

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES  
PRÓ-REITORIA DE ENSINO, PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
CAMPUS DE ERECHIM  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ANNE LUIZE LUPATINI MENEGOTTO**

**SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS DE *Spirulina platensis* E AVALIAÇÃO DAS  
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E TECNO-FUNCIONAIS**

**ERECHIM – RS**

**2020**

**ANNE LUIZE LUPATINI MENEGOTTO**

**SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS DE *Spirulina platensis* E AVALIAÇÃO DAS  
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E TECNO-FUNCIONAIS**

**Tese apresentada como quesito parcial à  
obtenção do grau de Doutor, pelo Curso de  
Pós-Graduação em Engenharia de  
Alimentos da Universidade Regional  
Integrada do Alto Uruguai e das Missões –  
Campus Erechim.**

**Orientadoras  
Dr<sup>a</sup>. Eunice Valduga  
Dr<sup>a</sup>. Juliana Steffens**

**ERECHIM – RS**

**2020**

**ANNE LUIZE LUPATINI MENEGOTTO**

**SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS DE *Spirulina platensis* E AVALIAÇÃO DAS  
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E TECNO-FUNCIONAIS**

**Tese apresentada como quesito parcial à  
obtenção do grau de Doutor, pelo Curso de  
Pós-Graduação em Engenharia de  
Alimentos da Universidade Regional  
Integrada do Alto Uruguai e das Missões –  
Campus Erechim.**

Erechim, 31 de março de 2020.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eunice Valduga – URI – Campus  
de Erechim (Orientadora)

---

Dr<sup>a</sup>. Ilizandra Fernandes – URI – Campus  
de Erechim

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Steffens – URI – Campus  
de Erechim (Orientadora)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciane Colla – UPF – Campus  
de Passo Fundo

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarisse Steffens – URI –  
Campus de Erechim

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cecilia Abirached – Universidad  
de la República

---

M541s Menegotto, Anne Luize Lupatini

Separação de proteínas de *Spirulina platensis* e avaliação das propriedades físico-químicas e tecno-funcionais / Anne Luize Lupatini Menegotto - 2020. 168 f.

Tese (doutorado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2020.

“Orientação: Dra Eunice Valduga, Dra Juliana Seffens.”

1. Processo de separação por membranas 2. Propriedades tecnofuncionais  
3. Propriedades térmicas 4. Proteína microalgal 5. Sistema aquoso bifásico  
I. Título

C.D.U.: 664

---

Catlogação na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela valiosa oportunidade e por estar sempre comigo.

À minha família, que sempre me motivou e me apoiou, além da paciência e compreensão com a minha ausência durante esta jornada. Em especial, aos meus pais, Mirian e Luiz, pelo amor e incentivo, ao meu irmão Júnior, por estar sempre torcendo pelo meu sucesso e, ao meu marido Rafael, pelo companheirismo em todos os momentos.

À URI – Campus de Erechim e ao programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, pela oportunidade e suporte para o meu desenvolvimento profissional e, as agências de fomento à pesquisa, em especial a CAPES pela concessão de bolsas de doutorado e de missões de estudos.

Às Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eunice Valduga e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Steffens, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos, conselhos e compreensão. Foi um privilégio ter a amizade e as orientações de vocês.

À Sandy (Dr<sup>a</sup>. Ilizandra Fernandes), pelos ensinamentos, auxílio no laboratório, paciência e amizade.

À Bianca e Dani, por me auxiliarem como bolsistas de iniciação científica, nos longos dias de trabalho no laboratório.

Aos colegas da “Salinha de Estudos”, aos quais não conseguirei nomear, mas que deixaram suas marcas de amizade e companheirismo.

Às amigas que vou levar para vida toda, Naira, Maiara, Letícia e Karine, pela companhia, companheirismo, amizade, além dos diversos conselhos.

À Universidade de Caxias do Sul (UCS), em especial à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mára Zeni Andrade e à MSc. Jocelei Duarte, que me acolheram com tanto carinho e permitiram a execução dos experimentos de processos de separação por membranas.

À Universidade de Passo Fundo (UPF), em nome da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciane Colla pela disponibilidade no auxílio das análises antioxidantes, além do incentivo e dos conselhos.

À *Universidad de la República* (UDELAR), em especial à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cecilia Abirached pela oportunidade concedida e pela receptibilidade, além do auxílio na realização das análises das propriedades funcionais das frações proteicas de *S. platensis*.

À Universidade Tiradentes (UNIT), em nome do Prof. Dr. Elton Franceschi pela realização das análises térmicas das frações proteicas de *S. platensis*.

Aos componentes da banca de avaliação deste trabalho, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarisse Steffens, Dr<sup>a</sup>. Ilizandra Fernandes, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Luciane Colla, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cecilia Abirached, por aceitarem fazer parte da banca examinadora e pelas correções e sugestões pertinentes ao aprimoramento deste trabalho.

A todos os professores e funcionários da Pós-Graduação e Departamento de Engenharia de Alimentos da URI, em especial Rosicler, Rosi, Vera e Liane.

Obrigada a todos que de alguma forma me auxiliaram nesta jornada.

*Construí amigos, enfrentei derrotas, venci  
obstáculos, bati na porta da vida e disse-lhe:  
Não tenho medo de vivê-la!*

(Augusto Cury)

## RESUMO

A *Spirulina platensis* é reconhecida pelo seu elevado conteúdo proteico (55 a 77%), com potencial nutricional e tecnológico. As proteínas de *S. platensis* podem suprir a insuficiência nutricional da alimentação humana, além de compor formulações de alimentos, aprimorando seu processamento. Com a presença de compostos bioativos, a fração proteica dessa microalga também pode promover efeitos benéficos no organismo, retardando ou evitando o aparecimento de doenças. Neste contexto, a purificação, recuperação e/ou a concentração de proteínas de *S. platensis* se tornam altamente interessante para a indústria alimentícia, bem como a química e a farmacêutica. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar distintos processos de separação de proteínas, visando a concentração de proteínas de *S. platensis*. Para tal foram avaliados processos de separação por membranas (PSM) e sistemas aquoso bifásicos (SAB), além da caracterização das frações em termos de proteína total, concentração de ficocianina, atividade antioxidante, cor e tamanho molar por eletroforese (SDS-PAGE). Conforme a obtenção das melhores condições de purificação, as frações proteicas foram desidratadas por liofilização e submetidas a avaliação de sua estrutura secundária, propriedades tecno-funcionais (solubilidade e propriedades emulsificantes) e térmicas. A primeira parte do trabalho consistiu na avaliação do PSM, a condição maximizada (membrana tipo fibra oca, 50 kDa, fluxo tangencial com 1,5 bar, associada com uma diafiltração (UF)) permitiu a obtenção das frações concentrado e permeado com 81,75% e 61,20% de proteínas em base seca (bs), respectivamente. Com a fração retida pela membrana foi possível produzir um concentrado proteico com 90% de atividade antioxidante, 142 mg.L<sup>-1</sup> de ficocianina, tamanho molecular de 5-15 e 100 kDa e a maior estabilidade de emulsão e solubilidade ocorreu em pH 7,0. Na segunda etapa deste trabalho realizou-se o estudo de precipitação de proteínas, o qual, indicou faixas de concentração de sais e solventes que podem ser aplicados no SAB; os sais fosfato de potássio e citrato de sódio e o solvente etanol foram os que apresentaram melhor performance em concentrar as proteínas de *S. platensis* (sobrenadante). Em seguida, realizou-se o estudo de dois SAB, compostos por fosfato de potássio/etanol e citrato de sódio/etanol, respectivamente. O SAB composto por citrato de sódio apresentou melhor desempenho; utilizando-se 19,5% de citrato de sódio e 29% de etanol foi possível obter 1,3 de fator de purificação e 78% de recuperação. De acordo com essas condições realizou-se a associação do SAB com PSM, permitindo o aumento da recuperação (~87%) e da pureza (~1,5). As frações topo e fundo do SAB composto com citrato de sódio/etanol, e o concentrado do SAB/PSM apresentaram 61, 5,9 e 69% de proteínas (bs), 110, 12 e 101 mg.L<sup>-1</sup> de ficocianina e 42, 23 e 40% de atividade antioxidante, respectivamente. A fração topo e o concentrado do sistema associado apresentaram coloração verde azulada e a fundo amarela intensa, e as bandas proteicas mais evidentes ocorreram em 5 e 10-15 kDa. Entre as amostras obtidas nesta etapa do trabalho, a topo foi a que apresentou melhor propriedade emulsificante. A terceira etapa do trabalho consistiu no estudo de SAB compostos por polietilenoglicol (PEG) com distintos pesos molares (1500, 4000, 6000 e 8000 Da) e sal; avaliou-se sistemas compostos por PEG/fosfato de potássio e PEG/citrato de sódio. A condição mais viável de recuperação proteica ocorreu ao utilizar 16% de citrato de sódio e 18% de PEG 1500 em pH 9,0 e, possibilitou a recuperação de 75% com pureza de 1,02. Conforme dados científicos, a

concentração de proteínas de *S. platensis* pode influenciar em suas propriedades, tornando necessário o aprofundamento de técnicas com esta finalidade a fim de garantir a obtenção de uma proteína mais pura, com propriedades tecnológica, nutricional e nutracêutica. Os métodos de separação de proteínas avaliados neste estudo apresentaram importante potencial na obtenção de proteínas de *S. platensis*, sendo técnicas promissoras para aplicação industrial, eficientes e economicamente viáveis.

**Palavras-chave:** Processo de separação por membranas. Propriedades tecnofuncionais. Propriedades térmicas. Proteína microalgal. Sistema aquoso bifásico.

## ABSTRACT

*Spirulina platensis* is recognized for its high protein content (55 to 77%), with nutritional and technological potential. *S. platensis* proteins can supply the food insufficiency of human, besides composing food formulations, which may improve their processing. With the presence of bioactive compounds, the protein fraction of this microalgae can also promote beneficial effects in the human body, delaying or preventing the appearance of diseases. In this context, the purification, recovery and/or concentration of *S. platensis* protein become highly interesting for the food industry, as well as the chemical and pharmaceutical. Thus, the objective of this study was to evaluate different protein separation processes, aiming the concentration of *S. platensis* protein. For this purpose, membrane separation processes (MSP) and aqueous biphasic system (ABS) were evaluated, in addition to characterizing the fractions in terms of total protein, phycocyanin concentration, antioxidant activity, color and molar weight by electrophoresis (SDS-PAGE). According to the best purification conditions obtainment, the protein fractions were dehydrated by lyophilization and subjected to evaluation of their characteristics by secondary structure, techno-functional (solubility and emulsifying properties) and thermal properties. The first part this study consisted of evaluating the MSP, the maximized condition (hollow fiber membrane, 50 kDa of cut-off, tangential flow at 1.5 bar, associated with one diafiltration (DF)) allowed to obtain the concentrated and permeate fractions with 81, 75 and 61.20% of protein in dry weight (dw), respectively. With the fraction retained by the membrane, it was possible to produce a protein concentrate with 90% antioxidant activity, 142 mg.L<sup>-1</sup> of phycocyanin, molecular weight of 5-15 and 100 kDa, greater stability of emulsion and solubility at pH 7.0. In the second stage of this study, the protein precipitation was evaluated in order to indicate the ranges of salts and solvents concentration which could be applied in the ABS; the potassium phosphate and sodium citrate and ethanol showed the best performance in concentrating the *S. platensis* protein (supernatant). Then, the study of two ABS, composed by potassium phosphate/ethanol and sodium citrate/ethanol, respectively, were carried out. The citrate sodium/ethanol ABS showed better performance; using 19,5% sodium citrate and 29% ethanol it was possible to obtain 1.3 of purification factor and 78% of recovery. According to these conditions, the association of ABS with MSP was carried out, allowing an increase in recovery (~87%) and purity (~1.5). The top and bottom fractions of the sodium citrate/ethanol ABS, and the ABS/MSP concentrate showed 61, 5.9 and 69% protein (dw), 110, 12 and 101 mg.L<sup>-1</sup> of phycocyanin and 42, 23 and 40% of antioxidant activity, respectively. The top fraction and the concentrate of the associated system had a bluish green color and the bottom had a yellow coloration; the most evident protein bands occurred at 5 and 10-15. Among the samples obtained at this stage of the work, the top was the one with the best emulsifying properties. The third stage of this study consisted of the evaluation of several ABS composed by polyethylene glycol (PEG) with different molar weights (1500, 4000, 6000 and 8000 kDa) and salt; PEG/potassium phosphate and PEG/sodium citrate systems were evaluated. The most viable condition of protein recovery happened when it was used 16% of sodium citrate and 18% of PEG 1500 kDa at pH 9.0, and made possible the recovery of 75% and 1.02 of purity. According to scientific data, the concentration of *S. platensis* protein may influence its properties, making necessary to deepen techniques for this purpose, in order to guarantee the

achievement of a purer protein, with technological, nutritional and nutraceutical properties. The protein separation methods evaluated in this study have showed an important potential, and can be promisor techniques for industrial application, efficient and economically viable.

**Keywords:** Aqueous biphasic system. Membrane separation process. Microalgae proteins. Tecno-functional properties. Thermal properties.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1 - Imagem da microalga <i>S. platensis</i> em microscopia. ....	30
Figura 3.2 - Configurações geométricas de membranas.....	44
Figura 3.3 - Exemplo de um diagrama de fase expresso em coordenadas retangulares de um SAB formado por um polímero e um sal.....	47
Figure 4.1 - Pilot unit of membrane separation process (Laboratory of Milk and Derivates Technology (URI – Erechim, Brazil). ....	64
Figure 4.2 - Membrane 1 permeate flux at pressures 1.0, 1.5 and 2.0 bar (a), pressures influence on protein content (b), and permeate flux of three DF added in the UF (c). ....	72
Figure 4.3 - SDS-PAGE electrophoresis gel of SpPE and UF/DF samples.....	76
Figure 4.4 - FTIR Spectrum and curve-fitting with second-derivative of amide I of <i>S. platensis</i> biomass, UF/DF concentrate and permeate.....	78
Figure 4.5 - Thermogravimetric curves (a) and DSC thermogram (b) of <i>S. platensis</i> biomass, UF/DF concentrate and permeate fractions. ....	80
Figure 4.6 - Droplet surface (a), volume (b) and number (c) distribution for the emulsions prepared with a concentration of 1 mg.mL <sup>-1</sup> in 0.1 M citrate-phosphate buffer pH 4.0 and 7.0. ....	83
Figure 4.7 - Study of backscattering variation as function of the tube height for destabilization process of <i>S. platensis</i> biomass pH 4 (a) and 7.0 (b), UF/DF concentrate pH 4 (c) and 7.0 (d), and permeate pH 4.0 (e) and 7.0 (f). ....	84
Figura 5.1 - Esquema detalhado do módulo de membrana plana.....	100
Figura 5.2 - Curva de contorno para FP da fase topo do SAB composto por fosfato de potássio e etanol (a), e FP (b) e RE (c) da fase topo do SAB composto por citrato de sódio e etanol. ....	111
Figura 5.3 - Gel de eletroforese das amostras obtidas pela maximização dos SABs fosfato de potássio/etanol e citrato de sódio/etanol (a) e do SAB/PSM (b).....	117
Figura 5.4 - Espectro de FTIR das amostras topo e fundo do SAB composto por citrato de sódio e etanol e concentrado do SAB/PSM.....	118
Figura 5.5 - Curvas termogravimétricas (a) e de DSC (b) das amostras topo e fundo do SAB composto por citrato de sódio e etanol e do concentrado do SAB/PSM. ....	119

Figura 5.6 - Distribuição de tamanho de partícula em termos de área superficial (a), volume (b) e número (c) para as amostras topo, fundo e concentrado do SAB/PSM em pH 7,0.....	121
Figura 5.7 - Estudo da retrodispersão em função do comprimento do tubo de medida para avaliação da estabilidade de emulsão elaboradas com as amostras topo pH 4,0 (a) e 7,0 (b), fundo pH 4,0 (c) e 7,0 (d), concentrado SAB/PSM pH 4,0 (e) e 7,0 (f), e as constantes de desestabilização – $k_s$ e $k_h$ (g). ....	123
Figura 6.1 - Curvas de contorno para FP (a) e RE (%) (b) da fase topo do SAB PEG 1500/fosfato de potássio e para FP (c) e RE (%) (d) da fase topo do SAB PEG 1500/citrato de sódio.....	146
Figura 6.2 - Gel de eletroforese das amostras obtidas pela maximização dos SABs compostos por fosfato de potássio e PEG 1500 e citrato de sódio e PEG 1500.....	149
Figura 8.1 - Processo de obtenção do perfil de RD em função da altura da célula.....	155
Figura 8.2 - Curva binodal para etanol e fosfato de potássio. ....	155
Figura 8.3 - Curva binodal para etanol e citrato de sódio.....	156
Figura 8.4 - Fluxograma da separação das proteínas de <i>S. platensis</i> com SAB composto por etanol e sal.....	156
Figura 8.5 - Curva binodal para PEG 1500 e fosfato de potássio pH 9,0.....	157
Figura 8.6 - Curva binodal para PEG 4000 e fosfato de potássio pH 9,0.....	157
Figura 8.7 - Curva binodal para PEG 6000 e fosfato de potássio pH 9,0.....	158
Figura 8.8 - Curva binodal para PEG 8000 e fosfato de potássio pH 9,0.....	158
Figura 8.9 - Curva binodal para PEG 1500 e citrato de sódio pH 9,0.....	159
Figura 8.10 - Curva binodal para PEG 4000 e citrato de sódio pH 9,0.....	159
Figura 8.11 - Curva binodal para PEG 6000 e citrato de sódio pH 9,0.....	160
Figura 8.12 - Curva binodal para PEG 8000 e citrato de sódio pH 9,0.....	160
Figura 8.13 - Fluxograma da separação das proteínas de <i>S. platensis</i> com SAB PEG/sal. ....	161
Figura 8.14 - Comparação entre as retrodispersões (RD) das emulsões elaboradas com as amostras biomassa de <i>S. platensis</i> , concentrado e permeado do PSM, fases topo e fundo do SAB e concentrado do SAB/PSM, em pH 4,0 (a) e 7,0 (b).....	161

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Proteínas (%) em diferentes espécies de microalgas (bs). .....	28
Tabela 3.2 - Estudos da literatura sobre proteínas de <i>S. platensis</i> . .....	35
Tabela 3.3 - Estudos referentes à aplicação de diferentes técnicas de recuperação de proteínas de micro e macroalgas. ....	37
Table 4.1 - Total protein contents and permeate flux for the different membranes evaluated at 2.0 bar and 30°C. ....	70
Table 4.2 - Total protein, TOC and phycocyanin concentration, antioxidant activity and color indexes ( $L^*$ , $a^*$ and $b^*$ ) results from the SpPE, concentrate and permeate samples obtained by UF/DF. ....	74
Table 4.3 - Emulsifying parameters studied by particle size distribution ( $D_{3,2}$ and $D_{4,3}$ ) and emulsion stability ( $k_h$ and $k_s$ ). ....	86
Tabela 5.1 - Níveis das variáveis empregadas no DCCR 2 <sup>2</sup> do SAB fosfato/etanol e SAB citrato/etanol. ....	98
Tabela 5.2 - Concentração de proteína nos ensaios de precipitação utilizando diferentes proporções de sal:EPSp. ....	106
Tabela 5.3 - Concentração de proteína nos ensaios de precipitação utilizando diferentes proporções de solvente orgânico:EPSp. ....	107
Tabela 5.4 - Matriz do DCCR 2 <sup>2</sup> (valores reais e codificados) para concentração de proteínas com SAB composto por fosfato de potássio e etanol, com as respostas de FP e RE (%) para as fases topo e, Rv e Kp do sistema. ....	109
Tabela 5.5 - Matriz do DCCR 2 <sup>2</sup> (valores reais e codificados) para concentração de proteínas com SAB composto por citrato de sódio e etanol com as respostas de FP e RE (%) para as fases topo e, Rv e Kp dos sistemas. ....	109
Tabela 5.6 - Validação dos parâmetros de purificação de proteínas para os SABs compostos por fosfato de potássio e etanol e citrato de sódio e etanol. ....	113
Tabela 5.7 - Proteína total (% , bs), concentração de ficocianina ( $g.L^{-1}$ ), atividade antioxidante (%) e índices de cor ( $L^*$ , $a^*$ e $b^*$ ) das amostras obtidas pelos SABs e da combinação do SAB composto por citrato de sódio e etanol com PSM. ....	114

Tabela 6.1 - Níveis reais e codificados das variáveis estudadas nos PFs 2 <sup>2</sup> referente aos SAB composto por PEG e solução salina. ....	136
Tabela 6.2 - Níveis reais e codificados das variáveis estudadas nos DCCRs. ....	137
Tabela 6.3 - Matrizes dos PFs 2 <sup>2</sup> (valores reais e codificados) para concentração de proteínas de <i>S. platensis</i> com SABs compostos por PEG (1500, 4000, 6000 e 8000) e fosfato de potássio com as respostas de FP e RE (%) para as fases topo e, Rv e Kp dos sistemas. ....	140
Tabela 6.4 - Matrizes dos PFs 2 <sup>2</sup> (valores reais e codificados) para concentração de proteínas de <i>S. platensis</i> com SABs compostos por PEG (1500, 4000, 6000 e 8000) e citrato de sódio com as respostas de FP, RE (%) para as fases topo e, Rv e Kp dos sistemas. ....	141
Tabela 6.5 – Efeitos das variáveis do PF 2 <sup>2</sup> para as fases topo dos SABs compostos por PEG de diferentes pesos molares e soluções salinas.....	142
Tabela 6.6 - Matriz do DCCR 2 <sup>2</sup> (valores reais e codificados) para concentração de proteínas de <i>S. platensis</i> com SAB composto por fosfato de potássio e PEG 1500 Da com as respostas de FP e RE (%) para fase topo e, Rv e Kp do sistema. ....	144
Tabela 6.7 - Matriz do DCCR 2 <sup>2</sup> (valores reais e codificados) para concentração de proteínas de <i>S. platensis</i> com SAB composto por citrato de sódio e PEG 1500 Da com as respostas de FP e RE (%) para fase topo e, Rv e Kp do sistema. ....	144
Tabela 6.8 - Validação dos parâmetros de recuperação de proteínas de <i>S. platensis</i> estudados nos SABs aplicando PEG 1500 Da e fosfato de potássio e PEG 1500 Da e citrato de sódio. ....	147
Tabela 8.1 - Matriz do DCCR 2 <sup>2</sup> (valores reais e codificados) para purificação de proteínas de <i>S. platensis</i> com SAB composto por fosfato de potássio e etanol com as respostas FP e RE para fase fundo. ....	162
Tabela 8.2 - Matriz do DCCR 2 <sup>2</sup> (valores reais e codificados) para purificação de proteínas de <i>S. platensis</i> com SAB composto por citrato de sódio e etanol com as respostas FP e RE para fase fundo. ....	162
Tabela 8.3 - Coeficientes de regressão do DCCR 2 <sup>2</sup> para avaliação das respostas obtidas pela fase topo do SAB composto por fosfato de potássio e etanol. ....	163

Tabela 8.4 - Coeficientes de regressão do DCCR 2 <sup>2</sup> para avaliação das respostas obtidas pela fase topo do SAB composto por citrato de sódio e etanol. ....	163
Tabela 8.5 - ANOVA para os modelos quadráticos para predição das respostas fator de purificação e recuperação para fase topo do SAB fosfato de potássio e etanol. ....	163
Tabela 8.6. ANOVA para os modelos quadráticos para predição das respostas de fator de purificação e recuperação para fase topo do SAB citrato de sódio e etanol. ....	164
Tabela 8.7 - Matriz do PF 2 <sup>2</sup> (valores reais e codificados) para concentração de proteínas de <i>S. platensis</i> com SAB PEG/fosfato de potássio com as respostas de FP e RE (%) para fase fundo.....	165
Tabela 8.8 - Matriz do PF 2 <sup>2</sup> (valores reais e codificados) para concentração de proteínas de <i>S. platensis</i> com SAB PEG/citrato de sódio com as respostas de FP e RE (%) para fase fundo.....	166
Tabela 8.9 - Matriz do DCCR 2 <sup>2</sup> (valores reais e codificados) para concentração de proteínas de <i>S. platensis</i> com SAB PEG 1500/fosfato de potássio e as respostas de FP e RE (%) para fase fundo. ....	167
Tabela 8.10 - Matriz do DCCR 2 <sup>2</sup> (valores reais e codificados) para concentração de proteínas de <i>S. platensis</i> com SAB PEG 1500/citrato de sódio e as respostas de FP e RE (%) para fase fundo. ....	167
Tabela 8.11 - Coeficientes de regressão do DCCR 2 <sup>2</sup> para avaliação das respostas obtidas pela fase topo do SAB composto por fosfato de potássio e PEG 1500. ....	168
Tabela 8.12 - Coeficientes de regressão do DCCR 2 <sup>2</sup> para avaliação das respostas obtidas pela fase topo do SAB composto por citrato de sódio e PEG 1500. ....	168
Tabela 8.13 - ANOVA para os modelos quadráticos para predição das respostas de PP, FP e RE para fase topo do SAB fosfato de potássio e PEG 1500. ....	168
Tabela 8.14 - ANOVA para os modelos quadráticos para predição das respostas de PP, FP e RE para fase topo do SAB citrato de sódio e PEG 1500. ....	169

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABS aqueous biphasic system

ABTS Ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzoatiazolina-6-sulfônico) – *2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid*

ANOVA Análise de Variância – *Analysis of Variance*

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BS *Backscattering Profile*

bs Base Seca

C Concentrado – *Concentrate*

CF *Concentration Factor*

DCCR Delineamento Composto Central Rotacional

DF Diafiltração – *Diafiltration*

DR Desvio Relativo

DSC Calorimetria Diferencial de Varredura – *Differential Scanning Calorimetry*

DTG *Derivative of the Thermogravimetric*

dw *Dry Weight*

EPSp Extrato Proteico de *S. platensis*

F Fundo

FAO *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FP Fator de Purificação

FTIR Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

HDL *High Density Lipoprotein*

$k_h$  Constante de Velocidade de Variação – *Constant of Speed of Variation*

$K_p$  Coeficiente de partição

$k_s$  Taxa Constante de Variação – *Rate Constant of Variation*

LDL *Low Density Lipoprotein*

MSP *Membrane Separation Processes*

P Permeado – *Permeate*

PEG Polietilenoglicol

PEO Poli(óxido de etileno)

PF Planejamentos Fatorial

pI Ponto Isoelétrico

PSM Processo de Separação por Membranas

RD retrodispersão

RE Recuperação proteica

Rv Razão volume

*S. platensis Spirulina platensis*

SAB Sistema Aquoso Bifásico

SAB/PSM SAB combinado com PSM

SDS-PAGE Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio –  
*Polyacrylamide Gel-Sodium Dodecyl Sulfate*

SpPE *S. platensis protein extract*

ssp. Subespécie

T Topo

TGA Analisador Termogravimétrico – *Thermogravimetric Analyzer*

TOC *Total Organic Carbon*

UF Ultrafiltração – *Ultrafiltration*

UF/DF Ultrafiltração combinada com Diafiltração – *Ultrafiltration combined with  
Diafiltration*

$\Delta H$  *Enthalpy*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>22</b>
1.1	Referências bibliográficas	24
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
2.1	Geral	27
2.2	Específicos	27
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>28</b>
3.1	Proteínas de microalgas	28
3.2	<i>Spirulina platensis</i>	29
3.2.1	Utilização de <i>S. platensis</i>	31
3.2.2	Proteínas da <i>S. platensis</i>	32
3.3	Técnicas de recuperação de proteínas de microalgas	36
3.3.1	Extração e rompimento celular	39
3.3.2	Métodos de separação	42
3.4	Estado da arte: Considerações finais	49
3.5	Referências bibliográficas	50
<b>4</b>	<b>Thermic and techno-functional properties of <i>Spirulina platensis</i> protein fractions obtained by membrane separation process</b>	<b>59</b>
4.1	Introduction	60
4.2	Material and Methods	61
4.2.1	Materials	61
4.2.2	Protein concentration by membrane separation process	62
4.2.3	Physicochemical and tecno-functional characterization	64
4.2.4	Statistical analysis	68
4.3	Results and Discussion	69
4.3.1	Protein concentration by membrane separation process (MSP)	69
4.3.2	Physicochemical and tecno-functional characterization	72
4.4	Conclusions	86
4.5	References	87

<b>5</b>	<b>Concentração de proteínas de <i>Spirulina platensis</i> utilizando sistema aquoso bifásico.....</b>	<b>94</b>
5.1	Introdução.....	95
5.2	Material e Métodos.....	96
5.2.1	Material.....	96
5.2.2	Extração de proteínas da biomassa de <i>S. platensis</i> .....	96
5.2.3	Separação de proteínas utilizando sais e solventes.....	97
5.2.4	Maximização do processo de recuperação de proteínas de <i>S. platensis</i> aplicando SAB Sal/Álcool.....	98
5.2.5	Sistema combinado: SAB e PSM.....	100
5.2.6	Caracterização físico-química e tecno-funcional das frações do SAB e SAB/PSM.....	101
5.2.7	Análise estatística.....	105
5.3	Resultados e Discussão.....	105
5.3.1	Separação de proteínas utilizando sais e solventes.....	105
5.3.2	Recuperação de proteínas utilizando SAB com Sal/Álcool.....	108
5.3.3	Caracterização físico-química e tecno-funcional.....	114
5.4	Conclusão.....	125
5.5	Referências Bibliográficas.....	125
<b>6</b>	<b>Concentração de proteínas de <i>Spirulina platensis</i> utilizando sistema aquoso bifásico composto por polietilenoglicol e fosfato de potássio/citrato de sódio ..</b>	<b>132</b>
6.1	Introdução.....	133
6.2	Material e Métodos.....	134
6.2.1	Material.....	134
6.2.2	Extração de proteínas da biomassa de <i>S. platensis</i> .....	134
6.2.3	Recuperação de proteínas de <i>S. platensis</i> aplicando SAB PEG/Sal.....	135
6.2.4	Caracterização das frações proteicas – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	138
6.2.5	Análise estatística.....	138
6.3	Resultados e Discussão.....	138

6.3.1	Maximização da recuperação de proteínas de <i>S. platensis</i> aplicando SAB PEG/Sal.....	138
<b>6.4</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>149</b>
<b>6.5</b>	<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>150</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>153</b>
7.1	Conclusões.....	153
7.2	Sugestões para trabalhos futuros .....	154
<b>8</b>	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>155</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As proteínas são a fração mais abundante presente nas microalgas, seguido por carboidratos e/ou fibras e lipídios (MATOS et al., 2017). Muitas espécies de microalgas vêm sendo consideradas como excelente fonte alternativa de proteína (ROY; PAL, 2015; LUPATINI et al., 2017b), as quais podem suprir a insuficiência nutricional da alimentação humana, diversificando e aumentando as fontes de proteínas não convencionais (BARKA; BLECKER, 2016). Entre as microalgas, a *Spirulina* spp. é considerada uma excelente fonte de proteínas, apresentando teores entre 55,8 a 77% em peso seco (BARKA; BLECKER, 2016).

Neste contexto a *Spirulina platensis* se sobressai, não somente pelo seu apreciável percentual proteico, mas também pela sua facilidade de produção em larga escala, sendo um organismo fotossintético (LUPATINI et al., 2017). Esta microalga é uma cianobactéria filamentosa com alto potencial para aplicação industrial, considerada um ingrediente de alto valor agregado (MENEGOTTO et al., 2019; BENELHADJ et al., 2016); seu valor nutritivo está relacionado com a qualidade dos aminoácidos, ácidos graxos, minerais e vitaminas presentes (EL-TANTAWY, 2015), podendo ser considerada uma das mais ricas fontes de vitamina B12 (KUMUDHA; SARADA, 2015). Além disso, cerca de 90% dos seu conteúdo em proteínas é biodisponível e pode ser facilmente incorporado pelo corpo humano (DEMISU; BENTI, 2018).

Além do seu alto valor nutricional, podendo ser comparada a fontes proteicas vegetais e animais (LUPATINI et al., 2017), as proteínas de *S. platensis*, podem apresentar diferentes propriedades nutracêuticas, com capacidade em melhorar a saúde e reduzir o risco de doenças. Estudos vêm relatando que compostos bioativos, tais como os pigmentos ficocianina e carotenoides, podem apresentar atividades antioxidantes (KONÍCKOVÁ et al., 2014; SU et al., 2014), que são associadas com alguns efeitos terapêuticos, como propriedades anticâncer (SILVA et al., 2017) e anti-inflamatória (XIA et al., 2016). Ainda, estas proteínas podem compor formulações de alimentos, aprimorando os processos tecnológicos, devido às suas apreciáveis características tecno-funcionais, tais como propriedades espumantes, emulsificantes, gelificantes, entre outras (MENEGOTTO et al., 2019; BENELHADJ et al., 2016). Contudo, o aprimoramento

do estudo destas propriedades ainda se faz necessário com o intuito do melhor entendimento do comportamento destas proteínas; assim como pesquisas sobre o aproveitamento dessas proteínas na alimentação humana (LUPATINI et al., 2017).

As propriedades das proteínas podem ser afetadas de acordo com o método de extração e/ou purificação utilizado para obter este componente (JAMBRAK et al., 2008). Desta forma, além do estudo de técnicas de extração de proteínas de *S. platensis*, os quais envolvem o rompimento celular e exposição dos componentes ao meio (SAFI et al., 2014), o estudo de distintos métodos de purificação destas proteínas é de grande importância. Diferentes técnicas de separação de proteínas são relatadas, entre elas, tratamentos enzimáticos, precipitações baseadas na solubilidade das proteínas, incluindo *salting-out* e precipitação isoelétrica (CHAIKLAHAN et al., 2011), métodos cromatográficos (PONTIS, 2016), uso de solventes orgânicos (BARBA; GRIMI; VOROBIEV, 2015), sistemas aquosos bifásicos (SAB) (AMID; ABDUL MANAP; MUSTAFA, 2013) e processos de separação por membranas (PSM) (NAGARAJ; PATIL; BIRADAR, 2006).

Para tal fim, PSM e SAB vem apontando potencial. Ambos, são responsáveis por separar bioconstituintes, mantendo sua estrutura nativa (OOI et al., 2009; BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011); além de serem econômicos ao comparar com outros sistemas, como os cromatográficos, por exemplo. O PSM pode ser associado a diafiltração (DF), o que se refere a adição de água ou outro solvente à alimentação do processo, e tem contribuído com o aumento da concentração proteica (ABEL et al., 2018). Além disso, a combinação entre PSM e SAB pode garantir a maior recuperação proteica e a redução de impurezas (GÓMEZ-LOREDO; GONZÁLEZ-VALDEZ; RITO-PALOMARES, 2014).

Diante do exposto acredita-se que este trabalho irá contribuir nas seguintes vertentes do conhecimento: *i)* exploração da fração proteica de *S. platensis*; *ii)* geração de novos conhecimentos acerca do comportamento de concentração e separação de proteínas desta microalga; *iii)* avaliação de propriedades físico-químicas e tecnofuncionais das proteínas de *S. platensis*.

Esta tese de doutorado está estruturada em capítulos, sendo que os resultados obtidos estão divididos em três artigos (capítulo 4, 5 e 6). O capítulo 4 está escrito na

língua inglesa, sendo este o artigo o qual já foi submetido a uma revista científica. A estrutura do trabalho segue a seguinte forma:

- Capítulo 1: Introdução do trabalho, apontando as justificativas do estudo.
- Capítulo 2: Objetivos, geral e específicos.
- Capítulo 3: Revisão bibliográfica a respeito da microalga *S. platensis*, sua fração proteica, bem como alguns métodos de obtenção e recuperação destas proteínas.
- Capítulo 4: Thermic and techno-functional properties of *Spirulina platensis* protein fractions obtained by membrane separation process.
- Capítulo 5: Concentração de proteínas de *Spirulina platensis* utilizando sistema aquoso bifásico.
- Capítulo 6: Purificação de proteínas de *Spirulina platensis* utilizando sistema aquoso bifásico composto de polietilenoglicol e fosfato de potássio/citrato de sódio.
- Capítulo 7: Conclusões e sugestões para trabalhos futuros.
- Capítulo 8: Apêndices.

## 1.1 Referências bibliográficas

ABEL, J.; KOSKY, A.; BALL, N.; BACON, H.; KAUSHILK, R.; KLEEMANN, G. R. A small-scale process for predictiong donnan and volume exclusion effects during ultrafiltration/diafiltration process development. **Jornal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, p. 1296–1303, 2018.

AMID, M.; ABDUL MANAP, M. Y.; MUSTAFA, S. Purification of pectinase from mango (*Mangifera indica* L. cv. Chokanan) waste using an aqueous organic phase system: A potential low cost source of the enzyme. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 931, p. 17–22, 2013.

BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, p. 381–386, 2011

BARBA, F. J.; GRIMI, N.; VOROBIEV, E. Evaluating the potential of cell disruption technologies for green selective extraction of antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana Bertoni* leaves. **Journal of Food Engineering**, v. 149, p. 222–228, 2015.

BARKA, A.; BLECKER, C. Microalgae as a potential source of single-cell proteins. A review. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, v. 20, p. 427–436, 2016.

BENELHADJ, S.; GHARSALLAOUI, A.; DEGRAEVE, P.; ATTIA, H.; GHORBEL, D. Effects of pH on the functional properties of *Arthrospira (Spirulina) platensis* protein isolate. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1056-1063, 2016.

CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; LOHA, V.; TIA, S.; BUNNAG, B. Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7159–7164, 2011.

DEMISU, D., G.; BENTI, B. D. Applications of *Arthrospira platensis* as an alternative source of food, maintaining nutritional security and awareness creation; there by reducing problems of malnutrition in the society. **World News of Natural Sciences**, v. 19, p. 1–8, 2018.

EL-TANTAWY, W. H. Antioxidant effects of *Spirulina* supplement against lead acetate-induced hepatic injury in rats. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, p. 0–4, 2015.

GÓMEZ-LOREDO, A.; GONZÁLEZ-VALDEZ, J.; RITO-PALOMARES, M. Insights on the downstream purification of fucoxanthin, a microalgal carotenoid, from aqueous two-system stream exploiting ultrafiltration. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, p. 1517–1523, 2014.

JAMBRAK, A. R.; MASON, T. J.; LELAS, V.; HERCEG, Z.; HERCEG, I. L. Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. **Journal of Food Engineering**, v. 86, p. 281–287, 2008.

KONÍCKOVÁ, R.; VANKOVÁ, K.; VANÍKOVÁ, J.; VÁNCOVÁ, K.; MUCHOVÁ, L.; SUBHANOVA, I.; ZADINOVÁ, M.; ZELENKA, J.; DVORÁK, A.; KOLÁR, M.; STRNAD, H.; RIMPELOVÁ, S.; RUMML, T.; WONG, R. J.; VÍTEK, L. Natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds. **Annals of Hepatology**, v. 13, p. 273–283, 2014.

KUMUDHA, A.; SARADA, R. Effect of different extraction methods on vitamin B12 from blue green algae, *Spirulina platensis*. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 6, p. 1–6, 2015.

LUPATINI, A. L.; COLLA, L. M.; CANAN, C.; COLLA, E. Potential application of microalgae *Spirulina platensis* as a protein source. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, p. 724–732, 2017b.

MATOS, J.; CARDOSO, C.; BANDARA, N. M.; AFONSO, C. Microalgae as a healthy ingredient for functional food: A review. **Food & Function**, v. 8, p. 2672–2685, 2017.

MENEGOTTO, A. L. L.; SOUZA, L. E. S.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V.; SEHN, E.; BITTENCOURT, P. R. S.; FLORES, É. L. M.; CANAN, C.; COLLA, E. Investigation of techno-functional and physicochemical properties of *Spirulina platensis* protein concentrate for food enrichment. **LWT – Food and Science Technology**, v. 114, p. 108267, 2019.

NAGARAJ, N.; PATIL, B. S.; BIRADAR, P. M. Osmotic membrane distillation – a brief review. **International Journal of Food Engineering**, v. 2, p. 1–22, 2006.

OOI, C. W.; TEY, B. T.; HII, S. L.; MAZLINA, S.; KAMAL, S. M. M.; LAN, J. C. W.; ARIFF, A.; LING, T. C. Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1083–1087, 2009.

PONTIS, H. G. **Methods for analysis of carbohydrate metabolism in photosynthetic organisms. Plants, green algae, and cyanobacteria.** London: Elsevier Inc., 2016.

ROY, S. S.; PAL, R. Microalgae in aquaculture: A review with special references to nutritional value and fish dietetics. **Proceedings of the Zoological Society**, v. 68, p. 1–8, 2015.

SAFI, C.; URSU, A. V.; LAROCHE, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; PONTALIER, P.-Y.; VACA-GARCIA, C. Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. **Algal Research**, v. 3, p. 61–65, 2014.

SILVA, E. F.; FIGUEIRA, F. S.; LETTNIN, A. P.; CARRETT-DIAS, M.; FILGUEIRA, D. M. B.; KALIL, S.; TRINDADE, G. S.; VOTTO, A. P. S. C-Phycocyanin: Cellular targets, mechanisms of action and multi drug resistance in cancer. **Pharmacological Reports**, v. 70, p. 75–80, 2017.

SU, C. H.; LIU, C. S.; YANG, P. C.; SYU, K. S.; CHIUH, C. C. Solid-liquid extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis*: Kinetic modeling of influential factors. **Separation and Purification Technology**, v. 123, p. 64-68, 2014.

XIA, D.; LIU, B.; XIN, W.; LIU, T.; SUN, J.; LIU, N.; QIN, S.; DU, S. Protective effects of C-phycocyanin on alcohol-induced subacute liver injury in mice. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, p. 765–772, 2016.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar métodos de separação de proteínas afim de concentrar proteínas da microalga *S. platensis*, visando a caracterização das frações proteicas obtidas, por meio de propriedades físico-químicas e emulsificantes e atividade antioxidante.

### 2.2 Específicos

Os objetivos específicos/metasp estão assim delineados:

- a) Aplicar PSM para concentrar proteínas de *S. platensis* avaliando o desempenho de diferentes membranas de ultrafiltração (UF), pressões e associação com diafiltração (DF), além de caracterizar as frações proteicas em termos de proteína total, carbono orgânico total, concentração de ficocianina, atividade antioxidante, peso molecular e índices de cor;
- b) Realizar o aumento de escala da UF/DF e determinar propriedades físico-químicas (análise da estrutura proteica por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e perfil térmico) e tecno-funcionais (solubilidade proteica e propriedades emulsificantes) das frações proteicas desidratadas;
- c) Aplicar delineamento composto central rotacional (DCCR) para avaliar os SAB compostos por fosfato de potássio/etanol e citrato de sódio/etanol e associar a condição maximizada com PSM, além de caracterizar as frações por meio de análise de proteína total, concentração de ficocianina, atividade antioxidante, peso molecular, índices de cor, estrutura proteica por FTIR, propriedades térmicas e emulsificantes;
- d) Aplicar estratégias de planejamentos de experimentos para avaliar o comportamento de distintos SAB, compostos por polietilenoglicol (PEG) com diferentes massas molares (1500, 4000, 6000 e 8000 Da) e sal (fosfato de potássio e citrato de sódio), além de determinar o tamanho molecular das proteínas por eletroforese.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é apresentada a revisão de literatura sobre as características de proteínas de microalgas, enfatizando a microalga *S. platensis*, sua fração proteica, e suas principais características. Além disso, são descritas algumas técnicas de recuperação de proteínas, abrangendo tanto a etapa de extração proteica como a de purificação.

#### 3.1 Proteínas de microalgas

As elevadas concentrações de proteínas de diversas espécies de microalgas as tornam uma fonte não convencional deste componente (CHEAH et al., 2016; SOLETTTO et al., 2005), além da sua alta qualidade que pode ser comparável a demais proteínas vegetais e animais (LUPATINI et al., 2017b). Neste contexto, muitos dados referentes ao percentual de proteínas em microalgas são encontrados na literatura científica; assim para uma visão geral, na Tabela 3.1 estão descritos os teores de proteínas (base seca – bs) de algumas microalgas.

Tabela 3.1 - Proteínas (%) em diferentes espécies de microalgas (bs).

Microalga	Proteína (%)	Referência
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	41-47	Wang et al. (2014)
<i>Chlorella ovalis</i>	~ 11	Slocombe et al. (2013)
<i>Chlorella vulgaris</i>	~ 50	Safi et al. (2014)
<i>Dunaliella primolecta</i>	~ 12	Slocombe et al. (2013)
<i>Muriellopsis</i> sp.	~ 45	López et al. (2010)
<i>Monodopsis subterranea</i>	~ 17	Slocombe et al. (2013)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	~ 46	Safi et al. (2014)
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	~ 50	Safi et al. (2017)
<i>Porphyridium aerugeneum</i>	~ 32	Tibbetts, Milley e Lall (2015)
<i>Porphyridium cruentum</i>	~ 57	Safi et al. (2014)
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	~ 55	López et al. (2010)
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	Becker (2007)
	55-77	Barka e Blecker (2016)
<i>Synechocystis aquatilis</i>	~ 30	López et al. (2010)
<i>Tetraselmis chuii</i>	~ 46	Tibbetts, Milley e Lall (2015)

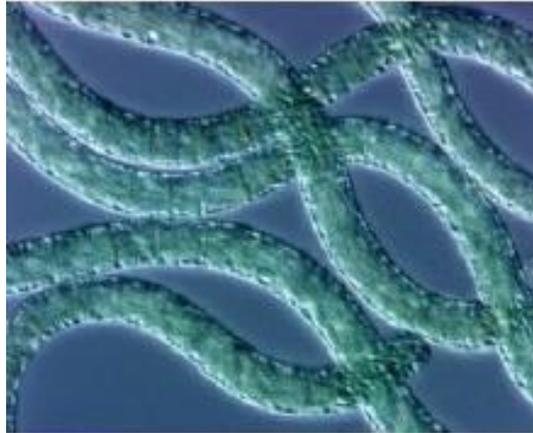
Existe grande variação nos percentuais de proteínas de microalgas, em função de gênero, espécie e, principalmente, devido às diversas variações nas condições de cultivo (GODLEWSKA et al., 2017; BARKA; BLECKER, 2016). A temperatura, pH, luminosidade e a disponibilidade de nutrientes podem resultar em alterações na composição centesimal da microalga (COCA et al., 2015; FERREIRA et al., 2012; COLLA et al., 2007); sendo possível conduzir cultivos específicos com o intuito de produzir microalgas com elevada concentração de certo componente (SALLA et al., 2016).

Além disso, o método analítico utilizado para determinação proteica também pode ser responsável pela variação deste componente (BARKA; BLECKER, 2016). De acordo com López et al. (2010) o método recomendado para determinação das proteínas totais presentes em microalgas é o método de determinação de nitrogênio total, sendo por Kjeldahl (AOAC, 2016) ou por análises elementares, onde a concentração de proteínas é o resultado da multiplicação do teor total de nitrogênio e do fator de conversão de nitrogênio em proteínas. Estes métodos especificam melhor os resultados do que, por exemplo, o método descrito por Lowry et al. (1951) que quantifica somente as proteínas solúveis, levando a necessidade de um tratamento prévio da biomassa de microalga para promover o rompimento celular, disponibilizando todo o conteúdo proteico; a qualidade deste tratamento, também, pode comprometer os resultados obtidos (BARKA; BLECKER, 2016).

### **3.2 *Spirulina platensis***

A *Spirulina*, também conhecida como *Arthrospira*, é uma microalga pertencente ao reino Bactéria, divisão Cianobactéria, da classe Cianofíceas e da família *Oscillatoriaceae*. Esta espécie de microalga apresenta filamentos helicoidais com comprimento entre 200-300 µm e largura entre 5-10 µm, sendo de fácil cultivo em água, com alta tolerância para pH alcalino e altas temperaturas, além disso sua parede celular pode ser facilmente rompida (HABIB et al., 2008; RANGEL-YAGUI et al., 2004; CHRONAKIS; GALATANU; NYLANDER, 2000). Existem 15 espécies (classificações) desta microalga, sendo uma delas a *S. platensis* (Figura 3.1) (HABIB et al., 2008).

Figura 3.1 - Imagem da microalga *S. platensis* em microscopia.



Fonte: Mazokopakis et al. (2008).

No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) permite a comercialização desta microalga, isolada ou em mistura com outros ingredientes, desde que o produto final no qual a mesma tenha sido adicionada esteja devidamente registrado e se enquadre nas categorias de alimentos com alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde ou substâncias bioativas. Além disso, especificações dos ingredientes e informações sobre a espécie de alga e seu local de cultivo devem estar informadas no rótulo (BRASIL, 2009).

A composição centesimal (bs) da *S. platensis*, quando cultivada em meio repleto de nutrientes, pode variar entre 46 a 63% de proteínas, 8 a 14% de carboidratos e 4 a 9% de lipídios, sendo o restante composto por minerais e fibras (BECKER, 2007). Além do seu elevado conteúdo proteico, a *S. platensis* é considerada uma das fontes mais ricas de provitamina A ( $\beta$ -caroteno) e de ferro absorvível; ainda, pode apresentar altos níveis de vitaminas (complexo B, C, D e E) e outros minerais (sódio, potássio, cálcio, cobre, magnésio, manganês, fósforo e zinco), compostos fenólicos, ácido gamicólico e outros ácidos graxos essenciais (BELAY et al., 1993; HABIB et al., 2008). Também possui importantes pigmentos fotossintéticos, como clorofila A, luteína,  $\beta$ -caroteno, ficocianina e aloficocianina, o que a classifica como uma microalga verde-azulada (CHEN; ZHANG; GUO, 1996).

De tal modo, a *S. platensis* pode ser considerada um alimento completo, principalmente devido suas características nutricionais, bem como a variedade de

nutrientes que a compõe, contendo componentes que não são sintetizados pelo organismo humano (PHANG et al., 2000).

### 3.2.1 Utilização de *S. platensis*

O consumo de *S. platensis* na alimentação humana ocorre há anos, principalmente pelo seu alto teor proteico e sua apreciável composição de aminoácidos (DEMIR; TÜKEL, 2010); índios de diferentes tribos já realizavam refeições com esta microalga (SPOLAORE et al., 2006; BERTOLDI; SANT'ANA; OLIVEIRA, 2008). No século 21, muitas empresas começaram a produzir esta microalga com finalidade de comercialização como um suplemento alimentar, disponibilizado em lojas de alimentos naturais distribuídas em todo o mundo (BELAY, 2002). O uso de cápsulas desta microalga está relacionado a benefícios como melhora da constipação gastrointestinal, auxílio no emagrecimento e auxílio na circulação sanguínea (EL-TANTAWY, 2015). Neste contexto, a *S. platensis* (em pó, tabletes, extratos ou cápsulas) é comercializada como um alimento natural e/ou um suplemento alimentar que, além do seu consumo isolado, pode ser adicionado em doces, massas, bebidas, entre outros (AUGUSTINI; SOETRISNANTO; MA'RUF, 2017; SOLETTTO et al., 2005).

Alguns estudos também descrevem diversos benefícios da aplicação de microalgas na alimentação animal (HOLMAN; MALAU-ADULI, 2012); que podem ser diretamente incorporadas na ração animal na forma de biomassa ou extratos (MADEIRA et al., 2017). Dogan et al. (2016) estudaram a utilização de *S. platensis* na alimentação de codornas e verificaram importantes efeitos nos parâmetros séricos e na qualidade de seus ovos, reduzindo o colesterol LDL (*Low Density Lipoprotein*) e aumentando o HDL (*High Density Lipoprotein*). Ainda, a aplicação de *S. platensis* como ingrediente favorece o ganho de peso de animais ruminantes como cordeiros e vacas leiteiras (MADEIRA et al., 2017).

Além disso, devido a sua apreciável composição de ácidos graxos essenciais, a *S. platensis* pode ser um componente da indústria de cosméticos, através do uso da microalga em diferentes produtos para cuidados do rosto e da pele, por exemplo, cremes

anti-idade e rejuvenescedores, protetores solares e produtos para o cabelo (SPOLAORE et al., 2006; STOLZ; OBERMAYER, 2005).

Outros estudos indicam que a aplicação de *S. platensis*, pode ir além do seu consumo e uso humano e/ou animal, indicando a aplicabilidade desta microalga na área ambiental, incluindo remoção da matéria orgânica e metais tóxicos de efluentes, e produção de biocombustíveis (SCHMITZ; DAL MAGRO; COLLA, 2012). Mezzomo et al. (2010) verificaram o cultivo de *S. platensis* em efluente suíno, verificando a eficiência desta microalga na remoção de DQO (demanda química de oxigênio) e fósforo, destacando-a como uma solução para o impacto ambiental gerado pela descarga de efluentes em fontes naturais. Zhu et al. (2014) destacam o potencial de microalgas como matéria-prima para produção de bioetanol; de acordo com Becker (2007), a *S. platensis* pode acumular entre 8 a 14% de carboidratos (bs), levando ao rendimento teórico em etanol de 40 a 70 g.kg<sup>-1</sup> de biomassa.

### 3.2.2 Proteínas da *S. platensis*

A *S. platensis* é uma das mais ricas fontes proteicas de origem microbiana, seu conteúdo proteico pode ser comparado com outras fontes proteicas, como de carnes, ovo, leite e soja (LUPATINI et al., 2017b; BECKER, 2007). Somando a isto, esta microalga também apresenta conteúdo balanceado de aminoácidos nas proporções recomendadas pela FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) (MENEGOTTO et al., 2019).

Além disso, a *S. platensis* apresenta percentuais de ficobiliproteínas, que são pigmentos com capacidade de receber luz para desenvolvimento da fotossíntese (HORVÁTH et al., 2013); sua estrutura é constituída por polipeptídios cromóforos contendo subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  ligados a resíduos de cisteína de uma apoenzima (CHAIKLAHAN; CHIRASUWAN; BUNNAG, 2012). As ficobiliproteínas de microalgas são classificadas em três grupos: ficoeritrina, aloficocianina e ficocianina (SANTIAGO-SANTOS et al., 2004).

Entre os grupos citados, a ficocianina é frequentemente utilizada na indústria de alimentos e de cosméticos como um corante natural com coloração azulada. Devido seu

potencial antioxidante, a presença de deste pigmento também é associada à efeitos terapêuticos, como anticâncer (SILVA et al., 2017) e propriedades anti-inflamatórias (XIA et al., 2016). A fração proteica da *S. platensis* pode conter cerca de 20% de ficocianina, sendo uma excelente fonte deste pigmento (SU et al., 2014).

Ainda, as proteínas de *S. platensis* também podem ser hidrolisadas a peptídeos bioativos, que representam específicas sequências de aminoácidos com atividade biológica e diversos efeitos na saúde humana (OVANDO et al., 2018; VO; RYU; KIM, 2013), podendo apresentar atividades antioxidante, anti-hipertensiva, anticoagulante, anti-diabética e antiobesidade (NAJAFIAN; BABJI, 2012; BETORET et al., 2011; RAJANBABU; CHEN, 2011).

O peso molecular das proteínas de *S. platensis* pode variar entre 14,4 a 116 kDa, sendo que as bandas mais evidentes podem ser observadas entre 20,1 e 43 kDa (CHRONAKIS; GALATANU; NULANDER, 2000). Também, pela análise de eletroforese, é possível verificar bandas características da ficocianina; conforme Kumar et al. (2014) e Chaiklahan et al. (2011) as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  apresentam massa molecular de 16-18,4 e 17-21,3 kDa, respectivamente. Rajakumar e Muthukumar (2018) destacam as bandas próximas à 47 e 95 kDa são características da proteína clorofila e da proteína de ligação da membrana nuclear, respectivamente.

Além das características nutricionais das proteínas de *S. platensis*, as mesmas também podem ser um importante componente em formulações de alimentos, devido as suas apreciáveis propriedades tecno-funcionais, tais como propriedades emulsificantes e espumantes, capacidade de absorção de água e óleo e capacidade gelificante (MENGOTTO et al., 2019; BENELHADJ et al., 2016). Neste contexto, sua solubilidade também vem sendo estudada, apresentando-se mais solúvel em pHs alcalinos (entre 8 a 10) e menos solúvel em pH 3, o qual corresponde ao ponto isoelétrico (pI) da fração proteica desta microalga (MENGOTTO et al., 2019; BENELHADJ et al., 2016; CHRONAKIS; GALATANU; NYLANDER, 2000).

A maioria das propriedades tecno-funcionais das proteínas de *S. platensis* está diretamente relacionada com a sua solubilidade. Chronakis (2001) verificou o efeito da temperatura e do pH na viscosidade de um concentrado proteico obtido de *S. platensis*, observando que em pH próximo a 9 ocorre uma menor viscosidade, devido à alta

solubilidade das proteínas neste pH; referente a temperatura o autor destaca que o concentrado proteico pode formar géis durante o aquecimento a 90 °C, seguindo do resfriamento do mesmo. No mesmo contexto, Benelhadj et al. (2016) verificaram que em pH próximo ao  $pI$  das proteínas de *S. platensis* ocorre a redução da formação da interface óleo/água com a rede proteica, reduzindo as propriedades emulsificantes desta proteína; a capacidade de formação de espuma, também apresentou dependência do pH, sendo que o valor máximo desta propriedade foi desenvolvido em pH próximo a 10, onde as interações hidrofóbicas são reduzidas levando a maior flexibilidade da proteína.

Mesmo revelando as diversas características benéficas e promissoras que as proteínas de *S. platensis* podem apresentar, sua utilização ainda é baixa, principalmente devido seu alto custo de produção e às suas características sensoriais, as quais lembram à peixe cru; sua aplicação é comprometida, sendo que atualmente sua maior demanda é em cosméticos ou alimentação animal (LUPATINI et al., 2017b). Neste contexto, ainda são poucos os estudos na literatura, sendo alguns apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Estudos da literatura sobre proteínas de *S. platensis*.

Assunto	Referência
Avaliação das propriedades físico-químicas e tecno-funcionais das proteínas de <i>S. platensis</i> extraídas por ondas ultrassônicas e agitação mecânica em meio alcalino; avaliaram o efeito do pH e concentração proteica nas propriedades tecno-funcionais, além de determinar o perfil de aminoácidos e a estrutura secundária das proteínas de <i>S. platensis</i> .	Menegotto et al. (2019)
Revisão bibliográfica referente ao potencial das proteínas de <i>S. platensis</i> , visando sua aplicação em alimentos e destacando os avanços e desafios relatados cientificamente sobre estas proteínas.	Lupatini et al. (2017b)
Estudo das propriedades tecno-funcionais do isolado proteico de <i>S. platensis</i> obtido por precipitação isoelétrica, verificando a influência do pH nestas propriedades; os autores também verificaram as propriedades formadoras de filmes das proteínas desta microalga.	Benelhadj et al. (2016)
Avaliação do cultivo de <i>S. platensis</i> em meio mineral suplementado com diferentes teores de vinhaça de beterraba, com o intuito de atingir altas produtividades em termos de conteúdo proteico.	Coca et al. (2015)
Proteínas isoladas de <i>S. platensis</i> cepa Pacífica foram caracterizadas por absorção visível, análise térmica por calorimetria diferencial de varredura (DSC), viscosimetria e determinação dos parâmetros reológicos.	Chronakis (2001)
Avaliação da atividade superficial de proteínas e lipídios de <i>S. platensis</i> cepa Pacífica com o intuito de investigar sua capacidade de estabilizar emulsões, espumas e dispersões; as proteínas obtidas por extração alcalina, seguido de centrifugação e precipitação isoelétrica.	Chronakis, Galatanu e Nylander (2000)
Caracterização química de diferentes biomassas de <i>S. platensis</i> obtidas comercialmente, destacando seu perfil de amino ácidos (essenciais e não essenciais) comparado com as concentrações requeridas pela FAO.	Campanella, Crescentini e Avino (1999)
Estudo das propriedades funcionais das proteínas da biomassa e de concentrado proteico de <i>S. platensis</i> comparando-as com as de soja.	Devi e Venkataraman (1984)

### **3.3 Técnicas de recuperação de proteínas de microalgas**

Conforme mencionado anteriormente, uma das principais dificuldades no consumo de microalgas se deve pelas suas características sensoriais; sendo que isto, possivelmente, pode ser solucionado com a extração e purificação dos componentes de interesse das microalgas, destacando-se a sua fração proteica (LUPATINI et al., 2017b). Além disso, a recuperação das proteínas da biomassa microalgal pode levar ao aumento do seu valor comercial (SCHWENZFEIER; WIERENGA; GRUPPEN, 2011), como também aprimorar suas propriedades físico-químicas e de tecno-funcionais.

Na Tabela 3.3 estão descritos alguns estudos de recuperação de proteínas de microalgas, abrangendo tanto técnicas de extração como purificação. Ainda, é possível verificar que a combinação de diferentes métodos de extração e purificação pode promover um aperfeiçoamento do processo, alcançando maiores percentuais de recuperação de proteínas (LUPATINI et al., 2017a).

Tabela 3.3 - Estudos referentes à aplicação de diferentes técnicas de recuperação de proteínas de micro e macroalgas.

Microalga / Macroalga	Método de recuperação/purificação	Desempenho	Referência
<i>S. platensis</i>	Extração de ficocianina com solução tampão de fosfato e congelamento-descongelamento; a purificação foi avaliada por meio da aplicação de UF/DF.	Somente com a extração foi obtido o pigmento com pureza de 0,53; ao associar UF/DF para purificação do componente, a pureza foi aumentada para 0,76.	Brião et al. (2020)
<i>N. gaditana</i>	Extração com homogeneizador a alta pressão e alcalase; seguido pelo estudo da associação destes métodos com ultrafiltração/diafiltração (UF/DF) (300 kDa).	Recuperação de 49% por homogeneizador a alta pressão e 35% com alcalase; associando estes métodos à UF/DF a recuperação foi de 17,4 e 24,8%, respectivamente	Safi et al. (2017)
<i>S. platensis</i>	Extração conjunta de proteínas e carboidratos aplicando ondas ultrassônicas e agitação mecânica em meio alcalino (pH 9).	Extração de 38% de proteínas e 9% de carboidratos, correspondendo à recuperação de 75,76 e 41,52%, respectivamente.	Lupatini et al. (2017a)
<i>S. platensis</i>	Purificação de ficocianina por sistemas aquosos bifásicos (SAB) com polietilenoglicol (PEG) e fosfato de potássio, variando a massa molar do PEG.	SABs com 4% de PEG 4000 e 21% de fosfato de potássio e, 4% PEG 6000 e 21% de fosfato de potássio recuperaram 100 e 73,5% de ficocianina, respectivamente.	Antelo, Costa e Kalil (2015)
<i>Haematococcus pluvialis</i> ; <i>N. oculata</i> ; <i>C. vulgaris</i> ; <i>P. cruentum</i> ; <i>S. platensis</i>	Extração com alta pressão hidrostática, tratamento químico, sonificação e agitação mecânica.	O uso de alta pressão hidrostática foi o método que permitiu maior extração, seguido do tratamento químico, sonificação e agitação mecânica.	Safi et al. (2014)
<i>Chlorella fusca</i>	Extração com diferentes misturas de enzimas proteolíticas (Protex 40XL, Protex P, Protex 5L, Protex 50FP e Protex 26L).	A aplicação das misturas enzimáticas Protex 40XL, Protex P e Protex 5L resultaram em percentuais de recuperação semelhantes, atingindo cerca de 80%.	Sari, Bruins e Sanders (2013)

*Capítulo 3*

<i>Palmaria palmata</i>	Aplicação de tratamentos preliminares com polissacaridase, alta força de cisalhamento e choque osmótico associado à extração alcalina e agitação.	Recuperação de 11,57% das proteínas aplicando polissacaridase, 6,92% com alta força de cisalhamento e 6,77% com choque osmótico.	Harnedy e FitzGerald (2013)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Extração com cinco diferentes métodos: líquido iônico, congelamento-descongelamento, ondas ultrassônicas, combinação de ultrassom com congelamento-descongelamento e baixa temperatura com alta pressão.	O melhor método foi o de baixa temperatura com alta pressão, extraindo 45,78% de proteínas. Além disso, os autores verificaram que associando as técnicas de ultrassom com congelamento-descongelamento foi possível aumentar o percentual de extração, de 3,2% (congelamento-descongelamento) e 16% (ultrassom), para 22,9%.	Wang e Zhang (2012)
<i>S. platensis</i>	Purificação de ficocianina por precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e gel-filtração em várias sequências.	Cromatografia de troca iônica foi responsável por aumentar a pureza do processo de obtenção de ficocianina e a precipitação salina por recuperar o composto; os autores otimizaram a combinação destes métodos, alcançando 44% de recuperação do pigmento com fator de pureza de 6,35.	Moraes e Kalil (2009)
<i>S. platensis</i> cepa Pacífica	Extração alcalina (pH 10), seguido de centrifugação e precipitação isoelétrica (pH 3).	Obtenção do extrato proteico com 67,9% de proteínas totais.	Chronakis, Galatanu e Nylander (2000)

### 3.3.1 Extração e rompimento celular

A extração dos componentes da biomassa microalgal, geralmente, é promovida pelo rompimento da sua parede celular (SAFI et al., 2014). Em geral, existem diversos métodos de rompimento celular, tais como métodos mecânicos, físicos, químicos e biológicos (enzimático), que devem ser escolhidos conforme a composição e estrutura da parede celular a ser rompida (ÜSTÜN-AYTEKIN et al., 2016). A composição da parede celular de microalgas é diferente para cada espécie, variando de membranas simples a estruturas complexas de múltiplas camadas. A parede celular mais simples é formada por uma bicamada lipídica integrada com proteínas e carboidratos, ao aumentar a complexidade da parede celular, camadas, intracelular e/ou extracelular, passam a existir entre a membrana (LEE et al., 2008). A *S. platensis*, por exemplo, possui uma parede celular fácil de ser rompida pois é composta por mucopolissacarídeos, açúcares e proteínas, diferente de outras microalgas que possuem celulose na sua composição, tornando o rompimento celular mais difícil (BELAY, 2002).

Neste contexto, diferentes métodos de extração de proteínas de microalgas vêm sendo estudados, destacando métodos como dissolução da célula em meio alcalino, uso de solventes orgânicos, tratamentos enzimáticos, técnicas de choque térmico e/ou aplicação de métodos mecânicos e físicos (LUPATINI et al., 2017b).

Na literatura existem diversas metodologias as quais utilizam solventes para extração de proteínas, sendo considerado um método convencional (BARBA; GRIMI; VOROBIEV, 2015). A solubilização de proteínas em meios alcalinos é comumente utilizada com esta finalidade, sendo que nestas condições de pH, as proteínas apresentam maior solubilidade e os materiais insolúveis são fisicamente separados por centrifugação (LEE et al., 2007). Para extração alcalina de proteínas da microalga *S. platensis* diferentes estudos têm aplicado solução de hidróxido de sódio para ajuste do pH para 9,0 e 10, sendo este método geralmente combinado com outras estratégias de extração, entre elas centrifugação, agitação mecânica, uso de ultrassom, entre outras (LUPATINI et al., 2017a; BENELHADJ et al., 2016; CHRONAKIS, 2001; CHRONAKIS; GALATANU; NYLANDER, 2000).

O choque osmótico é considerado um dos métodos mais comuns para o rompimento celular de algas, o qual pode ser realizado com um tampão, fosfato ou acetato, ou diluição em água; em geral, sendo aplicado como tratamento preliminar à extração alcalina (HARNEDY; FITZGERALD, 2013). Além disso, líquidos iônicos, representados por sais líquidos a temperatura ambiente, também tem recebido bastante atenção nos processos de extração de compostos bioativos de plantas (TANG et al., 2012); contudo, sua aplicação ainda possui algumas controvérsias, sendo que sua elevada viscosidade pode prejudicar o processo de transferência de massa e energia (MARSH; BOXALL; LICHTENTHALER, 2004).

Entre os métodos mecânicos de extração de proteínas, destaca-se agitação, moagem e homogeneização em alta pressão (COUSTETS et al., 2015; AZMIR et al., 2013; DOUCHA; LÍVANSKÝ, 2008). A agitação mecânica não é a causa direta do rompimento celular, mas é responsável pela formação de pequenas bolhas de gás no meio de extração as quais promovem a danificação da parede celular, causando a ruptura (SOBCZUK et al., 2006). A moagem constitui em uma das etapas da extração por maceração, sendo um método popular e de baixo custo; a maceração consiste na moagem da matéria-prima utilizada para extração com o intuito de aumentar a superfície de contato para em seguida ser associada a outro diferente método de extração, por exemplo, uso de solventes (AZMIR et al., 2013). A degradação da parede celular pode ser provocada utilizando-se homogeneizadores, sendo que o grau de desintegração aumenta quando o volume utilizado no equipamento aumenta; quando o volume é muito baixo, as forças de cisalhamento e a frequência das colisões não são suficientes para promover o rompimento (DOUCHA; LÍVANSKÝ, 2008).

Os métodos físicos para extração de compostos de interesse são considerados alternativos aos convencionais, sendo que podem ser representados pelas seguintes técnicas: ondas ultrassônicas (HOSSAIN et al., 2012), congelamento-descongelamento (SAFI et al., 2013), extração por fluidos supercríticos (MENDIOLA et al., 2007), campo elétrico pulsado (COUSTETS et al., 2015), micro-ondas (PHONGTHAI; LIM; RAWDKUEN, 2016), entre outros.

Em processos de extração de compostos de microalgas, o uso de ondas ultrassônicas é responsável por auxiliar no rompimento celular e reduzir o tamanho das

partículas da microalga (LUO; FANG; SMITH, 2014). O efeito causado pela cavitação acústica produzida no solvente pela passagem de uma onda ultrassônica é o que facilita este processo de extração; além disso, a sonificação pode promover um efeito mecânico que permite a melhor penetração do solvente na matriz da amostra, aumentando a superfície de contato (HOSSAIN et al., 2012). Neste contexto, é possível verificar que geralmente a aplicação de ultrassom é utilizada acoplada a outras técnicas de extração.

Outra técnica de extração de biocompostos considerada “verde”, que não afeta o meio ambiente, é a extração por fluido supercrítico; onde solventes com pressões e temperaturas acima do seu ponto crítico são utilizados promovendo alta velocidade e eficiência da extração, sendo o solvente mais utilizado o gás carbônico supercrítico (FABROWSKA et al., 2016; MENDIOLA et al., 2007). Contudo, a aplicação desta técnica para isolamento de biocompostos de algas ainda é pouco relatada na literatura científica (MESSYASZ et al., 2015). As tecnologias de campo elétrico pulsado, também são destacadas como ferramentas adequadas para extração de proteínas citoplasmáticas, mantendo sua integridade; a aplicação de pulsos elétricos curtos promove o aumento da permeabilidade da membrana celular, sem a necessidade de aplicar altas temperaturas (COUSTETS et al., 2015).

O uso de micro-ondas, também, vem sendo comumente aplicado para extrações sólido-líquido, destacando sua capacidade em promover o rompimento de ligações de hidrogênio (PHONGTHAI; LIM; RAWDKUEN, 2016). A rotação de dipolo e a migração dos íons induzidas por micro-ondas facilita a penetração do solvente na matriz, provocando o rompimento da parede celular e, conseqüentemente, liberando o composto intracelular (LI et al., 2010).

A extração de proteínas assistida por enzimas pode ser considerada como uma técnica suave, apresentando baixo impacto ambiental (SHEN et al., 2008). Este método envolve o uso de enzimas hidrolíticas responsáveis pelo rompimento da parede celular (MUSHTAQ et al., 2015) e, muitas vezes é aplicada combinada com outros métodos de extração. De acordo com o estudo realizado por Sari, Bruins e Sanders (2013), o uso de enzimas pode aperfeiçoar o processo de extração de proteínas de microalgas, comparado a métodos químicos, contudo a aplicação de enzimas associada a extração alcalina é capaz de hidrolisar parte das proteínas, para que posteriormente ocorra a

extração pela solubilização das proteínas em meio alcalino, aumentando a recuperação deste componente. Além da utilização de enzimas para a extração e/ou purificação de proteínas de microalgas, enzimas proteolíticas tem se mostrado promissoras para a obtenção de hidrolisados proteicos (WANG; ZHANG, 2012).

### 3.3.2 Métodos de separação

As técnicas de separação de proteínas de microalgas vêm ganhando importância em processos biotecnológicos por apresentar potencialidade de aplicação em larga escala; entre estes sistemas estão precipitações baseadas na solubilidade de proteínas (CHAIKLAHAN et al., 2011), métodos cromatográficos (PONTIS, 2016), processo de separação por membranas (PSM) (NAGARAJ; PATIL; BIRADAR, 2006) e SAB (AMID; ABDUL MANAP; MUSTAFA, 2013).

#### 3.3.2.1 Precipitação

A maioria das proteínas podem ser precipitadas de soluções aquosas utilizando diferentes princípios de precipitação, salina, por solventes ou pelo ponto isoelétrico (pI). A precipitação de proteínas de microalgas realizada com base no seu pI é a forma mais comumente utilizada de separação deste componente (LUPATINI et al., 2017b). Chronakis, Galatanu e Nylander (2000) sugerem que a precipitação das proteínas de *S. platensis* pode ser realizada pela baixa solubilidade das mesmas em pH 3,0 (pI); no mesmo contexto Gerde et al. (2013) também indica que a utilização da precipitação das proteínas de *Nannochloropsis* pelo seu pI (3,2) apresentou eficiência.

A precipitação salina afeta a solubilidade das proteínas pelos efeitos *salting-in* e *salting-out*, causando a precipitação (VEIDE VILG; UNDELAND, 2017). Moraes e Kalil (2009) verificaram que para purificação de ficocianina da *S. platensis*, foi necessária uma saturação de 50% com sulfato de amônio para que esta molécula fosse precipitada. Manirafasha et al. (2017) estudaram a extração desta ficobiliproteína com cloreto de amônio e em seguida promoveram sua purificação comparando os sais fosfato e sulfato de amônio (proporção 1:2, v/v: extrato-sal). Os resultados demonstraram que o fosfato

de amônio apresentou eficiência, se mostrando um sal alternativo ao sulfato de amônio para precipitação de biomoléculas. Além disso os autores ressaltaram que métodos de extração associados a técnicas de purificação podem promover melhores resultados para obtenção de moléculas em grau analítico.

O uso de solventes vem sendo constantemente aplicado para extrair componentes de microalgas como lipídios e pigmentos, entretanto alguns solventes também podem ser aplicados para precipitar proteínas de soluções aquosas. Contudo, por serem intracelulares, primeiramente as proteínas de microalgas devem ser extraídas do interior da célula. Neste contexto, Grossmann et al. (2018) avaliaram a precipitação, por solvente, de proteínas da microalga *Chlorella protothecoides* previamente extraídas por homogeneização em alta pressão; os autores verificaram que a polaridade do solvente afeta a eficiência da precipitação. A precipitação com mistura de etanol:acetona (1:1 v/v) facilitou a completa solubilização do pigmento, resultando em um precipitado com alto conteúdo proteico e coloração branca.

#### 3.3.2.2 Processo de separação por membrana (PSM)

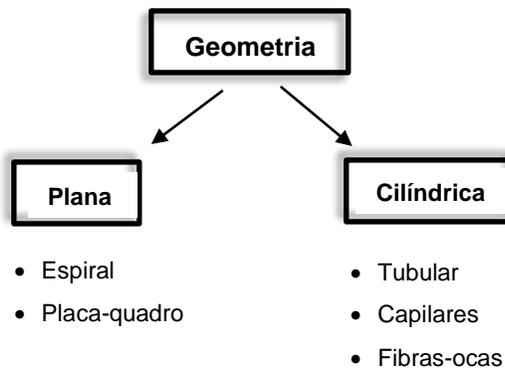
Os PSM podem ser destacados como técnicas de obtenção proteica alternativas às convencionais, compreendendo uma vasta gama de diferentes processos, desde a microfiltração até a diálise (BELL; COUSINS, 1994); em geral os PSM caracterizam-se por uma corrente de alimentação a qual é separada em duas correntes: concentrado e permeado (MULDER, 1996). Os PSM podem ser operados em escoamento frontal ou tangencial, o primeiro tende a formar, rapidamente, um acúmulo na superfície da membrana, promovendo uma resistência da passagem do permeado e reduzindo o fluxo ao longo do processo; já no escoamento tangencial a solução escoia paralelamente a superfície da membrana, limitando o acúmulo de material retido sobre a mesma (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

Além disso, as membranas podem ser preparadas em diferentes configurações, como planas e cilíndricas (Figura 3.2). Entre elas, as fibras ocas vêm se destacando nas últimas décadas; uma das vantagens desta geometria é a relação área de permeação e volume, representando uma melhor utilização do espaço e redução dos custos de

equipamento (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006). Contudo, sua principal desvantagem é a facilidade de entupimento das fibras, levando a necessidade de uma limpeza cuidadosa e eficiente (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

Entre os diferentes PSM, a UF tem sido indicada como um dos meios para superar os problemas encontrados com o processo de precipitação isoelétrica de proteínas (MONDOR, 2014). A UF pode apresentar dois mecanismos distintos de separação; quando são aplicadas membranas como poros maiores, o mecanismo dominante é o de exclusão por tamanho, por outro lado, ao utilizar membranas com poros menores, a exclusão molecular é mais restrita e a separação ocorre em termos de solubilidade dos componentes e hidrofobicidade da membrana. O último mecanismo pode representar algumas restrições deste processo de separação devido à polarização por concentração das proteínas e polissacarídeos, conduzindo à formação de uma camada viscosa de agregação proteica, o que causa incrustações (GALANAKIS, 2015).

Figura 3.2 - Configurações geométricas de membranas.



Fonte: Habert, Borges e Nobrega (2006).

Os PSM que utilizam o gradiente de pressão como força motriz, como microfiltração, UF e nanofiltração podem ser associados à DF (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006); modo de operação que consiste na remoção de espécies retidas na membrana devido a lavagem do concentrado com água ou outro solvente, o que facilita a permeação pela membrana e aumenta a pureza da fração concentrada (ABEL et al., 2018). A DF pode ser realizada de dois modos: contínuo ou descontínuo. No primeiro se

realiza a diluição do sistema, mantendo-se o volume constante durante o processo; já no segundo o diluente é adicionado intermitentemente, podendo ser repetido quantas vezes forem necessárias. Ambos os modos consideram um fator de concentração e permitem maior concentração e pureza do soluto retido (CHERYAN, 1998).

Neste contexto, Safi et al. (2017) verificaram a extração das proteínas da microalga *N. gaditana* aplicando homogeneização a alta pressão e tratamento enzimático (alcalase) associados com PSM, aplicando UF juntamente a DF; os sobrenadantes obtidos pelos diferentes processos de rompimento celular foram utilizados no processo de UF/DF, onde a membrana com melhor desempenho foi de 300 kDa, atingindo 17,4 e 24,8% de recuperação de proteínas, respectivamente. Além de verificarem que a aplicação do processo de DF acoplado com a UF promoveu maior recuperação das proteínas, os autores contrastam a ideia de que ao aumentar o tamanho molecular da membrana ocorre aumento do fluxo de permeado e do percentual de proteína, sendo que ao avaliarem membranas de 1000 kDa obtiveram resultados inferiores à de 300 kDa.

Chaiklahan et al. (2011) verificaram a purificação de ficocianina de *S. plantensis* utilizando membranas de microfiltração (0,2 e 0,8/0,2  $\mu\text{m}$ ) seguido da concentração deste pigmento pela aplicação de UF com diferentes tamanhos de corte (50, 70 e 100 kDa), sendo que 50 kDa apresentou os resultados com maior grau de pureza; conforme estas condições, os autores conseguiram recuperar cerca de 82% deste componente, com concentração final de 6,17  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e, ainda ressaltam a eficiência do PSM e seu potencial para aplicação industrial.

### 3.3.2.3 Sistema Aquoso Bifásico (SAB)

Outra técnica de separação a qual vem se destacando, principalmente, devido seu simples e econômico processo, é o SAB. Esta técnica consiste na mistura ternária heterogênea formada por duas fases líquidas imiscíveis em equilíbrio, estes sistemas ocorrem principalmente pela mistura de dois polímeros ou de um polímero com um sal (AMID; ABDUL MANAP; MUSTAFA, 2013). Além disso, os SABs também podem ser compostos por um álcool e um sal, formando um sistema de baixa viscosidade, com alta polaridade e com rapidez para separação dos biocompostos; este sistema também

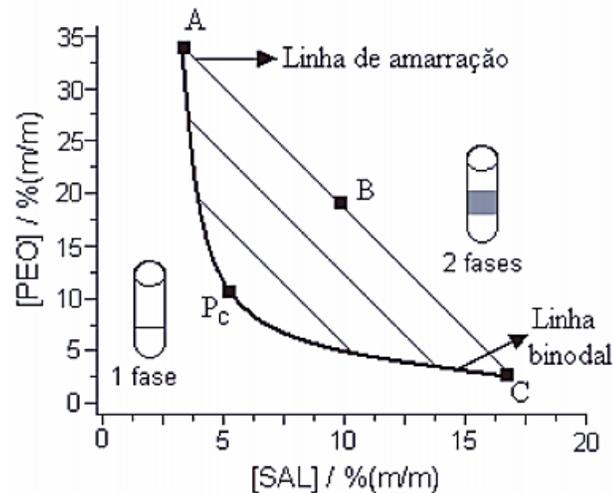
apresenta maior facilidade para recuperação do solvente (álcool), enquanto a separação da proteína de um polímero tende a ser mais difícil e muitas vezes o polímero não é efetivamente reciclado (PHONG et al., 2017).

A partição de proteínas pelo SAB ocorre devido à interação hidrofóbica do solvente orgânico e pelo efeito *salting-out* da fase salina (AMID; ABDUL MANAP; MUSTAFA, 2013), visto que altas concentrações de sais favorecem a migração das proteínas para a fase não composta por sal. Entre os principais sais utilizados no SAB, destacam-se os sais fosfato de potássio e citrato de sódio. O primeiro já vem sendo estudado há anos, apresentando grande potencial na separação de proteínas (ANTELO, COSTA; KALIL, 2015) e o segundo vem se destacando principalmente devido sua alta seletividade e biodegradabilidade (GOJA et al., 2013).

A representação gráfica é muito importante para os estudos de separação, sendo que inicialmente é utilizada como ferramenta básica para o desenvolvimento de um SAB. A composição das fases em equilíbrio de um SAB é feita por meio de diagramas de equilíbrio, os quais podem ser construídos empregando o sistema de coordenadas retangulares como também podem ser expressos em coordenadas triangulares, a diferença é que na condição retangular, a concentração de solvente está implícita no diagrama (ALBERTSSON, 1985). A Figura 3.3 ilustra um exemplo de um diagrama de equilíbrio de fase retangular de um SAB formado por um polímero, poli(óxido de etileno) [PEO] e um sal.

Os componentes presentes em maior quantidade nas fases inferior e superior são representados no eixo das abscissas e das ordenadas, respectivamente. A curva que divide a região em duas fases é denominada curva binodal ou curva de equilíbrio, e é responsável por informar em quais condições o sistema é homogêneo ou heterogêneo. Os dados de equilíbrio apresentados nos diagramas são relacionados com a variação da energia livre de Gibbs do processo e a posição da curva binodal varia de acordo com o tipo e massa molar do polímero, características do sal, pH e temperatura. A linha ABC representa a linha de amarração que, para determinada composição, o ponto B fornece a concentração dos solutos nas duas fases em equilíbrio, representadas pelos pontos A (fase superior) e C (fase inferior) (SILVA et al., 2006).

Figura 3.3 - Exemplo de um diagrama de fase expresso em coordenadas retangulares de um SAB formado por um polímero e um sal.



\*PEO: Poli(óxido de etileno); A, B e C: componentes da linha de amarração; Pc: componente linha binodal.

Fonte: Silva et al. (2006).

Os SABs permitem a seleção específica para separação proteica em um pequeno intervalo de tempo (OOI et al., 2009), além de apresentarem baixo custo e baixa toxicidade ambiental (AMID; ABDUL MANAP; MUSTAFA, 2013). A eficiência da partição de biomoléculas aplicando esta técnica se deve principalmente pela possibilidade em alcançar as melhores condições manipulando seus parâmetros, tais como: concentração dos componentes das diferentes fases, tamanho da biomolécula, afinidade entre a molécula de interesse e os componentes do SAB, pH e temperatura (RAJA et al., 2011; FU et al., 2015). A partição decorrente deste processo é complexa, envolvendo interações hidrofóbicas e de ligação de hidrogênio entre o composto a ser separado e as fases do sistema (MARCOS et al., 2002).

Antelo, Costa e Kalil (2015) estudaram o uso de dois distintos SABs para purificação de ficocianina de *S. platensis*, encontrando condições otimizadas para SABs com 4% de PEG 4000 e 6000, ambos com 21% de fosfato de potássio, recuperando 100% e 73,5% de ficocianina, respectivamente. Phong et al. (2017) investigaram a viabilidade da aplicação do SAB com metanol e diferentes sais de potássio para

recuperação de proteínas da microalga *Chlorella sorokiniana*, após a otimização das condições de purificação, os resultados mostraram que o SAB formado com 30% de fosfato de potássio e 20% de metanol com adição de 3% de NaCl possibilitou a recuperação de 84,23% das proteínas e, ainda apresentou capacidade de reciclo dos componentes do SAB e potencial para implementação em grande escala.

Além disso, a combinação do SAB com PSM pode garantir um aperfeiçoamento do processo de purificação de proteínas. Gómez-Loredo, González-Valdez e Rito-Palomares (2015) avaliaram a associação de SAB composto por etanol e fosfato de potássio com UF para purificar fucoxantina e entre as vantagens observadas pelos autores destacam-se o aumento de cerca de 6% da recuperação da molécula e redução de 16% de impurezas. Santos et al. (2018) também estudaram a combinação do SAB com UF para obtenção; os autores relataram que a adição da UF para purificação da proteína verde fluorescente, permitiu a recuperação do solvente além da eliminação das impurezas de baixo peso molar.

#### 3.3.2.4 Outros Métodos de Separação

A separação por eletroforese é uma técnica baseada na migração de espécies iônicas ou ionizáveis conforme a aplicação de um campo elétrico, causando a separação de diferentes frações proteicas, mostrando-se competitiva à cromatografia de exclusão molecular (ROMARÍS-HORTAS et al., 2014). Outra técnica de separação que é semelhante aos métodos cromatográficos é a adsorção, a qual vem sendo aplicada na separação de proteínas através da utilização de adsorventes como sílica, óxido de alumínio, celulose e outros polímeros sintéticos (LI et al., 2013), onde posteriormente o adsorvente é retirado da solução por centrifugação ou filtração (PONTIS, 2016). Ambas as técnicas citadas não apresentam relatos científicos da sua aplicação na separação de proteínas de microalgas.

Os métodos cromatográficos geralmente são aplicados para obtenção de frações proteicas altamente purificadas que previamente já foram submetidas a outros métodos de separação. Os mecanismos desenvolvidos pela cromatografia são baseados na partição e distribuição do componente de interesse entre duas fases imiscíveis. Na

separação de proteínas, a cromatografia líquida é a mais amplamente aplicada e seus diferentes mecanismos de separação são: troca iônica, adsorção, afinidade e exclusão molecular (ou gel-filtração) (PONTIS, 2016). A cromatografia por troca iônica é uma das mais utilizadas com o intuito de separar proteínas, a qual pode promover a separação proteica não afetando a conformação da molécula, ocorrendo conforme as interações iônicas e atrações eletrostáticas (ISHIHARA; YAMAMOTO, 2005). Moraes e Kalil (2009) estudaram a purificação da ficocianina de *S. platensis* por precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e gel-filtração; verificaram que a melhor condição de purificação foi utilizando precipitação com sulfato de amônio seguido da cromatografia de troca iônica onde conseguiram obter o extrato purificado com fator de purificação de 6,35.

### **3.4 Estado da arte: Considerações finais**

Visto as diversas qualidades nutricionais das proteínas de *S. platensis*, esta microalga pode ser considerada uma fonte alternativa no aporte deste componente, com características comparáveis às proteínas vegetais e animais. Além disso, suas propriedades tecno-funcionais evidenciam sua possível aplicação em diferentes tipos de alimentos, contribuindo em seu processamento como agentes emulsificantes, gelificantes e espumantes. Sem menos importância, as suas propriedades nutracêuticas estão a cada dia mais evidenciadas, levando ao melhoramento da saúde e redução de riscos de doenças crônicas.

Neste contexto, o estudo de técnicas de purificação de proteínas de *S. platensis* se torna necessário. Para isto, primeiramente é necessário o rompimento da sua parede celular, podendo ser desenvolvido por métodos mecânicos, físicos, químicos ou enzimáticos, seguido da extração de proteína. Posteriormente, técnicas de separação, concentração e/ou purificação podem ser aplicadas a fim de aumentar a pureza deste componente; estudos científicos destacam que a combinação de diferentes métodos de extração e recuperação podem aperfeiçoar a obtenção de proteínas de microalgas.

Além disso, conforme embasamento científico, métodos de extração, concentração e/ou purificação de proteínas podem influenciar diretamente nas suas

propriedades tecno-funcionais, assim como nas suas demais características; o que demonstra a necessidade de novos estudos com esta finalidade. Mesmo considerando os diversos benefícios das proteínas de *S. platensis* ainda existe um leque de informações pouco exploradas sobre sua aplicação na indústria alimentícia, química e farmacêutica, tornando-se incontestável a necessidade de novas pesquisas referente à sua obtenção, caracterização e aplicação, priorizando suas propriedades físico-químicas e tecno-funcionais.

### 3.5 Referências bibliográficas

ABEL, J.; KOSKY, A.; BALL, N.; BACON, H.; KAUSHILK, R.; KLEEMANN, G. R. A small-scale process for predictiong donnan and volume exclusion effects during ultrafiltration/diafiltration process development. **Jornal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, p. 1296–1303, 2018.

ALBERTSSON, P. A. **Partition of cell particles and macromolecules**. 3 ed. Nova York: New Wiley & Sons, 1985.

AMID, M.; ABDUL MANAP, M. Y.; MUSTAFA, S. Purification of pectinase from mango (*Mangifera indica* L. cv. Chokanan) waste using an aqueous organic phase system: A potential low cost source of the enzyme. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 931, p. 17–22, 2013.

ANTELO, F. S.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Purification of C-phycoocyanin from *Spirulina platensis* in aqueous two-phase systems using an experimental design. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, p. 1–11, 2015.

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC international**. 20. ed. Maryland: AOAC International, 2016.

AUGUSTINI, T. W.; SOETRISNANTO, D.; MA'RUF, W. F. Study on chemical, physical, microbiological and sensory of yoghurt enriched by *Spirulina platensis*. **International Food Research Journal**, v. 24, p. 367–371, 2017.

AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S.M.; RAHMAN, M.M; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F.; JAHURUL, M. H. A.; GHAFOR, K.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 426–436, 2013.

BARBA, F. J.; GRIMI, N.; VOROBIEV, E. Evaluating the potential of cell disruption technologies for green selective extraction of antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana Bertoni* leaves. **Journal of Food Engineering**, v. 149, p. 222–228, 2015.

BARKA, A.; BLECKER, C. Microalgae as a potential source of single-cell proteins. A review. **Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement**, v. 20, p. 427–436,

2016.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology advances**, v. 25, p. 207–10, 2007.

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

BELAY, A. The Potential Application of *Spirulina (Arthrospira)* as a nutritional and therapeutic supplement in health management. **The Journal of the American Nutraceutical Association**, v. 5, p. 27–48, 2002.

BELL, G.; COUSINS, R. B. Membrane separation processes. In: WEATHERLEY, L. R. (ed), **Engineering Processes for Bioseparations**. Weatherley: Oxford, 1994.

BENELHADJ, S.; GHARSALLAOUI, A.; DEGRAEVE, P.; ATTIA, H.; GHORBEL, D. Effects of pH on the functional properties of *Arthrospira (Spirulina) platensis* protein isolate. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1056-1063, 2016.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, L. J. B. Revisão: Biotecnologia de Microalgas. **B. CEPPA**, v. 26, p. 9–20, 2008.

BETORET, E.; BETORET, N.; VIDAL, D.; FITO, P. Functional foods development: Trends and technologies. **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, p. 498–508, 2011.

BRASIL. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e/ou saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos, VII Lista dos novos ingredientes aprovados, de maio de 2009. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos\\_ingredientes.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_ingredientes.htm)>. Acesso em: 11 junho 2017.

BRIÃO, V. B.; SBEGHEN, A. L.; COLLA, L. M.; CASTOLDI, V.; SEGUENKA, B.; SCHIMIDT, G. O.; COSTA, J. A. V. Is downstream ultrafiltration enough for production of food-grade phycocyanin from *Arthrospira platensis*? **Journal of Applied Phycology**, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10811-019-02006-1>>. Acesso em: 14 abril 2020.

CAMPANELLA, L.; CRESCENTINI, G.; AVINO, P. Chemical composition and nutritional evaluation of some natural and commercial food products based on *Spirulina*. **Analisis**, v. 27, p. 533–540, 1999.

CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; LOHA, V.; TIA, S.; BUNNAG, B. Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7159–7164, 2011.

CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; BUNNAG, B. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 659–664, 2012.

CHEAH, W. Y.; LING, T. C.; JUAN, J. C.; LEE, D.-J.; CHANG, J.-S.; SHOW, P. L. Biorefineries of carbon dioxide: From carbon capture and storage (CCS) to bioenergies production. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 346–356, 2016.

- CHEN, F.; ZHANG, Y.; GUO, S. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. **Biotechnology letters**, v. 18, p. 603–608, 1996.
- CHERYAN, M. **Ultrafiltration and microfiltration handbook**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 1998.
- CHRONAKIS, I. S. Gelation of edible blue-green algae protein isolate (*Spirulina platensis* strain Pacifica): Thermal transitions, rheological properties, and molecular forces involved. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 888–898, 2001.
- CHRONAKIS, I. S.; GALATANU, A. N.; NYLANDER, T. The behaviour of protein preparations from blue-green algae (*Spirulina platensis* strain Pacifica) at the air / water interface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 173, p. 181–192, 2000.
- COCA, M.; BARRACAL, V.; LUCAS, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; GARCÍA-CUBERO, M. T. Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 306–312, 2015.
- COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1489–1493, 2007.
- COUSTETS, M.; JOUBERT-DURIGNEUX, V.; HÉRAULT, J.; SCHOEFS, B.; BLANCKAERT, V.; GARNIER, J. P.; TEISSIÉ, J. Optimization of protein electroextraction from microalgae by a flow process. **Bioelectrochemistry**, v. 103, p. 74–81, 2015.
- DEMIR, B. S.; TÜKEL, S. S. Purification and characterization of lipase from *Spirulina platensis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, p. 123–128, 2010.
- DEVI, M. A.; VENKATARAMAN, L.V. Functional properties of protein products of mass cultivated blue-green alga *Spirulina platensis*. **Journal of Food Science**, v. 49, p. 24–27, 1984.
- DOGAN, S. C.; BAYLAN, M.; ERDOGAN, Z.; AKPINAR, G. C.; KUCUKGUL, A.; DUZGUNER, V. Performance, egg quality and serum parameters of japanese quails fed diet supplemented with *Spirulina platensis*. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 25, p. 5857–5862, 2016.
- DOUCHA, J.; LÍVANSKÝ, K. Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella* cells in various types of homogenizers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, p. 431–440, 2008.
- EL-TANTAWY, W. H. Antioxidant effects of *Spirulina* supplement against lead acetate-induced hepatic injury in rats. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, p. 0–4, 2015.
- FABROWSKA, J.; IBAÑEZ, E.; LESKA, B.; HERRERO, M. Supercritical fluid extraction as a tool to valorize underexploited freshwater green algae. **Algal Research**, v. 19, p. 237–245, 2016.
- FERREIRA, L. S.; RODRIGUES, M. S.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* cultivation in tubular photobioreactor: Use of no-cost CO<sub>2</sub>

- ethanol fermentation. **Applied Energy**, v. 92, p. 379–385, 2012.
- FU, H.; DAI, H.; SUN, Y.; ZHANG, D.; XIU, Z. Partition behavior of hydrophilic diols in an ethanol/ammonium sulfate salting-out extraction system. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, p.797–803, 2015.
- GALANAKIS, C. M. Separation of functional macromolecules and micromolecules: From ultrafiltration to the border of nanofiltration. **Trends in Food Science and Technology**, v. 42, p. 44–63, 2015.
- GERDE, J. A.; WANG, T.; YAO, L.; JUNG, S.; JOHSON, L. A.; LAMSAL, B. Optimizing protein isolation from defatted and non-defatted *Nannochloropsis* microalgae biomass. **Algal Research**, v. 2, p. 145–153, 2013.
- GODLEWSKA, K.; DMYTRYK, A.; TUHY, D. L. Algae as source of food and nutraceuticals. In: TRIPATHI, B. N.; KUMAR, D. (ed), **Prospects and Challenges in Algal Biotechnology**. Srinagar-Garhwal: Springer, 2017.
- GOJA, A. M.; YANG, H.; CUI, M.; LI, C. Aqueous two-phase extraction advances for bioseparation. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 4, p. 1–8, 2013.
- GÓMEZ-LOREDO, A.; GONZÁLEZ-VALDEZ, J.; RITO-PALOMARES, M. Insights on the downstream purification of fucoxanthin, a microalgal carotenoid, from aqueous two-system stream exploiting ultrafiltration. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, p. 1517–1523, 2015.
- GROSSMANN, L.; EBERT, S.; HINRICHS, J.; WEISS, J. Effect of precipitation, lyophilization, and organic solvent extraction on preparation of protein-rich powders from the microalgae *Chlorella protothecoides*. **Algal Research**, v.29, p. 266–276, 2018.
- HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processos de separação por membranas**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2006.
- HABIB, M. A. B.; PARVIN, M.; HUNTINGTON, T. C.; HASAN, M. R. **A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish**. FAO - Fisheries and Aquaculture Circular, n. 1034. Roma: FAO, 2008.
- HARNEDY, P. A.; FITZGERALD, R. J. Extraction of protein from the macroalga *Palmaria palmata*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, p. 375–382, 2013.
- HOLMAN, B. W. B.; MALAU-ADULI, A. E. O. *Spirulina* as livestock supplement and animal feed. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, p. 615–623, 2012.
- HORVÁTH, H.; KOVÁCS, A. W.; RIDDICK, C.; PRÉSING, M. Extraction methods for phycocyanin determination in freshwater filamentous cyanobacteria and their application in a shallow lake. **European Journal of Phycology**, v. 48, p. 278–286, 2013.
- HOSSAIN, M. B.; BRUNTON, N. P.; PATRAS, A.; TIWARI, B.; O'DONNELL, C. P.; MARTIN-DIANA, A. B.; BARRY-RYAN, C. Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 19, p. 582–90, 2012.
- ISHIHARA, T.; YAMAMOTO, S. Optimization of monoclonal antibody purification by ion-

- exchange chromatography: Application of simple methods with linear gradient elution experimental data. **Journal of Chromatography A**, v. 1069, n. 1, p. 99–106, 2005.
- KUMAR, D.; DHAR, D. W.; PABBI, S.; KUMAR, N.; WALIA, S. Extraction and purification of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* (CCC540). **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 19, p. 184–188, 2014.
- LEE, R. E. **Phycology**. Cambridge: Cambridge University Press, 2008.
- LEE, H. C.; HTOON, A. K.; UTHAYAKUMARAN, S.; PATERSON, J. L. Chemical and functional quality of protein isolated from alkaline extraction of Australian lentil cultivars: Matilda and Digger. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1199–1207, 2007.
- LI, J.; LIAO, X.-P.; ZHANG, Q.-X.; SHI, B. Adsorption and separation of proteins by collagen fiber adsorbent. **Journal of Chromatography B**, v. 928, p. 131–138, 2013.
- LI, J.; ZU, Y.-G.; FU, Y.-J.; YU, Y.-C.; LI, S.-M.; LI, Z.-N.; WINK, N. Optimization of microwave-assisted extraction of triterpene saponins from defatted residue of yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge.) kernel and evaluation of its antioxidant activity. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 637–643, 2010.
- LÓPEZ, C. V. G.; GARCÍA, M. C. C.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; BUSTOS, C. S.; CHISTI, Y.; SEVILLA, J. M. F. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7587–7591, 2010.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.
- LUO, J.; FANG, Z.; SMITH, R. L. Ultrasound-enhanced conversion of biomass to biofuels. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 41, p. 56–93, 2014.
- LUPATINI, A. L.; BISPO, L. O.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V.; CANAN, C.; COLLA, E. Protein and carbohydrate extraction from *S. platensis* biomass by ultrasound and mechanical agitation. **Food Research International**, v. 99, p.1028–1035, 2017a.
- LUPATINI, A. L.; COLLA, L. M.; CANAN, C.; COLLA, E. Potential application of microalgae *Spirulina platensis* as a protein source. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, p. 724–732, 2017b.
- MADEIRA, M. S.; CARDOSO, C.; LOPES, P. A.; COELHO, D.; AFONSO, C.; BANDARRA, N. M.; PRATES, J. A. M. Microalgae as feed ingredients for livestock production and meat quality: A review. **Livestock Science**, v. 205, p. 111–121, 2017.
- MANIRAFASHA, E.; MURWANASHYAKA, T.; NDIKUBWIMANA, T.; YUE, Q.; ZENG, X.; LU, Y.; JING, K. Ammonium chloride: a novel effective and inexpensive salt solution for phycoerythrin extraction from *Arthrospira (Spirulina) platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, p. 1261–1270, 2017.
- 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.
- MARSH, K. N.; BOXALL, J. A.; LICHTENTHALER, R. Room temperature ionic liquids and

- their mixtures - A review. **Fluid Phase Equilibria**, v. 219, p. 93–98, 2004.
- MAZOKOPAKIS, E. E.; KAREFILAKIS, C. M.; TSARTSALIS, A. N.; MILKAS, A. N.; GANOTAKIS, E. S. Acute rhabdomyolysis caused by *Spirulina* (*Arthrospira platensis*). **Phytomedicine**, v. 15, p. 525–527, 2008.
- MENDIOLA, J. A.; JAIME, L.; SANTOYO, S.; REGLERO, G.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E.; SEÑORÁNS, F. J. Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1357–1367, 2007.
- MENEGOTTO, A. L. L.; SOUZA, L. E. S.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V.; SEHN, E.; BITTENCOURT, R. S.; FLORES, E. L. M.; CANAN, C.; COLLA, E. Investigation of techno-functional and physicochemical properties of *Spirulina platensis* protein concentrate for food enrichment. **LWT – Food Science and Technology**, v. 114, p.108267, 2019.
- MESSYASZ, B.; LESKA, B.; FABROWSKA, J.; PIKOSZ, M.; ROJ, E.; CIESLAK, A.; SCHROEDER, G. Biomass of freshwater *Cladophora* as a raw material for agriculture and the cosmetic industry. **Open Chemistry**, v. 13, p. 1108–1118, 2015.
- MEZZOMO, N.; SAGGIORATO, A. G.; SIEBERT, R.; TATSCH, P. O.; LAGO, M. C.; HEMKEMEIER, M.; COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. v. 30, p. 173–178, 2010.
- MONDOR, M. Production of value-added soy protein products by membrane-based operations. In: CASSANO, A.; DRIOLI, E. (eds), **Integrated Membrane Operations**. Berlin/Boston: Walter de Gruyter GmbH, 2014.
- MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Strategy for a protein purification design using C-phycocyanin extract. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5312–5317, 2009.
- MULDER, M. **Basic Principles of Membrane Technology**. 2ed. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1996.
- MUSHTAQ, M.; SULTANA, B.; ANWAR, F.; ADNAN, A.; RIZVI, S. S. H. Enzyme-assisted supercritical fluid extraction of phenolic antioxidants from pomegranate peel. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 104, p. 122–131, 2015.
- NAGARAJ, N.; PATIL, B. S.; BIRADAR, P. M. Osmotic membrane distillation – a brief review. **International Journal of Food Engineering**, v. 2, p. 1–22, 2006.
- NAJAFIAN, L.; BABJI, A. S. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. **Peptides**, v. 33, p. 178–185, 2012.
- OOI, C. W.; TEY, B. T.; HIL, S. L.; MAZLINA, S.; KAMAL, S. M. M.; LAN, J. C. W.; ARIFF, A.; LING, T. C. Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1083–1087, 2009.
- OVANDO, C. A.; CARVALHO, J. C.; PEREIRA, G. V. M.; JACQUES, P.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Functional properties and health benefits of bioactive peptides derived from *Spirulina*: A review. **Food Reviews International**, v. 34, p. 34–51, 2018.

- PHANG, S. M.; MIAH, M. S.; YEOH, B. G.; HASHIM, M. A. *Spirulina* cultivation in digested sago starch factory wastewater. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, p. 395–400, 2000.
- PHONG, W. N.; SHOW, P. L.; TEH, W. H.; TEH, T. X.; LIM, H. M. Y.; NAZRI, N. S. B.; TAN, C. H.; CHANG, J.-S.; LING, T. C. Proteins recovery from wet microalgae using liquid biphasic flotation (LBF). **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1329–1336, 2017.
- PHONGTHAI, S.; LIM, S. T.; RAWDKUEN, S. Optimization of microwave-assisted extraction of rice bran protein and its hydrolysates properties. **Journal of Cereal Science**, v. 70, p. 146–154, 2016.
- PONTIS, H. G. **Methods for analysis of carbohydrate metabolism in photosynthetic organisms. Plants, green algae, and cyanobacteria**. London: Elsevier Inc., 2016.
- RAJA, S.; MURTY, V. R.; THIVAHARAN, V.; RAJASEKAR, V.; RAMESH, V. Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules – a review. **Science and Technology**, v. 1, p. 7–16, 2011.
- RAJAKUMAR, M. S.; MUTHUKUMAR, K. Influence of pre-soaking conditions on ultrasonic extraction of *Spirulina platensis* proteins and its recovery using aqueous biphasic system. **Separation Science and Technology**, v. 53, p. 2034–2043, 2018.
- RAJANBABU, V.; CHEN, J. Y. Antiviral function of tilapia hepcidin 1-5 and its modulation of immune-related gene expressions against infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in Chinook salmon embryo (CHSE)-214 cells. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 30, p. 39–44, 2011.
- RANGEL-YAGUI, C. O.; DANESI, E. D. G.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: Cultivation with urea addition by fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 133–141, 2004.
- ROMARÍS-HORTAS, V.; BIANGA, J.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, P.; SZPUNAR, J. Speciation of iodine-containing proteins in *Nori* seaweed by gel electrophoresis laser ablation ICP-MS. **Talanta**, v. 127, p. 175–180, 2014.
- SAFI, C.; CHARTON, M.; PIGNOLET, O.; SILVESTRE, F.; VACA-GARCIA, C.; PONTALIER, P.-Y. Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, p. 523–529, 2013.
- SAFI, C.; URSU, A. V.; LAROCHE, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; PONTALIER, P.-Y.; VACA-GARCIA, C. Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. **Algal Research**, v. 3, p. 61–65, 2014.
- SAFI, C.; OLIVIERI, G.; CAMPOS, R. P.; ENGELEN-SMIT, N.; MULDER, W. J.; VAN DEN BROEK, L. A. M.; SIJTSMA, L. Biorefinery of microalgal soluble proteins by sequential processing and membrane filtration. **Bioresource Technology**, v. 225, p. 151–158, 2017.
- SALLA, A. C. V.; MARGARITES, A. C.; SEIBEL, F. I.; HOLZ, L. C.; BRIÃO, V. B.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina platensis* in culture by nutrient starvation and the addition of

- residues of whey protein concentrate. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 133–141, 2016.
- SANTIAGO-SANTOS, M. C.; PONCE-NOYOLA, T.; OLVERA-RAMÍREZ, 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, N. V.; MARTINS, M.; SANTOS-EBINUMA, V. C.; VENTURA, S. P. M.; COUTINHO, J. A. P.; VALENTINI, S. R.; PEREIRA, J. F. B. Aqueous biphasic systems composed of cholinium chloride and polymers as effective platforms for the purification of recombinant green fluorescent protein. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 6, p. 9383–9393, 2018.
- SARI, Y. W.; BRUINS, M. E.; SANDERS, J. P. M. Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals. **Industrial Crops & Products**, v. 43, p. 78–83, 2013.
- SCHMITZ, R.; DAL MAGRO, C.; COLLA, L. M. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista CIATEC**, v. 4, , p. 48–60, 2012.
- SCHWENZFEIER, A.; WIERENGA, P. A.; GRUPPEN, H. Isolation and characterization of soluble protein from the green microalgae *Tetraselmis* sp. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9121–9127, 2011.
- SHEN, L.; WANG, X.; WANG, Z.; WU, Y.; CHEN, J. Studies on tea protein extraction using alkaline and enzyme methods. **Food Chemistry**, v. 107, p. 929–938, 2008.
- SILVA, M. C.; SILVA, L. H. M.; PAGGIOLI, F. J.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A. Sistema aquoso bifásico: uma alternativa eficiente para extração de íons. **Química nova**, v. 29, p. 1332–1339, 2006.
- SILVA, E. F.; FIGUEIRA, F. S.; LETTNIN, A. P.; CARRETT-DIAS, M.; FILGUEIRA, D. M. B.; KALIL, S.; TRINDADE, G. S.; VOTTO, A. P. S. C-Phycocyanin: Cellular targets, mechanisms of action and multi drug resistance in cancer. **Pharmacological Reports**, v. 70, p. 75–80, 2017.
- SLOCOMBE, S. P.; ROSS, M.; THOMAS, N.; MCNEILL, S.; STANLEY, M. S. A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 51–57, 2013.
- SOBCZUK, T. M.; CAMACHO, F. G.; GRIMA, E. M.; CHISTI, Y. Effects of agitation on the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Porphyridium cruentum*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 28, p. 243–250, 2006.
- SOLETTA, D.; BINAGHI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J. C. M.; CONVERTI, A. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. **Aquaculture**, v. 243, p. 217–224, 2005.
- SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 101, p. 87–96, 2006.
- STOLZ, P.; OBERMAYER, B. Manufacturing microalgae for skin care. **The International**

**Magazine of Cosmetic Technology**, v. 120, p. 99–106, 2005.

SU, C. H.; LIU, C. S.; YANG, P. C.; SYU, K. S.; CHIUH, C. C. Solid-liquid extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis*: Kinetic modeling of influential factors. **Separation and Purification Technology**, v. 123, p. 64-68, 2014.

TANG, B.; BI, W.; TIAN, M.; ROW, K. H. Application of ionic liquid for extraction and separation of bioactive compounds from plants. **Journal of Chromatography B**, v. 904, p.1-21, 2012.

TIBBETTS, S. M.; MILLEY, J. E.; LALL, S. P. Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, p.1109-1119, 2015.

ÜSTÜN-AYTEKIN, Ö.; ARISOY, S.; AYTEKIN, A. O.; YILDIZ, E. Statistical optimization of cell disruption techniques for releasing intracellular X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* spp. *lactis*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 29, p. 163–171, 2016.

VEIDE VILG, J.; UNDELAND, I. pH-driven solubilization and isoelectric precipitation of proteins from the brown seaweed *Saccharina latissima* – effects of osmotic shock, water volume and temperature. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, p. 585–593, 2017.

VO, T.-S.; RYU, B.; KIM, S.-K. Purification of novel anti-inflammatory peptides from enzymatic hydrolysate of the edible microalgal *Spirulina maxima*. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1336–1346, 2013.

WANG, S. K.; HU, Y.-R.; WANG, F.; STILES, A. R.; LIU, C.-Z. Scale-up cultivation of *Chlorella ellipsoidea* from indoor to outdoor in bubble column bioreactors. **Bioresource Technology**, v. 156, p. 117–122, 2014.

WANG, X.; ZHANG, X. Bioresource Technology Optimal extraction and hydrolysis of *Chlorella pyrenoidosa* proteins. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 307–313, 2012.

XIA, D.; LIU, B.; XIN, W.; LIU, T.; SUN, J.; LIU, N.; QIN, S.; DU, S. Protective effects of C-phycocyanin on alcohol-induced subacute liver injury in mice. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, p. 765–772, 2016.

ZHU, L. D.; HILTUNEN, E.; ANTILA, E.; ZHONG, J. J.; YUAN, Z. H.; WANG, Z. M. Microalgal biofuels: Flexible bioenergies for sustainable development. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 30, p. 1035–1046, 2014.

#### 4 Thermic and techno-functional properties of *Spirulina platensis* protein fractions obtained by membrane separation process

#### Propriedades térmicas e tecno-funcionais das frações proteicas de *Spirulina platensis* obtidas através de processo de separação por membranas

##### Abstract

The high protein concentration of *Spirulina platensis* makes this microalga a great component of food. Thus, the protein obtainment should guarantee the nutrient characteristic, in this case, as bioactivity and techno-functional properties. Membrane separation processes (MSP) have been highlighted by its capacity to separate proteins and keep their properties. Therefore, MSP was used to concentrate and separate the proteins from *S. platensis*, which were characterized by its physicochemical and techno-functional properties. Different ultrafiltration (UF) membranes and operational conditions (10 and 50 kDa pore size, conventional and tangential flow, hollow fiber type and pressures of 1.0, 1.5 and 2.0 bar) were tested, and associated with diafiltration (DF). The maximized condition of UF/DF (hollow fiber, 50 kDa, tangential flow at 1.5 bar, associated with one DF) was upscaled, and allowed to obtain a concentrate and permeate fractions with 81.75% and 61.20% of protein, respectively. Thus, it was produced a protein concentrate with 142 mg.L<sup>-1</sup> of phycocyanin, 90% of antioxidant activity, with proteins more soluble at high pH (50% soluble protein at pH 7.0), and molecular weight among 5-15 and 100 kDa. Protein thermal and emulsifying properties were kept by the PSM, the concentrate fraction presented results similar as *S. platensis* biomass, which confirm the advantage of this method in guarantee the protein quality.

**Keywords:** antioxidant activity; diafiltration; emulsifying properties; microalgae potential; protein secondary structure.

## 4.1 Introduction

Among microalgae composition, their high protein content is highlighted, however this nutrient concentration differs from various species, culture media and climate conditions (GODLEWSKA et al., 2017). The blue-green microalgae *Spirulina* has been one of the richest natural sources of protein, corresponding to 55-77% of its dry weight (BARKA; BLECKER, 2016). For human consumption, two species traditionally used are *S. platensis* and *S. maxima*, which besides the protein content, present excellent source of amino acids, vitamins and fatty acids (STANIC-VUCINIC et al., 2018).

*S. platensis* proteins have high nutritional value and can be compared to vegetal and meat protein sources (LUPATINI et al., 2017b). In the last decade, several studies have been published about the potential of *Spirulina* on human health (STANIC-VUCINIC et al., 2018). In *S. platensis* composition, such molecules as xanthophyll's pigments-tocopherol, phycocyanin,  $\beta$ -carotene and phenolic compounds, are recognized by their antioxidant potential (DEMISU; BENTI, 2018). Among these compounds, phycocyanin is a phycobiliproteins which is part of the *S. plantesis* proteins (LUPATINI et al., 2017b), and known as a natural colored pigment, presenting blue-green color (SUDHAKAR et al., 2015). According to antioxidant activity, phycocyanin can also be associated with some therapeutics agents, such as anticancer (SILVA et al., 2017), and anti-inflammatory properties (XIA et al., 2016).

Parallel studies have shown that *S. platensis* proteins also present potential to formulate food, improving the technological process due to their protein tecno-functional properties, such as foaming, emulsifying and gelling properties (MENEGOTTO et al., 2019; BENELHADJ et al., 2016). However, these properties have been connected with the protein composition, structure and denaturation, which can be affected according to the protein extraction and isolation method (ABIRACHED et al., 2018).

Thus, the protein extraction can improve the tecno-functional properties, due to the cellular wall rupture and the exposition of the intracellular compounds (SAFI et al., 2014). Nevertheless, it is missing researches of microalgae protein purification and separation that explain the influence of those methods on the protein properties. Among the techniques reported in the literature, enzymatic treatments, chromatographic precipitation

and membrane separation are some of the available studies (PONTIS, 2016; BARBA; GRIMI; VOROBIEV, 2015; AMID; ABDUL MANAP; MUSTAFA, 2013; NAGARAJ; PATIL; BIRADAR., 2006).

Membrane separation processes (MSP) is highlighted as an alternative procedure to separate and purify proteins. Ultrafiltration (UF) has been indicated as strategy to solve proteins isoelectric precipitation issues, such as from an environmental point of view, the isoelectric precipitation requires a large amount of water and generates a large volume of effluents (MONDOR, 2014). Besides, MSP represent the most economic process when compared to enzymatic treatments or chromatographic methods. In order to increase the performance, MSP can be associated with diafiltration (DF), which refers to the washing of the concentrate with purified water, considering a concentration factor (ABEL et al., 2018).

However, the use of MSP to obtain microalgae proteins is still little studied. There are studies in the literature with *Chlorella vulgaris* (URSU et al., 2014), *Haematococcus pluvialis* (BA; URSU; LAROCHE, 2016) and *Nannochloropsis gaditana* (SAFI et al., 2017); these researches used UF to concentrate the proteins, and the last associated UF and DF. Thus, the importance of novel scientific studies on this subject is evident, as well as the evaluation of the protein fractions obtained. Therefore, the present work aimed to apply MSP, including UF and DF, in order to concentrate *S. platensis* proteins, as well, the physicochemical and tecno-functional characterization of the UF/DF fractions.

## **4.2 Material and Methods**

### **4.2.1 Materials**

Dried *S. platensis* biomass was obtained by commercial source, from Tamandúa Farm, localized on Santa Terezinha, Paraíba, Brazil. All the chemicals were analytical grade and were purchased from distinct commercial sources.

The polyether sulfone UF membrane (847) with hollow fiber type was derived from PAM-Membranes (Brazil) and the flat polyether sulfone membranes, Ultrafilic type, were obtained commercially from GE Osmotics® (USA).

#### 4.2.2 Protein concentration by membrane separation process

The protein extraction was developed by Lupatini et al. (2017a) with adaptations on sonification and mechanical agitation performance. *S. platensis* biomass was suspended on purified water ( $30 \text{ g.L}^{-1}$ ) and the pH was set to 9.0. The suspension was left in ultrasound bath (Unique, USC-1800A, Brazil) at 40 kHz of frequency, 90% of amplitude for 35 min, following by mechanical agitation (Fisatom, 712, Brazil) at speed rate of 100 rpm for 50 min. Temperature was maintained at  $30^\circ\text{C}$  during the extraction process. After, the suspension was centrifuged at  $5,260 \times g$ ,  $25^\circ\text{C}$  for 15 min (Biosystems, MPW-351R, Brazil). The supernatant was submitted to conventional filtration (qualitative filter paper  $60 \times 60 \text{ cm}$ , 80 g weight); thus, the *S. platensis* protein extract (SpPE) has been obtained.

The protein separation with the MSP were performed, and SpPE was used as feed. This step of the work was performed at the Laboratory of Membrane and Materials (UCS – Caxias do Sul, Brazil). Initially, the performance of different UF membranes was evaluated, with transmembrane pressure of 2.0 bar, temperature of  $30^\circ\text{C}$  and time of 1.0 h. The studied membranes were: Membrane 1 – UF membrane, hollow fiber type with 50 kDa asymmetric pore size and  $0.027 \text{ m}^2$  of filtration area in tangential flow; Membrane 2 – flat membrane with 50 kDa pore size and  $0.0017 \text{ m}^2$  of filtration area in tangential flow; Membrane 3 – flat membrane with 10 kDa pore size and  $0.0017 \text{ m}^2$  of filtration area in conventional flow; Membrane 4 – flat membrane with 50 kDa pore size and  $0.0017 \text{ m}^2$  of filtration area in conventional flow; Membrane 5 – flat membrane with 100 kDa pore size and  $0.0017 \text{ m}^2$  of filtration area in conventional flow. The responses of permeate flow rate ( $\text{L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ ) and protein concentration ( $\text{g.L}^{-1}$ ) were evaluated in the concentrate and permeate fractions. Protein concentration was evaluated by the total nitrogen determination according to the catalytic combustion method at  $720^\circ\text{C}$  with infrared detection (Shimadzu, TOC-V<sub>CSH</sub>, Japan); taking into consideration the nitrogen conversion factor of 6.25 (CHRONAKIS; GALATANU; NYLANDER, 2000). Before the experiment runs, water permeate flow rate was evaluated for each membrane.

The membrane with the better flow performance was used to evaluate the effect of different transmembrane pressures (1.0, 1.5 and 2.9 bar) on permeate flow rate and

protein concentration. Thus, from the best protein concentration condition, an association of DF (UF/DF) was studied. Consequently, the UF concentrate was diluted by adding purified water in the system and again submitted to the MSP. For this, three subsequent washes of the concentrate fractions (DF 1, DF 2 and DF 3) were used, in batch conditions. The volume of water (~140 mL) was proportional to complete the initial volume of SpPE (500 mL). The operation time was set to 0.7 h, with concentration factor (CF) of 1.39, which was adjusted according to Equation 4.1 (ATRA et al., 2005).

$$CF = \frac{V_i}{(V_i - V_p)} \quad (4.1)$$

where  $V_i$  and  $V_p$  are initial and permeate volumes (L), respectively.

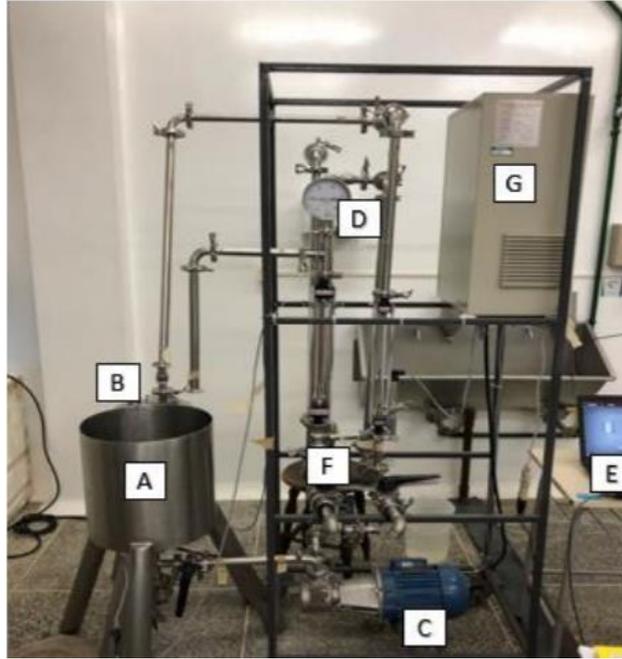
The permeate flow rate (J) was monitored every 5 min and calculated according to Equation 4.2 (CUARTAS-URIBE et al., 2007).

$$J = \frac{V_p}{(A \cdot t)} \quad (4.2)$$

where  $V_p$  is the permeate volume (L),  $A$  is the permeation area ( $m^2$ ) and  $t$  is the permeation time (h).

The maximized condition of MSP was upscaled using a pilot plant (PAM Membranes, Brazil) (Figure 4.1) localized at the Laboratory of Milk and Derivates Technology (URI – Erechim, Brazil). The process was realized by batch conditions, with hollow fiber membrane (PAM Membranes, Brazil), with 50 kDa of cut-off and 2.2  $m^2$  of filtration area in tangential flow tangential flow with 1.5 bar and 30°C.

Figure 4.1 - Pilot unit of membrane separation process (Laboratory of Milk and Derivates Technology (URI – Erechim, Brazil)).



(A) tank of feed; (B) tank of permeate collect; (C) flow regulator pump; (D) thermostat; (E) computer for adjusting pump power and control panel; (F) control valve; (G) electrical board.

#### 4.2.3 Physicochemical and tecno-functional characterization

The UF/DF concentrate and permeate fractions, and the SpPE were evaluated in relation to total protein and fractions (SDS-PAGE), total organic carbon (TOC), phycocyanin, antioxidant activity, and color parameters ( $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ ).

In order to evaluate the protein techno-functional properties, secondary structure and thermal performance of the extracts obtained in the best condition of the UF/DF, concentrate and the permeate fractions were frozen ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) and freeze-dried (Edwards, Modulyo, UK) with a vacuum pump (Edwards, RV8, UK) coupled at an absolute pressure lower than 0.01 mbar,  $-40^{\circ}\text{C}$  for 72 h. As comparative, *S. platensis* biomass (63.85% protein, dry weight (dw)) was also evaluated.

*Total protein and total organic carbon (TOC)*

The total protein content of the concentrate and permeate fractions, and the SpPE were evaluated by the total nitrogen determination according to the catalytic combustion method at 720°C with infrared detection (Shimadzu, TOC-V<sub>CSH</sub>, Japan); taking into consideration the nitrogen conversion factor of 6.25 (CHRONAKIS; GALATANU; NYLANDER, 2000). TOC contents were also determined by catalytic combustion at 680°C. TOC was obtained by difference between total and inorganic carbons. All the protein and TOC results were determined on dry weight, considering the samples moisture content (AOAC, 2016).

*Phycocyanin*

The phycocyanin determination consisted of absorbance measurements by spectrophotometer (Agilent Technologies, 8453E, USA) at 615 and 652 nm. Phycocyanin concentration (PC) was calculated by Equation 4.3 (BENNET; BOGORAD, 1973).

$$PC = \frac{A_{615} - 0.474 \times A_{652}}{5.34} \times 1000 \quad (4.3)$$

where PC is the phycocyanin concentration (mg.L<sup>-1</sup>), A<sub>615</sub> and A<sub>652</sub> were absorbance measures at 615 and 652 nm, respectively.

*Antioxidant activity*

The antioxidant activity was evaluated according to ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) method (Re et al., 1999) and at Biochemistry and Bioprocess Laboratory (UPF – Passo Fundo, Brazil). The samples (10 µL) mixed with 1 mL of ABTS<sup>•+</sup> were kept in a dark place for 6 min and analyzed using a spectrophotometer at 734 nm (Eppendorf, BioSpectrometer, Germany). The variation of the absorbance was measured, and its percentage of inhibition was calculated through Equation 4.4 (MILIAUSKAS; VENSKUTONIS; VAN BEEK, 2004).

$$AA = \frac{ABS_{blank} - ABS_{sample}}{ABS_{blank}} \times 100 \quad (4.4)$$

where AA is the antioxidant activity (% inhibition),  $ABS_{\text{blank}}$  and  $ABS_{\text{sample}}$  at 734 nm.

#### *Color parameters $L^*$ , $a^*$ , $b^*$*

The color indexes were determined by instrumental measurement using the Minolta colorimeter (Chroma Meter, CR400, Japan). The luminance values  $L^*$ , red-green component  $a^*$  and yellow-blue component  $b^*$  were expressed in the CIELAB (Commission International for Illumination) system.

#### *Protein fraction - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)*

The proteins molecular weight was determined by electrophoresis as cited by Laemmli (1970), using polyacrylamide gel-sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) 15% and molecular weight marker of 5 to 250 kDa (PageRuler, 4-20% Tris-glycine SDS-PAGE). The samples in gel were carried out under constant current of 300 mA and voltage of 250 V for about 60 min. The protein bands were revealed using dye solution of Coomassie Brilliant Blue R-250 (0.1%). *S. platensis* biomass concentration used for electrophoresis analysis was 16.60 g.L<sup>-1</sup>, SpPE, concentrate (DF1 C) were diluted 1:10 (v/v) and the permeate (DF1 P) was measured without dilution.

#### *Identification of spectral parameters*

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was performed to investigate the protein secondary structures. The biomass, UF/DF concentrate and permeate spectra were collected using a PerkinElmer, FT-IR Spectrum 100S (USA) instrument, equipped with a Universal ATR accessory, localized at Laboratory of Polymers (UCS – Caxias do Sul, Brazil). Samples were placed on a diamond/ZnSe crystal plate, and scanned from 4,000 to 600 cm<sup>-1</sup> in transmission mode with a resolution of 4 cm<sup>-1</sup>. Protein secondary structures were evaluated with spectral deconvolution and a second derivative of the region of interest (1,800 to 1,500 cm<sup>-1</sup>, which correspond to the amide I region). The peaks were adjusted, and their areas were calculated with Gaussian functions.

### *Protein thermal performance*

The thermal analyses were evaluated at Colloidal Systems Study Group (UNIT – Aracaju, Brazil). The degradation profile was measured by analysis in a thermogravimetric analyzer – TGA (Hitachi, STA 7200RV, Japan). Briefly, samples were placed in oxide aluminum pans and heated from room temperature to 550°C at heating rate of 10°C.min<sup>-1</sup>. Nitrogen was used as a purge gas (100 mL.min<sup>-1</sup>).

The differential scanning calorimetry (DSC) curves of the *S. platensis* biomass and UF/DF fractions were obtained in a TA instrument Q-20 equipment. About 4 to 6 mg of the samples were sealed in aluminum pans and submitted to a heating rate of 10°C.min<sup>-1</sup> from room temperature to 200°C, under a nitrogen atmosphere with flow rate of 30 mL.min<sup>-1</sup>.

### *Protein solubility*

Protein solubility was determined by dispersing the samples (1 g.L<sup>-1</sup>) in 0.01 M citrate-phosphate buffer pH 4.0 and 7.0, and stirring for 60 min at room temperature and then centrifuged for 15 min at 10,000 x g (20°C). The concentration of soluble protein in the supernatant was determined by the bicinchoninic acid method (SMITH et al., 1985). Protein solubility was expressed as percentage of total protein.

### *Emulsifying properties*

The emulsifying properties were analyzed at the Chemical Institute, localized on the *Universidad de la República (UDELAR)* – Montevideo, Uruguay. The o/w 25:75 (v/v) emulsions were prepared with 1 mg.mL<sup>-1</sup> soluble protein of each sample in 0.01 M citrate-phosphate buffer pH 4.0 and 7.0 and sunflower oil. The emulsions were prepared at room temperature using Ultra-Turrax homogenizer (IKA-Labortechnik, GmbH & Co., Germany) with the S25N-10G dispersing tool (GmbH & Co., Germany), the speed was adjusted to 20,000 rpm, and the homogenization time was 1 min.

The droplet size distribution of the emulsions was determined by laser light diffraction and polarized light dispersion using a particle analyzer (Coulter Counter Multisizer, Coulter Electronics Ltd., UK) (Figure 8.1, Appendix). Analyses were made on fresh emulsions. From the droplet size, expressed as number (%), volume (%) and superficial area (%) percentage, the average diameters ( $D_{3,2}$  and  $D_{4,3}$ ) were calculated using the Coulter LS software version 2.11a (Coulter Corporation, UK). The average diameters were calculated considering all the populations.

Global stability of the emulsions was determined using a vertical optical analyzer (Turbiscan Classic MA 2000, Formulacion, France). The freshly prepared emulsions were placed in a cylindrical glass cell (80 mm) to register the backscattering profile (BS, %), based on the cell height. The kinetics of creaming and emulsion destabilization were monitored every minute over 60 min and one last measurement at 24 h through BS measurement.

Destabilization due to creaming was studied through the decrease in the average BS values (at the bottom of the measuring cell, height of 10 mm) versus time. The BS data was adjusted to a second-order equation (Equation 4.5) developed by Panizzolo, Mussio and Añón (2014).

$$BS(t) = \frac{BS_s}{BS_s k_s t + 1} + \frac{BS_h}{BS_h k_h t + 1} \quad (4.5)$$

where  $BS(t)$  is the backscattering value at time  $t$ ,  $k_s$  is the rate constant of variation for BS with time for the larger size droplets,  $k_h$  is the constant of speed of variation of BS with time for the smaller size droplets, and  $BS_s$  and  $BS_h$  are the amplitude parameters corresponding to larger and smaller droplets, respectively. Thus,  $BS_h + BS_s = BS_0$ , where  $BS_0$  is the BS of the emulsion at time 0. These values were estimated by least square regression.

#### 4.2.4 Statistical analysis

The results (triplicate) were statistically treated by analysis of variance (ANOVA) ( $p \leq 0.05$ ), followed by the averages differences comparison by the Tukey test, with a 95% confidence level, using the Statistica 5.0 software (StatSoft Inc., EUA). The parameter

estimation in the second-order equation on the emulsion stability was done with the same software. The OriginPro 7.0 software (OriginLab Corporation, EUA) was used to construct the graphs.

### 4.3 Results and Discussion

#### 4.3.1 Protein concentration by membrane separation process (MSP)

In the present study, MSP was used to concentrate *S. platensis* proteins; for that it was evaluated five different membranes, and the performance of each one regarding to protein concentration is presented in Table 4.1. Protein content in the concentrate was among 9.43 to 14.27 g.L<sup>-1</sup> (membranes 5 and 4, respectively); and in the permeate was 1.72 to 4.81 g.L<sup>-1</sup> (membranes 3 and 1, respectively). According to these results, it was possible to verify that from any membrane used, mostly of *S. platensis* proteins remained in the concentrate fraction.

Membranes 1 (hollow fiber type), 2 (flat membrane in tangential flow rate) and 4 (flat membrane in convectional flow rate), all with 50 kDa of pore size, did not differ ( $p > 0.05$ ) in protein concentration; and had about 10% more protein (g.L<sup>-1</sup>) than the SpPC that was used as system feed. The protein content of membrane 3 and SpPE did not differ ( $p > 0.05$ ), concluding that the use of small pore size (10 kDa) cannot separate *S. platensis* proteins of the other constituents, due to their difficulty to permeate through the membrane. Membrane 5 presented the highest permeate flow rate due to its pore size (100 kDa), however also due to its pore size, more protein has permeated through the membrane, reducing the protein concentration. There is an exchange among membrane permeability and selectivity for protein concentration; with the increase of the membrane pore size, the flow rate increases, however the selectivity decreases, due to the wide pore size distribution of membranes which are inherently looser (ARUNKUMAR; ETZEL, 2015). Thus, in membrane 5 must have permeated other components with smaller size, such as monosaccharides, non-protein nitrogen, ash and other, and a large amount of proteins must have become entrapped in the membrane pores.

Table 4.1 - Total protein contents and permeate flux for the different membranes evaluated at 2.0 bar and 30°C.

Membranes		Protein (g.L <sup>-1</sup> )	Permeate flux (L.m <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> )
SpPE		12.94 <sup>b</sup> ± 0.16	-
1	C	13.91 <sup>a</sup> ± 0.43	8.74 <sup>d</sup> ± 0.26
	P	4.81 <sup>d</sup> ± 0.05	
2	C	13.84 <sup>a</sup> ± 0.03	8.23 <sup>d</sup> ± 0.41
	P	3.18 <sup>f</sup> ± 0.01	
3	C	12.99 <sup>b</sup> ± 0.01	18.82 <sup>c</sup> ± 0.41
	P	1.72 <sup>g</sup> ± 0.04	
4	C	14.27 <sup>a</sup> ± 0.02	35.06 <sup>b</sup> ± 0.41
	P	2.97 <sup>f</sup> ± 0.01	
5	C	9.43 <sup>c</sup> ± 0.05	36.47 <sup>a</sup> ± 0.04
	P	3.87 <sup>e</sup> ± 0.11	

\*Mean ± standard deviation followed by equal letters at the same column do not differ statistically in a level of 5% (Tukey's test).

C: concentrate; P: permeate.

1 - hollow fiber, ~ 50 kDa, tangential flow rate; 2 - flat, 50 kDa, tangential flow; 3 - flat, 10 kDa, conventional flow rate; 4 - flat, 50 kDa, conventional flow; 5 - flat, 100 kDa, conventional flow rate.

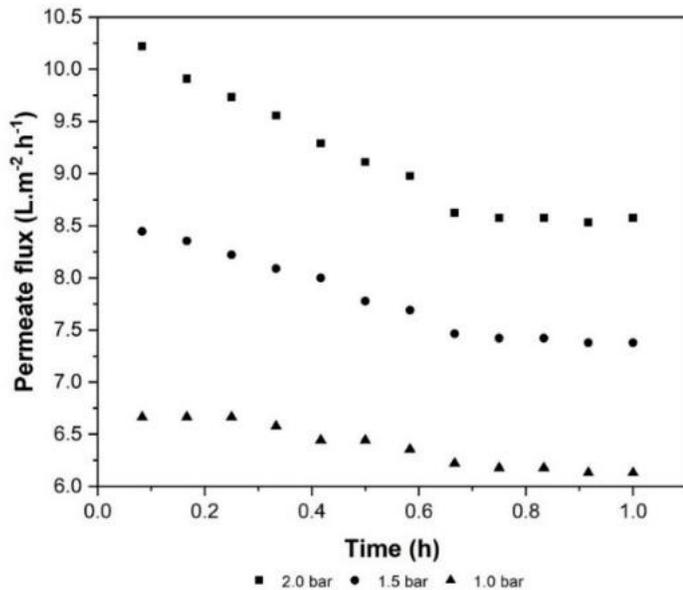
Membranes with conventional flow rate (membranes 3, 4 and 5) are more susceptible to polarization by concentration of proteins at the interface of the membrane, and lead to the form of a viscous protein aggregation layer, which favors fouling and hinders the passage of the sample through the membrane (DING et al., 2016). This phenomenon can be reduced by using membranes operating in tangential flow rate, such as membranes 1 and 2. As both membranes showed the same behavior regarding to protein concentration (~14 g.L<sup>-1</sup>) and permeate flow rate (~8.5 L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>), membrane 1 was selected to conduct the subsequent step, due to its larger permeation area and hollow fiber configuration. These characteristics lead to a greater relationship of permeation area and volume which represent more efficiency of the space used by the machine and consequently reduce the operational costs (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006). Besides, membrane 1 allowed the protein separation, part remained in the concentrated fraction (13.91 g.L<sup>-1</sup>) and part was fractionated to the permeate (4.81 g.L<sup>-1</sup>).

The effect of transmembrane pressures (1.0, 1.5 and 2.0 bar) at membrane 1 is shown in Figure 4.2a. Higher pressure significantly enhanced the driving force of filtration, increasing the permeate flow rate. It is possible to see that all permeate flow rates reduces quickly at first period of time (0.4 to 0.5 h), then continue to decrease until 0.7 h, when the flow rate is stabilized. This phenomenon occurs due to increase of the protein and the polysaccharides layer on the membrane surface, leading to membrane incrustation (GALANAKIS, 2015). According to Zhang et al. (2016) the decrease of flow rate can be explained due to increase of concentration polarization caused by the protein foulants deposited and adsorbed at membrane in short time, then membrane fouling was developed and the flow rate was reduced rapidly. After that, due to the “self-cleaning” capacity of high shear rate, the flow rate decreases unnoticeable, and when the flow rate became constant and the fouling layer did not aggravate, the equilibrium among transmembrane pressure and shear rate was developed.

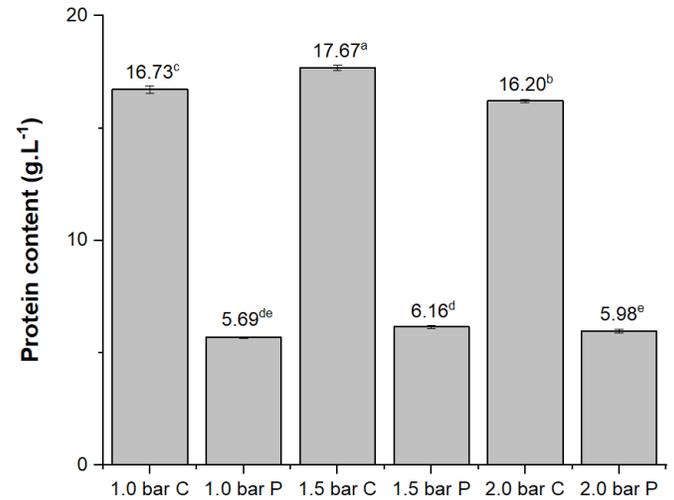
The protein separation performance applying different transmembrane pressure is shown in Figure 4.2b. Protein content of the concentrate at the pressure of 1.5 bar was approximately  $17.67 \text{ g.L}^{-1}$ , differing ( $p < 0.05$ ) from the other samples. At pressure of 2.0 bar, the driving force is higher, which increase the flow rate. However, more foulants are accumulated on the membrane and more concentration polarization occurred (ZHANG et al., 2016), leading the membrane fouling increase and consequently, the protein concentration decreases (BRIÃO; TAVARES, 2012).

After choosing the pressure with better performance, UF and DF was combined in order to improve the protein concentration. Figure 4.2c shows the permeate flow rates of the DF at 1.5 bar. The same phenomena that was related on Figure 4.2a is observed, however the flow rate stabilization occurred quickly. There was a reduction of the flow rate with the operation time of the DF, at 0.4 h there is a trend of the flow rate stabilization; the flow rate decrease can be related to the membrane fouling and polarization (LIU ET AL., 2017; FERRER; ALEXANDER; CORREDIG, 2014).

Figure 4.2 - Membrane 1 permeate flux at pressures 1.0, 1.5 and 2.0 bar (a), pressures influence on protein content (b), and permeate flux of three DF added in the UF (c).

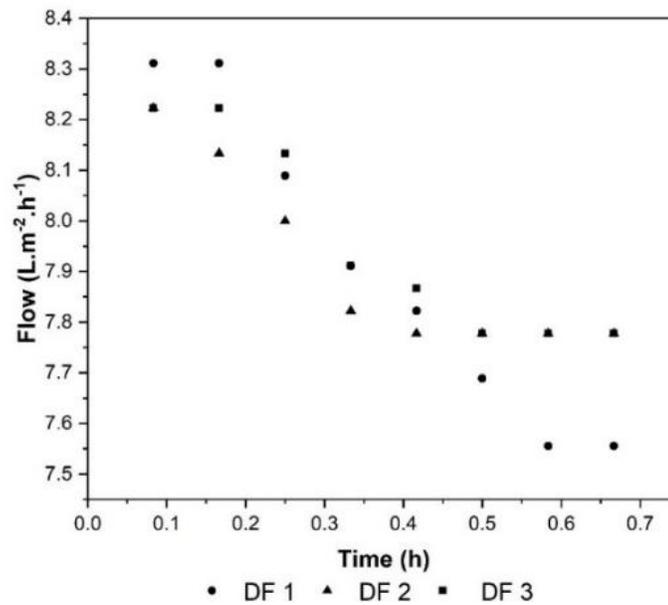


(a)



\*Protein content (g.L<sup>-1</sup>) ± standard deviation followed by equal letters do not differ statistically in a level of 5% (Tukey's test); C: concentrate; P: permeate.

(b)



(c)

#### 4.3.2 Physicochemical and tecno-functional characterization

In order to have a best visualization of the UF/DF performance, the partial characterization of concentrate and permeate fractions was studied. Table 4.2 presents

the total protein (dw), TOC (dw), phycocyanin concentration, antioxidant activity and color indexes ( $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ ) results of the SpPE (UF/DF feed) and UF/DF concentrates and permeates.

DF1 C allowed the highest protein concentration, obtaining approximately 88% of this component. According to the content found, the product may be classified as a *S. platensis* protein concentrate; Brazilian legislation for protein products from vegetable origin considered a protein concentrate at least 68% protein in dw (BRASIL, 2005). In the following DFs, there were a reduction of the protein content in the concentrate fraction, mainly due to the possibility of glycoproteins formed a covalent bond with polysaccharides and part of the proteins are entrapped on the surface of the membrane (SAFI et al., 2017). Protein content of DF permeates were higher than the UF permeate, indicating that the DF facilitated the permeation of the small proteins.

TOC is related to the organic matter existing in the samples, which include mainly carbohydrates, proteins and free fatty acids. TOC from the concentrate fractions presented the same behavior that protein (Table 4.2), DF1 C was able to obtain the higher value (~76%). This fact happened due to the protein concentration, which promote an increase of carbon present. However, on the permeate fractions, TOC increased until DF2 (~66%), then decreased. Thus, the process facilitated the permeation of some carbons by the membrane, possibly from small sugar and protein molecules. The highest phycocyanin concentration also was observed in DF1 C (~142 g.L<sup>-1</sup>).

Antioxidant activity was expressed as percentage of inhibition and the results according to the MSP samples are described in Table 4.2. Usually, higher antioxidant activity is reported with the increase in phycocyanin concentration (Wu et al., 2016). Antioxidant potential can also be related to allophycocyanin (PIÑERO ESTRADA; BEMEJO BESCÓS; VILLAR DEL FRESNO, 2001), phenolic content (ILTER et al., 2018) and bioactive peptides (COSTA et al., 2019). In this work, the maximum antioxidant activity was approximately 90% for UF C and DF1 C, which allowed increase almost 25% of the antioxidant potential.

Table 4.2 - Total protein, TOC and phycocyanin concentration, antioxidant activity and color indexes (L\*, a\* and b\*) results from the SpPE, concentrate and permeate samples obtained by UF/DF.

Samples	Protein (%, dw)	TOC (%, dw)	Phycocyanin (mg.L <sup>-1</sup> )	Antioxidant activity (% inhibition)	Color indexes		
					L*	a*	b*
SpPE	58.23 <sup>d</sup> ± 0.74	48.59 <sup>e</sup> ± 0.05	130.78 <sup>b</sup> ± 0.42	66.55 <sup>d</sup> ± 0.49	21.95 <sup>g</sup> ± 0.01	1.43 <sup>a</sup> ± 0.03	-5.87 <sup>h</sup> ± 0.03
UF C	60.94 <sup>c</sup> ± 0.54	60.81 <sup>c</sup> ± 0.12	130.94 <sup>b</sup> ± 2.84	90.25 <sup>a</sup> ± 0.29	22.08 <sup>fg</sup> ± 0.04	0.67 <sup>c</sup> ± 0.04	-5.61 <sup>g</sup> ± 0.05
UF P	27.87 <sup>g</sup> ± 0.12	25.98 <sup>h</sup> ± 0.12	7.25 <sup>e</sup> ± 0.21	60.63 <sup>e</sup> ± 0.10	55.46 <sup>d</sup> ± 0.01	-2.54 <sup>g</sup> ± 0.01	4.50 <sup>b</sup> ± 0.01
DF1 C	88.09 <sup>a</sup> ± 0.11	76.02 <sup>a</sup> ± 0.07	142.04 <sup>a</sup> ± 0.24	89.11 <sup>a</sup> ± 0.74	22.15 <sup>f</sup> ± 0.07	0.75 <sup>b</sup> ± 0.06	-5.56 <sup>fg</sup> ± 0.04
DF1 P	55.26 <sup>e</sup> ± 0.21	38.42 <sup>f</sup> ± 0.53	7.23 <sup>e</sup> ± 0.23	54.77 <sup>f</sup> ± 0.55	56.69 <sup>b</sup> ± 0.03	-2.94 <sup>h</sup> ± 0.01	5.50 <sup>a</sup> ± 0.01
DF2 C	76.25 <sup>b</sup> ± 0.09	66.04 <sup>b</sup> ± 0.14	126.33 <sup>c</sup> ± 1.23	79.41 <sup>b</sup> ± 1.12	22.16 <sup>f</sup> ± 0.07	0.59 <sup>c</sup> ± 0.04	-5.49 <sup>f</sup> ± 0.07
DF2 P	48.29 <sup>e</sup> ± 0.85	66.40 <sup>b</sup> ± 0.03	7.27 <sup>e</sup> ± 0.41	38.24 <sup>g</sup> ± 0.10	56.89 <sup>a</sup> ± 0.02	-2.08 <sup>f</sup> ± 0.01	2.62 <sup>c</sup> ± 0.01
DF3 C	60.77 <sup>c</sup> ± 0.29	53.18 <sup>d</sup> ± 0.12	116.71 <sup>d</sup> ± 1.04	73.67 <sup>c</sup> ± 0.96	22.42 <sup>e</sup> ± 0.02	0.04 <sup>d</sup> ± 0.02	-5.00 <sup>e</sup> ± 0.03
DF3 P	37.91 <sup>f</sup> ± 0.37	31.05 <sup>g</sup> ± 0.05	7.24 <sup>e</sup> ± 0.51	34.56 <sup>h</sup> ± 0.17	56.36 <sup>c</sup> ± 0.10	-1.64 <sup>e</sup> ± 0.01	1.97 <sup>d</sup> ± 0.03

\*Mean ± standard deviation followed by equal letters do not differ statically in a level of 5% (Tukey's test); SpPE: *S. platensis* protein extracted; UF: ultrafiltration; DF: diafiltration; C: concentrate; P: permeate.

Several studies have highlight beneficial effects of *S. platensis* on human health, mainly due to its antioxidant activity as a whole or from its individual components, such as phycocyanin (STANIC-VUCINIC et al., 2018). However, this bioactivity is very unstable and can be easily affected by the three-dimensional structure of phycocyanin and other protein changes under several conditions which cause their denaturation (DEJSUNGKRANONT; CHEN; SIRISANSANEEYAKUL, 2017). Therefore, the technique applied in this work should be highlighted, since by the UF/DF it was possible to increase and keep the antioxidant capacity as increase the protein concentration; instead of Brião et al. (2020) work, which the *S. platensis* antioxidant capacity decrease with the UF/DF.

The color indexes showed a significant difference ( $p < 0.05$ ) in the UF and DF processes. The  $L^*$  results from the permeate fractions were higher than in the concentrates, showing greater transparency and luminosity. For the index  $a^*$ , the negative values of the permeate fractions indicate a tendency of decrease in the greenish color. Regarding to the  $b^*$  index, it was possible to verify that the permeate results presented positive values, indicating the presence of yellow coloration and the concentrate fractions showed the presence of blue color ( $b^*$  negative); in both fractions decreasing with the DF ( $p < 0.05$ ).

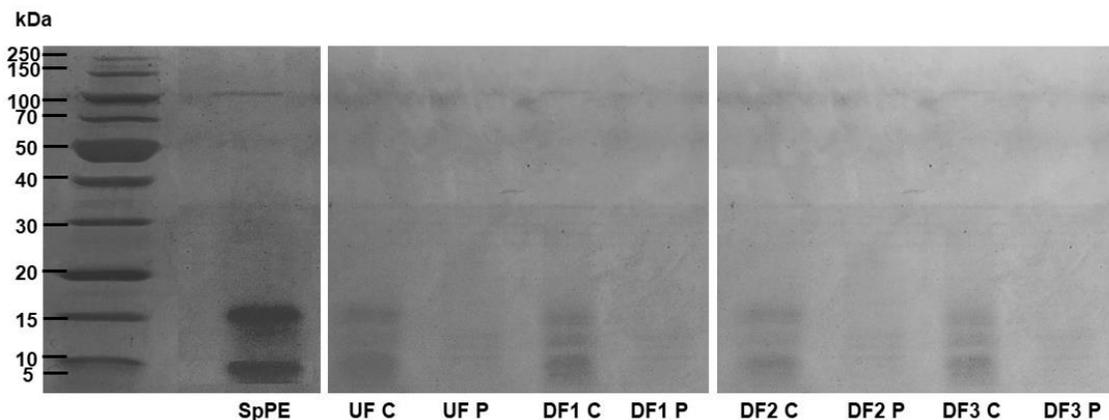
According to the color results, it is possible to relate then to the concentration of phycocyanin, that is a natural pigment with green-blue color. DF1 C was responsible to the highest pigment concentration and, consequently, according to color profile the highest  $a^*$  index. Phycocyanin has high potential for food industry applications, besides its use in biotechnology and medical; this natural colorant is prone to interact with other ingredients and binds to matrix compounds, such as proteins, lectins, saccharides, lipids and polyphenols (STANIC-VUCINIC et al., 2018). Besides, nowadays the green color has been highlighted, specially to compose children products, as food, vitamins and drugs. Thus, several foods have shown potential to apply *S. platensis* biomass, some exemples that have already been tested are ice cream, soft cheese (AGUSTINI et al., 2016) and yogurt (BARKALLAH et al., 2017); in this food formulation it is possible to guarantee the protein and the others beneficial characteristic of *S. platensis*.

The SDS-PAGE electrophoresis gel (Figure 4.3) reveals different bands with corresponding molecular weights between 5 and 100 kDa, and the most evident bands

occurred among 5 to 10 and 15 kDa. Protein retention, with molecular size less than 50 kDa (membrane 1 cut-off), is mainly due to the possibility of interaction between different molecules, forming clusters of proteins which makes the molecule larger and prevents its permeation by the membrane (SAFI et al., 2017). Gantar et al. (2012) suggested that molecular mass higher than 50 kDa could be because the phycocyanin dimmers.

According to Figure 4.3, it was possible to verify that the UF/DF process provided the *S. platensis* protein separation. In the permeate fractions, the bands showed less intensity and are smaller than 15 kDa. The wide range found in the concentrates may be related to the binding of other compounds with the proteins, such as phycocyanin, which prevents the permeation of these molecules.

Figure 4.3 - SDS-PAGE electrophoresis gel of SpPE and UF/DF samples.



SpPE: *S. platensis* protein extract; C: Concentrate; P: Permeate.

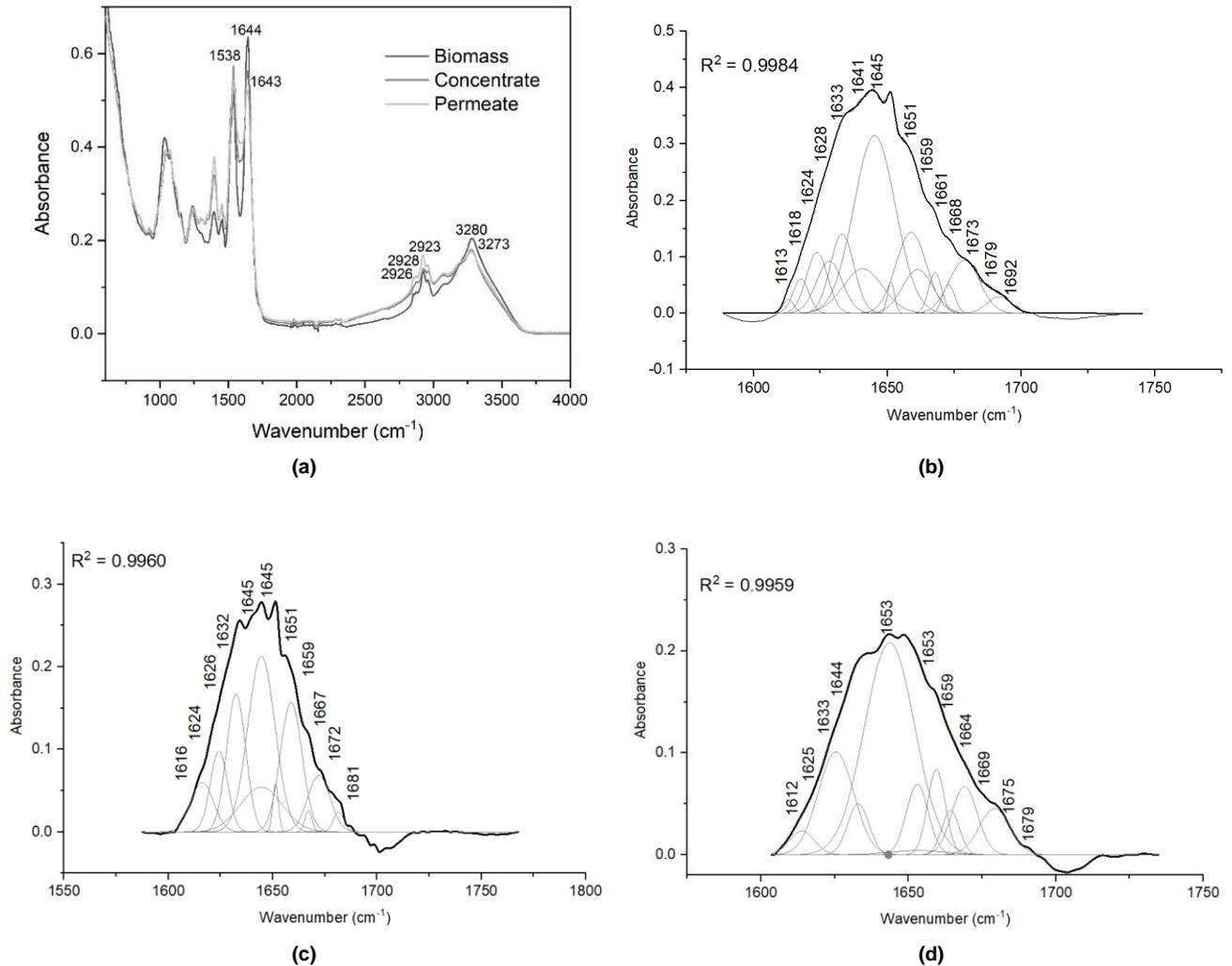
Chronakis, Galatanu and Nylander (2000) obtained a *S. platensis* strain *Pacifica* protein isolate by alkaline extraction, and studied its molecular weight, finding the most evident band at 20.1 kDa; besides checking the fractionation of the proteins of the same microalga by centrifugation and the only band observed for all fractions corresponded to a molecular weight of 14 to 22 kDa. Chaiklahan et al. (2011) studied the purified phycocyanin extract of *S. platensis* using stirred extraction and MSP and verified the presence of bands in the electrophoresis gel of 18.4 and 21.3 kDa, for  $\alpha$  and  $\beta$ , respectively.

However, Kumar et al. (2014) and Gantar et al. (2012) described that  $\alpha$  and  $\beta$  subunits have 16 and 17 kDa, and 13 and 11 kDa, respectively. It is important to note that the presence of phycocyanin bands always present high intensity. Besides, the 100 kDa band may happened due to the core membrane linker protein (95 kDa) presence. However, the results of the literature and the one present in this research demonstrate that the microalgae culture conditions, protein extraction and concentration methods may affect the characteristics of the protein, justifying the difference among the molecular weights.

As in general, DF1 showed the best results regarding to protein concentration in laboratory scale, and were made new experiments in pilot scale using hollow fiber membrane, 50 kDa of size pore, 1.5 bar, 30°C and 1.39 of concentration factor (CF). Protein content of concentrate and permeate were used as control test, reaching 81.75 and 61.20% of protein (dw) on concentrate and permeate fraction, respectively. When upscaling, it is normal to reduce the process performance (Geng et al., 2015). Thus, after the upscaling, the both fractions (DF1 C and P) were freeze-dried and characterized by chemical and tecno-functional properties.

Figure 4.4a shows the *S. platensis* biomass, UF/DF concentrate and permeate spectrums with FTIR of the amide I region (1600 to 1700  $\text{cm}^{-1}$ ); *S. platensis* biomass and the concentrate presented the main band with characteristic amide I frequencies at 1644  $\text{cm}^{-1}$  and the permeate at 1643  $\text{cm}^{-1}$ . Amide I group is attributed by C=O bond stretch and allows the bond among protein and water – by hydrogen bond, which may improve the some of the tecno-functional protein properties (NELSON; COX, 2002).

Figure 4.4 - FTIR Spectrum and curve-fitting with second-derivative of amide I of *S. platensis* biomass, UF/DF concentrate and permeate.



(a) FTIR Spectrum; (b) curve-fitting with second-derivative of amide I of *S. platensis* biomass: 32.81%  $\beta$ -sheet, 34.61% random coil, 12.64%  $\alpha$ -helix, 18.06%  $\beta$ -turn and 1.87%  $\beta$ -anti; (c) curve-fitting with second-derivative of amide I of *S. platensis* UF/DF concentrate: 31.63%  $\beta$ -sheet, 39.96% random, 13.76%  $\alpha$ -helix, 8.57%  $\beta$ -turn and 1.25%  $\beta$ -anti (c); (d) curve-fitting with second-derivative of amide I of *S. platensis* UF/DF permeate – 22.04%  $\beta$ -sheet, 44.20% random, 13.76%  $\alpha$ -helix and 20.00%  $\beta$ -turn.

Besides, at 1538 cm<sup>-1</sup> is possible to note the amide II presence, characterized by the C–N and N–H stretch (HARIS; SEVERCAN, 1999). Other bands characteristic from amide II are at 2923, 2928 and 2926 cm<sup>-1</sup> (biomass, concentrate and permeate, respectively), that happen due to C–H bonds, and at 3280 (biomass) and 3273 cm<sup>-1</sup>

(concentrate and permeate) which are bands resulted from axial deformation of N–H (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012).

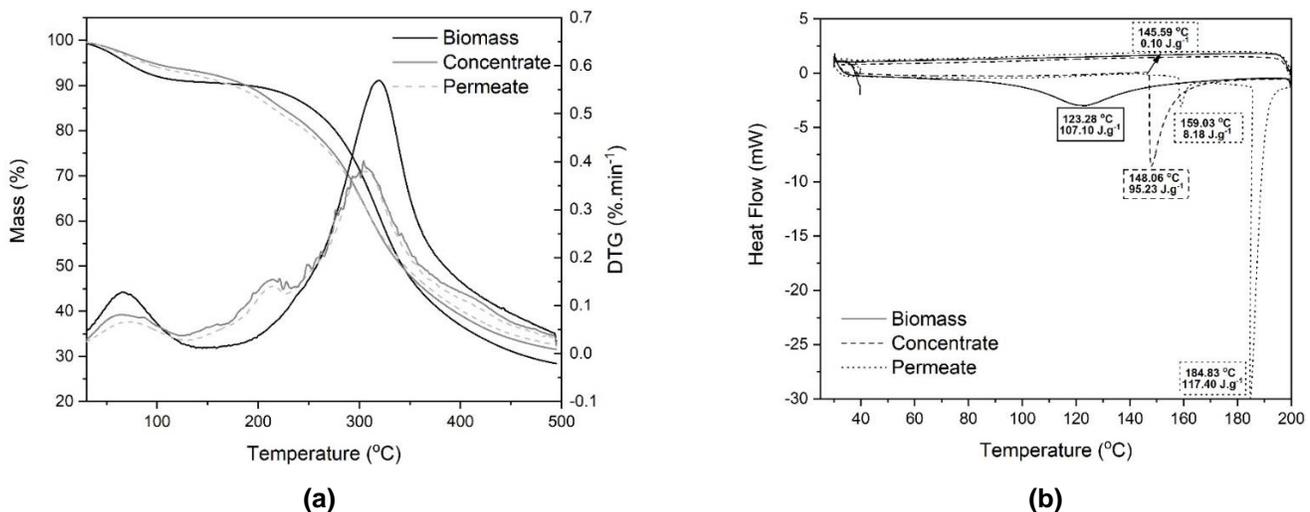
Gunasundari and Kumar (2017) evaluated the *S. platensis* biomass spectrum, and found the amide I band at  $1626\text{ cm}^{-1}$ . Menegotto et al. (2019) and Suganya et al. (2015) studied the FTIR spectra of *S. platensis* protein, and connected bands to amide I region at  $1639$  and  $1664\text{ cm}^{-1}$ , respectively. FTIR spectra, also, revealed that UF/DF process reduced the intensity for amide I band, as expected due to the separation of the *S. platensis* proteins; amide II band has the same intensity for all samples evaluated.

According to the curve-fitting of second-derivative procedures (Figure 4.4b, c and d), the contents of the secondary structures of *S. platensis* biomass, UF/DF concentrate and permeate were calculated. The contents of secondary structures were determined, by considering the ranges for the  $\beta$ -lactoglobulin (LI; MA; NGADI, 2013). For all the samples analyzed, random coil structure was the most predominant, however, according to Ulrichs, Drotleff and Ternes (2015) it is not possible to distinguish clearly between  $\alpha$ -helix and random coil structures using only FTIR method. Thus,  $\alpha$ -helix and/or random coil were the main secondary structure of all samples (47.26, 58.55 and 57.96% for biomass, concentrate and permeate, respectively). Due to its amphiphilic properties, this structure can contribute to the protein techno-functional properties, such as emulsifying (NELSON; COX, 2002). Due to  $\beta$ -sheet' hydrophobic amino acid composition, this structure can promote an increase in the protein stability, specially at high temperature. Furthermore, as the protein extraction step applied was ultrasound treatment, this is also able to affect the secondary protein structures, due to the rupture of the protein's internal hydrophobic molecular interactions, the increase in surface hydrophobicity and the molecular movement (JIANG et al., 2014). Nevertheless, Baltacıođlu, Bayındırlı and Severcan (2017) described that after sonication treatment  $\beta$ -sheet structure became weaker, and other structures, such as random coil, became stronger. The decrease of  $\beta$ -sheet, turns the protein unstable and the denaturation can be easily approached.

Thermal properties are presented in Figure 4.5. Figure 4.5a shows the mass loss and the derivative of the thermogravimetric (DTG) curves of biomass, UF/DF concentrate and permeate. The initial mass loss (< 10%) from 30 to  $120^{\circ}\text{C}$  was the evaporation of free and loosely bounded water, and between 180 and  $350^{\circ}\text{C}$ , represents the degradation of

proteins and carbohydrates (RICCI et al., 2018; LARROSA et al., 2018), which represented about 38% of mass loss in this range. The last stage of mass loss (350–500°C) is associated with lipid degradation and to the degradation of more thermally resistant compounds of microalgae (DA SILVA et al., 2019; CAMPANELLA et al., 2012). Besides, Schmatz et al. (2020) have verified that at 393°C occurs the maximum degradation of pure phycocyanin, however the denaturation of this compound occurs at lower temperatures. Comparison among the DTG curves for the biomass, concentrate and permeate evidences a main degradation process with a maximum peak in the derivative plot at 320°C to biomass and 304°C to concentrate and permeate, suggesting protein decomposition, which is the main component of *S. platensis*. The higher denaturation temperature for biomass (320°C) can be associated with its secondary structure profile, the great content of  $\beta$ -sheet promotes an increase on the protein denaturation temperature (DAMODARAN, 2017). Da Silva et al. (2019) studied the thermal degradation of *S. platensis* biomass and described that the microalgae decompose in the range of 163 to 464°C, with maximum degradation at 304°C. Larrosa et al. (2018) evaluated the influence of drying *S. platensis* biomass in a spouted bed at different temperatures, and found the maximum peak in the derivative plot at 260 to 304°C, and a mass loss among 31 and 35% in the temperature range from 180 to 350°C.

Figure 4.5 - Thermogravimetric curves (a) and DSC thermogram (b) of *S. platensis* biomass, UF/DF concentrate and permeate fractions.



The DSC curves of all the samples exhibited endothermic events (Figure 4.5b), which demonstrate the phase transition occurrence by heat absorption, with peak among 123 and 185°C. Pereira, Lisboa and Costa (2018) concluded that the increase of thermal denaturation means increasing the protein stability, mainly globular protein. The authors also state that protein extracts, isolates and concentrates are more resistant to thermal denaturation than *Spirulina* biomass. The enthalpy ( $\Delta H$ ) values were calculated by the area of the endothermic peak, and depict the proportion of undenatured proteins as well as the extent of ordered structure. The higher  $\Delta H$  were observed for the third peak of permeate fraction that was of 117.40 J.g<sup>-1</sup> and for the biomass that was of 107.10 J.g<sup>-1</sup>. Thus, the modification between the transition enthalpy for membrane separation fractions and biomass may be due to the modification of protein structures due to change in electric charge caused by pH adjustment in the extraction process (PEREIRA; LISBOA; COSTA, 2018). The permeate fraction presented three peaks, two of them with a greater thermic stability. The permeate fraction (composed with protein lower than 10 kDa), probably presented absence of tertiary and quaternary structures and peptide bonds, which made possible the visualization of a different behavior.

Solubility is an important characteristic for the application of protein in food system, and can affect other techno-functional properties due to its equilibrium between protein-protein and protein-solvent interactions (DAMODARAN, 2017). Besides, proteins with low solubility may exhibit limited techno-functional properties, and consequently limited use in food industry (LÓPEZ et al., 2019). Besides, the solubility was determined to make possible the calculation of the necessary samples weight to evaluate the emulsifying properties.

The solubility values at pH 4.0 were 10.77, 37.73 and 71.20% (g soluble protein.100 g<sup>-1</sup> total protein) for *S. platensis* biomass, UF/DF concentrate and permeate, respectively. At pH 7.0 the solubilities were 30.11% for *S. platensis* biomass, 50.09% for UF/DF concentrate and 80.62% for permeate. The solubility at pH 7.0 was greater than pH 4.0, as the *S. platensis* protein tends to increase its solubility at pH far from its isoelectric point, pH 3.0 (MENEGOTTO et al., 2019). Benelhadj et al. (2016) also studied the protein solubility of *S. platensis* protein, and found a similar behavior, but with lower values; they found about 10% of solubility at pH 4.0 and almost 40% at pH 7.0.

Protein solubility was lower for biomass than for UF/DF samples which occurred due to the strong aggregation of the biomass (BASHIR et al., 2016). The greater solubility for permeate fraction probably happened because of the protein size, increasing the protein diffusion with water (JARPA-PARRA et al., 2015).

Emulsions prepared with *S. platensis* biomass, UF/DF concentrate and permeate fractions presented a droplet size that included an interval among ~0.04 and 150  $\mu\text{m}$  (Figure 4.6). The droplet size distribution expressed in the surface exhibited a bimodal character, with two defined droplet populations ( $4 \mu\text{m} < d$ ;  $d > 4 \mu\text{m}$ ): drops with larger and smaller diameter; fact that is consequence of the homogenization process, and it was already observed by Abirached et al. (2018) and Medrano et al. (2012). Figure 4.6a shows the droplet size distribution in terms of area for the emulsions assayed. There were significant differences between UF/DF permeate and *S. platensis* biomass and UF/DF concentrate samples.

Emulsions prepared with permeate showed the distribution maximum shifted to larger droplet sizes, decreasing the percentage of volume fraction of oil particles (Figure 4.6b), and biomass and concentrate emulsions showed a greater separation between the two-droplet population. When the droplet size distribution profile expressed in number (Figure 4.6c), a significant decrease in the size of emulsions prepared with biomass and concentrate was detected. The  $D_{4,3}$  values were higher than  $D_{3,2}$  (Table 4.3), showing that the emulsions were polydisperse (ABIRACHED et al., 2018). Significant differences ( $p < 0.05$ ) in the  $D_{3,2}$  values were observed between the emulsions evaluated, permeate emulsions presented higher values, which corresponds to the displacement toward larger diameters for the curves of permeate samples, as discussed above (Figure 4.6a, b and c). The pH has not shown any significant difference on the droplet size distribution.

The BS profiles were analyzed for 60 min and after 24 h of storage in order to evaluate the creaming-flocculation kinetics of the emulsions. The results are shown in Figure 4.7, and it was found that in the bottom of the measuring tube there was a decrease in the BS values with time, evidencing the development of creaming of the oil droplets. On the other hand, in the upper zone of the tube, there was an increase in the BS values, due to the cream phase formation (ABIRACHED et al., 2018; MEDRANO et al., 2012).

Figure 4.6 - Droplet surface (a), volume (b) and number (c) distribution for the emulsions prepared with a concentration of  $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  in 0.1 M citrate-phosphate buffer pH 4.0 and 7.0.

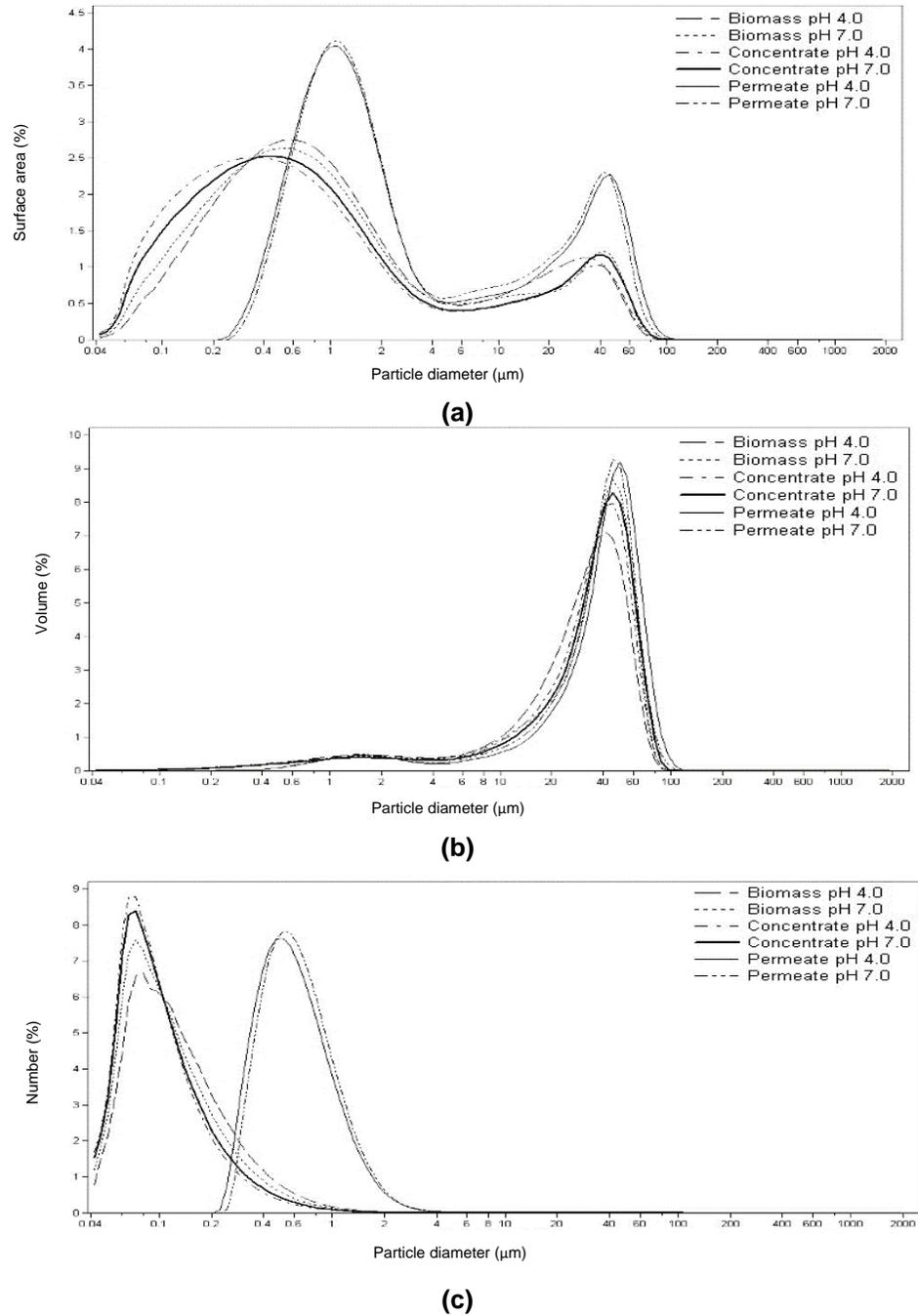
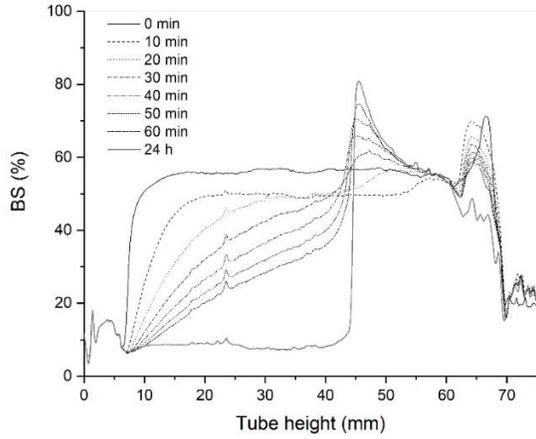
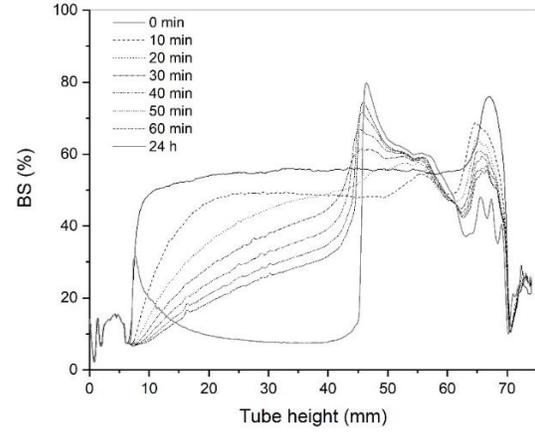


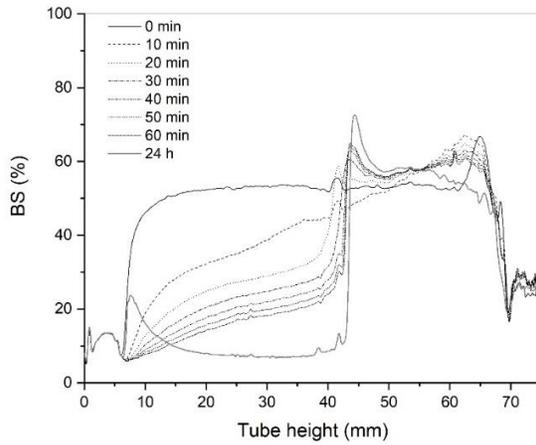
Figure 4.7 - Study of backscattering variation as function of the tube height for destabilization process of *S. platensis* biomass pH 4 (a) and 7.0 (b), UF/DF concentrate pH 4 (c) and 7.0 (d), and permeate pH 4.0 (e) and 7.0 (f).



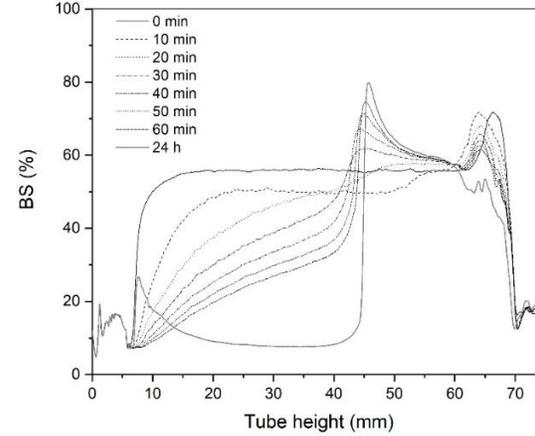
(a)



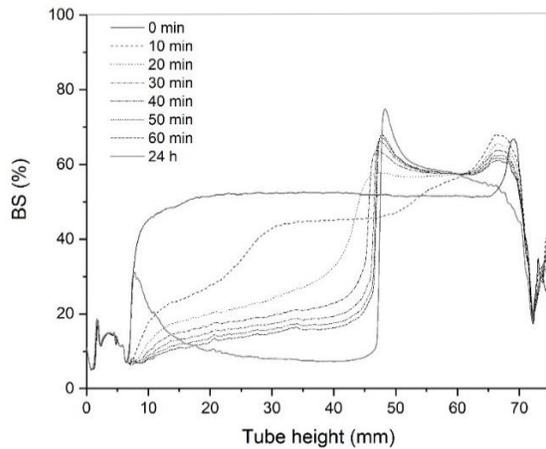
(b)



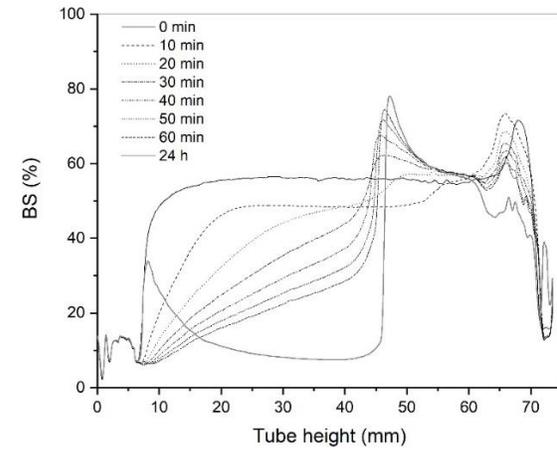
(c)



(d)



(e)



(f)

The analysis of the BS variation vs time profiles in the lower zone of the tube (height of 10 mm) showed sigmoidal curves in all samples, which were evaluated with two-term kinetic model, according to Equation 5. The sigmoidal profile describes the presence of two different droplet size, as it has been discussed before (LÓPEZ et al., 2019). In the bottom of the tube there was a decrease in the BS values, implying that a creaming process occurred, and large droplets can be visualized on the upper zone of the tube. Thus, the BS values decreased with the time due to the migration of the oil droplets to the upper zone which had lower density than the continuous phase (MEDRANO et al., 2012). The BS profiles did not present considerable differences as shown at Figure 4.7.

The Stoke's law can list the parameters which affect the rate of creaming, such as particle radius, density of the aqueous and the oil phases, and viscosity (PANIZZOLO et al., 2014). Thus, it has been concluded that particles that cream faster are those with larger radius (ABIRACHED et al., 2018).

The  $k_h$  value is related to the creaming of small particles whereas the  $k_s$  value is linked to the creaming of the large droplets (LÓPEZ et al., 2019). However, as  $k_h$  and  $k_s$  are destabilization rate constants, the smaller they are, more stable the emulsion is, and these constants are presented in Table 4.3. Emulsions stabilized with concentrate and permeate at pH 4.0 presented  $k_h$  values higher than those at pH 7.0, which could be ascribed to a higher destabilization at pH 4.0. To *S. platensis* biomass emulsions  $k_h$  did not show any significant difference ( $p > 0.05$ ) among the two levels of pH evaluated. The  $k_s$  value to biomass at pH 4.0 was smaller than those to concentrate and permeate, however at pH 7.0  $k_s$  values were similar for all samples ( $p > 0.05$ ). The results indicate that the emulsion prepared with biomass at both pH evaluated, concentrate and permeate at pH 7.0 have shown more stability, since these emulsions presented lower values of  $k_s$  and  $k_h$ . In general, the emulsion capacity of proteins is similar with solubility, as the pH decrease, the solubility also decreases and the same is observed to the emulsion characteristics (DAMODARAN, 2017). However, the greater emulsion stability obtained by biomass at pH 4.0, may be justified by the peptides of different size and with net charge without defined isoelectric point. As the hydrophobicity/hydrophilicity ratio increased, and as a result of the pH effect, the stability was benefited, suggesting that high hydrophobicity might have favored the biomass emulsion (SGARBIERI, 1998).

Table 4.3 - Emulsifying parameters studied by particle size distribution ( $D_{3,2}$  and  $D_{4,3}$ ) and emulsion stability ( $k_h$  and  $k_s$ ).

Samples	Particle diameters ( $\mu\text{m}$ )		Destabilization rate constants ( $\text{s}^{-1}$ )	
	$D_{3,2}$	$D_{4,3}$	$k_h \times 10^{-4}$	$k_s \times 10^{-3}$
Biomass pH 4.0	$6.15^b \pm 0.22$	$33.84^{ab} \pm 4.41$	$6.15^b \pm 0.52$	$4.07^d \pm 0.36$
Biomass pH 7.0	$5.78^b \pm 0.64$	$34.03^{ab} \pm 0.54$	$7.36^b \pm 0.45$	$7.79^c \pm 0.43$
Concentrate pH 4.0	$5.59^b \pm 0.37$	$30.94^b \pm 3.24$	$9.53^a \pm 0.72$	$22.4^a \pm 0.32$
Concentrate pH 7.0	$6.57^b \pm 0.64$	$35.89^{ab} \pm 0.62$	$6.95^b \pm 0.24$	$6.70^c \pm 0.56$
Permeate pH 4.0	$12.17^a \pm 0.53$	$41.69^a \pm 1.07$	$9.19^a \pm 0.26$	$15.6^b \pm 1.67$
Permeate pH 7.0	$10.38^a \pm 1.15$	$35.37^{ab} \pm 3.30$	$7.51^b \pm 0.63$	$6.60^c \pm 0.39$

\*Mean  $\pm$  standard deviation followed by equal letters at the same column does not differ statistically in a level of 5% (Tukey's test).

On the other hand, permeate and concentrate emulsions at pH 4.0 were more unstable, which can be explained by the lack of net charge and electrostatic repulsive interactions in pH next to the isoelectric point (pH 3.0) (CHRONAKIS; GALATANU; NYLANDER). On these samples, the peptides of different size were separated and the hydrophobicity/hydrophilicity ratio decreased. The emulsions prepared at pH 7.0 have shown the same performance, at pH far from the isoelectric point, proteins are more soluble and hydrated, with electrostatic repulsive forces, which improve the emulsions performances (MENEGOTTO et al., 2019). It is important to mention that the effect of protein solubility values (described earlier) cannot be considered, as the sample content used to prepare the emulsions was based on soluble proteins; e.g. the biomass content (g) was bigger than the permeate (g), as the solubility of biomass was lower.

Therefore, emulsions were stored per 24 h in order to detect coalescence. After this time, the emulsions exhibited similar BS values in the middle zone of the cream phase, different of the freshly emulsions performance. This fact indicates the lack of significant droplet size increase after 24 h of storage (LÓPEZ et al., 2019).

#### 4.4 Conclusions

The association of UF/DF has allowed to increase about 17% of protein concentration. The maximized condition of MSP (hollow fiber, 50 kDa of cut-off, tangential

flow at 1.5 bar and associated with one DF) has shown a great performance when upscaled, and allowed to obtain a concentrate and permeate fraction with 81.75% and 61.20% of protein (dw), respectively. By the concentrate fraction, it was possible to produce a protein concentrate of *S. platensis* which presented potential beyond its protein content. The protein concentrate has shown 90% of antioxidant activity, 142 mg.L<sup>-1</sup> of phycocyanin and a good emulsifying properties – high stability at pH 7.0 (< k<sub>s</sub>) and small droplet size. According to the technique studied to obtain *S. platensis* protein, it was possible to keep the protein characteristics even the process operations.

In general, the *S. platensis* samples (biomass, UF/DF concentrate and permeate fractions) presented proteins more soluble at higher pH (7.0), molecular weight among 5 to 15 and 100 kDa and protein decomposition occurred at temperature up to 300°C. The random coil and/or  $\alpha$ -helix were the main secondary structure, which can be related to the protein emulsifying properties. According to the emulsification destabilization profiles, the samples showed sigmoidal performance, that is associated to the existence of two populations with different droplet sizes.

#### 4.5 References

- ABEL, J.; KOSKY, A.; BALL, N.; BACON, H.; KAUSHILK, R.; KLEEMANN, G. R. A small-scale process for predictiong donnan and volume exclusion effects during ultrafiltration/diafiltration process development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 107, 1296–1303, 2018.
- ABIRACHED, C.; MEDRANO, A.; AÑÓN, M. C.; PANIZZOLO, L. A. Effect of acid modification of soy glycinin on its interfacial and emulsifying properties. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 95, 313–323, 2018.
- AMID, M.; ABDUL MANAP, M. Y.; MUSTAFA, S. Purification of pectinase from mango (*Mangifera indica* L. cv. Chokanan) waste using an aqueous organic phase system: A potential low cost source of the enzyme. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 931, 17–22, 2013.
- AOAC. **Official methods of analysis of AOAC international** (20th ed.). Maryland, AOAC International, 2016.
- AGUSTINI, T. W., MA'RUF, W. F., WIDAYAT, SUZERY, M., HADIYANTO, BENJAKUL, S. Application of *S. platensis* on ice cream and soft cheese with respect to their nutritional and sensory perspectives. **Jurnal Teknologi**, 78, 245–251, 2016.

- ARUNKUMAR, A.; ETZEL, M. R. Negatively charged tangential flow ultrafiltration membranes for whey protein concentration. **Journal of Membrane Science**, 475, 340–348, 2015.
- ATRA, R.; VATAI, G.; BEKASSY-MOLNAR, E.; BALINT, A. Investigation of ultra- and nanofiltration for utilization of whey protein and lactose. **Journal of Food Engineering**, 67, 325–332, 2005.
- BA, F.; URSU, A. V.; LAROCHE, C.; DJELVEH, G. *Haematococcus pluvialis* soluble protein: Extraction, characterization, concentration/fractionation and emulsifying properties. **Bioresource Technology**, 200, 147–152, 2016.
- BALTACIOĞLU, H.; BAYINDIRLI, A.; SEVERCAN, F. Secondary structure and conformation change of mushroom polyphenol oxidase during thermosonication treatment by using FTIR spectroscopy. **Food Chemistry**, 214, 507–514, 2017.
- BARBA, F. J.; GRIMI, N.; VOROBIEV, E. Evaluating the potential of cell disruption technologies for green selective extraction of antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana Bertoni* leaves. **Journal of Food Engineering**, 149, 222–228, 2015.
- BARKA, A.; BLECKER, C. Microalgae as a potential source of single-cell proteins. A review. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, 20, 427–436, 2016.
- BARKALLAH, M., DAMMAK, M., LOUATI, I., HENTATI, F., HADRICH, B., MECHICHI, T., AYADI, M. A., FENDRI, I., ATTIA, H., ABDELKAFI, S. Effect of *Spirulina platensis* fortification on physicochemical, textural, antioxidant and sensory properties of yogurt during fermentation and storage. **LWT – Food Science and Technology**, 84, 323–330, 2017.
- BASHIR, S.; SHARIF, M. K.; BUTT, M. S.; SHAHID, M. Functional properties and amino acid profile of *Spirulina platensis* protein isolates. **Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research – Series B: Biological Sciences**, 59, 12–19, 2016.
- BENELHADJ, S.; GHARSALLAOUI, A.; DEGRAEVE, P.; ATTIA, H.; GHORBEL, D. Effects of pH on the functional properties of *Arthrospira (Spirulina) platensis* protein isolate. **Food Chemistry**, 196, 1056–1063, 2016.
- BENNET, A.; BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **Journal of Cell Biology**, 58, 419–485, 1973.
- BRASIL. Resolução RDC no 268, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos protéicos de origem vegetal. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**: Brasil, 2005. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_268\\_2005.pdf/60145a2f-eb4c-4911-b1e0-46d776357a25](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_268_2005.pdf/60145a2f-eb4c-4911-b1e0-46d776357a25)>. Acesso em: 27 março 2018.
- BRIÃO, V. B.; TAVARES, C. R. G. Nota científica: Ultrafiltração de efluente da indústria de laticínios para recuperação de nutrientes: efeito da pressão e da velocidade tangencial. **Brazilian Journal of Food Technology**, 15, 352–362, 2012.
- BRIÃO, V. B.; SBEGHEN, A. L.; COLLA, L. M.; CASTOLDI, V.; SEGUENKA, B.; SCHIMIDT, G. O.; COSTA, J. A. V. Is downstream ultrafiltration enough for production of

food-grade phycocyanin from *Arthrospira platensis*? **Journal of Applied Phycology**, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10811-019-02006-1>>. Acesso em: 14 abril 2020.

CAMPANELLA, A.; MUNCRIEF, R.; HAROLD, M. P.; GRIFFITH, D. C.; WHITTON, N. M.; WEBER, R. S. Thermolysis of microalgae and duckweed in a CO<sub>2</sub>-swept fixed-bed reactor: Bio-oil yield and compositional effects. **Bioresource Technology**, 109, 154–162, 2012.

CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; LOHA, V.; TIA, S.; BUNNAG, B. Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process. **Bioresource Technology**, 102, 7159–7164, 2011.

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

COSTA, A. M.; BUENO, K. T. L.; ROSA, A. P. C.; COSTA, J. A. V. The antioxidant activity of nanoemulsions based on lipids and peptides from *Spirulina* sp. LEB18. **LWT – Food Science and Technology**, 99, 173–178, 2019.

CUARTAS-URIBE, B.; ALCAINA-MIRANDA, M. I.; SORIANO-COSTA, E.; BES-PIA, A. Comparison of the behavior of two nanofiltration membranes for sweet whey demineralization. **Journal of Dairy Science**, 90, 1094–1101, 2007.

DA SILVA, A. C.; FERNANDES, I. P.; BARROS, L.; FERNANDES, A.; ALVES, M. J.; CALHELHA, R. C.; PEREIRA, C.; BARREIRA, J. C. M.; MANRIQUE, Y.; COLLA, E.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARREIRO, M. F. Spray-dried *Spirulina platensis* as an effective ingredient to improve yogurt formulations: Testing different encapsulating solutions. **Journal of Functional Foods**, 60, 103427, 2019.

DAMODARAN, S. Amino acids, peptides, and proteins. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. (eds.), **Fennema's Food Chemistry**. 5. ed. Boca Raton: CRC Press, 2017.

DEJSUNGKRANONT, M.; CHEN, H.-H.; SIRISANSANEEYAKUL, S. Enhancement of antioxidant activity of C-phycocyanin of *Spirulina* powder treated with supercritical fluid carbon dioxide. **Agriculture and Natural Resources**, 51, 347–354, 2017.

DEMISU, D. G.; BENTI, B. D. Applications of *Arthrospira platensis* as an alternative source of food, maintaining nutritional security and awareness creation; there by reducing problems of malnutrition in the society. **World News of Natural Sciences**, 19,1–8, 2018.

DING, L.; ZHANG, W.; OULD-DRIS, A.; JAFFRIN, M. Y.; TANG, B. Concentration of milk proteins for producing cheese using a shear-enhanced ultrafiltration technique. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 55, 11130–11138, 2016.

FERRER, M.; ALEXANDER, M.; CORREDIG, M. Changes in the physico-chemical properties of casein micelles during ultrafiltration combined with diafiltration. **LWT – Food Science and Technology**, 59, 173–180, 2014.

GALANAKIS, C. M. Separation of functional macromolecules and micromolecules: From ultrafiltration to the border of nanofiltration. **Trends in Food Science & Technology**, 42,

44–63, 2015.

GANTAR, M.; SIMOVIC, D.; DJILAS, S.; GONZALEZ, W. W.; MIKSOVSKA, J. Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycoerythrin from *Limnothrix* sp. strain 37–2-1. **Journal of Biotechnology**, 159, 21–26, 2012.

GENG, X. L.; TOLKACH, A.; OTTE, J.; IPSEN, R. Pilot-scale purification of  $\alpha$ -lactalbumin from enriched whey protein concentrate by anion-exchange chromatography and ultrafiltration. **Dairy Science & Technology**, 95, 353–368, 2015.

GODLEWSKA, K.; DMYTRYK, A.; TUHY, L.; CHOJNACKA, K. Algae as source of food and nutraceuticals. In: TRIPATHI, N. B.; KUMAR, D. (eds), **Prospects and Challenges in Algal Biotechnology**. Uttarakhand: Springer, 2017.

GUNASUNDARI, E.; KUMAR, P.S. Higher adsorption capacity of *Spirulina platensis* alga for CR(VI) ions removal: parameter optimization, equilibrium, kinetic and thermodynamic prediction. **IET Nanobiotechnology**, 11, 317–328, 2017.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processos de separação por membranas**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2006.

HARIS, P. I.; SEVERCAN, F. FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 7, 201–221, 1999.

ILTER, I.; AKYIL, S.; DEMIREL, Z.; KOÇ, M.; CONK-DALAY, M.; KAYMAK-ERTEKIN, F. Optimization of phycoerythrin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. **Journal of Food Composition and Analysis**, 70, 78–88 2018.

JARPA-PARRA, M.; BAMDAD, F.; TIAN, Z.; ZENG, H.; TEMELLI, F.; CHEN, L. Impact of pH on molecular structure and surface properties of lentil legumin-like protein and its application as foam stabilizer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 132, 45–53, 2015.

JIANG, L.; WANG, J.; LI, Y.; WANG, Z.; LIANG, J.; WANG, R.; CHEN, Y.; MA, W.; QI, B.; ZHANG, M. Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. **Food Research International**, 62, 595–601, 2014.

KUMAR, D.; DHAR, D. W.; PABBI, S.; KUMAR, N.; WALIA, S. Extraction and purification of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* (CCC540). **Indian Journal of Plant Physiology**, 19, 184–188, 2014.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227, 680–685, 1970.

LARROSA, A. P. Q.; CAMARA, A. S.; POHNDORF, R. S.; ROCHA, S. F.; PINTO, L. A. A. Physicochemical, biochemical, and thermal properties of *Arthrospira* (*Spirulina*) biomass dried in spouted bed at different conditions. **Journal of Applied Phycology**, 30, 1019–1029, 2018.

LI, M.; MA, Y.; NGADI, M. O. Binding of curcumin to  $\beta$ -lactoglobulin and its effect on antioxidant characteristics of curcumin. **Food Chemistry**, 141, 1504–1511, 2013.

LIU, D.; LI, J.; ZHANG, J.; LIU, X.; WANG, M.; HEMAR, Y.; REGENSTEIN, J. M.; ZHOU, P. Effect of partial acidification on the ultrafiltration and diafiltration of skim milk: Physico-chemical properties of the resulting milk protein concentrates. **Journal of Food Engineering**, 212, 55–64, 2017.

LÓPEZ, D.; BOERIS, V.; SPELZINI, D.; BONIFACINO, C.; PANIZZOLO, L. A.; ABIRACHED, A. Adsorption of chia proteins at interfaces: Kinetics of foam and emulsion formation and destabilization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 180, 503–507, 2019.

LUPATINI, A. L.; BISPO, L. O.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V.; CANAN, C.; COLLA, E. Protein and carbohydrate extraction from *S. platensis* biomass by ultrasound and mechanical agitation. **Food Research International**, 99, 1028–1035, 2017a.

LUPATINI, A. L.; COLLA, L. M.; CANAN, C.; COLLA, E. Potential application of microalgae *Spirulina platensis* as a protein source. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 97, 724–732, 2017b.

MEDRANO, A.; ABIRACHED, C.; MOYNA, P.; PANIZZOLO, L.; AÑÓN, M. C. The effect of glycation on oil-water emulsion properties of  $\beta$ -lactoglobulin. **LWT – Food Science and Technology**, 45, 253–260, 2012.

MENEGOTTO, A. L. L.; DE SOUZA, L. E. S.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V.; SEHN, E.; BITTENCOURT, P. R. S.; FLORES, É. L. M.; CANAN, C.; COLLA, E. Investigation of techno-functional and physicochemical properties of *Spirulina platensis* protein concentrate for food enrichment. **LWT – Food Science and Technology**, 114, 108267, 2019.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, 85, 231–237, 2004.

MONDOR, M. Production of value-added soy protein products by membrane-based operations. In: CASSANO, A.; DRIOLI, E. (eds.). **Integrated Membrane Operations**. Berlin/Boston: Walter de Gruyter GmbH, 2014.

NAGARAJ, N.; PATIL, B. S.; BIRADAR, P. M. Osmotic membrane distillation - A brief review. **International Journal of Food Engineering**, 2, 1–22, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principios de bioquímica**. (3rd ed.) São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos LTDA, 2002.

PANIZZOLO, L. A.; MUSSIO, L. E.; ANON, M. C. Kinetics for describing the creaming of protein-stabilized O/W emulsions by multiple light scattering. **Journal of Food Science and Engineering**, 4, 236–243, 2014.

PIÑERO ESTRADA, J. E.; BEMEJO BESCÓS, P.; VILLAR DEL FRESNO, A. M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protein extract. **II Farmaco**, 56, 497–500, 2001.

PONTIS, H. G. **Methods for analysis of carbohydrate metabolism in photosynthetic organisms. Plants, green algae, and cyanobacteria**. London: Elsevier Inc, 2016.

RE, R.; PELEGRINE, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, 26, 1231–1237, 1999.

RICCI, L.; UMILTÀ, E.; RIGHETTI, M. C.; MESSINA, T.; ZURLINI, C.; MONTANARI, A.; BRONCO, S.; BERTOLDO, M. On the thermal behavior of protein isolated from different legumes investigated by DSC and TGA. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 98, 5368–5377, 2018.

SAFI, C.; URSU, A. V.; LAROCHE, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; PONTALIER, P.-Y.; VACA-GARCIA, C. Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. **Algal Research**, 3, 61–65, 2014.

SAFI, C.; OLIVIERI, G.; CAMPOS, R. P.; ENGELEN-SMIT, N.; MULDER, W. J.; VAN DEN BROEK, L. A. M.; SIJTSMA, L. Biorefinery of microalgal soluble proteins by sequential processing and membrane filtration. **Bioresource Technology**, 225, 151–158, 2017.

SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais de proteínas em alimentos. **Bol. SBCTA**, v.32, p. 105-126, 1998.

SCHMATZ, D. A.; MASTRANTONIO, D. J. S.; COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. Encapsulation of phycocyanin by electrospraying: A promising approach for the protection of sensitive compounds. **Food and Bioproducts Processing**, 119, 206–215, 2020.

SILVA, E. F.; FIGUEIRA, F. S.; LETTNIN, A. P.; CARRETT-DIAS, M.; FILGUEIRA, D. M. V. B.; KALIL, S.; TRINDADE, G. S.; VOTTO, A. P. S. C-Phycocyanin: Cellular targets, mechanisms of action and multi drug resistance in cancer. **Pharmacological Reports**, 70, 75–80, 2017.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. (8th ed.). New Jersey: John Wiley & Sons, 2012.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, 150, 76–85, 1985.

STANIC-VUCINIC, D.; MINIC, S.; NIKOLIC, M. R.; VELICKOVIC, T. C. *Spirulina* phycobiliproteins as food components and complements. In: JACOB-LOPEZ, E. (ed). **Microalgal Biotechnology**. IntechOpen: Santa Maria, 2018.

SUDHAKAR, M. P.; JAGATHEESAN, A.; PERUMAL, K.; ARUNKAMAR, K. Methods of phycobiliprotein extraction from *Gracilaria crassa* and its applications in food colourants. **Algal Research**, 8, 115–120, 2015.

SUGANYA, K. S. U.; GOVINDARAJU, K.; KUMAR, V. G.; DHAS, T. S.; KARTHICK, V.; SINGARAVELU, G.; ELANCHEZHIAN, M. Blue green alga mediated synthesis of gold nanoparticles and its antibacterial efficacy against Gram positive organisms. **Materials Science and Engineering C**, 47, 351–356, 2015.

ULRICHS, T.; DROTLEFF, A. M.; TERNES, W. Determination of heat-induced changes in the protein secondary structure of reconstituted livetins (water-soluble proteins from hen's egg yolk) by FTIR. **Food Chemistry**, 172, 909–920, 2015.

URSU, A. V.; MARCATI, A.; SAYD, T.; SANTE-LHOUTELLIER, V.; DJELVEH, G.; MICHAUD, P. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, 157, 134–139, 2014.

XIA, D.; LIU, B.; XIN, W.; LIU, T.; SUN, J.; LIU, N.; QIN, S.; DU, S. Protective effects of C-phycoyanin on alcohol-induced subacute liver injury in mice. **Journal of Applied Phycology**, 28, 765–772, 2016.

ZHANG, W.; DING, L.; GRIMI, N.; JAFFRIN, M.; TANG, B. Application of UF-RDM (Ultrafiltration rotation disk membrane) module for separation and concentration of leaf protein from alfalfa juice: Optimization of operation conditions. **Separation and Purification Technology**, 175, 365–375, 2016.

## 5 Concentração de proteínas de *Spirulina platensis* utilizando sistema aquoso bifásico

### Concentration of *Spirulina platensis* protein using aqueous two-phase systems

#### Resumo

A *Spirulina platensis* vem se destacando, especialmente devido seu elevado conteúdo proteico e sua potencialidade de aplicação. Contudo, a exploração de técnicas de concentração de proteínas desta microalga ainda apresenta um grande desafio. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a purificação das proteínas de *S. platensis* aplicando distintos sistemas aquosos bifásicos (SABs) compostos por fosfato de potássio e etanol e citrato de sódio e etanol, além da associação com o processo de separação por membranas (PSM) e, a caracterização das frações obtidas. Utilizando-se 19,5% de citrato de sódio e 29% de etanol foi possível obter 1,3 de fator de purificação e 78% de recuperação. A associação do SAB com o PSM permitiu o aumento da recuperação (~87%) e do fator de purificação (~1,5). As frações topo e fundo, e o concentrado do SAB/PSM apresentaram cerca de 61, 5,9 e 69% de proteínas (base seca), 110, 12 e 101 mg.L<sup>-1</sup> de ficocianina e 42, 23 e 40% de atividade antioxidante, respectivamente. As frações proteicas mais evidentes foram visualizadas em bandas de 5 e 10-15 kDa. A amostra topo foi a que apresentou melhor potencial emulsificante, com distribuição média de partícula de  $D_{4,3} = 33,69 \mu\text{m}$  e  $D_{3,2} = 6,02 \mu\text{m}$  e maior estabilidade de emulsão ( $k_h = 0,04 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  e  $k_s = 3,54 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ). O SAB apresentou eficiência na concentração e separação de proteínas de *S. platensis*, podendo ser uma alternativa a ser utilizado em sistemas industriais.

**Palavras-chave:** atividade antioxidante; eletroforese; ficocianina; propriedades emulsificantes; purificação de proteínas.

## 5.1 Introdução

As microalgas são consideradas uma fonte alternativa de proteínas (ROY; PAL, 2015). O seu cultivo para esta finalidade teve início entre os anos 60 e 70, quando alguns pesquisadores mencionaram a possibilidade de falta de alimentos devido ao crescimento exponencial da população (MATASSA et al., 2016). Entre as microalgas, a *Spirulina* spp. tem recebido grande atenção principalmente devido seu alto percentual proteico, e sua facilidade de cultivo (LUPATINI et al., 2017). Além do apreciável teor de proteínas (aproximadamente 60%) com presença de aminoácidos de qualidade, a *S. platensis* apresenta alta concentração de vitaminas, ácidos graxos essenciais e minerais (EL-TANTAWY, 2015). Alguns estudos também vêm destacando a presença de compostos bioativos, os quais podem apresentar potencial antioxidante e propriedades terapêuticas (KONÍCKOVÁ et al., 2014; SU et al., 2014). Além disso, as proteínas de *S. platensis* são excelentes surfactantes e podem compor sistemas alimentares, agindo como agentes espumante ou emulsificante (MENEGOTTO et al., 2019).

Entretanto, os métodos de obtenção destas proteínas podem afetar suas propriedades (LÓPEZ et al., 2019; JAMBRAK et al., 2008); para tal, primeiramente ocorre a extração proteica e, em seguida, a recuperação e/ou purificação das frações proteicas (PHONG et al., 2017). Tratamentos enzimáticos, precipitações baseadas na solubilidade de proteínas (CHAIKLAHAN et al., 2011), cromatografia (PONTIS, 2016), sistemas aquosos bifásicos (SAB) (AMID; ABDUL MANAP; MUSTAFA, 2013) e processos de separação por membranas (PSM) (NAGARAJ; PATIL; BIRADAR, 2006), vem sendo estudados como métodos para purificar e/ou concentrar proteínas de sistemas biológicos.

O SAB destaca-se por ser uma técnica alternativa para recuperação de biomoléculas, o qual consiste na mistura ternaria heterogênea formada por duas fases líquidas imiscíveis em equilíbrio (AMID; ABDUL MANAP; MUSTAFA, 2013). Estes sistemas, na maioria das vezes, são compostos por dois polímeros ou um polímero e um sal (OOI et al. 2009). Devido as grandes desvantagens, incluindo o alto custo e a dificuldade de recuperação, polímeros vêm sendo substituídos por solventes orgânicos, o quais, vem se destacando pela simplicidade, baixo custo (TIANWEI; QING; QIANG, 2002) e facilidade de reciclo (TAN; LI; XU, 2013).

O PSM, também, se destaca por ser uma técnica simples e econômica para concentrar e purificar biomoléculas, tais como proteínas. Além disso, o PSM é responsável por separar proteínas, mantendo sua estrutura nativa (BALDASSO et al., 2011). O PSM pode ser associado com diafiltrações (DF), o que se refere na adição de um solvente, na maioria das vezes água, à alimentação do processo; o que tem contribuído com o aumento da performance do processo (ABEL et al., 2018).

Baseado no exposto, verifica-se que as proteínas de *S. platensis* são um importante objeto de estudo de diversas áreas de investigação científica, contudo são poucos os dados encontrados na literatura sobre a aplicação de SAB para obtenção das proteínas de microalgas. Desta forma, o objetivo do estudo foi avaliar a purificação de proteínas de *S. platensis* utilizando SAB compostos por sal e etanol, além da combinação do SAB com PSM, afim de eliminar o excesso de sal e aumentar a purificação proteica. Com intuito de verificar a eficiência do processo, os parâmetros de purificação, as propriedades físico-químicas e tecno-funcionais das frações proteicas obtidas foram avaliados.

## **5.2 Material e Métodos**

### **5.2.1 Material**

A biomassa inativa da microalga *S. platensis* desidratada foi obtida comercialmente pela Fazenda Tamandúa, localizada em Santa Terezinha, Paraíba, Brasil. Todos os reagentes utilizados possuíam pureza analítica, sendo de procedências comerciais distintas.

### **5.2.2 Extração de proteínas da biomassa de *S. platensis***

A extração proteica foi realizada conforme Lupatini et al. (2017) com adaptações. A biomassa foi dissolvida em água purificada ( $30 \text{ g.L}^{-1}$ ) e o pH foi ajustado para 9,0, com solução de NaOH 2,0 M. A suspensão foi submetida ao tratamento ultrassônico em banho de ultrassom (Unique, USC-1800A, Indaiatuba, Brasil) na frequência de 40 kHz,

amplitude de 90% por 35 min e, em seguida, submetida à agitação mecânica (Fisatom, 712, São Paulo, Brasil) na velocidade de 100 rpm por 50 min. A temperatura foi mantida em 30 °C durante todo o processo. Para separação das fases a suspensão foi centrifugada à 7000 rpm, 25°C por 15 min (Biosystems, MPW-351R, Curitiba, Brasil) e do sobrenadante foi obtido o extrato proteico de *S. platensis* (EPSp).

### 5.2.3 Separação de proteínas utilizando sais e solventes

A precipitação das proteínas de *S. platensis* foi avaliada como estudo preliminar para definir os componentes do SAB. Para a precipitação salina foram avaliados três diferentes sais, sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Dinâmica, Indaiatuba, Brasil), fosfato de potássio dibásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Synth, São Paulo, Brasil) e citrato de sódio tribásico (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> \* H<sub>2</sub>O) (Sigma-Aldrich, EUA) e, para precipitação com solventes orgânicos avaliou-se a acetona (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O) (Synth, São Paulo, Brasil), o álcool etílico (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O) (Dinâmica, Indaiatuba, Brasil), o álcool isopropílico (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O) (Química Moderna, Barueri, Brasil) e o n-propílico (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O) (Vetec, Duque de Caxias, Brasil). As proporções de sais (m/m) ou solventes:EPSp (v/v) foram de 1:5, 2:5, 3:5 e 4:5, respectivamente. Para a escolha dos sais e solventes, assim como as proporções avaliadas, considerou-se os estudos realizados por Trentini (2014), Trentini et al. (2018) e ensaios prévios realizados.

Os ensaios foram realizados em tubos graduados tipo falcon de 50 mL adicionando-se o extrato proteico e, os sais ou solventes conforme às respectivas proporções, e homogeneizados. Na sequência, as amostras foram armazenadas a 10°C por 90 min. Em seguida, a separação das fases foi conduzida por centrifugação (Biosystems, MPW-351R, Curitiba, Brasil) a 7000 rpm, a 10°C durante 20 min. Simultaneamente, amostras controle foram preparadas, ao invés da adição do extrato proteico foi utilizada água destilada. Como respostas avaliou-se a concentração de proteínas (g.L<sup>-1</sup>) do sobrenadante e do precipitado.

#### 5.2.4 Maximização do processo de recuperação de proteínas de *S. platensis* aplicando SAB Sal/Álcool

Com base nos resultados obtidos na etapa de precipitação, na sequência realizou-se o estudo da maximização da recuperação de proteínas de *S. platensis* utilizando fosfato de potássio bifásico, citrato de sódio e etanol, mediante o emprego de metodologia de planejamento de experimentos (delineamentos compostos centrais rotacionais - DCCR 2<sup>2</sup>, 3 pontos centrais, total de 11 ensaios), visando avaliar os efeitos das variáveis concentração de sal (% m/m) e etanol (% m/m). Os níveis das variáveis estudadas (Tabela 5.1) foram definidos baseados nas curvas binodais obtidas por Leong et al. (2018) e Wang et al. (2010) (Apêndice, Figuras 8.2 e 8.3). A concentração da solução estoque salina foi de 40% (m/m).

Tabela 5.1 - Níveis das variáveis empregadas no DCCR 2<sup>2</sup> do SAB fosfato/etanol e SAB citrato/etanol.

Níveis	SAB Fosfato de potássio e etanol		SAB Citrato de sódio e etanol	
	Fosfato de potássio (%, m/m)	Etanol (%, m/m)	Citrato de sódio (%, m/m)	Etanol (%, m/m)
-1,41	12,98	25,18	17,09	28,59
-1	14	26	17,5	29
0*	16,5	28	18,5	30
+1	19	30	19,5	31
+1,41	20,02	30,82	19,91	31,41

\*Triplicata do ponto central.

Os ensaios foram conduzidos em tubos graduados tipo falcon de 50 mL onde foram adicionados o álcool e a solução salina, conforme os níveis propostos (Tabela 5.1), para completar o peso total (20 g) foi adicionado água destilada. Após a separação das duas fases, o extrato proteico de *S. platensis* foi adicionado, correspondendo a 20% (4,0 g) da massa final do sistema. Na sequência os tubos foram homogeneizados em vortex (Quimis, Q220B1, Diadema, Brasil) e mantidos em repouso em temperatura ambiente (25°C) por 15 min. O sistema foi centrifugado por 20 min a 4000 rpm a 25°C

(Biosystems, MPW-351R, Curitiba, Brasil). O fluxograma do processo de purificação proteica está apresentado na Figura 8.4 (Apêndice).

As fases topo e fundo foram separadas, sendo que cada fase foi submetida à análise de concentração de nitrogênio ( $\text{g.L}^{-1}$ ) seguindo o método de oxidação por combustão catalítica a  $720^\circ\text{C}$  com detecção por infravermelho (Shimadzu, TOC-V<sub>CSH</sub>, Japão). Para o cálculo do teor de proteína ( $\text{g.L}^{-1}$ ) levou-se em consideração o fator geral de 6,25 multiplicado pelo nitrogênio (CHRONAKIS; GALATANU; NYLANDER, 2000). Os parâmetros de purificação, fator de purificação (FP), recuperação proteica (RE), razão volume (Rv) e coeficiente de partição (Kp) foram calculados de acordo com Albertson (1986).

O FP foi calculado através da Equação 5.1, onde  $PP_f$  é a concentração de proteína purificada da fase ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e  $P_i$  a concentração de proteína do EPSp ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

$$FP = \frac{PP_f}{P_i} \quad (5.1)$$

A RE foi calculada pela Equação 5.2, sendo  $P_f$  a concentração de proteína da fase ( $\text{g.L}^{-1}$ ),  $V_f$  o volume da fase (mL),  $P_i$  a concentração de proteína do EPSp ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e  $V_i$  o volume de EPSp (mL).

$$RE = \frac{P_f \cdot V_f}{P_i \cdot V_i} \cdot 100 \quad (5.2)$$

A Rv dos SABs foi determinada pela Equação 5.3, onde  $V_{fs}$  é o volume da fase superior (mL) e  $V_{fi}$  é o volume da fase inferior (mL).

$$Rv = \frac{V_{fs}}{V_{fi}} \quad (5.3)$$

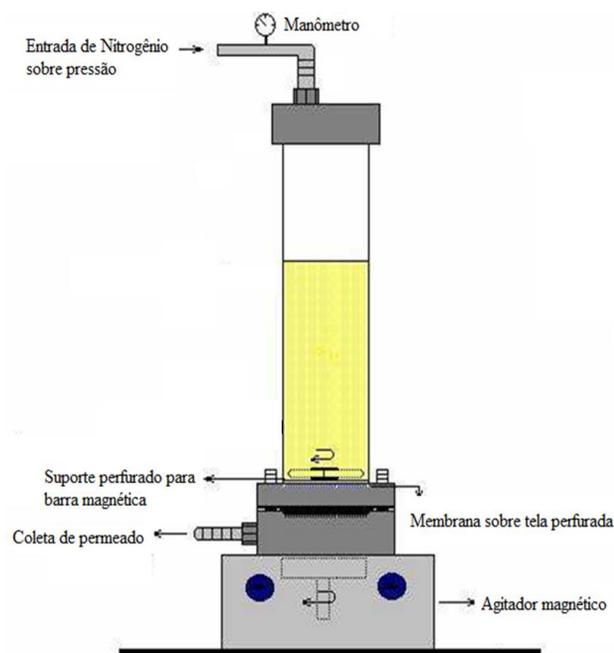
O Kp do sistema foi obtido pela Equação 5.4, sendo  $C_{fs}$  a concentração de proteína da fase superior ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e  $C_{fi}$  a concentração de proteína da fase inferior ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

$$Kp = \frac{C_{fs}}{C_{fi}} \quad (5.4)$$

### 5.2.5 Sistema combinado: SAB e PSM

Para maximizar a recuperação de proteínas de *S. platensis* obtidas pelo SAB foi avaliada a associação do SAB com PSM. Em função do peso molecular das proteínas encontradas na fase topo do SAB (determinado pela análise de perfil de eletroforese, descrito no item 5.2.6), utilizou-se membrana plana de 10 kDa de poliétersulfona tipo *Ultrafilic* (GE Osmonics, EUA), em fluxo convencional (Figura 5.1). Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Termodinâmica (URI – Erechim, RS).

Figura 5.1 - Esquema detalhado do módulo de membrana plana.



Primeiramente, a amostra correspondente a fase topo do SAB em condição maximizada foi submetida ao armazenamento em refrigerador (5°C) por 24 h e a filtração, para que o excesso de sal fosse precipitado e removido. Posteriormente, a amostra foi diluída com água purificada, considerando o fator de concentração de 1,39 e, em seguida foi submetida a ultrafiltração/diafiltração (UF/DF), operando com pressão de 1,5 bar e 30°C. As condições do processo UF/DF foram definidas a partir de ensaios preliminares e o estudo apresentado no Capítulo 4 deste trabalho.

### 5.2.6 Caracterização físico-química e tecno-funcional das frações do SAB e SAB/PSM

As fases topo e fundo do SAB em condição maximizada e as frações (concentrado e permeado) do SAB combinado com PSM foram avaliadas em termos de proteína total, frações proteicas (SDS-PAGE), ficocianina, atividade antioxidante e parâmetros de cor ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ).

Com o intuito de avaliar as propriedades tecno-funcionais, estrutura secundária e térmicas das proteínas, as fases topo e fundo do SAB com melhor desempenho e o concentrado do SAB/PSM foram congelados (-80 °C) e desidratados em liofilizador (Edwards, Modulyo, UE) acoplado com uma bomba de vácuo (Edwards, EV8, UE) em pressão absoluta menor que 0,01 mBar, -40°C por 48 h.

#### *Proteína total*

A concentração de nitrogênio ( $\text{g.L}^{-1}$ ) total foi determinada pelo método de oxidação por combustão catalítica a 720°C com detecção por infravermelho (Shimadzu, TOC-V<sub>CSH</sub>, Japão). O conteúdo de proteína ( $\text{g.L}^{-1}$ ) foi calculado levando-se em consideração o fator de conversão de nitrogênio de 6,25 (CHRONAKIS; GALATANU; NYLANDER, 2000). O percentual de proteína total foi calculado em base seca (bs), considerando o teor de umidade da amostra (AOAC, 2016).

#### *Ficocianina*

A determinação da ficocianina consistiu na leitura de absorbância (Agilent Technologies, 8453E, EUA) nos comprimentos de onda 615 e 652 nm. A concentração de ficocianina (FC) foi calculada pela Equação 5.5 (BENNET; BOGORAD, 1973).

$$FC = \frac{A_{615} - 0,474 \times A_{652}}{5,34} \times 1000 \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} \quad (5.5)$$

### *Atividade antioxidante*

A atividade antioxidante foi avaliada de acordo com o método ABTS (ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzoatiazolina-6-sulfônico)) (Re et al., 1999) no Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos (UPF – Passo Fundo, RS). As amostras (10 µL) misturadas com 1 mL de ABTS+ foram mantidas no escuro por 6 min e, em seguida, analisadas utilizando um espectrofotômetro (Eppendorf, BioSpectrometer, Alemanha) em comprimento de onda de 734 nm. A variação da absorbância foi avaliada e o percentual de inibição foi calculada pela Equação 5.6.

$$\% \text{ Inibição} = \frac{\text{ABS}_{\text{branco}} - \text{ABS}_{\text{amostra}}}{\text{ABS}_{\text{branco}}} \times 100 \quad (5.6)$$

### *Cor L\*, a\*, b\**

Os parâmetros de cor foram determinados por medida instrumental utilizando o colorímetro Minolta (Chroma Meter, CR400, Japão), os valores de luminosidade L\*, a\* (componente vermelho-verde) e b\* (componente amarelo-azul) foram expressos no sistema de cor CIELAB (*Commission International for Illumination*).

### *Frações proteicas - Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)*

As frações proteicas foram avaliadas por eletroforese utilizando gel de poliacrilamida, dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) 15% e padrão de massa molar 5-100 kDa (PageRuler, 4-20% Tris-glycine SDS-PAGE) de acordo com a metodologia de Laemmli (1970). As frações das fases topo foram diluídas 7,5 vezes e das fases fundo não necessitaram de diluição. As amostras foram submetidas a uma corrente constante de 300 mA e tensão de 250 V por aproximadamente 60 min. As bandas de proteínas presentes foram visualizadas utilizando solução corante azul brilhante (Blue R-250).

### *Identificação de parâmetros espectrais*

A análise da estrutura proteica foi realizada pela técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) no Laboratório de Polímeros (UCS – Caxias do Sul, RS). As amostras liofilizadas foram submetidas à análise em um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (PerkinElmer, FT-IR Spectrum 100S, EUA), acoplado com o acessório de reflexão total atenuada (ATR), localizado no Laboratório de Polímeros (UCS – Caxias do Sul, RS). As amostras foram inseridas em uma placa de cristal de diamante/ZnSe e digitalizadas de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$  no modo de transmissão com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### *Análises térmicas das proteínas*

As análises térmicas foram realizadas no Núcleo de Estudo em Sistemas Coloidais (UNIT – Aracaju, SE). O perfil de degradação térmico foi obtido pela análise em um analisador termogravimétrico – TGA (Hitachi, STA 7200RV, Japão). Primeiramente, as amostras foram inseridas em panelinhas de óxido de alumínio e aquecidas da temperatura ambiente à 550°C, com taxa de aquecimento de 10°C.min<sup>-1</sup>. O gás de purga utilizado foi nitrogênio (100 mL.min<sup>-1</sup>).

As curvas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram obtidas pelo instrumento TA do equipamento Q-20 (Japão). Aproximadamente 4–6 mg das amostras foram seladas em panelinhas de alumínio e submetidas ao aquecimento (10°C.min<sup>-1</sup>) da temperatura ambiente à 200°C, utilizando 30 mL.min<sup>-1</sup> de nitrogênio atmosférico.

### *Solubilidade proteica*

A solubilidade proteica foi determinada pela dispersão das amostras (1 g.L<sup>-1</sup>) em tampão de citrato-fosfato (0,01 M) em pH 4,0 e 7,0 e, agitação por 60 min em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 min, 10.000 x g, a 20°C. A concentração de proteínas solúveis no sobrenadante foi mesurada pelo método do

ácido bicinconínico (SMITH et al., 1985). A solubilidade proteica foi expressa como porcentagem de proteínas totais.

### *Propriedades emulsificantes*

As análises emulsificantes foram realizadas no *Instituto de Química*, localizado na *Universidad de la República (UDELAR)* – Montevideu, Uruguai. Para cada amostra foram preparadas emulsões óleo (girassol)/água 25:75 (v/v) com 1 mg.mL<sup>-1</sup> de proteína solúvel dissolvidas em tampão de citrato-fosfato (0,01 M) em pH 4,0 e 7,0. As emulsões foram preparadas em temperatura ambiente utilizando homogeneizador de alta velocidade Ultra-Turrax (IKA-Labortechnik, GmbH & Co., Alemanha) com rotor S25N-10G (GmbH & Co., Alemanha), velocidade de 20.000 rpm e por 1 min.

A distribuição do tamanho de partícula das emulsões foi determinada por difração de luz a laser e dispersão de luz polarizada utilizando um analisador de partículas (Coulter Counter Multisizer, Couter Eletronix Ltd., UE), cuja faixa variou entre 0,04 a 2000 µm. A análise foi realizada em emulsões recém preparadas somente com tampão pH 7,0. O tamanho de partícula, expresso como número (%), volume (%) e área superficial (%) e, os diâmetros médios (D<sub>3,2</sub> e D<sub>4,3</sub>) foram calculados usando o Coulter LS software versão 2.11a (Coulter Corporation, EU). Os diâmetros médios foram calculados considerando a população total.

A estabilidade global das emulsões foi determinada utilizando um analisador óptico vertical (Turbiscan Classic MA 2000, Formulacion, França). As emulsões recém preparadas foram colocadas em uma célula de vidro cilíndrico (80 mm) para registrar o perfil de retrodispersão (RD, %) em função da altura da célula (Figura 8.1, Apêndice). As medidas foram realizadas a cada minuto durante 30 min e uma última medida após 24 h.

A desestabilização da emulsão foi avaliada mediante o decréscimo do RD médio (do fundo da célula de medida, altura de 10 mm) *versus* tempo. Os dados de RD foram ajustados com a equação de segunda ordem (Equação 5.7) (PANIZZOLO; MUSSIO; AÑÓN, 2014).

$$RD(t) = \frac{RD_s}{RD_s k_s t + 1} + \frac{RD_h}{RD_h k_h t + 1} \quad (5.7)$$

Onde  $RD(t)$  é o valor de RD no tempo  $t$ ,  $k_s$  é a taxa constante de variação de RD com tempo para partículas grandes,  $k_h$  é a constante de velocidade de variação de RD com tempo para partículas pequenas e,  $RD_s$  e  $RD_h$  são os parâmetros de amplitude correspondentes às partículas grande e pequenas, respectivamente. Portanto,  $RD_h + RD_s = RD_0$ , onde  $RD_0$  é o RD da emulsão no tempo 0.

### 5.2.7 Análise estatística

Os resultados foram tratados estatisticamente com auxílio do software Statistica 5.0 (Statsoft Inc., EUA) pela metodologia de planejamento de experimentos, os modelos foram validados pela análise de variância (ANOVA) ( $p \leq 0,10$ ), calculou-se os valores preditos e o desvio relativo (DR). O ajuste da equação de segunda ordem da estabilidade de emulsão foi realizado pelo mesmo software. Os resultados, também, foram tratados pela ANOVA, seguido de comparação entre as médias pelo teste de Tukey com 95% de nível de confiança.

## 5.3 Resultados e Discussão

### 5.3.1 Separação de proteínas utilizando sais e solventes

Como etapa preliminar à aplicação do SAB avaliou-se a separação proteica aplicando diferentes sais e solventes orgânicos, baseando-se no princípio de separação de proteínas pela diferença de solubilidade. Os sais utilizados foram sulfato de amônio, fosfato de potássio e citrato de sódio, nas proporções sal:EPSp de 1:5, 2:5, 3:5 e 4:5 (m/m). Os resultados de concentração de proteína ( $g.L^{-1}$ ) dos sobrenadantes e dos precipitados estão apresentados na Tabela 5.2.

O conteúdo de proteínas nas fases topo variaram de 9,33 a 14,03  $g.L^{-1}$  empregando a razão 3:5 (m/m) de sulfato de amônio:EPSp e 1:5 (m/m) de citrato de sódio:EPSp, respectivamente. Os ensaios na proporção de 1:5 (m/m) sal:EPSp, independente do sal, não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na fase topo,

neste caso, as proteínas tendem a ficar em suspensão, devido à baixa concentração salina.

Tabela 5.2 - Concentração de proteína nos ensaios de precipitação utilizando diferentes proporções de sal:EPSp.

Proporções sal:EPSp (m/m)		Proteína (g.L <sup>-1</sup> )		
		Sulfato de Amônio	Fosfato de Potássio	Citrato de Sódio
1:5	S	13,35 <sup>aB</sup> ± 0,04	13,46 <sup>aB</sup> ± 0,07	14,03 <sup>aA</sup> ± 0,02
	P	0,69 <sup>hA</sup> ± 0,08	0,56 <sup>dA</sup> ± 0,10	0,04 <sup>dB</sup> ± 0,01
2:5	S	11,61 <sup>bB</sup> ± 0,02	13,41 <sup>aA</sup> ± 0,45	13,77 <sup>aA</sup> ± 0,04
	P	2,39 <sup>gA</sup> ± 0,25	0,63 <sup>dB</sup> ± 0,10	0,27 <sup>dB</sup> ± 0,03
3:5	S	9,33 <sup>dC</sup> ± 0,04	12,50 <sup>abB</sup> ± 0,10	13,98 <sup>aA</sup> ± 0,51
	P	4,69 <sup>eA</sup> ± 0,01	1,52 <sup>cdB</sup> ± 0,13	0,12 <sup>dC</sup> ± 0,01
4:5	S	10,30 <sup>cA</sup> ± 0,23	11,10 <sup>bA</sup> ± 0,82	12,08 <sup>bA</sup> ± 0,05
	P	3,72 <sup>fA</sup> ± 0,20	2,87 <sup>cAB</sup> ± 0,37	1,94 <sup>cB</sup> ± 0,08

\*Média ± desvio padrão seguidas de letras diferentes minúsculas/coluna e maiúsculas/linha diferem a nível de 95% de confiança (teste de Tukey); S: sobrenadante; P: precipitado.

Os três sais avaliados apresentaram potencial para aplicação em SAB, de maneira que os sais citrato de sódio e fosfato de potássio apresentaram maior potencial de concentração proteica, ao considerar as cinco proporções avaliadas. Ao aumentar a saturação salina observou-se uma redução da concentração de proteína na fase topo, evidenciando o efeito *salting-out* na precipitação proteica. Os efeitos dos sais sobre as proteínas estão relacionados com a sua capacidade em se ligar com estas moléculas e, alterar suas propriedades de hidratação (DAMODARAN, 2017).

A Tabela 5.3 apresenta as concentrações de proteínas resultantes da etapa de separação com solventes orgânicos (acetona, álcool etílico, álcool isopropílico e álcool n-propílico), nas proporções solvente:EPSp de 1:5, 2:5, 3:5 e 4:5 (v/v).

Os maiores teores de proteínas foram encontrados nos sobrenadantes, na proporção 1:5 (v/v) solvente:EPSp, sendo que o maior teor de proteína foi de 13,71 g.L<sup>-1</sup> no ensaio com álcool etílico, porém não difere ( $p > 0,05$ ) dos ensaios com álcool isopropílico (13,40 g.L<sup>-1</sup>) e acetona (13,00 g.L<sup>-1</sup>). Os percentuais de proteínas nas frações precipitadas aumentaram à medida que foi aumentada a proporção de solvente, variando

de 0,30 a 7,04 g.L<sup>-1</sup>, nos ensaios na proporção álcool etílico:EPSp 1:5 (v/v) e acetona:EPSp 4:5 (v/v), respectivamente.

Tabela 5.3 - Concentração de proteína nos ensaios de precipitação utilizando diferentes proporções de solvente orgânico:EPSp.

Proporções solvente:EPSp		Proteína total (g.L <sup>-1</sup> )			
		Acetona	Álcool Etílico	Álcool Isopropílico	Álcool N-propílico
1:5	S	13,00 <sup>aA</sup> ± 0,15	13,71 <sup>aA</sup> ± 0,04	13,40 <sup>aA</sup> ± 0,23	10,94 <sup>aB</sup> ± 0,62
	P	1,02 <sup>fB</sup> ± 0,12	0,30 <sup>hC</sup> ± 0,07	0,62 <sup>fBC</sup> ± 0,20	3,07 <sup>dA</sup> ± 0,19
2:5	S	10,72 <sup>bB</sup> ± 0,37	12,37 <sup>bA</sup> ± 0,24	12,42 <sup>bA</sup> ± 0,37	9,06 <sup>bC</sup> ± 0,21
	P	3,29 <sup>eB</sup> ± 0,40	1,65 <sup>gC</sup> ± 0,21	1,60 <sup>eC</sup> ± 0,40	4,96 <sup>cA</sup> ± 0,18
3:5	S	7,58 <sup>cD</sup> ± 0,14	8,12 <sup>cC</sup> ± 0,12	9,82 <sup>cA</sup> ± 0,04	8,71 <sup>bB</sup> ± 0,03
	P	6,44 <sup>dA</sup> ± 0,11	5,90 <sup>fB</sup> ± 0,09	4,20 <sup>dD</sup> ± 0,01	5,31 <sup>cC</sup> ± 0,06
4:5	S	6,98 <sup>cdB</sup> ± 0,05	7,46 <sup>dB</sup> ± 0,22	9,10 <sup>cA</sup> ± 0,14	8,90 <sup>bA</sup> ± 0,52
	P	7,04 <sup>cdA</sup> ± 0,02	6,56 <sup>eA</sup> ± 0,19	4,91 <sup>dB</sup> ± 0,11	5,12 <sup>cB</sup> ± 0,51

\*Média ± desvio padrão seguidas de letras diferentes minúsculas/coluna e maiúsculas/linha diferem a nível de 95% de confiança (teste de Tukey); S: sobrenadante; P: precipitado.

O peso molecular da proteína possivelmente afetou a separação proteica com solventes orgânicos; pois moléculas de menor peso molecular necessitam de maior concentração de solvente para que ocorra a precipitação (SCOPES, 1994). Como as proteínas de *S. platensis* apresentam baixo peso molecular, com bandas mais evidentes entre 10-15 kDa (BENELHADJ et al., 2016), as proteínas permaneceram solúveis e somente uma pequena fração precipitou. A constante dielétrica dos solventes é outro fator que pode estar relacionado com a separação de proteínas, sendo que quanto menor a constante dielétrica, maior é a força de atração entre as moléculas de proteínas, favorecendo a precipitação (SGARBIERI, 1998; DAMODARAN, 2017). Neste contexto, por apresentar uma constante dielétrica ligeiramente menor que os demais solventes, o etanol possivelmente favoreceu a solubilidade das proteínas, aumentando sua concentração no sobrenadante (SGARBIERI, 1998; LIDE, 1999), o que apresenta maior potencial para aplicação no SAB. Além disso, o etanol é considerado um solvente “verde”, amigável com meio ambiente e de baixo custo (BONATTO et al., 2019).

Os ensaios de separação proteica com sais e solventes indicaram faixas de concentrações que podem ser aplicados no SAB. Os sais fosfato de potássio e citrato de sódio e o solvente etanol foram os que apresentaram maior capacidade em concentrar as proteínas de *S. platensis* (sobrenadante), reduzindo as chances das proteínas se ligarem entre si e precipitarem. Desta forma, realizou-se o estudo de dois SAB, compostos por fosfato de potássio/etanol e citrato de sódio/etanol, respectivamente.

### 5.3.2 Recuperação de proteínas utilizando SAB com Sal/Álcool

Nas Tabelas 5.4 e 5.5 estão apresentadas as matrizes dos DCCRs  $2^2$  (valores reais e codificados) das variáveis estudadas para o SAB com fosfato de potássio/etanol e SAB com citrato de sódio/etanol e as respostas em relação ao fator de purificação (FP) e recuperação (RE, %) para fase topo, razão volume (Rv) e do coeficiente de partição (Kp) dos respectivos sistemas.

Para ambos os sistemas, a maior concentração de proteínas ocorreu na fase topo, indicando que esta foi mais solúvel na fase rica em etanol. A preferência pela fase topo resultou em valores de Kp maiores que 1 para todos os ensaios. Desta forma, avaliou-se estatisticamente os resultados obtidos da fase topo e os resultados das fases fundo estão apresentados nas Tabelas 8.1 e 8.2 (Apêndice).

O FP para o SAB composto por fosfato de potássio e etanol variou de 0,90 a 1,29 na fase topo (Tabela 5.4, ensaios 5 e 4) e a RE entre 68,73 a 80,28% (ensaios 8 e 7). Para o SAB composto por citrato de sódio e etanol, os resultados foram semelhantes, sendo que o FP foi de 0,82 a 1,32 (Tabela 5.5, ensaios 5 e 2) e a RE mais relevante, também, ocorreu no ensaio 2 (78,02%). Analisando-se os resultados dos DCCRs foi possível determinar os coeficientes de regressão para os parâmetros de purificação da fase topo resultantes de ambos os SABs avaliados (Tabelas 8.3 e 8.4 – Apêndice).

Tabela 5.4 - Matriz do DCCR 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados) para concentração de proteínas com SAB composto por fosfato de potássio e etanol, com as respostas de FP e RE (%) para as fases topo e, Rv e Kp do sistema.

Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis dependentes					Rv	Kp
			FP			RE (%)			
	Fosfato de potássio (%)	Etanol (%)	Experimental	Prevista	Desvio Relativo	Experimental			
1	-1 (14)	-1 (26)	0,95 ± 0,03	0,96	-0,92	76,93 ± 2,09	18,60	2,46	
2	+1 (19)	-1 (26)	1,24 ± 0,08	1,22	1,82	74,56 ± 5,03	2,76	3,06	
3	-1 (14)	+1 (30)	0,96 ± 0,01	0,96	0,22	70,28 ± 0,42	7,00	2,55	
4	+1 (19)	+1 (30)	1,29 ± 0,01	1,22	5,76	78,80 ± 0,62	2,80	2,91	
5	-1,41 (12,98)	0 (28)	0,90 ± 0,00	0,91	-0,81	73,52 ± 0,22	18,80	1,68	
6	+1,41 (20,02)	0 (28)	1,19 ± 0,01	1,27	-7,03	69,31 ± 0,30	2,48	1,60	
7	0 (16,5)	-1,41 (25,18)	1,15 ± 0,01	1,09	5,55	80,28 ± 0,60	5,00	2,64	
8	0 (16,5)	+1,41 (30,82)	1,04 ± 0,01	1,09	-4,80	68,73 ± 0,38	3,62	2,36	
9	0 (16,5)	0 (28)	1,08 ± 0,01	1,09	-1,03	73,18 ± 0,91	4,59	2,58	
10	0 (16,5)	0 (28)	1,08 ± 0,03	1,09	-0,74	73,39 ± 1,71	4,59	2,55	
11	0 (16,5)	0 (28)	1,08 ± 0,01	1,09	-1,10	72,19 ± 0,80	4,28	2,53	

Tabela 5.5 - Matriz do DCCR 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados) para concentração de proteínas com SAB composto por citrato de sódio e etanol com as respostas de FP e RE (%) para as fases topo e, Rv e Kp dos sistemas.

Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis dependentes						Rv	Kp
			FP			RE (%)				
	Citrato de sódio (%)	Etanol (%)	Experimental	Prevista	Desvio Relativo	Experimental	Prevista	Desvio Relativo		
1	-1 (17,5)	-1 (29)	0,88 ± 0,02	0,86	2,38	62,05 ± 1,40	65,24	-5,14	5,06	2,85
2	+1 (19,5)	-1 (29)	1,32 ± 0,01	1,10	16,70	78,02 ± 0,74	71,7	8,10	2,00	2,27
3	-1 (17,5)	+1 (31)	0,86 ± 0,03	0,86	0,50	53,36 ± 1,69	51,18	4,09	2,63	1,35
4	+1 (19,5)	+1 (31)	1,10 ± 0,03	1,10	0,42	60,51 ± 1,73	57,64	4,75	1,91	1,66
5	-1,41 (17,09)	0 (30)	0,82 ± 0,00	0,81	1,43	53,64 ± 0,12	50,86	5,20	3,57	1,19
6	+1,41 (19,91)	0 (30)	1,01 ± 0,01	1,15	-13,41	55,51 ± 0,54	59,96	-8,02	1,91	1,58
7	0 (18,5)	-1,41 (28,59)	1,00 ± 0,00	0,98	2,37	75,94 ± 0,13	77,31	-1,81	9,67	1,36
8	0 (18,5)	+1,41 (31,41)	0,93 ± 0,01	0,98	-5,82	54,76 ± 0,34	57,49	-4,98	2,34	1,48
9	0 (18,5)	0 (30)	1,04 ± 0,01	0,98	6,19	59,04 ± 0,71	55,41	6,15	2,10	1,70
10	0 (18,5)	0 (30)	0,89 ± 0,00	0,98	-10,10	51,09 ± 0,26	55,41	-8,47	2,20	1,39
11	0 (18,5)	0 (30)	0,90 ± 0,01	0,98	-7,92	53,70 ± 0,47	55,41	-3,19	2,27	1,49

As variáveis concentração de fosfato de potássio (%) e citrato de sódio (%) apresentaram efeitos significativos ( $p \leq 0,10$ ) positivos para o FP, indicando que à medida que aumenta a concentração de sal tem-se maior purificação da proteína. Na literatura há relatos confirmando que ao aumentar a concentração salina, a proteína tende a migrar para fase topo (SOUZA et al., 2015; LI; TENG; XIU, 2011; OOI et al., 2009). Desta forma, ao aumentar a concentração salina ocorre redução da solubilidade das proteínas na fase rica em sal (fase fundo), levando a concentração deste componente na fase topo, resultado decorrente do efeito *salting-out* (NG et al., 2018).

A variável concentração de etanol (%), para os dois sistemas foi significativa ( $p \leq 0,10$ ) somente para a RE, contudo revelou efeito negativo para as duas variáveis dependentes, ou seja, menores concentrações de etanol possibilitaram maiores valores de RE e FP. Isso ocorre, pois em baixos percentuais de álcool, as proteínas permanecem mais solúveis (DAMODARAN, 2017). Ooi et al. (2009), também, encontraram efeito semelhante ao utilizar SAB com sal/álcool para recuperação de lipase. Além disso, os mesmos autores relataram que a alta concentração de álcool na fase topo pode causar o desequilíbrio do sistema, não favorecendo a retenção proteína na fase superior.

Considerando os parâmetros significativos para as respostas FP e RE foi possível validar modelos codificados de segunda ordem, dentro da faixa estudada. A Equação 5.8 é decorrente do SAB composto por fosfato de potássio e etanol para a resposta de FP. Para RE não foi possível obter um modelo matemático visto que o percentual de variação explicado pelo modelo não foi adequado, com coeficiente de correlação igual 0,56 e  $F_{\text{calculado}}$  menor que o  $F_{\text{tabelado}}$ . As Equações 5.9 e 5.10 são referentes ao SAB com citrato de sódio e etanol.

$$FP^f(\%) = 1,09 + 0,13.X_1^f \quad (5.8)$$

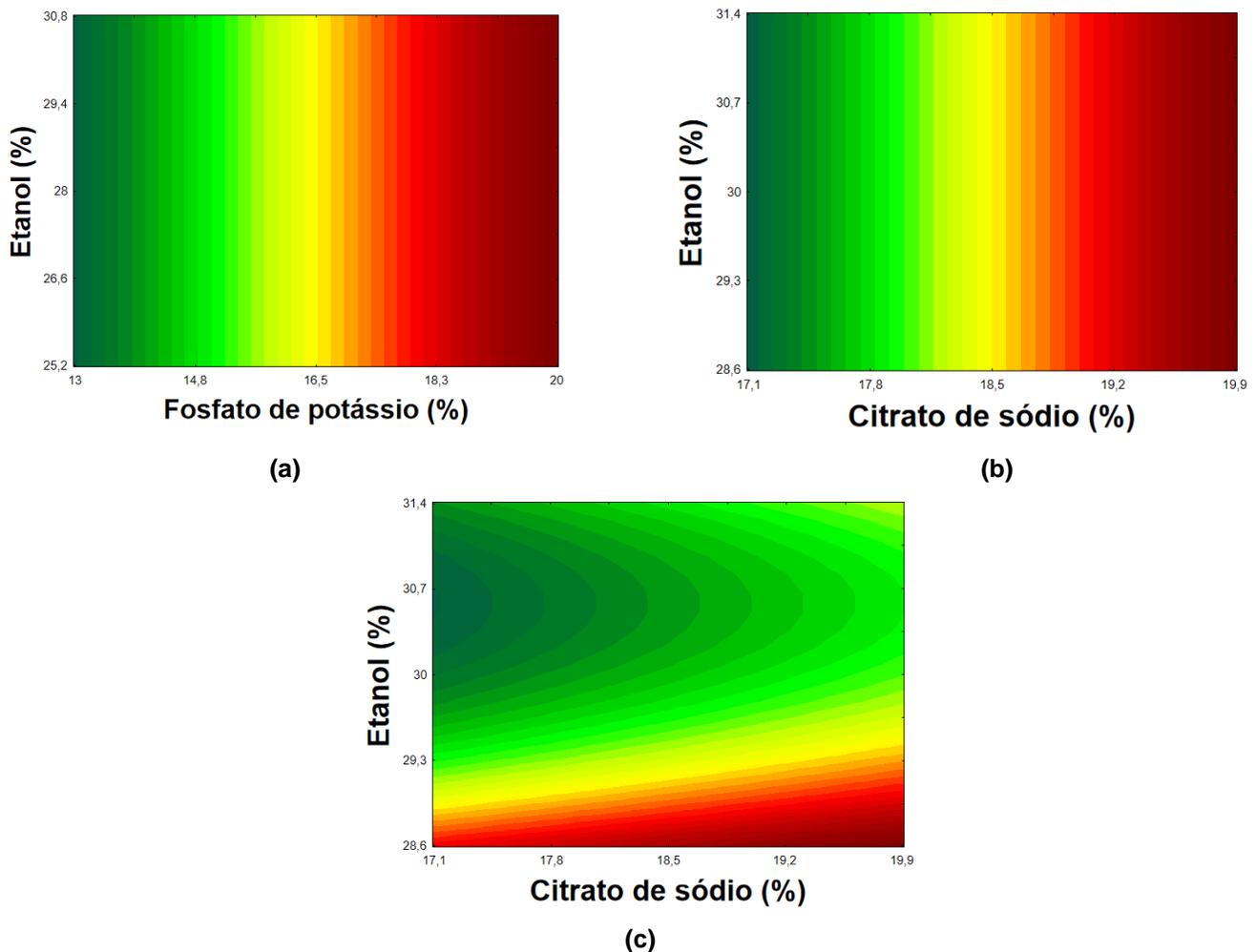
$$FP^c(\%) = 0,98 + 0,12.X_1^c \quad (5.9)$$

$$RE^c(\%) = 55,41 + 3,23.X_1^c - 7,03.X_2^c + 6,03.X_2^{c2} \quad (5.10)$$

Onde  $FP^f$  é o fator de purificação do SAB com fosfato de potássio e etanol;  $FP^c$  e  $RE^c$  são o fator de purificação e a recuperação do SAB com citrato de sódio e etanol;  $X_1^f$  é a concentração de fosfato de potássio (%) e  $X_1^c$  é a concentração de citrato de sódio (%);  $X_2^c$  é a concentração de etanol (%) para o sistema composto por citrato de sódio.

Os modelos foram validados pela análise de variância pois os  $F_{\text{calculados}}$  foram de aproximadamente 18 vezes maiores que os  $F_{\text{tabelados}}$ , para o FP do SAB fosfato de potássio/etanol, 3 vezes maior que o  $F_{\text{tabelado}}$  para o FP do SAB citrato de sódio/etanol e 4 vezes maior para RE do mesmo sistema (Tabelas 8.3 e 8.4, Apêndice), bem como coeficientes de correlação de 0,93 para FP do SAB composto por fosfato de potássio e, 0,75 e 0,92 para FP e RE do SAB composto por citrato de sódio. Desta forma, foi possível, também, construir as curvas de contorno que são apresentadas na Figura 5.2. Além disso, os desvios relativos – DR (Tabelas 5.1 e 5.2) foram inferiores à 17%, comprovando o ajuste adequado do modelo aos dados experimentais.

Figura 5.2 - Curva de contorno para FP da fase topo do SAB composto por fosfato de potássio e etanol (a), e FP (b) e RE (c) da fase topo do SAB composto por citrato de sódio e etanol.



Nas curvas de contorno (Figura 5.2) observa-se que a combinação de 18 a 20% de fosfato de potássio e em qualquer concentração de etanol (25,18 a 30,82%), resultaram em maiores fatores de purificação ( $> 1,2$ ) para o SAB composto por fosfato de potássio e etanol. Isto, também, foi verificado para o sistema SAB composto por citrato de sódio e etanol com maiores fatores de purificação ( $> 1,1$ ), na faixa de 19 a 20% de citrato de sódio e 29 a 30% de etanol, respectivamente. As melhores recuperações ( $> 75\%$ ) foram encontradas em menores concentrações de etanol (28,6%) e em qualquer concentração de citrato de sódio, dentro da faixa estudada (17,09 a 19,91%).

De acordo com Rodrigues e lemma (2014), a indicação de uma faixa maximizada das variáveis é mais interessante do que apenas um valor pontual. Contudo, os autores também sugerem a necessidade da validação experimental da resposta prevista pelo modelo, realizando, ao menos em triplicata, ensaios nas condições definidas após a análise da superfície de resposta. Para tal, foram realizados ensaios em triplicata nas condições de 19% de fosfato de potássio e 30% de etanol (ensaio 4) e 19,5% de citrato de sódio e 29% de etanol (ensaio 2) para os SABs compostos por fosfato de potássio e etanol, e citrato de sódio e etanol, respectivamente. Como o percentual de etanol não apresentou efeito significativo ( $p > 0,05$ ) para as respostas avaliadas, optou-se em realizar os ensaios de validação considerando os ensaios que apresentaram maior FP. A Tabela 5.6 apresenta os resultados de FP e RE encontrados nas condições definidas. O Kp foi 2,85 e 2,27, para o SAB fosfato de potássio/etanol e SAB citrato de sódio/etanol, os quais, comprovam a preferência da proteína pela fase topo, em ambos os sistemas.

De forma geral, o SAB composto por citrato de sódio apresentou pureza (FP = 1,32) significativamente ( $p \leq 0,05$ ) maior que o SAB composto por fosfato de potássio, além de possibilitar a recuperação de cerca de 78% das proteínas de *S. platenis*. Além disso, o citrato de sódio é biodegradável e não-tóxico, podendo ser descartado sem nenhum tratamento prévio ao meio ambiente, diferente do fosfato de potássio o qual necessita de tratamento do local o qual será descartado (SILVA et al., 2009). O citrato de sódio, também, apresenta alta seletividade, biocompatibilidade e facilidade para aumento de escala (GOJA et al., 2013) e com potencial de aplicação em alimentos. Em relação ao custo, o citrato de sódio também apresenta vantagens, apresentando valor (Reais – R\$) de aproximadamente 50% menor que o fosfato de potássio.

Tabela 5.6 - Validação dos parâmetros de purificação de proteínas para os SABs compostos por fosfato de potássio e etanol e citrato de sódio e etanol.

Ensaio		SAB fosfato de potássio e etanol		SAB citrato de sódio e etanol	
		FP	RE (%)	FP	RE (%)
1	T	1,25 <sup>a</sup> ± 0,04	76,00 <sup>a</sup> ± 2,42	1,34 <sup>a</sup> ± 0,00	79,02 <sup>a</sup> ± 0,08
	F	0,45 <sup>b</sup> ± 0,01	8,58 <sup>b</sup> ± 0,14	0,58 <sup>b</sup> ± 0,01	17,19 <sup>b</sup> ± 0,33
2	T	1,27 <sup>a</sup> ± 0,02	78,46 <sup>a</sup> ± 1,01	1,32 <sup>a</sup> ± 0,02	77,91 <sup>a</sup> ± 1,20
	F	0,44 <sup>b</sup> ± 0,00	8,12 <sup>b</sup> ± 0,06	0,57 <sup>b</sup> ± 0,01	17,00 <sup>b</sup> ± 0,17
3	T	1,28 <sup>a</sup> ± 0,01	77,87 <sup>a</sup> ± 0,85	1,29 <sup>a</sup> ± 0,01	77,45 <sup>a</sup> ± 0,41
	F	0,44 <sup>b</sup> ± 0,00	8,79 <sup>b</sup> ± 0,06	0,58 <sup>b</sup> ± 0,01	17,21 <sup>b</sup> ± 0,18

\*Médias (n=3) seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ± erro padrão; T: Topo; F: Fundo.

Embora o SAB seja utilizado há anos para concentrar e/ou purificar biomoléculas (LAM et al., 2018), não foram encontrados dados na literatura utilizando a estratégia de purificação com SAB composto de sal (fosfato de potássio e citrato de sódio) e etanol para concentrar/purificar proteínas de *S. platensis*. Entretanto, os dados obtidos neste estudo são coerentes com a literatura, revelando a afinidade das proteínas pela fase topo (etanol) e confirmando que a concentração salina é o principal interferente na partição proteica utilizando SAB, devido seu efeito *salting-out* (BABU et al., 2008).

Neste contexto, destaca-se o estudo de Phong et al. (2017) que avaliaram um SAB composto por 30% de fosfato de potássio tribásico e 20% de metanol e recuperaram cerca de 80% de proteínas da microalga *Chlorella sorokiniana*. Antelo et al. (2015) avaliaram a purificação de ficocianina de *S. platensis* utilizando SAB composto por fosfato de potássio e PEG 6000 e ao utilizar 21 e 4% destes componentes, respectivamente, alcançaram FP de 2,2 e 100% de RE. Por outro lado, Nascimento et al. (2020) estudaram a purificação de ficocianina de *Anabaena variabilis* utilizando SAB composto por 13% de PEG 1500 e 14% de fosfato de potássio e atingiram 1,48 de pureza; os autores, também, citam que para ficocianina o valor mínimo de pureza necessária para aplicação em alimentos é de 0,7. De forma geral, os dados encontrados na literatura são superiores aos obtidos neste estudo, contudo utilizam o sal fosfato de potássio e outros solventes ou PEG, que são constituintes de maior custo, comprometendo o custo do processo.

Após a maximização da recuperação das proteínas de *S. platensis* utilizando SAB, a fase topo da condição maximizada (19,5% de citrato de sódio e 29% de etanol) foi submetida ao PSM. A combinação entre as duas técnicas de recuperação de proteínas possibilitou uma RE final de 86,63% com 1,46 de FP, revelando um aumento nos parâmetros de purificação. Tanuja et al. (2000) e Xing e Li et al. (2009), também, utilizaram a combinação entre SAB e PSM para separar e purificar amiloglucosidase e polissacarídeos de babosa, respectivamente; ambos os trabalhos destacam a eficiência desta estratégia, aumentando a purificação dos compostos de interesse.

### 5.3.3 Caracterização físico-química e tecno-funcional

Após a maximização do SAB (19% de fosfato de potássio e 30% de etanol e 19,5% de citrato de sódio e 29% de etanol), as amostras foram mantidas em 5°C por 24 h, para que fosse possível realizar a precipitação do sal e, após foram realizadas as análises de proteínas totais (bs), concentração de ficocianina, atividade antioxidante e índices de cor (L, a\*, b\*) (Tabela 5.7). Na Tabela 5.7 encontram-se os resultados obtidos após a combinação do SAB composto por citrato de sódio e etanol com PSM.

Tabela 5.7 - Proteína total (%), concentração de ficocianina (g.L<sup>-1</sup>), atividade antioxidante (%) e índices de cor (L\*, a\* e b\*) das amostras obtidas pelos SABs e da combinação do SAB composto por citrato de sódio e etanol com PSM.

Amostras	Proteína total (%), bs)	Ficocianina (mg.L <sup>-1</sup> )	Atividade antioxidante (%)	Índice de cor		
				L*	a*	b*
SAB F/E T	56,94 <sup>c</sup> ± 1,81	123,68 <sup>a</sup> ± 7,59	57,70 <sup>a</sup> ± 1,01	44,73 <sup>bc</sup> ± 1,63	-1,08 <sup>c</sup> ± 0,24	10,76 <sup>a</sup> ± 1,08
SAB F/E F	4,43 <sup>d</sup> ± 0,18	21,95 <sup>c</sup> ± 1,95	33,16 <sup>c</sup> ± 1,14	55,29 <sup>a</sup> ± 0,10	-0,02 <sup>b</sup> ± 0,01	2,58 <sup>cd</sup> ± 0,07
SAB C/E T	61,36 <sup>b</sup> ± 1,26	110,45 <sup>b</sup> ± 3,91	42,33 <sup>b</sup> ± 0,73	46,08 <sup>b</sup> ± 0,34	-1,57 <sup>d</sup> ± 0,31	7,90 <sup>b</sup> ± 0,62
SAB C/E F	5,88 <sup>d</sup> ± 0,25	12,01 <sup>c</sup> ± 1,05	23,19 <sup>d</sup> ± 0,52	52,25 <sup>a</sup> ± 1,87	0,10 <sup>b</sup> ± 0,01	2,97 <sup>cd</sup> ± 0,21
SAB/PSM C	68,99 <sup>a</sup> ± 1,65	101,06 <sup>b</sup> ± 2,10	40,53 <sup>b</sup> ± 0,95	42,86 <sup>c</sup> ± 0,24	-0,88 <sup>c</sup> ± 0,07	3,61 <sup>c</sup> ± 0,01
SAB/PSM P	5,63 <sup>d</sup> ± 0,10	1,77 <sup>d</sup> ± 0,48	10,04 <sup>e</sup> ± 0,57	53,43 <sup>a</sup> ± 1,32	1,33 <sup>a</sup> ± 0,14	1,55 <sup>d</sup> ± 0,03

\*Médias (n=3) seguidas de letras iguais nas colunas não diferem pelo teste de Tukey (p ≤ 0,05) ± desvio padrão; SAB F/E: SAB composto por fosfato de potássio e etanol; SAB C/E: SAB composto por citrato de sódio e etanol; T: Topo; F: Fundo; C: Concentrado; P: Permeado.

O SAB composto por citrato de sódio e etanol possibilitou a obtenção de um extrato proteico com aproximadamente 61% (bs) de proteínas. O baixo percentual proteico (4,43 a 5,88%, bs) nas fases fundo se deve pela maior composição de sal nestas fases, sendo seu principal componente. Como nas fases topo a presença salina é menor e o álcool foi facilmente evaporado, as proteínas de *S. platensis* estão em maior concentração, contudo para aumentar a pureza da proteína podem ser realizados diferentes ensaios para retirada do sal; neste trabalho foi realizado somente a precipitação.

Com a combinação SAB/PSM foi possível aumentar cerca de 8% no percentual de proteína, obtendo um concentrado proteico com 69% de proteínas (bs). Os resultados obtidos são semelhantes aos encontrados por Benelhadj et al. (2016), que obtiveram em concentrado proteico de *S. platensis* com cerca de 70% de proteínas, quando aplicaram extração por dissolução e recuperação das proteínas por precipitação isoelétrica. Mesmo se tratando de uma operação a mais para obtenção das proteínas de *S. platensis*, esta técnica pode ser vantajosa dependendo da pureza da proteína necessária, já que foi possível aumentar o percentual proteico e manter sua capacidade antioxidante.

Maiores concentrações de ficocianina, também, ocorreram nas fases topo, sendo mais relevante para o sistema composto com fosfato de potássio (124 mg.L<sup>-1</sup>). Os dois sais utilizados nos SAB resultaram em diferentes pH, SAB com fosfato de potássio apresentou menor pH (~7,0) que com citrato de sódio (> 9,0), e tal mudança na condição do sistema resultou em uma mudança na partição de ficocianina. Patil e Raghavarao (2007) relataram que a ficocianina é mais estável na faixa de pH entre 5,0 a 8,0 e, por isso os sais de fosfato são mais eficazes para recuperar este pigmento. Outros estudos já vêm relatando a eficiência do fosfato de potássio como componente de SABs juntamente com polietileno glicol (PEG) para recuperação de ficocianina (ANTELO; COSTA; KALIL, 2015; LIU; FENG; LUN, 2012; PATIL; RAGHAVARAO, 2007).

Devido sua composição em aminoácidos, a ficocianina vem sendo relacionada com o potencial antioxidante da *S. platensis* (WU et al., 2016). Desta forma, o maior percentual de inibição ocorreu na fase topo do SAB composto por fosfato de potássio (58%), mesma amostra com maior concentração de ficocianina. As amostras fase topo do SAB composto por citrato de sódio e o concentrado do SAB/PSM não apresentaram

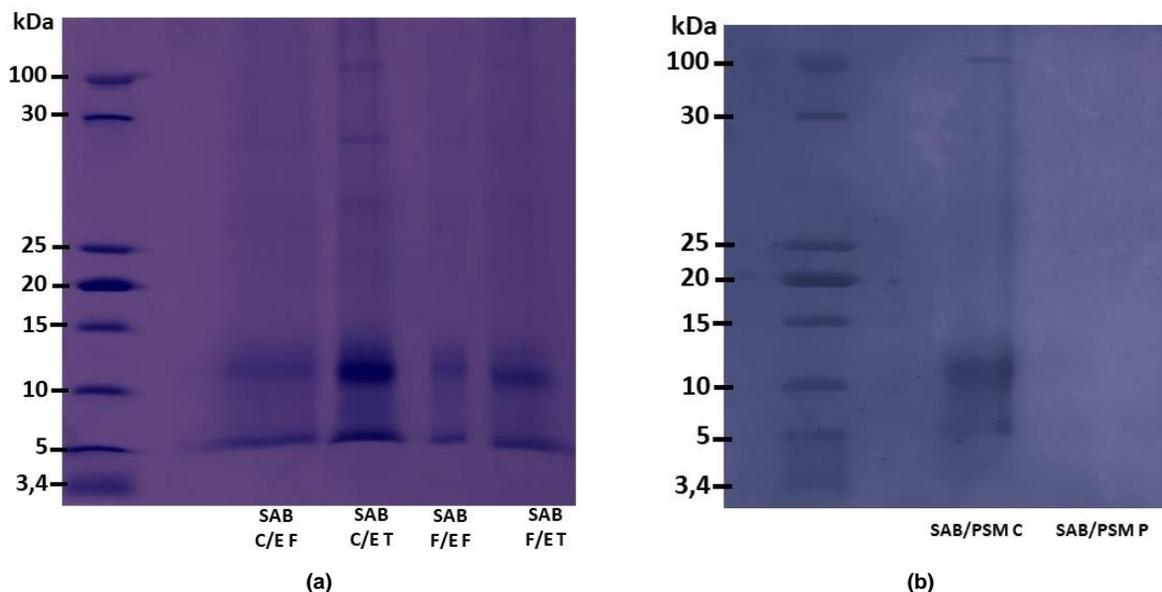
diferença significativa ( $p > 0,05$ ), sendo os seus resultados menores o que possivelmente ocorreu pela ação do citrato de sódio na concentração de ficocianina. Para fase fundo, o SAB composto por fosfato de potássio, também, possibilitou maior atividade antioxidante e concentração de ficocianina ao comparar com a fase fundo resultante ao utilizar citrato de sódio.

Os índices de cor apresentaram maior luminosidade ( $L^*$ ) para as amostras das fases fundo, sendo que as amostras das fases topo apresentaram uma coloração mais escura e maior tendência para coloração verde ( $a^* < 0$ ); características diretamente relacionadas com a concentração de ficocianina. A maior luminosidade e a diferença dos parâmetros  $a^*$  e  $b^*$  para o concentrado do SAB/PSM ocorreu devido a diluição da amostra, o que alterou as características de cor.

A Figura 5.3 apresenta as frações proteicas por gel de eletroforese das fases topo e fundo do SABs nas condições maximizadas e, do concentrado e permeado do SAB/PSM. As bandas mais evidentes estão apresentadas nas faixas de 5 e 10-15 kDa para todas as amostras, exceto para o permeado do SAB/PSM (Figura 5.3b), onde as bandas são imperceptíveis, devido ao seu baixo percentual proteico (Tabela 5.7). Para as amostras topo do SAB composto por citrato de sódio e concentrado do SAB/PSM é possível verificar uma banda de 100 kDa, que é características da proteína clorofila (47 kDa) e da proteína de ligação da membrana nuclear (95 kDa) (RAJAKUMAR; MUTHUKUMAR, 2018; SUDHIR et al., 2005). Além disso, uma banda de baixa intensidade é verificada entre 25-30 kDa na amostra topo do SAB composto por citrato de sódio.

Os resultados obtidos apresentam coerência com os dados encontrados por Benelhadj et al. (2016) que avaliaram o perfil de eletroforese de um concentrado proteico de *S. platensis* e encontraram bandas evidentes entre 10-15 kDa. Chethana, Chetan e Madhusudhan (2015) identificaram bandas entre 14 a 43 kDa, com maior intensidade entre 14, 3 kDa, para a biomassa e a ficocianina de *S. platensis* purificada por SAB composto por PEG e fosfato de potássio; os autores citam que bandas de 18 a 20 kDa são características do pigmento ficocianina e que as demais são oriundas das outras proteínas presentes. Alzahrani, Perera e Hemar (2017) sugerem que bandas entre 14,4 e 30 kDa indicam a presença de ficocianina  $\alpha$  16 e  $\beta$  18, respectivamente.

Figura 5.3 - Gel de eletroforese das amostras obtidas pela maximização dos SABs fosfato de potássio/etanol e citrato de sódio/etanol (a) e do SAB/PSM (b).



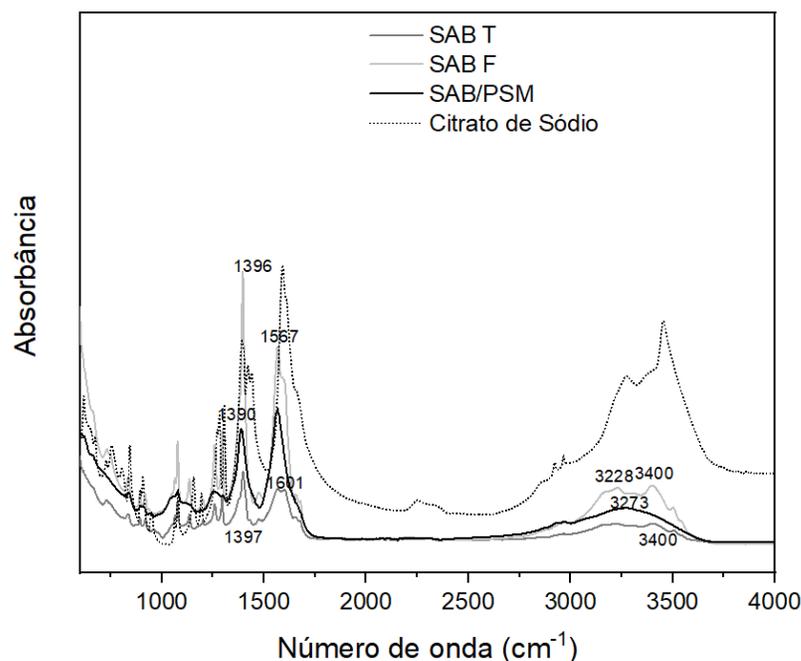
C/E: Citrato de sódio/etanol; F/E: Fosfato de potássio/etanol; F: Fundo; T: Topo; C: Concentrado; P: Permeado.

Espectroscopia de FTIR foi realizada com o intuito de investigar as diferenças na composição de cada fração obtida pelo SAB composto por citrato de sódio e etanol e do concentrado SAB/PSM (Figura 5.4). Ao contrário da análise de gel SDS-PAGE, o FTIR fornece informações gerais da composição das amostras, não somente da fração proteica.

Na Figura 5.4 é possível visualizar a presença e a influência do sal citrato de sódio nas três amostras avaliadas, contudo observa-se que as intensidades dos picos para as amostras topo e SAB/PSM são menores, evidenciando a menor concentração de citrato de sódio nestas amostras. Devido à alta interferência salina na composição das amostras, não foi possível verificar a presença da banda referente a amida I ( $1600$  a  $1700\text{ cm}^{-1}$ ), principal característica de espectros de proteínas (NELSON; COX, 2002). A banda da amida II é visualizada em  $1567$  e  $1601\text{ cm}^{-1}$ , para amostras topo e SAB/PSM, respectivamente; esta banda é tipicamente atribuída devido ao acoplamento dos modos de flexão N-H e do alongamento de C-N (HARIS; SEVERCAN, 1999). As bandas mais largas próximas à  $3300\text{ cm}^{-1}$  são devido a deformação N-H, correspondentes às amidãs

secundárias. Para amostra fundo, as bandas apresentadas nestas regiões se devem somente pela presença do sal, sendo que possuem as mesmas características que o espectro para o citrato de sódio. Além disso, as vibrações deformacionais dos picos próximos à  $1390\text{ cm}^{-1}$  comprovam a ligação do citrato de sódio.

Figura 5.4 - Espectro de FTIR das amostras topo e fundo do SAB composto por citrato de sódio e etanol e concentrado do SAB/PSM.

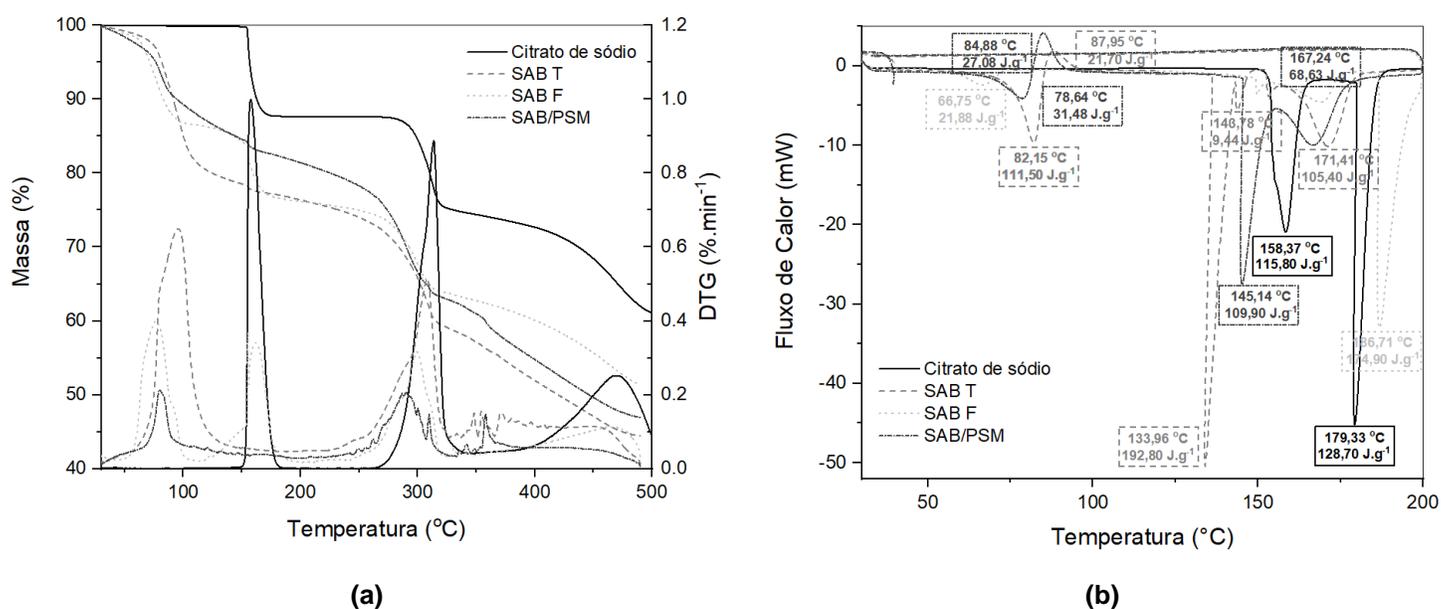


T: Topo; F: Fundo.

Para avaliação das propriedades térmicas das amostras topo e fundo do SAB composto por citrato de sódio e etanol e do concentrado do SAB/PSM foram elaboradas as curvas termogravimétricas e de DSC (Figura 5.5). A Figura 5.5a descreve as curvas de perda de massa das amostras estudadas e do sal citrato de sódio, sendo possível verificar a presença de quatro principais eventos de perda de massa. O primeiro ocorre pela desidratação e evaporação da água ( $30\text{--}120^\circ\text{C}$ ), posteriormente, verifica-se picos nas curvas da amostra fundo e do sal ( $100\text{--}200^\circ\text{C}$ ), os quais correspondem a parcial perda do citrato de sódio, pela eliminação de  $\text{CO}_2$  (MARCILLA et al., 2017). O próximo estágio ( $180\text{--}350^\circ\text{C}$ ) acontece pela degradação de proteínas e carboidratos (RICCI et al.,

2018), o qual representa mais de 30% de perda de massa e, o pico mais evidente ocorre próximo à 300°C para as três amostras; para o citrato de sódio (313°C), o terceiro estágio representa a decomposição dos demais resíduos, resultando na formação de carbonatos (MARCILLA et al., 2017). Na faixa de temperatura de 350 a 500°C ocorre a perda de massa pela degradação dos compostos que são mais resistentes termicamente.

Figura 5.5 - Curvas termogravimétricas (a) e de DSC (b) das amostras topo e fundo do SAB composto por citrato de sódio e etanol e do concentrado do SAB/PSM.



T: Topo; F: Fundo.

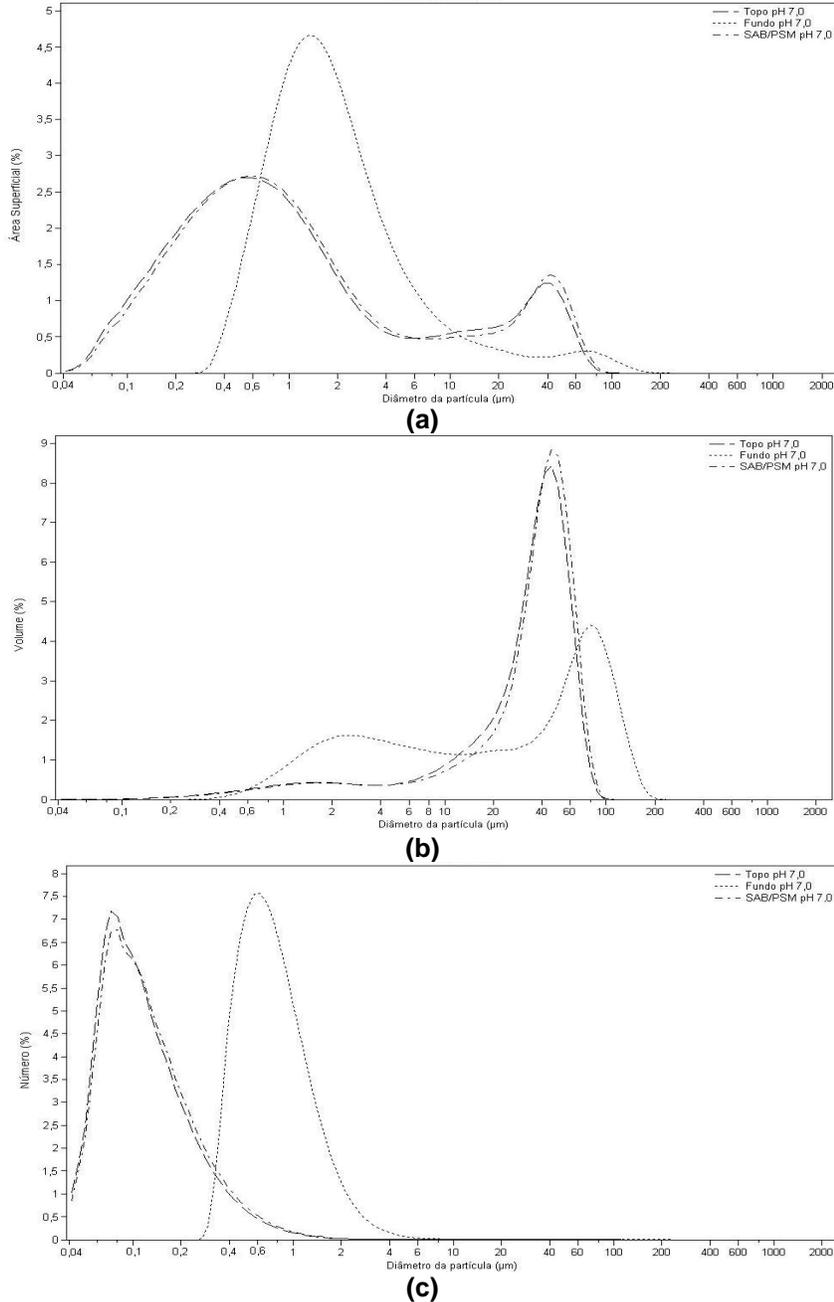
Os termogramas de DSC do citrato de sódio e das amostras obtidas pelo SAB e pelo SAB/PSM estão apresentados na Figura 5.5b. Os picos endotérmicos do termograma representam os pontos de máxima absorção de energia calorífica pelas amostras, ou seja, pontos de fusão; estes picos podem estar associados a desnaturação proteica (COSTA et al., 2015). Além disso, é possível verificar que a concentração de sal afeta a temperatura de transição térmica, com menor quantidade de sal, as amostras topo e concentrado do SAB/PSM apresentaram temperatura de transição térmica mais elevada (~80°C). Nas amostras topo e SAB/PSM é possível constatar um evento exotérmico, o qual pode estar relacionado com a cristalização da amostra (ABDELGHANY; KLAPÖTKE, 2018). Interpretando estes picos exotérmicos, verifica-se que na

temperatura de aproximadamente 90°C, estas amostras liberam energia e se movem ordenadamente em forma de cristais (FARAH et al., 2018). Os picos das amostras topo e SAB/PSM, encontrados em temperaturas mais elevadas, podem estar relacionados com a presença de proteínas pré-purificadas, isoladas da presença de estruturas terciárias e/ou quaternárias. Por outro lado, o comportamento da amostra fundo é semelhante ao sal.

O índice de solubilidade das proteínas de *S. platensis* apresentam um comportamento em forma de U, onde a mínima solubilidade é encontrada no seu ponto isoelétrico (pI) – pH 3,0 e, em pHs menores e/ou maiores ocorre o aumento gradativo da sua solubilidade, a qual é máxima em pH 10,0 (MENEGOTTO et al., 2019; BENELHADJ et al., 2016). No presente estudo avaliou-se duas faixas de pH, 4,0 e 7,0. Os resultados de solubilidade em pH 4,0 foram 41,06, 30,08 e 60,69 g proteínas solúveis. 100 g<sup>-1</sup> proteínas totais para as frações topo, fundo e concentrado SAB/PSM, respectivamente. Em pH 7,0 a solubilidade foi 52, 29,22 e 67,24 g proteínas solúveis. 100 g<sup>-1</sup> proteínas totais para as frações topo, fundo e SAB/PSM, respectivamente. Em pH 7,0 a amostra fundo, que além de apresentar menor solubilidade, não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os dois níveis de pH estudados. A baixa solubilidade da amostra fundo, possivelmente, se deve pela interferência do citrato de sódio; quando a amostra é solubilizada, este sal possui maior facilidade ao se ligar com as moléculas de água, fazendo com que as proteínas presentes na amostra se ligam entre elas e precipitando-as (DAMODARAN, 2017). Contudo, a baixa solubilidade proteica pode limitar as demais propriedades tecno-funcionais (LÓPEZ et al., 2019).

O tamanho de partícula foi avaliado em emulsões recém preparadas, com as amostras topo, fundo e concentrado do SAB/PSM, em pH 7,0. As distribuições de tamanho de partícula apresentaram dimensão entre ~0,04 e 200 µm (Figura 5.6) e comportamento bimodal, com duas populações de diâmetro de gotas distintas: gotas com diâmetros menores e maiores a 10 µm ( $10 \mu\text{m} < d$ ;  $d > 10 \mu\text{m}$ ). Conforme Abirached et al. (2011) o tamanho das gotas produzidas durante a formação da emulsão depende, primeiramente, da geração das gotas pequenas e, da rápida estabilização das gotas formadas, as quais impede que ocorre a coalescência. Portanto, quanto menor o tamanho das gotas, maior é a estabilidade da emulsão.

Figura 5.6 - Distribuição de tamanho de partícula em termos de área superficial (a), volume (b) e número (c) para as amostras topo, fundo e concentrado do SAB/PSM em pH 7,0.



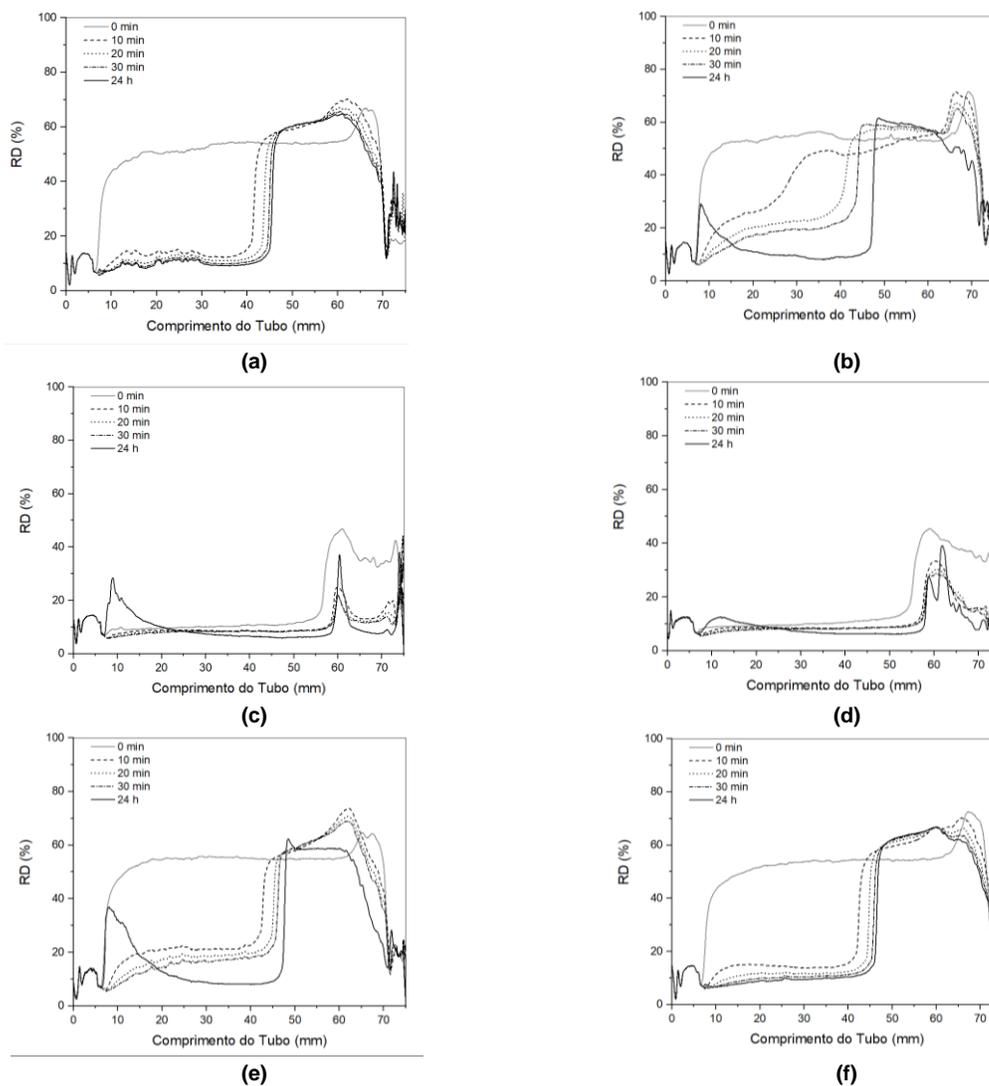
A Figura 5.6a apresenta a distribuição do tamanho de partícula em termos de área das emulsões avaliadas, sendo possível verificar um comportamento distinto para a emulsão elaborada com a amostra fundo, a qual apresentou distribuição para gotas

maiores, reduzindo o volume de partículas de óleo (Figura 5.6b). Por outro lado, as emulsões com as amostras topo e concentrado do SAB/PSM apresentaram melhor separação entre as populações das partículas. Quando a distribuição das partículas é expressa em termos de número (Figura 5.6c), é possível verificar um significativo decréscimo no tamanho de partícula para as emulsões preparadas com topo e SAB/PSM.

Os diâmetros  $D_{4,3}$  e  $D_{3,2}$  obtidos foram 33,69 e 6,02  $\mu\text{m}$ , 41,81 e 5,07  $\mu\text{m}$  e, 36,42 e 6,42  $\mu\text{m}$ , para as amostras topo, fundo e concentrado SAB/PSM, respectivamente. Os resultados de  $D_{4,3}$  significativamente maiores que  $D_{3,2}$  comprovam que as emulsões são polidispersas (ABIRACHED et al., 2018). O maior valor de  $D_{4,3}$  para a amostra fundo, confirma a presença de gotas maiores e a menor estabilidade desta emulsão.

Em relação ao estudo da estabilidade global da emulsão, os perfis de RD (Figura 5.7) foram avaliados com o objetivo de verificar a cinética de floculação das gotas de óleo do fundo do tubo (10 mm) e a floculação e/ou coalescência das gotas após 24 h. Nas amostras topo e concentrado do SAB/PSM verifica-se que na parte inferior do tubo de medida existe uma redução nos valores de RD com o tempo, evidenciando o desenvolvimento da fase creme. Por outro lado, grandes gotas de óleo são formadas na parte superior do tubo. Este comportamento também foi verificado por outros autores (ABIRACHED et al., 2018; MEDRANO et al., 2012). No entanto, para as emulsões formadas com a amostra fundo, os valores de RD no tempo inicial já são baixos, o que indica que a emulsão não foi adequadamente formada; provavelmente a alta concentração de sal provocou o *salting-out* das proteínas, não permitindo que as mesmas migrassem para interface e formassem a emulsão. As emulsões avaliadas apresentaram cinética de desestabilização de segunda ordem (curva hiperbólica) (PANIZZOLO et al., 2014). Conforme a lei de Stokes (Equação 5.7) foram calculadas as constantes de desestabilização de emulsão,  $k_s$  e  $k_h$ , as quais quanto menores os valores, correspondem a emulsões mais estáveis;  $k_s$  está relacionada com as gotas de tamanho maior que sofrem flotação mais rapidamente e  $k_h$  corresponde às gotas menores, que crescem lentamente (LÓPEZ et al., 2019).

Figura 5.7 - Estudo da retrodispersão em função do comprimento do tubo de medida para avaliação da estabilidade de emulsão elaboradas com as amostras topo pH 4,0 (a) e 7,0 (b), fundo pH 4,0 (c) e 7,0 (d), concentrado SAB/PSM pH 4,0 (e) e 7,0 (f), e as constantes de desestabilização –  $k_s$  e  $k_h$  (g).



**Constantes de desestabilização ( $k_h$  e  $k_s$ ) e  $R^2$  para o modelo de segunda ordem.**

Amostras	$k_h \times 10^{-6} (s^{-1})$	$k_s \times 10^{-3} (s^{-1})$	Ajuste do modelo ( $R^2$ )
Topo pH 4,0	$847,75^b \pm 75,98$	$30,79^a \pm 1,07$	$0,9944 \pm 0,0008$
Topo pH 7,0	$0,04^c \pm 0,01$	$3,54^b \pm 0,37$	$0,9961 \pm 0,0058$
Fundo pH 4,0	SA**	SA**	$0,3403 \pm 0,0069$
Fundo pH 7,0	SA**	SA**	$0,3788 \pm 0,0625$
SAB/PSM pH 4,0	$1680,69^a \pm 56,92$	$33,85^a \pm 1,53$	$0,9974 \pm 0,0023$
SAB/PSM pH 7,0	$1842,01^a \pm 10,54$	$31,44^a \pm 1,26$	$0,9986 \pm 0,0007$

\*Médias (n=3) seguidas de letras iguais nas colunas não diferem pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ )  $\pm$  desvio padrão.

\*\*SA: Sem ajuste ao modelo, constante não calculada.

(g)

A emulsão formada com a amostra topo em pH 7,0 apresentou os menores resultados, tanto de  $k_s$  como  $k_h$ , indicando ser a emulsão mais estável. Em pH 4,0 a emulsão com a mesma amostra foi menos estável; este pH é próximo ao ponto isoelétrico das proteínas de *S. platensis* (pH 3,0) o que faz com que a interação eletrostática entre as partículas não seja alta o suficiente para prevenir a coalescência e/ou floculação (MENEGOTTO et al., 2019; DAMODARAN, 2017).

Os resultados para as emulsões formadas com o concentrado SAB/PSM não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os pH avaliados, e seus resultados, em ambos pH foram menos estáveis que para as emulsões formadas com a amostra topo. Isto indica que pode ter ocorrido perda de proteínas com potencial emulsificante durante o PSM e/ou que a redução do sal presente na amostra tenha diminuído a capacidade emulsificante das proteínas. Scarbieri (1999) apontou diversos estudos científicos que já haviam relatado sobre a influência de sais na capacidade emulsificante de proteínas hidrossolúveis, destacando que o aumento da concentração salina pode garantir a melhor solubilidade proteica, aumentando a qualidade da emulsão. No entanto, para a amostra fundo, a concentração salina foi tão elevada que promoveu o agrupamento das proteínas, não havendo solubilidade suficiente que garantisse a formação da emulsão, além disso o RD experimental para estas amostras não se ajustou com o modelo estimado ( $R^2 < 0,4$ ), não sendo possível calcular os parâmetros de desestabilização.

Além disso, após 24 h, as emulsões elaboradas com a amostra topo e SAB/PSM apresentaram estabilidade à coalescência e/ou floculação, o RD se manteve semelhante ao perfil de 30 min, principalmente na fase creme (superior do tubo), o que indica que não ocorreu aumento do tamanho das partículas (LÓPEZ et al., 2019). Como consequência da falta de estabilidade das emulsões elaboradas com a amostra fundo, após 24 h é possível verificar a mesma tendência, o perfil de RD apresenta baixos resultados, indicando desestabilização da emulsão.

## 5.4 Conclusão

O SAB composto por citrato de sódio apresentou melhor desempenho; utilizando-se 19,5% de citrato de sódio e 29% de etanol foi possível obter 1,3 de fator de purificação e 78% de recuperação. Além disso, o citrato de sódio é de menor custo, biodegradável e não tóxico, não comprometendo sua aplicação em alimentos.

A associação do SAB com o PSM, permitiu o aumento da recuperação (~ 87%) e da pureza (~1,5). As frações topo e fundo, e o concentrado do SAB/PSM apresentaram aproximadamente 61, 5,9 e 69% de proteínas (bs), 110, 12 e 101 mg.L<sup>-1</sup> de ficocianina e 42, 23 e 40% de atividade antioxidante, respectivamente. A fração topo e o concentrado do sistema associado apresentaram coloração verde azulada e o fundo amarelo intenso. Em todas as amostras, as bandas proteicas evidentes ocorreram em 5 e 10-15 kDa.

De acordo, com as propriedades térmicas, verificou-se que para as três amostras (SAB T, SAB F e SAB/PSM) a temperatura de perda de massa referente degradação proteica foi em cerca de 300°C e pelo termograma de DSC foi possível visualizar picos endotérmicos (~80°C) referente a transição térmica e exotérmicos (90°C), onde ocorreu a liberação de calor. A amostra topo foi a que apresentou melhor propriedade emulsificante apresentando distribuição de partículas de 33,69 µm (D<sub>4,3</sub>) e 6,02 µm (D<sub>3,2</sub>) e maior estabilidade ( $k_h = 0,04 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  e  $k_s = 3,54 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ).

Todas as técnicas de separação proteica avaliadas neste estudo (precipitação, SAB e PSM) apresentam vantagens por se tratarem de técnicas eficazes, simples, rápidas e com potencial para aumento de escala. A escolha do método deve se basear nas características desejadas no produto final.

## 5.5 Referências Bibliográficas

ABD-ELGHANY, M; KLAPÖTKE, T. M. A review on differential scanning calorimetry technique and its importance in the field of energetic materials. **Physical Sciences Review**, 20170103, 2018.

ABEL, J.; KOSKY, A.; BALL, N.; BACON, H.; KAUSHILK, R.; KLEEMANN, G. R. A small-scale process for predictiong donnan and volume exclusion effects during ultrafiltration/diafiltration process development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 107, p. 1296–1303, 2018.

ABIRACHED, C.; MEDRANO, A.; PANIZZOLO, L. A.; MOYNA, P.; AÑÓN, M. C. Desestabilización de emulsiones aceite-agua preparadas con proteínas de soja. **Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay**, n. 6, p. 7–10, 2011.

ABIRACHED, C.; MEDRANO, A.; AÑÓN, M. C.; PANIZZOLO, L. A. Effect of acid modification of soy glycinin on its interfacial and emulsifying properties. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 95, p. 313–323, 2018.

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

ALZHRANI, M. A. J.; PERERA, C. O.; HEMAR, Y. Production of bioactive proteins and peptides from the diatom *Nitzschia laevis* and comparison of their *in vitro* antioxidant activities with those from *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris*. **International Journal of Food Science + Technology**, v. 53, p. 676–682, 2017.

AMID, M.; ABDUL MANAP, M. Y.; MUSTAFA, S. Purification of pectinase from mango (*Mangifera indica* L. cv. Chokanan) waste using an aqueous organic phase system: A potential low cost source of the enzyme. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 931, p. 17–22, 2013.

ANTELO, F. S.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Purification of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* in aqueous two-phase systems using an experimental design. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, p. 1–11, 2015.

AOAC. **Official methods of analysis of AOAC international**. 20. ed. Maryland: AOAC International, 2016.

BABU, B. R.; RASTOGI, N. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 83–89, 2008.

BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, 278, 381–386, 2011.

BENELHADJ, S.; GHARSALLAOUI, A.; DEGRAEVE, P.; ATTIA, H.; GHORBEL, D. Effects of pH on the functional properties of *Arthrospira (Spirulina) platensis* protein isolate. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1056-1063, 2016.

BENNET, A.; BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **The Journal of Cell Biology**, v. 58, p. 419–485, 1973.

BONATTO, C.; VENTURIN, B.; MAYER, D. A.; BAZOTI, S. F.; MULINARI, J.; CAMARGO, A. F.; SCAPINI, T.; MÜLLER, C.; FONGARO, G.; TREICHEL, H. Introduction on bioethanol. In: TREICHEL, H.; ALVES JR, S. L.; FONGARO, G.; MÜLLER, C. (eds.), **Ethanol as a Green Alternative Fuel: Insight and Perspectives**. New York: Nova Science Publishers, 2019.

CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; LOHA, V.; TIA, S.; BUNNAG, B. Separation and purification of phycoerythrin from *Spirulina* sp. using a membrane process. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7159–7164, 2011.

CHETHANA, S.; NAYAK, C. A.; MADHUSUDHAN, M. C.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Single step aqueous two-phase extraction for downstream processing of C-phycoyanin from *Spirulina platensis*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 2415–2421, 2015.

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

COSTA, B. R.; RODRIGUES, M. C. K.; ROCHA, S. F.; POHNDORF, R. S.; LARROSA, A. P. Q.; PINTO, L. A. A. Optimization of *Spirulina* sp. drying in heat pump: Effects on the physicochemical properties and color parameters. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 40, p. 934–942, 2015.

DAMODARAN, S. Amino acids, peptides, and proteins. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. (eds.), **Fennema's Food Chemistry**. 5 ed. Boca Raton: CRC Press, 2017.

EL-TANTAWY, W. H. Antioxidant effects of *Spirulina* supplement against lead acetate-induced hepatic injury in rats. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, p. 0–4, 2015.

FARAH, J. S.; SILVA, M. C.; CRUZ, A. G.; CALADO, V. Differential calorimetry scanning: Current background and application in authenticity of dairy products. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 88–94, 2018.

GOJA, A. M.; YANG, H.; CUI, M.; LI, C. Aqueous two-phase extraction advances for bioseparation. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 4, p. 1–8, 2013.

HARIS, P. I.; SEVERCAN, F. FTIR spectroscopic characterization of protein structure in aqueous and non-aqueous media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 7, p. 201–221, 1999.

JAMBRAK, A. R.; MASON, T. J.; LELAS, V.; HERCEG, Z.; HERCEG, I. L. Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. **Journal of Food Engineering**, v. 86, p. 281–287, 2008.

KONÍCKOVÁ, R.; VANKOVÁ, K.; VANÍKOVÁ, J.; VÁNCOVÁ, K.; MUCHOVÁ, L.; SUBHANOVÁ, I.; ZADINOVÁ, M.; ZELENKA, J.; DVORÁK, A.; KOLÁR, M.; STRNAD, H.; RIMPELOVÁ, S.; RUMML, T.; WONG, R. J.; VÍTEK, L. Natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds. **Annals of Hepatology**, v. 13, p. 273–283, 2014.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LAM, G. P.; VERMUË, M. H.; EPPINK, M. H. M.; WIJFFELS, R. H.; BERG, C. Multi-product microalgae biorefineries from concept towards reality. **Trends in Biotechnology**, v. 36, p. 216–227, 2018.

LEONG, H. Y.; OOI, C. W.; LAW, C. L.; JULKIFLE, A. L.; SHOW, P. L. Betacyanins extraction from *Hylocereus polyrhizus* using alcohol/salt-based liquid biphasic partitioning

system and antioxidant activity evaluation. **Separation Science and Technology**, DOI: 10.1080/01496395.2018.1517795, 2018.

LI, Z.; TENG, H.; XIU, Z. Extraction of 1,3-propanediol from glycerol-based fermentation broths with metanol/phosphate aqueous two-phase system. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 586–591, 2011.

LIDE, D. R. **CRC Handbook of chemistry and physics**. 8 ed. Boca Raton: CRC Press, 1999.

LIU, Y.; FENG, Y.; LUN, J. Aqueous two-phase countercurrent distribution for the separation of c-phycoyanin and allophycocyanin from *Spirulina platensis*. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 111–117, 2012.

LÓPEZ, D. N.; BOERIS, V.; SPELZINI, D.; BONIFACINO, C.; PANIZZOLO, L. A.; ABIRACHED, C. Adsorption of chia proteins at interfaces: Kinetics of foam and emulsion formation and destabilization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 180, p. 503–507, 2019.

LUPATINI, A. L.; BISPO, L. O.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V.; CANAN, C.; COLLA, E. Protein and carbohydrate extraction from *S. platensis* biomass by ultrasound and mechanical agitation. **Food Research International**, v. 99, p.1028–1035, 2017.

MARCILLA, A.; GÓMEZ-SIURANA, A.; BELTRÁN, M.; MARTÍNEZ-CASTELLANOS, I.; BLASCO, I.; BERENQUER, D. TGA/FTIR study of the behavior of sodium and potassium citrates in the decomposition of 3R4F tobacco. N<sub>2</sub> and air atmosphere. **Thermochimica Acta**, v. 657, p. 31–38, 2017.

MATASSA, S.; BOON, N.; PIKAAR, I.; VERSTRAETE, W. Microbial protein: future sustainable food supply route with low environmental footprint. **Microbial Biotechnology**, v. 9, p. 568–575, 2016.

MEDRANO, A.; ABIRACHED, C.; MOYNA, P.; PANIZZOLO, L.; AÑÓN, M. C. The effect of glycation on oil-water emulsion properties of  $\beta$ -lactoglobulin. **LWT – Food Science and Technology**, v. 45, p. 253–260, 2012.

MENEGOTTO, A. L. L.; SOUZA, L. E. S.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V.; SEHN, E.; BITTENCOURT, R. S.; FLORES, E. L. M.; CANAN, C.; COLLA, E. Investigation of techno-functional and physicochemical properties of *Spirulina platensis* protein concentrate for food enrichment. **LWT – Food Science and Technology**, v. 114, p.108267, 2019.

NAGARAJ, N.; PATIL, B. S.; BIRADAR, P. M. Osmotic membrane distillation – a brief review. **International Journal of Food Engineering**, v. 2, p. 1–22, 2006.

NASCIMENTO, S. S.; SANTSO, V. S. V.; WATANABE, E. O.; FERREIRA, J. S. Assessment of the purification of phycobiliproteins in cyanobacteria through aqueous two-phase systems with different proportions of PEG/salt. **Food and Bioproducts Processing**, v. 119, p. 345–349, 2020.

NELSON, D.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 3 ed. New York: Worth Publishers, 2002.

NG, H. S.; CHAI, C. X. Y.; CHOW, Y. H.; LOH, W. L. C.; YIM, H. S.; TAN, J. S.; LAN, J.

- C.-W. Direct recovery of *Bacillus subtilis* xylanase from fermentation broth with an alcohol/salt aqueous biphasic system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, p. 585–589, 2018.
- OOI, C. W.; TEY, B. T.; HII, S. L.; MAZLINA, S.; KAMAL, S. M. M.; LAN, J. C. W.; ARIFF, A.; LING, T. C. Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1083–1087, 2009.
- PANIZZOLO, L. A.; MUSSIO, L. E.; ANON, M. C. Kinetics for describing the creaming of protein-stabilized O/W emulsions by multiple light scattering. **Journal of Food Science and Engineering**, v. 4, p. 236–243, 2014.
- PATIL, G.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycoyanin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 156–164, 2007.
- PEREIRA, A. M.; LISBOA, C. R.; COSTA, J. A. V. High protein ingredients of microalgal origin: Obtainment and functional properties. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 47, p. 187–194, 2018.
- PHONG, W. N.; SHOW, P. L.; TEH, W. H.; TEH, T. X.; LIM, H. M. Y.; NAZRI, N. S. B.; TAN, C. H.; CHANG, J.-S.; LING, T. C. Proteins recovery from wet microalgae using liquid biphasic flotation (LBF). **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1329–1336, 2017.
- PONTIS, H. G. **Methods for analysis of carbohydrate metabolism in photosynthetic organisms. Plants, green algae, and cyanobacteria**. London: Elsevier Inc..
- RAJAKUMAR, M. S.; MUTHUKUMAR, K. Influence of pre-soaking conditions on ultrasonic extraction of *Spirulina platensis* proteins and its recovery using aqueous biphasic system. **Separation Science and Technology**, v. 53, p. 2034–2043, 2018.
- RE, R., PELEGRINE, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., & RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.
- RICCI, L.; UMILTÀ, E.; RIGHETTI, M. C.; MESSINA, T.; ZURLINI, C.; MONTANARI, A.; BRONCO, S.; BERTOLDO, M. On the thermal behavior of protein isolated from different legumes investigated by DSC and TGA. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, p. 5368–5377, 2018.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2014.
- ROY, S. S.; PAL, R. Microalgae in aquaculture: A review with special references to nutritional value and fish dietetics. **Proceedings of the Zoological Society**, v. 68, p. 1–8, 2015.
- SCOPES, P. K. **Protein purification**. 3 ed. Nova York: Springer-Verlag, 1994.
- SGARBIERI, V. C. Propriedades funcionais de proteínas em alimentos. **Bol. SBCTA**, v.32, p. 105-126, 1998.

SILVA, C. A. S.; COIMBRA, J. S. R.; ROJAS, E. E. C.; TEIXEIRA, J. A. C. Partitioning of glycomacropptide in aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1213–1216, 2009.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76–85, 1985.

SOUZA, R. L.; LIMA, R. A.; COUTINHO, J. A. P.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Novel aqueous two-phase systems based on tetrahydrofuran and potassium phosphate buffer for purification of lipase. **Process biochemistry**, v. 50, p. 1459–1467, 2015.

SU, C. H.; LIU, C. S.; YANG, P. C.; SYU, K. S.; CHIUH, C. C. Solid-liquid extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis*: Kinetic modeling of influential factors. **Separation and Purification Technology**, v. 123, p. 64–68, 2014.

SUDHIR, P.-R.; POGORYELOV, D.; KOVÁCS, L.; GARAB, G.; MURTHY, S. D. S. The effects of salts stress on photosynthetic electron transport and thylakoid membrane proteins in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 481–485, 2005.

TAN, Z.-J.; LI, F.-F.; XU, X.-L. Extraction and purification of anthraquinones derivatives from *Aloe vera* L. using alcohol/salt aqueous two-phase system. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, p. 1105–1113, 2013.

TANUJA, S.; SRINIVAS, N. D.; GOWTHAMAN, M. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two-phase extraction coupled with ultrafiltration for purification of amyloglucosidase. **Bioprocess Engineering**, v. 23, p. 63–68, 2000.

TIANWEI, T.; QING, H.; QIANG, L. Purification of glycyrrhizin from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch with ethanol/phosphate aqueous two phase system. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 1417–1420, 2002.

TRENTINI, M. M. S. **Purificação de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* ATCC 9642 em sistemas aquosos bifásicos e precipitação por solventes orgânicos**. 2014. 122 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2014.

TRENTINI, M. M. S.; ROSSETTO, A. P.; FERNANDES, I. A.; ORO, C. E. D.; CANSIAN, R. L.; DI LUCCIO, M.; VALDUGA, E. Influence of diferente solvents in the recovery and pre-purification of pectinases from *Aspergillus niger*. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 14, p. 69–76, 2018.

WANG, Y., MAO, Y.; HAN, J.; LIU, Y.; YAN, H. Liquid-liquid equilibrium of potassium phosphate/potassium citrate/sodium citrate + ethanol aqueous two-phase systems at (298,15 and 313,15) K and correlation. **Journal Chemical Engineering**, v. 55 p. 5621–5626, 2010.

WU, Y.; WANG, Y.; ZHANG, W.; HAN, J.; LIU, Y.; HU, Y.; NI, L. Extraction and preliminary purification of anthocyanins from grape juice in aqueous two-phase system. **Separation and Purification Technology**, v. 124, p. 170–178, 2014.

XING, J.-m.; LI, F.-f. Separation and purification of aloe polysaccharides by a combination of membrane ultrafiltration and aqueous two-phase extraction. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 158, p. 11–19, 2009.

XIN-YING, Z.; FENG, Q.; MIN, D.; FAN, C.; AI-QIN, L.; JING-HUA, Z. Separation of proteins by aqueous two-phase extraction system combined with liquid chromatography. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 40, p. 38–42, 2012.

## **6 Concentração de proteínas de *Spirulina platensis* utilizando sistema aquoso bifásico composto por polietilenoglicol e fosfato de potássio/citrato de sódio**

### ***Spirulina platensis* purification using Aqueous two-phase system composed of polyethylene glycol and potassium phosphate/sodium citrate**

#### **Resumo**

Os sistemas aquosos bifásicos (SABs) vêm se destacando como técnica alternativa para recuperar e concentrar proteínas. Contudo, seu estudo para recuperar proteínas da *Spirulina platensis* ainda é pouco relatado. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi aplicar estratégias de planejamento de experimentos para avaliar distintos SABs composto por polietilenoglicol (PEG) e solução salina visando maior recuperação das proteínas de *S. platensis*. Os SABs compostos por PEG de diferentes massas molares (1500, 4000, 6000 e 8000 Da) revelaram comportamentos diversos, obtendo fatores de purificação de 0,83 a 1,52 e 0,92 a 1,38 para as fases topo dos SABs compostos por fosfato de potássio e citrato de sódio, respectivamente. As condições maximizadas de recuperação de proteínas de *S. platensis* ocorreram ao aplicar 14% de fosfato de potássio e 15% de PEG 1500 Da e 16% de citrato de sódio e 18% de PEG 1500 Da, ambos em pH 9,0. O SAB composto por PEG e citrato de sódio foi o que apresentou melhor potencial, atingindo 1,02 de fator de purificação e 75% de recuperação. A eletroforese evidenciou bandas entre 5-15 kDa, tamanho característico de ficobiliproteínas. O SAB composto por PEG e citrato de sódio torna-se uma alternativa simples e de baixo custo para recuperar proteínas de *S. platensis*, possuindo potencial para aplicação industrial.

**Palavras-chave:** eletroforese; estratégia sequencial de planejamento de experimentos; proteínas de microalgas; separação de proteínas.

## 6.1 Introdução

O uso do SAB tem se mostrado uma eficiente alternativa, sua técnica envolve o isolamento do composto de interesse a partir da concentração do mesmo em uma de suas fases (LEONG et al., 2015). Além disso, esta técnica envolve simplicidade operacional, rápida separação, baixa desnaturação e potencial de aumento de escala (RAJA et al., 2011). Estes sistemas ocorrem principalmente pela mistura de dois polímeros, de um polímero e um sal e/ou de um solvente orgânico e um sal (AMID; ABDUL MANAP; MUSTAFA, 2013; PHONG et al., 2017).

A eficiência da partição de biomoléculas aplicando esta técnica se deve, principalmente, pela possibilidade em alcançar as melhores condições, sendo possível manipular seus parâmetros, tais como: concentração dos seus componentes, pH, temperatura, entre outros (RAJA et al., 2011; FU et al., 2015). A obtenção do composto de interesse ocorre de forma complexa, envolvendo interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre a molécula alvo e os componentes das fases (MARCOS et al., 2002).

Na literatura são descritas várias técnicas de fracionamento de proteína para obtenção e purificação deste componente (PONTIS, 2016; CHAIKLAHAN et al., 2011; AMID; ABDUL MANAP; MUSTAFA, 2013). Afim de substituir os procedimentos tradicionais de separação de proteínas, os quais, geralmente consomem um longo período de tempo, são complexos e de alto custo (WU et al., 2014). Os sistemas aquosos bifásicos (SABs) vêm se sobressaindo, principalmente pela sua facilidade e baixo custo (LEONG et al., 2015).

Neste contexto, a concentração das proteínas de *S. platensis* pode facilitar seu consumo, favorecendo sua aplicação na indústria de alimentos (LUPATINI et al., 2017b). As proteínas obtidas a partir desta microalga podem apresentar conteúdo balanceado de aminoácidos (BASHIR et al., 2016) e promissoras características funcionais, tais como, propriedades emulsificantes e espumantes e capacidade de absorção de água e óleo (BENELHADJ et al., 2016). A fração proteica da *S. platensis*, também, pode conter cerca de 20% de ficocianina, uma ficobiliproteína com coloração esverdeada, que além disso podem apresentar algumas propriedades terapêuticas, tais como antioxidante, anti-

inflamatória e anticâncer (CHAIKLAHAN; CHIRASUWAN; BUNNAG, 2012; SOUZA et al., 2006).

Desta forma, este estudo teve como objetivo investigar a viabilidade da utilização de SAB composto por polietilenoglicol (PEG) e solução salina (fosfato de potássio e citrato de sódio) visando a recuperação e/ou pré-purificação das proteínas de *S. platensis*.

## 6.2 Material e Métodos

### 6.2.1 Material

A biomassa inativa da microalga *S. platensis* desidratada foi obtida comercialmente pela Fazenda Tamandúa, localizada em Santa Terezinha, Paraíba, Brasil. Todos os reagentes utilizados possuíam pureza analítica, sendo de procedências comerciais distintas.

### 6.2.2 Extração de proteínas da biomassa de *S. platensis*

A extração proteica foi realizada conforme Lupatini et al. (2017a) com adaptações. A biomassa foi dissolvida em água purificada ( $30 \text{ g.L}^{-1}$ ) e o pH foi ajustado para 9,0, com solução de NaOH 2,0 M. A suspensão foi submetida ao tratamento ultrassônico em banho de ultrassom (Unique, USC-1800A, Indaiatuba, Brasil) na frequência de 40 kHz, amplitude de 90% por 35 min e, em seguida, submetida à agitação mecânica (Fisatom, 712, São Paulo, Brasil) na velocidade de 100 rpm por 50 min. A temperatura foi mantida em 30°C durante todo o processo. Para separação das fases a suspensão foi centrifugada à 7000 rpm, 25°C por 15 min (Biosystems, MPW-351R, Curitiba, Brasil) e do sobrenadante foi obtido o extrato proteico de *S. platensis* (EPSp).

### 6.2.3 Recuperação de proteínas de *S. platensis* aplicando SAB PEG/Sal

Com o intuito de maximizar o processo de concentração das proteínas de *S. platensis* por SAB composto por PEG e sal, foram estudadas diferentes massas molares de PEG (1500, 4000, 6000 e 8000 Da) (Sigma-Aldrich, EUA) e soluções salinas de fosfato de potássio (monobásico e bibásio) (Synth, São Paulo, Brasil) e citrato de sódio (Sigma-Aldrich, EUA) com pH 9,0. A faixa de pH foi escolhida considerando a solubilidade das proteínas de *S. platensis* e o estudo desenvolvido por Lupatini et al. (2017a), além da necessidade de padronização do pH devido sua interferência na formação das fases em equilíbrio do SAB.

Inicialmente, foram realizados planejamentos fatoriais (PF) 2<sup>2</sup> (cada um com 3 pontos centrais, total de 7 ensaios) para a avaliação os efeitos da concentração de sal (% m/m) e PEG (% m/m) sobre a concentração de proteínas, sendo que para cada massa molar de PEG (1500, 4000, 6000 e 8000 Da) foi desenvolvido um PF. Os níveis das variáveis estudadas nos PFs (Tabela 6.1) foram definidos conforme os diagramas de fases, os quais, para os SABs compostos por PEG de massas molares 1500, 4000, 6000 e 8000 Da com citrato de sódio e por PEG 8000 com fosfato de potássio foram construídos segundo metodologia descrita por Minami (1997); enquanto que para os SABs formados por PEG 1500, 4000 e 6000 com fosfato de potássio foram assumidas as curvas obtidas pelo mesmo autor (Figuras 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 8.10, 8.11 e 8.12, Apêndice). As concentrações das soluções estoques, PEG e sal foram de 50 e 40% (m/m), respectivamente.

Os ensaios foram conduzidos em tubos graduados tipo falcon de 50 mL onde foram adicionadas as soluções estoques de PEG e de sal, conforme os níveis propostos (Tabela 6.1), para completar o peso total (20 g) foi adicionado água destilada. Após a separação das duas fases, o extrato proteico de *S. platensis* foi adicionado, correspondendo a 20% (4,0 g) da massa final do sistema. Na sequência os tubos foram homogeneizados por agitação em vortex (Quimis, Q220B1, Diadema, Brasil) e mantidos em repouso em temperatura ambiente por 15 min. O sistema foi centrifugado por 20 min a 4000 rpm a 25°C (Biosystems, MPW-351R, Curitiba, Brasil). O fluxograma do processo está apresentado na Figura 8.13 (Apêndice).

As fases topo e fundo foram separadas sendo que cada fase foi submetida à análise de concentração de nitrogênio ( $\text{g.L}^{-1}$ ) através do método de oxidação por combustão catalítica a  $720^{\circ}\text{C}$  com detecção por infravermelho (Shimadzu, TOC- $V_{\text{CSH}}$ , Japão); para o cálculo de proteína ( $\text{g.L}^{-1}$ ) levou-se em consideração o fator geral 6,25 multiplicado pelo nitrogênio (CHRONAKIS; GALATANU; NYLANDER, 2000). Os parâmetros de purificação, fator de purificação (FP), recuperação (RE), razão volume (Rv) e coeficiente de partição (Kp) foram calculados de acordo com Albertson (1986).

Tabela 6.1 - Níveis reais e codificados das variáveis estudadas nos PFs 2<sup>2</sup> referente aos SAB composto por PEG e solução salina.

SAB PEG/fosfato de potássio								
Níveis	PEG 1500		PEG 4000		PEG 6000		PEG 8000	
	PEG (%, m/m)	Sal (%, m/m)						
-1	15	14	15	11	13	9,0	18	10
0	20	17	20	14	18	12	22	12
+1	25	20	25	17	23	15	26	14

SAB PEG/citrato de sódio								
Níveis	PEG 1500		PEG 4000		PEG 6000		PEG 8000	
	PEG (%, m/m)	Sal (%, m/m)						
-1	18	16	18	10	18	10	22	10
0	23	18	23	13	23	12	25	12
+1	28	20	28	16	28	14	28	14

O FP foi calculado através da Equação 6.1, onde  $PP_f$  é a concentração de proteína purificada da fase ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e  $P_i$  a concentração de proteína do EPSp ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

$$FP = \frac{PP_f}{P_i} \quad (6.1)$$

A RE foi calculada pela Equação 6.2, sendo  $P_f$  a concentração de proteína da fase ( $\text{g.L}^{-1}$ ),  $V_f$  o volume da fase (mL),  $P_i$  a concentração de proteína do EPSp ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e  $V_i$  o volume de EPSp (mL).

$$RE = \frac{P_f \cdot V_f}{P_i \cdot V_i} \cdot 100 \quad (6.2)$$

A Rv dos SABs foi determinada pela Equação 6.3, onde  $V_{fs}$  é o volume da fase superior (mL) e  $V_{fi}$  é o volume da fase inferior (mL).

$$Rv = \frac{V_{fs}}{V_{fi}} \quad (6.3)$$

O Kp do sistema foi obtido pela Equação 6.4, sendo C<sub>fs</sub> a concentração de proteína da fase superior (g.L<sup>-1</sup>) e C<sub>fi</sub> a concentração de proteína da fase inferior (g.L<sup>-1</sup>).

$$Kp = \frac{C_{fs}}{C_{fi}} \quad (6.4)$$

O estudo dos PFCs contribuiu para identificar o comportamento dos SABs em concentrar as proteínas de *S. platensis*, identificando em qual massa molar de PEG ocorreu a melhor performance. A partir dos ensaios com maior fator de purificação, tanto utilizando fosfato de potássio como citrato de sódio, estudou-se a adição de pontos axiais nos planejamentos (Tabela 6.2), tornando-os dois delineamentos centrais compostos rotacionais (DCCRs) (03 repetições no ponto central e 04 pontos axiais, totalizando 11 ensaios).

Tabela 6.2 - Níveis reais e codificados das variáveis estudadas nos DCCRs.

Níveis	SAB PEG e fosfato de potássio		SAB PEG e citrato de sódio	
	PEG 1500 (%, m/m)	Fosfato de potássio (%, m/m)	PEG 1500 (%, m/m)	Citrato de sódio (%, m/m)
-1,41	13,95	12,77	15,95	15,18
-1	15	14	18	16
0*	20	17	23	18
+1	25	20	28	20
+1,41	27,05	21,23	30,05	20,82

\* Triplicata do ponto central.

Os ensaios dos SABs com as melhores condições de concentração de proteínas foram validados, realizando-se ensaios em triplicata, os quais também foram avaliados de acordo com os parâmetros de purificação.

#### 6.2.4 Caracterização das frações proteicas – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As frações proteicas foram avaliadas por eletroforese utilizando gel de poliacrilamida, dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) 15% e padrão de massa molar 5-100 kDa (PageRuler, 4-20% Tris-glycine SDS-PAGE) de acordo com a metodologia de Laemmli (1970). As frações das fases topo foram diluídas 7,5 vezes e das fases fundo não necessitaram de diluição. As amostras foram submetidas a uma corrente constante de 300 mA e tensão de 250 V por aproximadamente 60 min. As bandas de proteínas presentes foram visualizadas utilizando solução corante azul brilhante (Blue R-250).

#### 6.2.5 Análise estatística

Os resultados foram tratados com o software *Statistica* 5.0 (Statsoft Inc., EUA) pela metodologia de planejamento de experimentos. Os modelos foram validados através da análise de variância (ANOVA), calculou-se os valores preditos e o desvio relativo (DR). Os resultados, também, foram tratados pela ANOVA e a comparação entre as médias foi determinada pelo teste de Tukey com 95% de nível de confiança.

### 6.3 Resultados e Discussão

#### 6.3.1 Maximização da recuperação de proteínas de *S. platensis* aplicando SAB PEG/Sal

As Tabelas 6.3 e 6.4 apresentam as matrizes dos PFs 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados) das variáveis estudadas para os SABs compostos por PEG e fosfato de potássio e PEG e citrato de sódio, assim como as respostas obtidas para os parâmetros de purificação, respectivamente. Em todos os sistemas, a maior concentração de proteínas ocorreu nas fases topo ( $K_p > 1,0$ ), indicando maior solubilidade deste componente em solução composta por PEG. Desta forma, somente os resultados da fase

topo são apresentados e discutidos, e os resultados das fases fundo encontram-se no Tabelas 8.7 e 8.8 (Apêndice 2).

A aplicação do SAB composto por PEG e sal foi utilizado como estratégia para recuperar e concentrar as proteínas de *S. platensis*, previamente extraídas com ondas ultrassônicas e agitação mecânica. A partição de proteínas utilizando SAB pode ser influenciada por diversos fatores, tais como: massa molar do polímero, tipo do sal, concentração do sal e do polímero, pH do sistema, tamanho da proteína, entre outros (LEONG et al., 2015). O pH é uma variável importante do processo, considerando-se a solubilidade das proteínas (FRANCO et al., 2005), portanto este parâmetro foi fixado em 9,0 sendo um ponto de alta solubilidade das proteínas de *S. platensis* (MENEGOTTO et al., 2019; BENELHADJ et al., 2016). Entre os polímeros, o PEG vem sendo muito utilizado em SAB devido sua característica inerte e de carga neutra (PEREIRA et al., 2012).

Os maiores FP ocorreram nos ensaios 4 (Tabelas 6.3 e 6.4), exceto para os SABs compostos por fosfato de potássio e PEG 4000 e 6000 Da; indicando que maiores quantidades salinas favorecem a concentração proteica. Os melhores resultados ocorreram ao utilizar PEG 1500 Da, atingindo 1,52 e 1,38 de FP (Tabela 6.3 e 6.4, ensaios 4) e 75,05 e 74,96% (Tabelas 6.3 e 6.4, ensaio 1) de RE com fosfato de potássio e com citrato de sódio, respectivamente. Em geral, o fracionamento das proteínas pode ser favorecido com PEG de menor peso molecular, pois em pesos moleculares mais altos (> 1500 Da), o volume livre da solução é reduzido, dificultando a solubilidade das proteínas-alvo na fase rica em polímero e devido ao mecanismo de exclusão molecular, e desta forma, as proteínas migram à fase salina (GOJA et al., 2013; FRANCO et al., 2005). A Tabela 6.5 apresenta os coeficientes de regressão para os fatores de purificação das fases topo.

## Capítulo 6

Tabela 6.3 - Matrizes dos PFs 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados) para concentração de proteínas de *S. platensis* com SABs compostos por PEG (1500, 4000, 6000 e 8000) e fosfato de potássio com as respostas de FP e RE (%) para as fases topo e, Rv e Kp dos sistemas.

SAB PEG 1500/fosfato de potássio						
Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis dependentes		Rv	Kp
	Fosfato de potássio (%)	PEG 1500 (%)	FP	RE (%)		
1	-1 (14)	-1 (15)	1,11 ± 0,02	75,05 ± 1,30	6,20	2,01
2	+1 (20)	-1 (15)	1,47 ± 0,00	48,02 ± 0,01	0,79	2,40
3	-1 (14)	+1 (25)	1,14 ± 0,00	68,99 ± 0,26	3,48	1,93
4	+1 (20)	+1 (25)	1,52 ± 0,03	56,35 ± 1,06	0,89	3,41
5	0 (17)	0 (20)	1,35 ± 0,01	62,59 ± 0,59	1,57	2,05
6	0 (17)	0 (20)	1,33 ± 0,05	62,94 ± 2,57	1,56	2,19
7	0 (17)	0 (20)	1,31 ± 0,00	62,88 ± 0,04	1,69	1,89
SAB PEG 4000/fosfato de potássio						
Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis dependentes		Rv	Kp
	Fosfato de potássio (%)	PEG 4000 (%)	FP	RE (%)		
1	-1 (11)	-1 (15)	1,10 ± 0,02	67,04 ± 1,22	3,50	1,48
2	+1 (17)	-1 (15)	1,25 ± 0,05	35,90 ± 1,41	0,66	1,75
3	-1 (11)	+1 (25)	1,03 ± 0,01	60,18 ± 0,57	2,73	1,17
4	+1 (17)	+1 (25)	1,14 ± 0,01	37,80 ± 0,31	0,77	1,54
5	0 (14)	0 (20)	1,15 ± 0,01	43,04 ± 1,37	0,95	1,52
6	0 (14)	0 (20)	1,11 ± 0,02	42,40 ± 0,83	0,95	1,38
7	0 (14)	0 (20)	1,16 ± 0,01	42,93 ± 0,25	0,94	1,50
SAB PEG 6000/fosfato de potássio						
Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis dependentes		Rv	Kp
	Fosfato de potássio (%)	PEG 6000 (%)	FP	RE (%)		
1	-1 (9,0)	-1 (13)	1,05 ± 0,02	72,37 ± 1,30	6,12	1,65
2	+1 (15)	-1 (13)	1,07 ± 0,04	30,24 ± 1,21	0,62	1,37
3	-1 (9,0)	+1 (23)	1,00 ± 0,03	69,74 ± 2,25	6,67	1,52
4	+1 (15)	+1 (23)	1,37 ± 0,11	46,55 ± 3,59	0,78	1,87
5	0 (12)	0 (18)	1,16 ± 0,01	50,39 ± 0,48	1,28	1,38
6	0 (12)	0 (18)	1,12 ± 0,03	50,88 ± 1,45	1,33	1,32
7	0 (12)	0 (18)	1,14 ± 0,03	50,62 ± 1,55	1,32	1,34
SAB PEG 8000/fosfato de potássio						
Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis dependentes		Rv	Kp
	Fosfato de potássio (%)	PEG 8000 (%)	FP	RE (%)		
1	-1 (10)	-1 (18)	0,83 ± 0,00	53,20 ± 0,05	4,20	1,38
2	+1 (14)	-1 (18)	1,18 ± 0,01	44,51 ± 0,57	0,97	1,99
3	-1 (10)	+1 (26)	0,83 ± 0,00	55,89 ± 0,08	3,44	1,39
4	+1 (14)	+1 (26)	1,04 ± 0,01	38,48 ± 0,54	0,94	1,76
5	0 (12)	0 (22)	0,83 ± 0,01	35,96 ± 0,29	1,25	1,24
6	0 (12)	0 (22)	0,83 ± 0,00	35,93 ± 0,07	1,25	1,22
7	0 (12)	0 (22)	0,84 ± 0,03	36,20 ± 1,46	1,22	1,30

## Capítulo 6

Tabela 6.4 - Matrizes dos PFs 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados) para concentração de proteínas de *S. platensis* com SABs compostos por PEG (1500, 4000, 6000 e 8000) e citrato de sódio com as respostas de FP, RE (%) para as fases topo e, Rv e Kp dos sistemas.

SAB PEG 1500/citrato de sódio						
Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis dependentes		Rv	Kp
	Citrato de sódio (%)	PEG 1500 (%)	FP	RE (%)		
1	-1 (16)	-1 (18)	0,98 ± 0,01	74,96 ± 0,69	35,00	1,25
2	+1 (20)	-1 (18)	1,13 ± 0,00	61,18 ± 0,17	2,27	1,58
3	-1 (16)	+1 (28)	1,20 ± 0,01	70,69 ± 0,53	3,00	2,77
4	+1 (20)	+1 (28)	1,38 ± 0,02	63,55 ± 0,94	1,43	2,48
5	0 (18)	0 (23)	1,21 ± 0,00	66,93 ± 0,24	2,40	2,11
6	0 (18)	0 (23)	1,21 ± 0,00	67,38 ± 0,04	2,46	1,94
7	0 (18)	0 (23)	1,18 ± 0,03	64,16 ± 1,84	2,46	1,82

SAB PEG 4000/citrato de sódio						
Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis dependentes		Rv	Kp
	Citrato de sódio (%)	PEG 4000 (%)	FP	RE (%)		
1	-1 (10)	-1 (18)	0,92 ± 0,00	67,49 ± 0,09	14,00	1,31
2	+1 (16)	-1 (18)	1,21 ± 0,01	47,32 ± 0,54	1,00	1,51
3	-1 (10)	+1 (28)	0,97 ± 0,00	66,45 ± 0,08	6,83	1,78
4	+1 (16)	+1 (28)	1,22 ± 0,01	63,50 ± 0,39	2,00	3,39
5	0 (13)	0 (23)	1,02 ± 0,01	66,35 ± 0,54	5,00	2,15
6	0 (13)	0 (23)	1,06 ± 0,01	68,14 ± 0,35	4,63	2,27
7	0 (13)	0 (23)	1,03 ± 0,02	66,31 ± 1,11	4,63	2,36

SAB PEG 6000/citrato de sódio						
Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis dependentes		Rv	Kp
	Citrato de sódio (%)	PEG 6000 (%)	FP	RE (%)		
1	-1 (10)	-1 (18)	1,06 ± 0,01	74,03 ± 0,42	8,00	1,82
2	+1 (14)	-1 (18)	1,19 ± 0,01	72,34 ± 0,81	3,11	1,63
3	-1 (10)	+1 (28)	1,10 ± 0,00	70,57 ± 0,20	4,00	1,79
4	+1 (14)	+1 (28)	1,32 ± 0,05	73,22 ± 2,61	2,42	2,33
5	0 (12)	0 (23)	1,00 ± 0,02	67,23 ± 1,02	5,17	1,39
6	0 (12)	0 (23)	1,02 ± 0,01	67,62 ± 0,73	4,78	1,46
7	0 (12)	0 (23)	0,96 ± 0,02	67,08 ± 1,34	5,71	1,28

SAB PEG 8000/citrato de sódio						
Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis dependentes		Rv	Kp
	Citrato de sódio (%)	PEG 8000 (%)	FP	RE (%)		
1	-1 (10)	-1 (22)	1,17 ± 0,01	74,88 ± 0,59	4,20	2,71
2	+1 (14)	-1 (22)	1,20 ± 0,01	45,26 ± 0,55	0,97	1,85
3	-1 (10)	+1 (28)	1,09 ± 0,01	73,33 ± 0,98	3,44	2,28
4	+1 (14)	+1 (28)	1,20 ± 0,02	44,69 ± 0,82	0,94	2,28
5	0 (12)	0 (25)	1,10 ± 0,01	48,03 ± 0,63	1,25	1,98
6	0 (12)	0 (25)	1,05 ± 0,01	45,61 ± 0,50	1,25	1,82
7	0 (12)	0 (25)	1,06 ± 0,00	45,45 ± 0,05	1,22	1,73

Ao mudar o nível de -1 a +1, as variáveis fosfato de potássio (%) e citrato de sódio (%) exerceram efeitos positivos para o FP, significativo ( $p \leq 0,10$ ) na maioria dos PFs, exceto para os SABs compostos por citrato de sódio e PEG 6000 e 8000 Da. Os resultados indicam que os maiores resultados de FP ocorrem em maiores concentrações de sal, principalmente, devido ao *salting-out* das proteínas, que ao reduzir a solubilidade deste componente na fase salina, favorece a migração para fase topo (NG et al., 2018; SOUZA et al., 2015). No entanto, o efeito negativo para a resposta RE (%) é decorrente da redução de volume da fase topo, muitas vezes, consequência do aumento da concentração salina (XIN-YING et al., 2012), onde o sal se liga com as moléculas de água devido a solvatação dos íons (FRANCO et al., 2005), aumentando o volume da fase fundo.

Tabela 6.5 – Efeitos das variáveis do PF 2<sup>2</sup> para as fases topo dos SABs compostos por PEG de diferentes pesos molares e soluções salinas.

		<b>SAB PEG/Fosfato de potássio</b>			
		<b>1500 Da</b>	<b>4000 Da</b>	<b>6000 Da</b>	<b>8000 Da</b>
<b>FP</b>	SAL	0,37*	0,13*	0,20*	0,28*
	PEG	0,04	-0,09*	0,23*	-0,07
	PEGxSAL	0,01	-0,02	0,17*	-0,06
<b>RE (%)</b>	SAL	-19,83*	-26,76*	-32,65*	-13,05
	PEG	1,13	-2,48	6,84	-1,67
	PEGxSAL	7,20*	4,38	9,47*	-4,36
		<b>SAB PEG/ citrato de sódio</b>			
		<b>1500 Da</b>	<b>4000 Da</b>	<b>6000 Da</b>	<b>8000 Da</b>
<b>FP</b>	SAL	0,16*	0,27*	0,17	0,07
	PEG	0,23*	0,03	0,08	-0,03
	PEGxSAL	0,01	-0,02	0,04	0,04
<b>RE (%)</b>	SAL	-10,46*	-11,56	0,48	-29,13*
	PEG	-0,95	7,57	-1,29	-1,06
	PEGxSAL	3,32*	8,61	2,17	0,49

\*Significativo ( $p \leq 0,10$ ).

Em geral, o aumento da concentração do PEG favorece a partição das proteínas, aumentando o K<sub>p</sub> do sistema (PEREIRA et al., 2012). Contudo, valores intermediários de PEG são mais aplicáveis, garantindo uma adequada separação e recuperação (GOJA et

al., 2013). Em altas concentrações do polímero, ocorre o aumento da viscosidade do sistema, dificultando a homogeneização e, conseqüentemente, a separação das fases (PEREIRA et al., 2012). Comportamento semelhante foi observado por Antelo, Costa e Kalil (2015) que ao purificar ficocianina de *S. platensis* em SAB composto por PEG 1500, 4000, 6000 e 8000 Da e fosfato de potássio, observaram efeitos positivos para FP em todas as massas molares avaliadas e para RE (%), os resultados positivos ocorreram somente para 1500 e 6000 Da.

A fim de maximizar a concentração das proteínas de *S. platensis* utilizando SAB composto por PEG e sal foram incluídos ensaios de pontos axiais nos PFs referente a aplicação de PEG 1500 Da com fosfato de potássio e com citrato de sódio (Tabelas 6.6 e 6.7). O FP para o SAB composto por fosfato de potássio e PEG 1500 Da variou entre 1,08 a 1,88% na fase topo (Tabela 6.6, ensaios 5 e 6), e a maior RE foi 75,05% (Tabela 6.6, ensaio 1). Para o SAB composto por citrato de sódio e PEG 1500 Da, o FP na fase topo permaneceu entre 0,98 e 1,56% (Tabela 6.7, ensaios 1 e 6) e máxima recuperação foi 74,96% (Tabela 6.7, ensaio 1). Os resultados para as fases fundo estão apresentadas nas Tabelas 8.9 e 8.10 (Apêndice).

Os coeficientes de regressão resultantes dos DCCRs  $2^2$  (Tabelas 8.11 e 8.12, Apêndice) confirmaram os resultados obtidos pelos PFs  $2^2$ , nos quais as variáveis referentes às concentrações salinas foram significativas ( $p \leq 0,10$ ), dentro da faixa estudada, para todas as respostas, sendo positiva para FP e negativa para RE; a variável PEG (%) apresentou o mesmo efeito para ambas respostas, contudo revelou caráter significativo somente para FP do SAB composto por citrato de sódio.

## Capítulo 6

Tabela 6.6 - Matriz do DCCR 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados) para concentração de proteínas de *S. platensis* com SAB composto por fosfato de potássio e PEG 1500 Da com as respostas de FP e RE (%) para fase topo e, Rv e Kp do sistema.

Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis dependentes						Rv	Kp
	Fosfato de potássio (%)	PEG 1500 (%)	FP			RE (%)				
			Experimental	Previsto	DR	Experimental	Previsto	DR		
1	-1 (14)	-1 (15)	1,11 ± 0,02	1,10	1,23	75,05 ± 1,31	68,35	8,93	6,20	2,01
2	+1 (20)	-1 (15)	1,47 ± 0,00	1,58	-7,29	48,02 ± 0,01	55,55	-15,68	0,79	2,40
3	-1 (14)	+1 (25)	1,14 ± 0,00	1,10	3,63	68,99 ± 0,26	68,35	0,92	3,48	1,93
4	+1 (20)	+1 (25)	1,52 ± 0,03	1,58	-3,61	56,35 ± 1,06	55,55	1,43	0,89	3,41
5	-1,41 (12,77)	0 (20)	1,08 ± 0,01	1,00	7,07	70,29 ± 0,36	70,974	-0,97	5,00	1,98
6	+1,41 (21,23)	0 (20)	1,88 ± 0,06	1,68	11,67	62,22 ± 1,89	52,926	14,94	0,73	2,92
7	0 (17)	-1,41 (13,95)	1,17 ± 0,02	1,34	-14,27	57,61 ± 0,87	61,95	-7,53	1,69	1,40
8	0 (17)	+1,41 (27,05)	1,38 ± 0,01	1,34	2,81	54,52 ± 0,42	61,95	-13,64	1,02	1,91
9	0 (17)	0 (20)	1,35 ± 0,01	1,34	0,40	62,59 ± 0,59	61,95	1,02	1,57	2,05
10	0 (17)	0 (20)	1,33 ± 0,05	1,34	-0,89	62,94 ± 2,57	61,95	1,58	1,56	2,19
11	0 (17)	0 (20)	1,31 ± 0,00	1,34	-1,91	62,88 ± 0,04	61,95	1,48	1,69	1,89

Tabela 6.7 - Matriz do DCCR 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados) para concentração de proteínas de *S. platensis* com SAB composto por citrato de sódio e PEG 1500 Da com as respostas de FP e RE (%) para fase topo e, Rv e Kp do sistema.

Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis dependentes						Rv	Kp
	Citrato de sódio (%)	PEG 1500 (%)	FP			RE (%)				
			Experimental	Previsto	DR	Experimental	Previsto	DR		
1	-1 (16)	-1 (18)	0,99 ± 0,01	0,99	-0,49	74,96 ± 0,69	72,84	2,82	3,50	1,25
2	+1 (20)	-1 (18)	1,13 ± 0,00	1,23	-9,27	61,18 ± 0,17	60,56	1,01	2,27	1,58
3	-1 (16)	+1 (28)	1,20 ± 0,01	1,19	1,19	70,69 ± 0,53	69,52	1,66	3,00	2,77
4	+1 (20)	+1 (28)	1,38 ± 0,02	1,43	-3,71	63,55 ± 0,94	63,88	-0,53	1,43	2,48
5	-1,41 (15,18)	0 (23)	1,08 ± 0,00	1,04	3,28	70,18 ± 0,31	73,02	-4,04	5,00	2,22
6	+1,41 (20,82)	0 (23)	1,56 ± 0,07	1,38	11,62	59,71 ± 2,82	60,38	-1,13	0,96	2,28
7	0 (18)	-1,41 (15,95)	1,08 ± 0,00	1,07	0,89	66,12 ± 0,07	66,70	-0,87	3,62	1,64
8	0 (18)	+1,41 (30,05)	1,29 ± 0,05	1,35	-4,67	67,34 ± 2,58	66,70	0,95	2,00	3,09
9	0 (18)	0 (23)	1,21 ± 0,00	1,21	0,18	66,93 ± 0,24	66,70	0,35	2,40	2,01
10	0 (18)	0 (23)	1,21 ± 0,00	1,21	0,06	67,38 ± 0,04	66,70	1,01	2,46	1,94
11	0 (18)	0 (23)	1,18 ± 0,03	1,21	-2,48	65,71 ± 1,84	66,70	-1,51	2,46	1,87

Considerando os parâmetros significativos para as respostas de FP e RE (%) foi possível obter equações que representam seus modelos quadráticos em função das variáveis independentes estudadas. As Equações 6.5, 6.6 são decorrentes do SAB composto por fosfato de potássio e PEG 1500 e as Equações 6.7 e 6.8 do SAB com citrato de sódio.

$$FP^f = 1,34 + 0,24.X_1^f \quad (6.5)$$

$$RE^f (\%) = 61,95 - 6,40.X_1^f \quad (6.6)$$

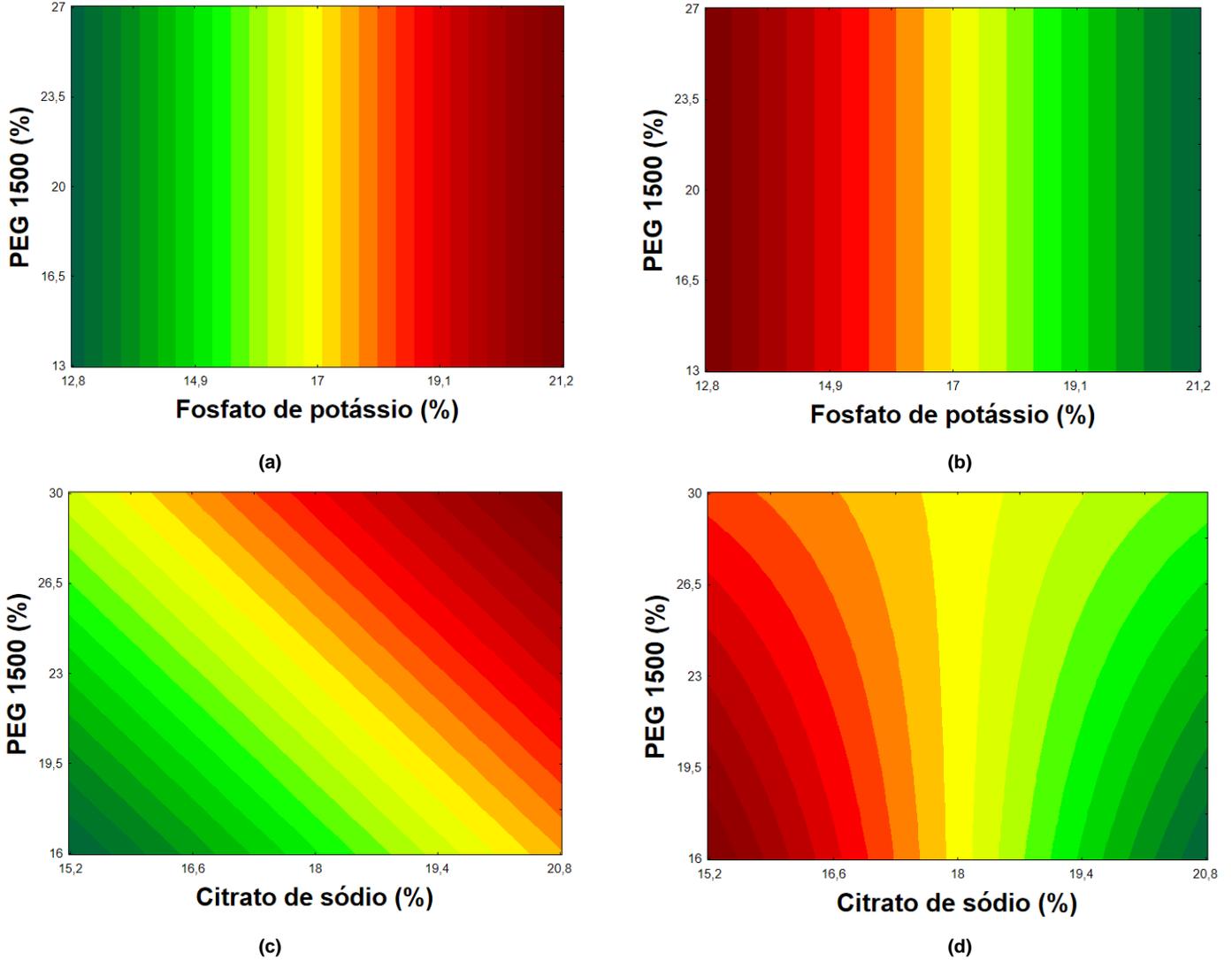
$$FP^c = 1,21 + 0,12.X_1^c + 0,10.X_2^c \quad (6.7)$$

$$RE^c (\%) = 66,70 - 4,48.X_1^c + 1,66.X_1^c.X_2^c \quad (6.8)$$

Onde  $FP^f$  é fator de purificação e  $RE^f$  a recuperação do SAB com fosfato de potássio e PEG;  $FP^c$  e  $RE^c$  são o fator de purificação e a recuperação do SAB com citrato de sódio e PEG;  $X_1^f$  é a concentração de fosfato de potássio (%) e  $X_1^c$  é a concentração de citrato de sódio (%); e  $X_2^c$  é a concentração de PEG 1500 (%) para o sistema composto por citrato de sódio.

Os parâmetros não utilizados foram incorporados aos resíduos para o cálculo da ANOVA (Tabelas 8.15 e 8.16, Apêndice). Como os  $F_{\text{calculados}}$  para as regressões foram significativos ( $p \leq 0,10$ ); apresentando-se aproximadamente 130 vezes maior que o  $F_{\text{tabelado}}$ , para FP e 3 vezes maior para RE do SAB fosfato de potássio/PEG 1500, 5 vezes maior que o  $F_{\text{tabelado}}$  para FP do SAB citrato de sódio/PEG 1500 e 13 vezes maior para R do mesmo sistema. Os coeficientes de correlação obtidos pelos modelos foram 0,90 para FP e 0,74 para RE do SAB composto por fosfato de potássio e, 0,89 e 0,95 para FP e RE do SAB citrato de sódio/PEG 1500. Desta forma, os modelos se ajustaram aos dados experimentais, sendo possível construir as curvas de contorno (Figura 6.1). Além disso, os desvios relativos – DR (Tabelas 6.6 e 6.7) foram inferiores à 16%, comprovando o ajuste adequado do modelo aos dados experimentais.

Figura 6.1 - Curvas de contorno para FP (a) e RE (%) (b) da fase topo do SAB PEG 1500/fosfato de potássio e para FP (c) e RE (%) (d) da fase topo do SAB PEG 1500/citrato de sódio.



De acordo com as Figura 6.1 observa-se que a combinação entre 20 a 21,2% de fosfato de potássio e em qualquer concentração de PEG 1500 Da, dentro da faixa estudada (13 a 27%), resultou em maiores FP ( $> 1,6$ ). Para o mesmo sistema a combinação entre 12,8 a 17% de fosfato de potássio e 13 a 26% de PEG 1500 Da resultou em RE maior que 70%. No SAB composto por PEG 1500 Da e citrato de sódio (Figura 6.2) obteve-se um FP maior que 1,5, combinando aproximadamente 20% de citrato de sódio e com qualquer percentual de PEG nos níveis estudados (16 a 30%). Os

maiores percentuais de RE (> 75%) foram encontrados ao utilizar de 15,2 a 17% do sal, também, com qualquer concentração de PEG.

Para validação dos experimentos dos planejamentos DCCR foram realizados ensaios, em triplicata, nas seguintes condições: 14% de fosfato de potássio e 15% de PEG 1500 Da e 16% de citrato de sódio e 18% de PEG 1500 Da para os SABs compostos por PEG 1500/fosfato de potássio e PEG1500/citrato de sódio (Tabelas 6.6 e 6.7, ensaio 1), respectivamente. A Tabela 6.8 apresenta os resultados de FP e RE encontrados nas condições definidas, os quais não diferiram ao nível de confiança de 95%.

Tabela 6.8 - Validação dos parâmetros de recuperação de proteínas de *S. platensis* estudados nos SABs aplicando PEG 1500 Da e fosfato de potássio e PEG 1500 Da e citrato de sódio.

Ensaio	T	SAB PEG 1500/fosfato de potássio		SAB PEG 1500/citrato de sódio	
		FP	RE (%)	FP	RE (%)
1	T	1,11 <sup>a</sup> ± 0,01	75,05 <sup>a</sup> ± 0,22	0,99 <sup>a</sup> ± 0,07	74,96 <sup>a</sup> ± 0,69
	F	0,64 <sup>b</sup> ± 0,01	28,78 <sup>b</sup> ± 0,14	0,73 <sup>b</sup> ± 0,02	28,71 <sup>b</sup> ± 0,81
2	T	1,10 <sup>a</sup> ± 0,01	74,72 <sup>a</sup> ± 0,10	1,00 <sup>a</sup> ± 0,08	76,01 <sup>a</sup> ± 0,98
	F	0,66 <sup>b</sup> ± 0,01	30,00 <sup>b</sup> ± 0,61	0,69 <sup>b</sup> ± 0,03	27,46 <sup>b</sup> ± 1,26
3	T	1,09 <sup>a</sup> ± 0,06	75,80 <sup>a</sup> ± 1,05	1,06 <sup>a</sup> ± 0,02	76,71 <sup>a</sup> ± 0,64
	F	0,65 <sup>b</sup> ± 0,01	29,49 <sup>b</sup> ± 0,22	0,70 <sup>b</sup> ± 0,00	28,09 <sup>b</sup> ± 0,09

\* Médias seguidas de letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ± erro padrão; T: Topo; F: Fundo.

Os resultados de FP do SAB composto por fosfato de potássio foi significativamente maior ( $p \leq 0,05$ ), contudo os RE entre os dois SAB avaliados, não apresentaram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre eles. Desta forma, pode-se sugerir que o SAB composto por citrato de sódio apresentou melhor desempenho, pois além da sua performance, o citrato de sódio é considerado biodegradável e atóxico (SILVA et al., 2009), podendo ser descartado sem nenhum tratamento ao meio ambiente, e apresenta alta seletividade, biocompatibilidade e facilidade para aumento de escala (GOJA et al., 2013).

Para tornar o processo ainda mais eficiente, a recuperação do polímero é de grande importância industrialmente. Para isso, primeiramente, deve ser realizado o

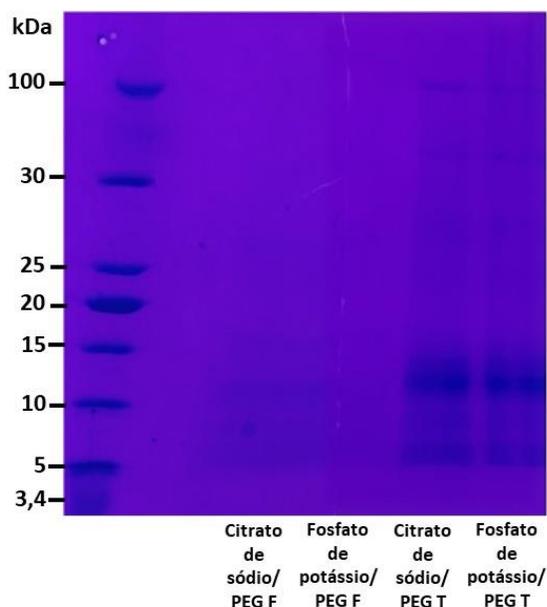
rompimento da interação entre o polímero e a molécula purificada, para isso geralmente utilizam-se moléculas que competem com o polímero para ligar-se com a proteína-alvo. Em seguida a recuperação do polímero pode ser realizada por extração por solventes, transferência da massa polimérica para um novo sistema ou ultrafiltração; sendo a última técnica não muito aplicada devido aos custos de diluição e reconcentração (FRANCO et al., 2005). Desta forma, será possível obter a proteína isolada dos constituintes do SAB e altamente purificada.

Patil et al. (2008) também estudaram diferentes sais para purificação de ficocianina de *S. platensis* aplicando SAB composto por PEG. Da mesma forma os autores verificaram que o sistema composto pelo sal fosfato de potássio promoveu maior pureza e recuperação do pigmento, possuindo uma biocompatibilidade favorável com o sistema. Rajakumar e Muthukumar (2018) estudaram a recuperação de proteínas de *S. platensis* avaliando diferentes SABs; os autores avaliaram sistemas compostos por PEG de distintas massas molares (2000, 4000 e 6000 Da) e pH (6,0, 7,0 e 8,0), ressaltando que ao aumentar o pH (8,0) o percentual de recuperação de proteínas aumentava, devido a maior solubilidade do componente na fase topo. Os mesmos autores verificaram que ao utilizar PEG 6000 Da houve uma recuperação de aproximadamente 84%. Rajakumar e Muthukumar (2018) verificaram que ao utilizarem NaCl na composição do SAB, este favoreceu a partição das proteínas, quando não aplicaram NaCl, a recuperação proteica foi menor (~ 37%).

A Figura 6.3 apresenta perfil de eletroforese das fases topo e fundo dos SABs maximizados. As bandas evidentes foram encontradas nas faixas de 5 e 10-15 kDa. No entanto, nas frações das fases fundo não foram identificadas bandas evidentes, devido ao baixo conteúdo proteico. Benelhadj et al. (2016) avaliaram o perfil de eletroforese de um concentrado proteico de *S. platensis* e encontraram bandas evidentes entre 10-20 kDa, resultado semelhante ao do presente estudo; os autores destacam que as bandas encontradas são decorrentes das ficobiliproteínas.

Chethana, Chetan e Madhusudhan (2015) destacam que bandas entre 15-20 kDa são decorrentes do pigmento ficocianina e a presença de uma banda próxima a 100 kDa, que é característica da proteína clorofila (47 kDa) e da proteína de ligação da membrana nuclear (95 kDa) (RAJAKUMAR; MUTHUKUMAR, 2018; SUDHIR et al., 2005).

Figura 6.2 - Gel de eletroforese das amostras obtidas pela maximização dos SABs compostos por fosfato de potássio e PEG 1500 e citrato de sódio e PEG 1500.



F: Fundo; T: Topo.

## 6.4 Conclusão

Os maiores resultados de FP e RE ocorreram nas fases topos dos SABs, demonstrando a maior afinidade da biomolécula com o PEG. Além disso, estudou-se o desempenho de PEG com diferentes massas molares, alcançando fatores de purificação entre 0,83 a 1,52 e 0,92 a 1,38 para as fases topo dos SAB compostos por fosfato de potássio e citrato de sódio, respectivamente. Ao utilizar uma sequência de planejamentos experimentais foi possível definir as condições maximizadas de recuperação de proteínas de *S. platensis* por SAB, as quais foram: 14% de fosfato de potássio e 15% de PEG 1500 e 16% de citrato de sódio e 18% de PEG 1500, ambos em pH 9,0. O SAB composto por PEG e citrato de sódio foi considerado com melhor desempenho para a recuperação de proteínas de *S. platensis*, o qual alcançou 1,02 de FP e 75% de RE. A eletroforese indicou a presença de bandas (5 e 15 kDa), referente às ficobiliproteínas.

Neste trabalho foi possível verificar a potencialidade do uso de SAB para a recuperação de proteínas de *S. platensis*. Devido à alta demanda por métodos de purificação e recuperação de biomoléculas, SAB compostos por polímeros e sais são

considerados promissores para aplicação industrial, além de serem eficazes, simples e economicamente viáveis.

### 6.5 Referências Bibliográficas

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

AMID, M.; ABDUL MANAP, M. Y.; MUSTAFA, S. Purification of pectinase from mango (*Mangifera indica* L. cv. Chokanan) waste using an aqueous organic phase system: A potential low cost source of the enzyme. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 931, p. 17–22, 2013.

ANTELO, F. S.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Purification of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* in aqueous two-phase systems using an experimental design. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, p. 1–11, 2015.

BASHIR, S.; SHARIF, M. K.; BUTT, M. S.; SHAHID, M. Functional properties and amino acid profile of *Spirulina platensis* protein isolates. **Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 59, p. 12–19, 2016.

BENELHADJ, S.; GHARSALLAOUI, A.; DEGRAEVE, P.; ATTIA, H.; GHORBEL, D. Effects of pH on the functional properties of *Arthrospira (Spirulina) platensis* protein isolate. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1056-1063, 2016.

CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; BUNNAG, B. Stability of phycoerythrin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 659–664, 2012.

CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; LOHA, V.; TIA, S.; BUNNAG, B. Separation and purification of phycoerythrin from *Spirulina* sp. using a membrane process. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7159–7164, 2011.

CHETHANA, S.; NAYAK, C. A.; MADHUSUDHAN, M. C.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Single step aqueous two-phase extraction for downstream processing of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 2415–2421, 2015.

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

FRANCO, T. T.; KILIKIAN, B. V.; COIMBRA, J. S. R.; MEIRELLES, A. J. A. Extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas. In: PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005.

FU, H.; DAI, H.; SUN, Y.; ZHANG, D.; XIU, Z. Partition behavior of hydrophilic diols in an ethanol/ammonium sulfate salting-out extraction system. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, p.797–803, 2015.

- GOJA, A. M.; YANG, H.; CUI, M.; LI, C. Aqueous two-phase extraction advances for bioseparation. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 4, p. 1–8, 2013.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- LEONG, Y. K.; KOROH, F. E.; SHOW, P. L.; LAN, J. C.-W.; LOH, H.-S. Optimisation of extractive bioconversion for green polymer via aqueous two-phase system. **Chemical Engineering Transactions**, v. 45, p. 1495–1500, 2015.
- LUPATINI, A. L.; BISPO, L. O.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V.; CANAN, C.; COLLA, E. Protein and carbohydrate extraction from *S. platensis* biomass by ultrasound and mechanical agitation. **Food Research International**, v. 99, p.1028–1035, 2017a.
- LUPATINI, A. L.; COLLA, L. M.; CANAN, C.; COLLA, E. Potential application of microalgae *Spirulina platensis* as a protein source. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, p. 724–732, 2017b.
- 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.
- MENEGOTTO, A. L. L.; SOUZA, L. E. S.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V.; SEHN, E.; BITTENCOURT, R. S.; FLORES, E. L. M.; CANAN, C.; COLLA, E. Investigation of techno-functional and physicochemical properties of *Spirulina platensis* protein concentrate for food enrichment. **LWT – Food Science and Technology**, v. 114, p.108267, 2019.
- 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.
- NG, H. S.; CHAI, C. X. Y.; CHOW, Y. H.; LOH, W. L. C.; YIM, H. S.; TAN, J. S.; LAN, J. C.-W. Direct recovery of *Bacillus subtilis* xylanase from fermentation broth with an alcohol/salt aqueous biphasic system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, p. 585–589, 2018.
- PATIL, G.; CHETHANA, S.; MADHUSUDHAN, M. C.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Fractionation and purification of the phycobiliproteins from *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 7393–7396, 2008.
- PEREIRA, J. F. B.; SANTOS, V. C.; JOHANSSON, H.-O.; TEIXEIRA, J. A. C.; PESSOA JR, A. A stable liquid-liquid extraction system for clavulanic acid using polymer-based aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 98, p. 441–450, 2012.
- PHONG, W. N.; SHOW, P. L.; TEH, W. H.; TEH, T. X.; LIM, H. M. Y.; NAZRI, N. S. B.; TAN, C. H.; CHANG, J.-S.; LING, T. C. Proteins recovery from wet microalgae using liquid biphasic flotation (LBF). **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1329–1336, 2017.
- PONTIS, H. G. **Methods for analysis of carbohydrate metabolism in photosynthetic organisms. Plants, green algae, and cyanobacteria**. London: Elsevier Inc., 2016.
- RAJA, S.; MURTY, V. R.; THIVAHARAN, V.; RAJASEKAR, V.; RAMESH, V. Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules – a review. **Science and**

**Technology**, v. 1, p. 7–16, 2011.

RAJAKUMAR, M. S.; MUTHUKUMAR, K. Influence of pre-soaking conditions on ultrasonic extraction of *Spirulina platensis* proteins and its recovery using aqueous biphasic system. **Separation Science and Technology**, v. 53, p. 2034–2043, 2018.

SILVA, C. A. S.; COIMBRA, J. S. R.; ROJAS, E. E. C.; TEIXEIRA, J. A. C. Partitioning of glycomacropptide in aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1213–1216, 2009.

SOUZA, R. L.; LIMA, R. A.; COUTINHO, J. A. P.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Novel aqueous two-phase systems based on tetrahydrofuran and potassium phosphate buffer for purification of lipase. **Process biochemistry**, v. 50, p. 1459–1467, 2015.

SOUZA, F. T.; MARGARITES, A. C.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E. Avaliação do potencial antioxidante da ficocianina em sistema lipídico óleo de soja e azeite de oliva. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, p. 275–279, 2006.

SUDHIR, P.-R.; POGORYELOV, D.; KOVÁCS, L.; GARAB, G.; MURTHY, S. D. S. The effects of salts stress on photosynthetic electron transport and thylakoid membrane proteins in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 481–485, 2005.

WU, Y.; WANG, Y.; ZHANG, W.; HAN, J.; LIU, Y.; HU, Y.; NI, L. Extraction and preliminary purification of anthocyanins from grape juice in aqueous two-phase system. **Separation and Purification Technology**, v. 124, p. 170–178, 2014.

XIN-YING, Z.; FENG, Q.; MIN, D.; FAN, C.; AI-QIN, L.; JING-HUA, Z. Separation of proteins by aqueous two-phase extraction system combined with liquid chromatography. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 40, p. 38–42, 2012.

## 7 CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

### 7.1 Conclusões

A seguir serão apresentadas as principais conclusões deste trabalho:

Empregando diferentes tipos de membranas e condições de operação, a membrana tipo fibra oca (corte de 50 kDa), nas condições de 1,5 bar e 30°C, e associada à DF foi efetiva na concentração e recuperação de proteínas (88%, bs) e ficocianina (142 mg.L<sup>-1</sup>) de *S. platensis*, além de apresentar maior percentual de atividade antioxidante (90%). Além disso, as estruturas secundárias presentes,  $\alpha$ -hélice e  $\beta$ -folha, estão relacionadas com o potencial emulsificante e de estabilidade térmica. Em geral, o PSM foi o que apresentou os melhores resultados, possibilitando a obtenção de duas frações proteicas de *S. platensis* com performances diferentes, mas ambas com potencial de aplicação na indústria alimentícia, como química e farmacêutica.

O SAB composto por citrato de sódio e fosfato de potássio revelaram potencial para purificação de proteínas de *S. platensis*, sendo que o primeiro além de apresentar os maiores resultados de pureza e recuperação, também é de menor custo, biodegradável e não tóxico. O SAB compostos por citrato de sódio e etanol apresentou 1,3 de fator de purificação e 78% de recuperação e o SAB composto por PEG 1500 e citrato de sódio, 1,02 de pureza e 75% de recuperação.

A associação do SAB composto por citrato de sódio e etanol com o PSM, possibilitou um aumento do fator de purificação (1,5) e da recuperação (87%) de proteínas. Este sistema foi vantajoso por possibilitar o aumento do conteúdo proteico e manter a atividade antioxidante das proteínas de *S. platensis*.

Ao avaliar as propriedades emulsificantes das amostras de proteínas obtidas neste trabalho, foi possível verificar que o perfil de retrodispersão (RD) das emulsões elaboradas com o concentrado e permeado do processo UF/DF se ajustaram ao modelo sigmoidal para obtenção das constantes de desestabilização ( $k_s$  e  $k_h$ ) e revelaram as emulsões mais estáveis ( $> RD$ ), tanto em pH 4,0 como 7,0 (Apêndice, Figura 8.14). As emulsões formadas com as fases topo e fundo do SAB e com o concentrado do SAB/PSM

apresentaram cinética de desestabilização de segunda ordem, ajustando-se no modelo hiperbólico, e entre as três amostras, a topo foi a que apresentou melhor estabilidade ( $> k_s$  e  $k_h$ ). As distribuições do tamanho de partícula das emulsões recém preparadas apresentaram dimensão entre 0,04 e 200  $\mu\text{m}$  e comportamento bimodal, como duas populações de diâmetro de gotas distintas: diâmetros menores e maiores.

Os métodos de concentração PSM e o SAB apresentaram importante potencial para a obtenção de proteínas de *S. platensis*, sendo que a finalidade da proteína a ser purificada que deve determinar a escolha do método. Ambas as técnicas possibilitaram a obtenção de proteínas de *S. platensis* com características que vão além da sua performance nutricional, com propriedades antioxidante, emulsificante e estabilizante.

## 7.2 Sugestões para trabalhos futuros

- Realizar a recuperação e reciclo do PEG, possibilitando a avaliação das frações obtidas pelo SAB. Desta forma, será possível determinar suas propriedades, além de compará-las com os demais resultados obtidos neste trabalho;
- Realizar o estudo das demais propriedades tecno-funcionais, tais como capacidade de absorção de água e óleo, propriedades espumantes e gelificantes;
- Aplicar os concentrados e/ou extratos proteico de *S. platensis* em sistemas alimentares, visando sua atuação pelas suas propriedades tecno-funcionais (emulsificante, antioxidante, estabilizante e geleificante) e sua característica sensorial.

## 8 APÊNDICES

Figura 8.1 - Processo de obtenção do perfil de RD em função da altura da célula.

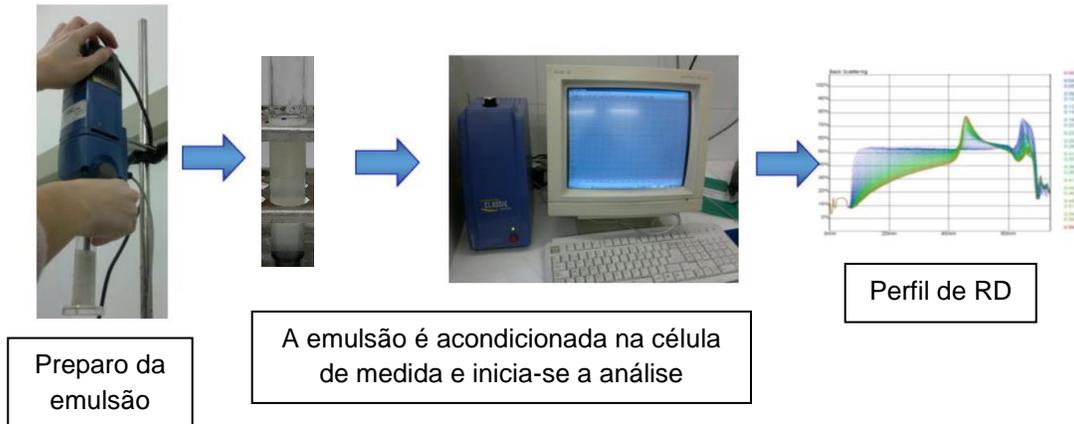
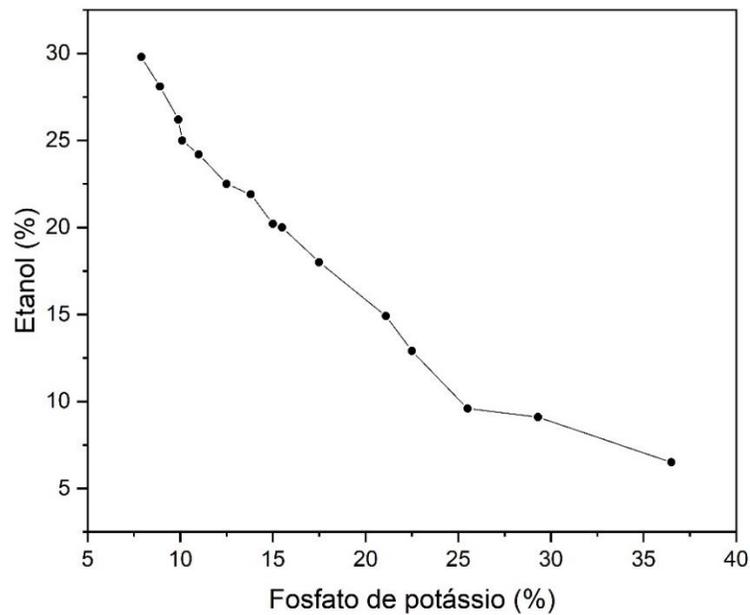
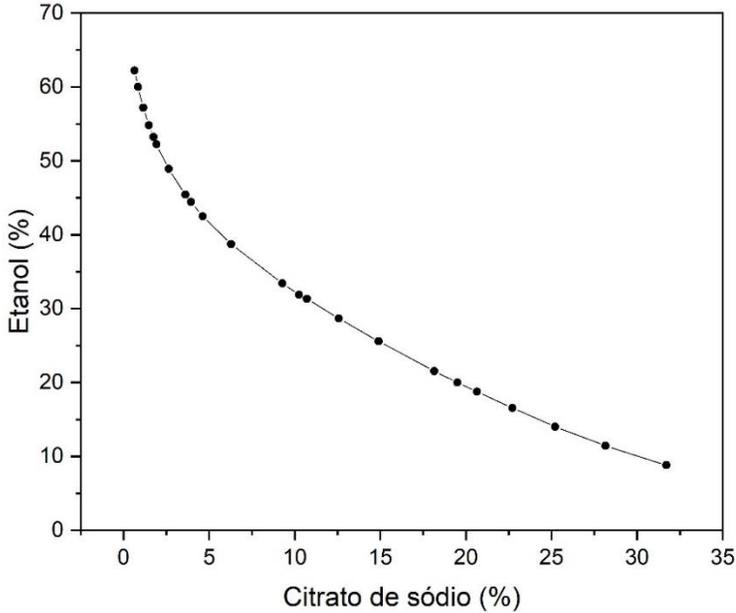


Figura 8.2 - Curva binodal para etanol e fosfato de potássio.



Fonte: Leong et al. (2018)

Figura 8.3 - Curva binodal para etanol e citrato de sódio.



Fonte: Wang et al. (2010)

Figura 8.4 - Fluxograma da separação das proteínas de *S. platensis* com SAB composto por etanol e sal.

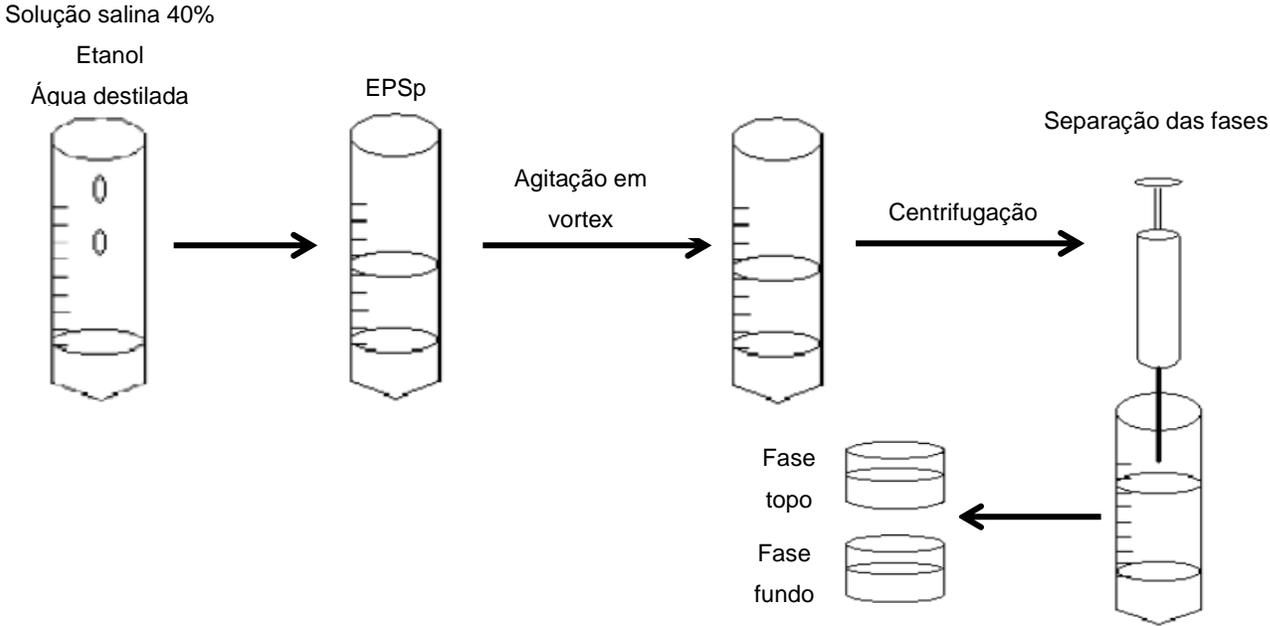
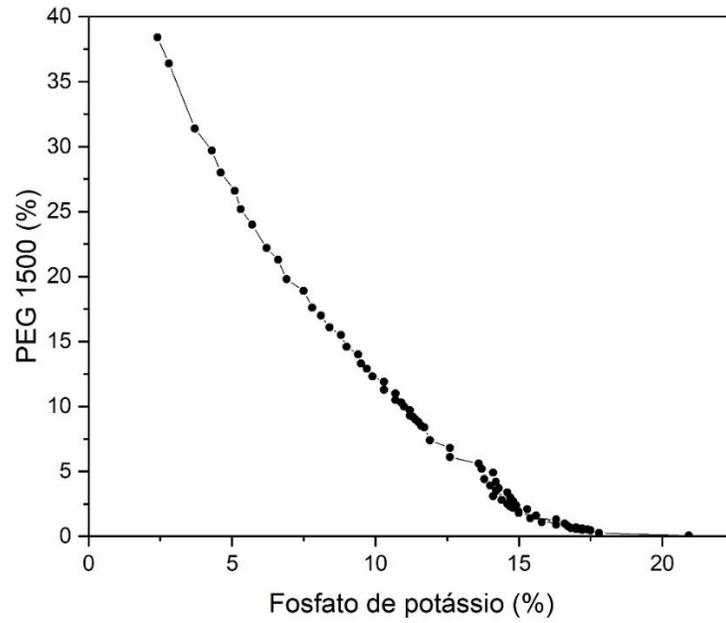
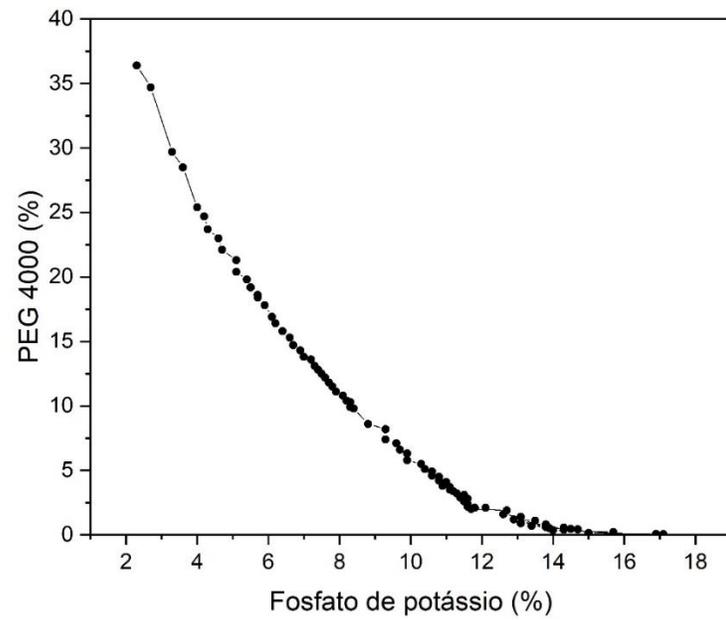


Figura 8.5 - Curva binodal para PEG 1500 e fosfato de potássio pH 9,0.



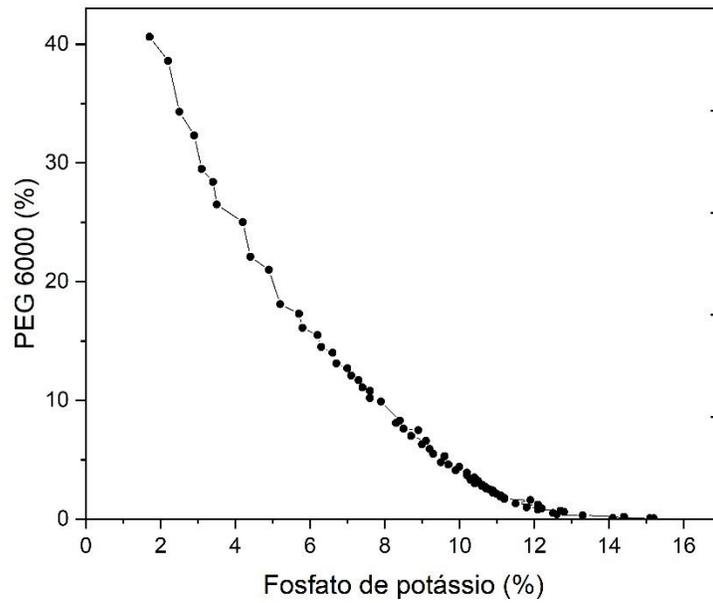
Fonte: Minami, 1997

Figura 8.6 - Curva binodal para PEG 4000 e fosfato de potássio pH 9,0.



Fonte: Minami, 1997

Figura 8.7 - Curva binodal para PEG 6000 e fosfato de potássio pH 9,0.



Fonte: Minami, 1997

Figura 8.8 - Curva binodal para PEG 8000 e fosfato de potássio pH 9,0.

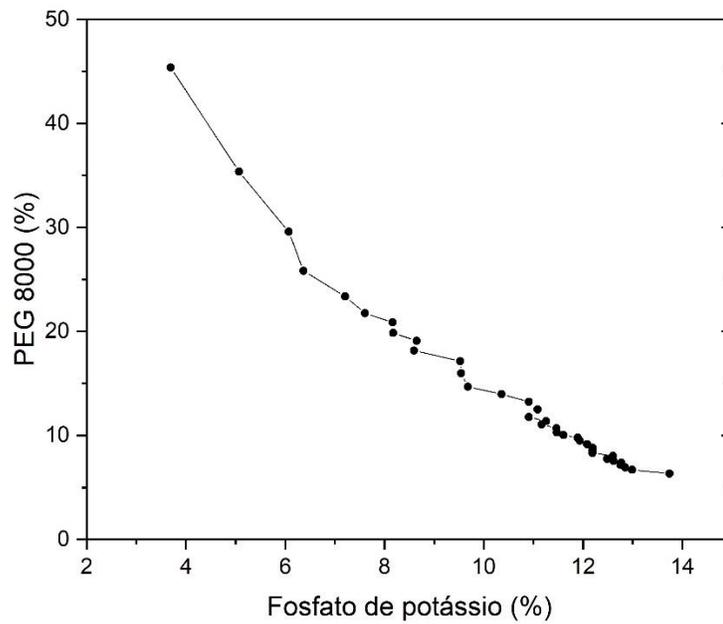


Figura 8.9 - Curva binodal para PEG 1500 e citrato de sódio pH 9,0.

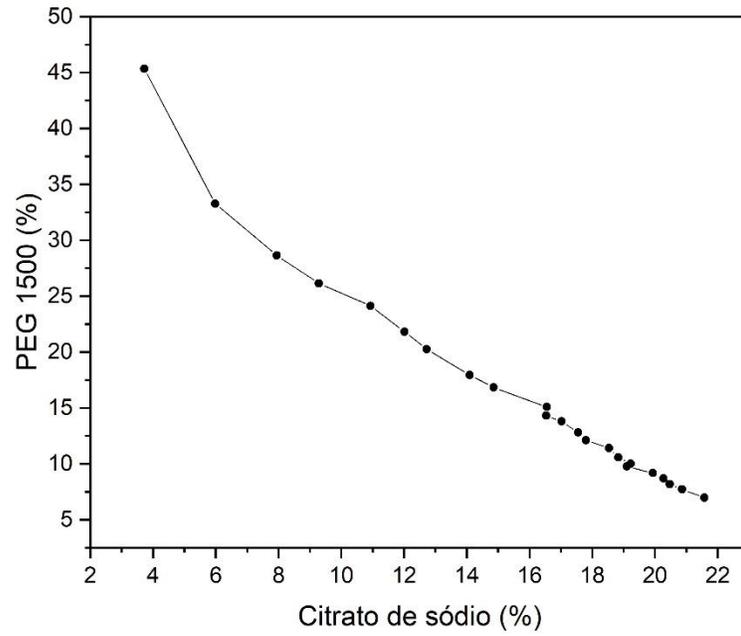


Figura 8.10 - Curva binodal para PEG 4000 e citrato de sódio pH 9,0.

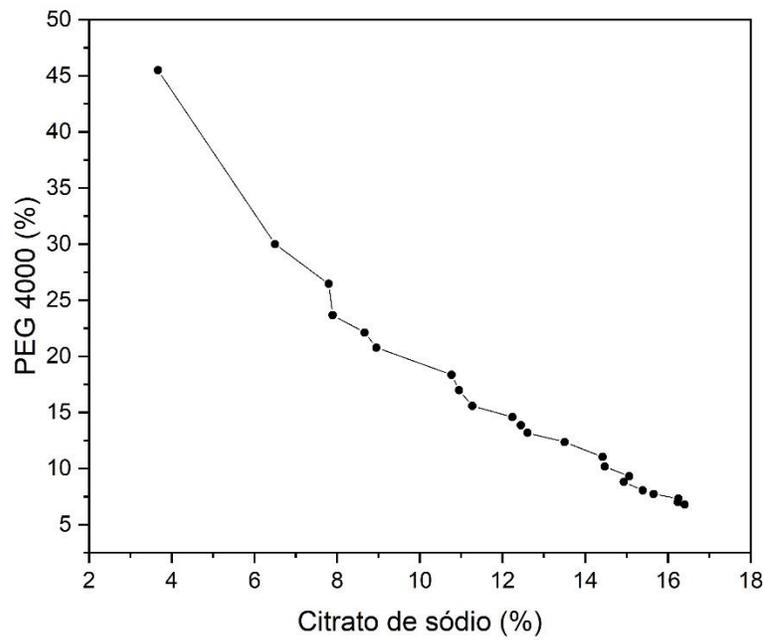


Figura 8.11 - Curva binodal para PEG 6000 e citrato de sódio pH 9,0.

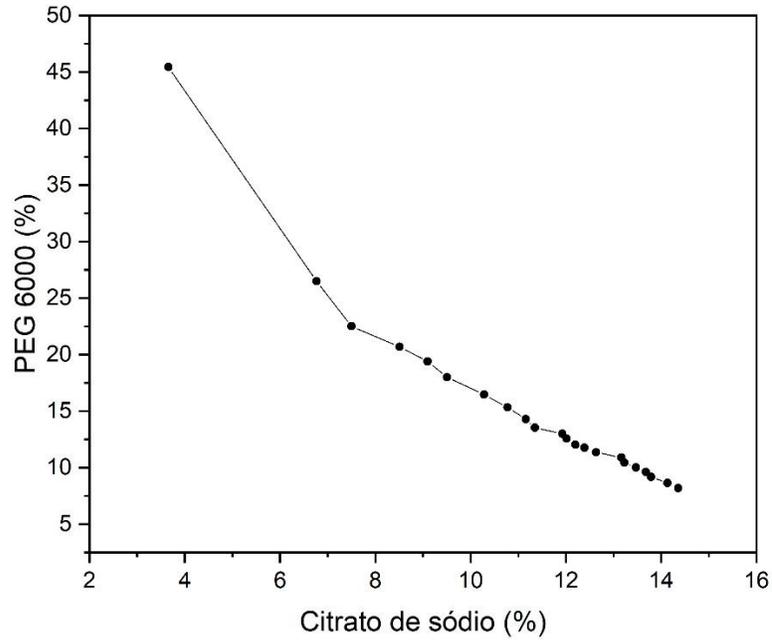


Figura 8.12 - Curva binodal para PEG 8000 e citrato de sódio pH 9,0.

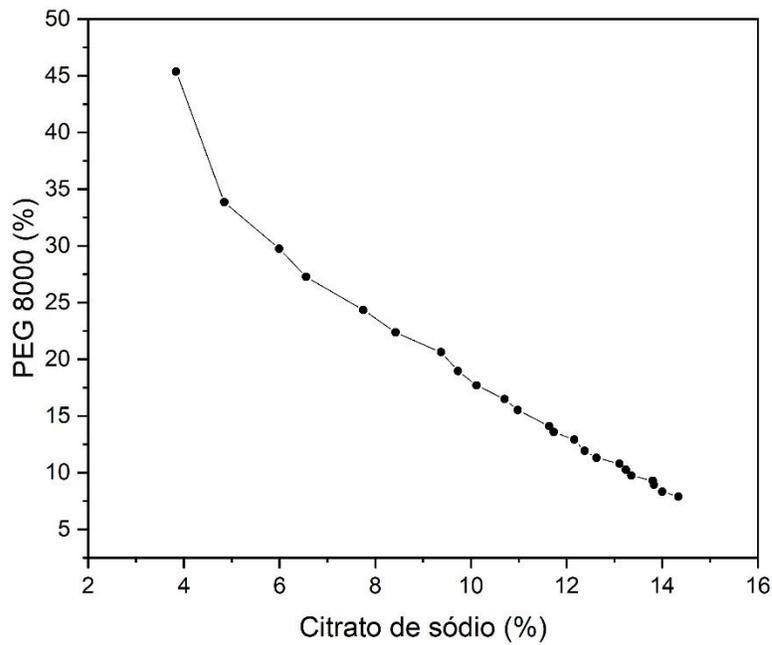


Figura 8.13 - Fluxograma da separação das proteínas de *S. platensis* com SAB PEG/sal.

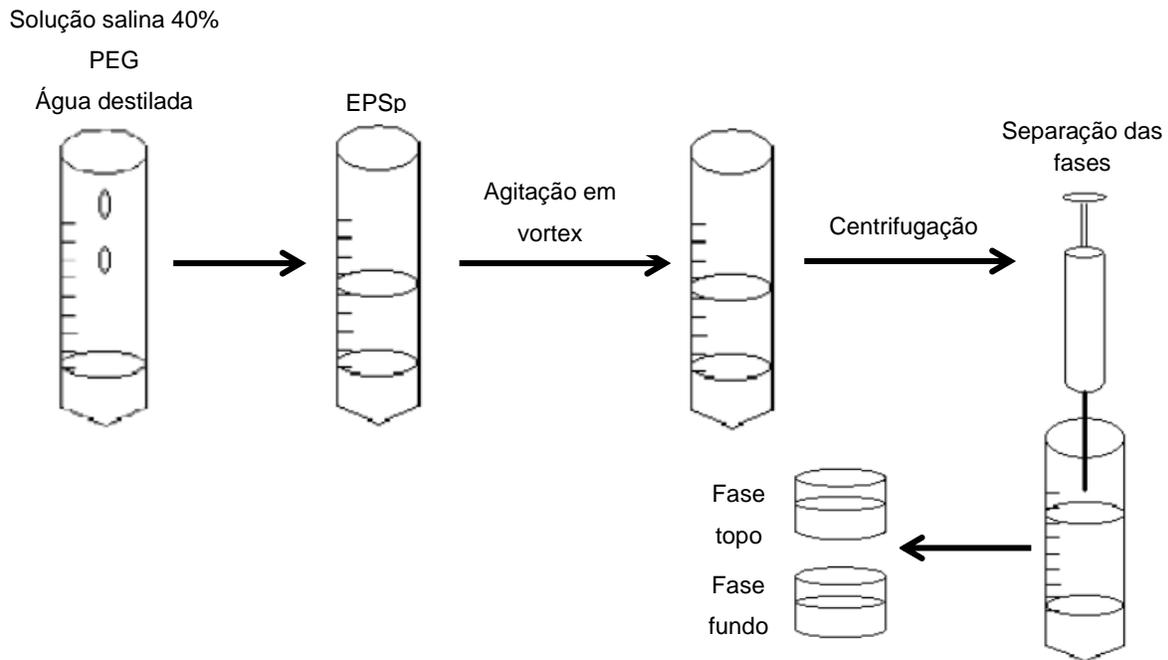


Figura 8.14 - Comparação entre as retrodispersões (RD) das emulsões elaboradas com as amostras biomassa de *S. platensis*, concentrado e permeado do PSM, fases topo e fundo do SAB e concentrado do SAB/PSM, em pH 4,0 (a) e 7,0 (b).

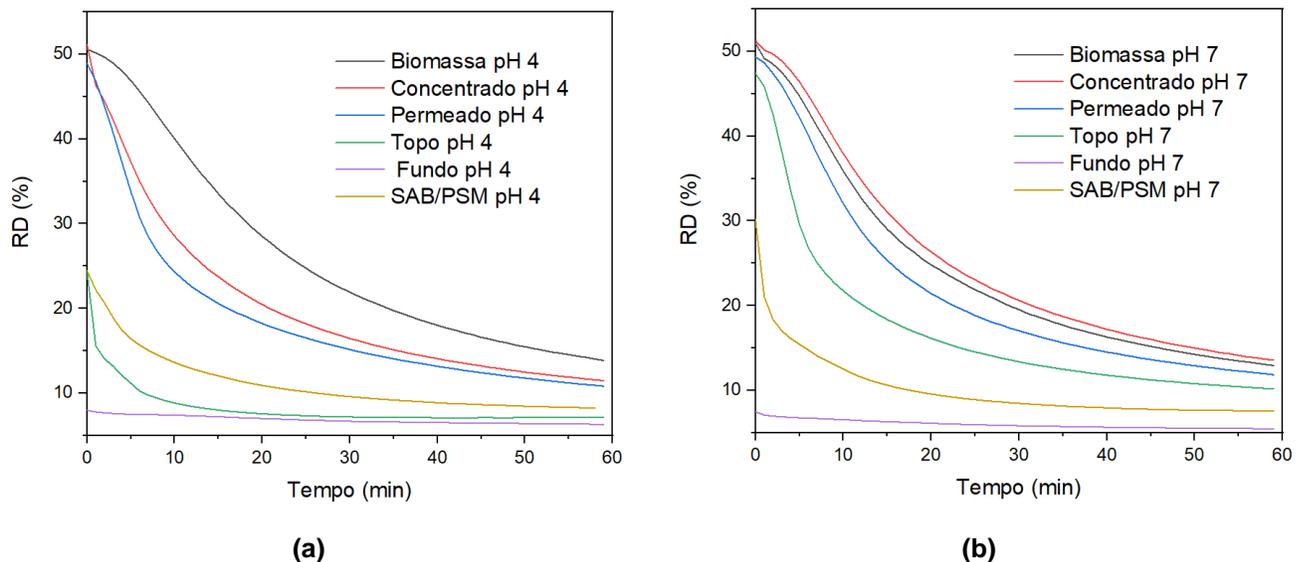


Tabela 8.1 - Matriz do DCCR 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados) para purificação de proteínas de *S. platensis* com SAB composto por fosfato de potássio e etanol com as respostas FP e RE para fase fundo.

Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis dependentes	
	Fosfato de potássio (%)	Etanol (%)	FP	RE (%)
1	-1 (14)	-1 (26)	0,39 ± 0,03	1,68 ± 0,13
2	+1 (19)	-1 (26)	0,41 ± 0,04	8,82 ± 0,83
3	-1 (14)	+1 (30)	0,38 ± 0,01	3,93 ± 0,12
4	+1 (19)	+1 (30)	0,44 ± 0,00	9,67 ± 0,01
5	-1,41 (12,98)	0 (28)	0,54 ± 0,02	2,33 ± 0,08
6	+1,41 (20,02)	0 (28)	0,74 ± 0,06	17,47 ± 1,48
7	0 (16,5)	-1,41 (25,18)	0,44 ± 0,01	6,08 ± 0,14
8	0 (16,5)	+1,41 (30,82)	0,44 ± 0,00	8,06 ± 0,04
9	0 (16,5)	0 (28)	0,42 ± 0,02	6,18 ± 0,29
10	0 (16,5)	0 (28)	0,42 ± 0,01	6,27 ± 0,12
11	0 (16,5)	0 (28)	0,43 ± 0,00	6,67 ± 0,00

Tabela 8.2 - Matriz do DCCR 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados) para purificação de proteínas de *S. platensis* com SAB composto por citrato de sódio e etanol com as respostas FP e RE para fase fundo.

Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis dependentes	
	Citrato de sódio (%)	Etanol (%)	FP	RE (%)
1	-1 (17,5)	-1 (29)	0,31 ± 0,01	4,31 ± 0,10
2	+1 (19,5)	-1 (29)	0,58 ± 0,01	17,21 ± 0,18
3	-1 (17,5)	+1 (31)	0,64 ± 0,01	15,07 ± 0,27
4	+1 (19,5)	+1 (31)	0,67 ± 0,03	19,11 ± 0,89
5	-1,41 (17,09)	0 (30)	0,69 ± 0,01	12,63 ± 0,14
6	+1,41 (19,91)	0 (30)	0,64 ± 0,00	18,40 ± 0,07
7	0 (18,5)	-1,41 (28,59)	0,74 ± 0,01	5,79 ± 0,07
8	0 (18,5)	+1,41 (31,41)	0,62 ± 0,00	15,74 ± 0,05
9	0 (18,5)	0 (30)	0,62 ± 0,00	16,61 ± 0,04
10	0 (18,5)	0 (30)	0,64 ± 0,01	16,74 ± 0,26
11	0 (18,5)	0 (30)	0,61 ± 0,01	15,85 ± 0,15

Tabela 8.3 - Coeficientes de regressão do DCCR 2<sup>2</sup> para avaliação das respostas obtidas pela fase topo do SAB composto por fosfato de potássio e etanol.

Fatores	FP				RE (%)			
	C.R.	E.P.	t(5)	p-valor	C.R.	E.P.	t(5)	p-valor
<b>Média</b>	1,08*	0,03*	33,70*	0,0001*	72,91*	1,88*	38,82*	0,0001*
<b>x<sub>1</sub> (L)</b>	0,13*	0,02*	6,59*	0,0012*	0,03	1,15	0,02	0,9815
<b>x<sub>1</sub> (Q)</b>	-0,01	0,02	-0,30	0,7759	-0,20	1,37	-0,15	0,8881
<b>x<sub>2</sub> (L)</b>	-0,01	0,02	-0,62	0,5596	-2,34*	1,15*	-2,03*	0,0976*
<b>x<sub>2</sub> (Q)</b>	0,02	0,02	0,83	0,4461	1,35	1,37	0,98	0,3700
<b>x<sub>1</sub>.x<sub>2</sub></b>	0,01	0,03	0,37	0,7262	2,72	1,63	1,67	0,1549

x<sub>1</sub>: Fosfato de potássio (%); x<sub>2</sub>: Álcool etílico (%); L: termos lineares; Q: termos quadráticos; C.R.: Coeficientes de Regressão; E.P.: Erro Padrão; \*p ≤ 0,10.

Tabela 8.4 - Coeficientes de regressão do DCCR 2<sup>2</sup> para avaliação das respostas obtidas pela fase topo do SAB composto por citrato de sódio e etanol.

Fatores	FP				R (%)			
	C.R.	E.P.	t(5)	p-valor	C.R.	E.P.	t(5)	p-valor
<b>Média</b>	0,95	0,06	15,31	0,0001*	54,59*	2,72*	20,05*	0,0001*
<b>x<sub>1</sub> (L)</b>	0,12	0,04	3,14	0,0258*	3,23	1,67	1,93	0,1109
<b>x<sub>1</sub> (Q)</b>	0,01	0,05	0,24	0,8220	0,87	1,99	0,44	0,6807
<b>x<sub>2</sub> (L)</b>	-0,04	0,04	-1,13	0,3095	-7,03*	1,67*	-4,21*	0,0084*
<b>x<sub>2</sub> (Q)</b>	0,03	0,05	0,76	0,4819	6,29*	1,99*	3,16*	0,0252*
<b>x<sub>1</sub>.x<sub>2</sub></b>	-0,05	0,05	-0,93	0,3949	-2,21	2,36	-0,94	0,3926

x<sub>1</sub>: Citrato de sódio (%); x<sub>2</sub>: Álcool etílico (%); L: termos lineares; Q: termos quadráticos; C.R.: Coeficientes de Regressão; E.P.: Erro Padrão; \*p ≤ 0,10.

Tabela 8.5 - ANOVA para os modelos quadráticos para predição das respostas fator de purificação e recuperação para fase topo do SAB fosfato de potássio e etanol.

Fonte de Variação	FP fase topo						
	SQ	GL	QM	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>	R <sup>2</sup> (%)	p - valor
<b>Regressão</b>	0,14	1	0,13	59,91	3,36	86,94	0,0001
<b>Resíduos</b>	0,2	9	0,02				
<b>Total</b>	0,15	10					
	RE fase topo (%)						
<b>Regressão</b>	43,78	1	43,78	4,15	3,36	31,54	0,0722
<b>Resíduos</b>	95,03	9	10,56				
<b>Total</b>	138,81	10					

SQ: soma de quadrados; GL: graus de liberdade; QM: quadrados médios.

Tabela 8.6. ANOVA para os modelos quadráticos para predição das respostas de fator de purificação e recuperação para fase topo do SAB citrato de sódio e etanol.

Fonte de Variação	FP fase topo						
	SQ	GL	QM	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>	R <sup>2</sup> (%)	p - valor
Regressão	0,11	1	0,11	11,47	3,36	56,03	0,0080
Resíduos	0,09	9	0,01				
<b>Total</b>	<b>0,20</b>	<b>10</b>					
	RE fase topo (%)						
Regressão	700,00	3	233,33	12,11	3,07	83,84	0,0037
Resíduos	134,89	7	19,27				
<b>Total</b>	<b>834,89</b>	<b>10</b>					

SQ: soma de quadrados; GL: graus de liberdade; QM: quadrados médios.

Tabela 8.7 - Matriz do PF 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados) para concentração de proteínas de *S. platensis* com SAB PEG/fosfato de potássio com as respostas de FP e RE (%) para fase fundo.

<b>SAB PEG 1500/fosfato de potássio</b>				
<b>Ensaio</b>	<b>Variáveis independentes</b>		<b>Variáveis dependentes</b>	
	<b>Fosfato de potássio (%)</b>	<b>PEG 1500 (%)</b>	<b>FP</b>	<b>RE (%)</b>
1	-1 (14)	-1 (15)	0,55 ± 0,00	6,01 ± 0,03
2	+1 (20)	-1 (15)	0,61 ± 0,01	25,36 ± 0,34
3	-1 (14)	+1 (25)	0,59 ± 0,00	10,26 ± 0,02
4	+1 (20)	+1 (25)	0,45 ± 0,00	18,45 ± 0,05
5	0 (17)	0 (20)	0,66 ± 0,01	19,43 ± 0,16
6	0 (17)	0 (20)	0,63 ± 0,04	19,31 ± 1,16
7	0 (17)	0 (20)	0,64 ± 0,00	18,97 ± 0,07

<b>SAB PEG 4000/fosfato de potássio</b>				
<b>Ensaio</b>	<b>Variáveis independentes</b>		<b>Variáveis dependentes</b>	
	<b>Fosfato de potássio (%)</b>	<b>PEG 4000 (%)</b>	<b>FP</b>	<b>RE (%)</b>
1	-1 (11)	-1 (15)	0,75 ± 0,01	12,97 ± 0,15
2	+1 (17)	-1 (15)	0,71 ± 0,01	31,05 ± 0,62
3	-1 (11)	+1 (25)	0,88 ± 0,00	18,84 ± 0,05
4	+1 (17)	+1 (25)	0,74 ± 0,00	31,91 ± 0,15
5	0 (14)	0 (20)	0,76 ± 0,01	29,87 ± 0,31
6	0 (14)	0 (20)	0,80 ± 0,01	32,51 ± 0,35
7	0 (14)	0 (20)	0,77 ± 0,00	30,22 ± 0,12

<b>SAB PEG 6000/fosfato de potássio</b>				
<b>Ensaio</b>	<b>Variáveis independentes</b>		<b>Variáveis dependentes</b>	
	<b>Fosfato de potássio (%)</b>	<b>PEG 6000 (%)</b>	<b>FP</b>	<b>RE (%)</b>
1	-1 (9,0)	-1 (13)	0,64 ± 0,00	7,19 ± 0,04
2	+1 (15)	-1 (13)	0,78 ± 0,03	35,64 ± 1,58
3	-1 (9,0)	+1 (23)	0,66 ± 0,01	6,87 ± 0,10
4	+1 (15)	+1 (23)	0,73 ± 0,04	31,87 ± 1,56
5	0 (12)	0 (18)	0,84 ± 0,01	28,41 ± 0,28
6	0 (12)	0 (18)	0,85 ± 0,02	28,82 ± 0,55
7	0 (12)	0 (18)	0,85 ± 0,01	28,60 ± 0,17

<b>SAB PEG 8000/fosfato de potássio</b>				
<b>Ensaio</b>	<b>Variáveis independentes</b>		<b>Variáveis dependentes</b>	
	<b>Fosfato de potássio (%)</b>	<b>PEG 8000 (%)</b>	<b>FP</b>	<b>RE (%)</b>
1	-1 (10)	-1 (18)	0,61 ± 0,00	9,21 ± 0,03
2	+1 (14)	-1 (18)	0,59 ± 0,00	23,09 ± 1,11
3	-1 (10)	+1 (26)	0,60 ± 0,00	11,65 ± 0,08
4	+1 (14)	+1 (26)	0,59 ± 0,01	23,16 ± 0,20
5	0 (12)	0 (22)	0,67 ± 0,00	23,28 ± 0,11
6	0 (12)	0 (22)	0,68 ± 0,01	23,62 ± 0,29
7	0 (12)	0 (22)	0,65 ± 0,00	22,83 ± 0,17

Tabela 8.8 - Matriz do PF 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados) para concentração de proteínas de *S. platensis* com SAB PEG/citrato de sódio com as respostas de FP e RE (%) para fase fundo.

<b>SAB PEG 1500/citrato de sódio</b>				
<b>Ensaio</b>	<b>Variáveis independentes</b>		<b>Variáveis dependentes</b>	
	<b>Citrato de sódio (%)</b>	<b>PEG 1500 (%)</b>	<b>FP</b>	<b>RE (%)</b>
1	-1 (16)	-1 (18)	0,79 ± 0,00	1,71 ± 0,00
2	+1 (20)	-1 (18)	0,71 ± 0,01	17,06 ± 0,19
3	-1 (16)	+1 (28)	0,43 ± 0,00	8,50 ± 0,02
4	+1 (20)	+1 (28)	0,56 ± 0,02	17,92 ± 0,70
5	0 (18)	0 (23)	0,60 ± 0,05	13,90 ± 1,23
6	0 (18)	0 (23)	0,62 ± 0,00	14,10 ± 0,04
7	0 (18)	0 (23)	0,63 ± 0,01	14,31 ± 0,20

<b>SAB PEG 4000/citrato de sódio</b>				
<b>Ensaio</b>	<b>Variáveis independentes</b>		<b>Variáveis dependentes</b>	
	<b>Citrato de sódio (%)</b>	<b>PEG 4000 (%)</b>	<b>FP</b>	<b>RE (%)</b>
1	-1 (10)	-1 (18)	0,71 ± 0,00	3,69 ± 0,02
2	+1 (16)	-1 (18)	0,80 ± 0,01	31,37 ± 0,40
3	-1 (10)	+1 (28)	0,55 ± 0,00	5,46 ± 0,03
4	+1 (16)	+1 (28)	0,36 ± 0,01	9,37 ± 0,20
5	0 (13)	0 (23)	0,47 ± 0,00	6,19 ± 0,01
6	0 (13)	0 (23)	0,47 ± 0,01	6,49 ± 0,10
7	0 (13)	0 (23)	0,44 ± 0,00	6,07 ± 0,00

<b>SAB PEG 6000/citrato de sódio</b>				
<b>Ensaio</b>	<b>Variáveis independentes</b>		<b>Variáveis dependentes</b>	
	<b>Citrato de sódio (%)</b>	<b>PEG 6000 (%)</b>	<b>FP</b>	<b>RE (%)</b>
1	-1 (10)	-1 (22)	0,59 ± 0,01	5,09 ± 0,09
2	+1 (14)	-1 (22)	0,73 ± 0,00	14,28 ± 0,06
3	-1 (10)	+1 (28)	0,61 ± 0,01	9,86 ± 0,17
4	+1 (14)	+1 (28)	0,56 ± 0,05	13,02 ± 1,05
5	0 (12)	0 (25)	0,72 ± 0,00	9,36 ± 0,03
6	0 (12)	0 (25)	0,70 ± 0,01	9,70 ± 0,21
7	0 (12)	0 (25)	0,72 ± 0,04	9,43 ± 0,48

<b>SAB PEG 8000/citrato de sódio</b>				
<b>Ensaio</b>	<b>Variáveis independentes</b>		<b>Variáveis dependentes</b>	
	<b>Citrato de sódio (%)</b>	<b>PEG 8000 (%)</b>	<b>FP</b>	<b>RE (%)</b>
1	-1 (10)	-1 (22)	0,43 ± 0,01	6,57 ± 0,18
2	+1 (14)	-1 (22)	0,65 ± 0,03	25,33 ± 1,14
3	-1 (10)	+1 (28)	0,48 ± 0,00	9,36 ± 0,05
4	+1 (14)	+1 (28)	0,53 ± 0,00	20,74 ± 0,17
5	0 (12)	0 (25)	0,56 ± 0,00	19,37 ± 0,10
6	0 (12)	0 (25)	0,58 ± 0,00	20,10 ± 0,04
7	0 (12)	0 (25)	0,61 ± 0,00	21,46 ± 0,08

Tabela 8.9 - Matriz do DCCR 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados) para concentração de proteínas de *S. platensis* com SAB PEG 1500/fosfato de potássio e as respostas de FP e RE (%) para fase fundo.

Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis dependentes	
	Fosfato de potássio (%)	PEG 1500 (%)	FP	RE (%)
1	-1 (14)	-1 (15)	0,55 ± 0,00	6,01 ± 0,03
2	+1 (20)	-1 (15)	0,61 ± 0,01	25,36 ± 0,34
3	-1 (14)	+1 (25)	0,59 ± 0,00	10,26 ± 0,02
4	+1 (20)	+1 (25)	0,45 ± 0,00	18,45 ± 0,05
5	-1,41 (12,77)	0 (20)	0,55 ± 0,00	7,11 ± 0,03
6	+1,41 (21,23)	0 (20)	0,64 ± 0,00	29,14 ± 0,22
7	0 (17)	-1,41 (13,95)	0,84 ± 0,01	24,43 ± 0,26
8	0 (17)	+1,41 (27,05)	0,72 ± 0,01	27,92 ± 0,47
9	0 (17)	0 (20)	0,66 ± 0,01	19,43 ± 0,16
10	0 (17)	0 (20)	0,63 ± 0,04	19,31 ± 1,16
11	0 (17)	0 (20)	0,64 ± 0,00	18,97 ± 0,07

Tabela 8.10 - Matriz do DCCR 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados) para concentração de proteínas de *S. platensis* com SAB PEG 1500/citrato de sódio e as respostas de FP e RE (%) para fase fundo.

Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis dependentes	
	Citrato de sódio (%)	PEG 1500 (%)	FP	RE (%)
1	-1 (16)	-1 (18)	0,79 ± 0,00	1,71 ± 0,00
2	+1 (20)	-1 (18)	0,71 ± 0,01	17,06 ± 0,19
3	-1 (16)	+1 (28)	0,43 ± 0,00	8,50 ± 0,02
4	+1 (20)	+1 (28)	0,56 ± 0,02	17,92 ± 0,70
5	-1,41 (15,18)	0 (23)	0,48 ± 0,00	6,32 ± 0,07
6	+1,41 (20,82)	0 (23)	0,69 ± 0,04	27,42 ± 1,51
7	0 (18)	-1,41 (15,95)	0,66 ± 0,01	11,19 ± 0,14
8	0 (18)	+1,41 (30,05)	0,42 ± 0,01	10,89 ± 0,15
9	0 (18)	0 (23)	0,60 ± 0,05	13,90 ± 1,23
10	0 (18)	0 (23)	0,62 ± 0,00	14,10 ± 0,04
11	0 (18)	0 (23)	0,63 ± 0,01	14,31 ± 0,20

Tabela 8.11 - Coeficientes de regressão do DCCR 2<sup>2</sup> para avaliação das respostas obtidas pela fase topo do SAB composto por fosfato de potássio e PEG 1500.

Fatores	FP				RE (%)			
	C.R.	E.P.	t(5)	p-valor	C.R.	E.P.	t(5)	p-valor
<b>Média</b>	1,33*	0,05*	26,38*	0,0001*	62,80*	2,67*	23,55*	0,0001*
<b>x<sub>1</sub> (L)</b>	0,24*	0,03*	7,71*	0,0006*	-6,40*	1,64*	-3,91*	0,0113*
<b>x<sub>1</sub> (Q)</b>	0,06	0,04	1,70	0,1505	1,98	1,95	1,01	0,3575
<b>x<sub>2</sub> (L)</b>	0,05	0,03	1,50	0,1930	-0,26	1,64	-0,16	0,8786
<b>x<sub>2</sub> (Q)</b>	-0,04	0,04	-1,21	0,2803	-3,15	1,95	-1,61	0,1675
<b>x<sub>1</sub>.x<sub>2</sub></b>	0,01	0,04	0,14	0,8940	3,60	2,31	1,56	0,1798

x<sub>1</sub>: Fosfato de potássio (%); x<sub>2</sub>: PEG 1500 (%); L: termos lineares; Q: termos quadráticos; C.R.: Coeficientes de Regressão; E.P.: Erro Padrão; \*p ≤ 0,10.

Tabela 8.12 - Coeficientes de regressão do DCCR 2<sup>2</sup> para avaliação das respostas obtidas pela fase topo do SAB composto por citrato de sódio e PEG 1500.

Fatores	FP				RE (%)			
	C.R.	E.P.	t(5)	p-valor	C.R.	E.P.	t(5)	p-valor
<b>Média</b>	1,20	0,05	25,33	0,0001*	66,67	0,96	69,33	0,0001*
<b>x<sub>1</sub> (L)</b>	0,13	0,03	4,30	0,0077*	-4,48	0,59	-7,59	0,0006*
<b>x<sub>1</sub> (Q)</b>	0,04	0,03	1,12	0,3117	-0,42	0,70	-0,60	0,5723
<b>x<sub>2</sub> (L)</b>	0,10	0,03	3,33	0,0209*	-0,02	0,59	-0,04	0,9710
<b>x<sub>2</sub> (Q)</b>	-0,03	0,03	-0,81	0,4539	0,48	0,70	0,68	0,5296
<b>x<sub>1</sub>.x<sub>2</sub></b>	0,01	0,04	0,21	0,8445	1,66	0,83	1,99	0,1031*

x<sub>1</sub>: Citrato de sódio (%); x<sub>2</sub>: PEG 1500 (%); L: termos lineares; Q: termos quadráticos; C.R.: Coeficientes de Regressão; E.P.: Erro Padrão; \*p ≤ 0,10.

Tabela 8.13 - ANOVA para os modelos quadráticos para predição das respostas de PP, FP e RE para fase topo do SAB fosfato de potássio e PEG 1500.

Fonte de Variação	FP fase topo						
	SQ <sup>a</sup>	GL <sup>b</sup>	QM <sup>c</sup>	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>	R <sup>2</sup> (%)	p - valor
<b>Regressão</b>	0,45	1	0,45	40,13	3,36	81,68	0,0001
<b>Resíduos</b>	0,10	9	0,01				
<b>Total</b>	0,56	10					
	RE fase topo (%)						
<b>Regressão</b>	326,59	1	326,59	11,05	3,36	55,12	0,0088
<b>Resíduos</b>	265,96	9	29,55				
<b>Total</b>	592,55	10					

SQ: soma de quadrados; GL: graus de liberdade; QM: quadrados médios.

Tabela 8.14 - ANOVA para os modelos quadráticos para predição das respostas de PP, FP e RE para fase topo do SAB citrato de sódio e PEG 1500.

Fonte de Variação	FP fase topo						
	SQ <sup>a</sup>	GL <sup>b</sup>	QM <sup>c</sup>	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>	R <sup>2</sup> (%)	p - valor
Regressão	0,20	2	0,10	15,30	3,11	79,28	0,0018
Resíduos	0,05	8	0,01				
<b>Total</b>	<b>0,25</b>	<b>10</b>					
	RE fase topo (%)						
Regressão	170,77	2	85,39	39,99	3,11	90,91	0,0001
Resíduos	17,08	8	2,14				
<b>Total</b>	<b>187,86</b>	<b>10</b>					

SQ: soma de quadrados; GL: graus de liberdade; QM: quadrados médios.