

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE  
ALIMENTOS**

**PURIFICAÇÃO DE FICOCIANINA DE *Spirulina platensis* ATRAVÉS DE SISTEMA  
AQUOSO BIFÁSICO E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA DESNATURAÇÃO  
TÉRMICA**

**Eng<sup>a</sup>. Francine Antelo**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Susana Juliano Kalil**

Orientadora

**Rio Grande, RS**

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE**  
**ALIMENTOS**

**PURIFICAÇÃO DE FICOCIANINA DE *Spirulina platensis* ATRAVÉS DE SISTEMA**  
**AQUOSO BIFÁSICO E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA DESNATURAÇÃO**  
**TÉRMICA**

**Eng<sup>a</sup>. Francine Antelo**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos.

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Susana Juliano Kalil**

Orientadora

**Prof<sup>o</sup>. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa**

Co-orientador

**Rio Grande, RS**

**2007**

## AGRADECIMENTOS

À minha avó Lídia, carinhosamente a quem chamo de Lé, dedico esse trabalho, pela participação direta nessa tão importante conquista devido a seu amor incondicional, dedicação, apoio e incentivo não só durante esse período, mas ao longo de toda minha vida.

À professora Susana Kalil, pela contribuição no meu crescimento profissional e pessoal, orientação, apoio, amizade, conselhos e ótimas conversas.

Ao professor Jorge Alberto Vieira Costa pelo apoio no decorrer do trabalho.

À Ana Virgínia Sanzo, pela amizade e confiança que me dedicou, pela paciência, longas conversas, boas risadas, caronas e apoio técnico prestado desde que iniciei no Laboratório de Microbiologia.

À Elisane Santos pela amizade, disponibilidade e apoio técnico sempre que necessário.

Às mais que amigas Caroline Moraes e Ana Paula Manera, pela ajuda e apoio prestados durante todo o trabalho, pela maravilhosa companhia em todos os momentos, pelo incentivo, pelas conversas, desabafos e risadas e por me dedicarem uma amizade sincera e fraternal que perdurará pela vida toda.

Às queridas Andréia Anschau, Lilliane Dias e Luci Kelin Quines, pela ótima companhia, por disponibilizarem uma grande ajuda na execução desse trabalho e pela dedicação ao longo de toda essa jornada.

À todos os amigos e colegas, Itiara Veiga, Fernanda Grunenvaldt, Kátia Kuhn, Fabiana Medeiros, Fernanda Alves, Joana Ores, Vanessa Ribeiro, Ruan Rafael, Vitor Aragão, Roberto Gomes, Guido Picaluga, Luíza Sala e Lígia Prieto, por tornarem o ambiente de trabalho mais descontraído e acolhedor.

Aos laboratórios de Engenharia Bioquímica, Análise Instrumental, Micotoxinas e Operações Unitárias pela disponibilidade de equipamentos fundamentais ao desenvolvimento desse trabalho.

A FURG - Campus Cidade e ao Departamento de Química por possibilitarem a minha formação.

À CAPES pelo apoio financeiro na forma de bolsa de estudo.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
<b>CAPÍTULO I</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>1</b>
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	3
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>4</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>4</b>
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1. BIOTECNOLOGIA	5
2. CIANOBACTÉRIAS	5
2.1. A Cianobactéria <i>Spirulina</i>	6
2.2. Cultivo de <i>Spirulina</i>	8
3. FICOBILIPROTEÍNAS	10
3.1. Ficocianina	12
4. PURIFICAÇÃO DE BIOPRODUTOS	14
4.1. Purificação de ficocianina	15
4.2. Purificação por sistema aquoso bifásico	16
4.2.1. Sistema aquoso bifásico	16
4.2.2. Diagrama de fases	19
4.2.3. Fatores que influenciam o sistema aquoso bifásico	20
4.2.4. Coeficiente de partição	21
5. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	21
6. CARACTERIZAÇÃO DE BIOPRODUTOS	22
7. CONSIDERAÇÕES GERAIS	24
<b>CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO</b>	<b>25</b>
PURIFICAÇÃO DE FICOCIANINA DE <i>SPIRULINA PLATENSIS</i> POR SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO	26
RESUMO	27
1. INTRODUÇÃO	28
2. MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1. Cultivo de <i>Spirulina platensis</i>	29
2.2. Extração de ficocianina	29
2.3. Massa molar do polietilenoglicol (PEG)	30
2.4. Construção do diagrama de fases	30
2.5. Montagem do sistema aquoso bifásico (SAB)	30
2.6. Estudo do pH para a purificação de ficocianina em SAB	31
2.7. Estudo da purificação por SAB utilizando técnica e planejamento experimental	31
2.8. Concentração de ficocianina	32
2.9. Pureza do extrato	33
2.10. Fator de purificação	33
2.11. Recuperação da ficocianina	33
2.12. Coeficiente de partição da ficocianina	34

2.13. Razão de volumes do sistema	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
3.1. Estudo do pH	34
3.2. Planejamentos fatoriais 2 <sup>2</sup> completos	36
3.3. Planejamentos fatoriais 2 <sup>2</sup> completos tipo DCCR (2 <sup>2</sup> ensaios + 4 pontos axiais + 3 pontos centrais)	41
4. CONCLUSÕES	52
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
INFLUÊNCIA DA MASSA MOLAR DO POLIETILENOGLICOL NA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO INTEGRADAS DE FICOCIANINA DE <i>SPIRULINA PLATENSIS</i> POR SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO	57
RESUMO	58
1. INTRODUÇÃO	59
2. MATERIAL E MÉTODOS	60
2.1. Cultivo de <i>Spirulina platensis</i>	60
2.2. Extração de ficocianina	60
2.3. Massa molar do polietilenoglicol (PEG)	61
2.4. Construção do diagrama de fases	61
2.5. Montagem do sistema aquoso bifásico (SAB)	61
2.6. Composição dos SABs	61
2.7. Concentração da ficocianina	62
2.8. Pureza do extrato	62
2.9. Razão de volumes do sistema	63
2.10. Coeficiente de partição da ficocianina	63
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	63
4. CONCLUSÕES	67
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
CINÉTICA DE DESNATURAÇÃO TÉRMICA DA FICOCIANINA DE <i>SPIRULINA PLATENSIS</i>	70
RESUMO	71
1. INTRODUÇÃO	72
2. MATERIAL E MÉTODOS	73
2.1. Cultivo de <i>Spirulina platensis</i>	73
2.2. Extração de ficocianina	73
2.3. Análise da cor da ficocianina	73
2.4. Determinação da cinética de desnaturação	74
2.5. Determinação da cinética de desnaturação com adição de agente estabilizante	74
2.6. Concentração de ficocianina	75
2.7. Constante cinética de desnaturação	75
2.8. Tempo de meia-vida	75
2.9. Equação de Arrhenius	76
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	76
3.1. Influência do pH na cor da ficocianina	76
3.2. Determinação da cinética de desnaturação térmica da ficocianina	77
3.3. Determinação da cinética de desnaturação térmica da ficocianina com adição de agente estabilizante	81
4. CONCLUSÕES	86
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
<b>CAPÍTULO IV - CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES</b>	<b>90</b>
CONCLUSÕES GERAIS	91
SUGESTÕES PARA TRABALHO FUTUROS	93

<b>CAPÍTULO V - BIBLIOGRAFIA GERAL</b>	<b>94</b>
BIBLIOGRAFIA GERAL	95
<b>CAPÍTULO VI - ANEXOS</b>	<b>106</b>
ANEXO 1 - CURVAS BINODAIS	107
ANEXO 2 - TESTES DE TUKEY	109

## LISTA DE TABELAS

<b>CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>4</b>
<b>Tabela 1</b> – Propriedades físicas e espectrais e algumas ficobiliproteínas.	11
<b>Tabela 2</b> – Conteúdo percentual em base seca de biomassa das ficobiliproteínas em três diferentes espécies de cianobactérias.	12
<b>Tabela 3</b> – Classificação dos sistemas aquosos bifásicos segundo a composição.	18
<b>CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO</b>	<b>25</b>
PURIFICAÇÃO DE FICOCIANINA DE <i>SPIRULINA PLATENSIS</i> POR SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO	26
<b>Tabela 1</b> – Valores dos níveis codificados usados nos planejamentos fatoriais completos.	32
<b>Tabela 2</b> – Valores dos níveis codificados usados nos planejamentos fatoriais completos tipo DCCR.	32
<b>Tabela 3</b> – Comparativo entre o fator de purificação (FP), a recuperação (RP), a razão de volumes (Vr) e o coeficiente de partição ( $K_{part}$ ) obtidos para os sistemas compostos por 21% de polietilenoglicol 1500, 4000, 6000 ou 8000 Da e 10% de fosfato de potássio, valores de pH 6 e 7.	35
<b>Tabela 4</b> – Matriz do planejamento fatorial completo $2^2$ para o sistema polietilenoglicol 1500/fosfato de potássio, valores codificados, com os resultados obtidos para fator de purificação (FP), recuperação (RP), razão de volumes (Vr) e coeficiente de partição ( $K_{part}$ ) da ficocianina na fase de topo dos ensaios.	37
<b>Tabela 5</b> – Matriz do planejamento fatorial completo $2^2$ para o sistema polietilenoglicol 4000/fosfato de potássio, valores codificados e resultados obtidos para fator de purificação (FP), recuperação (RP), razão de volumes (Vr) e coeficiente de partição ( $K_{part}$ ) da ficocianina na fase de topo dos ensaios.	37
<b>Tabela 6</b> – Matriz do planejamento fatorial completo $2^2$ para o sistema polietilenoglicol 6000/fosfato de potássio, valores codificados, e resultados obtidos para fator de purificação (FP), recuperação (RP), razão de volumes (Vr) e coeficiente de partição ( $K_{part}$ ) da ficocianina na fase de topo dos ensaios.	38
<b>Tabela 7</b> – Matriz do planejamento fatorial completo $2^2$ para o sistema polietilenoglicol 8000/fosfato de potássio, valores codificados, e resultados obtidos para fator de purificação (FP), recuperação (RP), razão de volumes (Vr) e coeficiente de partição ( $K_{part}$ ) da ficocianina na fase de topo dos ensaios.	38
<b>Tabela 8</b> – Efeitos principais das variáveis percentual de polímero, de sal e da interação entre ambas no fator de purificação e na recuperação da ficocianina nos sistemas aquosos bifásicos polietilenoglicol 1500, 4000, 6000 ou 8000/fosfato de potássio.	40
<b>Tabela 9</b> – Matriz do planejamento fatorial completo tipo DCCR ( $2^2$ ensaios + 4 pontos axiais + 3 pontos centrais) para o sistema polietilenoglicol 1500/fosfato de potássio, valores codificados com os resultados obtidos, previstos e seus desvios relativos para fator de purificação (FP), recuperação (RP), razão de volumes (Vr) e coeficiente de partição ( $K_{part}$ ) da ficocianina na fase de topo dos ensaios.	41
<b>Tabela 10</b> – Análise da variância para o fator de purificação da ficocianina em sistema polietilenoglicol 1500/fosfato de potássio.	42
<b>Tabela 11</b> – Análise da variância para a recuperação da ficocianina em sistema polietilenoglicol 1500/fosfato de potássio.	43
<b>Tabela 12</b> – Matriz do planejamento fatorial completo tipo DCCR ( $2^2$ ensaios + 4 pontos axiais + 3 pontos centrais) para o sistema polietilenoglicol 4000/fosfato de potássio, valores codificados com os resultados obtidos, previstos e seus desvios relativos para fator de purificação (FP), recuperação (RP), razão de volumes (Vr) e coeficiente de partição ( $K_{part}$ ) da ficocianina na fase de topo dos ensaios.	44

<b>Tabela 13</b> – Análise da variância para a recuperação da ficocianina em sistema polietilenoglicol 4000/fosfato de potássio.	45
<b>Tabela 14</b> – Matriz do planejamento fatorial completo tipo DCCR ( $2^2$ ensaios + 4 pontos axiais + 3 pontos centrais) para o sistema polietilenoglicol 6000/fosfato de potássio, valores codificados com os resultados obtidos e previstos para fator de purificação (FP), recuperação (RP), razão de volumes ( $V_r$ ) e coeficiente de partição ( $K_{part}$ ) da ficocianina na fase de topo dos ensaios.	47
<b>Tabela 15</b> – Análise da variância para o fator de purificação da ficocianina em sistema polietilenoglicol 6000/fosfato de potássio.	48
<b>Tabela 16</b> – Matriz do planejamento fatorial completo tipo DCCR ( $2^2$ ensaios + 4 pontos axiais + 3 pontos centrais) para o sistema polietilenoglicol 8000/fosfato de potássio, valores codificados com os resultados obtidos e previstos para fator de purificação (FP), recuperação (RP), razão de volumes ( $V_r$ ) e coeficiente de partição ( $K_{part}$ ) da ficocianina na fase de topo dos ensaios.	50
<b>Tabela 17</b> – Análise da variância para o fator de purificação da ficocianina em sistema polietilenoglicol 8000/fosfato de potássio.	51
<b>INFLUÊNCIA DA MASSA MOLAR DO POLIETILENOGLICOL NA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO INTEGRADAS DE FICOCIANINA DE <i>SPIRULINA PLATENSIS</i> POR SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO</b>	57
<b>Tabela 1</b> – Valores dos percentuais de PEG e de fosfato de potássio para cada ensaio, variando-se a massa molar do polímero, para ambos os SABs convencional e conjugado.	62
<b>Tabela 2</b> – Comparativo entre os sistemas PEG 1500/fosfato de potássio convencional para purificação e integrado para extração e purificação de ficocianina relativo à concentração ( $mg.mL^{-1}$ ), pureza e coeficiente de partição ( $K_{part}$ ) da proteína e razão de volumes ( $V_r$ ) das fases.	64
<b>Tabela 3</b> – Comparativo entre os sistemas PEG 4000/fosfato de potássio convencional para purificação e integrado para extração e purificação de ficocianina relativo à concentração ( $mg.mL^{-1}$ ), pureza e coeficiente de partição ( $K_{part}$ ) da proteína e razão de volumes ( $V_r$ ) das fases.	64
<b>Tabela 4</b> – Comparativo entre os sistemas PEG 6000/fosfato de potássio convencional para purificação e integrado para extração e purificação de ficocianina relativo à concentração ( $mg.mL^{-1}$ ), pureza e coeficiente de partição ( $K_{part}$ ) da proteína e razão de volumes ( $V_r$ ) das fases.	65
<b>Tabela 5</b> – Comparativo entre os sistemas PEG 6000/fosfato de potássio convencional para purificação e integrado para extração e purificação de ficocianina relativo à concentração ( $mg.mL^{-1}$ ), pureza e coeficiente de partição ( $K_{part}$ ) da proteína e razão de volumes ( $V_r$ ) das fases.	65
<b>CINÉTICA DE DESNATURAÇÃO TÉRMICA DA FICOCIANINA DE <i>SPIRULINA PLATENSIS</i></b>	71
<b>Tabela 1</b> – Valores das constantes de desnaturação térmica ( $K_d$ ) e do tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), do extrato aquoso de ficocianina, pH 5, para cada temperatura estudada.	78
<b>Tabela 2</b> – Valores das constantes de desnaturação térmica ( $K_d$ ) e do tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), do extrato aquoso de ficocianina, pH 6, para cada temperatura estudada.	79
<b>Tabela 3</b> – Valores das constantes de desnaturação térmica ( $K_d$ ) e do tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), do extrato aquoso de ficocianina, pH 7, para cada temperatura estudada.	79
<b>Tabela 4</b> – Valores das energias de ativação da reação de desnaturação ( $E_d$ ) e dos fatores de frequência ( $A$ ) para o extrato aquoso de ficocianina nos valores de pH 5, 6 e 7.	81

<b>Tabela 5</b> – Valores das constantes de desnaturação térmica ( $K_d$ ) e do tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), do extrato aquoso de ficocianina, pH 5, para cada concentração de sorbitol (%p/p) adicionada.	83
<b>Tabela 6</b> – Valores das constantes de desnaturação térmica ( $K_d$ ) e do tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), do extrato aquoso de ficocianina, pH 6, para cada concentração de sorbitol (%p/p) adicionada.	83
<b>Tabela 7</b> – Valores das constantes de desnaturação térmica ( $K_d$ ) e do tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), do extrato aquoso de ficocianina, pH 7, para cada concentração de sorbitol (%p/p) adicionada	83
<b>CAPÍTULO VI - ANEXOS</b>	<b>106</b>
<b>Tabela 1</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 5 (%), após 30 segundos de banho de imersão.	109
<b>Tabela 2</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 5 (%), após 60 segundos de banho de imersão.	109
<b>Tabela 3</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 5 (%), após 90 segundos de banho de imersão.	109
<b>Tabela 4</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 5 (%), após 120 segundos de banho de imersão.	110
<b>Tabela 5</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 5 (%), após 180 segundos de banho de imersão.	110
<b>Tabela 6</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 5 (%), após 5 minutos de banho de imersão.	110
<b>Tabela 7</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 5 (%), após 10 minutos de banho de imersão.	111
<b>Tabela 8</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 5 (%), após 20 minutos de banho de imersão.	111
<b>Tabela 9</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 5 (%), após 30 minutos de banho de imersão.	111
<b>Tabela 10</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 6 (%), após 30 segundos de banho de imersão.	112
<b>Tabela 11</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 6 (%), após 60 segundos de banho de imersão.	112
<b>Tabela 12</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 6 (%), após 90 segundos de banho de imersão.	112
<b>Tabela 13</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 6 (%), após 120 segundos de banho de imersão.	113
<b>Tabela 14</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 6 (%), após 180 segundos de banho de imersão.	113

<b>Tabela 15</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 6 (%), após 5 minutos de banho de imersão.	113
<b>Tabela 16</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 6 (%), após 10 minutos de banho de imersão.	114
<b>Tabela 17</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 6 (%), após 20 minutos de banho de imersão.	114
<b>Tabela 18</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 6 (%), após 30 minutos de banho de imersão.	114
<b>Tabela 19</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 7 (%), após 30 segundos de banho de imersão.	115
<b>Tabela 20</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 7 (%), após 60 segundos de banho de imersão.	115
<b>Tabela 21</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 7 (%), após 90 segundos de banho de imersão.	115
<b>Tabela 22</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 7 (%), após 120 segundos de banho de imersão.	116
<b>Tabela 23</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 7 (%), após 180 segundos de banho de imersão.	116
<b>Tabela 24</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 7 (%), após 5 minutos de banho de imersão.	116
<b>Tabela 25</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 7 (%), após 20 minutos de banho de imersão.	117
<b>Tabela 26</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 7 (%), após 30 minutos de banho de imersão.	117
<b>Tabela 27</b> – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 6 (%), após 40 minutos de banho de imersão.	117

## LISTA DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>4</b>
<b>Figura 1</b> – A cianobactéria <i>Spirulina platensis</i> .	7
<b>Figura 2</b> – A estrutura da molécula da ficocianina composta por dois grupos de proteínas, subunidades $\alpha$ e $\beta$ .	12
<b>Figura 3</b> – Posição das ficocianobilinas na seqüência de aminoácidos da ficocianina.	13
<b>Figura 4</b> – Estrutura química da ficocianobilina, grupo cromóforo da ficocianina.	13
<b>Figura 5</b> – Sistema de duas fases aquosas imiscíveis: T, fase de topo (leve); B, fase de fundo (pesada); P, produto.	18
<b>Figura 6</b> – Exemplo de um diagrama de fases.	20
<b>CAPÍTULO III – DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO</b>	<b>25</b>
PURIFICAÇÃO DE FICOCIANINA DE <i>SPIRULINA PLATENSIS</i> R SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO	26
<b>Figura 1</b> – Esquema da rotina de ensaios de purificação de ficocianina por SAB.	31
<b>Figura 2</b> – Superfícies de resposta e curvas de contorno para o fator de purificação (a) e (b) e a recuperação da ficocianina (c) e (d) para os sistemas polietilenoglicol 1500/fosfato de potássio.	43
<b>Figura 3</b> – Efeitos principais e de interação das variáveis percentual de PEG 4000 e de sal no fator de purificação da ficocianina.	45
<b>Figura 4</b> – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a recuperação da ficocianina nos sistemas polietilenoglicol 4000/fosfato de potássio.	46
<b>Figura 5</b> – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o fator de purificação da ficocianina para os sistemas polietilenoglicol 6000/fosfato de potássio.	48
<b>Figura 6</b> – Efeitos principais e de interação das variáveis percentual de PEG 6000 e de sal na recuperação da ficocianina.	49
<b>Figura 7</b> – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para fator de purificação da ficocianina para os sistemas polietilenoglicol 8000/fosfato de potássio.	51
<b>Figura 8</b> – Efeitos principais e de interação das variáveis percentual de PEG 8000 e de sal na recuperação da ficocianina.	52
CINÉTICA DE DESNATURAÇÃO TÉRMICA DA FICOCIANINA DE <i>SPIRULINA PLATENSIS</i>	71
<b>Figura 1</b> – Absorção máxima visível do extrato aquoso de ficocianina bruto (a) e a valores de pH 5 (b), 6 (c) e 7 (d).	77
<b>Figura 2</b> – Degradação do extrato aquoso de ficocianina, pH 5, a 55°C.	78
<b>Figura 3</b> – Dados experimentais das constantes de desnaturação térmica (Kd) em função da temperatura para o cálculo da energia de ativação da reação de desnaturação (Ed) do extrato aquoso de ficocianina através da equação de Arrhenius, para cada valor de pH 5 (a), 6 (b) e 7 (c).	80
<b>Figura 4</b> – Concentração relativa de ficocianina (%) nos tempos de tratamento de 30 a 2400 s utilizando-se concentrações de sorbitol entre 10 e 50% (p/p), para extrato aquoso de pH 5 (a) e 6 (b).	82
<b>Figura 5</b> – Análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 5 (%), após 40 minutos de banho de imersão.	84
<b>Figura 6</b> – Análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 6 (%), após 40 minutos de banho de imersão.	85

<b>Figura 7</b> – Análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 7 (%), após 10 minutos de banho de imersão.	85
<b>CAPÍTULO VI - ANEXOS</b>	<b>106</b>
<b>Figura 1</b> – Curva binodal para o PEG 1500 e fosfato de potássio 30% (p/p), pH6.	107
<b>Figura 1</b> – Curva binodal para o PEG 4000 e fosfato de potássio 30% (p/p), pH6.	107
<b>Figura 1</b> – Curva binodal para o PEG 6000 e fosfato de potássio 30% (p/p), pH6.	108
<b>Figura 1</b> – Curva binodal para o PEG 8000 e fosfato de potássio 30% (p/p), pH6.	108

## RESUMO

A microalga *Spirulina platensis* apresenta em sua biomassa compostos de alto valor agregado como a ficocianina, um pigmento azul usado como corante natural na indústria alimentícia e de cosméticos e de grande interesse na indústria farmacêutica devido as suas propriedades terapêuticas, fatos estes que tornam sua obtenção com alto grau de pureza e sua caracterização uma possibilidade atraente. A presente dissertação teve como objetivos estudar e otimizar o processo de purificação do extrato aquoso de ficocianina de *Spirulina platensis*, com e sem células, por Sistema Aquoso Bifásico (SAB) polietilenoglicol (PEG)/fosfato de potássio variando-se a massa molar do polímero, 1500, 4000, 6000 ou 8000 Da, assim como estudar a cinética de desnaturação térmica do extrato aquoso de ficocianina, avaliando sua estabilidade entre 50 e 65°C para valores de pH entre 5 e 7 e estabelecer o modelo cinético para cada uma das situações propostas. Verificou-se que o pH 6 proporcionou a melhor purificação da ficocianina que se concentrou na fase de topo, rico em PEG, em todos sistemas estudados. A análise de efeitos, realizada através de quatro planejamentos fatoriais completos ( $2^2$  ensaios + 3 pontos centrais), evidenciou que o aumento do percentual de sal causou um incremento no fator de purificação e o inverso ocorreu para o percentual de PEG. A otimização do processo de purificação através de quatro planejamentos fatoriais completos tipo delineamento central composto rotacional (DCCR) ( $2^2$  ensaios + 4 pontos axiais + 3 pontos centrais) estabeleceu que os SABs compostos por PEG 1500 e 8000 e fosfato de potássio, com 7 e 23% e 4 e 22,5%, respectivamente, atingiram fatores de purificação máximos de 1,6 vezes para a ficocianina, com recuperação total da proteína no primeiro e de 57% no segundo e que os formados pelos PEG 4000 e 6000, compostos ambos por 4% de polímero e 21% de sal, alcançaram fatores de purificação de 2,1 e 2,2 vezes, recuperando 100 e 73,5% da proteína-alvo. A extração e a purificação da ficocianina em SAB polietilenoglicol/fosfato de potássio pH 6 integrando essas duas etapas, composto pelo PEG 1500 alcançou valores de pureza para a ficocianina superiores aos obtidos com o sistema convencional, em todos os percentuais estudados, enquanto que para o PEG 6000, as purezas da proteína alcançadas nos ensaios do sistema convencional foram todas superiores às obtidas no outro. Os sistemas integrados compostos por 15% de PEG 1500 e 13% de fosfato de potássio e 5% de PEG 4000 e 18% de sal, alcançaram, nessa ordem, 0,73 e 0,79 de pureza ( $A_{620}/A_{280}$ ), valores estes que classificam esta ficobiliproteína como de grau alimentar, superior a 0,7. As concentrações de ficocianina obtidas nas fases de topo desses dois sistemas respectivamente, 2,67 e 1,60 mg.mL<sup>-1</sup>, evidenciam que o sistema composto pelo PEG 4000 foi mais eficiente que os demais pois alcançou a maior pureza conjugada a maior concentração da proteína. Para a caracterização cinética da desnaturação térmica da ficocianina, o modelo foi assumido como de primeira ordem e entre 50 e 55°C, o extrato aquoso de ficocianina foi mais estável a pH 6 e entre 57 e 65°C em pH 5, sendo então, na faixa de temperaturas estudadas, mais instável a pH 7. As energias de ativação para os extratos de ficocianina foram de 87,36, 135,57 e 111,14 kcal/gmol, para os valores de pH 5, 6 e 7. A adição do agente estabilizante sorbitol, entre 10 e 50% ampliou o tempo de meia-vida, provando que a descoloração da ficocianina é relacionada com a desnaturação da cadeia protéica e, através de testes estatísticos de diferença de médias, pode-se definir que ao final de 40 minutos de tratamento térmico, o extrato de ficocianina de pH 5 manteve cerca de 80% de sua concentração média relativa com adição de 30% (p/p) de sorbitol, para o pH 6, com 40% (p/p) de agente estabilizante, a concentração foi mantida em cerca de 86% e para o pH 7, a partir de 10 minutos, todas as concentrações de sorbitol adicionadas ocasionaram concentrações médias relativas de ficocianina diferentes significativamente e com 50% (p/p) de sorbitol 85% da concentração da proteína se manteve.

**Palavras-chave:** Proteína, pureza, polietilenoglicol, estabilidade, extração.

## ABSTRACT

*Spirulina platensis* microalgae presents in its biomass high added value compounds like phycocyanin, a blue pigment used as a natural colorant in the food and cosmetic industry also of great interest in the pharmaceutical industry due to its therapeutic properties. These facts make obtaining it with a high purity level and its characterization an attractive possibility. The present paper aimed at studying and optimizing the purification process of the phycocyanin aqueous extract from *Spirulina platensis* with and without cells through aqueous two-phase systems (ATPS) polietilenoglicol (PEG)/potassium phosphate by varying the polymer molar mass, 1500, 4000, 6000 or 8000 Da, as well as studying the thermal denaturation kinetics of the phycocyanin aqueous extract by evaluating its stability between 50 and 65 °C for pH values between 5 and 7 and establishing the kinetic model for each proposed situation. It was verified that the pH 6 provided the best phycocyanin purification which was concentrated in the top phase in all the studied systems. The effect analysis done for the four full factorial designs ( $2^2$  trial plus + 3 central points), made clear that the increase of the salt percentage caused an increment in the purification factor and the inverse occurred for the PEG percentage. The optimization of the purification process through four full factorial design CCRD ( $2^2$  trial + 4 axial points + 3 central points) established that the ATPS composed by PEG 1500 and 8000 and potassium phosphate, with 7 and 23% and 4 and 22.5%, respectively, reached maximum purification factors of 1.6 fold for the phycocyanin, with total protein recovery in the first and 57% in the second and that the ones formed by PEG 4000 and 6000, both composed by 4% of polymer and 21% of salt, reached purification factor of 2.1 and 2.2 fold, recuperating 100 and 73.5% of the target protein. The phycocyanin extraction and purification in SAB polyethylene glycol/potassium phosphate pH 6, integrating these two phases, composed by PEG 1500, reached purity values for phycocyanin higher than the ones obtained with the conventional system in all studied percentages, while for PEG 6000, all protein purities obtained in the conventional system trials were higher than the ones obtained in the other. The integrated systems composed by 15% of PEG 1500 and 13% of potassium phosphate and 5% of PEG 4000 and 18% of salt, reached, in this order, 0.73 and 0.79 of purity ( $A_{620}/A_{280}$ ). These values classify this phycobiliprotein as of food grade, higher than 0.7. The concentrations of phycocyanin obtained in the top phases of these two systems, respectively, 2.67 and 1.6 mg.mL<sup>-1</sup>, make clear that the system composed by PEG 4000 was more efficient than the others because it reached the biggest purity along with to the highest protein concentration. For the kinetic characterization of the phycocyanin thermal denaturation, the model was assumed as of first order and, between 50 and 55 °C, the phycocyanin aqueous extract was more stable at pH 6 and between 57 and 65 °C at pH 5, thus, being more stable at pH 7 for the ranges of temperature studied. The activation energy for the phycocyanin extracts were 87.36, 135.57 and 111.14 Kcal/gmol for pH 5, 6 and 7 values. The addition of the sorbitol stabilizing agent between 10 and 50% increased the half-life, proving that the phycocyanin discoloration is related to the denaturation of the protein chain and, through statistical tests of average differences, it is possible to define that, at the end of 40 minutes of thermal treatment, the pH 5 phycocyanin extract kept about 80% of its relative average concentration with the addition of 30% (w/w) of sorbitol, for pH 7, with 40% (w/w) of stabilizing agent, the concentration was kept at about 86% and for pH 7, from 10 minutes on, all the sorbitol concentrations added caused significantly different phycocyanin relative average concentrations and with 50% (w/w) of sorbitol, 85% of the protein concentration was kept.

**Keywords:** Protein, purity, polyethylene glycol, stability, extraction.

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUÇÃO GERAL**

## INTRODUÇÃO

A biotecnologia é uma das áreas do conhecimento que está em grande expansão e ocupa uma posição de destaque no desenvolvimento integrado e harmônico da humanidade. Sua reconhecida importância traduz-se de maneira clara, tendo-se em vista o seu caráter multidisciplinar, pois engloba o uso da microbiologia, da bioquímica e da engenharia (REGULY, 2000). Muitos produtos oriundos de processos biotecnológicos são obtidos como alimentos, antibióticos, entre outros. No decorrer da evolução da biotecnologia, as cianobactérias têm sido objeto de numerosos estudos por pesquisadores do mundo inteiro, principalmente devido ao grande potencial na utilização em alimentos, tratamento de efluentes ou, ainda, em produtos farmacêuticos (DUARTE FILHO, 2002). Dentre as cianobactérias, a *Spirulina* é uma das mais estudadas. Esta cianobactéria habita lagos e lagoas alcalinas, dos quais destacam-se o Lago Chad na África, onde os habitantes já a conheciam e a utilizavam amplamente em sua alimentação como fonte de proteínas e vitaminas (VONSHAK, 1997).

Quando comparadas aos vegetais superiores e aos animais, como fonte de produtos e nutrientes imprescindíveis para a qualidade de vida humana, as cianobactérias levam grande vantagem devido à rapidez com que se reproduzem, à facilidade de cultivo em zonas não apropriadas para agricultura e à possibilidade de direcionar a cultura para a produção de vários compostos de interesse comercial tais como pigmentos e vitaminas (COZZA, 1999).

Nas cianobactérias, os pigmentos fotoreceptores são a clorofila a, os carotenóides e as ficobiliproteínas. As ficobiliproteínas constituem um grupo de proteínas intensamente coloridas que participam do processo fotossintético, tendo como característica principal sua solubilidade em água, podendo ser divididos em três grupos de acordo com a sua estrutura: ficocianinas (azul escuro), aloficocianinas (azul esverdeado) e ficoeritrinas (vermelho).

A ficocianina, uma das ficobiliproteínas, possui particular interesse biotecnológico, pois pode ser utilizada como um corante natural além de que estudos têm associado a ela propriedades terapêuticas (ESTRADA *et al.*, 2001; REDDY *et al.*, 2003). Essa ficobiliproteína já é utilizada comercialmente no Japão como corante em bebidas, em produtos de confeitaria, em laticínios e em cosméticos e tem sido aplicada em pesquisas biomédicas, devido a apresentar fluorescência (SARADA *et al.*, 1999). Por ser solúvel em água, a ficocianina, presente na biomassa de *Spirulina*, pode ser isolada como complexo proteína – pigmento, o que facilita os processos de extração e purificação, permitindo a separação destas moléculas de outros pigmentos insolúveis em água (ABALDE *et al.*,

1998). Os métodos para purificação das ficobiliproteínas até então empregados são complexos e, devido à limitada distribuição, elas tornam-se caras e sua obtenção como composto puro é potencialmente atrativa (REIS *et al.*, 1998).

Dentre os processos para purificação de ficobiliproteínas conhecidos estão a precipitação, a cromatografia de permeação em gel e a cromatografia de troca iônica (SILVA, 2005). O uso de sistema aquoso bifásico (SAB) para este fim é um método seletivo inovador que permite o aumento de escalas sem perdas significativas de eficiência e que pode ser realizado na ausência de equipamentos sofisticados (KILIKIAN & PESSOA, 2003).

O SAB é formado pela mistura de dois polímeros ou de um polímero e um sal em água produzindo duas fases imiscíveis e, devido à elevada concentração de água, cerca de 60 a 80% de seu total, e a baixa tensão interfacial, torna-se favorável sua utilização na purificação de compostos biológicos tais como proteínas que anteriormente apresentavam problemas na sua separação com solventes orgânicos devido à ocorrência de desnaturação e precipitação (KILIKIAN & PESSOA, 2003).

Desde 2001, os Laboratórios de Microbiologia e Engenharia de Bioprocessos da Fundação Universidade Federal de Rio Grande desenvolvem linhas de pesquisa voltadas para a produção e recuperação de proteínas utilizando variadas técnicas como precipitação, separação bifásica e cromatografia. O cultivo da *Spirulina*, realizado pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica desde 1996, proporcionou a oportunidade de utilizar a biomassa produzida para avaliar a purificação da ficocianina.

A otimização das etapas de purificação responsáveis por grande parte dos custos de produção, assim como a caracterização da ficocianina, são fundamentais no momento que a busca por fontes biológicas de corantes naturais, sobretudo para uso alimentício, tem crescido significativamente nos últimos anos. Isso ocorre devido à necessidade de substituição dos mesmos por compostos naturais que além de promover o mesmo efeito, não sejam prejudiciais à saúde.

## OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral estudar a purificação da ficocianina extraída de *Spirulina platensis* através de sistema aquoso bifásico (SAB) e determinar sua cinética de desnaturação térmica.

E como objetivos específicos:

- Investigar a influência da composição do SAB, variáveis percentual de polietilenoglicol e de fosfato de potássio, no fator de purificação e na recuperação da ficocianina, para diferentes massas molares do polímero;
- Otimizar a purificação da ficocianina em SAB, para cada uma das massas molares do polietilenoglicol;
- Estudar a influência das diferentes massas molares do polietilenoglicol na extração conjunta à purificação de ficocianina em SAB, em diferentes formulações ao longo da região bifásica para cada tipo de sistema estudado, comparando com o SAB convencional de purificação;
- Caracterizar o extrato aquoso de ficocianina quanto a cinética de desnaturação térmica, para os valores de pH 5, 6 e 7;
- Avaliar o sorbitol como agente estabilizante adicionado ao extrato de ficocianina para os diferentes valores de pH.

**CAPÍTULO II**  
**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Biotecnologia

A biotecnologia consiste na aplicação em grande escala, ou transferência para a indústria, dos avanços científicos e tecnológicos, resultantes de pesquisas em ciências biológicas. Pode ser interpretada, em um contexto bastante amplo, como sendo a avaliação e o uso de agentes biológicos na produção de bens e serviços em áreas como saúde humana e animal, agricultura e manejo do meio ambiente. É um dos ramos da ciência de grande interdisciplinaridade, tendo suas raízes na biologia, na química e na engenharia, reunindo e integrando os conhecimentos e suas aplicações nas áreas da microbiologia, da genética, da bioquímica, da engenharia bioquímica e da bioengenharia (DALTON & BULL, 1985).

A parte central de um processo biotecnológico é o crescimento do microrganismo industrial em condições ambientais que estimulem a síntese do produto comercial que se pretende obter. Portanto, se faz necessário conhecer os microrganismos, controlar seu metabolismo e crescimento, bem como, manejá-los em grande escala. O processo se realiza em um fermentador ou biorreator que consta essencialmente de um grande recipiente onde se mantém o microrganismo a temperatura, pH, concentração de oxigênio dissolvido e concentração de substratos desejados (TREVAN *et al.*, 1990).

Dentre os processos biotecnológicos, a cultura de cianobactérias tem recebido um interesse crescente devido algumas de suas características, tais como, uso da luz solar como principal fonte de energia e altas produtividades com pequeno impacto ao meio ambiente (JENSEN & KNUTSEN, 1993).

### 2. Cianobactérias

Segundo a classificação de Carl Woese, de 1977, os microrganismos dividem-se em três reinos: eucariontes, arqueobactérias e eubactérias, pertencendo a esta última a divisão *Cyanophyta*, as algas verdes-azuis (HOEK *et al.*, 1995; PELCZAR *et al.*, 1993).

O nome *Cyanobacteria*, uma das três divisões das eubactérias, cuja classe é a *Cyanophyceae*, enfatiza dois aspectos das algas verdes-azuis melhor do que o tradicional nome *Cyanophyta*: sua natureza procariótica e a sua relação com as eubactérias. Por outro lado, o nome tradicional reflete as características de alga, tais como sua habilidade de realizar a fotossíntese (HOEK *et al.*, 1995).

Pelczar *et al.* (1980) cita como características das cianobactérias a ausência de membrana nuclear (procarióticos), de cloroplastos membrano-limitados, retículo endoplasmático, mitocôndrias e aparelho de Golgi, reprodução assexuada, além da morfologia, em geral, semelhante a das bactérias. Exibem uma grande variedade de formas e arranjos, de cocos unicelulares a bastões e até mesmo longos filamentos multicelulares e carecem de flagelo, porém as espécies filamentosas usualmente possuem motilidade deslizante que as possibilita migrar por superfícies úmidas (PELCZAR *et al.*, 1993).

As unidades fundamentais das cianobactérias são filamentos de células conhecidos como tricomas. Os tricomas podem constituir-se de células vegetativas ou conter células diferenciadas em função e estrutura, denominadas heterocistos e acinetos, respectivamente (PELCZAR *et al.*, 1993).

As cianobactérias estão distribuídas no solo, água doce e ambiente marinho. Devido a sua capacidade de fixar nitrogênio, as cianobactérias devem ter sido as primeiras colonizadoras de desertos, cavidades vulcânicas e regiões polares, onde trabalharam com os líquens na fixação do nitrogênio nas rochas (HENRIKSON, 1994). Algumas crescem em fontes quentes e são termofílicas. Outras podem viver em íntima associação com protozoários, fungos e plantas superiores, provendo os nutrientes por intermédio de seus processos fotossintéticos e de fixação do nitrogênio. A busca por soluções alternativas para a mitigação do dióxido de carbono gerado durante a produção de energia em termoelétricas também tem visado a utilização desses organismos fotossintéticos (RICHMOND, 1990).

As cores das cianobactérias incluem amarelo-dourado-claro, pardo, vermelho, verde esmeralda, azul, violeta e azul escuro, devido a presença de uma vasta quantidade de pigmentos, incluindo carotenóides, clorofila e ficobiliproteínas (HENRIKSON, 1994). Dentre as ficobiliproteínas estão a ficocianina, a aloficocianina e a ficoeritrina.

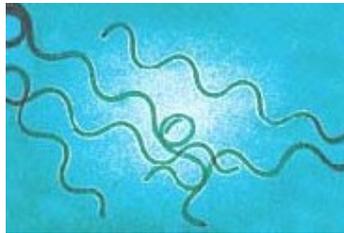
### **2.1. A cianobactéria *Spirulina***

A *Spirulina* descende dos primeiros seres fotossintetizantes e apresenta os maiores índices de produção de biomassa dentre as espécies do planeta. Quando comparadas aos vegetais superiores e aos animais, como fontes de produtos e nutrientes imprescindíveis para a qualidade de vida do homem, estas levam grande vantagem devido à rapidez com que se reproduzem e facilidade de cultivo em zonas não apropriadas para a agricultura. Além disso, o cultivo pode ser direcionado para a produção de vários compostos de interesse comercial, tais como a ficocianina, clorofila a,  $\beta$ -caroteno, biomassa, vitaminas, polissacarídeos, ácido  $\gamma$ -linolênico e enzimas (COZZA, 1999).

Segundo Hoek *et al.* (1995), a *Spirulina* é uma bactéria aeróbia fotossintética, do reino monera e divisão filogenética das eubactérias, pertencente ao Grupo II: *Cyanophyta* ou Cianobactéria e classe *Cyanophyceae*.

A cianobactéria *Spirulina* apesar de unicelular, se agrupam formando tricomas ou formas filamentosas dispostas em espiral com até 1,0 mm de comprimento. Assim como as plantas verdes superiores, seu metabolismo principal é a fotossíntese, onde a fonte principal de energia é a luz solar (VONSHAK, 1997). O diâmetro das células varia de 1 a 3  $\mu\text{m}$  nas espécies pequenas e de 3 a 12  $\mu\text{m}$  nas grandes. As espécies maiores de *Spirulina* como *S. platensis* e *S. maxima* possuem um citoplasma granular contendo vacúolos gasosos (RICHMOND, 1990).

As cianobactérias *Arthrospira platensis* e *Arthrospira maxima* são conhecidas e aceitas com *Spirulina platensis* e *Spirulina máxima* (VONSHAK, 1997). A Figura 1 mostra a cianobactéria *Spirulina platensis*.



**Figura 1** – A cianobactéria *Spirulina platensis*.

Fonte: MACCOLL, 1998.

A cianobactéria *Spirulina* apresenta, em base seca, cerca de 50 a 60% de proteínas, 5 a 15% de lipídios e 10 a 20% de carboidratos (HENRIKSON, 1994; RICHMOND, 1990; VONSHAK, 1997). Possuem ainda baixo conteúdo de ácidos nucléicos, 4%, além de que podem fornecer outros produtos como pigmentos, carotenóides, ficocianina e clorofila, vitaminas e ácidos graxos polinsaturados como o ômega 3 (PELIZER, 2003).

A única clorofila presente na *Spirulina* é a clorofila a, seu conteúdo varia de 1 a 1,5% da massa seca (VONSHAK, 1997). As quantidades de  $\beta$ -caroteno encontradas na cianobactéria podem chegar a concentrações 10 vezes maiores que as encontradas na cenoura. Em 10 g de biomassa seca, pode-se obter em torno de 14 mg do composto, o que representa 460% da dieta recomendada. Em valores percentuais, o conteúdo de carotenóides é de 0,37% na cianobactéria (HENRIKSON, 1994). O terceiro grupo de pigmentos presentes na *Spirulina* são as ficobiliproteínas e as duas mais importantes são a

ficocianina e a aloficocianina, sendo a relação entre a primeira e a segunda de aproximadamente 10:1.

Diante dessas características, a cianobactéria *Spirulina* pode ser utilizada na alimentação humana, bem como em ração animal e química fina (HENRIKSON, 1994).

Como a *Spirulina* apresenta substâncias de alto valor nutricional, suas propriedades terapêuticas e nutricionais têm sido amplamente estudadas. As principais propriedades já estudadas e confirmadas são: redução da hiperlipidemia, diminuindo níveis de colesterol e de lipoproteína de baixa densidade e aumentando níveis de lipoproteína de alta densidade; atividade anticarcinogênica, prevenindo tumores; efeito radioprotetor, havendo significativa redução dos problemas causados por radiações gama; melhoria de problemas renais, apresentando efeito protetor contra insuficiência renal; proteção da flora intestinal, havendo aumento da quantidade de *Lactobacillus* no intestino; efeito contra diabetes, diminuindo os níveis de glicose no soro; diminuição da obesidade, mostrando redução estatisticamente significativa no peso corporal de pacientes obesos; redução de hipertensão e pressão sangüínea; inibição da redução anafilática (COLLA, 2002; ESTRADA *et al.*, 2001; TORRES-DURÁN *et al.*, 1999; MIRANDA *et al.*, 1998; YANG *et al.*, 1997; RAMAMOORTHY & PREMAKUMARI, 1996; BELAY *et al.*, 1993; IWATA *et al.*, 1990; IWATA *et al.*, 1987).

A *Spirulina* está legalmente autorizada como alimento ou complemento alimentar na Europa, Japão e costa asiática do Pacífico. Nos Estados Unidos, o FDA (Food and Drug Administration) determinou, em 1981, que a *Spirulina* constitui fonte de proteínas e contém várias vitaminas e minerais, podendo ser comercializada legalmente como complemento alimentício (HENRIKSON, 1994).

No Brasil, a *Spirulina* tem sido empregada, basicamente, na produção de cápsulas destinadas a dietas de emagrecimento. De acordo com os fabricantes, o efeito de controlar o apetite ocorre se ingerida uma ou duas horas antes da refeição, devido à presença dos aminoácidos essenciais em quantidades balanceadas, bem como sua composição rica em proteínas. Também tem sido utilizada em formulações de alto teor nutritivo, servindo de complementação protéica e vitamínica (HENRIKSON, 1994).

## **2.2. Cultivo de *Spirulina***

O interesse em estudar os fatores físico-químicos e nutricionais limitantes do crescimento da *Spirulina* bem como a aplicação de condições de estresse no meio de cultivo justificam-se pelo fato de que é uma das cianobactérias mais estudadas no mundo. Os

constituintes necessários para o crescimento celular são: água, fonte de carbono, nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, ferro e outros micronutrientes (SANTOS, 2001).

Segundo Colla (2002), ainda são relevantes como fatores que possam influenciar no crescimento da *Spirulina platensis*, o pH, a salinidade, a luminosidade, a temperatura, a presença de contaminantes, o acúmulo de oxigênio e a presença de íons bicarbonato.

O cultivo comercial de *Spirulina* é realizado com diversas finalidades, como os vários trabalhos citados por Cozza (1999), onde esta cianobactéria é utilizada como alimento, complemento alimentar, ração animal em piscicultura, produtos farmacêuticos, suplemento dietético, alimento nutracêutico e no tratamento de efluentes industriais.

Cozza (1999) investigou a produção de *Spirulina platensis* utilizando meios de cultivo naturais e sintéticos, testando diversas fontes de nitrogênio e a utilização da água da Lagoa Mangueira.

Santos (2001) estudou a influência da taxa de aeração na concentração da biomassa de *Spirulina platensis*, usando como meio de cultivo a água da Lagoa Mangueira e o meio sintético Zarrouk (ZARROUK, 1966). As condições de cultivo foram: iluminância de 3.100 Lux, fotoperíodo de 12 horas fase clara e 12 horas fase escura a 30°C, sendo que a taxa de aeração variou de 0 a 0,9 vvm (vazão de ar por volume de meio por minuto). A velocidade específica de crescimento máxima foi maior ao utilizar taxa de aeração de 0,8 vvm, para ambos meios de cultivo, água da Lagoa Mangueira e Zarrouk, sendo 0,0046 h<sup>-1</sup> e 0,0047 h<sup>-1</sup>, respectivamente.

Costa *et al.* (2001) avaliaram o cultivo de *Spirulina platensis* utilizando diferentes fontes de nitrogênio de modo a obter substratos alternativos. As condições de cultivo foram: iluminância de 1.900 Lux e fotoperíodo de 12 horas fase clara e 12 horas fase escura a 30°C. A agitação e a aeração do cultivo foram promovidas pela passagem de ar a 0,2 vvm. O trabalho demonstrou que é possível utilizar outras fontes de nitrogênio como a uréia ou o nitrato de amônio substituindo o nitrato de sódio.

Duarte (2001) avaliou parâmetros para o aumento de escala do cultivo de *Spirulina platensis*, verificando o efeito da agitação, temperatura e concentração inicial de biomassa em fotobiorreatores de 5 litros. As condições utilizadas foram: 18 e 36 rpm de agitação, temperatura de 30 e 35°C e concentração inicial de biomassa de 0,1 e 0,2 g.L<sup>-1</sup>. Os experimentos realizados para os sistemas aberto e fechado mostraram que a concentração máxima foi atingida a 30°C e 3.200 Lux. As temperaturas de 12°C e 44°C inviabilizaram o

cultivo e em sistema aberto tanto a temperatura quanto a iluminância tiveram forte influência no crescimento celular.

### 3. Ficobiliproteínas

Os pigmentos importantes metabolicamente, são os carotenóides, a clorofila e as ficobiliproteínas (SARADA *et al.*, 1999). Os carotenóides formam um grupo de substâncias lipossolúveis, com estrutura altamente insaturada de hidrocarbonetos terpênicos, podendo conter grupos hidroxila, carbonilas e carboxilas e são pigmentos de cor amarelo-alaranjada, podendo apresentar-se como  $\beta$ -caroteno, xantofilas, zeaxantina e luteína. O consumo de  $\beta$ -caroteno tem sido indicado para reduzir o risco de contração de câncer, devido à capacidade de desativar os radicais livres, evitando que reajam no organismo. Também podem estimular populações de lactobacilos intestinais, aumentando a absorção de vitamina B<sub>1</sub> (HENRIKSON, 1994).

A clorofila pode ser utilizada como corante alimentício verde. É encontrada em pequenas quantidades na microalga quando comparada às quantidades de ficocianina, sendo no máximo apenas 1,5%, apresentando-se principalmente como clorofila a (VONSHAK, 1997).

As ficobiliproteínas são complexos pigmento-proteína, hidrossolúveis, envolvidos na captação de luz, covalentemente ligadas com grupos cromóforos e muito fluorescentes, encontradas em cianobactérias (algas verdes-azuis), em uma classe de algas eucarióticas (Criptomonados) e em Rhodophyta (algas vermelhas) (ABALDE *et al.*, 1998; BERMEJO *et al.*, 2002).

De acordo com Bermejo *et al.* (1997) e Maccoll (1998), as ficobiliproteínas podem ser divididas em três principais classes dependendo das propriedades de absorção, como aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina. Visualmente a ficoeritrina aparece vermelha, as ficocianinas variam de roxo a azul escuro e as aloficocianinas são azuis esverdeadas.

Os grupos cromóforos ligados as ficobiliproteínas são chamados bilinas ou ficobilinas porque a relação estrutural destes grupos se parece com a relação estrutural de pigmentos da bÍlis humana – a biliverdina e a bilirrubina (VISKARI & COLYER, 2003). A característica espectral das ficobiliproteínas depende do número e tipo de bilinas presentes. Aloficocianina e ficocianina contém principalmente ficocianobilina, enquanto que ficoeritrina contém principalmente ficoeritrobilina (VISKARI & COLYER, 2002). Poucas cianobactérias possuem um quarto tipo no lugar da ficoeritrina, a ficoeritrocianina, que contém os cromóforos ficocianobilina e ficobiliviolina tetrapirrole (BERMEJO *et al.*, 1997).

As ficobiliproteínas atuam como pigmento acessório fotossintético (BERMEJO *et al.*, 2002). A maior parte da energia luminosa usada por alguns organismos fotossintéticos é obtida por pigmentos acessórios, porque a clorofila absorve energia luminosa somente em uma região limitada do espectro solar. A energia de excitação é mais tarde transferida para o centro da reação localizado na membrana fotossintética, iniciando o processo fotossintético (REIS *et al.*, 1998).

As ficobiliproteínas estão agrupadas dentro de uma estrutura celular organizada, o ficobilissoma (BERMEJO *et al.*, 2002). Ficobilissomas consistem de aloficocianinas na parte central cercados por ficocianinas e quando presentes, ficoeritrinas na periferia. Vários polipeptídeos incolores servem para ligar ficobiliproteínas nos ficobilissomas e para uni-los com a membrana tilacóide (ABALDE *et al.*, 1998). Os ficobilissomas transferem máxima energia para o complexo proteína-clorofila localizado na membrana tilacóide (REIS *et al.*, 1998).

A unidade fundamental de todas ficobiliproteínas consiste de agregado trimérico ou hexamérico  $(\alpha\beta)_3$ ,  $(\alpha\beta)_6$  de dois polipeptídeos, com as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  presentes em uma estequiometria equimolecular (ABALDE *et al.*, 1998). Algumas ficobiliproteínas também contém subunidades  $\gamma$  (VISKARI & COLYER, 2002).

Na Tabela 1 encontram-se propriedades físicas e espectrais de algumas ficobiliproteínas.

**Tabela 1** – Propriedades físicas e espectrais de algumas ficobiliproteínas.

Ficobiliproteínas	Massa		Estrutura
	Molecular (Da)	$\lambda_{\max}$ (nm)	
Aloficocianina	104000	652	$(\alpha\beta)_3$
Ficocianina	232000	620	$(\alpha\beta)_6$
Ficoeritrina	240000	565	$(\alpha\beta)_6\gamma$

Fonte: Viskari & Colyer, 2002.

Patel *et al.* (2005) investigaram o conteúdo de ficobiliproteínas (aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina) em diferentes espécies de cianobactérias *Spirulina* sp., *Phormidium* sp. e *Lyngbya* sp. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** – Conteúdo percentual em base seca de biomassa das ficobiliproteínas em três diferentes espécies de cianobactérias.

Cianobactérias	Ficocianina (%)	Aloficocianina (%)	Ficoeritrina (%)
<i>Spirulina</i> sp.	17,5	3,8	1,2
<i>Phormidium</i> sp.	4,1	1,0	0,3
<i>Lyngbya</i> sp.	3,9	0,8	0,4

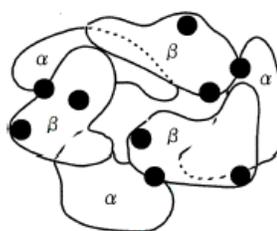
Fonte: Patel *et al.*, 2005.

A ficocianina é o principal pigmento da cianobactéria, podendo chegar a 20% em massa seca da proteína celular. Tem sido utilizada como pigmento em alimentos e cosméticos. Alguns produtos alimentícios onde se pode utilizar a ficocianina são sorvetes, refrescos e produtos lácteos (VONSHAK, 1997).

### 3.1. Ficocianina

A ficocianina, também chamada de C-ficocianina, cujo prefixo refere-se à origem cianobacterial, é um pigmento acessório fotossintético da família das ficobiliproteínas (SONI *et al.*, 2006). Estas, as quais possuem coloração azul, juntamente com a clorofila a, que possui coloração verde, são as responsáveis pela coloração verde-azulada das cianobactérias (MINKOVA *et al.*, 2003).

As subunidade de polipeptídeos que formam a ficocianina são as  $\alpha$  e  $\beta$ , como mostra a Figura 2. As estruturas primárias dessas subunidades da molécula da ficocianina foram determinadas em 1978 por Freindenreich P. *et al.* e apresentam massas molares de 20.500 e 23.500 Da, respectivamente (FUKUI, 2004).

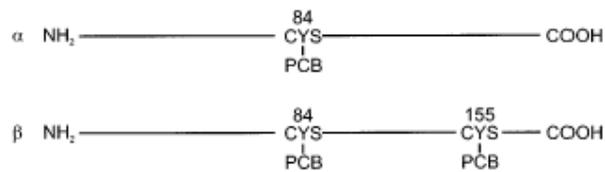


**Figura 2** – A estrutura da molécula da ficocianina composta por dois grupos de proteínas, subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ .

Fonte: Fukui, 2004.

Estas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  são compostas de uma proteína como suporte principal, onde grupos tetrapirroles lineares ficocianobilina (PCB) estão covalentemente ligados por

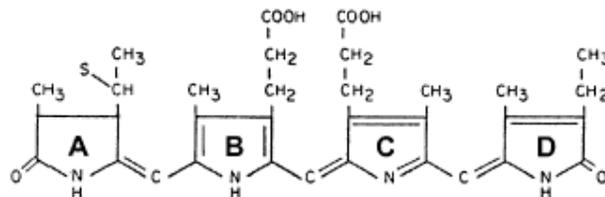
ligações tioéter a resíduos de cisteína (CYS), como mostra a Figura 3. Há uma ficocianobilina na cadeia  $\alpha$  e duas na cadeia  $\beta$  (FUKUI, 2004).



**Figura 3** – Posição das ficocianobilinas na seqüência de aminoácidos da ficocianina.

Fonte: Maccoll, 1998.

A Figura 4 apresenta a estrutura química do grupo cromóforo da ficocianina, a ficocianobilina, formada por uma cadeia linear tetrapirróle (MACCOL, 1998).



**Figura 4** – Estrutura química da ficocianobilina, grupo cromóforo da ficocianina.

Fonte: Fukui, 2004.

Além da sua importância como corante natural, estudos recentes têm demonstrado que ela possui algumas propriedades terapêuticas. Entre essas propriedades está a atividade antioxidante, visto que é capaz de seqüestrar radicais hidróxido e alcóxido. Estudos demonstraram que a ficocianina possui 20 vezes mais atividade antioxidante que o ácido ascórbico, tem sido também utilizada como anti-inflamatória e hepato-protetora (SANTIAGO-SANTOS *et al.*, 2004).

Rimbau *et al.* (1999) estudaram o efeito da ficocianina sobre danos neurocomportamentais induzidos em ratos pelo ácido cáinico. A incidência de alterações neurocomportamentais foi significativamente menor nos animais que receberam ficocianina. Embora estudos adicionais sejam necessários, o resultado do trabalho sugere que a ficocianina pode ser utilizada na prevenção e tratamento de algumas desordens neurológicas e doenças neurodegenerativas associadas ao stress oxidativo, como Alzheimer e Parkinson.

Múltiplas enfermidades estão associadas ao ataque dos radicais livres, em especial o hidróxido, o alcóxido e o peróxido, aos lipídios, carboidratos e proteínas. Por isso grande

parte das investigações atuais está centrada na busca por fármacos em potencial, capazes de interagir com esses compostos e evitar o dano que produzem. O trabalho de Romay *et al.* (2000) avaliou se a ficocianina de *Spirulina maxima* apresentava propriedades antioxidantes frente a radicais peróxidos, que estão envolvidos nos processos de peroxidação lipídica e citotoxicidade. Foi observado efeito inibitório da peroxidação lipídica, podendo estar relacionado com a capacidade de ficocianina de seqüestrar radicais hidróxido.

A atividade antioxidante da ficocianina, frente a radicais hidroxílicos, foi demonstrada por Estrada *et al.* (2001). Foram analisadas diferentes frações contendo ficocianina extraída de *Spirulina platensis*, observando que as frações ricas nessa ficobiliproteína apresentaram significativamente uma maior atividade antioxidante em relação a frações as quais não continham ficocianina.

As diferentes aplicações da ficocianina são determinadas pela sua pureza e esta é geralmente avaliada através da relação de absorbâncias  $A_{620}/A_{280}$ , em que a pureza de 0,7 é considerada para grau alimentar, 3,9 para grau reativo e superior a 4,0 para grau analítico (PATIL *et al.*, 2006).

O valor comercial da ficocianina pura, de pureza superior a 4,0, é de aproximadamente US\$ 13 por miligrama (CYANOTEC CORPORATION), sendo que uma parte considerável do custo de obtenção deste pigmento é devido às etapas de recuperação e purificação.

#### **4. Purificação de bioprodutos**

A purificação de produtos biotecnológicos produzidos por células de animais ou microbianas constitui uma etapa complexa do processo, dadas as variadas características dos meios e das biomoléculas de interesse, como ácidos orgânicos, antibióticos, polissacarídeos, aminoácidos, peptídeos e proteínas (KILIKIAN & PESSOA, 2003).

Para produtos associados às células é necessário efetuar o rompimento celular prévio e esses produtos intracelulares tornam o processo de purificação de biomoléculas mais difícil em comparação aos extracelulares. Como conseqüência, ocorre aumento da viscosidade do meio como resultado da liberação de nucleotídeos, e a molécula-alvo é liberada com todas as outras moléculas intracelulares, o que amplia a diversidade de contaminantes. Assim, a purificação de uma determinada proteína pode requerer muitas etapas para remover um grande número de outras proteínas que estão acompanhando aquela que se deseja purificar (LEHNINGER *et al.*, 1995).

A definição do processo de purificação depende da aplicação final da molécula-alvo, suas características físico-químicas, bem como aquelas dos contaminantes presentes no extrato bruto. Tipicamente, esse tipo de processo para proteínas é composto por múltiplas etapas cuidadosamente definidas que têm como fundamento a distinção das proteínas com base na seqüência, no conteúdo de carboidratos e lipídios e na sua atividade biológica entre outras características. As cromatografias em coluna de gel, filtração ou adsorção são os sistemas mais utilizados para a purificação de proteínas (ALMEIDA & KURTENBACH, 2002).

O grande desafio do processo de purificação de proteínas é o exaustivo trabalho para se encontrar as melhores estratégias e a adequação da metodologia para a escala de produção pretendida, garantindo que o produto final tenha todas as características necessárias para o seu uso (HO *et al.*, 2000).

Os custos do processo de recuperação e purificação representam pelo menos metade do custo total de produção de uma proteína ou produto biológico (SPALDING, 1991).

#### 4.1. Purificação de ficocianina

Por ser solúvel em água, a ficocianina, presente na biomassa de *Spirulina*, pode ser isolada como complexo proteína – pigmento o que facilita os processos de extração e purificação, permitindo a separação destas moléculas de outros pigmentos que não são solúveis em água (BERMEJO *et al.*, 2002; ABALDE *et al.*, 1998). Os métodos para purificação de ficocianina são usualmente precipitação, permeação em gel, adsorção e métodos cromatográficos, havendo também a descrição por sistema aquoso bifásico (ABALDE *et al.*, 1998; RITO-PALOMARES, 2004).

Reis *et al.* (1998) purificaram ficocianina e ficoeritrina extraídas da cianobactéria *Nostoc* sp. em quatro etapas, ultrafiltração, alcançando uma pureza  $A_{620}/A_{280}$  e  $A_{565}/A_{280}$ , respectivamente, de 1 para ambas, precipitação com sulfato de amônio, de onde obtiveram uma pureza de 1,5 para as duas ficobiliproteínas, seguida de filtração em gel em coluna com Sephacryl S-100 e cromatografia de troca iônica em coluna com resina Q-Sepharose. Após a etapa de filtração em gel a ficocianina e a ficoeritrina foram caracterizadas por uma pureza de 3,4 e 3,5, valores estes que aumentaram para 4 e 5, nessa ordem, após a cromatografia de troca iônica.

Abalde *et al.* (1998) utilizaram três passos para a purificação de ficocianina da cianobactéria *Synechococcus* sp. IO9201. Primeiramente extraíram a ficobiliproteína da

cianobactéria por congelamento a  $-21^{\circ}\text{C}$  e subsequente aquecimento a  $4^{\circ}\text{C}$ , prosseguindo com duas etapas de purificação: cromatografia de interação hidrofóbica, utilizando resina butil-sepharose e cromatografia de troca iônica, usando Q-Sepharose. Com esta metodologia, a ficocianina foi purificada com uma razão de  $A_{620}/A_{280}$  de 4,85.

Patel *et al.* (2005) descreveram a purificação de ficocianina extraída de três cianobactérias, *Spirulina* sp., *Phormidium* sp. e *Lyngbya* sp. por dois passos. Primeiramente foi realizada a precipitação fracionada do extrato com sulfato de amônio, obtendo ficocianina com pureza  $A_{620}/A_{280}$  de 0,82, 0,73 e 0,91, respectivamente, para então finalizar com a purificação por cromatografia de troca iônica em coluna com resina DEAE-Sepharose, cuja pureza chegou a 4,42, 4,43 e 4,59, respectivamente.

Santiago-Santos *et al.* (2004), extraíram ficocianina por tratamento das células com lisosima e purificou-a de duas formas, primeiramente por cromatografia de troca iônica usando resina Q-Sepharose e após por cromatografia de interação hidrofóbica. Dessa forma obteve uma ficocianina com pureza  $A_{620}/A_{280}$  de 2,2 para a primeira etapa e subsequente, 3,5.

Silva (2005), purificou ficocianina extraída de *Spirulina platensis* por cromatografia de permeação em gel com a resina Sephacryl S-100 HR, obtendo uma pureza  $A_{620}/A_{280}$  de 2,1 ao final do processo.

Moraes (2006) otimizou o processo de purificação de ficocianina extraída de *Spirulina platensis*, constituído por duas etapas, precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica. As melhores purezas  $A_{620}/A_{280}$  para a proteína foram obtidas com precipitação por sulfato de amônio, 0,88, seguida de cromatografia de troca iônica, 3,9.

Soni *et al.* (2006) purificaram ficocianina extraída de *Oscillatoria quadripunctulata* por precipitação com sulfato de amônio, obtendo uma pureza de  $A_{620}/A_{280}$  1,26, para então seguir o processo com cromatografia de exclusão molecular e de troca iônica, obtendo uma pureza de 2,36 e 3,31, respectivamente.

## **4.2. Purificação por sistema aquoso bifásico**

### **4.2.1. Sistema aquoso bifásico**

O sistema aquoso bifásico (SAB) é formado quando duas soluções aquosas de polímeros incompatíveis, tais como polietilenoglicol (PEG) e dextrana, ou uma solução aquosa polimérica e uma salina, são misturadas, acima da concentração crítica, havendo a formação de um sistema de duas fases líquidas distintas (ALBERTSSON, 1986). Proteínas

ou enzimas adicionadas na mistura bifásica resultante tendem à partição desigual entre as fases permitindo assim a extração da proteína em particular. Técnicas de separação baseadas nesta partição têm sido conhecidas como extração por sistema aquoso bifásico (SAB) (ALBERTSSON, 1986; WALTER *et al.*, 1985).

O SAB foi observado inicialmente em 1896, quando o microbiologista Beijerinck, ao misturar gelatina, agar-agar e água em certas concentrações, obteve um sistema de duas fases aquosas com a fase rica em gelatina na parte superior e a fase rica em agar-agar na parte inferior. Em 1947, Dobry & Boyer-Kawenoki fizeram um estudo sistemático sobre a miscibilidade de pares de polímeros em presença de água e solventes orgânicos, conseguindo a separação das fases em diversos casos. Albertsson (1955) pesquisou a influência de polímeros solúveis em solventes orgânicos na obtenção de duas fases aquosas. Desde então esses sistemas vem sendo amplamente investigados e utilizados na purificação de biomoléculas. Uma das principais características destes sistemas é fornecer um ambiente favorável para a separação de materiais biológicos (CHUMPITAZ, 2002).

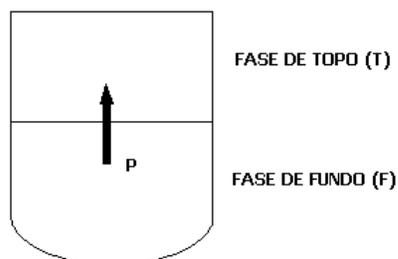
Em geral, as pesquisas em SAB podem ser divididas em duas áreas maiores. A elucidação de mecanismos moleculares para o entendimento da partição do soluto no SAB é o principal foco da maior área de pesquisa e geralmente envolve o uso de sistemas modelo para estabelecer as regras que poderão prever o procedimento desse soluto, enquanto a outra tem como alvo a implementação prática da técnica no desenvolvimento de processos (RITO-PALOMARES, 2004).

A partição por sistema aquoso bifásico apresenta algumas vantagens para o purificação de produtos biológicos em grande escala (ALBERTSSON, 1986):

- Facilidade de prever o “scale-up” através de pequenos ensaios em laboratório;
- Alta capacidade de utilização direta dos princípios disponíveis na Engenharia Química para a separação em escala industrial;
- A transferência de massa e o equilíbrio das fases são atingidos rapidamente, o que diminui os gastos com energia;
- Reduzida tensão superficial;
- Boa biocompatibilidade;
- Separação rápida e seletiva;
- Mais econômica quando comparada a outros métodos de purificação.

A separação entre a molécula a ser purificada e os contaminantes decorre das diferentes solubilidades apresentadas por esses solutos em cada uma das fases aquosas. A

Figura 5 ilustra a ocorrência das duas soluções aquosas imiscíveis e a presença de uma molécula-alvo P, cuja solubilidade é maior na fase de topo em relação à fase de fundo, havendo assim, um aumento do grau de pureza dessa molécula, caso os contaminantes apresentem solubilidade maior na fase de fundo (KILIKIAN & PESSOA, 2003).



**Figura 5** – Sistema de duas fases aquosas imiscíveis: T, fase de topo (leve); B, fase de fundo (pesada); P, produto.

Fonte: Kilikian & Pessoa, 2003.

Segundo ALBERTSSON (1986), o sistema de duas fases aquosas pode ser dividido em quatro grandes grupos, como mostra a Tabela 3.

**Tabela 3** – Classificação dos sistemas aquosos bifásicos segundo a composição.

Grupo	Exemplos
Dois polímeros não-iônicos	Polietilenoglicol/Ficoll, Polietilenoglicol /Dextrana, Polietilenoglicol /Polivinil Álcool, Polipropilenoglicol/Dextrana, Metil celulose/Hidroxipropildextrana, Ficoll/Dextrana
Um polieletrólito e um polímero não-iônico	Sulfato dextrana de sódio/Polipropileno glicol, Carboximetildextrana de sódio/ Polietilenoglicol, Carboximetilcelulose de sódio/metil celulose
Dois polieletrólitos	Sulfato dextrana de sódio/Carboximetildextrana de sódio Carboximetildextrana de sódio/Carboximetilcelulose de sódio
Um polímero não-iônico e um composto de baixa massa molar	Polipropilenoglicol /Fosfato de Potássio, Polietilenoglicol/Fosfato de Potássio, Metoxipolietilenoglicol/Fosfato de potássio, Polipropilenoglicol/glicose, Polietilenoglicol/glicose, Polietilenoglicol/Sulfato de Magnésio, Polietilenoglicol/Citrato de Sódio

Fonte: Albertsson, 1986.

Embora a variedade de SABs seja grande, os mais aplicados à extração líquido-líquido são os constituídos por Polietilenoglicol (PEG)/Dextrana e Polietilenoglicol (PEG)/Sal (fosfato, sulfato, citrato), quando se consideram fatores importantes do ponto de vista industrial, como custo e possibilidade de reciclagem dos reagentes, tempo de separação de

fases, possibilidade de esterilização, atoxidade e faixa de aplicação. Devido a esses fatores, justifica-se a concentração dos estudos nestes dois sistemas, sendo o último o mais utilizado devido ao seu baixo custo, elevada seletividade na separação de moléculas com base na solubilidade e menor tempo de separação das fases em relação ao primeiro (KILIKIAN & PESSOA, 2003; MINAMI, 1997).

Segundo Rito-Palomares (2004), o sistema PEG/Fosfato é o mais comumente usado para a recuperação de proteínas e Marcos (1999) ressalta que o sistema PEG/Fosfato tem sido melhor estudado, contudo há um crescente interesse na utilização de sistemas PEG/Citrato devido à baixa toxicidade do citrato comparado ao fosfato.

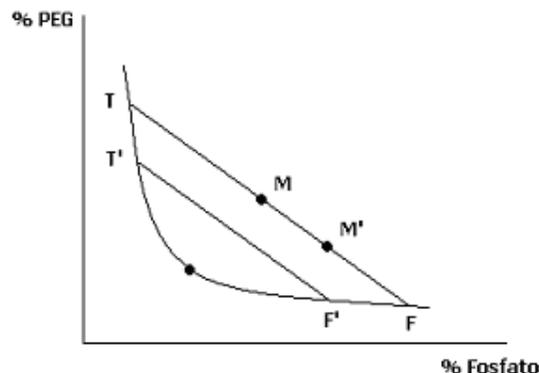
Nos sistemas aquosos bifásicos, os pigmentos como a ficocianina, têm preferência pela fase superior, rica em PEG, pois são substâncias hidrofóbicas (LAHORE *et al.*, 1995; HUSTEDT *et al.*, 1985). Já os fragmentos celulares permanecem na região da interface devido à ação da tensão superficial que é aumentada com o aumento da quantidade de massa celular, impedindo que essa massa celular migre para uma das fases (CASCONI *et al.*, 1991).

Benavides & Rito-Palomares *et al.* (2004) recuperaram 77% da proteína ficoeritrina extraída de *Porphyridium cruentum* através de SAB composto por 24,9% de PEG 1450 e 12,6% de fosfato de potássio, alcançando um fator de purificação de 2,9 vezes.

Marcos *et al.* (1999) purificaram acilase extraída de *Escherichia coli* utilizando SAB composto por 21% de PEG 1000 e 17% de citrato de sódio, alcançando um fator de purificação de 2,6 vezes e uma recuperação de 83% da enzima.

#### **4.2.2. Diagrama de fases**

O SAB é representado em um diagrama de fases no qual a ordenada representa a composição em massa da molécula que apresenta maior concentração na fase de topo, como por exemplo, PEG e a abscissa representa a composição da molécula de maior concentração na fase de fundo, por exemplo o sal. Composições representadas por pontos acima da curva de equilíbrio, também denominada curva binodal, levam à formação de duas fases e, abaixo da curva, de uma só fase. A formação de um SAB, depende portanto, da concentração dos componentes do sistema (KILIKIAN & PESSOA, 2003).



**Figura 6** – Exemplo de um diagrama de fases.

Fonte: Kilikian & Pessoa, 2003.

A Figura 6 mostra um exemplo genérico de um diagrama de fases. A composição inicial do sistema é dada pelo ponto M e a composição final de cada fase após atingir o equilíbrio é dada pelos pontos T (fase superior ou de topo) e F (fase inferior ou de fundo). O segmento TMF é chamado de *tie-line* ou linha de amarração, e todos os sistemas cuja composição inicial está contida nessa linha possuem a mesma composição de fases após o equilíbrio, porém com diferentes razões de volumes entre as fases superior e inferior. (KULA, 1985; ASENJO, 1994).

Após o estabelecimento do equilíbrio, o sistema cuja composição inicial é dada pelo ponto M, apresenta as composições indicadas pelos pontos T na fase superior e F na fase inferior, assim como a composição indicada pelo ponto M', de tal modo que ambos os componentes do sistema estão presentes nas fases líquidas, porém a relação de volumes entre as fases é diferente para cada composição, de acordo com a razão entre os segmentos TM e FM, a qual é igual à razão entre os volumes de fase de fundo e de topo (KILIKIAN & PESSOA, 2003).

O ponto crítico é aquele no qual as composições e os volumes das fases superior e inferior são iguais. Sistemas de composição próxima ao ponto crítico são instáveis e devem ser evitados, pois pequenas diluições no sistema poderão levar à região monofásica (ASENJO *et al.*, 1994).

#### 4.2.3. Fatores que influenciam no sistema aquoso bifásico

Os principais fatores que influenciam no sistema de fases e conseqüentemente alteram o diagrama de fases são a massa molar do polímero e a concentração dos componentes do sistema. Quanto maior a massa molar do polímero, menor a concentração

necessária para a formação de duas fases e isso significa que a curva binodal desloca-se no sentido da região monofásica à medida que a massa molar do polímero aumenta. Já a concentração dos componentes do sistema pode afetar a viscosidade e a densidade do sistema, causando diferenças no tempo de separação das fases e na razão de volumes (ALBERTSSON, 1986).

O pH também é um tipo de variável que pode influenciar no diagrama de fases, a medida que diminuindo o seu valor, as concentrações necessárias de polímero e sal em um sistema PEG/sal aumentam, deslocando a curva binodal para a direita. Este fato pode ser explicado pelo aumento da razão  $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ , para o caso do fosfato, com a diminuição do pH, pois como o ânion monovalente é menos efetivo no “salting out” do PEG (fenômeno de expulsão devido ao tamanho do PEG), será necessária uma concentração maior dos componentes para formar o sistema bifásico (MINAMI, 1997).

#### 4.2.4. Coeficiente de partição

O desempenho da purificação, quanto à eficiência da partição da biomolécula-alvo a uma dada fase, é dado pelo valor de K, coeficiente de partição (KILIKIAN & PESSOA, 2003). Pode ser calculado tanto para a substância de interesse como para os contaminantes ou proteínas totais presentes na amostra, podendo-se comparar estes valores, desejando-se que os dois coeficientes tenham uma ordem de grandeza bem distinta entre si (MINAMI, 1997).

O coeficiente de partição é uma grandeza adimensional que representa a relação entre as concentrações da molécula de interesse na fase de topo e na fase de fundo, no equilíbrio (ALBERTSSON, 1986).

Ainda que o valor de K da molécula-alvo seja elevado, assim como a razão entre valores de K (molécula-alvo e contaminantes), a viabilidade da aplicação da extração em SAB requer rendimento elevado da molécula desejada em uma dada fase do sistema (KILIKIAN & PESSOA, 2003).

### 5. Planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta

Os planejamentos experimentais foram introduzidos por G. E. Box na década de 1950 e, nos últimos 20 anos, sua aplicação vem crescendo exponencialmente desde a revolução da informática e a facilidade do uso de softwares para análises estatísticas (BARROS *et al.*, 1996).

Segundo Kalil *et al.* (2000), a importância do uso da técnica de planejamento experimental e análise de superfície de resposta advém do fato desta metodologia possibilitar a análise dos efeitos sinérgicos ou antagônicos entre as variáveis, que só podem ser verificados pela determinação dos efeitos de interação entre as mesmas através de um planejamento fatorial.

Quando o comportamento da medida da resposta de interesse é governada por certas leis as quais conduzem a uma relação determinante entre a resposta e o conjunto de fatores experimentais escolhidos, deve então ser possível determinar as melhores condições dos fatores para otimizar a produção desejada. Muito freqüentemente, no entanto, devido à relação ser muito complexa ou desconhecida, uma abordagem empírica é necessária (KHURI & CORNELL, 1987).

Segundo Marcos *et al.* (2002), os estudos de purificação por SAB são em sua maioria empíricos, devido a sua complexidade e, desta forma, as melhores condições são geralmente obtidas pela variação sistemática de diversos fatores tais como massa molar do polímero, concentração de sal e pH, o que o uso de planejamentos experimentais pode propor.

## **6. Caracterização de bioprodutos**

Para uma proteína especificamente, depois de isolada, é importante estabelecer sua homogeneidade e conseqüentemente sua caracterização por uma seqüência de métodos que tornam possível a avaliação de sua estabilidade térmica e dos parâmetros cinéticos (LEHNINGER, 1995).

A cor é uma importante regra na aparência, processamento e aceitabilidade de alimentos (CORZO *et al.*, 2006). A cinética de degradação da cor em alimentos é complexa. Modelos seguros que predizem corretamente o processo da reação química ocorrendo em líquidos homogêneos ou fases semi-sólidas durante os processos térmicos e armazenamento são proveitosos em muitas aplicações da engenharia incluindo processos de otimização. Portanto, estudos experimentais e aplicação de modelos para prever e interpretar parâmetros cinéticos como a ordem de reação, a taxa de reação e a energia de ativação são necessários (AHMED *et al.*, 2002b).

Além disso, modelos cinéticos de destruição térmica são essenciais para desenvolver novos processos, assumindo um produto alimentício seguro e fornecendo a máxima retenção dos fatores de qualidade (ÁVILA & SILVA, 1999).

A estabilidade térmica, em particular, é influenciada por diversos fatores experimentais como temperatura e pH, os quais podem afetar fortemente a estrutura tridimensional ou conformação espacial da proteína podendo ocorrer a desnaturação da mesma. Essa degradação protéica permite o estudo da cinética de reação que é assumida como de primeira ordem devido ao rompimento de uma ligação simples ou de uma estrutura sensível (SCHIMIDELL *et al.*, 2001; JURADO *et al.*, 2004).

Com a obtenção da ficocianina, corante natural azul, tornou-se interessante investigar suas propriedades, sobretudo químicas, de modo a estabelecer as características desta proteína de potencial mundial utilizada como corante nas indústrias. O estudo da cinética de desnaturação térmica e da estabilidade química são algumas das propriedades que podem caracterizar esta ficobiliproteína.

Edwards *et al.* (1997) purificaram ficocianina extraída de *Synechococcus lividus*, cianobactéria que cresce em altas temperaturas, entre 66 e 73°C e avaliaram suas propriedades, captação de luz, conformação dos grupos bilinas, fluorescência e estrutura protéica secundária a temperaturas fisiológicas extremas de 20 e 70°C. Em ambas temperaturas, as propriedades da proteína foram mantidas e entre 60 e 70°C, ocorreu a desnaturação da ficocianina.

Sarada *et al.* (1999) extraíram ficocianina de *Spirulina* sp. e estudaram sua estabilidade térmica a -4, 10, 30, 45 e 55°C assim como a estabilidade em relação ao pH do extrato para valores na faixa de 2,5 e 13 às temperaturas 9 e 25°C. A ficocianina mostrou-se estável a valores de pH entre 5 e 7,5 para ambas temperaturas estudadas e acima e abaixo deste intervalo, a cor foi perdida gradualmente. Já a estabilidade térmica foi mantida até 45°C mostrando-se instável acima desta.

Ainda assim, a estabilidade temporal de proteínas em solução é de maior interesse biotecnológico e farmacêutico, devido a possibilidade de manterem seu potencial por um longo tempo e assim possibilitarem a maximização do seu tempo de vida (WIMMER *et al.*, 1997). Essa estabilidade à longo prazo tem sido reconhecida que pode ser obtida pela adição de substâncias como açúcares, sais ou álcoois polihídricos (GERLSMA & STUUR, 1972; BACK *et al.*, 1979; UEDAIRA & UEDAIRA, 1980; LEE & TIMASHEFF, 1981; GEKKO & ITO, 1990).

Wimmer *et al.* (1997) estudaram a estabilidade térmica da lisozima extraída de ovos brancos com sorbitol como agente estabilizante. A temperatura de desnaturação (Td) da enzima subiu de 350 para 354K à medida que a concentração do sorbitol adicionada aumentou gradativamente de 0,25, 0,35, 0,50, 0, 75 a 1M. Esse acréscimo na Td foi

causado pelo efeito do solvente em torno das moléculas protéicas conduzindo a um aumento das interações hidrofóbicas na proteína.

## **7. Considerações gerais**

A utilização das técnicas de planejamento experimental e superfície de resposta para a avaliação da purificação através de sistema aquoso bifásico de ficobiliproteínas não foi reportada em trabalhos científicos até o momento, assim como o processo integrado de extração e purificação de ficocianina pela mesma técnica anterior ou a caracterização da cinética de desnaturação desse pigmento.

Dessa forma, faz-se necessário um estudo mais detalhado do processo de purificação do extrato aquoso de ficocianina, com e sem células, por SAB, avaliando-se o efeito de variáveis importantes nesse tipo de sistema, como os percentuais do sal e do polímero e a massa molar do PEG, na pureza e recuperação da proteína. Ainda assim, tendo em vista o crescente interesse por corantes alimentícios naturais, a caracterização cinética da ficocianina se torna interessante, pois possibilita um maior conhecimento das propriedades do pigmento.

## **CAPÍTULO III**

### **DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO**

**PURIFICAÇÃO DE FICOCIANINA DE *Spirulina platensis* POR  
SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO**

## PURIFICAÇÃO DE FICOCIANINA DE *Spirulina platensis* POR SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO

Laboratório de Microbiologia, Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), CP 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil, Telefone: (53) 32338754, E-mail: dqmsjk@furg.br

### RESUMO

Ficocianina de *Spirulina platensis* foi purificada em sistema aquoso bifásico (SAB) polietilenoglicol (PEG)/fosfato de potássio pH 6 variando-se a massa molar do PEG entre 1500 e 8000 Da. Através de quatro planejamentos fatoriais completos foi possível determinar que o aumento no percentual de sal e a redução no de PEG ocasionaram um incremento no fator de purificação para todos SABs estudados. A otimização do processo de purificação foi estudada através de quatro planejamentos fatoriais completos tipo delineamento central composto rotacional (DCCR), onde modelos quadráticos foram preditos para as respostas fator de purificação e recuperação (%). SABs compostos por 7% de PEG 1500 ou 4% de 8000 e 23 e 22,5% de fosfato, atingiram fatores de purificação de 1,6 vezes para a ficocianina, com recuperação total e de 57%, respectivamente. SABs com 4% de PEG 4000 ou 4% de 6000 e 21% fosfato, alcançaram fatores de purificação de 2,1 e 2,2 vezes, recuperando-se 100% e 73,5% da ficocianina na fase de topo.

**Palavras – chave adicionais:** Pureza, fosfato de potássio, polietilenoglicol, recuperação, proteína.

## 1. INTRODUÇÃO

A cianobactéria *Spirulina* tem sido comercializada em diversos países devido a sua utilização em dietas saudáveis e para propósitos terapêuticos, devido a seus valiosos constituintes, particularmente proteínas e vitaminas (SARADA *et al.*, 1999). As cianobactérias e algas possuem uma vasta gama de compostos coloridos incluindo carotenóides, clorofila e ficobiliproteínas. As ficobiliproteínas são um grupo de proteínas intensamente coloridas e que podem ser subdivididas em três grupos de acordo com a sua coloração e propriedades de absorção: ficocianinas (azul), aloficocianinas (azul) e ficoeritrinas (vermelha) (REIS *et al.*, 1998; SARADA *et al.*, 1999; SONI *et al.*, 2006). Alguns autores, como Padyana *et al.* (2001) e Bermejo *et al.* (2006) acrescentam mais uma ficobiliproteína, a ficoeritrocianina (vermelha).

A ficocianina é o maior componente da família das ficobiliproteínas na *Spirulina platensis*, cerca de 20% em base seca da proteína celular, e é usada como um corante em alimentos (chicletes, produtos de consumo diários, gelatinas) e cosméticos como batons e delineadores no Japão, Tailândia e China (VONSHAK, 1997; SARADA *et al.*, 1999; SANTIAGO-SANTOS *et al.*, 2004; PATEL *et al.*, 2005). Recentemente têm sido observadas suas propriedades terapêuticas, como os efeitos antiinflamatório e hepatoprotetor além de sua capacidade antioxidante (BATH *et al.*, 2000; REDDY *et al.*, 2000; ROMAY *et al.*, 2000).

Ficocianina extraída, sobretudo de *Spirulina* tem sido alvo de inúmeros estudos de purificação a partir de técnicas como precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de permeação em gel, cromatografia de troca iônica (MINKOVA *et al.*, 2003; SILVA, 2005; SILVEIRA, 2005). Ficocianina com pureza de 0,7, medida através da relação de absorbância  $A_{620}/A_{280}$ , é considerada como de grau alimentar, 3,9 como de grau reativo e superior a 4 como analítico (PATIL *et al.*, 2006).

Os processos de purificação geralmente são longos e complexos (BERMEJO *et al.*, 2002). Por essas razões, o sistema aquoso bifásico (SAB), um sistema simples e econômico, se torna interessante. Este sistema tem sido utilizado com sucesso na purificação e extração de macromoléculas biológicas e é formado pela mistura de dois polímeros ou de um polímero e um sal acima de uma determinada concentração que assegura a formação das duas fases no equilíbrio (MARCOS *et al.*, 1999; ALBERTSSON, 1986).

O SAB é um processo de remoção de contaminantes e fornece um meio não-agressivo a materiais biológicos, por ser constituído cerca de 80% por água, apresentar

biocompatibilidade e ser de fácil ampliação de escala (ALBERTSSON, 1986; BENAVIDES & RITO-PALOMARES, 2004; SPELZINI *et al.*, 2005). A partição de uma enzima ou de uma proteína nesse tipo de sistema é influenciada por fatores incluindo a massa molar do polímero, a concentração do polímero ou do sal, o pH do sistema e a temperatura, o tamanho e a natureza hidrofílica ou hidrofóbica da biomolécula (GAUTAM & SIMON, 2006).

Os estudos de purificação por SAB, devido a sua complexidade, são em sua maioria empíricos e, desta forma, as melhores condições são geralmente obtidas pela variação sistemática de fatores tais como massa molar do polímero, concentração de sal e pH, o que o uso de planejamentos experimentais pode propor (MARCOS *et al.*, 2002).

O presente trabalho teve como objetivo estudar e otimizar a purificação de ficocianina extraída de *Spirulina platensis* através do sistema aquoso bifásico polietilenoglicol/fosfato de potássio, avaliando primeiramente o efeito do pH no processo e então a influência da massa molar do PEG, 1500, 4000, 6000 ou 8000 Da e dos percentuais do polímero e do sal no fator de purificação e na recuperação da proteína em cada um desses sistemas, utilizando a técnica de planejamento experimental e metodologia de superfície de resposta.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Cultivo de *Spirulina platensis*

*Spirulina platensis* foi cultivada na planta localizada na cidade de Santa Vitória do Palmar, RS, que compreende quatro fotobiorreatores abertos, externos, três deles com capacidade de 10 m<sup>3</sup> e o outro de 1 m<sup>3</sup>, em condições não controladas, contendo inicialmente meio Zarrouk 100%, com manutenção contínua feita com o mesmo meio diluído a 20% em água (ZARROUK, 1966). A concentração celular inicial foi de 0,30 g.L<sup>-1</sup> e o crescimento de *Spirulina platensis* foi monitorado de forma semi-contínua através de densidade ótica (OD) em 670 nm (COSTA *et al.*, 2002). A biomassa foi obtida por filtração de um dos tanques, prensada a 1 ton/cm<sup>2</sup>, extrusada e seca a 50°C por 6 h com circulação de ar para posterior congelamento a -18°C. A moagem foi realizada em moinho de bolas e o peneiramento de forma a ser coletado o passante da peneira com abertura 0,125 mm, retido na peneira com abertura 0,106 mm.

### 2.2. Extração de ficocianina

A extração de ficocianina foi realizada em SAB polietilenoglicol (PEG)/fosfato de potássio de acordo com a correlação 0,08 g de biomassa seca/mL de água como solvente

extrator estabelecida por Silveira (2007). Após a extração, a suspensão foi centrifugada a 6000 rpm, filtrada à vácuo e o sobrenadante coletado. A concentração e a pureza da ficocianina foram calculadas como descrevem as seções 2.8 e 2.9, respectivamente.

### **2.3. Massa molar do polietilenoglicol (PEG)**

Para o processo de purificação da ficocianina nos sistemas PEG/fosfato de potássio, selecionou-se as massas molares do polietilenoglicol, 1500, 4000, 6000 ou 8000 Da, com base no trabalho de Benavides & Rito-Palomares (2004).

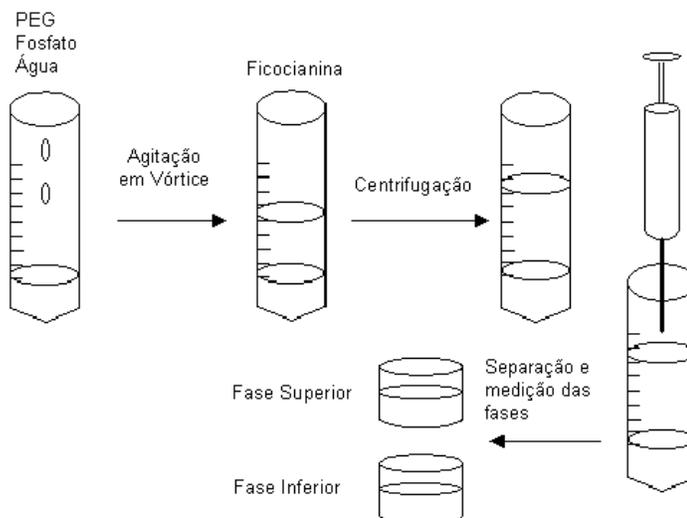
### **2.4. Construção dos diagramas de fases**

O diagrama de fases para o SAB composto por PEG 8000 e fosfato de potássio foi construído segundo metodologia descrita por Minami (1997), enquanto que para os SABs fosfato de potássio e PEG de massas molares 1500, 4000 ou 6000 e fosfato de potássio foram assumidas as curvas obtidas pelo mesmo autor, dispostas em anexo.

### **2.5. Montagem do sistema aquoso bifásico (SAB)**

O sistema foi montado em tubos graduados de centrífuga, onde foram adicionados o PEG, a solução salina 30% de fosfato de potássio, de pH de acordo com os valores a serem estudados e a água, em quantidades pré-definidas, de acordo com o diagrama de fases para cada massa molar do polímero. Os tubos foram homogeneizados por agitação em vórtice (Phoenix AP 56) até a dissolução do PEG e deixados em repouso até a formação das duas fases. O extrato bruto de ficocianina, de pH correspondente ao do sal foi então adicionado, sendo 20% da massa final do sistema. O sistema foi centrifugado por 20 min a uma velocidade de 3400 rpm em centrífuga (Presvac DCS 16 RV).

As fases de topo e de fundo foram então separadas e os volumes medidos. Uma alíquota de cada fase foi submetida às leituras espectrofotométricas em espectrofotômetro (Cary 100 Conc UV Visible Spectrophotometer e Quimis Q 108 D) a 280, 615, 620, 652 e 750 nm. A Figura 1 mostra o esquema da rotina de ensaios de purificação da ficocianina através de sistema aquoso bifásico.



**Figura 1** – Esquema da rotina de ensaios de purificação de ficocianina por sistema aquoso bifásico.

## 2.6. Estudo do pH para purificação de ficocianina em SAB

A purificação da ficocianina em SAB foi estudada nos valores de pH 5, 6 e 7 na composição central fixa de 21% de PEG e 10% de fosfato de potássio, possível a todas variações da massa molar do polímero, 1500, 4000, 6000 ou 8000 Da. Os ensaios foram realizados em duplicata.

## 2.7. Estudo da purificação por SAB utilizando a técnica de planejamento experimental

Os efeitos do percentual do polietilenoglicol e do fosfato de potássio sobre o fator de purificação e a recuperação da ficocianina foram avaliados através de quatro planejamentos fatoriais completos  $2^2$  ensaios com triplicata no ponto central, um planejamento para cada massa molar do PEG, 1500, 4000, 6000 ou 8000 Da.

A faixa de estudos para a otimização da purificação da ficocianina em SAB foi estabelecida a partir dos efeitos do percentual do PEG de diferentes massas molares, 1500, 4000, 6000 ou 8000 Da e do fosfato de potássio, no fator de purificação e na recuperação da proteína. Utilizaram-se quatro planejamentos fatoriais completos tipo delineamento composto central rotacional (DCCR)  $2^2$  ensaios com quatro pontos axiais e triplicata no ponto central. As Tabelas 1 e 2 apresentam os valores dos níveis codificados usados nos planejamentos fatoriais completos e nos planejamentos fatoriais completos tipo DCCR, respectivamente, para cada um dos SABs compostos por fosfato de potássio e diferente

massa molar do PEG. As análises foram realizadas em triplicata e foi utilizado o mesmo extrato bruto de ficocianina para todos os planejamentos.

**Tabela 1** – Valores dos níveis codificados usados nos planejamentos fatoriais completos.

Níveis Codificados	PEG 1500		PEG 4000		PEG 6000		PEG 8000	
	PEG (%)	SAL (%)	PEG (%)	SAL (%)	PEG (%)	SAL (%)	PEG (%)	SAL (%)
-1	5	18	5	15	6	14	7	22
0	10	21	10	20	10	18	10	24
+1	15	24	15	25	14	22	13	26

**Tabela 2** – Valores dos níveis codificados usados nos planejamentos fatoriais completos tipo DCCR.

Níveis Codificados	PEG 1500		PEG 4000		PEG 6000		PEG 8000	
	PEG (%)	SAL (%)	PEG (%)	SAL (%)	PEG (%)	SAL (%)	PEG (%)	SAL (%)
-1,41	2,8	20,2	2,4	20,2	2,8	18,6	2,8	21,9
-1	4	21	4	21	4	19	4	22,5
0	7	23	8	23	7	20	7	24
+1	10	25	12	25	10	21	10	25,5
+1,41	11,2	25,8	13,6	25,8	11,2	21,4	11,2	26,1

As respostas avaliadas fator de purificação e recuperação da ficocianina foram calculadas conforme as Seções 2.10 e 2.11.

## 2.8. Concentração de ficocianina

A concentração de ficocianina  $C_F$  ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) foi calculada por absorção espectrofotométrica em 652 nm e 615 nm através da Equação 1 (ABALDE *et al.*, 1998).

$$C_F = \frac{[A_{615} - 0,474 \times A_{652}]}{5,34} \quad (1)$$

Onde:

- $A_{615}$  é a absorbância da amostra a 615 nm;
- $A_{652}$  é a absorbância da amostra a 652 nm;

## 2.9. Pureza do extrato

A pureza do extrato PE foi determinada espectrofotometricamente através da Equação 2 (ABALDE *et al.*, 1998).

$$PE = \frac{A_{620}}{A_{280}} \quad (2)$$

Onde:

- $A_{620}$  é a absorbância da amostra a 620 nm;
- $A_{280}$  é a absorbância da amostra a 280 nm, devido à concentração total de proteínas na solução.

## 2.10. Fator de purificação

O fator de purificação FP obtido para a proteína foi calculado através da Equação 3.

$$FP = \frac{PE_{\text{purificado}}}{PE_{\text{bruto}}} \quad (3)$$

Onde:

- $PE_{\text{purificado}}$  é a pureza do extrato após o processo de purificação;
- $PE_{\text{bruto}}$  é a pureza do extrato bruto, anteriormente a ser submetido ao processo de purificação.

## 2.11. Recuperação de ficocianina

A recuperação da ficocianina RP (%) foi calculada pela Equação 4.

$$RP = \frac{[C_{F \text{ fase}} \times V_{\text{fase}}]}{[C_{F \text{ extrato inicial}} \times V_{\text{inicial}}]} * 100 \quad (4)$$

Onde:

- $C_{F \text{ fase}}$  é a concentração de ficocianina na fase considerada em  $\text{mg.mL}^{-1}$ ;
- $C_{F \text{ extrato inicial}}$  é a concentração de ficocianina no extrato inicial em  $\text{mg.mL}^{-1}$ ;
- $V_{\text{fase}}$  é o volume da fase considerada em mL;
- $V_{\text{inicial}}$  é o volume inicial do extrato adicionado em mL.

## 2.12. Coeficiente de partição da ficocianina

O coeficiente de partição  $K_{part}$  para a ficocianina foi calculado através da Equação 5 (KILIKIAN & PESSOA, 2003).

$$K_{part} = \frac{C_{F_{topo}}}{C_{F_{fundo}}} \quad (5)$$

Onde:

- $C_{F_{topo}}$  é a concentração de ficocianina na fase de topo, em  $\text{mg.mL}^{-1}$ , após o processo de purificação;
- $C_{F_{fundo}}$  é a concentração de ficocianina na fase de fundo, em  $\text{mg.mL}^{-1}$ , após o processo de purificação.

## 2.13. Razão de volumes do sistema

A razão de volume  $V_r$  do sistema foi determinada pela Equação 6 (KILIKIAN & PESSOA, 2003).

$$V_r = \frac{V_{topo}}{V_{fundo}} \quad (6)$$

Onde:

- $V_{topo}$  é o volume de ficocianina na fase de topo, em mL, após o processo de purificação;
- $V_{fundo}$  é o volume de ficocianina na fase de fundo, em mL, após o processo de purificação.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 3.1. Estudo do pH

Os estudos da purificação da ficocianina foram realizados considerando-se os valores de pH 6 e 7, valores estes onde a proteína se apresenta estável segundo estudo realizado por Silva (2005). Para o pH 5, onde a ficocianina também é estável, o sistema manteve-se monofásico, impossibilitando o estudo.

Na Tabela 3 estão expressos os valores de pH, o fator de purificação e a recuperação da ficocianina assim como a razão de volumes entre as fases obtidas e o coeficiente de partição da ficocianina para cada um dos sistemas compostos por sal e pelos PEG 1500, 4000, 6000 ou 8000.

A ficocianina concentrou-se na fase de topo dos sistemas para ambos valores de pH, significando que esta foi mais solúvel na fase rica em PEG, apresentando um comportamento hidrofóbico, como ressalta Patil *et al.* (2006), que atribuiu ainda à partição da ficocianina na fase de topo, sua carga negativa em adição ao volume livre disponível na fase de topo do sistema. Essa preferência pela fase de topo resultou em altos coeficientes de partição, em torno de 100 ou superiores, para todos os sistemas estudados.

Segundo Rito-Palomares *et al.* (2001), o ponto isoelétrico da ficocianina, valor de pH no qual há equilíbrio entre as cargas negativas e positivas dos grupamentos iônicos de uma proteína, foi definido como 5,8. Como nos SABs estudados trabalhou-se com pH 6, acima do valor de pI, a proteína tendeu a ficar carregada negativamente o que ocasionou a atração pela fase rica em polímero, de carga parcial positiva. Essa ligação intermolecular pode ser classificada como uma interação dipolo-dipolo (BRADY & HUMISTON, 1986), onde a molécula polar de carga parcial negativa, a ficocianina, liga-se à carga parcial positiva da outra, o polietilenoglicol.

**Tabela 3** – Comparativo entre o fator de purificação (FP), a recuperação (RP), a razão de volumes (Vr) e o coeficiente de partição ( $K_{part}$ ) obtidos para os sistemas compostos por 21% de polietilenoglicol 1500, 4000, 6000 ou 8000 Da e 10% de fosfato de potássio, valores de pH 6 e 7.

PEG (g/gmol)	pH	Fase	FP	RP (%)	Vr	$K_{part}$
1500	6	T	1,33±0,09	86,66±5,4	2,4	∞
		F	0	0		
	7	T	0,94±0,03	97,26±0,34	2,7	∞
		F	0,11±0,04	0,1±0,08		
4000	6	T	1,16±0,07	94,95±1,19	3,0	∞
		F	0,12±0,06	0		
	7	T	1,05±0,02	88,44±9,19	2,5	∞
		F	0,02±0,03	0		
6000	6	T	1,48±0,05	59,41±1,31	2,0	65,97
		F	0,09±0,02	0,45±0,02		
	7	T	0,92±0,05	86,09±4,63	2,2	∞
		F	0	0,43±0,46		
8000	6	T	1,26±0,03	93,59±5,89	2,7	>100
		F	0	0		
	7	T	0,95±0	98,09±2,18	2,1	∞
		F	0	0		

>100: valor superior a 100;

∞: valor tendendo ao infinito, concentração de ficocianina na fase de fundo inferior ao limite de detecção ( $10^{-5}$  mg.mL<sup>-1</sup>).

A purificação da ficocianina foi possível para os sistemas de pH 6, já que o fator de purificação foi superior a 1, sendo de 1,33, 1,16, 1,48 e 1,26 vezes para as massas molares do PEG consideradas, 1500, 4000, 6000 ou 8000, respectivamente.

Para o pH 7, não foram obtidos resultados favoráveis e, para os SABs de pH 6, constatou-se que quanto menor o valor da razão de volumes,  $V_r$ , maior o fator de purificação obtido para a ficocianina. A diminuição da fase de topo traz consigo, como conseqüência, um aumento na fase de fundo, havendo a possibilidade de uma maior parte das proteínas contaminantes migrarem para esse volume livre, contribuindo para o aumento do fator de purificação da proteína-alvo devido à alta afinidade da ficocianina pela fase de topo e permanência na mesma.

O menor valor do  $K_{part}$ , corresponde ao menor valor da  $V_r$ , pois no momento em que se reduz o volume da fase onde a ficocianina tem maior afinidade, fase de topo, cresce a possibilidade de migração de traços da proteína-alvo para a fase de fundo, o que também diminui conseqüentemente, sua recuperação na fase superior rica em PEG.

De acordo com estes resultados, optou-se por estudar o processo purificação de ficocianina por SAB a pH 6 e para os quatro massas molares do PEG, previamente selecionadas.

### **3.2. Planejamentos fatoriais completos ( $2^2$ ensaios + 3 pontos centrais)**

As Tabelas 4, 5, 6 e 7 apresentam as matrizes dos planejamentos para os sistemas PEG 1500, 4000, 6000 ou 8000 e fosfato de potássio, respectivamente, com os valores codificados e as respostas para o fator de purificação e a recuperação da proteína.

**Tabela 4** – Matriz do planejamento fatorial completo  $2^2$  para o sistema polietilenoglicol 1500/fosfato de potássio, valores codificados, com os resultados obtidos para fator de purificação (FP) e recuperação (RP) da ficocianina na fase de topo dos ensaios, razão de volumes (Vr) e coeficiente de partição ( $K_{part}$ ).

Ensaio	PEG (%)	Sal (%)	FP	RP (%)	Vr	$K_{part}$
1	-1	-1	1,0	78,2	1,4	3,03
2	+1	-1	1,0	97,1	1,6	> 100
3	-1	+1	1,6	77,9	0,4	> 100
4	+1	+1	1,0	90,5	1,1	> 100
5*	0	0	1,0	100	1,0	$\infty$
6*	0	0	1,0	100	1,1	$\infty$
7*	0	0	1,0	100	1,0	$\infty$

\*: ponto central;

>100: valor superior a 100;

$\infty$ : valor tendendo ao infinito, concentração de ficocianina na fase de fundo inferior ao limite de detecção ( $10^{-5}$  mg.mL<sup>-1</sup>).

**Tabela 5** – Matriz do planejamento fatorial completo  $2^2$  para o sistema polietilenoglicol 4000/fosfato de potássio, valores codificados, com os resultados obtidos para fator de purificação (FP) e recuperação (RP) da ficocianina na fase de topo dos ensaios, razão de volumes (Vr) e coeficiente de partição ( $K_{part}$ ).

Ensaio	PEG (%)	Sal (%)	FP	RP (%)	Vr	$K_{part}$
1	-1	-1	1,2	100	1,4	47,6
2	+1	-1	1,2	100	1,5	$\infty$
3	-1	+1	1,5	94,8	0,6	98,5
4	+1	+1	1,2	84,9	1,2	> 100
5*	0	0	1,4	78,2	0,7	> 100
6*	0	0	1,4	73,0	0,6	> 100
7*	0	0	1,4	71,0	0,6	> 100

\*: ponto central;

>100: valor superior a 100;

$\infty$ : valor tendendo ao infinito, concentração de ficocianina na fase de fundo inferior ao limite de detecção ( $10^{-5}$  mg.mL<sup>-1</sup>).

**Tabela 6** – Matriz do planejamento fatorial completo  $2^2$  para o sistema polietilenoglicol 6000/fosfato de potássio, valores codificados, com os resultados obtidos para fator de purificação (FP) e recuperação (RP) da ficocianina na fase de topo dos ensaios, razão de volumes (Vr) e coeficiente de partição ( $K_{part}$ ).

Ensaio	PEG (%)	Sal (%)	FP	RP (%)	Vr	$K_{part}$
1	-1	-1	1,4	60,3	0,6	> 100
2	+1	-1	1,5	84,2	1,4	$\infty$
3	-1	+1	1,7	69,7	0,5	$\infty$
4	+1	+1	1,3	85,4	0,7	$\infty$
5*	0	0	1,7	75,4	0,5	$\infty$
6*	0	0	1,7	78,0	0,6	$\infty$
7*	0	0	1,7	76,7	0,6	$\infty$

\*: ponto central;

>100: valor superior a 100;

$\infty$ : valor tendendo ao infinito, concentração de ficocianina na fase de fundo inferior ao limite de detecção ( $10^{-5}$  mg.mL<sup>-1</sup>).

**Tabela 7** – Matriz do planejamento fatorial completo  $2^2$  para o sistema polietilenoglicol 8000/fosfato de potássio, valores codificados, com os resultados obtidos para fator de purificação (FP) e recuperação (RP) da ficocianina na fase de topo dos ensaios, razão de volumes (Vr) e coeficiente de partição ( $K_{part}$ ).

Ensaio	PEG (%)	Sal (%)	FP	RP (%)	Vr	$K_{part}$
1	-1	-1	1,0	59,2	0,8	24,6
2	+1	-1	0,9	53,7	0,9	$\infty$
3	-1	+1	1,5	49,0	0,5	18,5
4	+1	+1	1,0	46,8	0,6	$\infty$
5*	0	0	1,3	62,2	0,7	> 100
6*	0	0	1,3	57,2	0,7	47,7
7*	0	0	1,3	55,9	0,7	> 100

\*: ponto central;

>100: valor superior a 100;

$\infty$ : valor tendendo ao infinito, concentração de ficocianina na fase de fundo inferior ao limite de detecção ( $10^{-5}$  mg.mL<sup>-1</sup>).

Para o sistema PEG 1500/fosfato de potássio, composto por 5% do polímero e 24% do sal, obteve-se um fator de purificação de 1,6 vezes, com 78% de recuperação da proteína, resultado este semelhante ao encontrado por Benavides & Rito-Palomares (2004) na purificação de ficoeritrina de *Porphyridium cruentum* em SAB PEG 1450/fosfato de

potássio composto por 17,6% de polímero e 10,9% de sal, obtendo um fator de purificação de 2,0 vezes.

Esse resultado foi obtido para a menor  $V_r$  entre os sistemas, 0,4, indicando a tendência de melhor purificação da proteína-alvo com baixo volume da fase de topo rica em PEG. O menor  $K_{part}$ , no ensaio 1, embora não correlacionado à baixa  $V_r$ , indicou a presença da proteína-alvo na fase inferior quando o sal e o PEG nos níveis inferiores, 18 e 5% respectivamente.

Os sistemas compostos por PEG 4000 mantiveram uma faixa de fator de purificação de 1,2 à 1,5 vezes e uma recuperação da ficocianina entre 70 e 100%, obtendo seu pico no ensaio 3, com 5% de polímero e 25 % de sal, respectivamente. Da mesma forma que para os SABs compostos pelo PEG 1500, os melhores fatores de purificação foram alcançados nos menores valores da  $V_r$ , em torno de 0,6.

Os SABs formados pelo PEG 6000 alcançaram fatores de purificação para a ficocianina na fase de topo entre 1,3 e 1,7 vezes, com recuperação de 60,3 e 85,4%, sendo os melhores resultados obtidos para as menores  $V_r$ , 0,5 e 0,6.

Para o PEG 8000, o sistema composto por 13% de PEG e 22% de sal não apresentou purificação da proteína e os demais mantiveram-no entre 1 e 1,3 vezes, com recuperações entre 45 e 63%, valores baixos em relação à faixa obtida nos outros SABs estudados.

Pode-se ressaltar ainda para os SABs compostos pelas massas molares do PEG, 1500, 4000 e 6000, há uma correlação entre o valor do  $K_{part}$  e o percentual de sal nos sistemas. Para os planejamentos estudados, os menores valores do  $K_{part}$  apresentam-se nos ensaios com o nível inferior de sal, ou seja, quando tem-se menor quantidade de fosfato de potássio no sistema, a ficocianina tende a migrar para a fase de fundo. A Tabela 8 mostra os efeitos das variáveis estudadas e suas interações, sobre o fator de purificação (FP) e a recuperação (RP) da ficocianina nos sistemas PEG/fosfato de potássio. Verificou-se que, com 95% de confiança, a mudança do nível -1 para o nível +1 do percentual de sal exerceu um efeito positivo sobre o fator de purificação da ficocianina nos quatro sistemas estudados, ou seja, o incremento do percentual de fosfato de potássio ocasionou um aumento no fator de purificação da proteína. Já a mudança do percentual de polímero do nível -1 para o nível +1 exerceu um efeito negativo para todos os SABs sobre o fator de purificação da ficocianina, de modo que o incremento no percentual de PEG ocasiona um decréscimo nessa resposta. A diminuição do percentual de PEG no sistema reduz o volume da fase de topo, onde a ficocianina apresenta afinidade, propiciando um aumento na sua concentração

e a possível exclusão de parte de seus contaminantes para a fase de fundo, ocasionando dessa forma um possível aumento na pureza e no fator de purificação da proteína. Diante desse fato, o aumento do percentual salino no SAB e a diminuição do percentual de PEG, podem ser relacionados igualmente a um ganho na pureza e no fator de purificação da ficocianina.

Para a recuperação da ficocianina, no sistema contendo PEG 6000, cujos efeitos dos percentuais de PEG e de sal e da interação de ambos foram estatisticamente significativos a 95% de confiança, o aumento do percentual de PEG do nível -1 para o nível +1, ocasionou um efeito positivo, contrário ao efeito detectado para o fator de purificação. Isto evidencia o fato de que quanto maior a pureza da proteína alvo que se deseja, menor a sua recuperação, pois há uma maior tendência de perdas junto aos contaminantes no momento em que se intensifica o processo de purificação.

Os aumentos do percentual de PEG e de fosfato de potássio do nível -1 para o nível +1 ainda exerceram um efeito positivo sobre a recuperação da ficocianina para os SABs compostos pelo PEG de massas molares 1500 e 6000 e negativo para 4000 e 8000.

**Tabela 8** – Efeitos principais das variáveis percentual de polímero, de sal e da interação entre ambas no fator de purificação e na recuperação da ficocianina nos sistemas aquosos bifásicos polietilenoglicol 1500, 4000, 6000 ou 8000/fosfato de potássio.

		1500	4000	6000	8000
Fator de Purificação	PEG	-0,6*	-0,2*	-0,2*	-0,3*
	SAL	0,6*	0,2*	0,1*	0,2*
	PEGxSAL	-0,6*	-0,2*	-0,3*	-0,2*
Recuperação	PEG	4,7	-5,0	19,8*	-3,9
	SAL	7,6	-10,1	5,3*	-8,5
	PEGxSAL	-14,2	-5,0	-4,1*	1,6

\*valor estatisticamente significativo a 95% de confiança ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.3. Planejamentos fatoriais completos tipo DCCR (2<sup>2</sup> ensaios + 4 pontos axiais + 3 pontos centrais)

A Tabela 9 apresenta a matriz do planejamento para o sistema PEG 1500/fosfato de potássio, com os valores codificados e as respostas experimentais e previstas pelos modelos fornecidos pelas Equações 7 e 8 para o fator de purificação e a recuperação da ficocianina, assim como a razão de volumes e o coeficiente de partição.

**Tabela 9** – Matriz do planejamento fatorial completo tipo DCCR (2<sup>2</sup> ensaios + 4 pontos axiais + 3 pontos centrais) para o sistema polietilenoglicol 1500/fosfato de potássio, valores codificados com os resultados obtidos, previstos e seus desvios relativos para fator de purificação (FP), recuperação (RP), razão de volumes (Vr) e coeficiente de partição ( $K_{part}$ ) da ficocianina na fase de topo dos ensaios.

Ensaio	PEG (%)	Sal (%)	FP	FP prev.	Desvio rel. (%)	RP (%)	RP prev. (%)	Desvio rel. (%)	Vr	$K_{part}$
1	-1	-1	1,3	1,2	6,8	95,2	91,5	3,9	0,6	> 100
2	+1	-1	1,1	1,2	-8,8	97,8	94,8	3,2	1,0	> 100
3	-1	+1	1,1	1,2	-7,9	100	99,5	0,5	0,6	> 100
4	+1	+1	1,1	1,2	-9,8	86,6	86,7	-0,2	0,7	> 100
5	-1,41	0	1,3	1,1	11,0	97,8	101,6	-3,8	0,5	$\infty$
6	+1,41	0	1,1	1,1	-2,7	91,9	94,9	-3,2	0,9	$\infty$
7	0	-1,41	1,3	1,3	0	86,0	88,1	-2,5	0,7	77,3
8	0	+1,41	1,5	1,3	8,9	86,7	88,1	-1,6	0,5	> 100
9*	0	0	1,5	1,6	-3,3	100	98,2	1,8	0,7	$\infty$
10*	0	0	1,6	1,6	4,3	100	98,2	1,8	0,6	> 100
11*	0	0	1,6	1,6	-0,6	97,8	98,2	-0,4	0,6	$\infty$

\*: ponto central;

>100: valor superior a 100;

$\infty$ : valor tendendo ao infinito, concentração de ficocianina na fase de fundo inferior ao limite de detecção ( $10^{-5}$  mg.mL<sup>-1</sup>).

Verificou-se que os ensaios com PEG 1500 que apresentaram maior fator de purificação, 1,6 e 1,5 vezes, oriundos de uma pureza de 0,8, com a melhor recuperação da proteína, corresponderam aos pontos centrais, compostos por 7% de PEG e 23% de fosfato de potássio. Os desvios relativos dos ensaios experimentais em relação ao modelos previstos para o fator de purificação, mantiveram-se até 11%, enquanto que para recuperação, os desvios foram até 3,9%, considerados baixos segundo Burkert (2003).

Valores de  $V_r$  em torno de 0,5 a 0,7 tenderam a fornecer os melhores fatores de purificação da ficocianina para os sistemas com PEG 1500, enquanto que coeficientes de partição,  $K_{part}$ , altos ou tendendo ao infinito indicam a afinidade da proteína pela fase de topo.

Para a verificação de uma correlação entre os percentuais de PEG e de sal no fator de purificação e na recuperação da ficocianina, foram avaliados modelos quadráticos. As Equações 7 e 8 apresentam os modelos codificados para as respostas fator de purificação e a recuperação da ficocianina, os quais foram validados pelas análises da variância apresentadas nas Tabelas 10 e 11.

Os coeficientes de correlação obtidos, 0,88 e 0,90, para o fator de purificação e para a recuperação da proteína e o teste F, 3,2 e 3,4 vezes maior que os valores tabelados, nessa ordem, validaram estatisticamente os modelos e permitiram a construção das superfícies de resposta e das curvas de contorno apresentadas na Figura 2.

$$\text{Fator de Purificação} = 1,57 - 0,22*[\text{PEG}]^2 - 0,12*[\text{SAL}]^2 \quad (7)$$

$$\text{Recuperação (\%)} = 98,23 - 2,38*[\text{PEG}] - 5,09*[\text{SAL}]^2 - 4,02*[\text{PEG}]*[\text{SAL}] \quad (8)$$

De acordo com os modelos obtidos, o fator de purificação da ficocianina pode ser predito em função dos percentuais de PEG 1500 e de fosfato de potássio que compõem o SAB, enquanto que a recuperação dessa proteína pode ser definida ainda pela interação entre ambas variáveis.

**Tabela 10** – Análise da variância para o fator de purificação da ficocianina em sistema polietilenoglicol 1500/fosfato de potássio.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	0,30	2	0,15	14,46
Resíduo	0,08	8	0,01	
Erro	0,08	8		
Total	0,38	10		

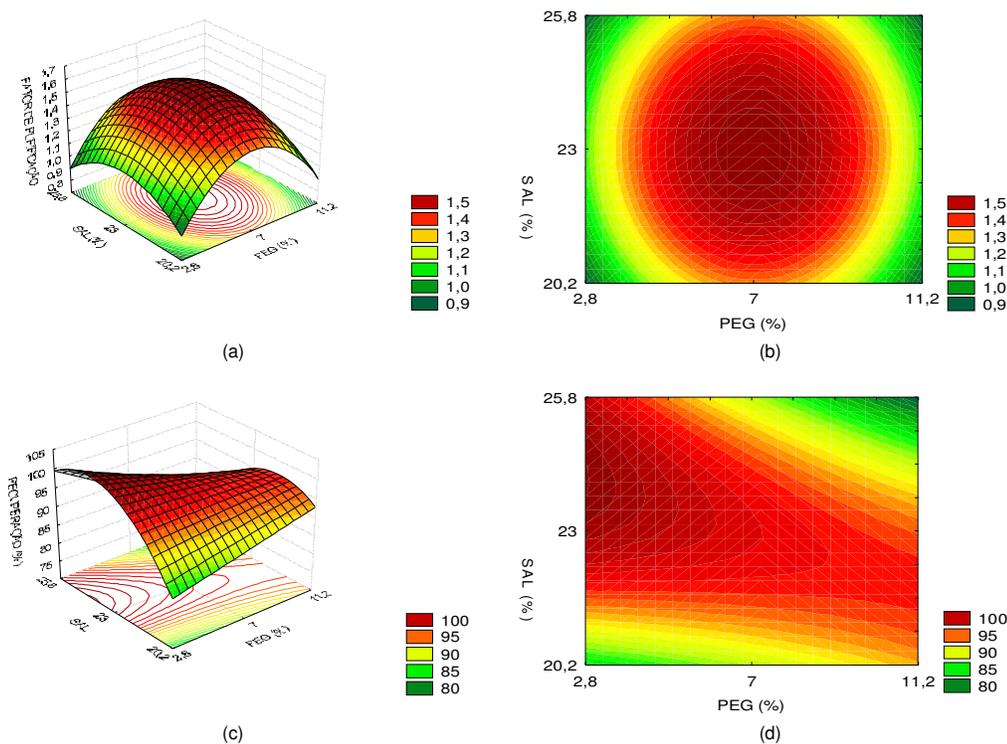
Coeficiente de correlação:  $R = 0,88$ ,  $F_{0,95;2;8} = 4,46$

**Tabela 11** – Análise da variância para a recuperação da ficocianina em sistema polietilenoglicol 1500/fosfato de potássio.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	268,51	3	89,50	10,56
Resíduo	59,33	7	8,48	
Erro	59,33	7		
Total	327,84	10		

Coefficiente de correlação:  $R = 0,90$ ,  $F_{0,90;3;7} = 3,07$

A Figura 2 aponta como a região ótima para a purificação de ficocianina em sistema PEG 1500/fosfato de potássio, a faixa percentual de PEG compreendida entre 4,6 e 9,3% e de sal entre 21 e 25%, atingindo um fator de purificação na ordem de 1,5 vezes. Nesta região, a recuperação da ficocianina ficou em torno de 95 a 100%.



**Figura 2** – Superfícies de resposta e curvas de contorno para o fator de purificação (a) e (b) e a recuperação da ficocianina (c) e (d) para os sistemas polietilenoglicol 1500/fosfato de potássio.

Os resultados para o fator de purificação e para a recuperação da ficocianina em sistema PEG 4000/fosfato de potássio estão expressos na Tabela 12, assim como a matriz do planejamento para o sistema, com os valores codificados e as respostas experimentais e

previstas pelo modelo fornecido pela Equação 9, a razão de volumes e o coeficiente de partição.

**Tabela 12** – Matriz do planejamento fatorial completo tipo DCCR ( $2^2$  ensaios + 4 pontos axiais + 3 pontos centrais) para o sistema polietilenoglicol 4000/fosfato de potássio, valores codificados com os resultados obtidos, previstos e seus desvios relativos para fator de purificação (FP), recuperação (RP), razão de volumes (Vr) e coeficiente de partição ( $K_{part}$ ) da ficocianina na fase de topo dos ensaios.

Ensaio	PEG (%)	Sal (%)	FP	RP (%)	RP	Desvio	Vr	$K_{part}$
					prev. (%)	rel. (%)		
1	-1	-1	2,1	100	90,5	9,5	0,5	> 100
2	+1	-1	1,1	77,8	77,6	0,2	1,0	49,3
3	-1	+1	1,3	100	90,5	9,5	0,6	> 100
4	+1	+1	1,1	79,1	77,6	1,8	0,7	$\infty$
5	-1,41	0	1,2	90	101,3	-12,6	0,5	> 100
6	+1,41	0	1,0	84,1	83,2	1,2	0,9	$\infty$
7	0	-1,41	1,0	82,3	75,8	7,9	0,7	> 100
8	0	+1,41	1,3	67,1	75,8	-12,9	0,5	> 100
9*	0	0	1,0	70,7	75,8	-7,3	0,7	> 100
10*	0	0	1,0	77,7	75,8	2,4	0,6	$\infty$
11*	0	0	1,1	71,0	75,8	-6,7	0,6	> 100

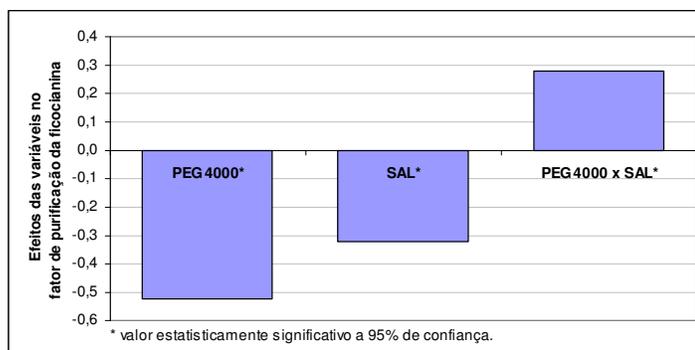
\*: ponto central;

>100: valor superior a 100;

$\infty$ : valor tendendo ao infinito, concentração de ficocianina na fase de fundo inferior ao limite de detecção ( $10^{-5}$  mg.mL<sup>-1</sup>).

Para o sistema PEG 4000/fosfato de potássio, o melhor fator de purificação foi alcançado com 4% de PEG e 21% de sal, atingindo 2,1 vezes, a partir de uma pureza de 1,1, com Vr de 0,5 e recuperação total da proteína alvo. Ambos ensaios que apresentaram maior fator de purificação são compostos pelo menor percentual de PEG. Os desvios relativos entre as recuperações experimental e prevista pelo modelo permaneceram até 13% e os coeficientes de partição,  $K_{part}$ , com exceção do ensaio 2, mantiveram-se altos ou tendendo ao infinito, garantindo a manutenção da proteína na fase de topo.

A análise estatística dos resultados do fator de purificação da ficocianina permitiu somente a obtenção dos efeitos do percentual de PEG e de fosfato de potássio sobre esta resposta, uma vez que não foi possível se obter um modelo estatisticamente significativo. Os efeitos foram expressos em forma de gráfico na Figura 3.



**Figura 3** – Efeitos principais e de interação das variáveis percentual de PEG 4000 e de sal no fator de purificação da ficocianina.

Observou-se que, com 95% de confiança, o percentual de PEG 4000 apresentou um efeito negativo sobre o fator de purificação da ficocianina, assim como o percentual de sal. Para ambas variáveis, a mudança do nível -1 para o nível +1, ocasionou uma queda no fator de purificação da ficocianina. Contudo, a interação entre as duas variáveis influenciou positivamente a resposta.

A Tabela 13 apresenta a análise de variância para a recuperação da ficocianina, que validou o modelo codificado apresentado na Equação 9, de acordo com o coeficiente de correlação obtido, 0,78, e com o teste F, cujo F calculado foi 2 vezes superior ao valor tabelado. Esse modelo possibilitou a construção da superfície de resposta e da respectiva curva de contorno para a recuperação da ficocianina, como mostra a Figura 4.

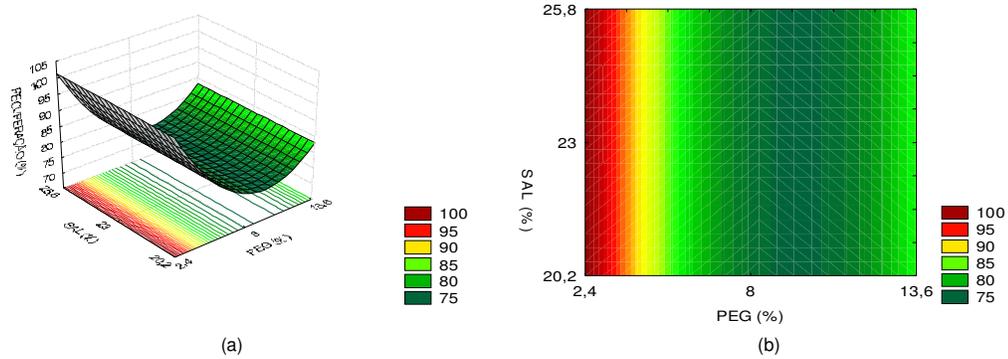
$$\text{Recuperação (\%)} = 75,81 - 6,43*[\text{PEG}] + 8,26*[\text{PEG}]^2 \quad (9)$$

De acordo com o modelo obtido, a recuperação da ficocianina pode ser predita por um modelo quadrático através apenas do percentual de polímero envolvido no sistema PEG 4000/fosfato de potássio, sem que o percentual do sal influencie na resposta.

**Tabela 13** – Análise da variância para a recuperação da ficocianina em sistema polietilenoglicol 4000/fosfato de potássio.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	747,35	2	373,68	6,20
Resíduo	482,46	8	60,31	
Erro	482,46	8		
Total	1229,81	10		

Coefficiente de correlação:  $R = 0,78$ ,  $F_{0,90;2;8} = 3,11$



**Figura 4** – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a recuperação da ficocianina nos sistemas polietilenoglicol 4000/fosfato de potássio.

A análise da Figura 4 mostra que para toda a faixa percentual estudada de fosfato de potássio e mantendo-se o percentual de PEG, a recuperação da ficocianina não se alterou, ou seja, a variável percentual de fosfato de potássio não influenciou na resposta, como previa o modelo estatístico.

A matriz do planejamento experimental realizado para o sistema PEG 6000/fosfato de potássio, com os níveis codificados, bem como as respostas experimentais e previstas pelo modelo fornecido pela Equação 10, obtidas para o fator de purificação e também a recuperação da ficocianina, a razão de volumes e o coeficiente de partição, estão dispostas na Tabela 14.

**Tabela 14** – Matriz do planejamento fatorial completo tipo DCCR ( $2^2$  ensaios + 4 pontos axiais + 3 pontos centrais) para o sistema polietilenoglicol 6000/fosfato de potássio, valores codificados com os resultados obtidos e previstos para fator de purificação (FP), recuperação (RP), razão de volumes (Vr) e coeficiente de partição ( $K_{part}$ ) da ficocianina na fase de topo dos ensaios.

Ensaio	PEG (%)	Sal (%)	FP	FP prev.	Desvio		Vr	$K_{part}$
					Rel. (%)	RP (%)		
1	-1	-1	1,2	1,1	8,9	82,8	0,6	73,6
2	+1	-1	1,2	1,2	-3,3	73,0	0,8	> 100
3	-1	+1	2,2	1,9	12,0	73,5	0,7	27,9
4	+1	+1	1,1	1,0	11,2	51,2	0,4	> 100
5	-1,41	0	1,4	1,6	-14,2	94,8	0,6	32,2
6	+1,41	0	1,0	1,0	1,9	93,4	1,0	$\infty$
7	0	-1,41	1,2	1,1	5,0	79,5	0,7	> 100
8	0	+1,41	1,3	1,5	-13,8	68,5	0,6	> 100
9*	0	0	1,2	1,3	-5,6	88,5	0,7	> 100
10*	0	0	1,3	1,3	1,5	80,2	0,7	> 100
11*	0	0	1,2	1,3	-7,4	90,0	0,7	> 100

\*: ponto central;

>100: valor superior a 100;

$\infty$ : valor tendendo ao infinito, concentração de ficocianina na fase de fundo inferior ao limite de detecção ( $10^{-5}$  mg.mL<sup>-1</sup>).

O ensaio 3, composto por 4% de polímero e 21% de sal, para o sistema PEG 6000/fosfato de potássio, forneceu o melhor fator de purificação para a ficocianina, 2,2 vezes, oriundo de uma pureza de 1,2, com um desvio relativo ao valor previsto de 12% e 73,5% de recuperação. A utilização do método de precipitação com sulfato de amônio para a purificação de ficocianina de *Spirulina platensis*, proposto por Silva (2005), alcançou um fator de purificação de 1,7 vezes, mostrando assim que o SAB PEG 6000 foi mais eficiente que esta técnica. Dessa forma verificou-se mais uma vez que o processo de purificação foi melhor em sistemas com percentual baixo de polietilenoglicol e alto de fosfato de potássio. Nos ensaios 3 e 5, houve uma forte tendência de migração da ficocianina para a fase de fundo, fato este mostrado pelos baixos valores do coeficiente de partição da proteína,  $K_{part}$ , comparados aos demais ensaios.

A Equação 10 apresenta o modelo codificado para o fator de purificação da ficocianina, o qual foi validado pela análise da variância apresentada na Tabelas 15, com um coeficiente de correlação 0,83, assim como pelo teste F, cujo F calculado foi 1,9 vezes

superior ao F tabelado. Na Figura 5 estão a superfície de resposta e a respectiva curva de contorno para o fator de purificação da ficocianina em SAB PEG 6000/fosfato de potássio.

$$\text{Fator de Purificação} = 1,31 - 0,21*[\text{PEG}] - 0,27*[\text{PEG}]*[\text{SAL}] \quad (10)$$

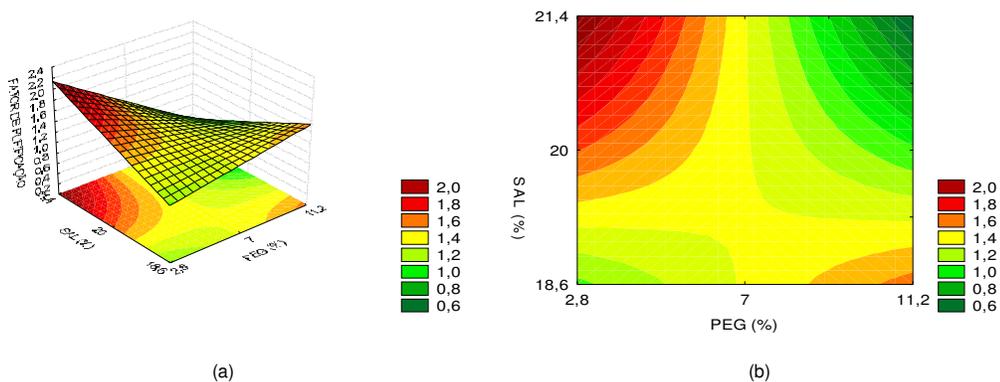
Pela Equação 10, o percentual do polímero e a interação entre este e o percentual de sal prediz o modelo para o fator da purificação da ficocianina em SAB PEG 6000/fosfato de potássio.

**Tabela 15** – Análise da variância para o fator de purificação da ficocianina em sistema polietilenoglicol 6000/fosfato de potássio.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	0,63	2	0,32	8,69
Resíduo	0,29	8	0,04	
Erro	0,29	8		
Total	0,93	10		

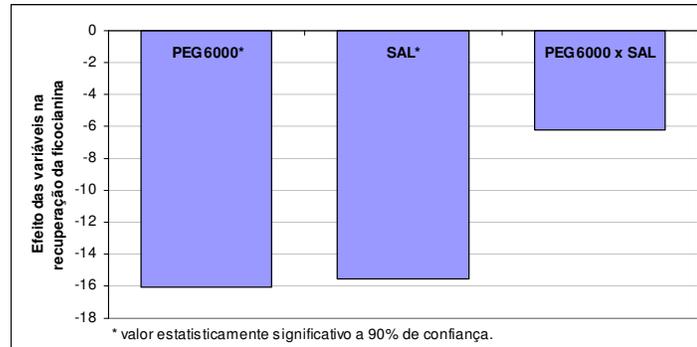
Coefficiente de correlação:  $R = 0,83$ ,  $F_{0,95;2;8} = 4,46$

A análise da Figura 5 permitiu definir que ao trabalhar-se com baixos percentuais de PEG 6000, entre 2,8 e 4,9%, e sal na ordem de 20,3 a 21,4%, o fator de purificação da ficocianina alcança em torno de 2 vezes.



**Figura 5** – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o fator de purificação da ficocianina para os sistemas polietilenoglicol 6000/fosfato de potássio.

A análise estatística dos resultados da recuperação da ficocianina permitiu somente a obtenção dos efeitos do percentual do polímero, PEG 6000, e do sal, expressos na Figura 6, sobre esta resposta, uma vez que não foi possível se obter um modelo estatisticamente significativo.



**Figura 6** – Efeitos principais e de interação das variáveis percentual de PEG 6000 e de sal na recuperação da ficocianina.

Com 90% de confiança, pode-se observar que os percentuais de PEG 6000 e de sal, assim como a interação entre ambos, influenciaram negativamente a recuperação da ficocianina, isto é, a passagem do nível -1 para o +1 de cada uma das variáveis de entrada, ocasionou um decréscimo na recuperação da ficocianina no SAB PEG 6000/fosfato de potássio.

A matriz do planejamento experimental realizado para o sistema PEG 8000/fosfato de potássio, com os níveis codificados e reais, bem como as respostas experimentais e previstas pelo modelo fornecido pela Equação 11, obtidas para o fator de purificação e também a recuperação da ficocianina, a razão de volumes e o coeficiente de partição, estão dispostos na Tabela 16.

**Tabela 16** – Matriz do planejamento fatorial completo tipo DCCR ( $2^2$  ensaios + 4 pontos axiais + 3 pontos centrais) para o sistema polietilenoglicol 8000/fosfato de potássio, valores codificados com os resultados obtidos e previstos para fator de purificação (FP), recuperação (RP), razão de volumes (Vr) e coeficiente de partição ( $K_{part}$ ) da ficocianina na fase de topo dos ensaios.

Ensaio	PEG (%)	Sal (%)	FP	FP prev.	Desvio		Vr	$K_{part}$
					Rel. (%)	RP (%)		
1	-1	-1	1,6	1,4	15,9	57,1	0,4	9,1
2	+1	-1	1,0	1,0	-1,9	74,5	0,8	> 100
3	-1	+1	1,4	1,4	0	86,8	0,7	> 100
4	+1	+1	1,1	1,0	3,7	75,9	0,7	> 100
5	-1,41	0	1,3	1,4	-9,9	83,8	0,6	78,6
6	+1,41	0	1,0	1,0	5,8	76,2	0,7	$\infty$
7	0	-1,41	1,1	1,2	-6,1	71,0	0,6	> 100
8	0	+1,41	1,1	1,2	-8,0	72,1	0,5	> 100
9*	0	0	1,2	1,2	0	78,6	0,7	> 100
10*	0	0	1,2	1,2	-0,8	73,1	0,6	> 100
11*	0	0	1,2	1,2	-0,8	67,5	0,6	> 100

\*: ponto central;

>100: valor superior a 100;

$\infty$ : valor tendendo ao infinito, concentração de ficocianina na fase de fundo inferior ao limite de detecção ( $10^{-5}$  mg.mL<sup>-1</sup>).

De acordo com os resultados obtidos para os sistemas PEG 8000/fosfato de potássio, o melhor fator de purificação para a ficocianina foi de 1,6 vezes, a partir de uma pureza de 0,8, com desvio relativo ao modelo de cerca de 16%, no ensaio 1, composto por 4% do polímero e 22,5% de sal, com a menor Vr obtida entre os ensaios e o menor percentual do polímero trabalhado. Nesse ensaio, obteve-se um valor de  $K_{part}$  muito baixo, 9,1, embora superior a 1, indica a migração da ficocianina para a fase de topo do sistema. A baixa recuperação da proteína-alvo na fase superior, cerca de 57%, em relação aos demais sistemas estudados pode ser justificada pelo fato de que parte da ficocianina possa ter passado para a fase inferior, com a diminuição da razão de volumes.

A Equação 11 apresenta o modelo codificado para o fator de purificação da ficocianina, com um fator de correlação de 0,83, validado pela análise da variância apresentada na Tabela 17, através do teste F, cujo F calculado foi 3,4 vezes superior ao tabelado e que permitiu a construção da superfície de resposta e da curva de contorno apresentadas na Figura 7.

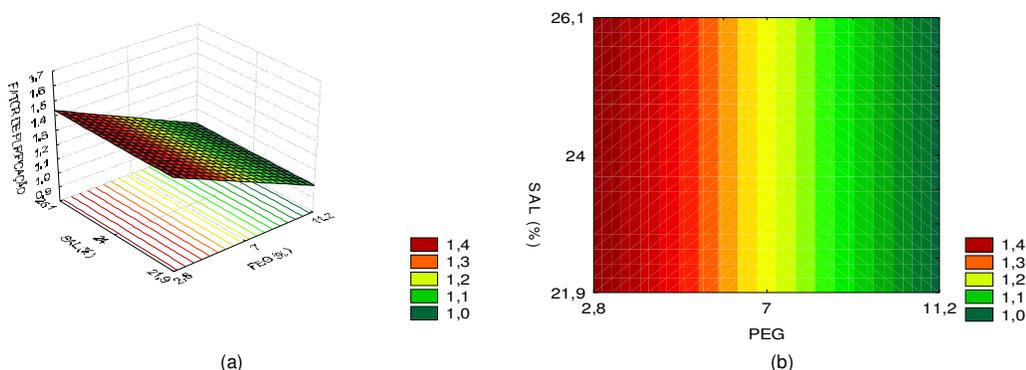
$$\text{Fator de Purificação} = 1,21 - 0,16*[\text{PEG}] \quad (11)$$

Como mostra a Equação 11, o modelo para o fator de purificação pode ser previsto apenas pelo percentual de PEG envolvido no sistema PEG 8000/fosfato de potássio, o que indica que esta resposta tende a independe do percentual de sal presente no SAB.

**Tabela 17** – Análise da variância para o fator de purificação da ficocianina em sistema polietilenoglicol 8000/fosfato de potássio.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	0,20	1	0,20	17,66
Resíduo	0,10	9	0,01	
Erro	0,10	9		
Total	0,30	10		

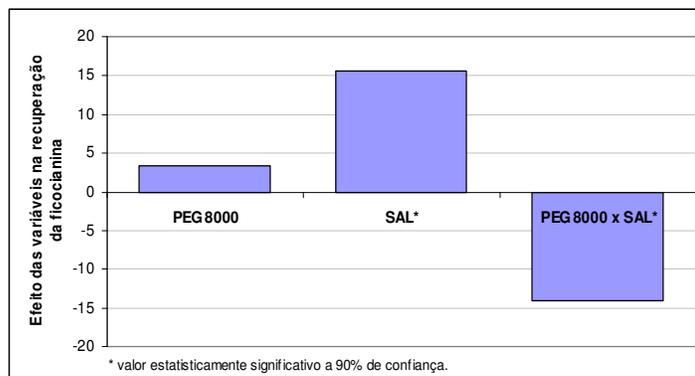
Coefficiente de correlação:  $R = 0,81$  ,  $F_{0,95;1;9} = 5,12$



**Figura 7** – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para fator de purificação da ficocianina para os sistemas polietilenoglicol 8000/fosfato de potássio.

A análise da Figura 7 permite dizer que fixando-se o percentual de PEG para toda a faixa percentual de fosfato de potássio estudada, de 21,9 a 26,1%, o fator de purificação da ficocianina não se alterou, ou seja, a variável percentual de fosfato de potássio não influenciou na resposta considerada, como já previa o modelo estatístico.

Para a recuperação de ficocianina as análises estatísticas permitiram a obtenção dos efeitos do percentual do polímero, PEG 8000 e do sal sobre esta resposta, já que não foi possível se obter um modelo estatisticamente significativo e a Figura 8 mostra os efeitos das variáveis de entrada na resposta considerada.



**Figura 8** – Efeitos principais e de interação das variáveis percentual de PEG 8000 e de sal na recuperação da ficocianina.

Com 90% de confiança, pode-se observar que o percentual de PEG 8000 e de sal, influenciaram positivamente a recuperação da ficocianina, ou seja, a passagem do nível -1 para o nível +1 de ambas variáveis de entrada, ocasionaram um incremento na recuperação da ficocianina. Contudo, a interação entre ambos, exerceu um efeito negativo sob a resposta recuperação.

#### 4. CONCLUSÕES

O sistema aquoso bifásico (SAB) polietilenoglicol/fosfato de potássio mostrou ser um método promissor de purificação aplicável à ficocianina extraída de *Spirulina platensis*, já que para as quatro massas molares de PEG estudadas, 1500, 4000, 6000 ou 8000 Da, foi possível atingir uma faixa de pureza de 0,8 a 1,2, o que a torna apta ao uso na indústria alimentícia.

Os SABs formados pelo PEG de massas molares 4000 e 6000 e fosfato de potássio, compostos ambos por 4% de polímero e 21% de sal, alcançaram os melhores fatores de purificação, 2,1 e 2,2 vezes, recuperando-se 100 e 73,5% da ficocianina na fase de topo, respectivamente.

Sistemas de pH 6 tenderam a uma melhor purificação da proteína-alvo, que se concentrou na fase superior, rica em PEG.

O processo de purificação da ficocianina utilizando SAB foi influenciado pelo percentual de polietilenoglicol e de fosfato de potássio, sendo que a passagem do nível inferior (-1) para o nível superior (+1) do primeiro promoveu uma redução no fator de purificação da ficocianina enquanto que do segundo ocasionou um incremento da mesma. Já a recuperação da ficocianina foi influenciada positivamente pelos percentuais de

polietilenoglicol e de fosfato de potássio nos SABs compostos pelos PEG de massa molar 1500 e 6000 Da e negativamente nos SABs com PEG 4000 e 8000 Da, na mudança do nível -1 para o +1.

Os SABs compostos pelo PEG de massas molares 6000 e 8000, permitiram que se estabelecessem modelos para o fator de purificação da ficocianina, assim como o formado pelo PEG 4000, para a recuperação da mesma proteína na fase de topo. O sistema com PEG 1500 permitiu modelos para ambas variáveis e as correlações para os quatro tipos de sistemas variaram de 0,78 a 0,90.

Para os SABs compostos por PEG 1500 e 8000 Da e fosfato de potássio, compostos respectivamente por 7 e 23% e 4 e 22,5%, atingiram fatores de purificação máximos de 1,6 vezes para a ficocianina. Contudo, o sistema composto pelo polímero de menor massa molar proporcionou uma recuperação total da proteína na fase de topo enquanto que o de maior massa molar permitiu uma apenas uma recuperação de 57%.

Os SABs formados pelo PEG de massas molares 4000 e 6000 e fosfato de potássio, compostos ambos por 4% de polímero e 21% de sal, alcançaram os melhores fatores de purificação, 2,1 e 2,2 vezes, recuperando-se 100 e 73,5% da ficocianina na fase de topo, respectivamente.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ALBERTSON, P. A. Partitioning of cell particles and macromolecules. New York: John Wiley & Sons, 1986.

BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. C-Phycocyanin: A potente peroxy scavenger *in vivo* and *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research*, v. 275, p. 20-25, 2000.

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

BERMEJO, R.; ALVAREZ-PEZ, J. M.; ACIÉN FERNAÁNDEZ, F. G.; MOLINA GRIMA, E. Recovery of pure B – phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology*, v. 93, p. 73 – 85, 2002.

BERMEJO, R.; RUIZ, E.; ACIÉN, F. G. Recovery of B – phycoerythrin using expanded bed adsorption chromatography. *Enzyme and Microbial Technology*, on-line, 2006.

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

BURKERT, J. M. Otimização das condições de produção da lipase por *Geotrichum candidum* NRRL – Y552. 2003. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos – Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, São Paulo.

COSTA, J. A. V.; COZZA, K. L.; OLIVEIRA, L.; MAGAGNIN, G. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 17, p. 439-442, 2002.

GAUTAM, S.; SIMON, L. Partitioning of  $\alpha$ -glucosidase from *Trichoderma reesei* in poly(ethylene glycol) and potassium phosphate aqueous two-phase systems: Influence of pH and temperature. *Biochemical Engineering Journal*, v. 30, p. 104 -108, 2006.

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

MARCOS, J. C.; FONSECA L. P.; RAMALHO, M. T.; CABRAL, J. M. S. Partial purification of penicillin acylase from *Escherichia coli* in poly(ethylene glycol)-sodium citrate aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, v. 734, p. 15-22, 1999.

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.

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

MINKOVA, K. M.; TCHERNOV, A. A.; TCHORBADJIEVA, M. I.; FOURNADJIEVA, S. T.; ANTOVA, R. E.; BUSHEVA, M. C. Purification of C-phycoerythrin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. *Journal of Biotechnology*, v. 116, p. 55-59, 2003.

PADYANA, A. K.; BATH, V. B.; MADYASTHA, K.M.; RAJASHANKAR, K. R. Crystal structure of a light-harvesting protein C-phycoerythrin from *Spirulina platensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 282, p. 893-898, 2001.

PATEL, A.; MISHRA, S.; PAWAR, R.; GHOSH, P. K. Purification and characterization of C-phycoyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expression & Purification*, v. 40, p. 248-255, 2005.

PATIL, G.; CHETHANA, S.; SRIDEVI, A. S.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Method to obtain C-phycoyanin of high purity. *Journal of Chromatography A*, on-line, 2006. <http://www.sciencedirect.com> [accessado em 20 setembro 2006].

REDDY, C. M.; BHAT, V. B.; KIRANMAI, G.; REDDY, M. N. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by c-phycoyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. *Biochemical and Biophysical Research*, v. 277, p. 599-603, 2000.

REIS, A.; MENDES, A.; LOBO-FERNANDES, H.; EMPIS, J. A.; MAGGIOLY NOVAIS, J. Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp. *Bioresource Technology*, v. 66, p. 181-187, 1998.

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

ROMAY, C.; ASPEE, A.; PIZARRO, M.; LISSI, E. A. Kinetics of phycocyanine bilin groups destruction by peroxy radicals. *Free Radical Biology & Medicine*. v. 28, p. 1051-1055, 2000.

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

SARADA, R.; PILLAI, M. G.; RAVISHANKAR, G. A. Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry*, India, v. 34, p. 795-801, 1999.

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

SILVEIRA, S. T.; BURKERT, J. F. M.; COSTA, J. A. V.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of phycocyanin 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 phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata* – isolated from the rocky shores of Bet Dwarka, Gurajat, India. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 2017-2023, 2006.

SPELZINI, D.; FARRUGGIA, B.; PICÓ, G. Features of the acid protease partition in aqueous-two phase systems of polyethylene glycol-phosphate: Chymosin and pepsin. *Journal of Chromatography B*, v. 821, p. 60-66, 2005

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

ZARROUK, C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima*. *Ph. D Thesis*, Paris, 1966.

**INFLUÊNCIA DA MASSA MOLAR DO POLIETILENOGLICOL NA  
EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO INTEGRADAS DA FICOCIANINA DE  
*Spirulina platensis* POR SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO**

**INFLUÊNCIA DA MASSA MOLAR DO POLIETILENOGLICOL NA EXTRAÇÃO E  
PURIFICAÇÃO INTEGRADAS DE FICOCIANINA DE *Spirulina platensis* POR SISTEMA  
AQUOSO BIFÁSICO**

Laboratório de Microbiologia, Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do  
Rio Grande (FURG), CP 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil, Telefone: (53)  
32338754, E-mail: dqmsjk@furg.br

**RESUMO**

Extrato aquoso de ficocianina de *Spirulina platensis*, com e sem células, foi purificado em sistema aquoso bifásico (SAB) polietilenoglicol (PEG)/fosfato de potássio pH 6 variando-se a massa molar do PEG entre 1500 e 8000 Da. Através de cinco ensaios, cada qual com percentuais de PEG e de sal distintos, comparou-se a concentração ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), a pureza ( $\text{Abs}_{620}/\text{Abs}_{280}$ ) e o coeficiente de partição da ficocianina assim como a razão de volumes entre as fases dos sistemas. Os sistemas integrados, contendo células, compostos por 15% de PEG 1500 e 13% de fosfato de potássio e 5% de PEG 4000 e 18% de sal, alcançaram, nessa ordem, concentrações de ficocianina na fase de topo de 2,67 e 1,60  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e purezas de 0,73 e 0,79 respectivamente, valores estes superiores aos obtidos nos sistemas sem células e, que classificam esta ficobiliproteína como de grau alimentar, superior a 0,7.

**Palavras – chave adicionais:** Pureza, concentração, razão de volumes, fosfato de potássio, polietilenoglicol.

## 1. INTRODUÇÃO

A cianobactéria *Spirulina platensis* tem sido amplamente estudada devido a sua riqueza em nutrientes, como proteínas, vitaminas, minerais, carboidratos e ácido  $\gamma$ -linolênico e, tem recebido mais atenção, não apenas no aspecto alimentar mas também no desenvolvimento de fármacos potentes (QUOC & PASCAUD, 1996).

Dentre as proteínas presentes na *Spirulina platensis* estão as ficobiliproteínas, compostos hidrosolúveis coloridos e que podem ser divididas em quatro classes de acordo com suas propriedades de absorção: ficoeritrinas (vermelha), ficoeritrocianinas (vermelha), aloficocianinas (azul) e ficocianinas (azul) (ABALDE *et al.*, 1998).

A ficocianina é o mais importante pigmento azul na indústria alimentícia e tem sido utilizada em chicletes, produtos lácteos e gelatinas. No entanto, pequenas quantidades são utilizadas como marcador bioquímico em imunoenaios devido as suas propriedades de fluorescência. Além do seu valor nutricional, possui propriedades medicinais como antioxidante e atividade hepatoprotetora (VONSHAK, 1997; BHAT *et al.*, 2000; ROMAY *et al.*, 2000; SANTIAGO-SANTOS *et al.*, 2004).

Contudo, a produção de proteínas celulares, como a ficocianina, apresenta um conjunto de problemas práticos para os processos de downstream. Processos para separação geralmente envolvem a liberação de cada produto por rompimento mecânico ou químico, seguido da remoção de contaminantes por centrifugação e filtração em membrana. A eliminação quantitativa dos resíduos celulares em cada operação unitária pode dificultar a realização do processo em larga escala além de que a complexa natureza dos produtos e contaminantes presentes no interior da célula podem exercer um impacto negativo no processo de recuperação (BIERAU *et al.*, 1999).

Para tanto, um processo integrado onde duas operações unitárias são combinadas em uma, oferece um benefício potencial considerável para a recuperação de produtos intracelulares de proteínas. (RITO-PALOMARES & LYDDIATT, 2002)

O sistema aquoso bifásico (SAB) é um método de bioseparação eficiente, econômico e de fácil ampliação de escala, que pode alcançar altos rendimentos além de proporcionar a purificação da proteína-alvo, mantendo a atividade biológica das moléculas.

Esse tipo de sistema é formado pela mistura de dois polímeros ou de um polímero e um sal acima de uma determinada concentração que assegura a formação das duas fases no equilíbrio. Embora simples, muitos fatores influenciam a partição e a purificação das proteínas, como a massa molar do polímero, a concentração do polímero ou do sal, o pH do sistema e a temperatura, o tamanho e a natureza hidrofílica ou hidrofóbica da biomolécula (KULA *et al.*, 1982; DIAMOND & HSU, 1992; MARCOS *et al.*, 1998; MARCOS *et al.*, 1999; ALBERTSSON, 1986; GAUTAM & SIMON, 2006; PATIL *et al.*, 2006).

Este trabalho teve como objetivos estudar o processo conjugado de extração e purificação de ficocianina de *Spirulina platensis* em SAB polietilenoglicol/fosfato de potássio, analisando a influência da massa molar do polímero, na obtenção de ficocianina pura.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Cultivo de *Spirulina platensis***

*Spirulina platensis* foi cultivada na planta localizada na cidade de Santa Vitória do Palmar, RS, que compreende quatro fotobiorreatores abertos, externos, três deles com capacidade de 10 m<sup>3</sup> e o outro de 1 m<sup>3</sup>, em condições não controladas, contendo inicialmente meio Zarrouk 100%, com manutenção contínua feita com o mesmo meio diluído a 20% em água (ZARROUK, 1966). A concentração celular inicial foi de 0,30 g.L<sup>-1</sup> e o crescimento de *Spirulina platensis* foi monitorado de forma semi-contínua através de densidade ótica (OD) em 670 nm (COSTA *et al.*, 2002). A biomassa foi obtida por filtração de um dos tanques, prensada a 1 ton/cm<sup>2</sup>, extrusada e seca a 50°C por 6 h com circulação de ar para posterior congelamento a -18°C. A moagem foi realizada em moinho de bolas e o peneiramento de forma a ser coletado o passante da peneira com abertura 0,125 mm, retido na peneira com abertura 0,106 mm.

### **2.2. Extração de ficocianina**

A extração de ficocianina foi realizada em SAB polietilenoglicol (PEG)/fosfato de potássio de acordo com a correlação 0,08 g de biomassa seca/mL de água como solvente extrator, estabelecida por Silveira (2007). A concentração e a pureza do extrato ficocianina foram calculadas como descrevem as seções 2.6 e 2.7, respectivamente.

### 2.3. Massa molar do polietilenoglicol (PEG)

Para o processo de extração e purificação da ficocianina nos sistemas PEG/fosfato de potássio, selecionou-se as massas molares do polietilenoglicol, 1500, 4000, 6000 ou 8000 Da, com base no trabalho de Benavides & Rito-Palomares (2004).

### 2.4. Construção dos diagramas de fases

O diagrama de fases para o SAB composto por PEG 8000 e fosfato de potássio foi construído segundo metodologia descrita por Minami (1997), enquanto que para os SABs fosfato de potássio e PEG de massas molares 1500, 4000 ou 6000 Da e fosfato de potássio foram assumidas as curvas obtidas pelo mesmo autor, dispostas em anexo.

### 2.5. Montagem do sistema aquoso bifásico (SAB)

Os sistemas foram montados em tubos graduados de centrífuga, onde foram adicionados o PEG e a solução salina 30% (p/p) de fosfato de potássio, de pH 6 de acordo com as quantidades pré-definidas com base nos diagramas de fases de cada massa molar do polímero. Os tubos foram homogeneizados por agitação em vórtice (Phoenix AP 56) até a dissolução do PEG e deixados em repouso até a formação das duas fases. Para os sistemas convencionais, sem células, o extrato bruto de ficocianina foi adicionado, correspondendo 20% da massa final do sistema. Para os sistemas integrados, com células, substituiu-se o extrato bruto de ficocianina pela suspensão de biomassa seca de *Spirulina platensis* devidamente macerada e peneirada, obedecendo à correlação estabelecida por Silveira (2007). Os sistemas foram então centrifugados por 20 min a uma velocidade de 3400 rpm em centrífuga (Presvac DCS 16 RV).

As fases de topo e de fundo foram então separadas, os volumes medidos e o resíduo celular removido. Uma alíquota de cada fase foi submetida às leituras espectrofotométricas em espectrofotômetro (Cary 100 Conc UV Visible Spectrophotometer e Quimis Q 108 D) a 280, 615, 620 e 652 nm.

### 2.6. Composição dos SABs

A Tabela 1 apresenta os valores dos percentuais de PEG e de fosfato de potássio, que foram estudados para cada tipo de sistema, convencional ou integrado, variando-se a massa molar do polímero. Os ensaios propuseram que se estudassem diferentes composições para os SABs, envolvendo altos e baixos percentuais para o PEG e para o sal e, foram realizadas em triplicata. A mesma solução de biomassa seca de *Spirulina platensis* foi utilizada para todos os ensaios.

**Tabela 1** – Valores dos percentuais de PEG e de fosfato de potássio para cada ensaio, variando-se a massa molar do polímero, para ambos os SABs, convencional e conjugado.

Ensaio	PEG 1500		PEG 4000		PEG 6000		PEG 8000	
	PEG (%)	SAL (%)						
1	38	5	38	5	38	5	25	8
2	25	8	25	8	25	8	15	13
3	15	13	15	13	15	13	11	17
4	5	18	5	18	5	18	5	25
5	16	20	16	20	16	20	16	20

As respostas avaliadas concentração, pureza, razão de volumes e coeficiente de partição da ficocianina foram calculadas conforme as Seções 2.7, 2.8, 2.9 e 2.10.

## 2.7. Concentração da ficocianina

A concentração de ficocianina  $C_F$  ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) foi calculada por absorção espectrofotométrica em 652 nm e 615 nm através da Equação 1 (ABALDE *et al.*, 1998).

$$C_F = \frac{[A_{615} - 0,474 \times A_{652}]}{5,34} \quad (1)$$

Onde:

- $A_{615}$  é a absorbância da amostra a 615 nm;
- $A_{652}$  é a absorbância da amostra a 652 nm.

## 2.8. Pureza do extrato

A pureza do extrato PE foi determinada espectrofotometricamente através da Equação 2 (ABALDE *et al.*, 1998).

$$PE = \frac{A_{620}}{A_{280}} \quad (2)$$

Onde:

- $A_{620}$  é a absorbância da amostra a 620 nm;
- $A_{280}$  é a absorbância da amostra a 280 nm, devido à concentração total de proteínas na solução.

## 2.9. Razão de volumes do sistema

A razão de volume  $V_r$  do sistema foi determinada pela Equação 6 (KILIKIAN & PESSOA, 2003).

$$V_r = \frac{V_{topo}}{V_{fundo}} \quad (6)$$

Onde:

- $V_{topo}$  é o volume de ficocianina na fase de topo, em mL, após o processo de purificação;
- $V_{fundo}$  é o volume de ficocianina na fase de fundo, em mL, após o processo de purificação.

## 2.10. Coeficiente de partição da ficocianina

O coeficiente de partição  $K_{part}$  para a ficocianina foi calculado através da Equação 5 (KILIKIAN & PESSOA, 2003).

$$K_{part} = \frac{C_{F_{topo}}}{C_{F_{fundo}}} \quad (5)$$

Onde:

- $C_{F_{topo}}$  é a concentração de ficocianina na fase de topo, em  $\text{mg.mL}^{-1}$ , após o processo de purificação;
- $C_{F_{fundo}}$  é a concentração de ficocianina na fase de fundo, em  $\text{mg.mL}^{-1}$ , após o processo de purificação.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Cinco diferentes formulações de SAB foram selecionadas para cada massa molar do polímero para a comparação direta do desempenho do processo convencional de purificação de ficocianina e do processo integrado de extração e purificação da proteína. As Tabelas 2, 3, 4 e 5 comparam a concentração, a pureza e o coeficiente de partição da ficocianina e a razão de volumes dos sistemas PEG/fosfato de potássio, para as massas molares 1500, 4000, 6000 e 8000 Da do polímero, respectivamente.

**Tabela 2** – Comparativo entre os sistemas PEG 1500/fosfato de potássio convencional para purificação e integrado para extração e purificação de ficocianina, relativo à concentração ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ), pureza e coeficiente de partição ( $K_{\text{part}}$ ) da proteína e razão de volumes ( $V_r$ ) das fases.

Ensaio	Sistemas convencionais				Sistemas integrados			
	Concentração ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )	Pureza	$V_r$	$K_{\text{part}}$	Concentração ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )	Pureza	$V_r$	$K_{\text{part}}$
1	0,79	0,45	14,4	>100	2,56	0,52	20,1	$\infty$
2	0,94	0,49	5,4	>100	2,17	0,64	5,5	$\infty$
3	1,27	0,48	2,1	>100	1,60	0,73	1,2	$\infty$
4	1,52	0,51	1,2	>100	2,41	0,58	1,4	>100
5	1,44	0,48	1,7	$\infty$	2,25	0,58	1,3	>100

\*>100: valor superior a 100;

$\infty$ : valor tendendo ao infinito, concentração de ficocianina na fase de fundo inferior ao limite de detecção ( $10^{-5} \text{ mg.mL}^{-1}$ ).

**Tabela 3** – Comparativo entre os sistemas PEG 4000/fosfato de potássio convencional para purificação e integrado para extração e purificação de ficocianina, relativo à concentração ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ), pureza e coeficiente de partição ( $K_{\text{part}}$ ) da proteína e razão de volumes ( $V_r$ ) das fases.

Ensaio	Sistemas convencionais				Sistemas integrados			
	Concentração ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )	Pureza	$V_r$	$K_{\text{part}}$	Concentração ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )	Pureza	$V_r$	$K_{\text{part}}$
1	0,79	0,49	25,9	$\infty$	2,40	0,47	11,7	$\infty$
2	0,92	0,56	5,4	$\infty$	2,00	0,45	3,7	$\infty$
3	1,47	0,52	2,1	$\infty$	2,05	0,46	1,5	>100
4	2,02	0,64	0,8	$\infty$	2,67	0,79	0,8	$\infty$
5	1,72	0,50	1,4	$\infty$	2,39	0,49	1,0	$\infty$

\*>100: valor superior a 100;

$\infty$ : valor tendendo ao infinito, concentração de ficocianina na fase de fundo inferior ao limite de detecção ( $10^{-5} \text{ mg.mL}^{-1}$ ).

**Tabela 4** – Comparativo entre os sistemas PEG 6000/fosfato de potássio convencional para purificação e integrado para extração e purificação de ficocianina, relativo à concentração ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ), pureza e coeficiente de partição ( $K_{\text{part}}$ ) da proteína e razão de volumes ( $V_r$ ) das fases.

Ensaio	Sistemas convencionais				Sistemas integrados			
	Concentração ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )	Pureza	$V_r$	$K_{\text{part}}$	Concentração ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )	Pureza	$V_r$	$K_{\text{part}}$
1	0,66	0,52	17,0	$\infty$	2,57	0,44	11,4	$\infty$
2	0,99	0,55	6,5	$\infty$	2,25	0,42	3,4	$\infty$
3	1,70	0,56	1,9	$\infty$	2,47	0,44	1,4	$\infty$
4	2,40	0,56	3,1	62,4	1,94	0,48	0,8	42,4
5	2,50	0,48	1,2	$\infty$	1,72	0,45	1,1	$\infty$

\*>100: valor superior a 100;

$\infty$ : valor tendendo ao infinito, concentração de ficocianina na fase de fundo inferior ao limite de detecção ( $10^{-5} \text{mg.mL}^{-1}$ ).

**Tabela 5** – Comparativo entre os sistemas PEG 8000/fosfato de potássio convencional para purificação e integrado para extração e purificação de ficocianina, relativo à concentração ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ), pureza e coeficiente de partição ( $K_{\text{part}}$ ) da proteína e razão de volumes ( $V_r$ ) das fases.

Ensaio	Sistemas convencionais				Sistemas integrados			
	Concentração ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )	Pureza	$V_r$	$K_{\text{part}}$	Concentração ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )	Pureza	$V_r$	$K_{\text{part}}$
1	0,95	0,57	16,2	$\infty$	2,21	0,41	12,4	$\infty$
2	1,74	0,54	2,6	$\infty$	2,20	0,40	1,3	$\infty$
3	2,51	0,46	0,9	$\infty$	2,61	0,42	0,7	$\infty$
4	1,08	0,32	0,8	$\infty$	2,58	0,48	0,5	$\infty$
5	2,63	0,45	1,1	$\infty$	2,41	0,48	1,1	$\infty$

\*>100: valor superior a 100;

$\infty$ : valor tendendo ao infinito, concentração de ficocianina na fase de fundo inferior ao limite de detecção ( $10^{-5} \text{mg.mL}^{-1}$ ).

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que a ficocianina manteve-se na fase de topo, rica em PEG, dos sistemas integrados, assim como nos sistemas convencionais de purificação, confirmando o comportamento hidrofóbico dessa ficobiliproteína como define Patil *et al.* (2006). Os altos valores obtidos para o  $K_{\text{part}}$  confirmam essa preferência, sendo superiores a 100 ou tendendo ao infinito, com exceção do ensaio 4 para o sistema PEG 6000/fosfato de potássio, cuja partição da ficocianina entre as fases de topo e fundo foi inferior a 100, embora ainda indicando a tendência da proteína à fase superior. Os resíduos de biomassa permaneceram na interface topo/fundo dos sistemas integrados, pós processo de extração, para todas as massas molares do PEG estudadas, 1500, 4000, 6000 ou 8000 Da.

Para os sistemas integrados constituídos pelas massas molares de PEG 1500 e 4000, as concentrações de ficocianina obtidas nas fases de topo foram superiores àquelas na mesma fase dos sistemas convencionais. Já para os sistemas integrados com PEG 6000

e 8000, os três e os quatro primeiros ensaios, respectivamente, obedeceram ao mesmo acréscimo na concentração da proteína. Esse incremento na concentração da ficocianina quando submetida aos sistemas integrados de extração e purificação pode ser decorrente da supressão de etapas que possam vir a reter parte da ficocianina extraída ao longo de processos com filtração por membranas, entre outros, prévios ao uso dos SABs convencionais.

Com relação à pureza, todos os ensaios para o sistema integrado PEG 1500/fosfato de potássio alcançaram valores superiores aos obtidos no sistema convencional de mesma composição, entre 14 e 52% maiores, enquanto que para o sistema com PEG 4000, apenas um ensaio do sistema integrado obteve pureza 23% maior que a do outro sistema, da mesma forma que dois ensaios para o composto por PEG 8000, 7 e 50% superiores. Para os SAB PEG 6000/fosfato de potássio, o sistema convencional obteve purezas superiores cerca de 6 a 24% para a ficocianina em relação ao integrado.

O SAB integrado PEG 1500/fosfato de potássio, obteve no ensaio 3, composto por 15% de PEG 1500 e 13% de sal, 0,73 de pureza para a ficocianina assim como o ensaio 4 do sistema integrado PEG 4000/fosfato de potássio, com 5% de polímero e 18% de sal, obteve 0,79. Segundo PATIL *et al.* (2006), a pureza da ficocianina avaliada através da razão de absorbâncias  $A_{620}/A_{280}$ , quando 0,7, pode ser considerada de grau alimentar, grau este alcançado nesses dois ensaios, em SABs integrados compostos de PEG 1500 ou 4000 e fosfato de potássio.

Sobretudo, o SAB integrado composto pelo PEG 4000 conciliou a melhor pureza, 0,79, em conjunto à maior concentração de ficocianina na fase de topo,  $2,67\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , mostrando-se assim mais eficiente que o sistema composto pelo PEG 1500, que resultou em uma pureza de 0,73 em contrapartida a concentração obtida de  $1,6\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  para a proteína na fase superior, valor este 60% inferior ao primeiro.

Nos sistemas integrados, os maiores valores para a pureza da ficocianina foram alcançados nos ensaios de menor razão de volumes,  $V_r$  entre 0,5 e 1,2, para cada massa molar do PEG estudada. A redução da fase superior aumenta conseqüentemente a fase de fundo, o que pode possibilitar que uma maior parte das proteínas contaminantes migrem para esse volume livre, contribuindo dessa forma para o incremento na pureza da proteína-alvo devido à alta afinidade da ficocianina pela fase de topo e permanência na mesma, para todas as massas molares do PEG verificadas.

#### 4. CONCLUSÕES

Para os quatro tipos de SABs estudados, os sistemas integrados de purificação e extração de ficocianina obtiveram maiores concentrações da proteína-alvo nas fases de topo dos sistemas, enquanto que os resíduos de biomassa permaneceram na interface de todos os tipos e composições dos sistemas.

Os SAB PEG 1500/fosfato de potássio integrado, alcançou purezas superiores às obtidas para o mesmo sistema convencional, para a ficocianina, em todas as cinco formulações estudadas. Os SABs convencionais compostos pelas massas molares do PEG 4000 e 8000, obtiveram quatro e três ensaios, respectivamente, com purezas para a ficocianina, superiores às obtidas nos sistemas integrados, para as mesmas formulações, enquanto que para o PEG 6000, as purezas da proteína alcançadas nos ensaios do sistema convencional foram todas superiores às obtidas no outro sistema.

As maiores purezas obtidas nos SABs integrados para as quatro diferentes massas molares do PEG estudadas, correspondem às menores  $V_r$  entre cada um dos cinco ensaios realizados, indicando a possibilidade de migração dos contaminantes para a fase de fundo, ampliada com a redução da fase de topo.

O sistema integrado composto por 5% de PEG 4000 e 18% de sal, alcançou os melhores resultados para a concentração de ficocianina na fase de topo e melhor pureza para esta proteína, 2,67 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,79, valor este que a classifica como de grau alimentar, superior a 0,7.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ALBERTSON, P. A. Partitioning of cell particles and macromolecules. New York: John Wiley & Sons, 1986.

BHAT, B. B.; GAIKWAD, N. M.; MADYASTHA, K. M. Hepatoprotective effect of C-Phycocyanin: protection for carbon tetrachloride and R-(1)-Pulegone-mediated hepatotoxicity in rats. *Biochemical Biophysical Research Communication*, v. 249, p. 428-431, 1998.

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.

BIERAU, H.; ZHANG, Z.; LYDDIATT, A. Direct process integration of cell disruption and fluidised bed adsorption for the recovery of intracellular proteins. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 74, p. 208-212, 1999.

COSTA, J. A. V.; COZZA, K. L.; OLIVEIRA, L.; MAGAGNIN, G. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 17, p. 439-442, 2002.

DIAMOND, A.D.; HSU, J. T. Aqueous two-phase systems for biomolecule separation. *Advances Biochemical Engineering Biotechnology*, v. 47, p. 89-135, 1992.

GAUTAM, S.; SIMON, L. Partitioning of  $\alpha$ -glucosidase from *Trichoderma reesei* in poly(ethylene glycol) and potassium phosphate aqueous two-phase systems: Influence of pH and temperature. *Biochemical Engineering Journal*, v. 30, p. 104 -108, 2006.

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

KULA, M. R.; KRONER, K. H.; HUSTEDT. Purification of Enzymes by liquid-liquid extraction. *Advances Biochemical Engineering and Biotechnology*, v. 24, p. 73-118, 1982.

MARCOS, J. C.; FONSECA L. P.; RAMALHO, M. T.; CABRAL, J. M. S. Variation of penicillin acylase partition coefficient with phase volume ratio in poly(ethylene glycol)-sodium citrate aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, v. 711, p. 295-299, 1998.

MARCOS, J. C.; FONSECA L. P.; RAMALHO, M. T.; CABRAL, J. M. S. Partial purification of penicillin acylase from *Escherichia coli* in poly(ethylene glycol)-sodium citrate aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, v. 734, p. 15-22, 1999.

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

PATIL, G.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycoyanin. *Biochemical Engineering Journal*, on-line, 2006. <http://www.sciencedirect.com> [accessado em 4 dezembro 2006].

QUOC, K. P.; PASCAUD, M. Effects of dietary gamma-linolenic acid on the tissue phospholipid fatty acid composition and the synthesis of eicosanoids in rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*, v. 40, p. 99-108, 1996.

RITO-PALOMARES, M.; LYDDIATT, A. Process integration using aqueous two-phase partition for the recovery of intracellular protein. *Chemical Engineering Journal*. v. 87, p. 313-319, 2002.

ROMAY, C.; ARMESTO, J.; REMIREZ, D.; GONZALEZ, R.; LEDON, N.; GARCIA, I. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoyanin from blue-green algae. *Inflammation Research*, v. 47, p. 36-41, 1998.

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

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

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

ZARROUK, C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima*. *Ph. D Thesis*, Paris, 1966.

**CINÉTICA DE DESNATURAÇÃO TÉRMICA DA FICOCIANINA DE**

***Spirulina platensis***

## **CINÉTICA DE DESNATURAÇÃO TÉRMICA DA FICOCIANINA DE *Spirulina platensis***

Laboratório de Microbiologia, Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), CP 474, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, Brasil, Telefone: (53) 32338754, E-mail: dqmsjk@furg.br

### **RESUMO**

A cianobactéria *Spirulina platensis* é uma fonte de pigmentos, como a ficocianina, usada nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. A cinética de desnaturação térmica do extrato líquido nos valores de pH 5, 6 e 7, foi estudada avaliando sua estabilidade entre 50 e 65 °C. O modelo cinético foi assumido e validado como de primeira ordem e entre 50 e 55 °C, o extrato foi mais estável a pH 6 e entre 57 e 65 °C em pH 5, mostrando-se instável a pH 7. Os tempos de meia-vida diminuíram a medida que a temperatura do tratamento foi aumentada, e as energias de ativação para os extratos de ficocianina de pH 5, 6 e 7 foram de 87,35, 135,57 e 111,14 kcal/gmol. A adição de sorbitol entre 10 e 50% (p/p) no tratamento a 62 °C durante 40 minutos ampliou o tempo de meia-vida do extrato de ficocianina provando que sua descoloração é relacionada à desnaturação da cadeia protéica.

**Palavras – chave adicionais:** Proteína, degradação, temperatura, estabilizante, sorbitol.

## 1. INTRODUÇÃO

A cianobactéria *Spirulina* tem sido um importante objeto de pesquisas biotecnológicas devido a sua importância econômica, biológica e nutricional (RIPPKA *et al.*, 1989). *Spirulina platensis* produz uma grande quantidade de produtos de alto valor, dentre eles as ficobiliproteínas (CHEN & ZHANG, 1997).

As ficobiliproteínas são proteínas intensamente coloridas, responsáveis pela captação de luz das cianobactérias (REIS *et al.*, 1998). São usualmente divididas em três grupos baseados na cor, propriedades de absorção e presença de cromóforos, como ficoeritrinas, aloficocianinas e ficocianinas (VISKARI & COLYER, 2003).

A ficocianina é o principal pigmento da cianobactéria *Spirulina platensis* podendo chegar a 20% em peso seco da proteína celular (VONSHAK, 1997). Esta proteína não é só usada como ingrediente nutritivo e corante natural para alimentos e cosméticos, mas também utilizada como um potencial agente terapêutico no tratamento de doenças oxidativas e como marcador fluorescente em pesquisas biomédicas (YOSHIDA *et al.*, 1996; ROMAY *et al.*, 2000; BHAT & MADYASTHA, 2000)

A tendência atual de uso de pigmentos naturais tem tornado a ficocianina um bioproduto bastante atrativo. Na Europa, a busca por corantes naturais é um fato crescente no momento em que os corantes artificiais em geral são tóxicos ou de algum modo perigosos (BELLISLE *et al.*, 1998).

A cor é um importante atributo relacionado ao apelo visual e à qualidade de produtos alimentícios (REYES *et al.*, 2007). Dessa forma a excessiva descoloração causada durante um processo térmico compromete a comercialização e os parâmetros cinéticos como ordem de reação, constante de reação e energia de ativação, fornecem proveitosas informações na mudança de qualidade de um alimento que ocorre durante o processo térmico (DUTTA *et al.*, 2006).

A cinética de degradação da cor tem sido considerada para seguir uma reação de primeira ordem como foi visto no caso de Ahmed *et al.* (2002a), Ahmed *et al.* (2002b), Guunawan & Barringer (2000), Weemaes *et al.* (1999) e Steet & Tong (1996).

Diante da possibilidade de desnaturação protéica e, conseqüentemente da cor no caso da ficocianina, na última década diferentes práticas têm sido empregadas para entender a estabilidade das proteínas, no momento que a possibilidade de maximizar a vida útil de soluções protéicas é de maior interesse biotecnológico e farmacêutico (WIMMER *et*

*al.*, 1997; PETERSEN *et al.*, 2004). Açúcares e polióis têm sido empregados para estabilizar proteínas e atualmente, sendo extensamente usados como agentes estabilizantes na indústria alimentícia assim como em formulações farmacêuticas desde que em concentrações inofensivas à ingestão (PETERSEN *et al.*, 2004).

O presente trabalho teve como objetivo estudar a cinética de degradação térmica do extrato aquoso da ficocianina extraído de *Spirulina platensis* no intervalo de temperaturas de 50 a 65°C, cada qual a três valores de pH, 5, 6 e 7 e com a adição de agente estabilizante nas condições de maior instabilidade da proteína.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Cultivo de *Spirulina platensis***

*Spirulina platensis*, foi cultivada na planta localizada na cidade de Santa Vitória do Palmar, RS, que compreende quatro fotobiorreatores abertos, externos, três deles com capacidade de 10 m<sup>3</sup> e o outro de 1 m<sup>3</sup>, em condições não controladas, contendo inicialmente meio Zarrouk 100%, com manutenção contínua feita com o mesmo meio diluído a 20% em água (ZARROUK, 1966). A concentração celular inicial foi de 0,30 g.L<sup>-1</sup> e o crescimento de *Spirulina platensis* foi monitorado de forma semi-contínua através de densidade ótica (OD) em 670 nm (COSTA *et al.*, 2002). A biomassa foi obtida por filtração de um dos tanques, prensada a 1 ton/cm<sup>2</sup>, extrusada e seca a 50°C por 6 h com circulação de ar para posterior congelamento a -18°C. A moagem foi realizada em moinho de bolas e o peneiramento de forma a ser coletado o passante da peneira com abertura 0,149 mm.

### **2.2. Extração de ficocianina**

A extração de ficocianina foi realizada de acordo com a correlação 0,08 g de biomassa seca/mL de água como solvente extrator, estabelecida por Silveira (2007). A concentração da ficocianina foi calculada como descreve a seção 2.6.

### **2.3. Análise da cor da ficocianina**

Amostras de extrato aquoso de ficocianina, bruto e nos valores de pH 5, 6 e 7 foram submetidas a varredura espectrofotométrica entre 380 e 700 nm em espectrofotômetro (Cary 100 Conc UV Visible Spectrophotometer) e a intensidade da cor foi medida pelos valores da absorbância.

## 2.4. Determinação da cinética de desnaturação

Os estudos da cinética da desnaturação da ficocianina foram conduzidos em frascos tampados à temperatura constante, contendo o extrato de ficocianina. Foram estudadas as temperaturas de 50, 53, 55, 57, 60, 62 e 65°C, cada qual para três valores de pH, 5, 6, e 7 de modo a se obter as constantes cinéticas de desnaturação ( $K_d$ ) para cada condição proposta. As amostras foram retiradas periodicamente até que se atingisse a metade da concentração inicial da ficocianina e o monitoramento da desnaturação da proteína foi determinado através de leitura espectrofotométrica.

Os valores de  $K_d$  obtidos em cada uma das temperaturas, para cada pH, permitiu determinar o tempo de meia-vida da proteína em cada uma das situações assim como a correlação entre as constantes cinéticas forneceu o modelo cinético de desnaturação térmica do extrato de ficocianina para cada valor de pH estudado. Através da equação de Arrhenius, foi possível definir a energia de ativação da reação de desnaturação da proteína igualmente para cada valor de pH.

A constante cinética de desnaturação, o tempo de meia-vida e a energia de ativação da reação de desnaturação foram calculados como descrevem as seções 2.7, 2.8 e 2.9.

## 2.5. Determinação da cinética de desnaturação com adição de agente estabilizante

Para prevenir a descoloração do extrato aquoso de ficocianina pela desnaturação da proteína, foi estudada a adição de um composto estabilizante. Utilizou-se então sorbitol em concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50% p/p para o extrato a 62°C, sendo as amostras retiradas periodicamente até 40 minutos e o monitoramento da desnaturação da proteína determinado através de leitura espectrofotométrica.

Para cada concentração de sorbitol adicionada ao extrato de ficocianina, em cada uma das condições estabelecidas, a constante cinética de desnaturação e o tempo de meia-vida do extrato de ficocianina foram calculados como descrevem as seções 2.7 e 2.8. Por meio de testes de médias estatísticas, avaliou-se as diferenças significativas com 95% de confiança, entre as concentrações de sorbitol adicionadas ao extrato de ficocianina para cada valor de pH, através do Teste de Tukey.

## 2.6. Concentração de ficocianina

A concentração de ficocianina  $C_F$  ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foi calculada por absorção espectrofotométrica em 652 nm e 615 nm através da Equação 1 (ABALDE *et al.*, 1998).

$$C_F = \frac{[A_{615} - 0,474 \times A_{652}]}{5,34} \quad (1)$$

Onde:

- $A_{615}$  é a absorbância da amostra a 615 nm;
- $A_{652}$  é a absorbância da amostra a 652 nm.

## 2.7. Constante cinética de desnaturação

A constante cinética de desnaturação da ficocianina  $K_d$  ( $\text{s}^{-1}$ ) foi estimada por regressão dos dados experimentais tempo, concentração da proteína ao longo do tempo e concentração inicial da proteína. Assumindo-se uma cinética de reação de primeira ordem, a determinação do  $K_d$  foi dada pela Equação 2 (FOGLER, 1999).

$$\frac{dC_F}{dt} = -K_d \times C \quad (2)$$

Onde:

- $C_F$  é a concentração da ficocianina em  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;
- $t$  é o tempo em s;
- $K_d$  é a constante cinética de desnaturação em  $\text{s}^{-1}$ .

## 2.8. Tempo de meia-vida

O tempo de meia-vida  $t_{1/2}$  (s) é o tempo necessário para que a concentração do reagente seja reduzida à metade do seu valor inicial e para uma reação de primeira ordem é dado pela Equação 3 (HILL, 1977).

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_d} \quad (3)$$

Onde:

- $K_d$  é a constante cinética de desnaturação em  $\text{s}^{-1}$ .

## 2.9. Equação de Arrhenius

A equação de Arrhenius relaciona a temperatura e a constante de velocidade para reações elementares e permite a determinação da energia de ativação e do fator de frequência da reação de desnaturação da proteína, sendo expressa pela Equação 4 (SMITH, 1970).

$$Kd = A \times e^{\frac{-Ed}{R \times T}} \quad (4)$$

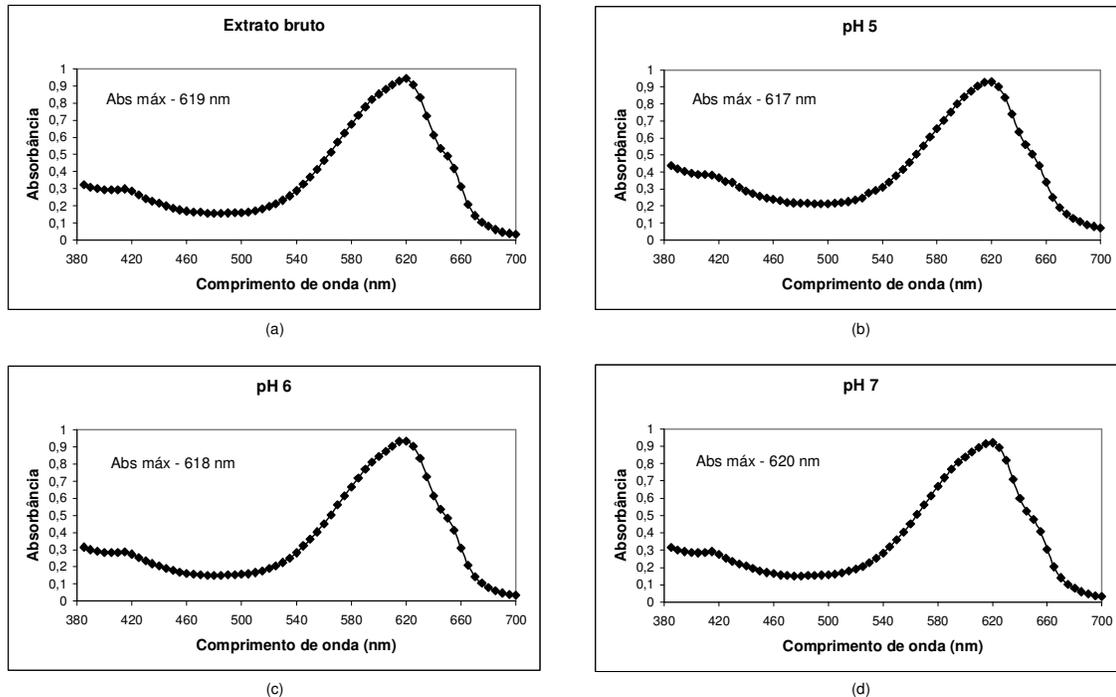
Onde:

- Kd é a constante cinética de desnaturação em s;
- A é o fator de frequência em s<sup>-1</sup>;
- Ed é a energia de ativação da reação de desnaturação em cal.gmol<sup>-1</sup>;
- T é a temperatura em K;
- R é a constante dos gases em cal.gmol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 3.1. Influência do pH na cor da ficocianina

Para determinar a influência do pH na intensidade da cor da ficocianina, foram medidas as absorções máximas do extrato aquoso da ficocianina bruto e nos valores de pH 5, 6 e 7. A Figura 1 mostra as análises de absorbância para os extratos aquosos de ficocianina nos diferentes valores de pH.



**Figura 1** – Absorção máxima visível do extrato aquoso de ficocianina bruto (a) e a valores de pH 5 (b), 6 (c) e 7 (d).

As absorções máximas dos extratos aquosos de ficocianina a diferentes valores de pH mantiveram-se entre 617 e 620 nm. De acordo com Sun *et al.* (2006) a máxima absorção da ficocianina extraída de *Spirulina platensis* ocorre a 618 nm, para Viskari & Colyer (2002) ocorre a 620 nm, enquanto que Bermejo *et al.* (2003) define a faixa entre 610 e 620 nm. Dessa forma, para os valores de pH estudados, os picos de absorção mantiveram-se de acordo com os valores esperados, mostrando assim que não houve diferença na coloração do extrato aquoso de ficocianina quando o pH do extrato bruto foi alterado.

### 3.2. Determinação da cinética de desnaturação térmica da ficocianina

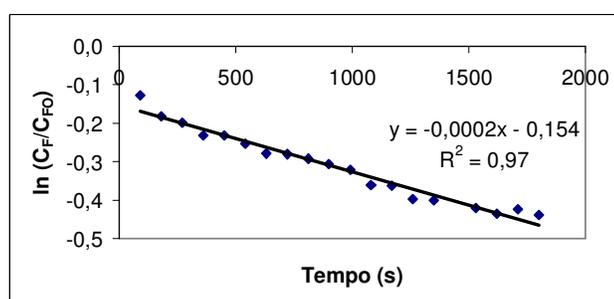
Amostras de ficocianina, nos três valores de pH estudados, foram submetidas às temperaturas de 50, 53, 55, 57, 60, 62 e 65°C, de modo a se obter as constantes cinéticas de desnaturação ( $K_d$ ) assim como o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) da proteína para cada condição proposta. A 65°C o extrato aquoso de ficocianina a valores de pH 6 e 7 desnaturou-se rapidamente, inviabilizando o procedimento prático, assim como a 62°C para o pH 7.

Segundo Àvila & Silva (1999) e Corzo *et al.* (2006), numerosas pesquisas estudaram a aplicação do modelo de primeira ordem para descrever a degradação da cor em produtos

alimentícios. Levando em consideração essa afirmativa e, integrando-se a Equação 2, tem-se a Equação 5:

$$\ln \frac{C_F}{C_{FO}} = -Kd \times t \quad (5)$$

Graficando  $\ln(C_F/C_{FO})$  em função do tempo, como mostra a Figura 2, como por exemplo, para a temperatura de 55°C, pH 5, foi possível determinar o valor das constantes cinéticas de desnaturação (Kd) para cada uma das temperaturas nos valores de pH estudados.



**Figura 2** – Degradação do extrato aquoso de ficocianina, pH 5, a 55°C.

Para os três valores de pH estudados, determinou-se o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) para a ficocianina para cada temperatura.

As Tabelas 1, 2 e 3 apresentam os valores da constante cinética de desnaturação e do tempo de meia vida para a ficocianina, nos três valores de pH, 5, 6 e 7 e, para as temperaturas estudadas em cada uma das situações.

**Tabela 1** – Valores das constantes de desnaturação térmica (Kd) e do tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), do extrato aquoso de ficocianina, pH 5, para cada temperatura estudada.

T (°C)	T (K)	$1/T \cdot 10^{-3} \text{ (K}^{-1}\text{)}$	Kd (s <sup>-1</sup> )	Coefficiente de correlação	$t_{1/2}$ (s)	$t_{1/2}$ (min)
50	323	3,10	$1 \cdot 10^{-5}$	0,95	69315	1155
53	326	3,07	$3 \cdot 10^{-5}$	0,93	23105	385
55	328	3,05	$2 \cdot 10^{-4}$	0,97	3466	58
57	330	3,03	$4 \cdot 10^{-4}$	0,94	1733	29
60	333	3,00	$1,1 \cdot 10^{-3}$	0,97	630	11
62	335	2,98	$2,5 \cdot 10^{-3}$	0,94	277	5
65	338	2,96	$2,9 \cdot 10^{-3}$	0,93	239	4

**Tabela 2** – Valores das constantes de desnaturação térmica (Kd) e do tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), do extrato aquoso de ficocianina, pH 6, para cada temperatura estudada.

T (°C)	T (K)	1/T *10 <sup>-3</sup> (K <sup>-1</sup> )	Kd (s <sup>-1</sup> )	Coefficiente de correlação	t <sub>1/2</sub> (s)	t <sub>1/2</sub> (min)
50	323	3,10	8*10 <sup>-6</sup>	0,96	86643	1444
53	326	3,07	2*10 <sup>-5</sup>	0,94	34657	578
55	328	3,05	5*10 <sup>-5</sup>	0,95	13863	231
57	330	3,03	6*10 <sup>-4</sup>	0,96	1155	19
60	333	3,00	3,8*10 <sup>-3</sup>	0,92	182	3
62	335	2,98	7,8*10 <sup>-3</sup>	0,95	89	1,5

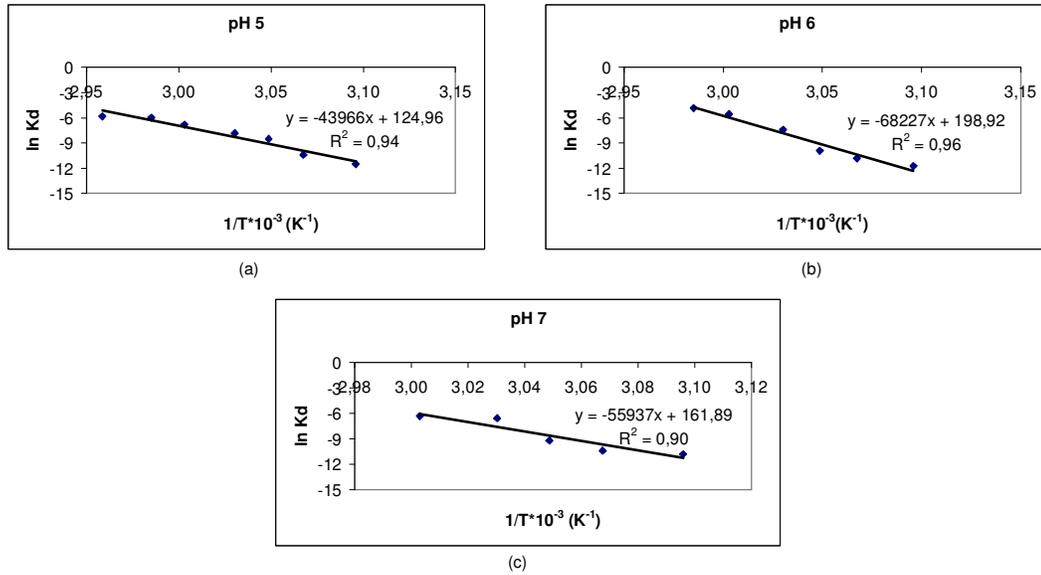
**Tabela 3** – Valores das constantes de desnaturação térmica (Kd) e do tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), do extrato aquoso de ficocianina, pH 7, para cada temperatura estudada.

T (°C)	T (K)	1/T *10 <sup>-3</sup> (K <sup>-1</sup> )	Kd (s <sup>-1</sup> )	Coefficiente de correlação	t <sub>1/2</sub> (s)	t <sub>1/2</sub> (min)
50	323	3,10	0,00002	0,97	34657	578
53	326	3,07	0,00003	0,97	23105	385
55	328	3,05	0,0001	0,96	6931	115
57	330	3,03	0,0014	0,93	495	8
60	333	3,00	0,0018	0,95	385	6

De acordo com os resultados obtidos, pode-se constatar que a ficocianina desnaturou-se mais rapidamente às temperaturas mais altas, já que o tempo de meia-vida, ou seja, tempo em que a concentração inicial da ficocianina reduziu-se a metade, diminuindo ao passo que a temperatura de trabalho foi aumentada. O mesmo foi observado por Koca *et al.* (2006) para a clorofila de grãos de ervilha, cujo tempo de meia-vida do pigmento reduziu-se à medida que a temperatura de trabalho foi aumentada.

Entre 50 e 55°C, a ficocianina foi mais estável a pH 6 e entre 57 e 65°C em pH 5. Dessa forma, à medida que se aumentou a temperatura a que se submeteu o extrato aquoso de ficocianina, ele apresentou-se mais estável reduzindo-se o valor do pH, evidenciando que a temperatura de desnaturação e o pH são inversamente proporcionais para a desnaturação da proteína. Nesta faixa de estudo, entre 50 e 65°C foi possível definir que o extrato aquoso de ficocianina foi mais instável a pH 7.

A dependência da temperatura com a desnaturação da ficocianina e conseqüentemente com a perda de cor, foi observada correlacionando-se o inverso das temperaturas com o logaritmo das constantes cinéticas de desnaturação térmica da proteína para cada valor de pH, conforme mostra a Figura 3.



**Figura 3** – Dados experimentais das constantes de desnaturação térmica (Kd) em função da temperatura para o cálculo da energia de ativação da reação de desnaturação (Ed) do extrato aquoso de ficocianina através da equação de Arrhenius, para cada valor de pH 5 (a), 6 (b) e 7 (c).

Linearizando-se a Equação 4, tem-se a Equação 6 e, para cada pH, respectivamente as Equações 7, 8 e 9.

$$\ln Kd = \ln A - \frac{E_d}{R \times T} \tag{6}$$

Para o pH 5:

$$\ln Kd = 124,96 - 43966 \times \frac{1}{T} \tag{7}$$

Para o pH 6:

$$\ln Kd = 198,92 - 68227 \times \frac{1}{T} \tag{8}$$

Para o pH 7:

$$\ln Kd = 161,89 - 55937 \times \frac{1}{T} \tag{9}$$

A energia de ativação da reação de desnaturação da ficocianina ( $E_d$ ), assim como o fator de frequência ( $A$ ) para cada valor de pH estudado, foram determinados através da equação de Arrhenius, como mostra a Tabela 4. A energia de ativação é considerada a mínima energia que devem possuir as moléculas reagentes antes da reação ocorrer e, o fator ( $e^{-E_d/RxT}$ ) fornece a fração de colisões entre as moléculas que juntas possuem a mínima energia (FOGLER, 1999).

**Tabela 4** – Valores das energias de ativação da reação de desnaturação ( $E_d$ ) e dos fatores de frequência ( $A$ ) para o extrato aquoso de ficocianina nos valores de pH 5, 6 e 7.

pH	$E_d$ (kcal/mol)	$A$ ( $s^{-1}$ )
5	87,36	$1,86 \times 10^{54}$
6	135,57	$2,45 \times 10^{86}$
7	111,14	$2,03 \times 10^{70}$

Dessa forma, as equações de Arrhenius, Equações 10, 11 e 12 para os valores de pH 5, 6 e 7 respectivamente, foram definidas e são válidas para a faixa de temperaturas que foi abrangida no estudo.

$$K_d = (1,86 \times 10^{54}) \times e^{-43966/T} \quad (10)$$

$$K_d = (2,45 \times 10^{86}) \times e^{-68227/T} \quad (11)$$

$$K_d = (2,03 \times 10^{70}) \times e^{-55937/T} \quad (12)$$

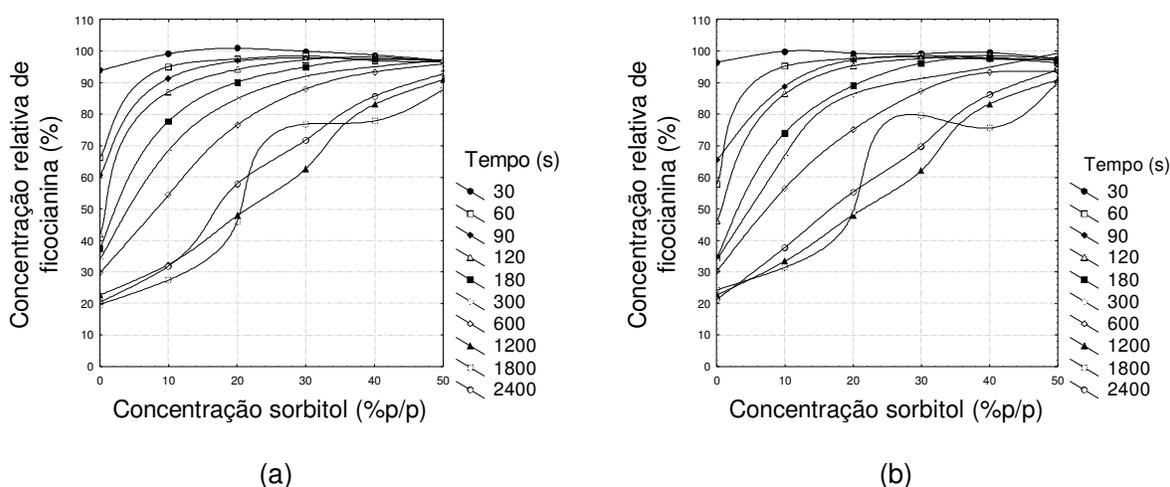
### 3.3. Determinação da cinética de desnaturação térmica da ficocianina com adição de agente estabilizante

Para Fukui *et al.* (2004), o desenvolvimento da cor da molécula de ficocianina é mantido pela alta ordem estrutural da molécula protéica e, dessa forma, para prevenir a descoloração da ficocianina por desnaturação, as ligações cruzadas entre os grupamentos amina de sua molécula devem ser mantidas. Assim, como o aspecto visual é o primeiro fator de qualidade pelo qual os consumidores tomam a decisão de adquirir um produto, um composto estabilizante deve ser requerido para manter a cor da ficocianina, impedindo a desnaturação da cadeia protéica.

Fukui *et al.* (2004) preveniu a desnaturação e a conseqüente descoloração da molécula da ficocianina adicionando DSP (*dithiobis succinimidyl propionate*) para manter a ligação entre seus grupamentos amina. Contudo, esse reagente químico não pode ser utilizado na em produtos destinados à alimentação e, portanto, se faz necessário o uso de

um agente estabilizante que possa ser aplicado com essa finalidade. O sorbitol é um poliálcool, que pode ser encontrado em uma vasta gama de produtos alimentícios, como cita Dierckx & Huyghebaert (2002) e, por esse motivo foi escolhido como o agente estabilizante para o extrato de ficocianina. Além disso, é conhecido seu efeito sobre a desnaturação de proteínas favorecendo ainda mais seu uso na estabilização da cor da ficocianina, no momento em que o desenvolvimento da cor está ligado à conformação da cadeia protéica.

A Figura 4 mostra a concentração relativa de ficocianina (%) após o tratamento em banho de imersão em água a 62°C para extratos aquosos de valores de pH 5 e 6 sem sorbitol e com adição de 10, 20, 30, 40 e 50% (p/p) do agente estabilizante, para os tempos de tratamento de 30 a 2400 segundos. O extrato de pH 7 mostrou o mesmo comportamento que o de pH 6.



**Figura 4** – Concentração relativa de ficocianina (%) nos tempos de tratamento de 30 a 2400 s utilizando-se concentrações de sorbitol entre 10 e 50% (p/p), para extrato aquoso de pH 5 (a) e 6 (b).

De acordo com os resultados obtidos, o sorbitol tendeu a manter a conformação da molécula protéica da ficocianina no momento em que sua adição, seja ela em qualquer um dos valores estudados de concentração (%p/p), ocasionou um incremento na concentração relativa da ficocianina, para todos os tempos analisados entre 30 e 2400 s. À medida que o tempo de tratamento foi ampliado, para os maiores percentuais de sorbitol adicionados se obteve maiores concentrações relativas de ficocianina.

As Tabelas 5, 6 e 7 apresentam os valores da constante cinética de desnaturação  $K_d$  e do tempo de meia vida para a ficocianina, nos três valores de pH, 5, 6 e 7 e a 62°C, para cada concentração de sorbitol adicionada ao extrato aquoso.

**Tabela 5** – Valores das constantes de desnaturação térmica (Kd) e do tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), do extrato aquoso de ficocianina, pH 5, para cada concentração de sorbitol (%p/p) adicionada.

Concentração Sorbitol (%p/p)	Kd (s <sup>-1</sup> )	Coefficiente de correlação	t ½ (s)	t ½ (min)
10	4*10 <sup>-4</sup>	0,94	1732	29
20	2*10 <sup>-4</sup>	0,88	3465	58
30	3*10 <sup>-4</sup>	0,95	2310	38
40	2*10 <sup>-4</sup>	0,93	3465	58
50	6*10 <sup>-5</sup>	0,94	11552	192

**Tabela 6** – Valores das constantes de desnaturação térmica (Kd) e do tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), do extrato aquoso de ficocianina, pH 6, para cada concentração de sorbitol (%p/p) adicionada.

Concentração Sorbitol (%p/p)	Kd (s <sup>-1</sup> )	Coefficiente de correlação	t ½ (s)	t ½ (min)
10	8*10 <sup>-4</sup>	0,96	866	14
20	5*10 <sup>-4</sup>	0,95	1386	23
30	1*10 <sup>-4</sup>	0,98	6931	116
40	1*10 <sup>-4</sup>	0,98	6931	116
50	6*10 <sup>-5</sup>	0,95	11552	193

**Tabela 7** – Valores das constantes de desnaturação térmica (Kd) e do tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ), do extrato aquoso de ficocianina, pH 7, para cada concentração de sorbitol (%p/p) adicionada.

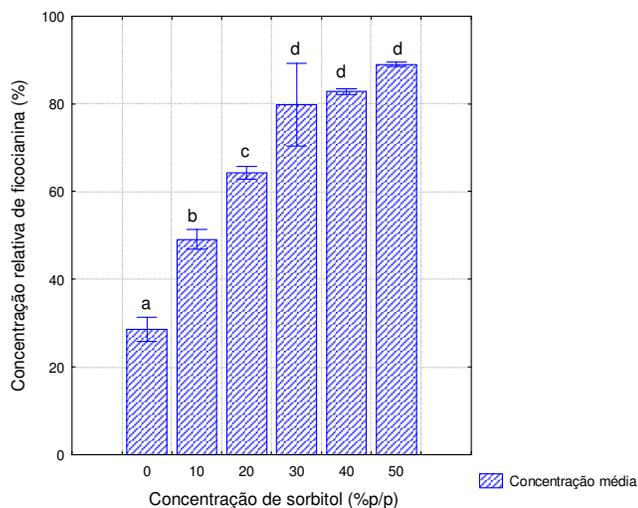
Concentração Sorbitol (%p/p)	Kd (s <sup>-1</sup> )	Coefficiente de correlação	t ½ (s)	t ½ (min)
10	7*10 <sup>-4</sup>	0,92	990	17
20	4*10 <sup>-4</sup>	0,90	1733	29
30	3*10 <sup>-4</sup>	0,92	2310	38
40	2*10 <sup>-4</sup>	0,94	3466	58
50	6*10 <sup>-5</sup>	0,92	11552	192

Analisando-se os resultados expressos para o extrato aquoso de ficocianina nos valores de pH 5, 6 e 7, verificou-se que o tempo de meia-vida, ou seja, o tempo necessário à concentração inicial da proteína reduzir-se a metade, aumentou proporcionalmente à concentração de sorbitol (%p/p) adicionada. Para o pH 5, o tempo de meia-vida do extrato de ficocianina a 62°C foi de 5 min sem adição de estabilizante, enquanto que a adição de 10% (p/p) de sorbitol proporcionou um aumento para 29 min. Essa constatação comprova

que o sorbitol foi um agente estabilizante protéico eficiente, prorrogando o processo de desnaturação da molécula da ficocianina quando adicionado a partir de 10% (p/p).

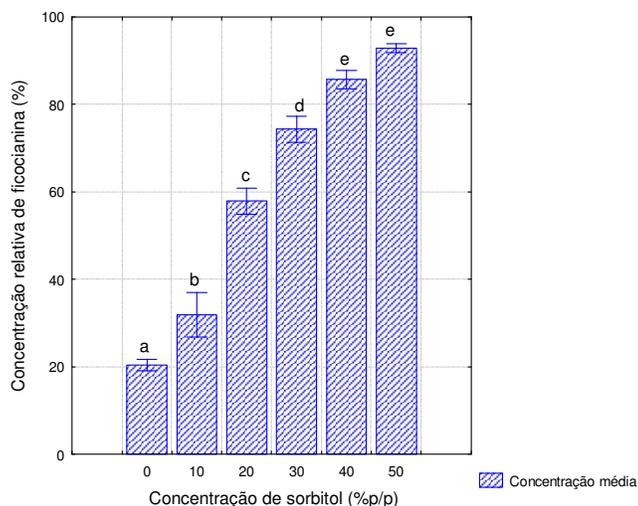
Através do Teste de Tukey, foi possível verificar a diferença significativa, com 95% de confiança, entre cada concentração de sorbitol adicionada ao extrato aquoso de ficocianina para cada valor de pH e para cada intervalo de tempo de retirada de amostra.

A Figura 5 mostra o efeito das concentrações de sorbitol (%p/p), na concentração relativa de ficocianina (%) pH 5, ao final de 40 min, onde letras iguais significam tratamentos iguais a  $p \leq 0,05$  e letras diferentes representam tratamentos estatisticamente diferentes a  $p \leq 0,05$ . Pode-se verificar que para o extrato de pH 5, ao final de 40 minutos de tratamento térmico, as concentrações de 30, 40 e 50% (p/p) de sorbitol adicionadas ao extrato aquoso de ficocianina, não apresentaram diferenças significativas a 95% de confiança na concentração média relativa de ficocianina (%). Portanto, com 30% (p/p) de agente estabilizante, o extrato de ficocianina de pH 5 mantém uma concentração relativa de cerca de 80%.



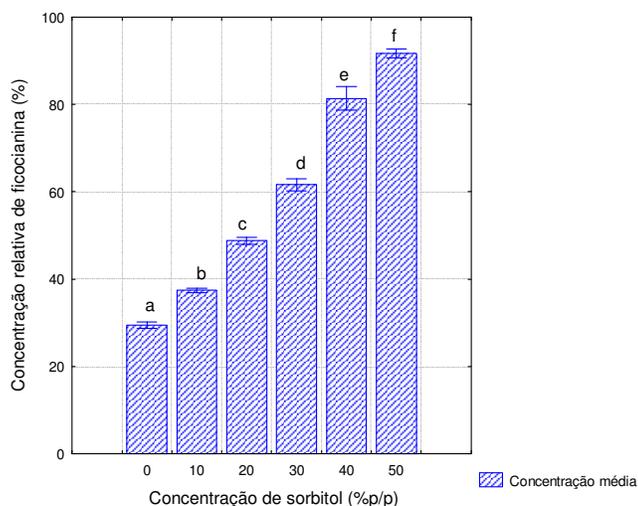
**Figura 5** – Análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 5 (%), após 40 minutos de banho de imersão.

Para o extrato de pH 6, ao final de 40 minutos de tratamento térmico, não houveram diferenças significativas a 95% de confiança, nas concentrações médias relativas de ficocianina (%) quando adicionados 40 e 50% (p/p) de sorbitol ao extrato aquoso da proteína, como mostra a Figura 6, onde letras iguais significam tratamentos iguais a  $p \leq 0,05$  e letras diferentes representam tratamentos estatisticamente diferentes a  $p \leq 0,05$ . Assim, com 40% (p/p) de agente estabilizante, o extrato de ficocianina de pH 6 mantém uma concentração relativa de cerca de 86%.



**Figura 6** – Análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 6 (%), após 40 minutos de banho de imersão.

Para o extrato de pH 7, com 3 minutos de tratamento térmico, não houve diferenças significativas a 95% de confiança, como mostra a Figura 7, nas concentrações médias relativas de ficocianina (%) quando adicionados 40 e 50% (p/p) de sorbitol ao extrato aquoso da proteína. Contudo, a partir de 10 minutos, todas as concentrações de sorbitol adicionadas, 10, 20, 30, 40 e 50% (p/p) ocasionaram uma diferença estatisticamente significativa entre as concentrações médias relativas de ficocianina (%) obtidas. Dessa forma, a adição de 50% (p/p) de sorbitol mantém 92% da concentração relativa de ficocianina ao final de 10 minutos e 85% em 40 minutos de tratamento.



**Figura 7** – Análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 7 (%), após 10 minutos de banho de imersão, atarv.

Os demais Testes de Tukey, para cada valor de pH e cada intervalo de tempo de retirada de amostras encontram-se dispostos em anexo.

#### 4. CONCLUSÕES

O modelo cinético de desnaturação térmica do extrato aquoso de ficocianina foi validado como de primeira ordem de acordo com as correlações obtidas na determinação das constantes cinéticas de desnaturação para cada uma das temperaturas estudadas. Entre as temperaturas de 50 e 55°C, o extrato aquoso de ficocianina foi mais estável a pH 6 e entre 57 e 65°C em pH 5. Dessa forma, mostrou-se mais instável, entre 50 e 65°C em pH 7.

Os tempos de meia-vida diminuíram à medida que a temperatura do tratamento térmico foi aumentada, permanecendo na faixa entre 239 e 69315 s para pH 5, 89 e 86643 s para pH 6 e 385 e 34657 s para pH 7 enquanto que as energias de ativação para os extratos de ficocianina foram de 87,36, 135,57 e 111,14 kcal/mol, respectivamente para os mesmos valores de pH.

A adição do agente estabilizante, entre 10 e 50% ampliou o tempo de meia-vida do extrato aquoso de ficocianina de 277 s para 1732 a 11552 s para pH 5, de 89 para 866 a 11552 s para pH 6 e entre 990 e 11552 s para pH 7, mostrando que a descoloração da ficocianina provavelmente é relacionada à desnaturação da cadeia protéica, já que o sorbitol é utilizado para estabilizar proteínas.

Ao final de 40 minutos de tratamento térmico, o extrato de ficocianina de pH 5 manteve cerca de 80% de sua concentração média relativa com adição de 30% (p/p) de sorbitol, já que não houve diferenças estatisticamente significativas, com 95% de confiança, entre os resultados obtidos quando adicionadas as três maiores concentrações do agente estabilizante. Para o extrato de pH 6, com 40% (p/p) de agente estabilizante, a concentração relativa da ficocianina foi mantida em cerca de 86% e para o pH 7, a partir de 10 minutos, todas as concentrações de sorbitol adicionadas ocasionaram uma diferença estatisticamente significativa entre as concentrações médias relativas de ficocianina obtidas e com 50% (p/p) de sorbitol 85% da concentração da proteína se manteve.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, J.; KAUR, A. SHIVHARE, U. S. Color degradation kinetics of spinach, mustard leaves and mixed puree. *Journal of Food Science*, v. 67, p. 1088-1091, 2002a.

AHMED, J.; SHIVHARE, U. S.; SANDHU, S. Thermal degradation kinetics of carotenoids and visual color of papaya puree. *Journal of Food Science*, v. 67, p. 2692–2695, 2002b.

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.

ÁVILA, I. M. L. B.; SILVA, C. L. M. Modelling kinetics of thermal degradation of colour in peach puree. *Journal of Food Engineering*, v. 39, p. 161-166, 1999.

BELLISLE, F.; BLUNDELL, T. E.; DYE, L.; FANTINO, M.; FERN, E.; FLETCHER, R. J.; LAMBERT, J.; ROBERFROID, M.; SPECTER, S.; WESTNHOFER, J.; WESTERTERP-PLANTENGA, M. S. Functional food science and behaviour and psychological functions. *British Journal of Nutrition*, v. 80, p. 419-435, 1998.

BERMEJO, R.; ACIÉN, F. G.; IBÁÑEZ, M. J.; FERNANDEZ, J. M.; MOLINA, E.; ALVAREZ-PEZ, J. M. Preparative purification of B – phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by expanded-bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 790, p. 317-325, 2003.

BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. C-Phycocyanin: A potente peroxy scavenger *in vivo* and *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research*, v. 275, p. 20-25, 2000.

CHEN, F.; ZHANG, Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using fed-batch system. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 20, p. 221-224, 1997.

CORZO, O.; BRACHO, N.; MARJAL, J. Color change kinetics of sardine sheets during vacuum pulse osmotic dehydration. *Journal of Food Engineering*, v. 75, p. 21–26, 2006.

COSTA, J. A. V.; COZZA, K. L.; OLIVEIRA, L.; MAGAGNIN, G. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 17, p. 439-442, 2002.

DIERCKX, S.; HUYGHEBAERT, A. Effects of sucrose and sorbitol on the gel formation of a whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, v. 16, p. 489-497, 2002.

DUTTA, D.; DUTTA, A.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. Rheological characteristics and thermal degradation kinetics of beta-carotene in pumpkin puree. *Journal of Food Engineering*, v. 76, p. 538–546, 2006.

FOGLER, H. S. *Elements of chemical reaction engineering*. 2ª edição. New York: Prentice Hall, 1999.

FUKUI, K.; SAITO, T.; NOGUCHI, Y.; KODERA, Y.; MATSUSHIMA, A.; NISHIMURA, H., INADA, Y. Relationship between color development and protein conformation in the phycocyanin molecule. *Dyes and Pigments*, v. 63, p. 89-94, 2003.

GUNAWAN, M. I., & BARRINGER, S. A. Green color degradation of blanched broccoli (*Brassica oleracea*) due to acid and microbial growth. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 24, p. 253–263, 2000.

HILL, C. G. *An introduction to chemical engineering kinetics & reactor design*. 2ª edição. Madison: John Wiley & Sons, 1977.

KOCA, N.; KARADENIZ, F.; BURDURLU, H. S. Effect of pH on chlorophyll degradation and colour loss in blanched green peas. *Food Chemistry*, v. 100, p. 609–615, 2006.

PETERSEN, S. B.; JONSON, V.; FOJAN, P.; WIMMER, R.; PEDERSEN, S. Sorbitol prevents the self-aggregation of unfolded lysozyme leading to an up to 13°C stabilisation of the folded form. *Journal of Biotechnology*, v. 114, p. 269–278, 2004.

REIS, A.; MENDES, A.; LOBO-FERNANDES, H.;EMPIS, J. A.; MAGGIOLY NOVAIS, J. Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp. *Bioresource Technology*, v. 66, p. 181 – 187, 1998.

ROMAY, C.; ASPEE, A.; PIZARRO, M.; LISSI, E. A. Kinetics of phycocyanine bilin groups destruction by peroxy radicals. *Free Radical Biology & Medicine*. v. 28, p. 1051-1055, 2000.

REYES, L. F.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple- and red-esh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Food Chemistry*, v. 100, p. 885–894, 2007.

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

SMITH, J. M. *Chemical engineering kinetics*. 2ª edição. Califórnia: McGraw-Hill LTDA., 1970.

STEET, J. A.; TONG, C. H. Degradation kinetics of green color and chlorophyll in peas by colorimetry and HPLC. *Journal of Food Science*, v. 61, p. 924–927, 1996.

SUN, L.; WANG, S.; QIAO Z. Chemical stabilization of phycocyanin from cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Journal of Biotechnology*, v. 121, p. 563-569, 2006.

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.

VISKARI, P. J. COLYER, C. L. Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. *Analytical of Biochemistry*, v. 319, p. 263-271, 2003.

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

WEEMAES, C. A.; OOMS, V., LOEY, A. M.; HENDRICKX, M. E. Kinetics of chlorophyll degradation and color loss in heated broccoli juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44, p. 2404–2409, 1999.

WIMMER, R.; OLSSON, M.; PETERSEN, M. T. N.; HATTI-KAUL, R.; PETERSEN, S. B.; MULLER, N. Towards a molecular level understanding of protein stabilization: the interaction between lysozyme and sorbitol. *Journal of Biotechnology*, v. 55, p. 85–100, 1997.

YOSHIDA, A.; TAKAGAKI, T.; NISHIMUNE, T. Enzyme immunoassay for phycocyanin as the main component of *Spirulina* color in foods. *Bioscience Biotechnology and Biochemical*, v. 60, p. 57-60, 1996

ZARROUK, C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima*. *Ph. D Thesis*, Paris, 1966.

## **CAPÍTULO IV**

### **CONCLUSÃO GERAL E SUGESTÕES**

## CONCLUSÕES GERAIS

Os estudos realizados durante este trabalho permitiram as seguintes conclusões:

Os SABs compostos por PEG 1500 e 8000 Da e fosfato de potássio pH 6, compostos respectivamente por 7 e 23% e 4 e 22,5%, atingiram fatores de purificação máximos de 1,6 vezes para a ficocianina, com recuperação total da proteína na fase de topo no primeiro e de 57% na mesma fase no segundo. Para os SABs formados pelo PEG de massas molares 4000 e 6000 e fosfato de potássio, compostos ambos por 4% de polímero e 21% de sal, foi possível alcançar fatores de purificação de 2,1 e 2,2 vezes, recuperando-se 100 e 73,5% da ficocianina na fase de topo, respectivamente.

Os SABs formados pelos PEG de massas molares 6000 e 8000, permitiram que se estabelecessem modelos para o fator de purificação da ficocianina, assim como o formado pelo PEG 4000, para a recuperação da mesma proteína na fase de topo. O sistema com PEG 1500 permitiu modelos para ambas variáveis e as correlações para os quatro tipos de sistemas variaram de 0,78 a 0,90.

A extração e a purificação da ficocianina em SAB polietilenoglicol/fosfato de potássio pH 6 integrando essas duas etapas permitiu obter maiores concentrações da proteína-alvo nas fases de topo dos sistemas, quando comparados aos sistemas convencionais de purificação. Os sistemas integrados compostos por 15% de PEG 1500 e 13% de fosfato de potássio e 5% de PEG 4000 e 18% de sal, alcançaram, nessa ordem, 0,73 e 0,79 de pureza, valores estes que classificam esta ficobiliproteína como de grau alimentar, superior a 0,7. As concentrações de ficocianina obtidas nas fases de topo desses dois sistemas respectivamente, 2,67 e 1,60 mg.mL<sup>-1</sup>, comparadas a 2,02 e 1,27 mg.mL<sup>-1</sup> obtidas nos sistemas convencionais, evidenciaram que o sistema composto pelo PEG 4000 foi mais eficiente que os demais pois alcançou a maior pureza conjugada a maior concentração da proteína.

O modelo cinético de desnaturação térmica da ficocianina foi validado como de primeira ordem. Entre 50 e 55 °C, o extrato aquoso de ficocianina foi mais estável a pH 6 e entre 57 e 65 °C em pH 5, sendo então, entre 50 e 65 °C, mais instável a pH 7 e, os tempos de meia-vida diminuíram a medida que a temperatura do tratamento térmico foi aumentada. As energias de ativação para os extratos de ficocianina foram de 87,35, 135,57 e 111,14 kcal/mol, respectivamente para os valores de pH 5, 6 e 7.

A adição do agente estabilizante sorbitol, entre 10 e 50% ampliou o tempo de meia-vida do extrato de ficocianina. Para o extrato de pH 5, a adição de 30% (p/p) de sorbitol

manteve cerca de 80% da concentração média da proteína e de pH 6, 30% (p/p) de sorbitol garantiu cerca de 86% ao final de 40 minutos, enquanto que para o extrato de pH 7, 50% (p/p) do mesmo agente estabilizante assegurou 85% da concentração de ficocianina em 10 minutos de tratamento térmico.

## **SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Realizar a separação da fase resultante de topo dos SABs, polietilenoglicol e ficocianina, pelo método de ultrafiltração;
- Realizar processos de purificação de ficocianina por SABs sucessivos, logo após o processo integrado que visa extrair e purificar esta ficobiliproteína, buscando o melhor resultado para a pureza;
- Promover ensaios de desnaturação a temperaturas mais elevadas, com adição de agentes estabilizantes;
- Após estudada a cinética de degradação térmica de ficocianina, aplica-lá como corante em produtos alimentícios;
- Avaliar as propriedades antioxidantes e a fluorescência da ficocianina durante o processo de desnaturação térmica;

## **CAPÍTULO V**

### **BIBLIOGRAFIA GERAL**

**BIBLIOGRAFIA GERAL**

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.

AHMED, J.; KAUR, A. SHIVHARE, U. S. Color degradation kinetics of spinach, mustard leaves and mixed puree. *Journal of Food Science*, v. 67, p. 1088-1091, 2002a.

AHMED, J.; SHIVHARE, U. S.; SANDHU, S. Thermal degradation kinetics of carotenoids and visual color of papaya puree. *Journal of Food Science*, v. 67, p. 2692–2695, 2002b.

ALBERTSON, P. A. Partitioning of cell particles and macromolecules. New York: John Wiley & Sons, 1986.

ALMEIDA, M. S.; KURTENBACH, E. Como purificar proteínas?. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 24, p. 30-35, 2002.

ASENJO, J. A. Industrial prospects os aqueous two-phase processes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 59, p. 119-125, 1994.

ÁVILA, I. M. L. B.; SILVA, C. L. M. Modelling kinetics of thermal degradation of colour in peach puree. *Journal of Food Engineering*, v. 39, p. 161-166, 1999.

BACK, J. F.; OAKENFULL, D.; SMITH, M. B. Increased thermal stability of proteins in the presence and sugars e polyols. *Biochemistry*, v. 18, p. 5191-5196, 1979.

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

BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits os *Spirulina*. *Journal of Applied Phycology*, v. 5, p. 235-241, 1993.

BELLISLE, F.; BLUNDELL, T. E.; DYE, L.; FANTINO, M.; FERN, E.; FLETCHER, R. J.; LAMBERT, J.; ROBERFROID, M.; SPECTER, S.; WESTNHOFER, J.; WESTERTERP-PLANTENGA, M. S. Functional food science and behaviour and psychological functions. *British Journal of Nutrition*, v. 80, p. 419-435, 1998.

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

- 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  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. *Journal of Chromatography*, v. 778, p. 441-450, 1997.
- BERMEJO, R.; ALVAREZ-PEZ, J. M.; ACIÉN FERNAÁNDEZ, F. G.; MOLINA GRIMA, E. Recovery of pure B – phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology*, v. 93, p. 73 – 85, 2002.
- BERMEJO, R.; ACIÉN, F. G.; IBÁNEZ, M. J.; FERNANDEZ, J. M.; MOLINA, E.; ALVAREZ-PEZ, J. M. Preparative purification of B – phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by expanded-bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 790, p. 317-325, 2003.
- BERMEJO, R.; RUIZ, E.; ACIÉN, F. G. Recovery of B – phycoerythrin using expanded bed adsorption chromatography. *Enzyme and Microbial Technology*, on-line, 2006.
- BHAT, B. B.; GAIKWAD, N. M.; MADYASTHA, K. M. Hepatoprotective effect of C-Phycocyanin: protection for carbon tetrachloride and R-(1)-Pulegone-mediated hepatotoxicity in rats. *Biochemical Biophysical Research Communication*, v. 249, p. 428-431, 1998.
- BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. C-Phycocyanin: A potente peroxy scavenger *in vivo* and *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research*, v. 275, p. 20-25, 2000.
- BIERAU, H.; ZHANG, Z.; LYDDIATT, A. Direct process integration of cell disruption and fluidised bed adsorption for the recovery of intracellular proteins. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 74, p. 208-212, 1999.
- BRADY, J. E.; HUMISTON, G. E. *Química Geral*. Rio de Janeiro: Livros técnicos e Científicos Ed., 1986.
- BURKERT, J. M. Otimização das condições de produção da lipase por *Geotrichum candidum* NRRL – Y552. 2003. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos – Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, São Paulo).
- CASCONE, O.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Partitioning and purification of traumatin in aqueous two-phase systems. *Enzyme Microbiology and Technology*, v. 13, p. 629-635, 1991.

CHEN, F.; ZHANG, Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using fed-batch system. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 20, p. 221-224, 1997.

CHUMPITAZ, L. D. A. Separação de proteínas de soro de queijo com sistema aquoso bifásico em uma coluna de discos rotativos. 2002. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, São Paulo.

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.

CORZO, O.; BRACHO, N.; MARJAL, J. Color change kinetics of sardine sheets during vacuum pulse osmotic dehydration. *Journal of Food Engineering*, v. 75, p. 21–26, 2006.

COSTA, J. A. V.; COZZA, K. L.; OLIVEIRA, L.; MAGAGNIN, G. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 17, p. 439-442, 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.

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

DIAMOND, A.D.; HSU, J. T. Aqueous two-phase systems for biomolecule separation. *Advances Biochemical Engineering Biotechnology*, v. 47, p. 89-135, 1992.

DIERCKX, S.; HUYGHEBAERT, A. Effects of sucrose and sorbitol on the gel formation of a whey protein isolate. *Food Hydrocolloids*, v. 16, p. 489-497, 2002.

DUARTE, M.C.T.; PORTUGAL, E.P.; PONEZI, A.N.; BIM, M.A.; TAGLIARI, C.V.; FRANCO, T.T. Production and purification of alkaline xylanases. *Bioresource Technology*, v. 68, p. 49-53, 1999.

DUARTE FILHO, P. F. M. Crescimento da cianobactéria *Spirulina platensis* em diferentes configurações de fotobiorreator e condições de cultivo. 2001. Dissertação (Mestrado em

Engenharia de Alimentos) – Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

DUTTA, D.; DUTTA, A.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. Rheological characteristics and thermal degradation kinetics of beta-carotene in pumpkin puree. *Journal of Food Engineering*, v. 76, p. 538–546, 2006.

EDWARDS, M. R.; HAUER, C.; STACK, R. F.; EISELE, L. E.; MACCOLL, R. Thermophilic C-phycocyanin: effect of temperature, monomer stability and structure. *Biochimica et Biophysica ACTA*, v. 1321, p. 157-164, 1997.

ESTRADA, J. E. P.; BESCÓS, P. B.; VILLAR DEL FRESNO, A. M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Il Farmaco*, v. 56, p. 497-500, 2001.

FOGLER, H. S. *Elements of chemical reaction engineering*. 2ª edição. New York: Prentice Hall, 1999.

FUKUI, K.; SAITO, T.; NOGUCHI, Y.; KODERA, Y.; MATSUSHIMA, A.; NISHIMURA, H., INADA, Y. Relationship between color development and protein conformation in the phycocyanin molecule. *Dyes and Pigments*, v. 63, p. 89-94, 2003.

GAUTAM, S.; SIMON, L. Partitioning of  $\alpha$ -glucosidase from *Trichoderma reesei* in poly(ethylene glycol) and potassium phosphate aqueous two-phase systems: Influence of pH and temperature. *Biochemical Engineering Journal*, v. 30, p. 104 -108, 2006.

GEKKO, K.; ITO, H. Competing solvent effects of polyols and guanidine hydrochloride on protein stability. *Journal of Biochemistry*, v. 107, p. 572-577, 1990.

GERLSMA, S. Y.; STUUR, E. R. The effect of polyhydric and monohydric alcohols on the heat-induced reversible denaturation of lysozyme. *International Journal of Peptide Protein Research*, v. 4, p. 377-393, 1972.

GUNAWAN, M. I., & BARRINGER, S. A. Green color degradation of blanched broccoli (*Brassica oleracea*) due to acid and microbial growth. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 24, p. 253–263, 2000.

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

HILL, C. G. *An introduction to chemical engineering kinetics & reactor design*. 2ª edição. Madison: John Wiley & Sons, 1977.

HO, P. L.; KITAHARA, E.; OGAWA, D. M. O.; SILVA, A. R. B. P.; RAMOS, C. R. R.; NASCIMENTO, A. L. T. O. A arte de purificar proteínas: Uma nova tecnologia cromatográfica para uso biotecnológico. *Biotecnologia*, v. 13, p. 24-26, 2000.

HOEK, V. D.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge University Press, 1995.

HUSTEDT, H.; KRONER, K. H.; KULA, M. R. Applications of phase partitioning in biotechnology. In: BROOKS, D. E.; WALTER, H.; FISHER, D. *Partitioning in aqueous two-phase systems*. Orlando, Academic Press, 1985.

IWATA, K.; INAYAMA, T.; KATO, T. Effects of *Spirulina platensis* on fructose-induced hyperlipidemia in rats. *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science*, v. 40, p. 463-467, 1987.

IWATA, K.; INAYAMA, T.; KATO, T. Effects of *Spirulina platensis* on plasma lipoprotein lipase activity in fructose-induced hyperlipidemic rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v. 36, p. 165-171, 1990.

JENSEN, S.; KNUTSEN, G. Influence of light and temperature on photoinhibition of photosynthesis in *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, v. 5, p. 195-204, 1993.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. Kinetic models of activity for  $\beta$ -galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 34, p. 33-40, 2004.

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.

KHURI, A. I.; CORNELL, J. A. *Response surface design and analysis*. New York: Marcel Dekker Inc., 1987.

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

KOCA, N.; KARADENIZ, F.; BURDURLU, H. S. Effect of pH on chlorophyll degradation and colour loss in blanched green peas. *Food Chemistry*, v. 100, p. 609-615, 2006.

KULA, M. R.; KRONER, K. H.; HUSTEDT. Purification of Enzymes by liquid-liquid extraction. *Advances Biochemical Engineering and Biotechnology*, v. 24, p. 73-118, 1982.

LAHORE, H. M. F.; MIRANDA, M. V.; FRAILE, E. R.; BONINO, M. J. B. J.; CASCONI, O. Partition behaviour and purification of *Mucor bacilliformis* acid protease in aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, v. 30, p. 615-621, 1995.

LEE, J. C.; TIMASHEFF, S. N. The stabilization of proteins by sucrose. *Journal of Biology and Chemistry*, v. 256, p. 7193-7201, 1981.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica*. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

MACCOL, R. Cyanobacterial phycobilisomes. *Journal of Structural Biology*, v. 124, p. 311-334, 1998.

MARCOS, J. C.; FONSECA L. P.; RAMALHO, M. T.; CABRAL, J. M. S. Variation of penicillin acylase partition coefficient with phase volume ratio in poly(ethylene glycol)-sodium citrate aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, v. 711, p. 295-299, 1998.

MARCOS, J. C.; FONSECA L. P.; RAMALHO, M. T.; CABRAL, J. M. S. Partial purification of penicillin acylase from *Escherichia coli* in poly(ethylene glycol)-sodium citrate aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, v. 734, p. 15-22, 1999.

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.

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.

MINKOVA, K. M.; TCHERNOV, A. A.; TCHORBADJIEVA, M. I.; FOURNADJIEVA, S. T.; ANTOVA, R. E.; BUSHEVA, M. C. Purification of C-phycocyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. *Journal of Biotechnology*, v. 116, p. 55-59, 2003.

MIRANDA, M. S.; CINTRA, R. G.; BARROS, S. B. M.; MANCINI FILHO, J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 31, p. 1075-1079, 1998.

MORAES, C. C. Extração e purificação de ficocianina de *Spirulina platensis*. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande - RS.

PADYANA, A. K.; BATH, V. B.; MADYASTHA, K.M.; RAJASHANKAR, K. R. Crystal structure of a light-harvesting protein C-phycoyanin from *Spirulina platensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 282, p. 893-898, 2001.

PATEL, A.; MISHRA, S.; PAWAR, R.; GHOSH, P. K. Purification and characterization of C-phycoyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expression & Purification*, v. 40, p. 248-255, 2005.

PATIL, G.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycoyanin. *Biochemical Engineering Journal*, on-line, 2006. <http://www.sciencedirect.com> [accessado em 4 dezembro 2006].

PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAN, E. C. S. *Microbiologia V.1*. São Paulo: MacGraw-Hill Ltda, 1980.

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

PELIZER, L. H.; DANESI, E. D. G.; RANGEL, C. O.; SASSANO, C. E. N.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. MORAES, I. O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. *Journal of Food Engineering*, v. 56, p. 371-375, 2003.

PETERSEN, S. B.; JONSON, V.; FOJAN, P.; WIMMER, R.; PEDERSEN, S. Sorbitol prevents the self-aggregation of unfolded lysozyme leading to an up to 13°C stabilisation of the folded form. *Journal of Biotechnology*, v. 114, p. 269–278, 2004.

QUOC, K. P.; PASCAUD, M. Effects of dietary gamma-linolenic acid on the tissue phospholipid fatty acid composition and the synthesis of eicosanoids in rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*, v. 40, p. 99-108, 1996.

RAMAMOORTHY, A.; PREMAKUMARI, S. Effect of supplementation of *Spirulina* on hypercholesterolemic patients. *Journal Food Science Technology*, v. 33 (2), p. 124-128, 1996.

REDDY, C. M.; BHAT, V. B.; KIRANMAI, G.; REDDY, M. N. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by c-phycoyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. *Biochemical and Biophysical Research*, v. 277, p. 599-603, 2000.

REDDY, M. C.; SUBHASHINI, S. V. K.; MAHIPAL, S. V. K.; BHAT, V. B.; REDDY, P. S.; KIRANMAI, G.; MADYASTHA, K. M.; REDDANA, P. C-Phycocyanin, a selective

cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 304, p. 385-392, 2003.

REGULY, J. C. *Biotecnologia dos Processos Fermentativos*. Vol. III. Pelotas: Editora Universitária UFPel, 2000.

REIS, A.; MENDES, A.; LOBO-FERNANDES, H.; EMPIS, J. A.; MAGGIOLY NOVAIS, J. Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp. *Bioresource Technology*, v. 66, p. 181-187, 1998.

REYES, L. F.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple- and red-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Food Chemistry*, v. 100, p. 885–894, 2007.

RICHMOND, A. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Boston: CRC Press, ISBN 0-8493-3240-0, 1990.

RIMBAU, V.; CAMINS, A.; ROMAY, C.; GONZÁLEZ, R. Protective effects of C-phycoyanin against kaunic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, v. 276, p. 75-78, 1999.

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

RITO-PALOMARES, M.; LYDDIATT, A. Process integration using aqueous two-phase partition for the recovery of intracellular protein. *Chemical Engineering Journal*. v. 87, p. 313-319, 2002.

RITO-PALOMARES, M. Practical Application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. *Journal of Chromatography B*, v. 807, p. 3-11, 2004.

ROMAY, C.; ARMESTO, J.; REMIREZ, D.; GONZALEZ, R.; LEDON, N.; GARCIA, I. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoyanin from blue-green algae. *Inflammation Research*, v. 47, p. 36-41, 1998.

ROMAY, C.; ASPEE, A.; PIZARRO, M.; LISSI, E. A. Kinetics of phycocyanine bilin groups destruction by peroxy radicals. *Free Radical Biology & Medicine*. v. 28, p. 1051-1055, 2000.

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

SANTOS, R. C. Influência da temperatura, iluminância e taxa de aeração na concentração de biomassa da cianobactéria *Spirulina platensis*. 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande - RS.

SARADA, R.; PILLAI, M. G.; RAVISHANKAR, G. A. Phycocyanin from *Spirulina* sp: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry*, India, v. 34, p. 795-801, 1999.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial*. Editora Edgard Blucher LTDA. São Paulo, Brasil, 2001.

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

SILVEIRA, S. T. Extração de ficocianina de *Spirulina platensis* e sua purificação por cromatografia de troca iônica. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande - RS.

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

SMITH, J. M. *Chemical engineering kinetics*. 2ª edição. Califórnia: McGraw-Hill LTDA., 1970.

SONI, B.; KALAWADIA, B.; TRIVEDI, U.; MADAMWAR, D. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata* – isolated from the rocky shores of Bet Dwarka, Gurajat, India. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 2017-2023, 2006.

- SPALDING, B. J. Downstreamprocessing: key to slashing production costs 100 fold. *Bio/Technology*, v. 9, p. 229-232, 1991.
- SPELZINI, D.; FARRUGGIA, B.; PICÓ, G. Features of the acid protease partition in aqueous-two phase systems of polyethylene glycol-phosphate: Chymosin and pepsin. *Journal of Chromatography B*, v. 821, p. 60-66, 2005
- STEET, J. A.; TONG, C. H. Degradation kinetics of green color and chlorophyll in peas by colorimetry and HPLC. *Journal of Food Science*, v. 61, p. 924–927, 1996.
- SUN, L.; WANG, S.; QIAO Z. Chemical stabilization of phycocyanin from cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Journal of Biotechnology*, v. 121, p. 563-569, 2006.
- TORRES-DÚRAN, P. V.; MIRANDA-ZAMORA, R.; PAREDES-CARBAJAL, M. C.; MASCHER, D.; BLÉ-CASTILLO, J.; DÍAZ-ZAGOYA, J. C.; JUAREZ-OROPEZA, M. A. Studies on the preventive effect of *Spirulina maxima* on fatty liver development induced by carbon tetrachloride, in the rat. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 64, p. 141-147, 1999.
- TREVAN, M. O.; BOFFEY, S.; GOULDING, K. H.; STANBURY, P. *Biotechnologia: Principios Biológicos*. Editorial Acribia. Zaragoza, 1990.
- UEDAIRA, H.; UEDAIRA, H. The effects of sugars on the thermal denaturation of lysozyme. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, v. 53, p. 2451-2455, 1980.
- 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.
- VISKARI, P. J. COLYER, C. L. Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. *Analytical of Biochemistry*, v. 319, p. 263-271, 2003.
- VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor & Francis, 1997.
- WEEMAES, C. A.; OOMS, V., LOEY, A. M.; HENDRICKX, M. E. Kinetics of chlorophyll degradation and color loss in heated broccoli juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44, p. 2404–2409, 1999.
- WIMMER, R.; OLSSON, M.; PETERSEN, M. T. N.; HATTI-KAUL, R.; PETERSEN, S. B.; MULLER, N. Towards a molecular level understanding of protein stabilization: the interaction between lysozyme and sorbitol. *Journal of Biotechnology*, v. 55, p. 85–100, 1997.

WALTER, H.; BROOKS, D.; FISHER, D. *Partitioning in aqueous two-phase systems, Theory, Methods, Uses and Applications to Biotechnology*. Orlando: Academic Press, 1985.

YANG, H. N.; LEE, E. H.; KIM, H. M. *Spirulina platensis* inhibits anaphylactic reaction. *Life Sciences*, v. 61, p. 1237-1244, 1997.

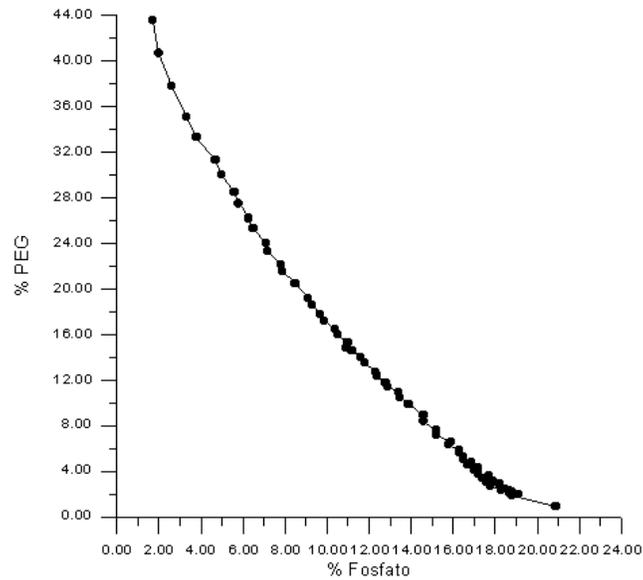
YOSHIDA, A.; TAKAGAKI, T.; NISHIMUNE, T. Enzyme immunoassay for phycocyanin as the main component of *Spirulina* color in foods. *Bioscience Biotechnology and Biochemical*, v. 60, p. 57-60, 1996

ZARROUK, C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima*. *Ph. D Thesis*, Paris, 1966.

## **CAPÍTULO VI**

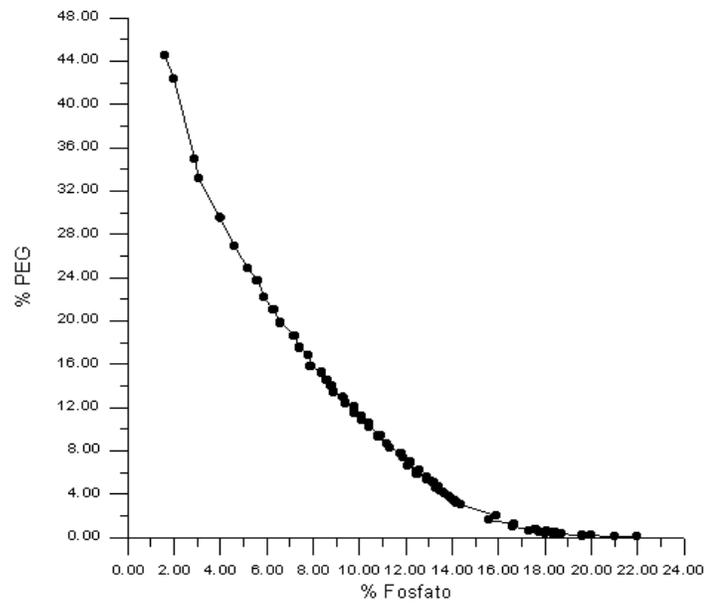
### **ANEXOS**

## ANEXO 1 – CURVAS BINODAIS



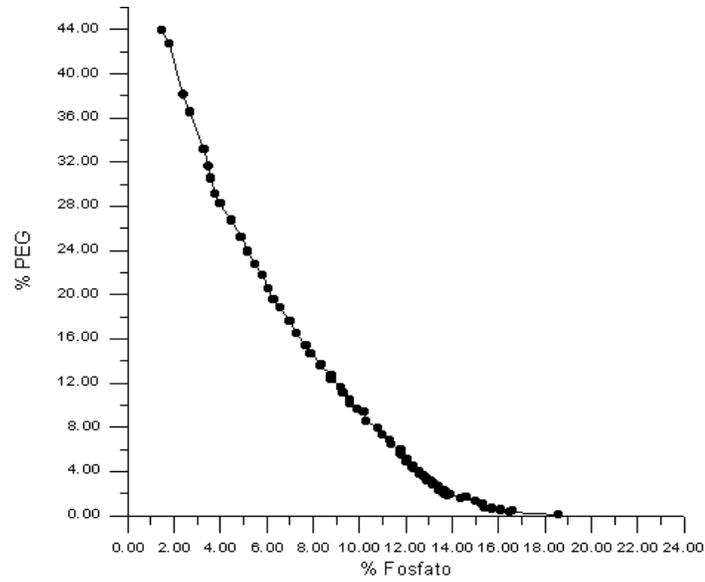
Fonte: MINAMI, 1997.

**Figura 1** – Curva binodal para o PEG 1500 e fosfato de potássio 30% (p/p), pH 6.



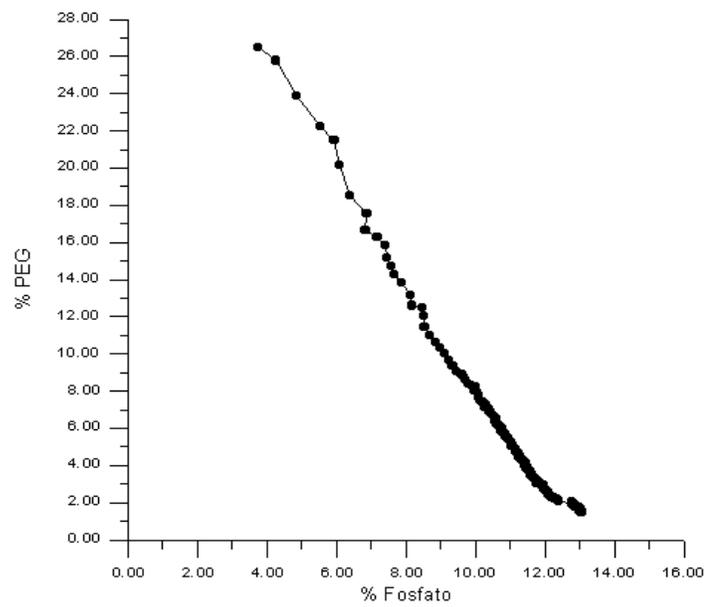
Fonte: MINAMI, 1997.

**Figura 2** – Curva binodal para o PEG 4000 e fosfato de potássio 30% (p/p), pH 6.



Fonte: MINAMI, 1997.

**Figura 3** – Curva binodal para o PEG 6000 e fosfato de potássio 30% (p/p), pH 6.



**Figura 4** – Curva binodal para o PEG 8000 e fosfato de potássio 30% (p/p), pH 6.

## ANEXO 2 – TESTES DE TUKEY

**Tabela 1** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 5 (%), após 30 segundos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	90,15	97,73	98,38	98,72	99,92	99,59
{1} 0		0,0004*	0,0003*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{2} 10	0,0004*		0,9917	0,9496	0,4508	0,6075
{3} 20	0,0003*	0,9917		0,9996	0,7660	0,8933
{4} 30	0,0002*	0,9496	0,9996		0,8978	0,9707
{5} 40	0,0002*	0,4508	0,7660	0,8978		0,9997
{6} 50	0,0002*	0,6075	0,8933	0,9707	0,9997	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 2** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 5 (%), após 60 segundos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	88,0	92,2	93,6	96,0	96,5	98,9
{1} 0		0,0623	0,0116*	0,0007*	0,0005*	0,0002*
{2} 10	0,0623		0,9088	0,1122	0,0642	0,0031*
{3} 20	0,0116*	0,9088		0,4643	0,3014	0,0159*
{4} 30	0,0007*	0,1122	0,4643		0,9992	0,3153
{5} 40	0,0005*	0,0642	0,3014	0,9992		0,4822
{6} 50	0,0002*	0,0031*	0,0159*	0,3153	0,4822	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 3** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 5 (%), após 90 segundos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	89,2	90,7	90,7	94,5	93,9	96,3
{1} 0		0,0005*	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{2} 10	0,0005*		0,9412	0,0656	0,1163	0,0103*
{3} 20	0,0002*	0,9412		0,2640	0,4192	0,0460*
{4} 30	0,0002*	0,0656	0,2640		0,9991	0,8698
{5} 40	0,0002*	0,1163	0,4192	0,9991		0,6947
{6} 50	0,0002*	0,0103*	0,0460*	0,8698	0,6947	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 4** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 5 (%), após 120 segundos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	77,9	80,6	87,77	92,2	92,2	92,6
{1} 0		0,9068	0,0302*	0,0019*	0,0020*	0,0015*
{2} 10	0,9068		0,1575	0,0095*	0,0096*	0,0072*
{3} 20	0,0302*	0,1575		0,5568	0,5608	0,4639
{4} 30	0,0019*	0,0095*	0,5568		1,0000	1,0000
{5} 40	0,0020*	0,0096*	0,5608	1,0000		1,0000
{6} 50	0,0015*	0,0072*	0,4639	1,0000	1,0000	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 5** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 5 (%), após 180 segundos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	85,5	84,3	84,5	92,5	91,0	93,0
{1} 0		0,9956	0,9982	0,0891	0,2370	0,0593
{2} 10	0,9956		1,0000	0,0394*	0,1117	0,0260*
{3} 20	0,9982	1,0000		0,0453*	0,1274	0,0299*
{4} 30	0,0891	0,0394*	0,0453*		0,9863	0,9998
{5} 40	0,2370	0,1117	0,1274	0,9863		0,9449
{6} 50	0,0593	0,0260*	0,0299*	0,9998	0,9449	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 6** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 5 (%), após 5 minutos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	61,1	79,2	82,4	88,6	88,9	91,0
{1} 0		0,0013*	0,0004*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{2} 10	0,0013*		0,9113	0,0979	0,0842	0,0288*
{3} 20	0,0004*	0,9113		0,4163	0,3711	0,1479
{4} 30	0,0002*	0,0979	0,4163		1,0000	0,9735
{5} 40	0,0002*	0,0842	0,3711	1,0000		0,9852
{6} 50	0,0002*	0,0288*	0,1479	0,9735	0,9852	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 7** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 5 (%), após 10 minutos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	43,3	64,2	72,3	83,2	84,2	91,1
{1} 0		0,0031*	0,0003*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{2} 10	0,0031*		0,4181	0,0064*	0,0042*	0,0004*
{3} 20	0,0003*	0,4181		0,1628	0,1076	0,0068*
{4} 30	0,0002*	0,0064*	0,1628		0,9998	0,4338
{5} 40	0,0002*	0,0042*	0,1076	0,9998		0,5784
{6} 50	0,0002*	0,0004*	0,0068*	0,4338	0,5784	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 8** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 5 (%), após 20 minutos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	33,5	55,2	68,2	81,6	83,7	89,6
{1} 0		0,0004*	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{2} 10	0,0004*		0,0166*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{3} 20	0,0002*	0,0166*		0,0136*	0,0045*	0,0004*
{4} 30	0,0002*	0,0002*	0,0136*		0,9818	0,1996
{5} 40	0,0002*	0,0002*	0,0045*	0,9818		0,4874
{6} 50	0,0002*	0,0002*	0,0004*	0,1996	0,4874	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 9** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 5 (%), após 30 minutos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	27,7	48,6	62,9	79,6	82,9	89,1
{1} 0		0,0026*	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{2} 10	0,0026*		0,0367*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{3} 20	0,0002*	0,0367*		0,0139*	0,0036*	0,0005*
{4} 30	0,0002*	0,0002*	0,0139*		0,9556	0,2466
{5} 40	0,0002*	0,0002*	0,0036*	0,9556		0,6595
{6} 50	27,71	48,56	62,89	79,56	82,92	89,06

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 10** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 6 (%), após 30 segundos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	93,8	99,1	100,0	99,9	98,8	97,0
{1} 0		0,0026*	0,0003*	0,0009*	0,0044*	0,0745
{2} 10	0,0026*		0,5878	0,9668	0,9992	0,3722
{3} 20	0,0003*	0,5878		0,9469	0,4009	0,0285*
{4} 30	0,0009*	0,9668	0,9469		0,8645	0,1205
{5} 40	0,0044*	0,9992	0,4009	0,8645		0,5539
{6} 50	0,0745	0,3722	0,0285*	0,1205	0,5539	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 11** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 6 (%), após 60 segundos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	66,2	95,0	97,5	99,4	96,9	96,6
{1} 0		0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{2} 10	0,0002*		0,9312	0,5735	0,9733	0,9887
{3} 20	0,0002*	0,9312		0,9726	1,0000	0,9994
{4} 30	0,0002*	0,5735	0,9726		0,9299	0,8856
{5} 40	0,0002*	0,9733	1,0000	0,9299		1,0000
{6} 50	0,0002*	0,9887	0,9994	0,8856	1,0000	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 12** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 6 (%), após 90 segundos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	60,6	91,3	96,8	98,8	97,5	97,2
{1} 0		0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{2} 10	0,0002*		0,1185	0,0212*	0,0682	0,0842
{3} 20	0,0002*	0,1185		0,8969	0,9993	0,9999
{4} 30	0,0002*	0,0212*	0,8969		0,9790	0,9574
{5} 40	0,0002*	0,0682	0,9993	0,9790		1,0000
{6} 50	0,0002*	0,0842	0,9999	0,9574	1,0000	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 13** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 6 (%), após 120 segundos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	41,9	87,0	94,2	98,4	98,1	96,9
{1} 0		0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{2} 10	0,0002*		0,0077*	0,0003*	0,0003*	0,0006*
{3} 20	0,0002*	0,0077*		0,1727	0,2256	0,5586
{4} 30	0,0002*	0,0003*	0,1727		1,0000	0,9402
{5} 40	0,0002*	0,0003*	0,2256	1,0000		0,9760
{6} 50	0,0002*	0,0006*	0,5586	0,9402	0,9760	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 14** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 6 (%), após 180 segundos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	37,6	77,7	90,1	96,1	97,4	96,7
{1} 0		0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{2} 10	0,0002*		0,0006*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{3} 20	0,0002*	0,0006*		0,0859	0,0282*	0,0507
{4} 30	0,0002*	0,0002*	0,0859		0,9824	0,9995
{5} 40	0,0002*	0,0002*	0,0282*	0,9824		0,9992
{6} 50	0,0002*	0,0002*	0,0507	0,9995	0,9992	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 15** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 6 (%), após 5 minutos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	33,9	68,5	84,9	93,4	95,0	97,2
{1} 0		0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{2} 10	0,0002*		0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{3} 20	0,0002*	0,0002*		0,0004*	0,0002*	0,0002*
{4} 30	0,0002*	0,0002*	0,0004*		0,7992	0,0922
{5} 40	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,7992		0,5407
{6} 50	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0922	0,5407	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 16** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 6 (%), após 10 minutos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	29,6	54,4	76,6	89,7	93,4	95,9
{1} 0		0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{2} 10	0,0002*		0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{3} 20	0,0002*	0,0002*		0,0002*	0,0002*	0,0002*
{4} 30	0,0002*	0,0002*	0,0002*		0,2139	0,0136*
{5} 40	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,2139		0,5649
{6} 50	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0136*	0,5649	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 17** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 6 (%), após 20 minutos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	22,6	32,4	47,8	66,2	83,1	90,9
{1} 0		0,0052*	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{2} 10	0,0052*		0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{3} 20	0,0002*	0,0002*		0,0002*	0,0002*	0,0002*
{4} 30	0,0002*	0,0002*	0,0002*		0,0002*	0,0002*
{5} 40	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*		0,0254*
{6} 50	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0254*	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 18** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 6 (%), após 30 minutos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	19,6	27,5	46,0	78,9	77,9	87,7
{1} 0		0,3465	0,0003*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{2} 10	0,3465		0,0033*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{3} 20	0,0003*	0,0033*		0,0002*	0,0002*	0,0002*
{4} 30	0,0002*	0,0002*	0,0002*		0,9997	0,2421
{5} 40	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,9997		0,1581
{6} 50	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,2421	0,1581	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 19** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 7 (%), após 30 segundos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	86,3	98,1	98,4	100,0	98,9	98,4
{1} 0		0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{2} 10	0,0002*		0,9888	0,0274*	0,6935	0,9918
{3} 20	0,0002*	0,9888		0,0751	0,9500	1,0000
{4} 30	0,0002*	0,0274*	0,0751		0,2815	0,0702
{5} 40	0,0002*	0,6935	0,9500	0,2815		0,9399
{6} 50	0,0002*	0,9918	1,0000	0,0702	0,9399	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 20** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 7 (%), após 60 segundos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	49,1	92,1	93,6	96,1	95,7	96,5
{1} 0		0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{2} 10	0,0002*		0,8490	0,0624	0,1023	0,0361*
{3} 20	0,0002*	0,8490		0,3613	0,5170	0,2305
{4} 30	0,0002*	0,0624	0,3613		0,9996	0,9994
{5} 40	0,0002*	0,1023	0,5170	0,9996		0,9865
{6} 50	0,0002*	0,0361*	0,2305	0,9994	0,9865	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 21** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 7 (%), após 90 segundos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	37,6	83,6	92,6	96,2	91,4	98,8
{1} 0		0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{2} 10	0,0002*		0,0101*	0,0008*	0,0003*	0,0002*
{3} 20	0,0002*	0,0101*		0,5477	0,1321	0,0995
{4} 30	0,0002*	0,0008*	0,5477		0,8917	0,8161
{5} 40	0,0002*	0,0003*	0,1321	0,8917		1,0000
{6} 50	0,0002*	0,0002*	0,0995	0,8161	1,0000	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 22** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 7 (%), após 120 segundos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	35,8	73,6	85,2	92,2	95,1	97,0
{1} 0		0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{2} 10	0,0002*		0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{3} 20	0,0002*	0,0002*		0,0008*	0,0002*	0,0002*
{4} 30	0,0002*	0,0002*	0,0008*		0,1951	0,0145*
{5} 40	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,1951		0,6224
{6} 50	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0145*	0,6224	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 23** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 7 (%), após 180 segundos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	34,9	62,7	79,7	89,6	95,2	96,7
{1} 0		0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{2} 10	0,0002*		0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{3} 20	0,0002*	0,0002*		0,0002*	0,0002*	0,0002*
{4} 30	0,0002*	0,0002*	0,0002*		0,0010*	0,0002*
{5} 40	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0010*		0,6899
{6} 50	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,6899	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 24** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 7 (%), após 5 minutos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	33,7	52,7	62,8	78,4	88,8	93,4
{1} 0		0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{2} 10	0,0002*		0,0003*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{3} 20	0,0002*	0,0003*		0,0002*	0,0002*	0,0002*
{4} 30	0,0002*	0,0002*	0,0002*		0,0003*	0,0002*
{5} 40	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0003*		0,0808
{6} 50	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0808	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 25** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 7 (%), após 20 minutos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	28,5	33,7	47,1	62,2	77,9	89,4
{1} 0		0,0441*	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{2} 10	0,0441*		0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{3} 20	0,0002*	0,0002*		0,0002*	0,0002*	0,0002*
{4} 30	0,0002*	0,0002*	0,0002*		0,0002*	0,0002*
{5} 40	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*		0,0002*
{6} 50	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 26** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 7 (%), após 30 minutos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	22,55	29,14	39	54,76	70,1	85,37
{1} 0		0,1003	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{2} 10	0,1003		0,0087*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{3} 20	0,0002*	0,0087*		0,0003*	0,0002*	0,0002*
{4} 30	0,0002*	0,0002*	0,0003*		0,0003*	0,0002*
{5} 40	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0003*		0,0003*
{6} 50	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0003*	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 27** – Teste de Tukey para análise do efeito das diferentes concentrações de sorbitol (%p/p) na concentração relativa de ficocianina pH 6 (%), após 40 minutos de banho de imersão.

Concentração de sorbitol (%p/p)	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	20,5	28,6	37,3	54,9	71,4	85,3
{1} 0		0,0436*	0,0003*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{2} 10	0,0436*		0,0294*	0,0002*	0,0002*	0,0002*
{3} 20	0,0003*	0,0294*		0,0002*	0,0002*	0,0002*
{4} 30	0,0002*	0,0002*	0,0002*		0,0003*	0,0002*
{5} 40	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0003*		0,0009*
{6} 50	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0002*	0,0009*	

\* A diferença entre as médias do percentual de ficocianina desnaturada foi significativa ( $p \leq 0,05$ ).