M de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4). Foram pesados 53,67 gramas do componente em um béquer de 500 mL e adicionada água destilada até a metade do béquer, que foi misturado até a completa dissolução. Posteriormente, a mistura foi colocada em um balão volumétrico de 1000 mL. Foi colocada água no béquer para completa remoção de vestígios de fosfato de sódio monobásico. A água foi colocada no balão volumétrico e foi completado até a marca do pescoço com água destilada completando e homogeneizando a solução.

Para a obtenção das soluções necessárias com diferentes pHs nas faixas definidas, a preparação foi realizada com a mistura das soluções A e B combinando as quantidades, seguindo as instruções da Tabela 6, obtendo, assim, os pHs necessários.

- X mL da solução A + Y mL da solução B.

Realiza-se a leitura no pHmetro da marca THERMO SCIENTIFIC ORION 3 STAR para confirmação do pH da solução.

Tabela 6 - Tabela preparação da solução de fosfato

X (mL)	Y(mL)	pH	X(mL)	Y(mL)	pH
98,0	2,0	5,2	45,0	55,0	6,9
93,5	6,5	5,7	39,0	61,0	7,0
92,0	8,0	5,8	33,0	67,0	7,1
90,0	10,0	5,9	28,0	72,0	7,2
87,7	12,3	6,0	23,0	77,0	7,3
85,0	15,0	6,1	19,0	81,0	7,4
81,5	18,5	6,2	16,0	84,0	7,5
77,5	22,5	6,3	13,0	87,0	7,6
73,5	26,5	6,4	10,5	90,0	7,7
68,5	31,5	6,5	8,5	91,0	7,8
62,5	37,5	6,6	7,0	93,0	7,9
56,5	43,5	6,7	5,3	94,0	8,0
51,0	49,0	6,8			

Tem-se que X é o volume em mL da solução A e Y é o volume em mL da solução B para cada 100 mL de solução tampão formada.

Preparou-se uma solução de concentração igual a 60 % (m/v) de Polietilenoglicol - PEG. Foram pesados 60 gramas de PEG 4000 em escamas em um béquer de 50 mL e adicionado água destilada até a metade do béquer, sendo misturado até completa dissolução. Posteriormente, a mistura foi colocada em um balão volumétrico de 100 mL. Foi colocada água novamente no béquer inicial para remover vestígios do PEG. A água foi colocada no balão volumétrico sendo completado até a marca do pescoço com água destilada completando e homogeneizando a solução. A solução foi deixada em descanso por 24 horas para sua total dissolução e posterior utilização. Esta solução foi armazenada a 8°C.

Prepararam-se duas soluções de Polímero de Baixo catiônico (PBC), sendo uma em concentração de 0,2% (m/v) e outra a 0,4% (m/v). Para a solução a 0,2%, pesou-se 0,02 gramas do polímero em um béquer de 50 mL e adicionou-se água destilada até a metade do mesmo, misturando até a

completa dissolução. A mistura foi colocada em um balão volumétrico de 100 mL. Foi colocada água novamente no béquer inicial para remover vestígios do PBC. A água foi colocada no balão volumétrico e foi completado até a marca do pescoço com água destilada completando e homogeneizando a solução. Para o preparo da solução com 0,4%, foi realizado o mesmo procedimento, mas sendo pesados 0,04 gramas do polímero. As duas soluções foram armazenadas a 8°C.

4.6. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA FICOCIANINA E ALOFICOCIANINA COM SAB

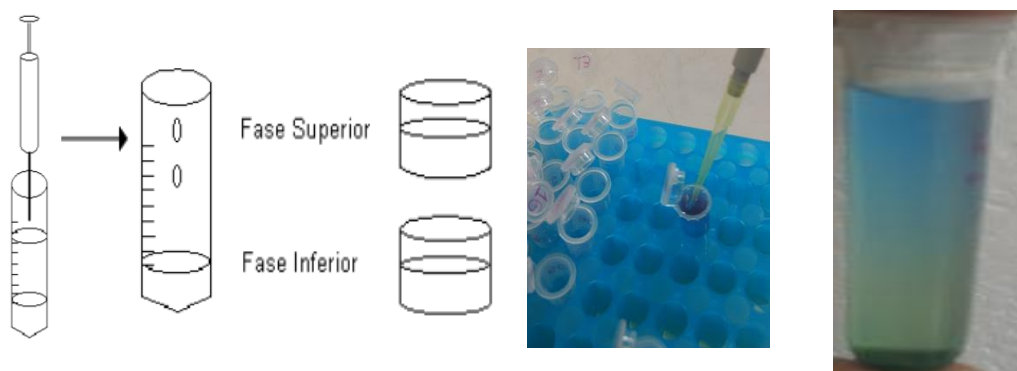
A extração e a purificação de Aloficocianina e ficocianina foi executada em SAB utilizando PEG, PBC, fosfato com diferentes pHs, biomassa do extrato bruto de *Spirulina* e extrato pré-purificado de ficocianina e água. O SAB foi preparado seguindo as definições feitas nos delineamentos respeitando as concentrações preestabelecidas. O experimento foi realizado em *ependorfes* com volume final de 2,0 mL. A montagem do sistema foi realizada colocando o PEG, depois colocou o PBC, a solução de volume tampão (fosfato) com os pHs já definidos, a água e, por último, o extrato, todos os componentes do SAB foram colocados seguindo as definições preestabelecidas conforme o delineamento.

Foi realizada a montagem simultânea dos dois sistemas, sendo um para o extrato bruto de *Spirulina* e o outro para o extrato pré-purificado de ficocianina. Para o planejamento fatorial 2^4 , o sistema foi montado em *ependorfes* com volume final de 2 mL, no qual foi definido o volume de extratos com valor de 0,250mL, tanto para o extrato bruto de *Spirulina* quanto para o extrato pré-purificado de ficocianina. O pH foi variado entre as faixas de 6,0; 6,5; e 7,0; a solução de PBC, a 0,2% (m/v), de 0 µL a 100 µL, o PEG de 20 a 40% (m/v) e o volume tampão (fosfato) de 25 a 125µl do pH correspondente.

Para o DCCR2², o sistema também foi montado simultaneamente para o extrato bruto de *Spirulina* e o outro para o extrato pré-purificado de ficocianina, em *ependorfes* com volume final de 2 mL, e utilizando 0,250mL de extrato bruto de *Spirulina* e extrato pré-purificado de ficocianina. O PEG foi variado de 40 a 70% (m/v), e o PBC, a 0,4% (m/v), de 50 µL a 150 µL, o pH foi fixado na faixa 6,0 e o volume tampão (fosfato) foi definido com volume de 25µl com pH na faixa de 6,0.

Após a montagem do sistema, o mesmo foi deixado em repouso por 48 horas em ambiente climatizado a 25° C. A separação das fases ocorreu após o período de repouso, ficando evidente a extração do pigmento com a faixa azul no *ependorfe*. Nesta faixa azul, foi coletado 0,2 mL de amostra do pigmento e feita uma diluição com 1,0 mL de água destilada para a leitura em espectrofotômetro da marca BIOSPECTRO SP-220 nos seguintes comprimentos de onda: 280nm, 562 nm, 620 nm e 652 nm. A partir dos resultados obtidos com as amostras, foram realizados os cálculos da concentração de Ficocianina e Aloficocianina e da Pureza, conforme descritos nos itens 4.9, 4.10 e 4.11, sendo utilizada a curva padrão para conversão das absorbâncias lidas em mg.mL⁻¹, conforme apresentada na Figura 3.

Figura 3 - Montagem sistema SAB para extração de ficobiliproteínas



Fonte: Antelo (2017); Autor (2018).

4.7. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Para o primeiro delineamento, foi realizado um planejamento fatorial 2^4 em triplicata, com duas repetições no ponto central sendo elaborado para avaliar as melhores concentrações para obter resultados satisfatórios para a extração e a purificação da ficocianina, aloficocianina e a pureza do extrato pré-purificado e o extrato bruto de *Spirulina*, avaliando a influência de uma ou mais variáveis, ou seja, a interação entre os fatores PBC, PEG, volume tampão e pH, tendo como variáveis respostas as concentrações de ficocianina e aloficocianina e pureza. Neste primeiro delineamento, foram analisadas as concentrações obtidas buscando valores que apresentassem os melhores resultados constatando, assim, qual ou quais variáveis de fato são significativas no processo de extração e purificação das ficobiliproteínas.

A Tabela 7 apresenta os níveis codificados e reais das variáveis estudadas para o planejamento fatorial 2^4 . Para este delineamento, foi realizada a variação de PBC de 0 μL a 100 μL . O PEG foi 20%, 30% e 40%. O pH teve uma variação com faixas de 6,0; 6,5 e 7,0. A solução de volume de sal fosfato de 25 μL , 75 μL e 125 μL , todos foram realizados em triplicata.

A partir dos resultados obtidos com o primeiro delineamento, foi realizado o planejamento DCCR 2^2 utilizando as variáveis que se apresentaram mais significativas no modelo gerado. O DCCR 2^2 para o extrato pré-purificado de ficocianina e o extrato bruto de *Spirulina* foi realizado com 10 ensaios, sendo quatro fatoriais (combinação dos níveis -1 e +1), dois pontos axiais ($-\alpha$ e $+\alpha$, com α igual a 1,41 e $-\alpha$ igual a -1,41) e duas repetições no ponto central (0), todos realizados em triplicata. A Tabela 8 apresenta os níveis codificados e reais das variáveis estudadas para o DCCR 2^2 , no qual foi fixado o volume de sal fosfato em 25 μL , o pH foi fixado na faixa de 6,0; sendo variado o PBC de 29 μL a 170 μL e o PEG de 33% a 76%.

Os resultados da Concentração de ficocianina, aloficocianina e pureza do extrato pré-purificado de ficocianina e do extrato bruto de *Spirulina* para os dois delineamentos foram analisadas estatisticamente mediante o

planejamento experimental através do *software* Statistica 7.0. Foi considerado nível de significância de 90%, ou seja, foram considerados significativos os parâmetros $p < 0,1$.

Tabela 7 - Matriz dos ensaios do Planejamento fatorial 2^4 com níveis codificados e reais das variáveis estudadas

Ensaio	[PBC] (μL)	[PEG] (%)	pH	Tampão (μL)
1	-1 (0)	-1 (20)	-1 (7)	-1 (25)
2	1 (100)	-1 (20)	-1 (7)	-1 (25)
3	-1 (0)	1 (40)	-1 (7)	-1 (25)
4	1 (100)	1 (40)	-1 (7)	-1 (25)
5	-1 (0)	-1 (20)	1 (6)	-1 (25)
6	1 (100)	-1 (20)	1 (6)	-1 (25)
7	-1 (0)	1 (40)	1 (6)	-1 (25)
8	1 (100)	1 (40)	1 (6)	-1 (25)
9	-1 (0)	-1 (20)	-1 (7)	1 (125)
10	1 (100)	-1 (20)	-1 (7)	1 (125)
11	-1 (0)	1 (40)	-1 (7)	1 (125)
12	1 (100)	1 (40)	-1 (7)	1 (125)
13	-1 (0)	-1 (20)	1 (6)	1 (125)
14	1 (100)	-1 (20)	1 (6)	1 (125)
15	-1 (0)	1 (40)	1 (6)	1 (125)
16	1 (100)	1 (40)	1 (6)	1 (125)
17	0 (50)	0 (30)	0 (6,5)	0 (75)
18	0 (50)	0 (30)	0 (6,5)	0 (75)

Tabela 8 - Matriz dos ensaios do DCCR 2^2 com níveis codificados e reais das variáveis estudadas

Ensaio	[PBC] (μL)	[PEG] (%)
1	-1(50)	-1(40)
2	-1 (50)	1 (70)
3	1 (150)	-1 (40)
4	1 (150)	1 (70)
5	0 (100)	-1,4142 (33,79)
6	0 (100)	1,4142 (76,21)
7	-1,4142(29,29)	0 (55)
8	1,4142(170,71)	0 (55)
9	0 (100)	0 (55)
10	0 (100)	0 (55)

4.8. CONCENTRAÇÃO DA FICOCIANINA

A concentração de ficocianina C, (mg.mL⁻¹) foi obtida por análise espectrofotométrica em 620nm e 652nm utilizando a Equação 1 (BENETT; BOGORAD, 1973). A leitura foi realizada com a parte da amostra em que se concentrou o pigmento após o processo de extração.

$$FC = \frac{(A_{620} - 0,474 A_{652})}{5,34} \quad \text{Equação 1}$$

Sendo:

- A_{620} é a absorbância da amostra a 620 nm;
- A_{652} é a absorbância da amostra a 652 nm.

4.9. CONCENTRAÇÃO DE ALOFICOCIANINA

A concentração de aloficocianina C, (mg.mL⁻¹) foi obtida por análise espectrofotométrica em 652nm e 620nm utilizando a Equação 2 (BENETT; BOGORAD, 1973). A leitura foi realizada com a parte da amostra em que se concentrou o pigmento após o processo de extração.

$$AFC = \frac{(A_{652} - 0,208 A_{620})}{5,09} \quad \text{Equação 2}$$

Sendo:

- A_{652} é a absorbância da amostra a 652 nm;
- A_{620} é a absorbância da amostra a 620 nm;

De acordo com Silvia (2008), estas equações foram utilizadas para a determinação da concentração de ficocianina e aloficocianina em

microalgas. Assim como no nosso estudo para a *Spirulina platensis*, as equações também foram utilizadas por outros autores, como Silveira *et al.* (2007) e Patel *et al.*, (2005).

4.10. DETERMINAÇÃO DE PUREZA

A determinação da pureza do extrato (PZ) foi obtida por análise espectrofotométrica utilizando a relação de 620 nm e 280 nm utilizando a Equação 3 (BENETT; BOGORAD, 1973). Uma forma bastante difundida e simples de determinar a pureza da ficocianina pode ser a partir da relação da absorbância a 620 nm do extrato, dividida pela absorbância do extrato a 280 nm. A leitura foi realizada com a parte da amostra em que se concentrou o pigmento após o processo de extração.

$$PZ = \frac{A_{620}}{A_{280}}$$

Equação 3

Onde:

- A_{620} é a absorbância da amostra a 620nm;
- A_{280} é a absorbância da amostra a 280nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. ESTUDO DO PH

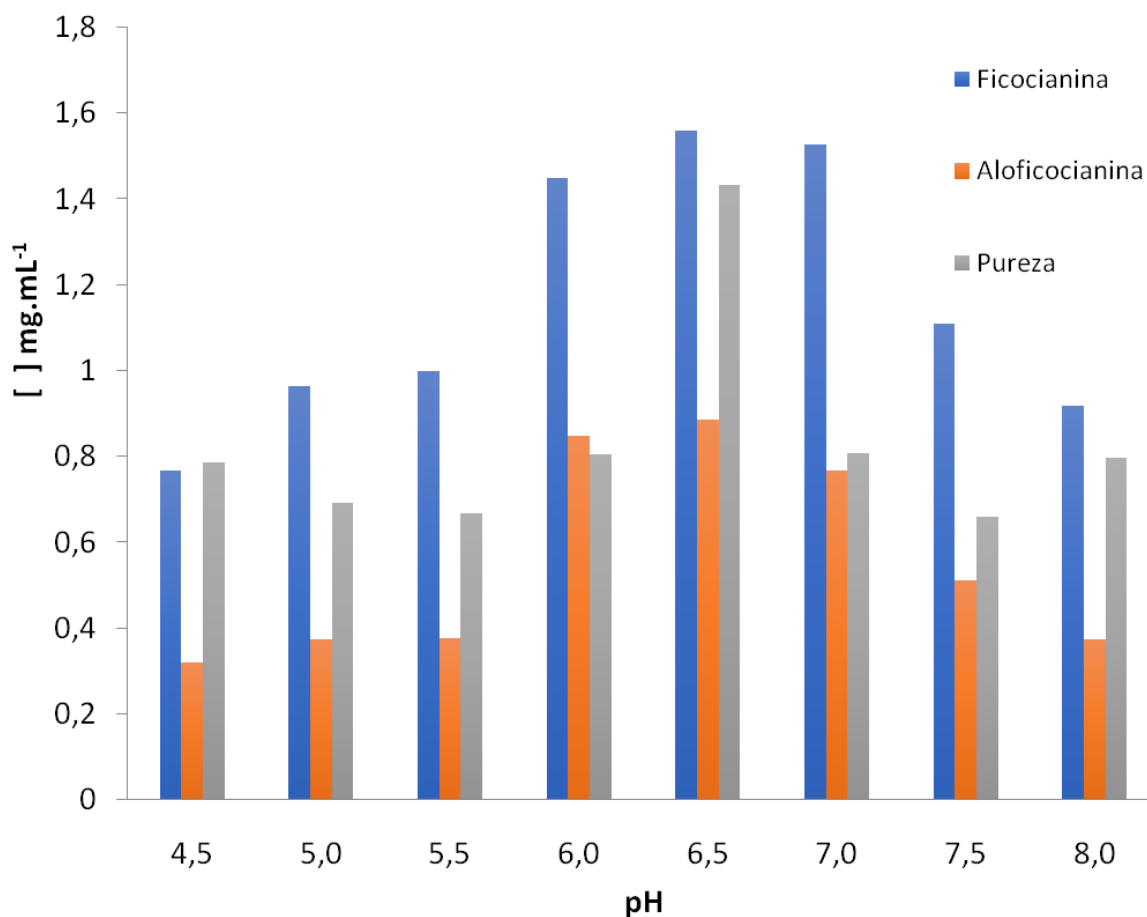
Os estudos para definição para melhor faixa de pH foram realizados utilizando os valores de pH (4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0), com 1,0 mL de extrato bruto de *Spirulina*, 5,0 mL de PEG e 0,5 de fosfato. Após a montagem do SAB para verificação da melhor faixa de pH para extração das ficobiliproteínas, esperou-se 48 horas para realização da leitura. Foi coletada a amostra da parte mais azul do *ependorfe*, ou seja, onde estava concentrada a maior parte de pigmento após a separação de fases.

Após a realização da análise de espectrofotometria, foi verificado que a melhor faixa de pH para a extração e a purificação de ficocianina e aloficocianina encontrava-se na faixa de pH 6,0 e 7,0, conforme Figura 4.

De acordo com Rito- Palomares *et al.*, (2001), a proteína apresenta o seu ponto isoelétrico, ou seja, a faixa de pH na qual as cargas negativas e positivas estão em equilíbrio na faixa de pH 5,8. Como no SAB utilizado neste estudo foram usadas as faixas de pH acima de 6,0, ou seja, valores acima do ponto isoelétrico da proteína, esta tende a ficar carregada com carga negativa pois a proteína é atraída pela fase rica em polímero que possui carga positiva. Ou seja, a ficocianina que possui carga parcial negativa vai ligar-se ao polietilenoglicol que possui carga parcial positiva. Silva (2005) relata nos estudos que na faixa de pH 5,0 o sistema permaneceu monofásico, o que não ocorreu no experimento deste trabalho em que foi verificada a separação de fases, principalmente com resultados satisfatórios para a extração entre as faixas de pH 6,0 e 7,0.

De acordo com os resultados obtidos, optou-se por estudar o processo de extração e purificação de ficocianina e aloficocianina por SAB com faixas de pH 6,0; 6,5 e 7,0. As melhores faixas em que foram alcançadas as maiores concentrações de ficocianina e aloficocianina foram as faixas de pH 6,0 e 7,0 e para pureza a faixa de pH 6,5, conforme Figura 4, para período de 48 horas.

Figura 4 - Resultados dos testes preliminares para obtenção da melhor faixa de pH para extração de ficocianina e aloficocianina



5.2. PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS

5.2.1 Planejamento Fatorial 2⁴ para Extração de Ficocianina utilizando Extrato Pré-Purificado de ficocianina e Extrato bruto de *Spirulina*

Tem-se a análise de planejamento experimental do tipo fatorial 2⁴, com 02 pontos centrais totalizando 18 experimentos realizados em triplicata, com variáveis independentes polímero de baixo catiônico (PBC), polietilenoglicol (PEG), pH e volume tampão e variáveis dependentes, ficocianina (FICO), aloficocianina (ALO) e pureza (PZ).

O planejamento fatorial do tipo comum 2^4 foi realizado com o objetivo de avaliar a influência de uma ou mais variáveis sobre outra de interesse, ou seja, prever a interação entre os fatores PBC, PEG, Volume Tampão e o pH; e como variável resposta a FICO, ALO e Pureza. O experimento foi realizado simultaneamente para o extrato pré-purificado de ficocianina e o extrato bruto de *Spirulina*. Neste primeiro momento, foram avaliadas as concentrações de PEG, PBC, volume tampão e pH, buscando valores que apresentassem os melhores resultados, constatando, assim, quais variáveis de fato são significativas para a extração e a purificação das ficobiliproteínas.

Os resultados obtidos no experimento de extração e purificação utilizando o planejamento fatorial 2^4 foram analisados estatisticamente mediante o planejamento experimental utilizando o *software* Statistica 7.0.

As Tabelas 9 e 10 apresentam a forma do modelo para a extração de ficocianina, para o extrato pré-purificado de ficocianina e o Extrato Bruto de *Spirulina*, respectivamente. Os fatores não relevantes com nível de significância superior a 10% ($p < 0,1$) foram retirados do modelo. Por se tratar da análise de vários modelos, optou-se por apresentar apenas as variáveis significativas para cada modelo.

Tabela 9 – Fatores do planejamento experimental 2^4 para extração e purificação de Ficocianina utilizando Extrato Pré-Purificado de Ficocianina

	Variáveis e interações	Coefficiente de Regressão	Nível de significância p – valor
Ficocianina (mg.mL⁻¹)	Termo Independente	1,395041	0,000000
	PBC μL (X₁) (L)	0,280280	0,000000
	PEG μL (X₂) (L)	0,213155	0,000003
	V. Tampão (X₄) (L)	-0,080491	0,049785
	R²	0,90	

$$\text{Ficocianina} = 1,395041 + 0,280280 * X_1 + 0,213155 * X_2 - 0,080491 * X_4$$

Equação 4

Tabela 10 - Fatores do planejamento experimental 2⁴ para extração e purificação de Ficocianina utilizando Extrato Bruto de *Spirulina*

	Variáveis e interações	Coefficiente de Regressão	Nível de significância p – valor
Ficocianina (mg.mL ⁻¹)	Termo Independente	1,521881	0,000000
	PBC µL (X ₁) (L)	0,223465	0,000007
	PEG µL (X ₂) (L)	0,263644	0,000000
	R ²	0,81	

$$(Ficocianina = 1,521881 + 0,223465 * X_1 + 0,263644 * X_2$$

Equação 5

Os resultados encontrados serão apresentados a partir do modelo reduzido, ou seja, foram considerados os fatores relevantes no processo e estes foram traduzidos em superfície de resposta e superfície de contorno para o extrato pré-purificado de ficocianina e o extrato bruto de *Spirulina* com os fatores que são significativos aos modelos com grau de significância a 90%. A partir das equações reduzidas (Equações 4 e 5), construíram-se as superfícies de resposta e superfície de contorno (Figuras 5 (a, b) e 6 (a,b)), do planejamento fatorial para análise da influência das variáveis PBC, PEG, pH e volume tampão na concentração de ficocianina para o extrato pré-purificado e para o extrato bruto de *Spirulina*.

Ao analisarmos os resultados apresentados, observa-se a influência entre as variáveis PBC e PEG na concentração de ficocianina utilizando o extrato pré-purificado de ficocianina (Figura 5) e o extrato bruto de *Spirulina* (Figura 6), em que é necessário utilizar maiores concentrações das variáveis PEG e PBC para obtenção de maiores concentrações de ficocianina. Isto pode ser evidenciado pelo modelo apresentado (Tabelas 9 e 10), comprovando que o comportamento destas variáveis é significativo para a extração de ficocianina para os dois extratos utilizados. Analisando a Equação 4, observa-se que a concentração de PBC exerceu maior interferência, ou seja, seu aumento estimula uma maior concentração de ficocianina para o extrato pré-purificado. Na Equação 5, pode-se observar

que a variável PEG exerceu maior interferência, o que mostra que com o seu aumento há maior concentração de ficocianina para o extrato bruto de *Spirulina*.

As curvas de nível de cor verde apresentam a região com os menores valores encontrados para concentração e as curvas de nível na cor vermelha apresentam as melhores respostas e, conseqüentemente, os melhores valores encontrados.

Rodrigues (2017) compara diferentes métodos de extração de ficocianina com extrato bruto de *Spirulina* utilizando extração por micro-ondas obtendo $0,74 \text{ mg.mL}^{-1}$ e extração por ultrassom obtendo $0,85 \text{ mg.mL}^{-1}$ para concentrações de ficocianina. Com a utilização do método SAB, o experimento deste trabalho utilizando PEG/PBC e Sal obteve-se $2,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ de concentração de ficocianina para o extrato pré-purificado e $2,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ de concentração de ficocianina para o extrato bruto de *Spirulina*. Foi observado que este método foi eficaz, pois alcançou concentrações consideráveis de ficocianina para os dois extratos utilizados.

Figura 5 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e PEG para Concentração de Ficocianina com Extrato Pré-Purificado de Ficocianina

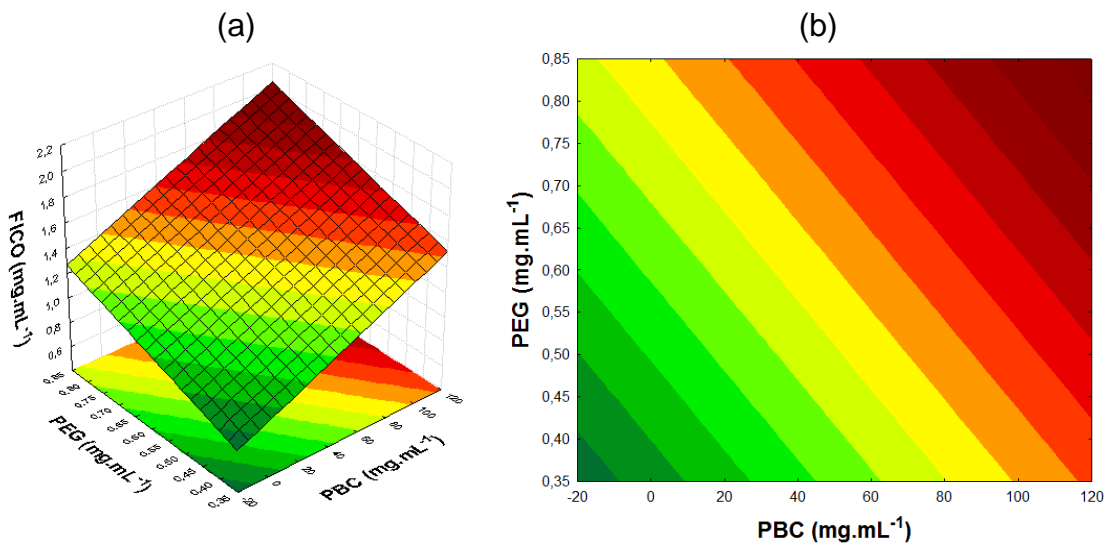
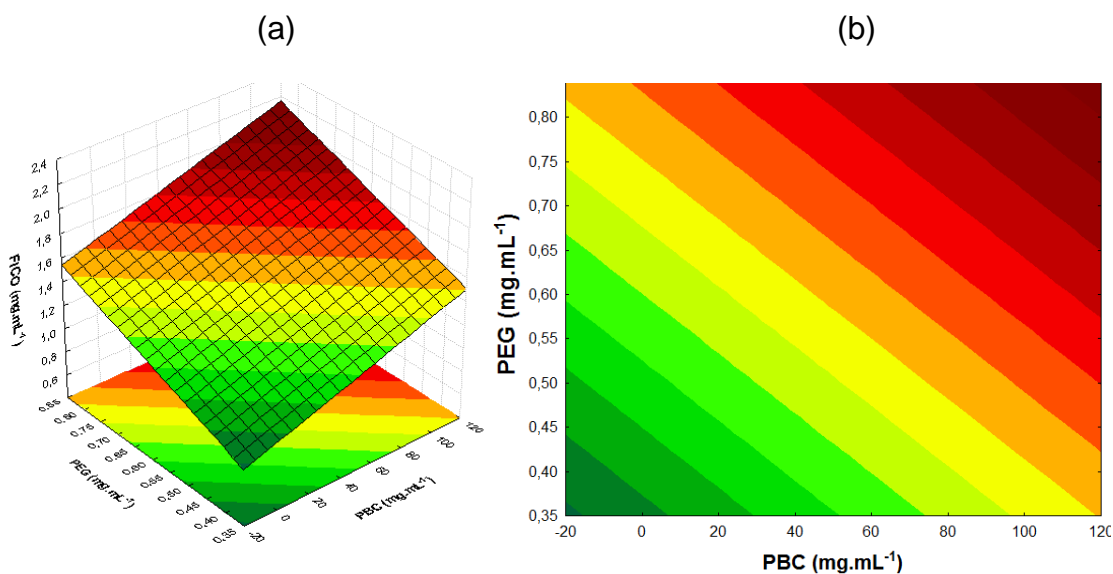


Figura 6 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e PEG para Concentração de Ficocianina com Extrato Bruto de *Spirulina*



Nas Figuras 7 e 8 são apresentadas a análise com as variáveis PEG e pH, evidenciando que a variável PEG é significativa ao modelo proposto utilizando os dois extratos (Tabelas 9 e 10). Na superfície de resposta, foi verificado que as maiores concentrações de ficocianina são observadas com maiores concentrações de PEG. Esse comportamento foi observado utilizando o extrato pré-purificado de ficocianina e o extrato Bruto de *Spirulina*.

Nota-se que na superfície de contorno não há influência da concentração de pH na extração de ficocianina, o mesmo comportamento não ocorre com o PEG, pois verifica-se que quanto maior a concentração de PEG utilizada melhor serão as concentrações obtidas na extração de ficocianina. Obteve-se 1,7 mg.mL⁻¹ para concentração de ficocianina utilizando o extrato pré-purificado de ficocianina e 1,8 mg.mL⁻¹ para concentração de ficocianina utilizando o extrato bruto de *Spirulina*.

Figura 7 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PEG e pH para Concentração de Ficocianina com Extrato Pré-Purificado de Ficocianina

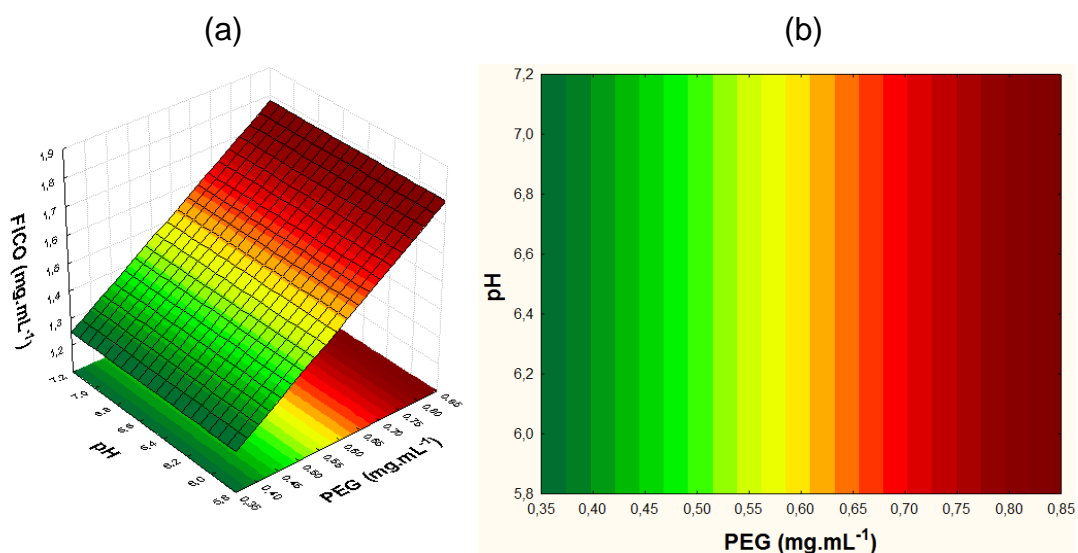
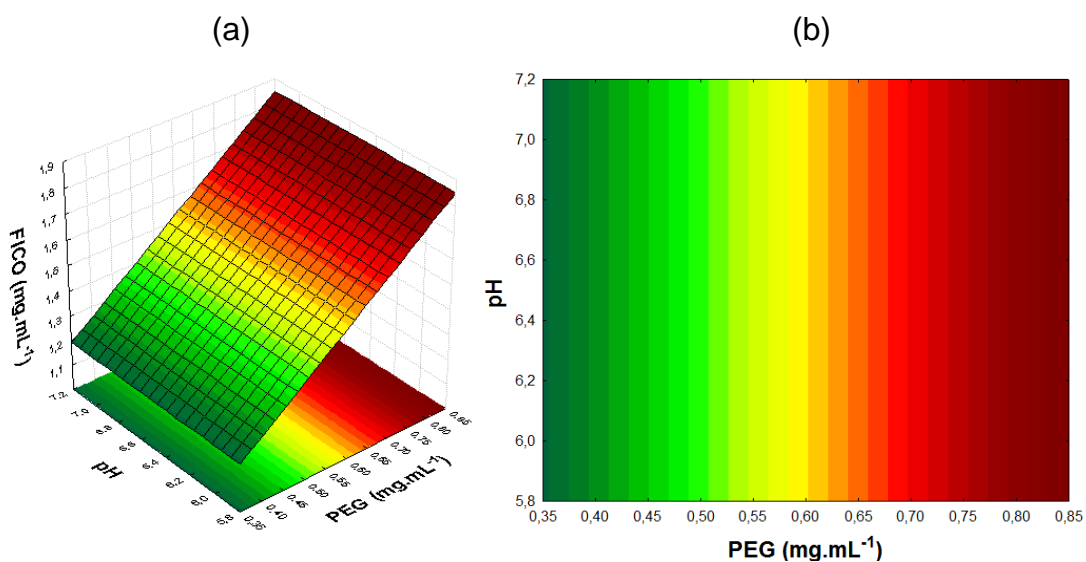


Figura 8 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PEG e pH para Concentração de Ficocianina com Extrato Bruto de *Spirulina*



Para análise das Figuras 9 e 10, observa-se a relação de PEG e volume tampão apresentando as superfícies de resposta e superfícies de contorno para o extrato purificado de ficocianina e extrato bruto de *Spirulina*. Para o extrato pré-purificado temos as duas como significativas ao modelo proposto (Equação 4), utilizando o extrato pré-purificado. Entretanto, o efeito da concentração de volume tampão apresenta valor negativo para o extrato

pré-purificado, o que indica que, para se obter maiores concentrações de ficocianina, são necessárias menores concentrações de volume tampão. Observa-se que, para o extrato bruto de *Spirulina*, a variável volume tampão não é significativa (Tabela 10). Obtendo 1,7 mg.mL⁻¹ de concentração de ficocianina para o Extrato pré-purificado e 1,8 mg.mL⁻¹ de concentração de ficocianina para o extrato bruto de *Spirulina*, conforme as Figuras 9 (a) e 10 (a). Verifica-se, através das Figuras 9 (b) e 10 (b), que as maiores concentrações utilizadas de PEG proporcionam as melhores concentrações de ficocianina e que o volume tampão não apresentou interferência para os dois extratos utilizados.

Figura 9 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PEG e Volume Tampão para Concentração de Ficocianina com Extrato Pré-Purificado de Ficocianina

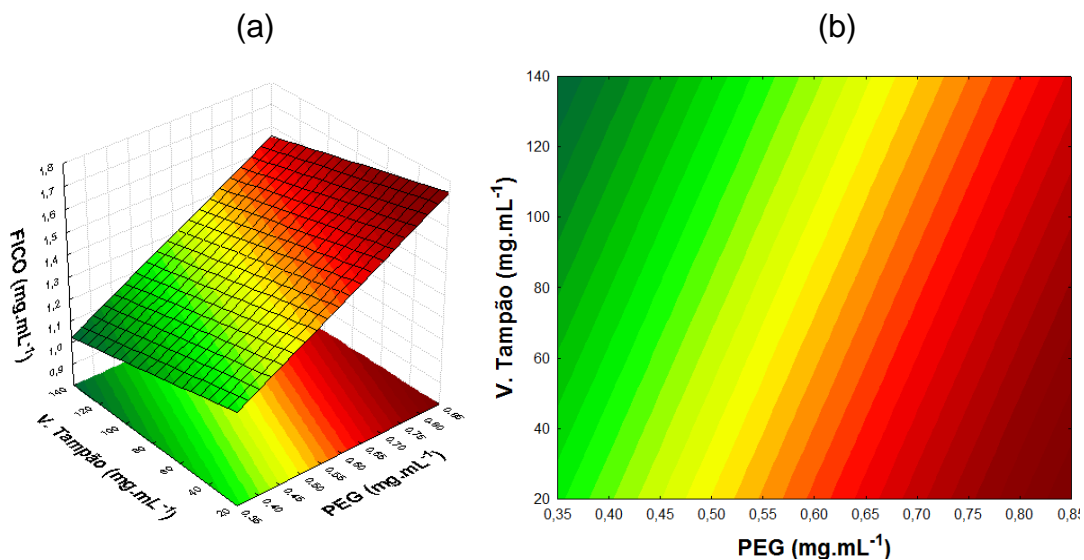
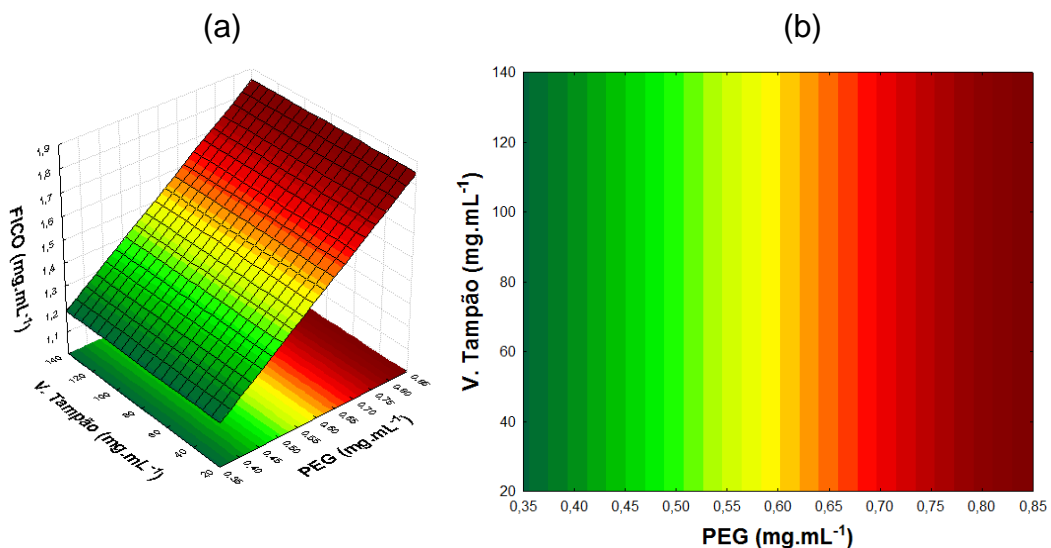


Figura 10 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PEG e Volume Tampão para Concentração de Ficocianina com Extrato Bruto de *Spirulina*



Observa-se, nas Figuras 11 e 12, a relação entre PBC e pH. A variável PBC é significativa para os dois extratos utilizados. Obteve-se para o extrato pré-purificado com faixas menores de pH e alta concentração de PBC 1,9 mg.mL⁻¹ de concentração de ficocianina para o extrato pré-purificado e com as mesmas condições obteve-se 1,8 mg.mL⁻¹ para o extrato bruto de *Spirulina*. Quando se analisa as superfícies de contorno do extrato pré-purificado de ficocianina e do extrato bruto de *Spirulina* (Figuras 11 (b) e 12 (b)), observa-se que há necessidade de altas concentrações de PBC para melhores concentrações de ficocianina e não se observa interferência do pH.

Figura 11 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e pH para Concentração de Ficocianina com Extrato Pré-Purificado de Ficocianina

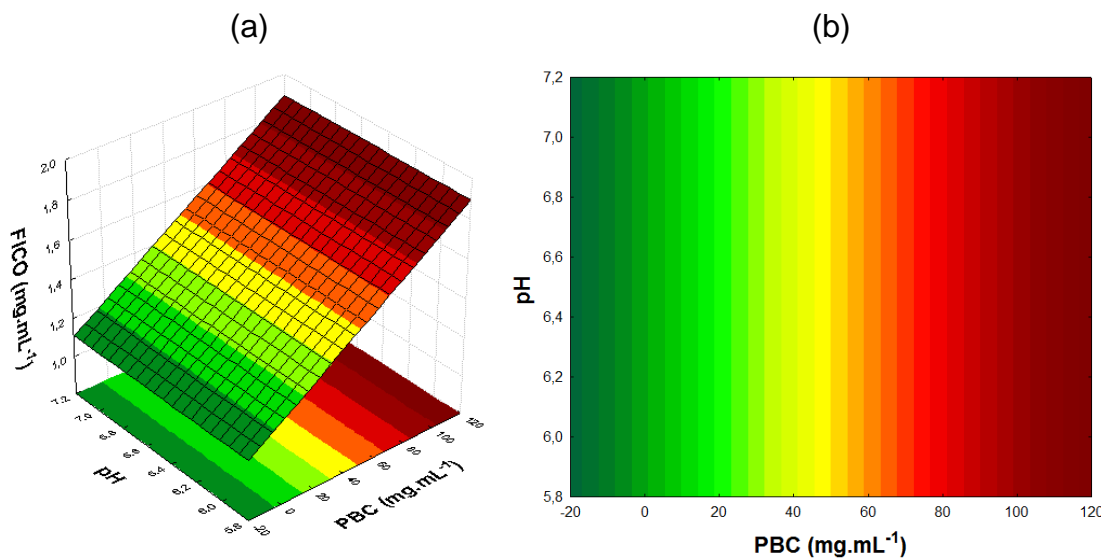
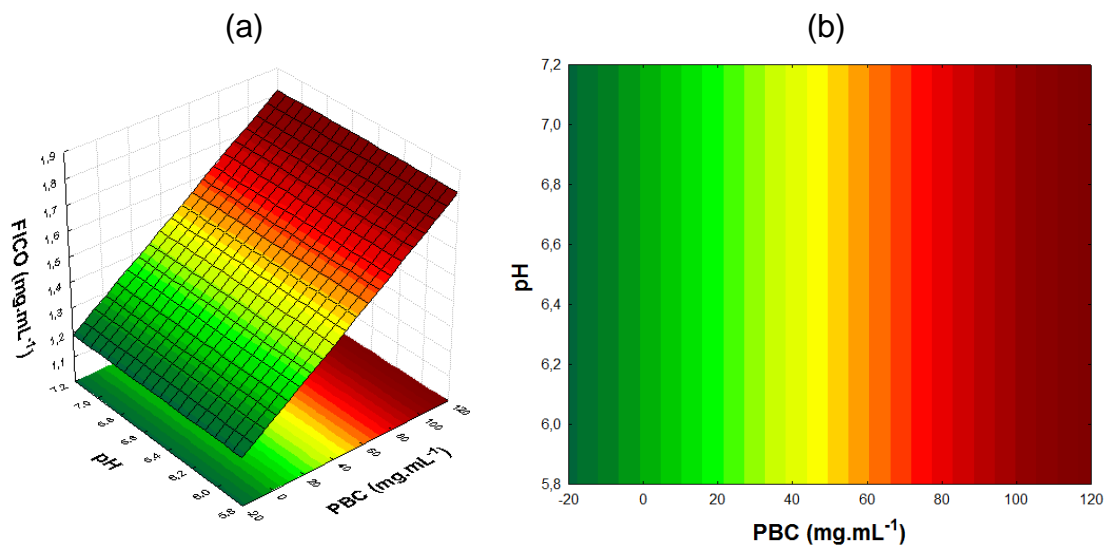


Figura 12 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e pH para Concentração de Ficocianina com Extrato Bruto de ficocianina



Para as superfícies apresentadas nas Figuras 13 e 14, observa-se a relação entre PBC e volume tampão. A variável PBC e o volume tampão são significativos para o extrato pré-purificado, como apresentado na Tabela 9. Ao analisar o extrato Bruto de *Spirulina*, somente a variável PBC é significativa e não há interação entre as mesmas (Tabela 10). Obteve-se 1,8 mg.mL⁻¹ de concentração de ficocianina para o extrato pré-purificado de ficocianina e 1,8 mg.mL⁻¹ de concentração de ficocianina para o extrato bruto de *Spirulina* (Figuras 13 (a) e 14 (a)). E, ao analisar as Figuras 13 (b) e 14 (b), observa-se que para as maiores concentrações de Ficocianina são necessárias maiores concentrações de PBC e o volume tampão não exerce influência significativa para o processo de extração.

Figura 13 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e Volume Tampão para Concentração de Ficocianina com Extrato Pré-Purificado de Ficocianina

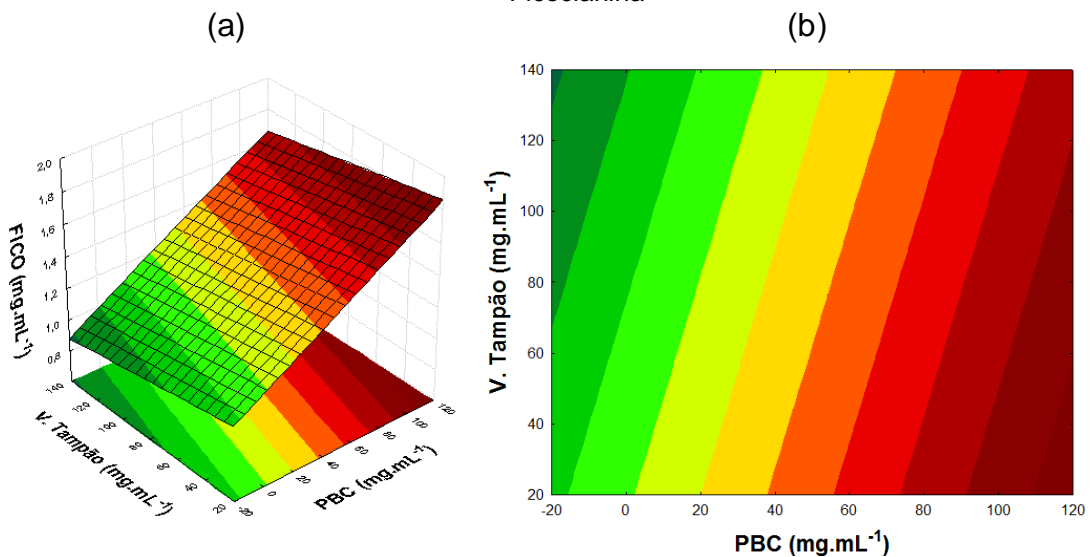
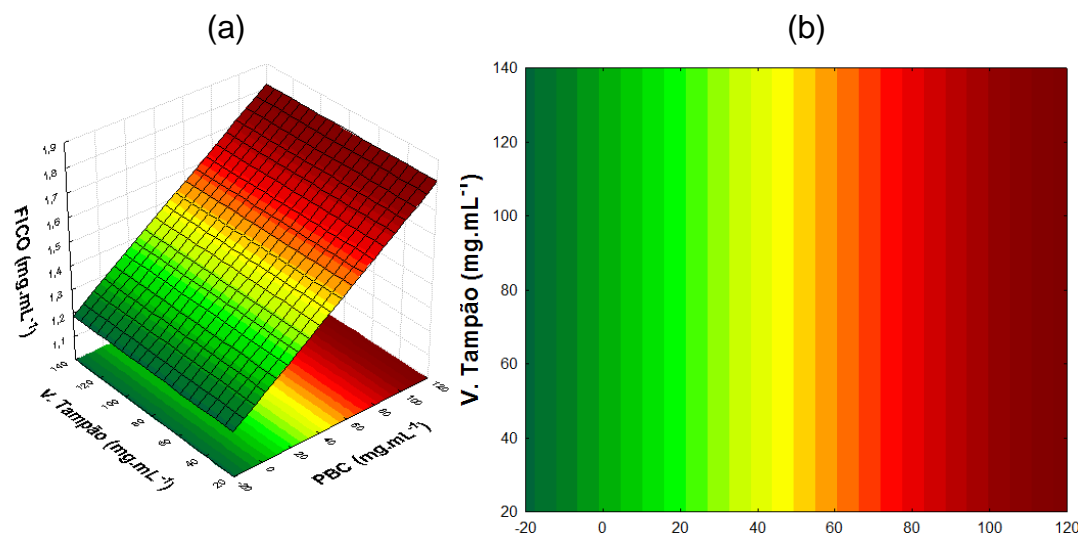


Figura 14 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e Volume Tampão para Concentração de Ficocianina com Extrato Bruto de *Spirulina*



Para análise das Figuras 15 e 16, tem-se a relação das variáveis pH e do volume tampão. Sendo o volume tampão significativo para o extrato pré-purificado, o mesmo não ocorre com o pH, assim como não há interação entre estas variáveis. Para o extrato bruto, as variáveis não são significativas para o modelo, como visto na Tabela 9. Observando-se, nas Figuras 16(a, b) e 17(a, b), que em concentrações mais baixas de volume tampão e com o pH na faixa de 6,0 obtêm-se as melhores concentrações de ficocianina. Obteve-se $1,4 \text{ mg.mL}^{-1}$ para o extrato pré-purificado de ficocianina e $1,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ para o extrato bruto de *Spirulina*.

Figura 15 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação pH e Volume Tampão para Concentração de Ficocianina com Extrato Pré-Purificado de Ficocianina

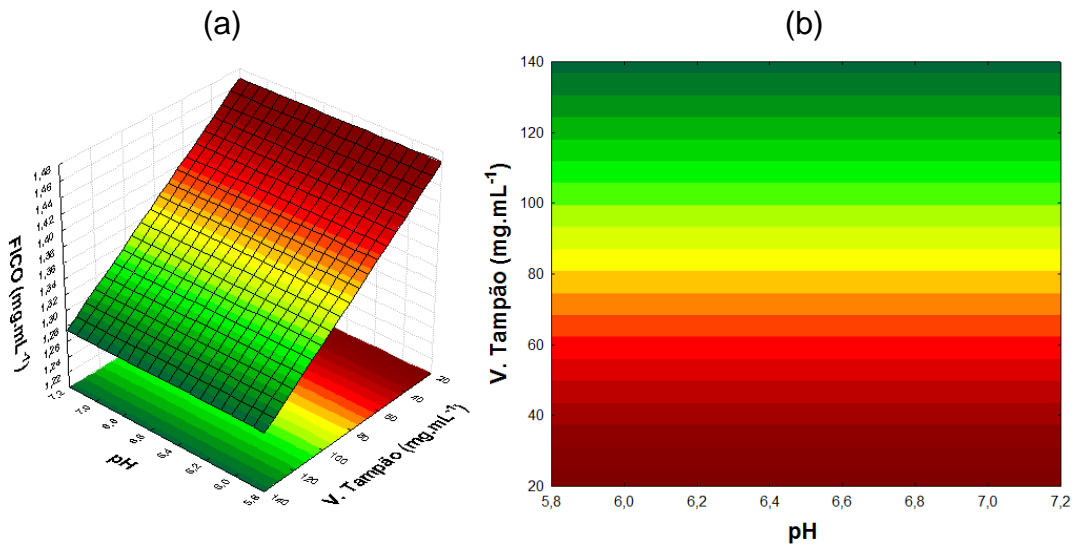
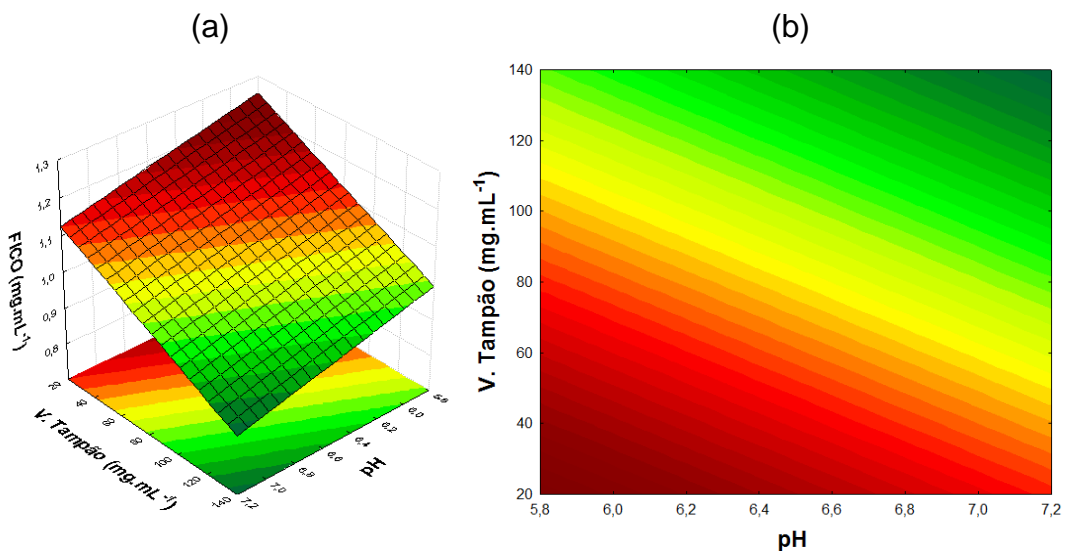


Figura 16 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação pH e Volume Tampão para Concentração de Ficocianina com extrato bruto de *Spirulina*



5.2.2 Planejamento Fatorial 2⁴ para Extração de Aloficocianina com Extrato Pré-Purificado de ficocianina e Extrato bruto de *Spirulina*

As Tabelas 11 e 12 apresentam o modelo para a extração de aloficocianina, para o Extrato de ficocianina pré-purificado e para o extrato bruto de *Spirulina*, respectivamente.

Os fatores não relevantes ao processo de extração de Aloficocianina com nível de significância superior a 10% ($p < 0,1$) foram retirados do modelo. Por se tratar da análise de vários modelos, optou-se por apresentar apenas as variáveis significativas para o modelo utilizando extrato pré-purificado de ficocianina e extrato bruto de *Spirulina*.

Tabela 11 - Fatores do planejamento experimental 2⁴ para extração de Aloficocianina para extrato pré-purificado de Ficocianina

	Variáveis e interações	Coefficiente de Regressão	Nível de significância p – valor
Aloficocianina (mg.mL ⁻¹)	Termo Independente	0,666256	0,000000
	PBC µL (X ₁) (L)	0,153939	0,000000
	PEG µL (X ₂) (L)	0,096394	0,000182
	pH µL (X ₃) (L)	-0,044530	0,070821
	V. Tampão (x ₄) (L)	-0,043914	0,071265
	R ²	0,76	

Aloficocianina

$$= 0,666256 + 0,153939 * X_1 + 0,096394 * X_2 - 0,044530 * X_3 - 0,043914 * X_4$$

Equação 6

Tabela 12 - Fatores do planejamento experimental 2⁴ para extração de Aloficocianina para extrato bruto de *Spirulina*

	Variáveis e interações	Coefficiente de Regressão	Nível de significância p – valor
Aloficocianina (mg.mL ⁻¹)	Termo Independente	0,695291	0,000000
	PBC μL (X ₁) (L)	0,091531	0,000038
	PEG μL (X ₂) (L)	0,149502	0,000000
	pH μL X ₃ (L)	0,049804	0,017450
	V. Tampão (X ₄) (L)	0,695291	0,000000
	R ²	0,82	

$$\text{Aloficocianina} = 0,695291 + 0,091531 * X_1 + 0,149502 * X_2 + 0,049804 * X_3 + 0,695291 * X_4$$

Equação 7

A partir da equação reduzida (Equações 6 e 7), foram geradas as superfícies de resposta e superfície de contorno da relação PBC e PEG, apresentadas nas Figuras 17 e 18. Pode-se observar que as duas variáveis são significativas ao modelo, como apresentado nas Tabelas 11 e 12, em que estas variáveis possuem interferência na obtenção da concentração de aloficocianina para os dois extratos utilizados. É possível confirmar esta interação analisando as regiões nas quais se apresentam as maiores concentrações de aloficocianina, sendo 1,0 mg.mL⁻¹ concentração de aloficocianina para extrato pré-purificado e 1,0 mg.mL⁻¹ para o extrato bruto de *Spirulina*.

Figura 17 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e PEG para Concentração de aloficocianina com Extrato Pré-Purificado de Ficocianina

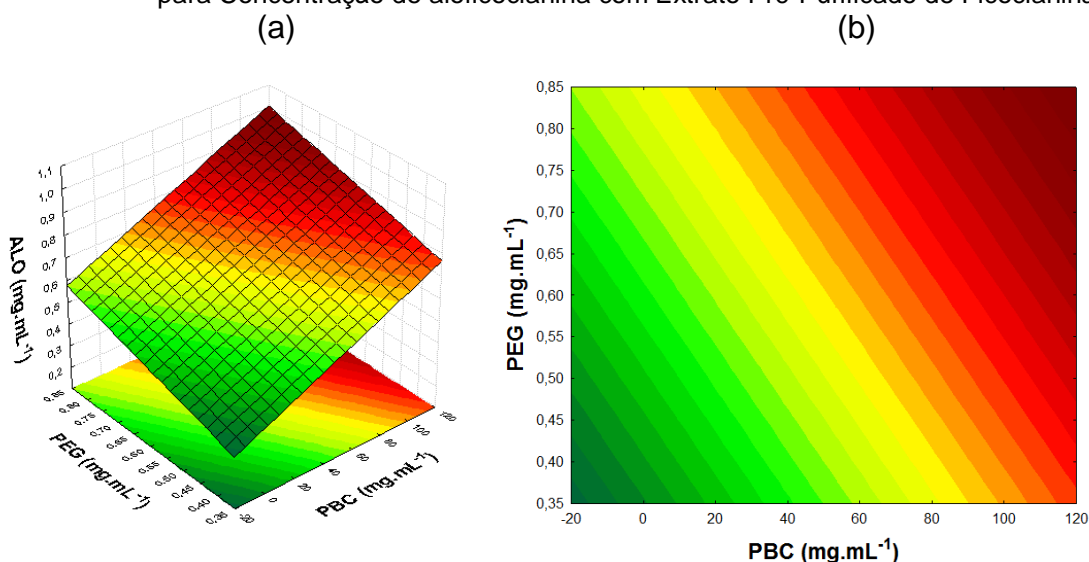
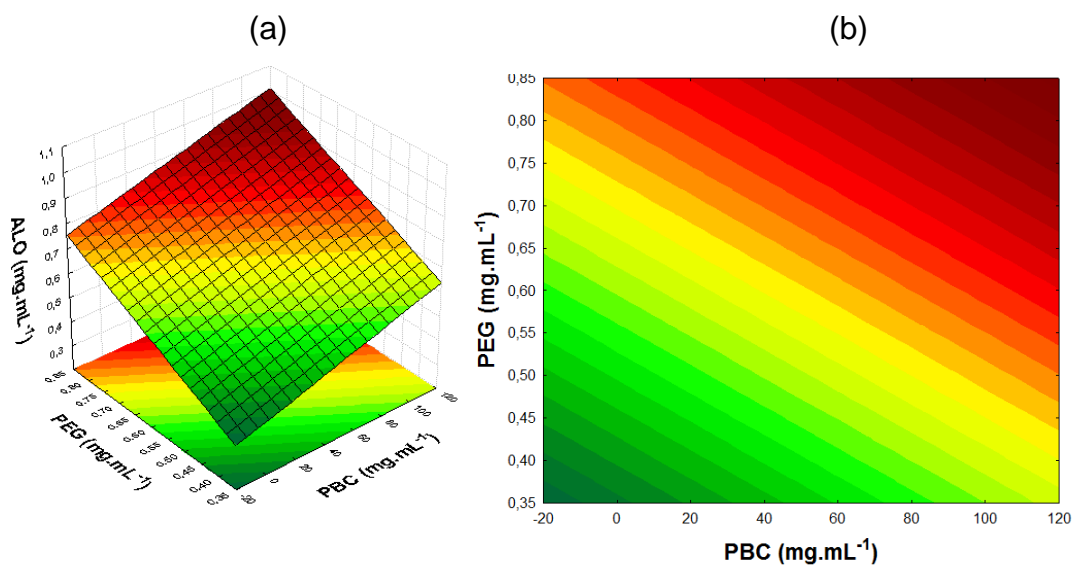


Figura 18 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e PEG para Concentração de aloficocianina com Extrato Bruto de *Spirulina*



As Figuras 19 e 20 apresentam a relação entre PEG e pH. O PEG tem efeito significativo para a extração de aloficocianina para os dois extratos estudados, pois se observa que em altas concentrações de PEG são obtidas melhores concentrações de aloficocianina. Quando se analisa o pH, este não apresenta significância para a extração da aloficocianina. Obteve-se 0,8 mg.mL⁻¹ para o extrato pré-purificado de ficocianina e 0,8 mg.mL⁻¹ para o extrato bruto de *Spirulina*.

Figura 19 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PEG e pH para Concentração de aloficocianina com Extrato Pré-Purificado de Ficocianina

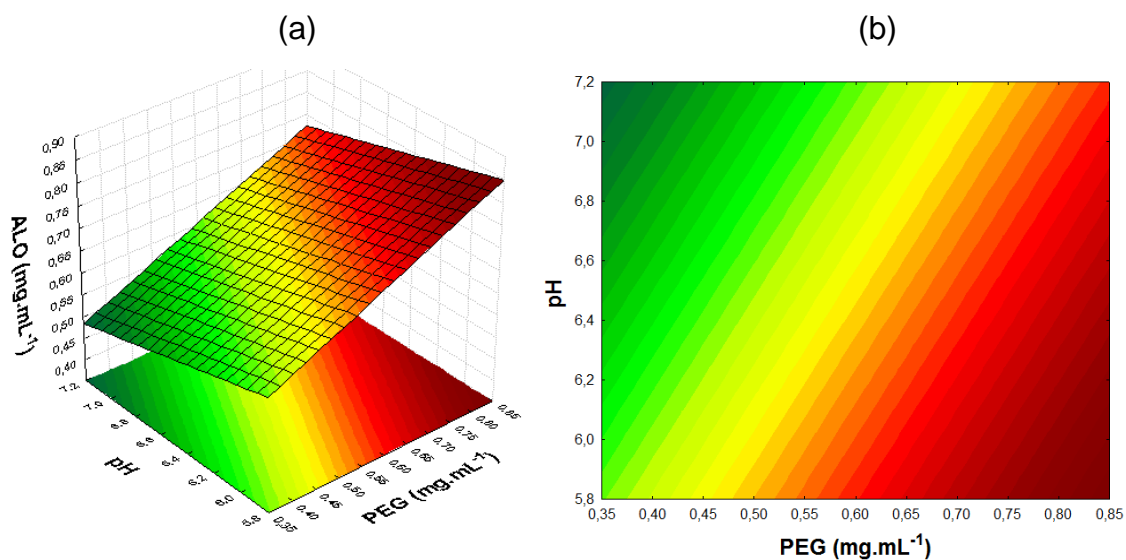
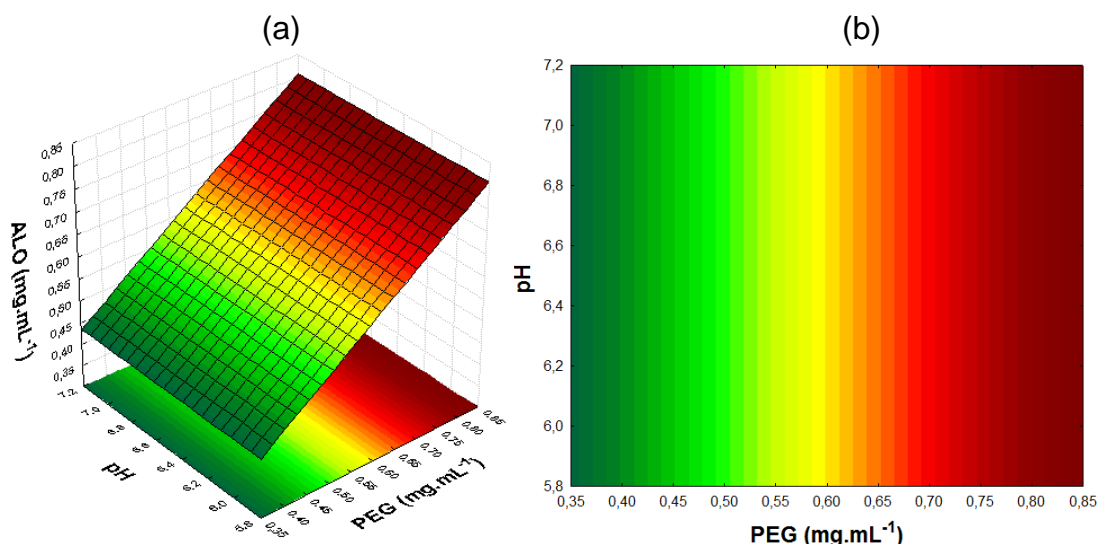


Figura 20 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PEG e pH para Concentração de aloficocianina com Extrato bruto de *Spirulina*



Nas Figuras 21 e 22 observa-se a relação entre PEG e Volume Tampão. Estas variáveis são significativas no modelo proposto para os dois extratos trabalhados. Nota-se nas superfícies de resposta (Figuras 21(a) e 22 (a)) que, para se obter as melhores concentrações de aloficocianina, são necessárias maiores concentrações de PEG. Já em relação ao volume tampão, este não se apresenta como fator de significância para a extração do pigmento tanto para o extrato pré-purificado de ficocianina como para o extrato bruto de *Spirulina*. Para o extrato pré-purificado de ficocianina, obteve-se 0,8 mg.mL⁻¹ para concentração de aloficocianina e bruto de *Spirulina* 0,9 mg.mL⁻¹ para o extrato bruto de *Spirulina*.

Figura 21 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PEG e Volume tampão para Concentração de aloficocianina com Extrato Pré-Purificado de Ficocianina

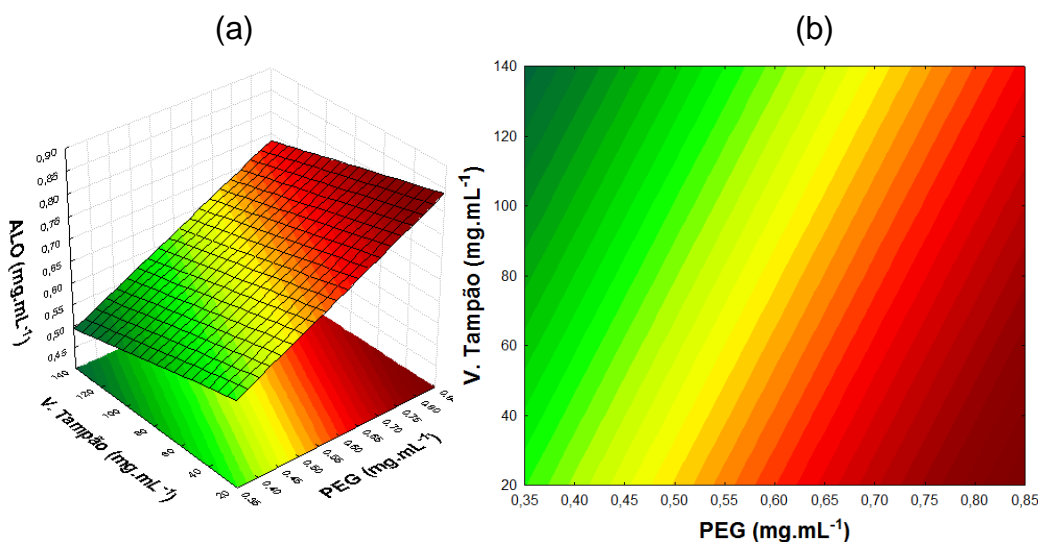
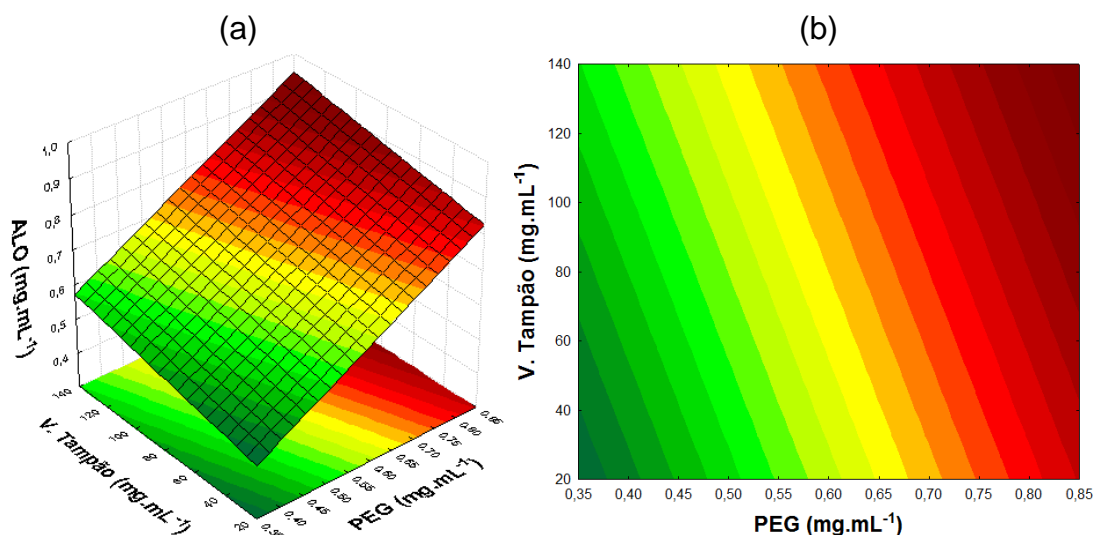


Figura 22 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PEG e Volume tampão para Concentração de aloficocianina com Extrato bruto de *Spirulina*



Nas Figuras 23 e 24 observam-se a relação entre PBC e pH. Pode-se notar, nas Figuras 23 e 24, que a variável pH não foi significativa para nenhum dos modelos propostos. Após a análise, pode-se verificar que os níveis em que a cor está mais vermelha condiz com as maiores concentrações encontradas nas superfícies para o extrato pré-purificado de ficocianina e para o extrato bruto de *Spirulina*. Obteve-se, para concentração de aloficocianina, 0,9 mg.mL⁻¹ para o extrato pré-purificado de ficocianina e 0,7 mg.mL⁻¹ para o extrato Bruto de *Spirulina*.

Figura 23 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e pH para Concentração de aloficocianina com Extrato Pré-Purificado de Ficocianina

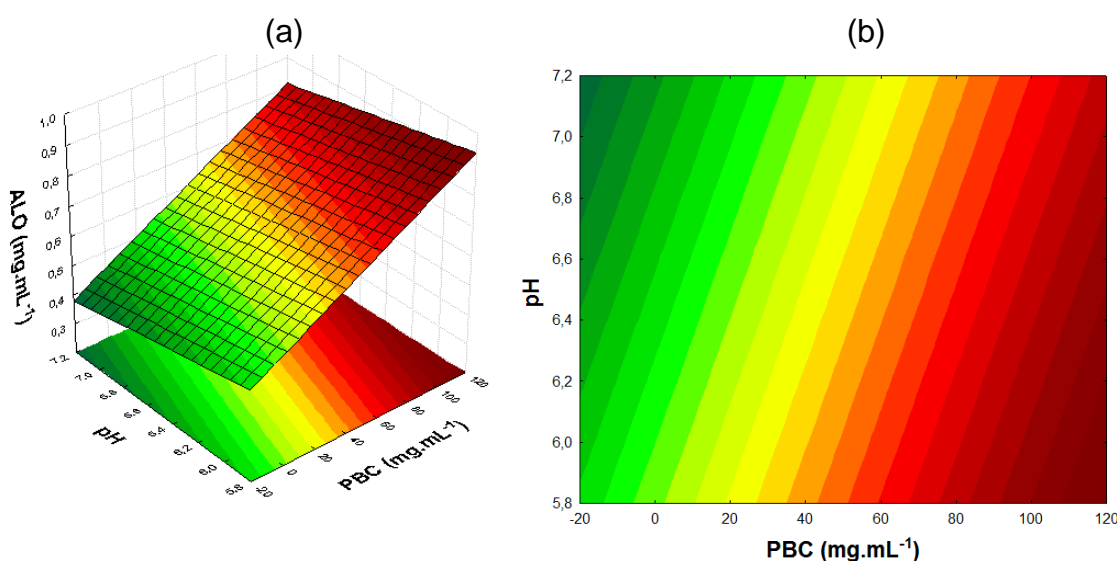
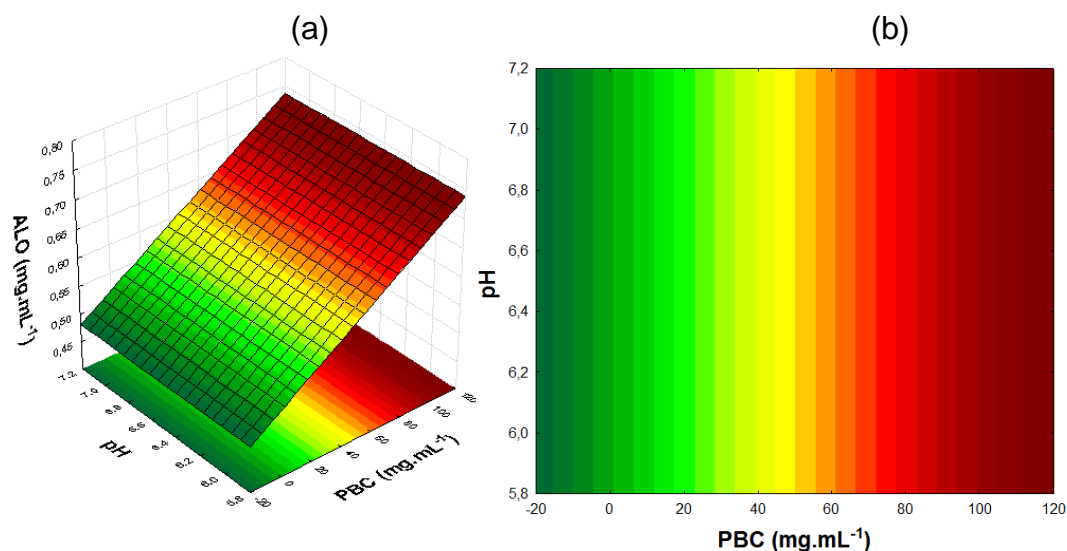


Figura 24 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e pH para Concentração de aloficocianina com Extrato Bruto de *Spirulina*



Para análise das Figuras 25 e 26, verifica-se a relação entre PBC e volume tampão, em que as duas variáveis são significativas, de acordo com as Tabelas 10 e 11. Entretanto, para o extrato pré-purificado, o volume tampão apresenta efeito negativo, ou seja, quanto menor a concentração de volume tampão maior será a concentração de aloficocianina. Para o extrato bruto de *Spirulina*, as maiores concentrações de aloficocianina apresentam-se nas maiores concentrações de PBC. No extrato pré-purificado de ficocianina obteve-se 0,9 mg.mL⁻¹ e 0,8 mg.mL⁻¹ para concentração de aloficocianina para o extrato bruto de *Spirulina*.

Figura 25 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e Volume Tampão para Concentração de aloficocianina com Extrato pré-purificado de Ficocianina

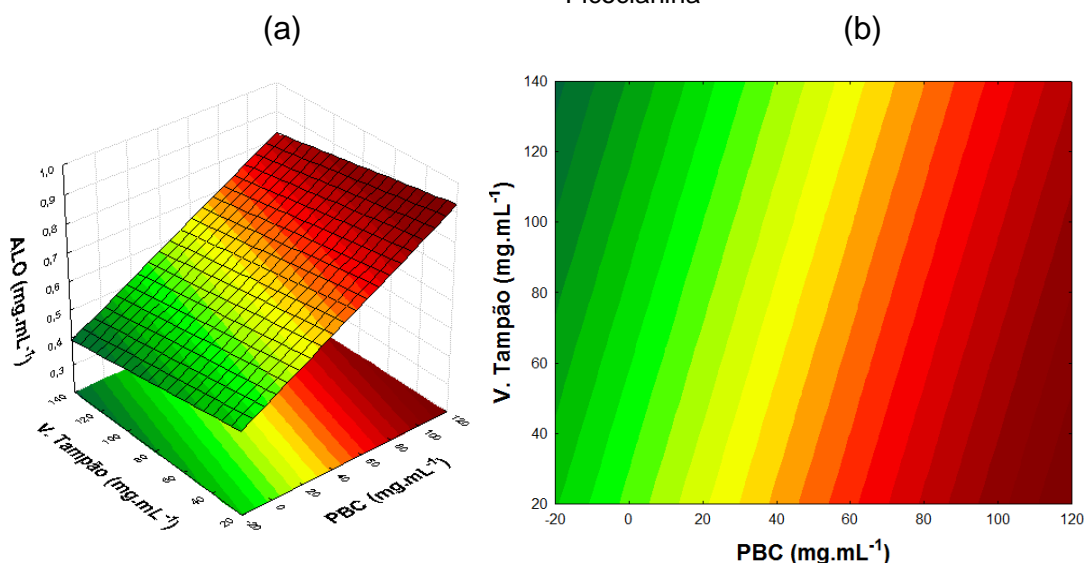
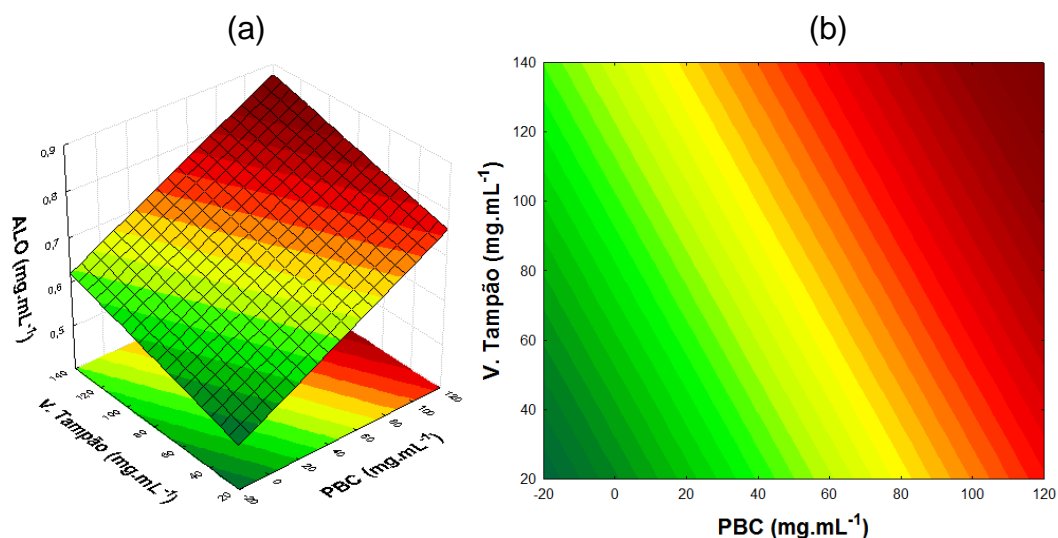


Figura 26 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e Volume Tampão para Concentração de aloficocianina Extrato Bruto de *Spirulina*



Para análise de pH e volume tampão, temos as superfícies resposta e superfícies de contorno apresentadas nas Figuras 27 (a e b) e 28 (a e b). Observa-se que, comparando estas duas variáveis, estas apresentam os melhores resultados nas menores concentrações de volume tampão e nas menores faixas de pH, obtendo-se 0,7 mg.mL⁻¹ para concentração de aloficocianina utilizando extrato pré-purificado de ficocianina e 0,7 mg.mL⁻¹ para concentração de ficocianina utilizando extrato bruto de *Spirulina*.

Figura 27 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação pH e Volume Tampão para Concentração de aloficocianina com Extrato pré-purificado de Ficocianina

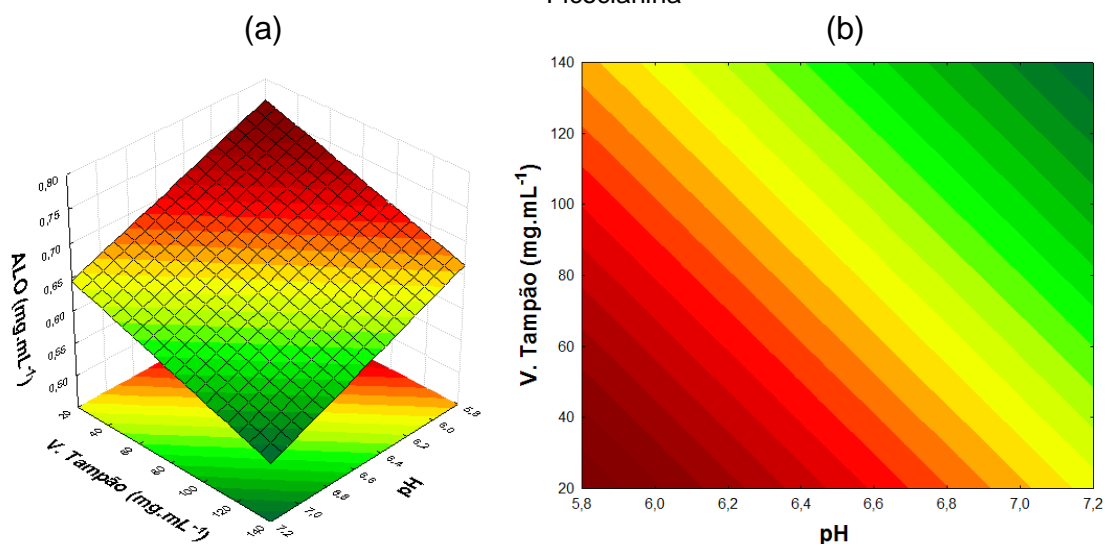
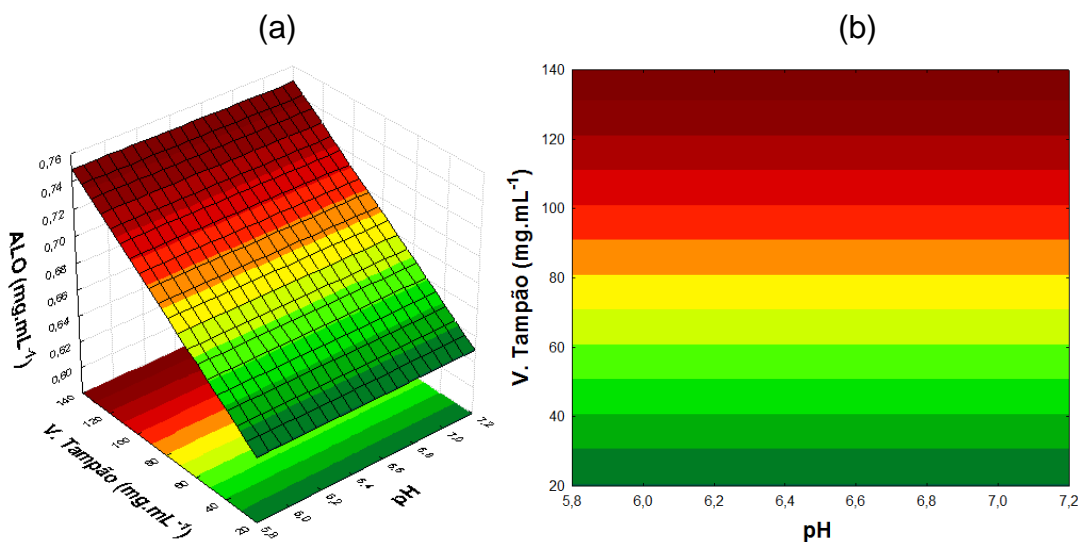


Figura 28 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação pH e Volume Tampão para Concentração de aloficocianina com Extrato bruto de *Spirulina*



5.2.3 Planejamento Fatorial 2^4 para Pureza com Extrato Pré-Purificado de ficocianina e Extrato bruto de *Spirulina*

Reis *et al.* (1998) afirmam que a pureza é considerada baixa se o valor alcançado for menor que 1,0 a partir da relação da absorvância lida do extrato utilizado a 620 nm dividido pela absorvância lida do extrato a 280 nm. Na indústria de alimentos e cosméticos, as ficobiliproteínas podem ser utilizadas com valores de 0,7 ou acima, contudo, se obtiver valores acima de 4,0, então considera-se com alto grau de pureza e pode ser utilizada em indústrias farmacêuticas.

Nas Tabelas 13 e 14 estão dispostos os fatores do planejamento para Pureza utilizando extrato pré-purificado de ficocianina e extrato bruto de *Spirulina*. Os fatores não relevantes na regressão múltipla, com nível de significância superior a 10% ($p < 0,1$), foram retirados do modelo. Por se tratar da análise de vários modelos, optou-se por apresentar apenas as variáveis significativas para cada modelo.

Tabela 13 - Fatores do planejamento experimental 2⁴ para Pureza utilizando extrato pré-purificado de Ficocianina

	Variáveis e interações	Coefficiente de Regressão	Nível de significância p – valor
Pureza	Termo Independente	1,187229	0,000000
	PBC µL (X ₁) (L)	0,146399	0,000000
	PEG µL (X ₂) (L)	-0,042955	0,052980
	V. Tampão (x ₄) (L)	-0,050315	0,023480
	R ²	0,80	

$$Pureza = 1,187229 + 0,146399 * X_1 - 0,042955X_2 - 0,050315 * X_4$$

Equação 8

Tabela 14 - Fatores do planejamento experimental 2⁴ para Pureza utilizando o Extrato bruto de *Spirulina*

	Variáveis e interações	Coefficiente de Regressão	Nível de significância p – valor
Pureza	Termo Independente	0,932340	0,000000
	PBC µL (X ₁) (L)	0,096157	0,000000
	PEG µL (X ₂) (L)	0,066162	0,000187
	R ²	0,92	

$$Pureza = 0,932340 + 0,096157 * X_1 + 0,066162 * X_2$$

Equação 9

A partir das equações reduzidas (Tabelas 13 e 14), foram geradas as superfícies de resposta e superfícies de contorno (Figuras 29 (a, b) e 30 (a, b)) do planejamento fatorial para análise da influência das variáveis PBC, PEG, pH e Volume Tampão para a Pureza. Pode-se observar que as variáveis PBC e PEG são significativas aos modelos, como apresentado nas Tabelas 13 e 14. Observa-se que estas variáveis possuem interferência na obtenção da Pureza dos extratos em estudo, sendo possível confirmar esta interação analisando as regiões nas quais se apresentam os maiores valores de Pureza encontrados. Para este trabalho utilizando SAB com

PEG/PBC/Sal fosfato, obteve-se 1,4 de Pureza para extrato pré-purificado de ficocianina e 1,1 de Pureza para o extrato bruto de *Spirulina*.

Na utilização do método de precipitação fracionada do extrato de *Spirulina* com sulfato de amônio (PATEL *et al.*, 2005), obteve-se pureza de 0,82. Silva (2008) relata que foi feita a purificação de *Spirulina* utilizando permeação em gel com resina, obtendo pureza com 2,1.

Figura 29 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e PEG para Pureza com Extrato pré-purificado de Ficocianina

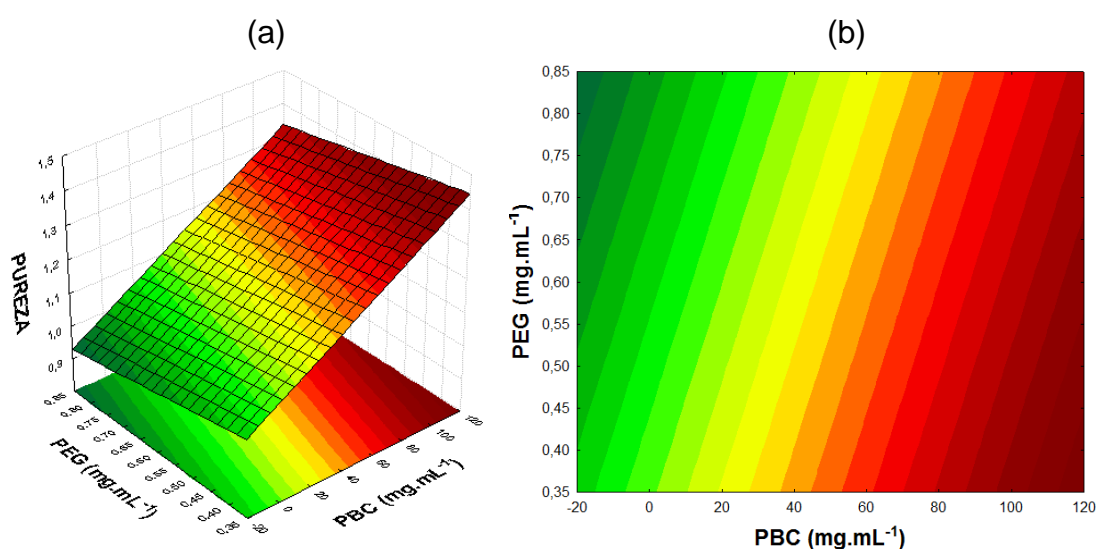
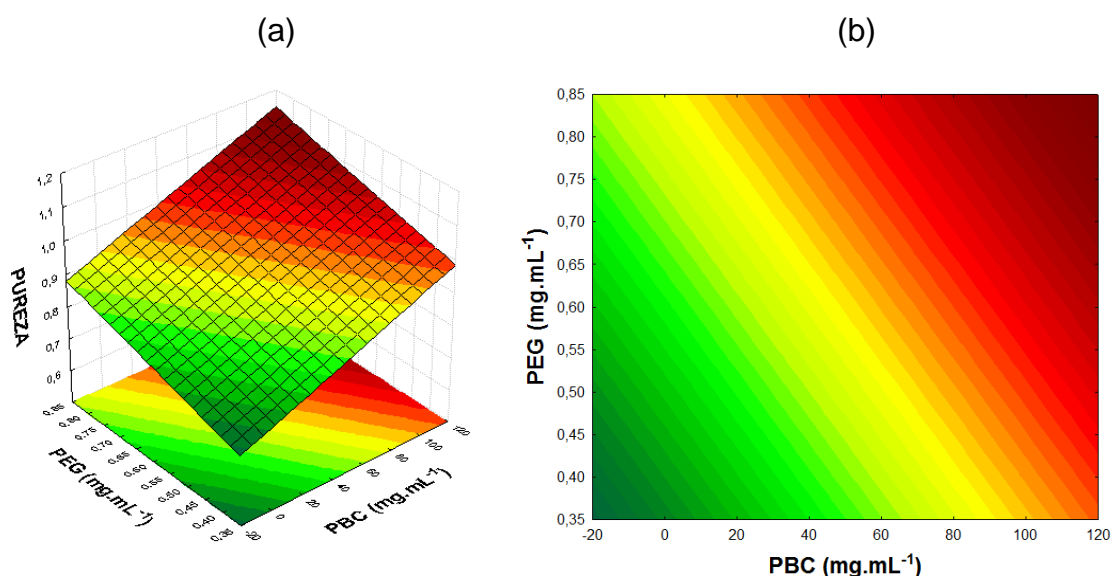


Figura 30 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e PEG para Pureza com Extrato Bruto de *Spirulina*



Para as Figuras 31 e 32, temos a relação de PEG e pH para concentração de Pureza. Observa-se que a variável PEG é significativa para os dois modelos obtidos. Antelo (2007) relata que, utilizando o pH na faixa de 7,0, não obteve resultados satisfatórios, contudo, para os SABs utilizando o pH na faixa de 6,0, encontrou-se maiores valores de pureza da ficocianina, estando de acordo com os resultados deste trabalho, pois as maiores concentrações encontradas foram obtidas com pH na faixa 6,0. Obteve-se pureza utilizando pH na faixa 6,0 e o valor de 1,3 o extrato pré-purificado de ficocianina e 1,1 para pureza utilizando o extrato bruto de *Spirulina*.

Figura 31 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PEG e pH para Pureza utilizando Extrato pré-purificado de Ficocianina

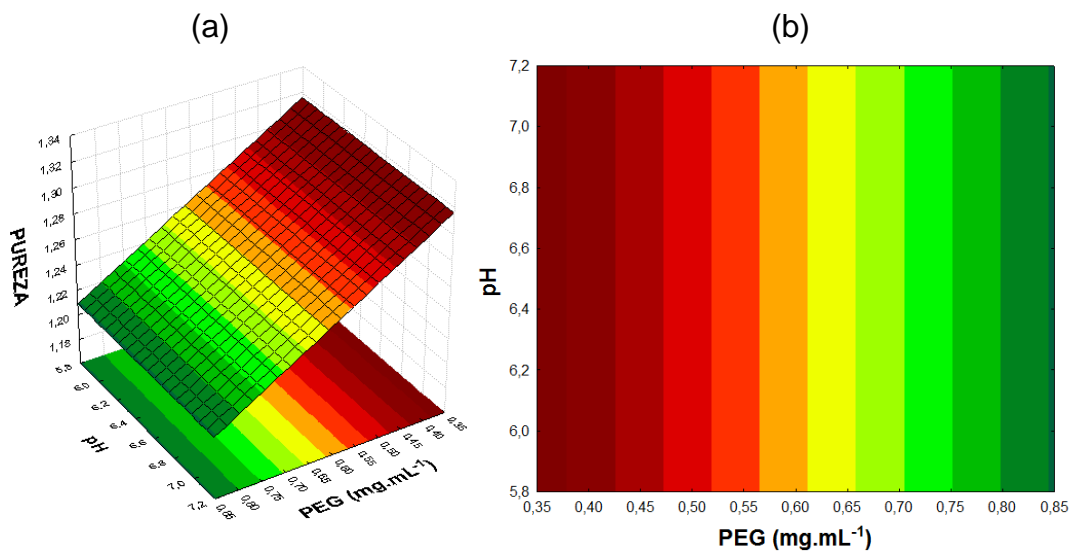
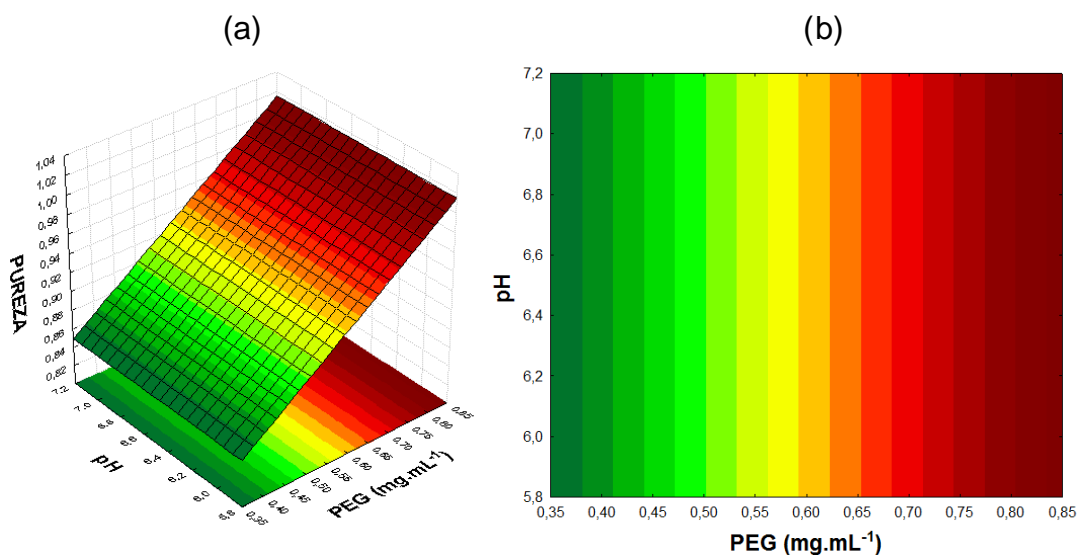


Figura 32 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PEG e pH para Pureza utilizando Extrato Bruto de *Spirulina*



Analisando as superfícies Resposta e de contorno (Figuras 33 e 34), em que se observa a relação de PEG e volume tampão, observa-se que, para os maiores valores de pureza, são necessárias as maiores concentrações de PEG. O volume tampão se mostra como variável significativa (Tabela 13), sendo possível constatar que, em maiores concentrações de PEG e menores concentrações de volume tampão (Figura 33 (b)), serão obtidos os melhores resultados para a pureza utilizando o extrato pré-purificado de ficocianina. Quando utilizado o extrato bruto de *Spirulina*, somente a variável PEG é significativa não apresentando significância o volume tampão. Obteve-se para pureza com extrato pré-purificado de ficocianina 1,3 e para o Extrato Bruto de *Spirulina* 1,0.

Figura 33 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PEG e V. Tampão para Pureza utilizando Extrato pré-purificado de Ficocianina

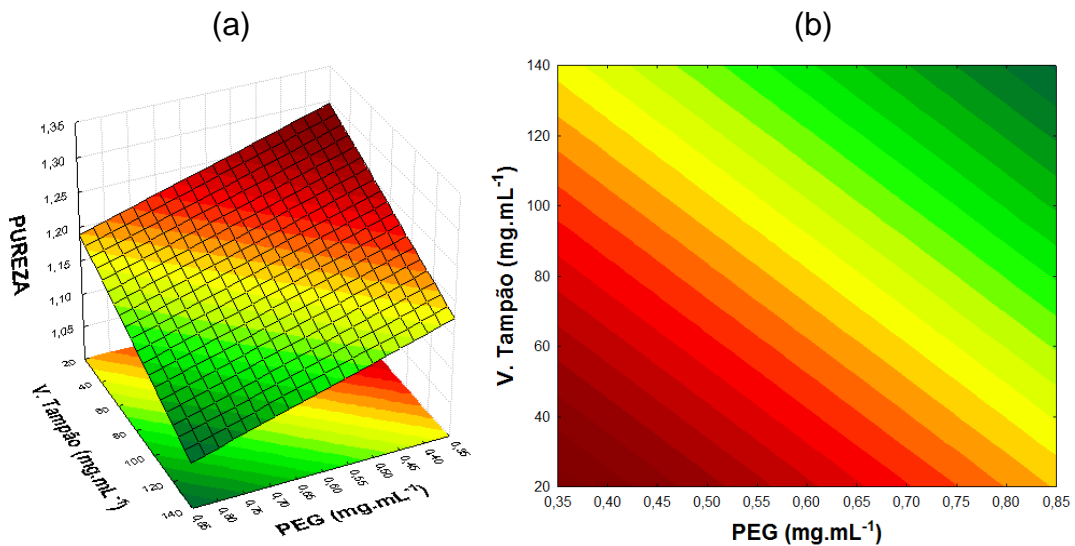
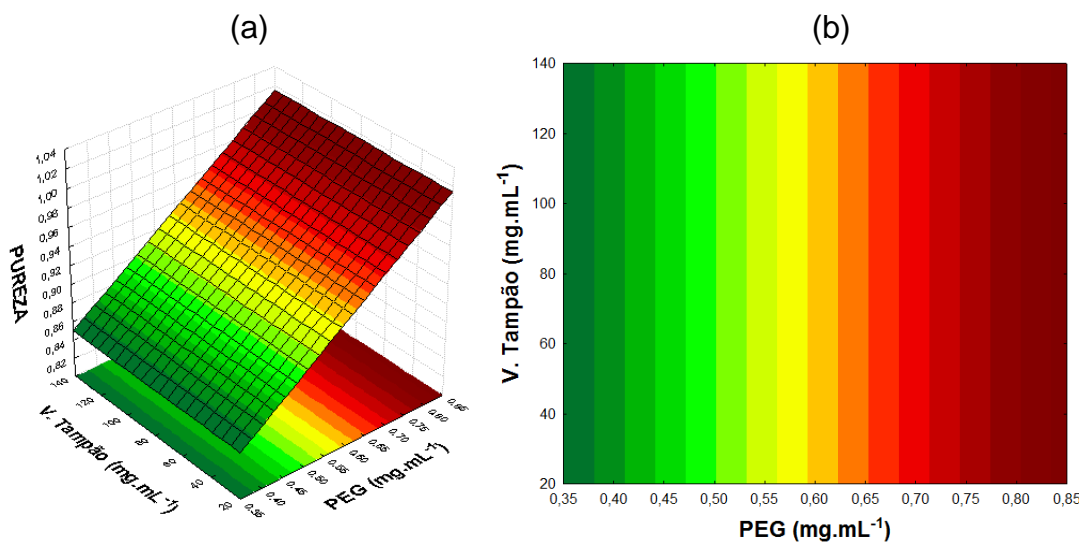


Figura 34 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PEG e V. Tampão para Pureza utilizando Extrato Bruto de *Spirulina*



Para análise das variáveis PBC e pH, observada nas Figuras 35 e 36, foi verificado que a variável PBC é a variável significativa para os dois extratos utilizados, conforme modelo apresentado nas Tabelas 13 e 14. A variável PBC, quando comparada ao pH, necessita de maiores concentrações para que se possa obter as melhores concentrações de Pureza, este comportamento é observado para o extrato pré-purificado de ficocianina e para o extrato bruto de *Spirulina*. Obteve-se 1,4 para pureza com o extrato pré-purificado de ficocianina e 1,0 para pureza utilizando o extrato bruto de *Spirulina*.

Figura 35 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e pH para Pureza utilizando Extrato pré-purificado de Ficocianina

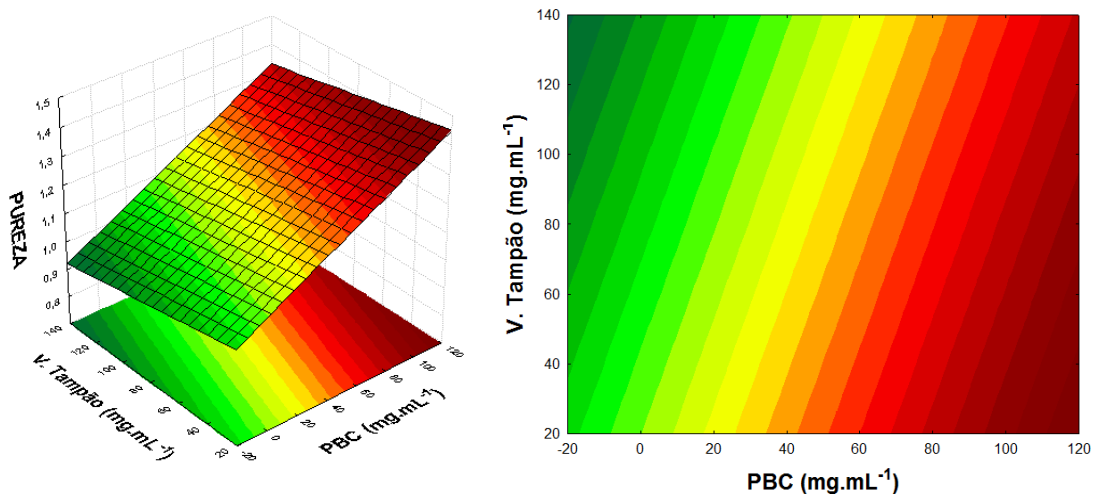
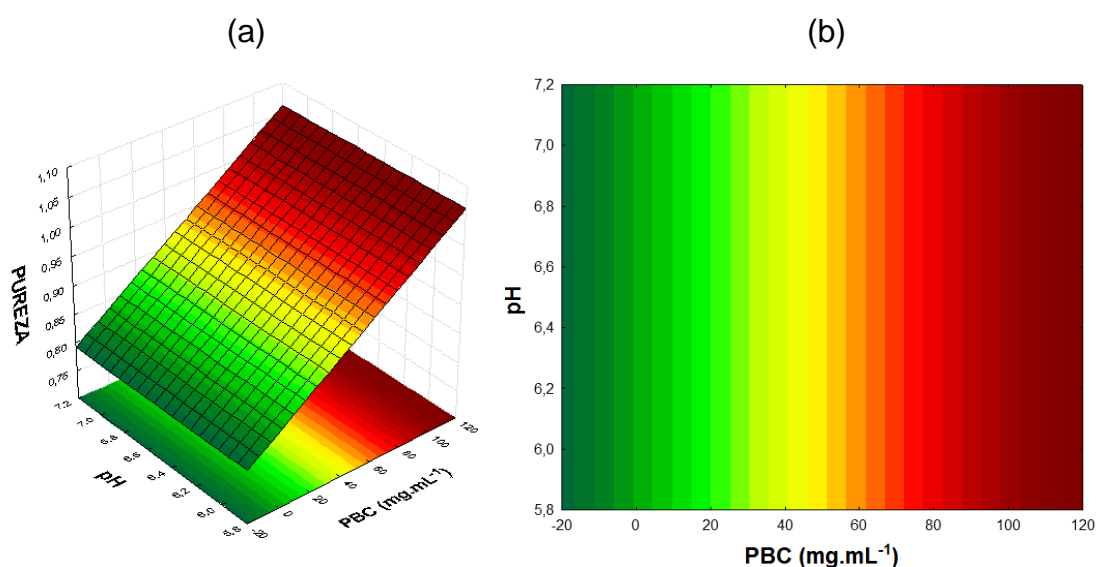


Figura 36 - Superfície de Resposta da Relação PBC e pH para Pureza do Extrato utilizando Extrato Bruto de *Spirulina*



Para análise das variáveis PBC e Volume tampão, relacionadas nas Figuras 37 e 38, nota-se que a variável PBC é significativa ao modelo proposto para os dois extratos utilizados. De acordo com as Figuras 37 (a) e 38 (a), observa-se que os maiores valores encontrados para a Pureza são obtidos para as maiores concentrações de PBC. Tal comportamento é comprovado quando se analisa os pontos da superfície de resposta e superfície de contorno (Figuras 37 (a, b) e 38 (a, b)). Obteve-se pureza para o extrato pré-purificado de ficocianina com valor de 1,4. Já o para extrato Bruto de *Spirulina*, apresenta 1,0 de Pureza.

Figura 37 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e Volume Tampão para Pureza utilizando Extrato pré-purificado de Ficocianina

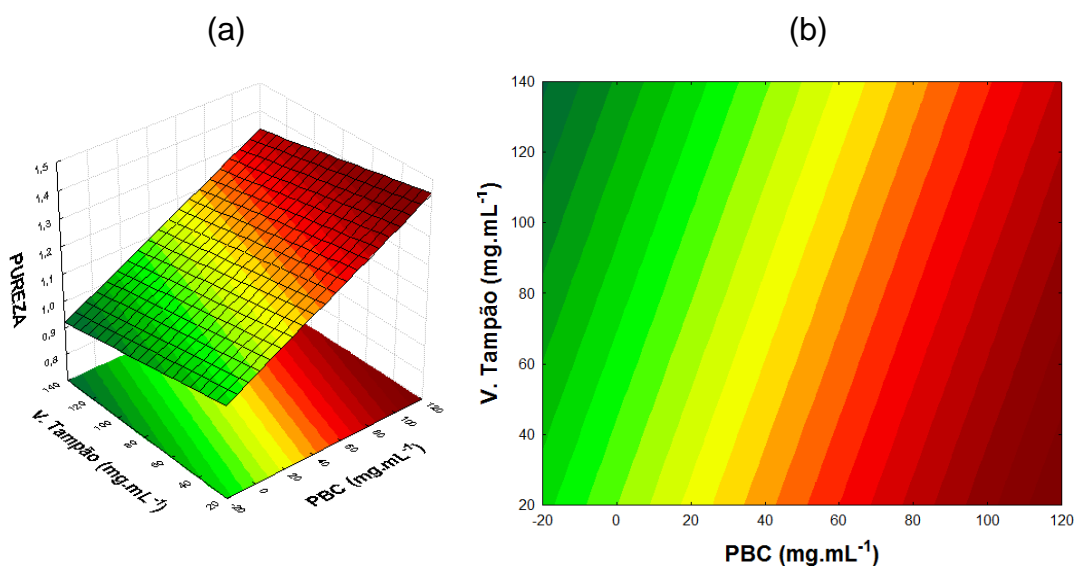
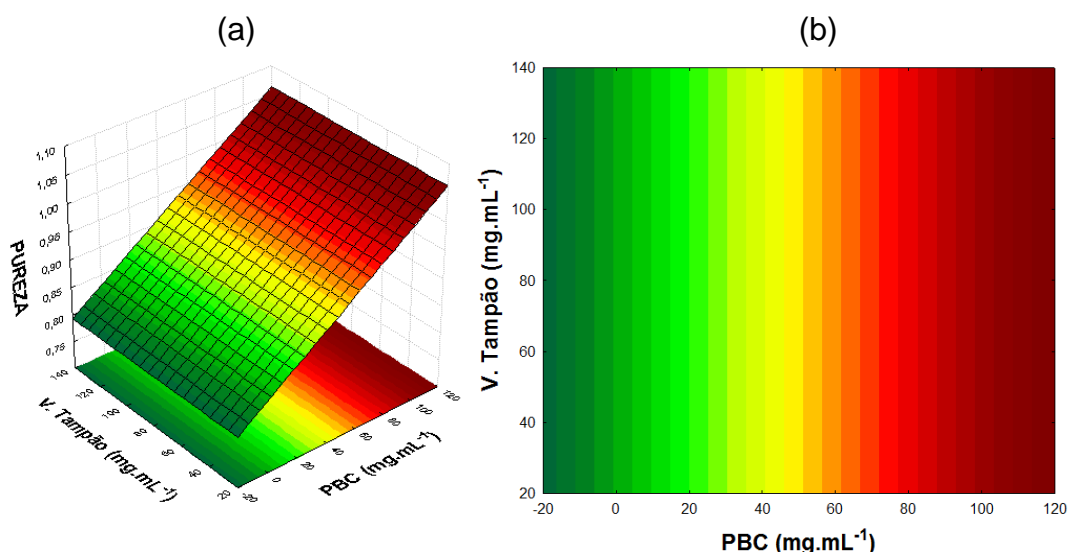


Figura 38 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e Volume Tampão para Pureza utilizando Extrato Bruto de *Spirulina*



Para as Figuras 39 e 40, temos a relação das variáveis pH e Volume tampão para pureza do extrato pré-purificado e extrato bruto de *Spirulina*. A variável pH não se mostrou significativa para a pureza para nenhum dos extratos em estudo, já a variável volume tampão se mostrou significativa para o extrato pré-purificado de ficocianina, contudo seu fator é negativo, com isso pode-se verificar que, para maiores valores de pureza, menores serão as concentrações de volume tampão. Obteve-se para o extrato pré-purificado de ficocianina 1,1 de Pureza, e para extrato bruto de *Spirulina* obteve 0,9 de Pureza.

Figura 39 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação pH e V. Tampão para Pureza utilizando Extrato pré-purificado de Ficocianina

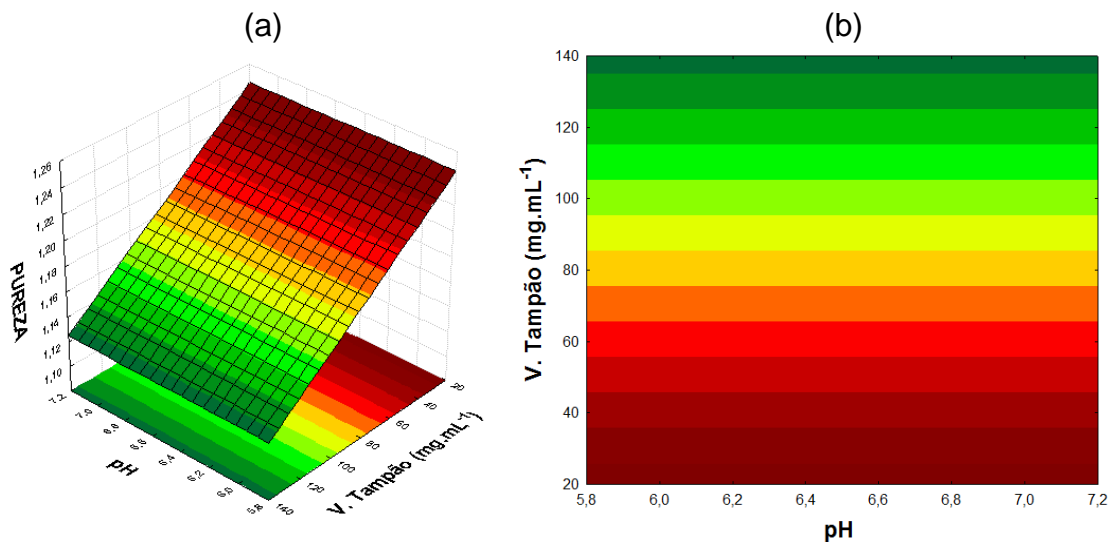
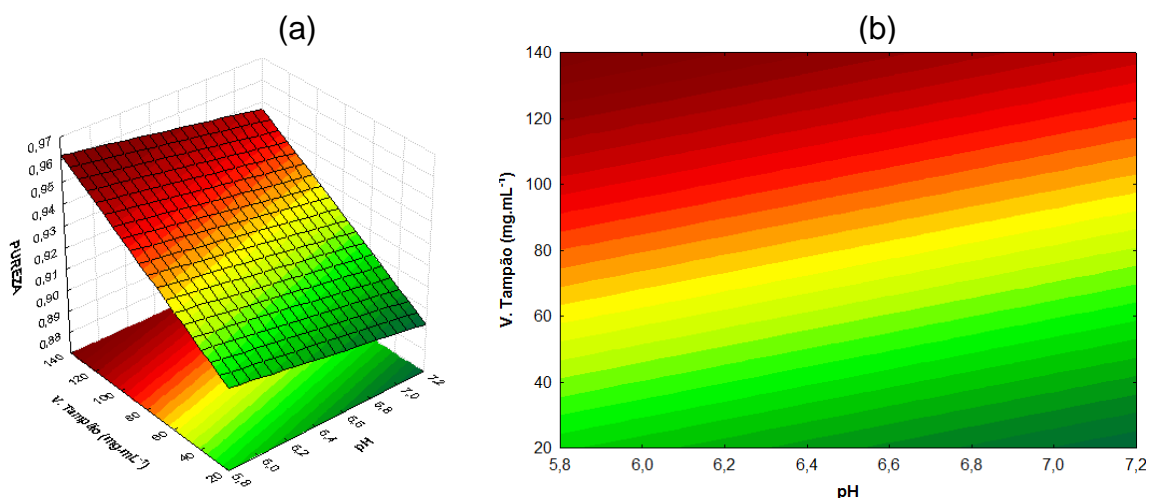


Figura 40 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação pH e V. Tampão para Pureza utilizando Extrato Bruto de *Spirulina*



A partir dos resultados obtidos, verificou-se que apenas as variáveis PBC e PEG foram significativas aos modelos propostos. Com isto, elaborou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2² para avaliar a influência de PEG e PBC no extrato pré-purificado de ficocianina e no extrato Bruto de *Spirulina*. As quantidades de volume de sal fosfato foram fixadas em 25 µL e o pH na faixa de 6,0. As concentrações de PEG e PBC foram variadas, sendo os valores de PBC de 50µL a 150µL e PEG de 40%, 55% e 70%.

Antelo (2007) utilizou SAB polietilenoglicol (PEG) /fosfato com pH na faixa 6,0 para estudar e aperfeiçoar o processo de purificação do extrato bruto de *Spirulina*, variando a massa molar do polímero, no qual se obteve as maiores concentrações da proteína em estudo, comparado com outros métodos de purificação, utilizando PEG 4000, obteve 1,16 de pureza. Neste estudo utilizando SAB em condições semelhantes, os resultados foram satisfatórios para a purificação do extrato, em que foram obtidos 1,4 de pureza para o extrato pré-purificado de ficocianina e 1,1 de pureza para o extrato bruto de *Spirulina*.

5.2.4 Planejamento Experimental DCCR 2² Extração Ficocianina com Extrato Pré-Purificado de ficocianina e Extrato bruto de *Spirulina*

Nas Tabelas 15 e 16, serão apresentados os modelos de Regressão múltipla para a concentração de Ficocianina para o extrato pré-purificado de ficocianina e para o extrato bruto de *Spirulina*. Os fatores que não foram relevantes na regressão múltipla, com nível de 10% ($p < 0,1$), foram retirados do modelo, sendo apresentadas apenas as variáveis significativas para cada extrato estudado.

Tabela 15 - Parâmetros da Regressão da Concentração de Ficocianina para Extrato Pré-Purificado de Ficocianina para o Planejamento DCCR2²

	Variáveis e interações	Coefficiente de Regressão	Nível de significância p – valor
Ficocianina (mg.mL ⁻¹)	Termo Independente	1,654178	0,000000
	PBC µL (X ₁) (L)	0,073157	0,035473
	PBC µL (X ₁ ²) (Q)	0,119109	0,011335
	PEG µL (X ₂) (L)	0,297825	0,000000
	PEG µL (X ₂ ²) (Q)	-0,100123	0,030122
	X ₁ *X ₂ (L)	0,153924	0,002900
	R ²		0,83

$$\text{Ficocianina} = 1,654178 + 0,073157X_1 + 0,119109X_1^2 + 0,297825X_2 - 0,100123X_2^2 + 0,15392X_1 * X_2$$

Equação 10

Tabela 16 - Parâmetros da Regressão da Concentração de Ficocianina para Extrato Bruto de *Spirulina* para o Planejamento DCCR2²

	Variáveis e interações	Coefficiente de Regressão	Nível de significância p – valor
Ficocianina (mg.mL ⁻¹)	Termo Independente	2,132769	0,000000
	PBC µL (X ₁) (L)	0,210822	0,000030
	PBC µL (X ₁ ²) (Q)	-0,120529	0,036502
	PEG µL (X ₂) (L)	0,014193	0,733086
	PEG µL (X ₂ ²) (Q)	-0,511264	0,000000
	X ₁ *X ₂ (L)	0,196789	0,002459
	R ²		0,84

$$\text{Ficocianina} = 2,132769 + 0,210822 * X_1 - -0,120529 * X_1^2 + 0,014193 * X_2 - 0,511264 * X_2^2 + 0,196789 * X_1 * X_2$$

Equação 11

A partir das equações reduzidas (Equações 10 e 11), construíram-se as superfícies resposta e superfícies de contorno para cada variável. As Figuras 41 (a, b) e 42 (a, b) apresentam as superfícies resposta e superfície de Contorno do planejamento experimental para análise da influência das variáveis PBC, PEG, para a concentração de ficocianina do extrato pré-purificado de ficocianina e do extrato bruto de *Spirulina*. Pode-se observar que as duas variáveis se apresentam significativas ao modelo proposto, conforme Tabelas 15 e 16. Nota-se que, para o extrato pré-purificado utilizando pH na faixa de 6,0 e com baixa concentração de fosfato, o comportamento para extração da ficocianina foi otimizado, pois obteve-se maiores valores de ficocianina utilizando maiores concentrações de PEG e PBC. Obteve-se para concentração de ficocianina $2,7 \text{ mg.mL}^{-1}$ para o extrato pré-purificado de ficocianina e $2,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ para o extrato bruto de *Spirulina*.

Figura 41 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e PEG para Pureza utilizando Extrato pré-purificado de Ficocianina para o DCCR²

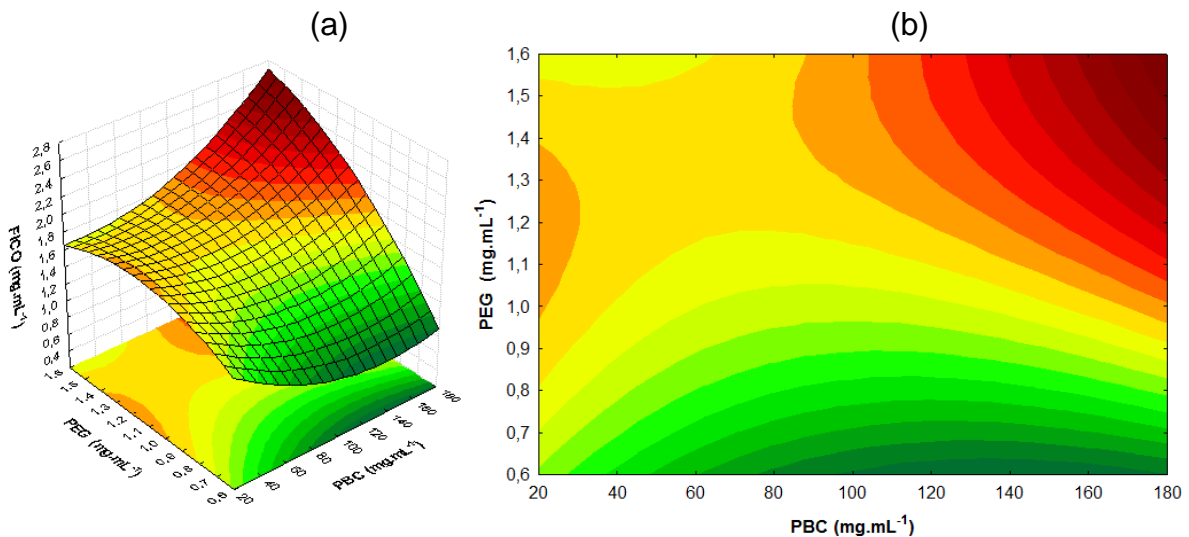
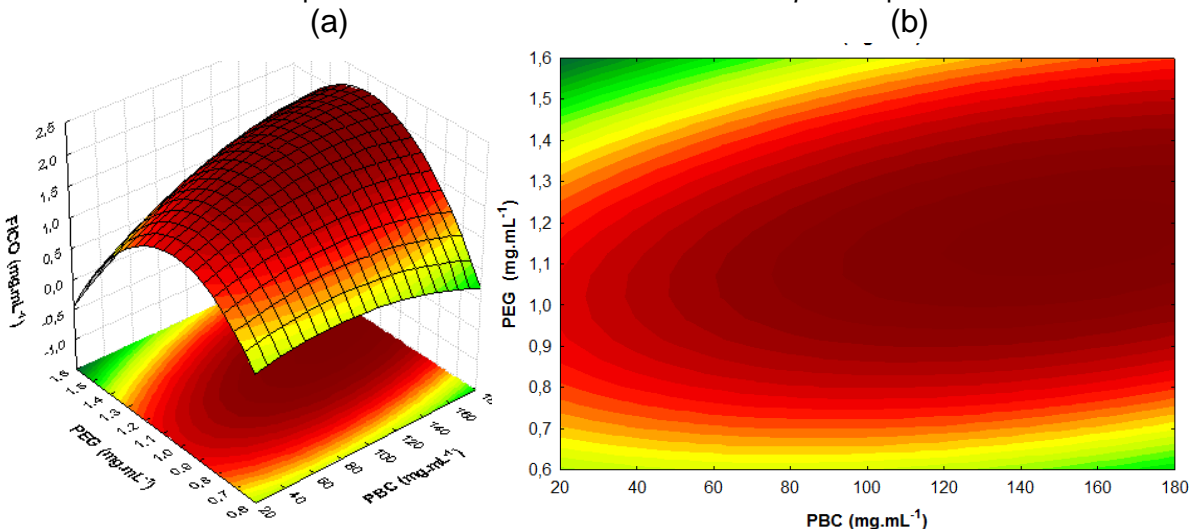


Figura 42 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e PEG para Pureza utilizando Extrato Bruto de *Spirulina* para o DCCR²



5.2.5 Planejamento Experimental DCCR 2² Extração

Aloficocianina com Extrato Pré-Purificado de ficocianina e Extrato bruto de *Spirulina*

Nas Tabelas 17 e 18 é apresentada a forma do modelo reduzido de Regressão múltipla para a concentração de Aloficocianina para o extrato pré-purificado de ficocianina e para o extrato bruto de *Spirulina*. Os fatores que não foram relevantes na regressão múltipla, com nível de 10% ($p < 0,1$), foram retirados do modelo, sendo apresentadas apenas as variáveis significativas para cada modelo.

Tabela 17 - Parâmetros da Regressão da Concentração de Aloficocianina para Extrato Pré-Purificado de Ficocianina para o DCCR2²-

	Variáveis e interações	Coefficiente de Regressão	Nível de significância p – valor
Aloficocianina (mg.mL ⁻¹)	Termo Independente	0,742704	0,000000
	PBC μL (X ₁) (L)	0,092616	0,001060
	PBC μL (X ₁ ²) (Q)	0,148377	0,000145
	PEG μL (X ₂) (L)	0,086774	0,001901
	PEG μL (X ₂ ²) (Q)	-0,097916	0,006599
	X ₁ *X ₂ (L)	0,039154	0,276854
	R ²	0,78	

Aloficocianina

$$= 0,742704 + 0,092616X_1 + 0,148377X_1^2 + 0,086774X_2 - 0,097916X_2^2 + 0,039154X_1 * X_2$$

Equação 12

Tabela 18 - Parâmetros da Regressão da Concentração de Aloficocianina para Extrato Bruto de *Spirulina* para o DCCR2²

	Variáveis e interações	Coefficiente de Regressão	Nível de significância p – valor
Aloficocianina (mg.mL ⁻¹)	Termo Independente	0,966783	0,000000
	PBC μL (X ₁) (L)	0,129245	0,000001
	PBC μL (X ₁ ²) (Q)	-0,049583	0,061610
	PEG μL (X ₂ ²) (Q)	-0,253859	0,000000
	X ₁ *X ₂ (L)	0,065276	0,023738
	R ²	0,86	

X₂= PEG (L);

Aloficocianina

$$= 0,966783 + 0,129245 * X_1 - 0,049583 * X_1^2 - 0,253859 * X_2^2 + 0,065276 * X_1 * X_2$$

Equação 13

A partir das equações reduzidas (Equações 12 e 13), construíram-se as superfícies resposta e as superfícies de contorno (Figuras 43 (a, b) e 44 (a, b)) do planejamento experimental para análise da influência das variáveis PBC, PEG, para a concentração de alofocianina do extrato pré-purificado de ficocianina e do extrato bruto de *Spirulina*. Pode-se notar que as duas variáveis foram significativas para os modelos propostos. Observa-se que, utilizando o extrato pré-purificado de ficocianina, as maiores concentrações de alofocianina foram obtidas a partir das maiores concentrações de PEG e PBC utilizadas. O mesmo comportamento pode ser observado quando utilizado o extrato bruto de *Spirulina*. Obteve-se para concentração de alofocianina para o extrato pré-purificado 1,3 mg.mL⁻¹ e 1,1 mg.mL⁻¹ de concentração de Alofocianina para o extrato bruto de *Spirulina*.

Figura 43 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e PEG para concentração de Alofocianina utilizando Extrato pré-purificado de Ficocianina para o DCCR²

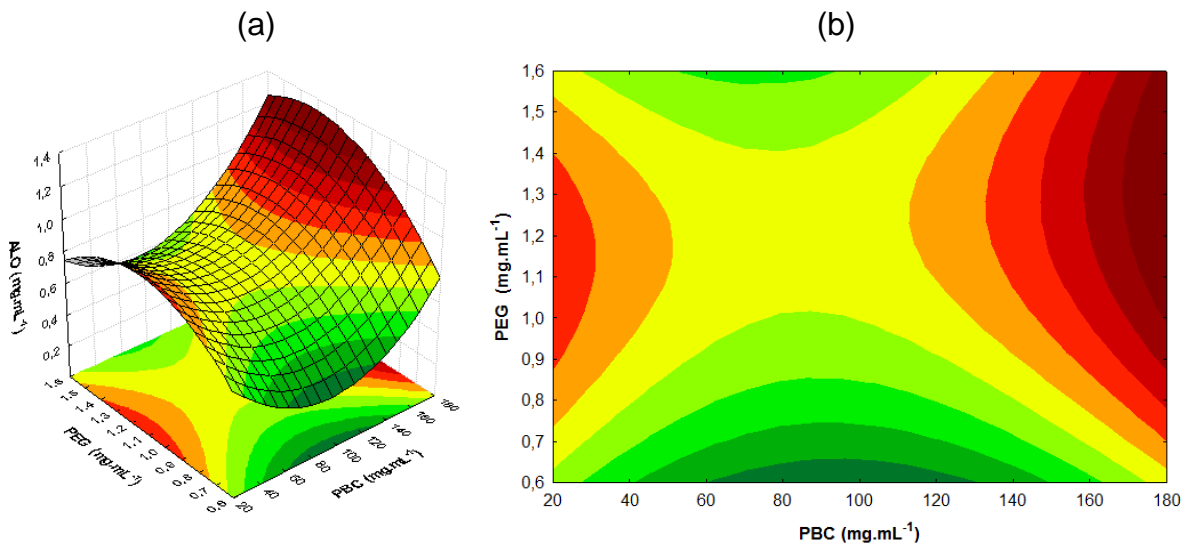
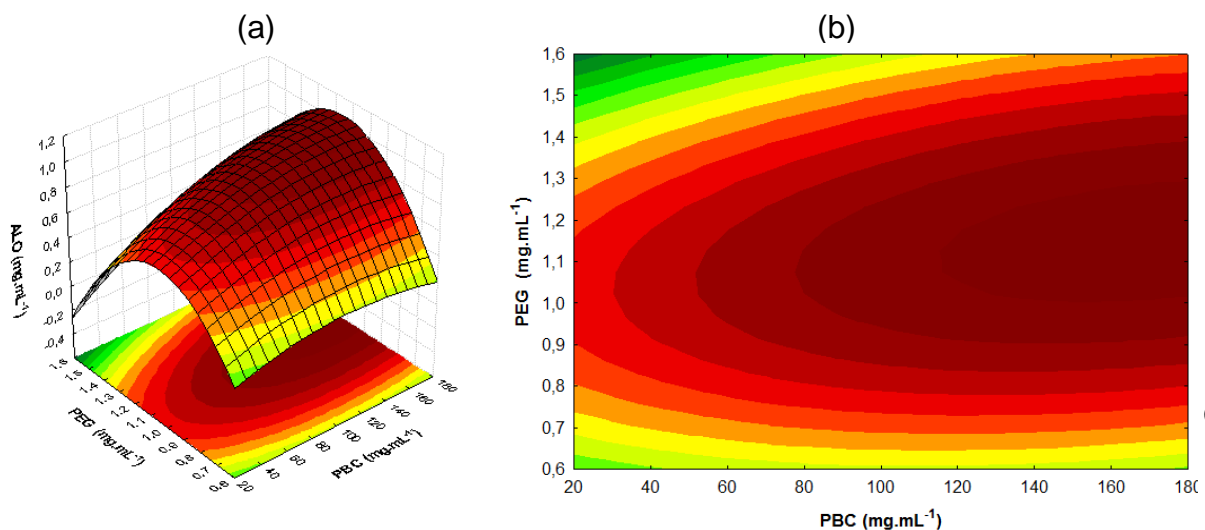


Figura 44 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e PEG para concentração de Alofocianina utilizando Extrato Bruto de Ficocianina para o DCCR²



5.2.6 Planejamento Experimental DCCR 2² para Pureza com Extrato Pré-Purificado de ficocianina e Extrato bruto de *Spirulina*

Nas Tabelas 19 e 20 é apresentada a forma do modelo reduzido de regressão múltipla para a pureza utilizado para o extrato pré-purificado de ficocianina e extrato bruto de *Spirulina*. Os fatores que não foram relevantes na regressão múltipla, com nível de 10% (p<0,1), foram retirados do modelo, sendo apresentadas apenas as variáveis significativas para cada modelo.

Tabela 19 - Parâmetros da Regressão da Concentração de Pureza para Extrato Pré-Purificado de Ficocianina para o Planejamento DCCR2²

	Variáveis e interações	Coefficiente de Regressão	Nível de significância p – valor
Pureza	Termo Independente	3,194074	0,000000
	PBC µL (X ₁) (L)	0,144692	0,018619
	PBC µL (X ₁ ²) (Q)	-0,340409	0,000145
	PEG µL (X ₂) (L)	0,139235	0,023025
	PEG µL (X ₂ ²) (Q)	-0,767032	0,000000
	R ²	0,82	

$$Pureza = 3,194074 + 0,144692X_1 - 0,340409X_1^2 + 0,139235X_2 - 0,767032X_2^2$$

Equação 14

Tabela 20 - Parâmetros da Regressão da Concentração de Pureza para Extrato Bruto de *Spirulina*DCCR2²

	Variáveis e interações	Coefficiente de Regressão	Nível de significância p – valor
Pureza	Termo Independente	1,666561	0,000000
	PBC µL (X ₁) (L)	0,093373	0,000567
	PBC µL (X ₁ ²) (Q)	-0,048128	0,134877
	PEG µL (X ₂) (L)	-0,150532	0,000001
	PEG µL (X ₂ ²) (Q)	-0,174174	0,000009
	X ₁ *X ₂ (L)	0,127841	0,000780
	R ²	0,81	

$$Pureza = 1,666561 + 0,093373X_1 - 0,048128X_1^2 - 0,150532X_2 + 0,174174X_2^2 + 0,127841X_1 * X_2$$

Equação 15

A partir das equações reduzidas, construiu-se as superfícies resposta e as superfícies de contorno (Figuras 45 (a, b) e 46 (a, b)) para análise da influência das variáveis PBC, PEG, para pureza utilizando extrato pré-purificado de ficocianina e para o extrato bruto de *Spirulina*. Pode-se observar que as duas variáveis se apresentam significativas ao modelo proposto (Tabelas 19 e 20). Obteve-se para o extrato pré-purificado de ficocianina pureza de 2,5 e para o extrato bruto de *Spirulina* pureza de 1,7. Foi possível verificar uma otimização para a pureza utilizando os dois extratos em estudo visto que o valor para a pureza foi melhorado com as condições de pH na faixa de 6,0 e em baixas concentrações de sal fosfato e nas maiores concentrações de PBC e PEG.

Figura 45 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e PEG para Pureza utilizando Extrato pré-purificado de Ficocianina para o DCCR²

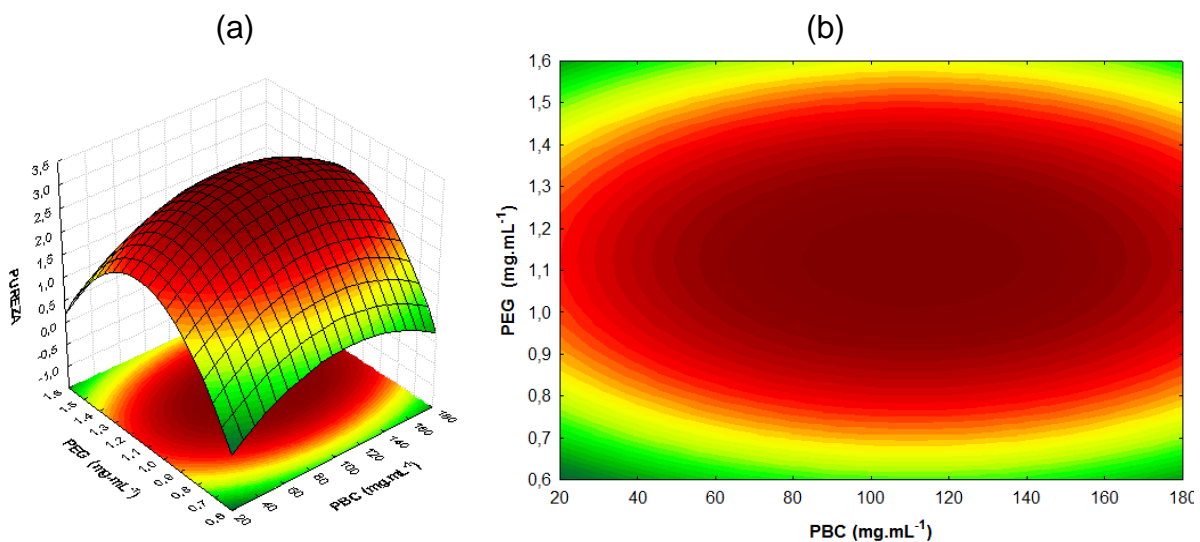
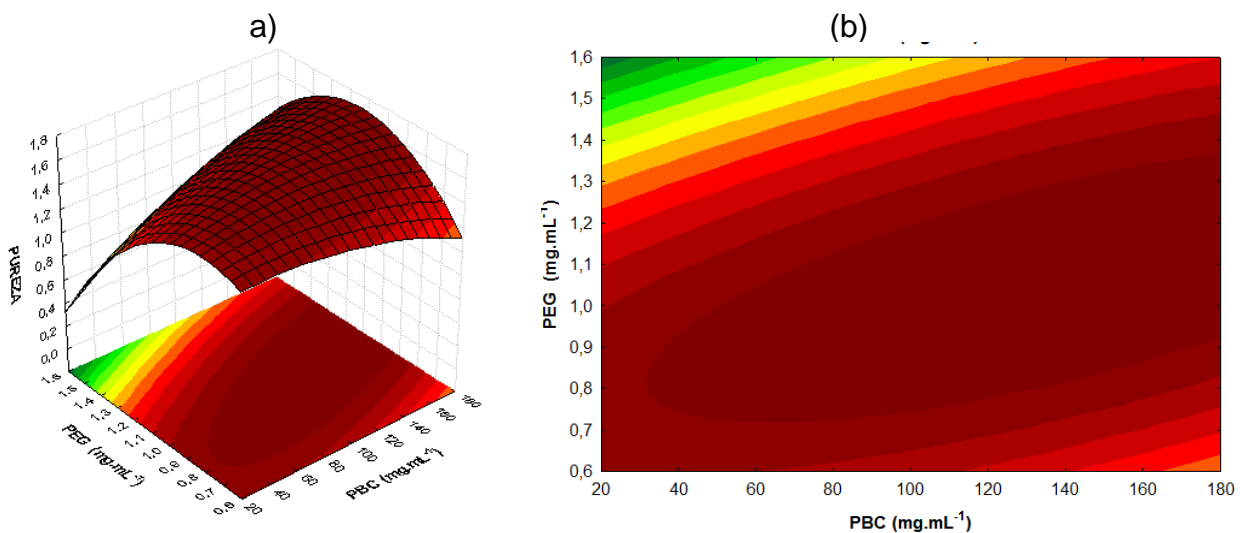


Figura 46 - Superfície de Resposta (a) e Superfície de Contorno (b) da Relação PBC e PEG para Pureza utilizando extrato bruto de *Spirulina* DCCR²



6. CONCLUSÕES

Neste estudo foi possível realizar a extração e a purificação de ficocianina, aloficocianina utilizando SAB e com os resultados obtidos foi possível observar informações importantes e favoráveis à utilização do sistema aquoso bifásico com PBC/PEG/Sal. Esta técnica se mostrou oportuna para a aplicação para extração das ficobiliproteínas e, principalmente, para as informações relacionadas à pureza, em que se obteve para o extrato pré-purificado de ficocianina pureza de 2,5 e para o extrato bruto de *Spirulina* pureza de 1,7. Demonstrou-se a viabilidade da utilização na indústria alimentícia, visto que o grau considerado aceitável para a sua utilização é de pureza com valor de 0,7 ou acima.

O processo de extração e purificação utilizando extrato pré-purificado de ficocianina e extrato bruto de *Spirulina* se mostrou viável. Foi constatado que, nos experimentos em que utilizamos o extrato Bruto de *Spirulina*, os valores da concentração de purificação foram satisfatórios e condizem com as exigências das indústrias alimentícias, ou seja, não necessitaria do processo de pré-purificação da ficocianina, possibilitando a viabilidade do processo de extração e purificação sem o pré-tratamento, o que de fato reduz o tempo e os custos do processo.

Foi observado que as variáveis Polietilenoglicol (PEG) e Polímero de baixo Catiônico (PBC) influenciam no processo de forma significativa, e quando analisamos os resultados em concentrações elevadas destas variáveis, estes se mostram mais significativos e com melhores resultados, ou seja, proporcionam melhores concentrações dos pigmentos em estudo viabilizando o processo. Nota-se que a melhor faixa de pH para extração e purificação é entre 6,0 e 7,0, visto que nesta faixa foram verificados os melhores valores de concentração das ficobiliproteínas estudadas e o fator de pureza encontrados.

7. SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

Em trabalhos futuros, sugere-se o aprofundamento e o prosseguimento de estudos desenvolvidos com esta Dissertação de Mestrado, a fim de se aperfeiçoar os resultados obtidos nesta pesquisa. Nesse sentido, são apresentadas propostas para trabalhos futuros:

- Testar novas técnicas para extração e purificação de proteínas, no caso, as ficobiliproteínas, visando o aumento da concentração e da pureza das referidas proteínas;
- Realizar novos experimentos utilizando a técnica deste trabalho, SAB (PBC/PEG/Sal) com outras microalgas para avaliar se os resultados são satisfatórios e se podem ser utilizados.
- Realizar novos estudos voltados às demais ficobiliproteínas, como a alofococianina e a ficoeritrina extraídas da *Spirulina platensis*, visto que há poucos estudos voltados a estas ficobiliproteínas.

8. REFERÊNCIAS

ABALDE, J.; BETANCOURT, L.; TORRES, E.; CID, A.; BARWELL, C. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. **Plant Science**, v. 136, p. 109-120, 1998.

ALBERTSSON, P-A **Partition of cell particles and macromolecules**. New York, Wiley, 3 ed, 1986.

ALMEIDA, M. R.; PASSOS, H.; PEREIRA, M.M.; LIMA, À. S.; COUTINHO, J. A. P.; FREIRE, M. G. Ionic liquids as additives to enhance the extraction of antioxidants in aqueous two-phase systems. **Sep. Purif. Technol.** vol. 128, p. 1–10, 2014.

AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. Propriedades de saúde de *Spirulina* spp. **Revista Ciências Farmaceuticas Básica e Aplicada**. v. 29 , n. 2 p. 109 – 117, 2008.

ANTELO, F. S.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*. **Biochem. Eng. J.**, v. 41, p. 43-47, 2008.

ANTELO, F. S. **Purificação de Ficocianina de *Spirulina platensis* através de sistema aquoso bifásico e caracterização cinética da denaturação térmica**, 2007. 117p. Dissertação de mestrado (Mestrado em Engenharia Ciências de Alimentos) – Fundação Universidade Federal do Rio Grande, RS, 2007.

BARROS, B. N.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Ed. UNICAMP, 1996.

BARROS, B. N.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos**. Campinas: Ed. UNICAMP, 2003.

BECKER, E.W. Microalgae: **Biotechnology and Microbiology**. Cambridge University Press, Cambridge, UK., 293 p., 1994.

BELTER, P. A.; CUSSLER, E. L.; HU, W. S. **Bioseparations: downstream processing for biotechnology**. Wiley, 1988.

BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, M. Bioprocess intensification: a potential aqueous-two phase process for the primary recovery of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. **Journal of chromatography B**, v. 807, p. 33-38, 2004

BENELHADJ, S.; GHARSALLAOUI, A.; DEGRAEVE, P.; HAMADI, A.; GHORBEL, D. **Effect of pH on the functional properties of *Arthrospira (Spirulina) platensis* protein isolate**. Food Chemistry, v.194, p.1056–1063, 2016.

BENNETT, A.; BOGORAD, L. complementary chromatic adaptation in a filamentous bluegreen-alga. **Journal of Cell Biology**, v. 58, n. 2, p. 419-435, 1973.

BERTOLDI, F.C.; Sant'anna E.; Oliveira J.L.B. Revisão: **biotecnologia de microalgas**. B Ceppa. 2008.

BERMEJO, R.; TALAVERA, E. M.; ALVAREZ-PEZ, J. M.; ORTE, J. C. Chromatographic purification of biliproteins from *Spirulina platensis* – high-performance liquid chromatographic separation of their α and β subunits. **Journal of Chromatography**, v. 778, p. 441-450, 1997.

BOROWITZKA, M.A. Products from microalgae. **Infofish International**, v.5, p.21-26, 1993.

BONGIOVANI, Milene C. *et al.*. Os benefícios da utilização de coagulantes naturais para obtenção de água potável. **Acta Scientiarum Technology**. Maringá, v.32, n. 2, p. 167-170, 2010.

BORBA, Luís R. **Viabilidade do uso da Moringa oleífera lam no tratamento simplificado de água para pequenas comunidades**. 2001. 92 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2001.

BRADY, J. E.; HUMISTON, G. E. **Química Geral**. Rio de Janeiro: Livros técnicos e Científicos Ed., 1986.

BRASIL. ANVISA. **Portaria nº 30, de 13 de janeiro de 1998**. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs1/1998/prt0038_13_01_1998.html>. Acesso em 02 de maio de 2018.

BRASIL. ANVISA. **Portaria nº 2, de 7 de janeiro de 2002**. Disponível em :<<http://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/legislacao/AGENCIAS/ANVISA/RS0002-070102.PDF>> Acesso em 02/05/2018.

BRASIL. ANVISA. **Decreto nº50040, de 24 de janeiro de 1961**. Disponível em:<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/19501969/D50040.htm>200 8a.Acessoem 01/02/2018.

BRUNO, J.J. Edible microalgae: a review of the health research. Pacifica: **Center for Nutritional Psychology**, 2001. V.3, 56p.

CABRAL, J. M. S., AIRES-BARROS, M.R. Liquid-liquid extraction of biomolecules using aqueous two-phase systems. In: JOHN WILEY & SONS Ltd (eds), **Recovery process for biological materials**. New York; p. 273-301, 1993.

CAVALCANTI , M. T. H.; PORTO T. S.; NETO, B. B.; LIMA-FILHO ,J. L.; PORTO , A. L. F.; PESSOA, A. Aqueous two-phase systems extraction of alphatoxin from *Clostridium perfringens* type A. **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, vol. 833, no. 2, pp. 135–140, 2006.

CERTIK, M.; SHIMIZU, S. Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.87, n.1, p.1-14, 1999.

CHEN T.; ZHENG, W.; YANG, F.; BAI, Y.; WONG, Y. S. Mixotrophic culture of high selenium-enriched *Spirulina platensis* on acetate and the enhanced production of photosynthetic pigments. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 103-107 2006.

COLLA, L. M. **Influência das condições de crescimento sobre o potencial antioxidante da microalga *Spirulina platensis* e seu potencial na redução hipercolesterolemia**. 2000. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

CONSTANT, P.B.L.; STRINGHETA, P.C.; SANDI, D. **Corantes alimentícios**, B.CEPPA, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 203-220, 2002.

COZZA, K. L. ***Spirulina platensis* em meios naturais e sintéticos: Fatores nutricionais e custos experimentais**. 1999. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

CHRONAKIS, I. S.; GALATANU, A. N.; NYLANDER, T.; LINDMAN, B. The behavior of protein preparations from blue-green algae (*Spirulina platensis* strain Pacifica) at the air/ 72 water interface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 173, p. 181-192, 2000.

DALTON, H.; BULL, A. T. **Comprehensive Biotechnology – The Principles of Biotechnology: Scientific Fundamentals**. Editora Pergamon Press, v.1,1995.

DERNER, R. B. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muellei* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

DIAZ, A. *et al.*. A preliminar evaluation of turbidity removal by natural coagulants indigenous to Venezuela. **Process Biochemistry**. v. 35, p. 391-395, 1999.

ERIKSEN, N. T. Production of phycocyanin - a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. **Applied Microbiology Biotechnology**. n.80, p. 1-14, jun. 2008.

EL-MOHSNAWY, E. Purification, characterization, and activity evaluation of allophycocyanin from *Thermosynechococcus elongates*. **Life Science Journal**, v. 10, n. 4, 2013.

FAN, C.; JIANG, J.; YIN, X.; WONG, K. H.; ZHENG, W.; CHEN, T. Purification of selenium-containing allophycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis* and its hepatoprotective effect against t-BOOH-induced apoptosis. **Food Chemistry**, v. 134, p. 253- 261, 2012.

FIGUEIRA, F. S. Purificação de C-Ficocianina e sua incorporação em nanofibras. 2014. 127 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Engenharia e Ciências dos Alimentos) – Química dos Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

FORCINITI, D., HALL, C. K., KULA, M-R. Interfacial tension of polyethylene glycol-dextran water systems: influence of temperature and polymer molecular weight, **Journal of Biotechnology**, v.16, p. 279-296, 1990.

FRANCISCO, E. C.; FRANCO, T. T.; MARONEZE, M. M.; ZEKPA, L. Q. JACOBLOPES, E. **Produção de biodiesel de terceira geração a partir de microalgas**. Ciência Rural, v. 45, 2015.

FURTADO, M. **REVISTA QUÍMICA e DERIVADOS** - EDITORA QD. Disponível em: <www.quimica.com.br>. Acesso em: 25 de maio de 2018.

GASTRONOMYLAB. **Citrato de sódio**. Disponível em: <<https://loja.gastronomylab.com/produtos1/citrato-de-sodio/citrato-de-sodio-500g/>>. Acesso em 14 de junho de 2018.

GLAZER, A. N. Phycobiliproteins - a Family of Valuable, Widely Used Fluorophores. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 2, p. 105-112, Apr 1994.

GROBBELAAR, J.U. Algal biotechnology: real opportunities for Africa. **South African Journal of Botany**, v.70, n.1, p.140-144, 2004.

GROSSMAN, A. R.; SCHAEFFER, M. R.; CHIANG, G. G.; COLLIER, J. L. **The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions**. Microbiol. Rev., v. 57, p. 725-749, 1993.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. **Culture of marine invertebrates Animals**. New York: Plenum, p. 29- 60, 1975.

HARRIS, J. M. Poly(ethylene glycol) chemistry- **Biotechnical and Biomedicai applications**, New Y ork, Phemun Press, 1992.

HENRIKSON, R. **Microalga Sspirulina**: Superalimento del futuro. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, 1994.

JACOBSON, G.; WASILESKI, J. BioproBioprocess Production Of Flavor, Fragrance, And Color Ingredients. **New York**: John Wiley e Sons, 1994.

JENSEN, S.; KNUTSEN, G. Influence of light and temperature on photoinhibition of photosynthesis in *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, v5,p. 195 – 204, 1993.

KALIL, S. J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 539-550, 2000.

KILIKIAN, B. V.; PESSOA JR., A. **Purificação de produtos biotecnológicos**. São Paulo: Ed. Manole, 2003.

KIRK, E.A.; BEHRENS, P.W. Commercial developments in microalgal biotechnology. **Journal of Phycology**, n.35, p.215– 226, 1999.

LEMAN, J. Oleaginous microorganisms: an assessment of the potential. **Advances in Applied Microbiology**, v.51, p.195- 243, 1997.

LIMA, A. S. **Extração Líquido-líquido de Pectinase Microbiana**. 2002. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

LIMA, P. K. D.; MORAIS, A. I.; CASTIGLIONI, L. G.; ARTHUR, V.; SOUZA, M. R. A. Avaliação de diferentes doses de radiação gama aplicadas na microalga *Spirulina (Arthrospira platensis)*. **Revista Agrarian**, v.11, n.40, p. 181-188, 2018.

LING, T. C.; LOONG, C. M.; TAN, W. S.; TEY, B. T.; ABDULLAH, W. M. W.; ARIFF, A. Purification of filamentous bacteriophage M13 by expanded bed anion exchange chromatography. **Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 228-232, Sep 2004.

LORETO, C.; ROSALES, N.; BERMÚDEZ, J.; MORALES, E. Pigment and protein production of the cyanobacterium *Anabaena* . PCC 7120 in relation to nitrogen concentration and irradiance. **Gayana Bot.**, v.60, n. 2, p. 83-89, 2003.

MACEDO, Jorge A. B. de. **Águas e águas**. 3 ed. Belo Horizonte: Editora CRG, 2007.

MARCOS, J. C.; FONSECA L. P.; RAMALHO, M. T.; CABRAL, J. M. S. Application of surface response analysis to the optimization of penicillin acylase purification in aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 1006-1014, 2002.

MAYOR, F. **As biotecnologias no início dos anos noventa**: êxitos, perspectivas e desafios. Estudos Avançados 6 (16), Espanha, 1992.

MILNE, J. Scale-up of protein purification: downstream processing issues. In: WALLS, D. e LOUGHRAN, S. T. (Ed.). Protein Chromatography: Humana Press, v.681, 2011. cap. 5, p.73-85. **Methods in Molecular Biology**. ISBN 978-1-60761-912-3.

MINKOVA, K. M.; TCHERNOV, A. A.; TCHORBADJIEVA, M. I.; FOURNADJIEVA, S.T.; ANTOVA, R. E.; BUSHEVA, M. Ch., Purification of C-phycoerythrin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. **Journal of Biotechnology**, v. 102, p. 55-59, 2003.

MINAMI, N. M. **Extração líquido-líquido aplicada à separação e purificação de amiloglucosidase**. 1997. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo.

NIU, J.; WANG, G.; LIN, X.; ZHOU, B. Large-scale recovery of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. **Journal of Chromatography B**, p.267–276, 2007.

OLAIZOLA, M. ; DUERR, E. Effects of light intensity and quality on the growth rate and photosynthetic pigment content of *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 2, p. 97-104, 1990.

PADILHA, S. G.; FERREIRA, F. J.; ALEGRE, M.R.; TAMBOURGI, B, E. **Efeitos do pH e massa molar do polímero sobre o sistema bifásico aquoso PEG/fosfato**. Acta Scientiarum. Technology, v. 33, n. 1, p.1-4, 2011. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=303226530002>> Acesso em 02/05/2018.

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.

PATIL, G.; CHETHANA, S.; SRIDEVI, A. S.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Method to obtain C-phycoerythrin of high purity. **Journal of Chromatography A, on-line**, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em 20 de junho 2018.

PATIL, G.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycoyanin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p.156-164, 2007.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiology: Concepts and Applications**. São Paulo: MacGraw – Hill Ltda, 1993.

PEREIRA, D. C. **Variação no conteúdo protéico e pigmentar em variantes cromáticas de Gracilaria domingensis nas populações naturais de Rio do Fogo-rn, Brasil**. 2009. 79f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Bioecologia Aquática) Universidade Federal do Rio Grande do Norte Centro de Biociências, Natal, 2009.

PESSOA, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**, São Paulo, SP: Editora Manole, 2005.

PIÑERO ESTRADA, J. E.; BERMEJO BESCÓS, P.; VILLAR DEL FRESNO, A. M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extrat. **IL Farmaco**, v. 56, p. 497 – 500, 2001.

PINOTTI, M.H.P. & SEGATO, R. Cianobactérias: importância econômica. **Semina**, v. 12, n. 4, p.27S-280, dez. 1991.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 65, p. 635-648, 2004.

QUIMIESP. **Sulfato de sódio anidro**. Disponível em: <<http://www.quimesp.com.br/sulfato-de-sodio-anidro.php>>. Acesso em 14 de junho de 2018.

RANGEL-YAGUI, C. O.; DANESI, E. D. G.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. **Bioresource Technology**, v 92, p. 133-141, 2004.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 906, 2007.

RAVEN, P.H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 7ª edição. Guanabara/Koogan. Rio de Janeiro, p. 248-259, 1996.

REIS, A.; MENDES, A. LOBO-FERNANDES, H.; EMPIS, J. A; NOVAIS, J, M. PRODUCTION, Extraction and purification of phycobiliptoteins from Nostoc sp. **Bioresource Technology**, v.66, p. 181 - 187, 1998.

RICHMOND, A. (Ed). Handbook of microalgal culture: **biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. 566p.

RITO-PALOMARES, M.; NUÑEZ, L.; AMADOR, D. Practical application of aqueous twophase systems for the development of a prototype process for c-phycocyanin recovery from *Spirulina maxima*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnecology**, v. 76, p. 1273-1280, 2001.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. Campinas, SP, Casa do Pão Editora, 2005.

RODRIGUES, R. D. P. **Extração e Purificação de Ficobiliproteínas de *Spirulina (arthrospira) platensis* com líquidos iônicos próticos**. 2017. 158f. Tese de Doutorado.(Doutorado em Engenharia Química) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

SANTIAGO-SANTOS, M. C.; PONCE-NOYOLA, T.; OLVERA-RAMIREZ, R.; ORTEGALÓPEZ, J.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O. Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2047-2052, 2004.

SANTOS, W. O. **Partição de β -Galactosidade em sistemas aquosos bifasicos constituídos por Polietileno Glicol e Poliacrilato de Sódio**. Dissertação de Mestrado. UESB, Itapetinga, 2011.

SAXENA, R.K.; SHEORAN, A.; BHOOPANDER, G.; DAVIDSON, S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiology Methods**, v.52, p.1-18, 2003.

SBEGHEN, A. L. **Processo de separação por membranas na purificação de ficocianina de *Spirulina sp.*** Dissertação. Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade de Passo Fundo, Passo fundo, 2017.

SIGMA-ALDRICH; Catálogo 2001. Disponível em : <<https://www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemical-synthesis/chemical-synthesis-catalog.html>>. Acesso em 01 de junho de 2018.

SILVA, M. C. H.; SILVA, L. H. M.; PAGGIOLI, F. J.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A. Sistema aquoso bifásico: uma alternativa eficiente para extração de íons. **Química Nova**, v. 29, n. 6, 2006.

ORES, J. C. **Produção e Extração da Enzima Anidrase Carbônica de Ficobiliproteínas a partir de Microalgas**. Tese Doutorado(Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Química dos Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

SILVA, C. A. S.**Partição do Glicomacropéptideo usando sistemas Aquoso Bifásicos**. 2007. 57f. Dissertação (Masister Scientiae em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viscosa, Minas Gerais, 2007.

SILVA, L. A. **Processo biotecnológico de produção, extração e recuperação do pigmento ficocianina da *Spirulina Platensis***. 2008. 91f.

Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos) –Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, 2008.

SILVA, A. P. R. **Purificação de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* através de sistema aquoso bifásico (sab)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande , Rio Grande – RS, 2009.

SILVA, L. A.; KUHN, K. R.; MORAES, C. C.; BURKERT, C. A. V. KALIL, S. J. Experimental design as a tool for optimization of C-phycoyanin purification by precipitation from *Spirulina platensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.20, p. 5-12, 2009.

SILVA, L. A. **Purificação de ficocianina de *Spirulina platensis* por precipitação e cromatografia de permeação em gel**. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Fundação Universidade Federal do Rio Grande , Rio Grande – RS, 2005.

SILVEIRA, S. T.; BURKERT, J. F. M.; COSTA, J. A. V.; BURKERT, S. J.; KELIL, S. J. Optimization of phycoyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1629-1634, 2007.

SONI, B.; KALAWADIA, B.; TRIVEDI, U.; MADAMWAR, D. Extraction, purification and characterization of phycoyanin from *Oscillatoria quadripunctulata* – isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, Índia. **Process Biochemistry**, PRBI 7974, 2006.

SONE, A. P.; GIMENES, M. L. **Separação de sericina utilizando alcoóis e congelamento/descongelamento**.XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Florianópolis - Santa Catarina. 2014.

SOUSA, B.F. M. **β -galactosidases: Aplicação à Produção de Alimentos Funcionais**. Dissertação (Mestrado em Controle de qualidade e toxicologia dos alimentos) - Universidade de Lisboa Faculdade de Farmácia, Lisboa – Portugal, 2012.

SPOLAORE, P., CASSAN, C. J., DURAN, E., ISAMBERT, A. Commercial Applications of Microalgae. **J. Biosci. Bioeng**. Vol. 101, No 2: 87-96, 2006.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISMABERT, A. Commercial applications of microalgae, review. **Journal of bioscience and Bioengineering**.2006.

SUN, L.; WANG, S.; GONG, X.; ZHAO, M.; FU, X.; WANG, L. Isolation, purification and characteristics of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Heterosiphonia japonica*. **Protein Expression and Purification**, v. 64, p. 146-154, 2009.

SKULBERG, O.M. Microalgae as a source of bioactive molecules – experience from cyanophyte research. **Journal of applied phycology**. n.12, p. 341-348, 2000.

SKULBERG, O.M. Bioactive Chemical in Microalgae. In: RICHMOND, A. (ed.) **Hand book of Microalgae Culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. p. 485 -512.

TABOADA, M. E. Liquid-liquid and solid-liquid equilibrium of the 1- propanol lithium sulfate water. **Fluid Phase Equilibria**, v. 5111, p. 1–11.2002.

TANAC. **Tanfloc SG**. 1999. Disponível em: <http://www.tanac.com.br/PT/upload/produtos/CT_TANFLOC_SG_PT.pdf> . Acesso em: 25 de junho de 2018.

TREVAN, M. O.; BOFFEY, S.; GOULDING, K. H.; STANBURY, P. **Biociologia: Princípios Biológicos**. Editorial Acribia. Zaragoza, 1990.

VALLE, M. G. . 249 p., Tese (Doutorado em Política Científica e Tecnologia) - Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

VONSHAK, A., 1997. *Spirulina platensis* (Arthospira): **Physiology, cell biology and biotechnology**. Taylor & Francis, London.

VISKARI, P. J. COLYER, C. L. Separation and quantitation of phycobiliproteins using phytic acid in capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **Journal of Chromatography A.**, v. 972, p. 269-276, 2002.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, **cell-biology and biotechnology**. London: Taylor & Francis, 1997.

WALTER, A. **Estudo do processo biotecnológico para obtenção de ficocianina a partir da microalga *Spirulina platensis* sob diferentes condições de cultivo**. 2001. 133f. Dissertação (Mestre em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, 2001.

YAN, M.; LIU, B.; JIAO, X.; QUIN, S. Preparation of phycocyanin microcapsules and its properties. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, p. 89-97, 2014.

YING, L.; XIE, S. Fluorescence Spectroscopy, Exciton Dynamics, and Photochemistry of Single Allophycocyanin Trimers Liming. **J. Phys. Chem. B**, v.102, 10399-10409, 1998.