



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE FICOBILIPROTEÍNAS DE
CIANOBACTÉRIAS E PURIFICAÇÃO POR SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

Arthur Godoy Cottas

Uberlândia – MG
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE FICOBILIPROTEÍNAS DE
CIANOBACTÉRIAS E PURIFICAÇÃO POR SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

Arthur Godoy Cottas

Orientadora: **Prof^a. Dr^a Juliana de Souza
Ferreira**

Coorientador: **Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Uberlândia – MG
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C846a
2019 Cottas, Arthur Godoy, 1990-
Avaliação do processo de produção de ficobiliproteínas de
cianobactérias e purificação por sistemas aquosos bifásicos [recurso
eletrônico] / Arthur Godoy Cottas. - 2019.

Orientadora: Juliana de Souza Ferreira.
Coorientador: Eloízio Júlio Ribeiro.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.47> Inclui
bibliografia.
Inclui ilustrações.

1. Engenharia química. 2. Ficocianina. 3. *Anabaena variabilis*. 4.
Nostoc. 5. Cianobactéria. I. Ferreira, Juliana de Souza, 1975-, (Orient.).
II. Ribeiro, Eloízio Júlio, 1952-, (Coorient.). III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV.
Título.

CDU: 66.0

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ARTHUR GODOY COTTAS SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 15 DE FEVEREIRO DE 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Juliana de Souza Ferreira
Orientadora PPGEQ/UFU

Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro
Coorientador PPGEQ/UFU

Prof. Dr. Gustavo Araújo Teixeira
FEA/UFTM

Prof. Dr^a. Érika Ohta Watanabe
FEQUI/UFU

Prof. Dr. Danylo de Oliveira Silva
PPGEA/UFU

Prof^a. Dr^a. Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros
FEQUI/UFU

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio, amor incondicional, incentivo, confiança e educação. Agradeço por estarem ao meu lado em todos os momentos, pela compreensão e dedicação.

À Fernanda, minha namorada, pela compreensão, carinho, companhia e apoio nos momentos mais difíceis.

À minha orientadora, prof. Dr^a. Juliana de Souza Ferreira, pela confiança, oportunidade, paciência, pelos conhecimentos transmitidos, pelo incentivo e motivação durante todo o mestrado.

Aos Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro e Érika Ohta Watanabe pela cooperação e todas as sugestões que ajudaram no enriquecimento do trabalho.

Aos meus alunos de iniciação científica Larissa, Vitor e Warley, pela colaboração, auxílio, companhia, apoio, confiança e amizade durante esse período.

Aos meus colegas de mestrado: Amanda, Daniel, Jéssica, Marcelo, Janaína, Guilherme e Michele e aos colegas de laboratório: Felipe, Natália, Franz, William, Marília, Camila, Larysse, Letícia, Raquel, Marlon, Lidiane, Roseli, Fred, Flávia, Eduardo, Thamirys, Tamires, Carla, Olga, Higor, Ana Carolina, Caroline, Stella, Luís, Priscila, Igor, Antônio, Sophia, Nathiele, Layse, Sthela e Érica, que contribuíram direta ou indiretamente para meu crescimento profissional e pela amizade nestes anos.

Aos funcionários da FEQUI: Cecília, Ione, Roberta e Ulisses pela colaboração.

Ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade concedida.

SUMÁRIO

Capítulo 1. INTRODUÇÃO.....	11
Capítulo 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 CIANOBACTÉRIAS.....	13
2.2 FICOBILIPROTEÍNAS.....	14
2.3 MEIOS E PROCESSOS DE CULTIVO.....	16
2.4 EXTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE FBP.....	18
2.5 RECUPERAÇÃO POR SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS (SAB).....	19
2.6 FUNDAMENTO DA FORMAÇÃO DOS SAB.....	21
Capítulo 3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 MATERIAL.....	25
3.2 METODOLOGIA.....	25
3.2.1 Manutenção das cianobactérias.....	25
3.2.2 Análise do processo de extração de FBP.....	26
3.2.3 Estudo do processo de recuperação das FBP.....	29
3.2.4 Obtenção do diagrama de fase.....	30
3.2.5 Obtenção dos SAB.....	31
3.2.6. Avaliação do efeito da suplementação do meio com fonte de carbono e de nitrogênio na produção de FBP.....	33
3.2.7 Métodos analíticos.....	35
3.2.7.1 Concentração Celular.....	35
3.2.7.2 Concentração de açúcares.....	36
3.2.7.3 Concentração de FBP.....	36
3.2.7.4. Concentração de proteína total.....	37
Capítulo 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE FICOBILIPROTEÍNAS.....	38
4.1.1 Avaliação da melhor solução extratora de FBP de Nostoc sp.....	38
4.1.2 Avaliação do melhor método de extração.....	39
4.1.3 Avaliação da melhor razão sólido-líquido.....	46
4.2 ESTUDO DO PROCESSO DE RECUPERAÇÃO DAS FBP.....	47
4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO COM FONTE DE CARBONO E DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO FICOCIANINA POR CIANOBACTÉRIAS.....	55

4.3.1	Avaliação do efeito do tipo de fonte de carbono na suplementação do meio controle (BG11o).....	55
4.3.2	Avaliação do efeito da concentração de glicose e de nitrato de sódio na suplementação do meio controle (BG11o) no cultivo de Nostoc sp.	58
4.3.3	Avaliação do efeito da concentração de glicose e de nitrato de sódio na suplementação do meio controle (BG11o) no cultivo de Anabaena variabilis	63
	Capítulo 5. CONCLUSÕES E ETAPAS FUTURAS	67
5.1	CONCLUSÃO.....	67
5.2	ETAPAS FUTURAS.....	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
	APÊNDICE	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Estrutura do Ficobilissomo	15
Figura 2- Representação do diagrama de fases a uma dada temperatura e pH	21
Figura 3 – Câmara de fotoperíodo mantida a 30°C, luminosidade de 1.553 lux e fotoperíodo de 12 h	25
Figura 4 - Ensaio realizados usando as cianobactérias <i>Anabaena variabilis</i> e <i>Nostoc</i> sp.	26
Figura 5 - Fluxograma dos ensaios para avaliação do processo de extração das FBP.	27
Figura 6 - Fluxograma do processo de recuperação de FBP por SAB	30
Figura 7 - Procedimento para recuperação de FBP por SAB	32
Figura 8 - Concentração de FC extraída por cada solução extratora usando o método de rompimento mecânico por vórtex e choque de esferas de vidro. Água destilada (■), Tampão fosfato: pH 6,0 (■), pH 7,0 (■) e pH 8,0 (■).....	39
Figura 9 - Extratos obtidos pela cepa de <i>Nostoc</i> sp. pelos diferentes métodos de extração (a) antes e (b) após filtração e centrifugação a 10.000 rpm. 1 - Ciclos de Congelamento/descongelação; 2- Vórtex e esferas de vidro; 3- Almofariz e pistilo e 4- Homogeneizador ultrassônico	40
Figura 10 - Varredura espectral dos extratos obtidos para <i>Nostoc</i> sp.	41
Figura 11 - Extratos obtidos pela cepa de <i>Anabaena variabilis</i> pelos diferentes métodos de extração. 1 - Ciclos de Congelamento/descongelação; 2- Vórtex e esferas de vidro; 3- Almofariz e pistilo e 4- Homogeneizador ultrassônico	43
Figura 12 - Varredura espectral dos extratos obtidos para <i>Anabaena variabilis</i>	43
Figura 13 - Diagrama de fase PEG–sais a 15 ° C. PEG 1500-fosfato de potássio (□), PEG 1500-citrato de sódio (△), PEG 4000-fosfato de potássio (■) e PEG 4000-citrato de sódio (▲)....	47
Figura 14 - Extratos utilizados para purificação por SAB. 1- Extrato <i>A. variabilis</i> após ciclos de congelamento e descongelamento, 2- Extrato de <i>A. variabilis</i> após centrifugação e filtração; 3- Extrato de <i>Nostoc</i> sp. após os ciclos de congelamento e descongelamento; 4- Extrato de <i>Nostoc</i> sp. após centrifugação e filtração	49
Figura 15 - Efeito Vr em relação ao K-FC para <i>Anabaena variabilis</i> . PEG 1500-fosfato de K (●), PEG-4000-fosfato de K (◆), PEG 1500-citrato de Na (■) e PEG 4000-citrato de Na (▲)	52
Figura 16 - Efeito Vr em relação ao K-FC para <i>Nostoc</i> sp. PEG 1500-FP (●), PEG-4000-FP (◆), PEG 1500-CS (■) e PEG 4000 (▲).....	54

Figura 17 - Perfil de concentração celular para diferentes meios: BG11o, BG11o suplementado com glicose (2 g/L) e BG11o suplementado com permeado de soro de leite (teor de lactose, 2 g/L). Controle (◆), PSL (▲), Glicose (■).....	56
Figura 18 - Obtenção de FC para meios com adição de fonte de carbono orgânico para <i>Nostoc</i> sp. Controle (■), Permeado (■) e Glicose (■).....	57
Figura 19 - Perfil de consumo de açúcar para diferentes meios: BG11o, BG11o suplementado com glicose (2 g/L) e BG11o suplementado com permeado de soro de leite (teor de lactose, 2 g/L). Lactose (▲), Glicose(■).....	58
Figura 20 - Crescimento celular pela suplementação de fonte de nitrogênio e glicose para <i>Nostoc</i> sp. para inóculo de 10% (v/v). Controle (◆), Glicose 2 g/L (■), Nitrato 2 mM (△), Glicose 2 g/L + Nitrato 2 mM (■), Glicose 5 g/L + Nitrato 2 mM (*), Glicose 2 g/L + Nitrato 5 mM (●)	59
Figura 21 - Obtenção de FC para os ensaios com suplementação de fonte de nitrogênio e glicose para <i>Nostoc</i> sp. com inóculo de 10% (v/v) para 14 dias de cultivo. Controle (■), Glicose 2 g/L (■), Nitrato 2 mM (■), Glicose 2 g/L+ Nitrato 2 mM (■), Glicose 2 g/L + Nitrato 5 mM (■)	60
Figura 22 - Crescimento celular pela suplementação de fonte de nitrogênio e glicose para <i>Nostoc</i> sp. para inóculo de 20% (v/v). Controle (◆), Nitrato 2 mM (△), Glicose 2 g/L + Nitrato 2 mM (■), Glicose 5 g/L + Nitrato 5 mM (●).....	61
Figura 23 - Concentração de FC para os ensaios com suplementação de fonte de nitrogênio e glicose para <i>Nostoc</i> sp. com inóculo de 20% (v/v) em 14 dias. Controle (■), Nitrato 2 mM (■), Glicose 2 g/L + Nitrato 2 mM (■), Glicose 5 g/L + Nitrato 5 mM (■).....	62
Figura 24 - Crescimento celular pela suplementação de fonte de nitrogênio e glicose para <i>Anabaena variabilis</i> para inóculo de 20% (v/v). Controle (◆), Nitrato 2 mM (△), Glicose 2 g/L (■), Glicose 2 g/L + Nitrato 2 mM (■), Glicose 2 g/L + Nitrato 5 mM (●), Glicose 5 g/L + Nitrato 2 mM (▲).....	64
Figura 25 - Concentração de FC para os ensaios com suplementação de fonte de nitrogênio e glicose para <i>Anabaena variabilis</i> com inóculo de 20% em 10 dias. Controle (■), Nitrato 2 mM (■), Glicose 2 g/L (■), Glicose 2 g/L + Nitrato 5 mM (■)	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições experimentais dos ensaios para avaliação dos métodos de extração	28
Tabela 2 - Razões sólido-líquido para extração de FC de <i>Nostoc</i> sp. por ciclo de congelamento e descongelamento em banho ultrassônico.....	29
Tabela 3 - Composições dos SABs PEG 1500-sais e PEG 4000-sais.....	31
Tabela 4 - Suplementação ao meio basal com açúcar e/ou NaNO ₃ durante fermentação por <i>Nostoc</i> sp. 10% (v/v), 30 °C,	34
Tabela 5 - Suplementação ao meio de cultivo utilizando fonte de carbono e/ou nitrato para <i>Nostoc</i> sp. 20% (v/v)	34
Tabela 6 - Suplementação ao meio de cultivo utilizando fonte de carbono e/ou nitrato para <i>Nostoc</i> sp. 20% (v/v)	35
Tabela 7 - Pureza obtida do extrato da <i>Nostoc</i> sp.....	42
Tabela 8 - Concentração total de proteínas para cada extrato medida por Bradford.....	42
Tabela 9 - Pureza e concentração obtida dos extratos da <i>Anabaena variabilis</i>	44
Tabela 10 - Concentração de proteínas totais em cada extrato para <i>Anabaena variabilis</i>	44
Tabela 11 - Concentração de FC obtidas nas diferentes razões S/L.....	46
Tabela 12 - Concentração e pureza de FC dos extratos iniciais utilizados para separação por SAB	49
Tabela 13 - 1ª Proporção SAB para extrato de <i>A. variabilis</i> (13% PEG e 14% sal).....	49
Tabela 14 - 2ª Proporção SAB para extrato de <i>A. variabilis</i> (10% PEG e 15,9% sal).....	50
Tabela 15 - 3ª Proporção SAB para extrato de <i>A. variabilis</i> (20% PEG e 9,9% sal).....	50
Tabela 16 - 1ª Proporção SAB para extrato de <i>Nostoc</i> sp. (13% PEG e 14% sal).....	52
Tabela 17 - 2ª Proporção SAB para extrato de <i>Nostoc</i> sp. (10% PEG e 15,9% sal).....	53
Tabela 18 - 3ª Proporção SAB para extrato de <i>Nostoc</i> sp. (20% PEG e 9,9% sal).....	53
Tabela 19 - Consolidado para avaliação do meio de cultivo para <i>Nostoc</i> sp.	63
Tabela 20 - Consolidado para avaliação do meio de cultivo para <i>Anabaena variabilis</i>	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Diferentes condições de metabolismo celular	17
Quadro 2 - Vantagens e desvantagens de diferentes métodos de extração de FBP.....	18
Quadro 3 - Exemplos de componentes formadores de SAB	20

SIMBOLOGIA E ABREVIATURAS

Ficobiliproteínas – FBP

Ficoeritrina – FE

Ficocianina – FC

Aloficocianina – AFC

Ficoeritricocianina – FEC

Sistema Aquoso Bifásico – SAB

Polietilenoglicol – PEG

Coefficiente de Partição – K

Recuperação – R (%)

Razão volumétrica entre as fases – V_r

RESUMO

As cianobactérias, conhecidas como algas azuis e verdes, são um grupo de microrganismos autótrofos fotossintetizantes. Elas são capazes de produzir uma diversidade de compostos bioativos, podendo ser metabólitos, como compostos antibacterianos, anticoagulantes, anti-inflamatórios, antivirais, antitumorais e citotóxicos ou compostos pigmentados, como clorofila a, b e c, beta-caroteno e ficobiliproteínas (FBP). Dentre os compostos pigmentados destacam-se as FBP, que são um conjunto de proteínas pigmentadas, hidrossolúveis e fluorescentes, com aplicações na indústria de alimentos como corantes naturais e na indústria farmacêutica como marcadores fluorescentes em diagnósticos de doenças. A principal FBP encontrada nas cianobactérias é a ficocianina (FC). Seu processo de obtenção é baseado em três etapas, representadas por cultivo, extração e recuperação/purificação. O presente trabalho foi um estudo que abordou as etapas de produção e recuperação de FBP de duas cepas de cianobactérias pouco exploradas na literatura, *Anabaena variabilis* e *Nostoc* sp. Foram investigados diferentes métodos de extração das FBP, método de recuperação por Sistemas Aquosos Bifásicos (SAB) e produção de FBP por suplementação de fonte de carbono orgânico e nitrogênio ao meio de cultivo basal, visando aumentar sua produtividade. Para purificação foi utilizado SAB, por ser uma técnica atrativa para biomoléculas, pelo fato de possuir água em alta concentração em ambas as fases, sendo assim um ambiente compatível e não tóxico. O SAB utilizado foi do tipo polietilenoglicol (PEG)-sal, variando o peso molecular do PEG (1500 e 4000) e o tipo de sal (fosfato de potássio, sulfato de amônio e citrato de sódio) para purificação, em diferentes proporções, visando aumentar a pureza inicial das FBP obtidas pelo método de extração. Dentre os resultados obtidos para extração, destacam-se a presença de apenas FC em ambas cianobactérias, melhor solução extratora sendo o tampão fosfato pH 7,0 0,1M, o melhor método de extração sendo por congelamento e descongelamento em banho ultrassônico obtendo as maiores concentrações de FC (32,8 µg/mL e 34,6 µg/mL) e purezas (0,545 e 0,5938) para *Nostoc* sp. e *Anabaena variabilis* respectivamente e a melhor razão sólido-líquido de 0,4 g de célula/L de solução extratora, obtendo 0,35 mg de FC. Para a recuperação, a melhor condição encontrada foi para o SAB PEG 1500-fosfato de potássio, para proporção (10% PEG e 15,9% sal), obtendo recuperação de 79,10%, coeficiente de partição de FC de 6,36 e pureza final de 1,34 o extrato de *Nostoc* sp. e recuperação de 82,10%, coeficiente de partição de FC de 5,73 e pureza final de 1,12 para o extrato de *Anabaena variabilis*. Para a suplementação ao meio de cultivo o melhor resultado foi a suplementação de glicose 2 g/L e nitrato de sódio 5 mM, obtendo aumento na concentração de FC de até 50% em relação ao meio basal, com produtividade de 48,73 µg/mL para *Nostoc* sp. em 14 dias e 18,57 µg/mL para *Anabaena variabilis* em 10 dias.

Palavras-chave: *Anabaena variabilis*, *Nostoc* sp., Ficocianina

ABSTRACT

Cyanobacteria also known as algae blue green, are a group of autotrophic photosynthetic microorganisms. They produce a variety of bioactive compounds, and may be metabolites like antibacterial, anticoagulant, anti-inflammatory, antiviral, antitumor and cytotoxic compounds or pigmented compounds, such as chlorophyll a, b and c, beta-carotene and phycobiliproteins (PBP). Among the pigmented compounds are the PBP, which are a set of pigmented proteins, water-soluble and fluorescent, with applications in the food industry as natural dyes and in the pharmaceutical industry as fluorescent markers in disease diagnosis. The main PBP found in cyanobacteria is phycocyanin (PC). The procurement process is based on three stages, represented by cultivation, extraction and recovery / purification. The present work was a study about the production and recovery of PBP of two strains of cyanobacteria little explored in the literature, *Anabaena variabilis* and *Nostoc* sp. Different extraction methods of PBP, recovery for Aqueous Two-Phase System (ATPS) and production of PBP by supplementation with organic carbon and nitrogen sources in addition to the basal culture medium were investigated in order to increase their productivity. The ATPS was used since it is an attractive technique for biomolecules, because it has water in high concentration in both phases, being thus a compatible and non-toxic for proteins. The ATPS used was of the polyethylene glycol (PEG)-salt type, varying the molecular weight of the PEG (1500 and 4000) and the salt type (potassium phosphate, ammonium sulfate and sodium citrate) for purification, in different proportions, in order to increase the initial purity of the PBP obtained by the extraction method. Results were obtained for extraction, only FC was found in both cyanobacteria, the best extractive solution being phosphate buffer pH 7.0 0.1M, the best method of extraction by freezing and thawing in ultrasonic bath obtaining the highest concentrations of FC (32.8 µg/mL and 34.6 µg/mL) and purities (0.54 and 0.59) for *Nostoc* sp. and *Anabaena variabilis*, respectively, and the best solid-liquid ratio of 0.4 g of cell/L of extractive solution, yielding 0.354 mg FC. For recovery, the best condition was ATPS PEG 1500-phosphate, in proportion (10% PEG and 15.9% salt), recovering 79.10%, partition coefficient of 6.36 and final purity of 1.34 the extract of *Nostoc* sp. and recovery of 82.10%, partition coefficient of 5.73 and final purity of 1.12 for the *Anabaena variabilis* extract. The best result for supplementation to the culture medium was 2 g/L glucose and 5 mM sodium nitrate, increasing the FC concentration by up to 50% compared to the basal medium, with a yield of 48.73 µg/mL *Nostoc* sp. at 14 days and 18.57 µg/mL for *Anabaena variabilis* at 10 days.

Keywords: *Anabaena variabilis*, *Nostoc* sp., Phycocyanin

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

Corantes são substâncias amplamente difundidas na indústria, principalmente nas áreas de alimentos, cosméticos e têxtil, sendo importantes para a apresentação e aceitação destes produtos. A crescente demanda e a necessidade por corantes naturais e não tóxicos, vem sendo fonte de novas pesquisas e investimentos. Dentre estas fontes, destaca-se a síntese de pigmentos por microrganismos, por fatores como a produção independentemente da época e de condições geográficas, seu caráter não tóxico, além da facilidade de sua extração (RIZZO *et al.*, 2015). Microrganismos que têm sido investigados na produção de pigmentos são as cianobactérias. Estas são responsáveis pela produção de uma diversidade de compostos de alto valor, como compostos ativos farmacológicos e pigmentos, destacando-se para essa finalidade as ficobiliproteínas (PATIL *et al.*, 2008; LAUCERI *et al.*, 2018).

As ficobiliproteínas (FBP) são proteínas providas de cor e solúveis em água (MORAES *et al.*, 2010). Essas proteínas podem ser isoladas como complexos pigmentares por serem fluorescentes (ABALDE *et al.*, 1998) e representam aproximadamente 20% do peso seco total desses organismos (PRASANNA *et al.*, 2010). Nas cianobactérias ocorrem principalmente três tipos de FBP: ficocianina (FC) e aloficocianina (AFC), de coloração azul, e ficoeritrina (FE), de coloração vermelha (GANTT, 1981).

A importância industrial das FBP provém das propriedades relacionadas aos altos coeficientes de absorvância, fluorescência, e estabilidade e características como cor única, natureza proteica, não-tóxica e capacidade antioxidante, que as tornam importantes tanto ecologicamente quanto economicamente (RASTOGI *et al.*, 2015). Uma aplicação interessante das FBP é como corantes naturais, que desempenham papel importante na indústria alimentícia (RIZZO *et al.*, 2015), substituindo parcial ou completamente os corantes artificiais, agregando valor nutricional e reduzindo a toxicidade dos alimentos. Destaca-se para esta finalidade a ficocianina, após purificação (PRADO e GODOY, 2003).

No âmbito clínico e biotecnológico, as FBP são aplicadas para o diagnóstico de doenças como marcadores fluorescentes. Tal aplicação se deve a suas propriedades espectroscópicas, tendo inúmeras aplicações em imunoenaios, histoquímica, citometria de fluxo, detecção de espécies reativas de oxigênio. Além disso, atuam como agentes terapêuticos, sendo que sua aplicação como antiviral, antifúngica, antibacteriana e antitumoral tem sido explorada. Para este fim, necessitam de alto grau de pureza (YADAV *et al.*, 2011).

De modo a favorecer a obtenção das FBP, têm-se estudado fatores que afetam o crescimento das cianobactérias e a sua produção, como composição do meio, cor da luz e

intensidade luminosa, além da extração e purificação destes pigmentos, sendo estas as etapas críticas do seu processo produtivo (LEBEDEVA *et al.*, 2005; KHATTAR *et al.*, 2015).

Na etapa de purificação de biomoléculas, como as FBP, os sistemas aquosos bifásicos (SAB) apresentam-se como uma técnica atrativa (CHETHANA *et al.*, 2007; SARAVANAN *et al.*, 2008) e consistem-se em um método de extração líquido-líquido que emprega duas fases compostas por dois polímeros imiscíveis ou um polímero e um sal acima de sua concentração crítica. As principais vantagens do SAB são alta capacidade e alto rendimento, baixo tempo de processo, baixo consumo de energia, facilidade de ampliação de escala e não toxicidade (ZHAO *et al.*, 2014). Além disso, na maioria dos casos, a água em alta concentração em ambas as fases, resulta em um ambiente biocompatível para utilização em biomoléculas, evitando perda de atividade e mudanças estruturais (OLIVEIRA, 2009).

Neste contexto, este estudo tem como objetivo abordar tanto a produção de ficobiliproteínas a partir das cianobactérias *Anabaena variabilis* e *Nostoc* sp., como sua extração e recuperação por sistemas aquosos bifásicos do tipo PEG-sal a 15°C.

A escolha destas cianobactérias está no fato de serem pouco estudadas até o momento. O uso de sistemas aquosos bifásicos para separação e purificação justifica-se por ser uma técnica promissora e ser um ambiente estável para biomoléculas.

Apresentam-se a seguir os objetivos específicos deste trabalho:

- ✓ Avaliar o efeito da suplementação de diferentes fontes de carbono orgânico e de nitrato de sódio ao meio de cultivo basal das cianobactérias, visando aumentar a produção de biomassa e de ficobiliproteínas.
- ✓ Testar métodos de extração das ficobiliproteínas: ciclos de congelamento e descongelamento combinado com ultrassom, rompimento por vórtex com esferas de vidro, fragmentação em almofariz e pistilo com esferas de vidro e rompimento utilizando homogeneizador ultrassônico.
- ✓ Avaliar os sistemas aquosos do tipo PEG-sal, investigando o efeito do peso molecular do PEG (Peso molecular 1500 e 4000) e do tipo de sal utilizado (fosfato de potássio e citrato de sódio) na purificação e recuperação das ficobiliproteínas.

CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias, conhecidas também como algas azuis ou verdes, são um grupo de bactérias gram-negativas e autótrofas fotossintéticas oxigenadas, compostas por cerca de 150 gêneros e 2.000 espécies e possuem traços fósseis datados de 3,5 bilhões de anos (TAMAGNINI *et al.*, 2007; SHARMA *et al.*, 2011). Possuem nível de organização simples e são divididas em espécies unicelulares, filamentosas e formadoras de colônias. Devido à grande flexibilidade a adaptações bioquímicas, fisiológicas, genéticas e reprodutivas, são encontradas em ambientes terrestres e, principalmente, ambientes aquáticos, sendo mais comuns em água doce. Além disso, desempenham papel importante nos ciclos biogeoquímicos da Terra (MOLICA e AZEVEDO, 2009; KEHR *et al.*, 2011).

As cianobactérias detêm a capacidade de tolerar condições ambientais extremas, como altas e baixas temperaturas, baixa concentração de oxigênio, radiação UV, dessecação, altas concentrações de metais pesados e ambientes salinos (MOLICA e AZEVEDO, 2009).

Historicamente, as cianobactérias têm sido apontadas como principais contribuintes para evolução do oxigênio atmosférico, produzido através da fotossíntese em Eras passadas, possibilitando o seu acúmulo na atmosfera. A elas é creditada a origem da vida vegetal eucariótica no planeta, já que o cloroplasto de células eucarióticas é derivado de um antepassado de cianobactérias. Esta capacidade de fotossíntese ocorre mesmo em condições de baixa luminosidade e as cianobactérias ainda usam íon bicarbonato em condições de pH elevado para fotossíntese (KASTING e SIEFERT, 2002; RASTOGI *et al.*, 2015).

As cianobactérias são também as principais responsáveis pela fixação de nitrogênio atmosférico no planeta em formas solúveis, mesmo sendo apenas 1% da biomassa marinha (TYRELL, 1999). A nitrogenase, enzima responsável pela fixação do nitrogênio, é afetada pelo oxigênio produzido na fotossíntese e devido ao processo evolutivo, alguns desses microrganismos desenvolveram heterocistos, camadas com paredes espessas, que dificultam a troca de gases e mantém o meio intracelular essencialmente anaeróbico. Outras cianobactérias realizam a fixação durante a noite e realizam fotossíntese durante o dia, ou seja, ocorrem com separação temporal (BERMAN-FRANK *et al.*, 2001). A redução do nitrogênio catalisada pela nitrogenase é acompanhada pela formação de hidrogênio. Esse hidrogênio é rapidamente consumido pela hidrogenase, enzima encontrada na maioria das espécies fixadoras de N₂ (TAMAGNINI *et al.*, 2007). Além disso, utilizam fontes de enxofre e fósforo (SHARMA *et al.*, 2011).

As cianobactérias, apesar de apresentarem diversidade morfológica e de *habitat*, são bastante uniformes em termos nutricionais e metabólicos (TAMAGNINI *et al.*, 2007). Seu potencial primário provém da indústria alimentícia, sendo utilizadas na nutrição humana como fonte de proteínas (SILVA, 2008), corantes comestíveis naturais, produção de biomassa e moléculas fluorescentes (YOON *et al.*, 2012); e da importância agrônômica como biofertilizantes, decorrente da fixação de N₂ que as ajuda a crescer com sucesso em *habitats* onde pouco ou nenhum N combinado está disponível (SHARMA *et al.*, 2011).

A produção de compostos a partir das cianobactérias ou microalgas requer dois tipos consecutivos de processos: processos *upstream*, representados pela produção de biomassa e concentração ou acúmulo de seus compostos e processos *downstream*, representados pelos métodos de extração, recuperação e purificação destes compostos (MANIRAFASHA *et al.*, 2016).

Em relação a metabólitos, considerados compostos secundários, as cianobactérias são responsáveis por originar um amplo conjunto de compostos de alto valor (RASTOGI e SINHA, 2009), com potencial farmacêutico significativo e diversas aplicações, como compostos de toxicidade animal, antibacterianos, anticoagulantes, antifúngicos, anti-inflamatórios, antiprotozoários, antivirais, antitumorais e citotóxicos. Quimicamente, estes compostos podem ser polipeptídeos, alcalóides, alcalóides indólicos, amidas, ácidos graxos, policetídeos e terpenos (YADAV *et al.*, 2011).

No que se refere a compostos extraídos de cianobactérias, destacam-se clorofila a, b e c, beta-caroteno, astaxantina, xantofilas e ficobiliproteínas (FBP). As FBP representam cerca de 40% das proteínas solúveis das cianobactérias e estão sendo utilizadas como corantes na indústria de alimentos, em doces e bebidas, devido às suas propriedades não tóxicas e não carcinogênicas, quando comparadas aos corantes sintéticos (KHATOON *et al.*, 2018).

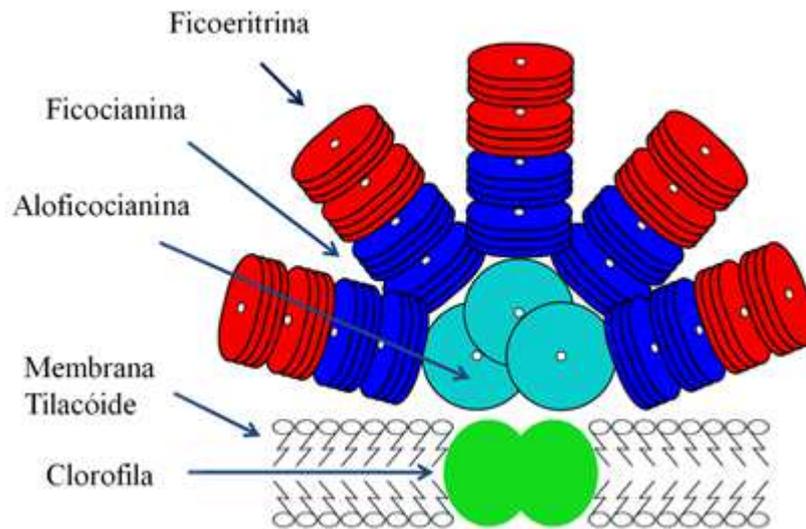
Dentre as cianobactérias, destacam-se os gêneros: *Anabaena*, *Arthrospira*, *Anabaenopsis*, *Hapalosiphon*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Nodularia*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermum*, *Phormidium* e *Rhaphidiopsis* (YADAV *et al.*, 2011).

2.2 FICOBILIPROTEÍNAS

Ficobiliproteínas (FBP) são um conjunto de proteínas pigmentadas, hidrossolúveis e fluorescentes, presentes em cianobactérias, algas vermelhas e criptofíceas (MORAES *et al.*, 2010; RUIZ-RUIZ *et al.*, 2013). Juntamente com a clorofila, são os principais pigmentos fotossintéticos nas cianobactérias (GANTT, 1981; RASTOGI *et al.*, 2015) e estão organizadas

em estruturas chamadas ficobilissomos, os quais estão ligados na superfície estromal da membrana do tilacoide. Estes permitem a otimização da captura de luz e transferência de energia, graças à organização e posicionamento dos pigmentos (DOUST *et al.*, 2004; MANIRAFASHA *et al.*, 2016). Uma representação de um ficobilissomo é apresentada na Figura 1.

Figura 1-Estrutura do Ficobilissomo



Fonte: Adaptado de Sonani *et al.* (2014).

Estes pigmentos são divididos em quatro principais classes, sendo diferenciados de acordo com seu comprimento de onda máximo na região do visível de absorção do espectro, sendo eles: ficoeritrina (FE, $\lambda_{\text{max}} = 565 \text{ nm}$), ficoeritricocianina (FEC, $\lambda_{\text{max}} = 575 \text{ nm}$), ficocianina (FC, $\lambda_{\text{max}} = 620 \text{ nm}$) e aloficocianina (AFC, $\lambda_{\text{max}} = 650 \text{ nm}$) (BRYANT *et al.*, 1976). A FC e AFC apresentam coloração azul, enquanto FE e FEC, cor vermelha.

A FC e a AFC são as ficobiliproteínas encontradas em maior quantidade nas cianobactérias, representando cerca de 20% da proteína total das mesmas. A FC é o principal constituinte dos ficobilissomos, sendo localizada ao seu redor, e a AFC está contida no núcleo dos ficobilissomos e é o pigmento de ligação entre os ficobilissomos e a lamela fotossintética. As outras ficobiliproteínas, FE e FEC são encontradas nas redondezas da cianobactéria. A FE é flexível e responsável por facilitar a adaptação a mudanças ambientais, captando a luz do ambiente (JOHNSON *et al.*, 2014).

A importância industrial das ficobiliproteínas provém das propriedades relacionadas aos altos coeficientes de absorvância, fluorescência e estabilidade (SILVA, 2008), e características

como cor única, natureza protéica não-tóxica e capacidade antioxidante, que as tornam importantes tanto ecologicamente quanto economicamente (RASTOGI *et al.*, 2015).

Uma aplicação das FBP é como corantes naturais. Os corantes desempenham papel importante na indústria alimentícia, sobretudo por ser um fator crítico para a aceitação do produto pelo consumidor (RIZZO *et al.*, 2015). O interesse na utilização de fontes naturais para obtenção de corantes, substituindo parcial ou completamente os corantes artificiais, está na agregação de valor nutricional e redução de toxicidade dos alimentos, uma vez que as crianças são as principais consumidoras de produtos coloridos artificialmente (PRADO e GODOY, 2003, ORES *et al.*, 2016). A FC, em grau alimentar, tem sido empregada na fabricação de doces, sobremesas, chicletes, geleias e bebidas alcoólicas (MOHAMMADI-GOURAJI *et al.*, 2018).

No âmbito clínico e biotecnológico, as ficobiliproteínas possuem grande potencial como ferramenta para o diagnóstico de doenças, agindo como marcadores fluorescentes, devido a suas propriedades espectroscópicas, tendo inúmeras aplicações em imunoenaios (sonda fluorescente e marcador para imunoglobulinas e proteínas receptoras), histoquímica, citometria de fluxo, detecção de espécies reativas de oxigênio e atuando como agentes terapêuticos. Para este fim, necessitam de alto grau de pureza (RODRIGUES *et al.*, 2015, HEMLATA *et al.*, 2018; NWOBA *et al.*, 2019).

A FC é considerada a principal FBP, encontrada em maior quantidade e proporção nas cianobactérias e sendo, atualmente, a mais estudada. Seu valor comercial depende da sua pureza, obtida pela razão entre o valor da absorção máximo da FC (615 nm) e o valor de absorbância relacionado com a proteína total (280 nm). A ficocianina com pureza maior que 0,7 é considerada como grau alimentício, maior que 3,9 como grau reativo e acima de 4,0 como grau analítico (LAUCERI *et al.*, 2018).

2.3 MEIOS E PROCESSOS DE CULTIVO

As cianobactérias são microrganismos fotoautotróficos facultativos, ou seja, podem crescer em meios de cultivo com ou sem fonte de carbono orgânico.

Os meios comumente utilizados para cultivo de cianobactérias são Meio BG-11 líquido ou sólido (com ou sem cicloheximida) e Meio ASM-1 líquido ou sólido (com ou sem cicloheximida), sendo que a cicloheximida é um antibiótico usado para eliminar organismos eucariontes. A utilização de diferentes meios de cultura é motivada pelas diferentes concentrações e tipos de nutrientes, proporcionando condições nutricionais específicas para alguns grupos de cianobactérias (JACINAVICIUS *et al.*, 2013).

Atualmente, o meio mais empregado para cultivo de biomassa e de FBP é o meio mineral BG11o, constituindo um cultivo fotoautotrófico, como relatado para *Arthrospira* sp. para a produção de ficocianina (VONSHAK, 1997). No entanto, alguns pesquisadores têm estudado a influência de cultivos mixotróficos, onde a fonte de carbono é constituída por substâncias minerais e orgânicas (BORSARI *et al.*, 2007; RIZZO *et al.*, 2015). Seguem, no Quadro 1, as diferentes formas de cultivos de cianobactérias e suas características.

Quadro 1 – Diferentes condições de metabolismo celular

Condições de metabolismo Celular	Fonte de energia	Fonte de Carbono	Densidade celular
Foto-Autotrófico	Luz	Inorgânica	Baixa
Químio-Heterotrófico	Orgânica	Orgânica	Alta
Mixotrófico	Luz e Orgânica	Inorgânica e Orgânica	Média
Foto-heterotrófico	Luz	Orgânica	Média

Fonte: Adaptado de Cheng *et al.* (2012).

A obtenção de FBP em concentrações elevadas depende de fatores que influenciam a produção efetiva de biomassa e estimulam o acúmulo de FBP. Luz e fontes de carbono favorecem a síntese de FBP e inibem a síntese de outras proteínas. Fontes de nitrogênio beneficiam o crescimento celular e a acumulação de FC nas células (MANIRAFASHA *et al.*, 2016).

Lebedeva *et al.* (2005) verificaram que a glicose, por ser um dos principais componentes da regulação da fotossíntese, foi capaz de aumentar tanto a produção de biomassa quanto de ficobiliproteínas e que a produção de FC e FE foi afetada diretamente pela quantidade e qualidade da fonte de luz utilizada, sendo que a luz vermelha induziu a síntese de FC e impediu o acúmulo de FE e, com a luz verde, observou-se o efeito contrário.

Ainda de modo a aumentar a produtividade de biomassa e produtos de forma mais eficiente, são estudados outros fatores que possam melhorar seu crescimento celular, sendo estes: intensidade luminosa, nitrogênio, enxofre e fósforo, além da cor da luz utilizada (LEBEDEVA *et al.*, 2005; YOON *et al.*, 2012). Porém, segundo Manirafasha *et al.* (2016), as variáveis mais importantes a serem analisadas visando a otimização do meio de cultivo são fontes de carbono e nitrogênio.

2.4 EXTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE FBP

Os processos *downstream* envolvem as etapas de extração e purificação das FBP, sendo fundamentais para sua identificação e quantificação nas cianobactérias (MORAES *et al.*, 2010). As formas físicas da biomassa para extração podem ser congelada, seca ou úmida, sendo esta última a mais utilizada (ÍLTER *et al.*, 2018).

A extração de FBP envolve a ruptura celular e liberação das proteínas da célula. A parede celular das cianobactérias é extremamente resistente, composta por quatro camadas, compostas por fibras, peptídeo-glicanos e proteínas. Desse modo, é necessário a utilização de métodos de extração, baseados em variações na pressão osmótica, tratamentos químicos, ciclos de congelamento e descongelamento, maceração, fluido supercrítico, extrusão, *French press* e sonicação (MORAES *et al.*, 2010; ÍLTER *et al.*, 2018; PAN-UTAI e IAMTHAM, 2018).

Durante o processo de extração de FBP podem ocorrer alguns inconvenientes, relacionados à grande quantidade de contaminantes como detritos e organelas celulares, além de outros compostos como carotenoides e clorofila (KUMAR *et al.*, 2014). Portanto, a escolha do método de extração é primordial na obtenção de um produto de maior pureza e de maior recuperação.

Para a extração de FBP, há uma diversidade de métodos empregados na literatura, com vantagens e desvantagens, como mostrado no Quadro 2:

Quadro 2 - Vantagens e desvantagens de diferentes métodos de extração de FBP

Método de extração	Vantagens	Desvantagens
Congelamento/ Descongelamento	- Alta reprodutibilidade - Método simples - Ambiente biocompatível - Alta pureza obtida para FC	- Ampliação de escala
Esmagamento	- Método simples - Alta produtividade - Fácil ampliação de escala	- Baixa pureza obtida - Desnaturação
Sonicação	- Alta produtividade em pequena escala - Baixo tempo de processo	- Ampliação de escala
Trituração	- Alta produtividade - Baixo tempo de processo	- Baixa pureza obtida - Desnaturação
	- Rápida extração de FC	- Desnaturação

Adição de solução ácida	- Método simples	- Ampliação de escala
----------------------------	------------------	--------------------------

Fonte: Adaptado de Manirafasha *et al.* (2016)

É relatado na literatura a combinação de diferentes métodos de extração, como Mittal *et al.* (2017), que combinaram maceração com ultrassonicação e maceração com congelamento e descongelamento, obtendo maiores concentrações de FBP extraídas em relação aos métodos em separado. A principal vantagem dessa combinação de técnicas é reduzir limitação dos processos, quando analisados individualmente.

Nos últimos anos, a técnica de congelamento e descongelamento tem sido uma das técnicas mais estudadas para extração de FBP, apresentando maior quantidade de FC que os demais métodos e apresentando algumas vantagens por ser um método simples, reproduzível e por não apresentar perdas significativas da capacidade biológica da proteína, embora possua dificuldade de ampliação de escala. Este método de extração baseia-se na formação de cristais de gelo intracelulares durante o congelamento e no decorrer do descongelamento estes cristais de gelo causam danos à célula, promovendo assim a extração de compostos intracelulares (MORAES *et al.*, 2010).

Como exemplos utilizados de congelamento e descongelamento citam-se Liu *et al.* (2012), que utilizaram extração por congelamento (-20°C) e descongelamento a temperatura ambiente, para extração de FC de *Spirulina platensis*; Kumar *et al.* (2014) que utilizaram o método de congelamento e descongelamento para extração FC de *A. platensis*; e Khattar *et al.* (2015) que empregaram congelamento e descongelamento para extração de FC e FE de *Anabaena fertilissima*.

2.5 RECUPERAÇÃO POR SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS (SAB)

Posterior à extração, segue-se a etapa de purificação que envolve geralmente a combinação de várias técnicas como precipitação, centrifugação, diálise, cromatografia de filtração em gel e cromatografia de troca-iônica. Porém, a principal desvantagem destas técnicas é a quantidade de etapas envolvidas no processo de purificação, acarretando perda de rendimento do produto (CHETHANA *et al.*, 2007; PATIL e RAGHAVARAO, 2007; LAUCERI *et al.*, 2018).

Os sistemas aquosos bifásicos apresentam-se como uma técnica atrativa para a purificação de biomoléculas, como as FBP (GUO-QING *et al.*, 2005; CHETHANA *et al.*, 2007; SARAVANAN *et al.*, 2008). Eles são constituídos por espécies químicas que, em determinadas concentrações e temperatura, formam duas fases líquidas distintas (fase topo e fase fundo), em

equilíbrio termodinâmico, com propriedades intensivas e composições diferentes (HARAGUCHI *et al.*, 2004; BARBOSA *et al.*, 2016). Basicamente é um método de extração líquido-líquido que emprega duas fases compostas por dois polímeros imiscíveis ou um polímero e um sal de baixo peso molecular acima de sua concentração crítica, sendo alguns exemplos mostrados no Quadro 3.

Quadro 3 - Exemplos de componentes formadores de SAB

Componente 1	Componente 2
Polietileno glicol (PEG)	Polipropileno glicol
Polietileno glicol (PEG)	Dextrana
Polietileno glicol (PEG)	Sulfato de amônio
Polietileno glicol (PEG)	Fosfato de potássio
Polietileno glicol (PEG)	Citrato de sódio

Fonte: Adaptado de SILVA e LOH (2006).

As principais vantagens do SAB são alta capacidade e rendimento, menor tempo de processo, baixo consumo de energia, facilidade de ampliação de escala. Além disso, os SABs oferecem um ambiente biocompatível e sem toxicidade, por possuírem, na maioria dos casos, alta concentração de água em ambas as fases e baixa tensão superficial, resultando em um ambiente ameno, favorável e estável para utilização em biomoléculas, uma vez que desnaturação, mudanças estruturais e perda de atividade biológica dificilmente ocorrem nestas condições (OLIVEIRA, 2009; ASENJO e ANDREWS, 2012, ZHAO *et al.*, 2014). Dessa forma, os SABs têm sido utilizados para separação de proteínas, enzimas, aminoácidos e peptídeos (HARAGUCHI *et al.*, 2004).

Sistemas PEG-sal têm sido utilizados para separação de proteínas em larga escala devido à maior diferença na densidade entre as fases, menor viscosidade e baixo custo (NASCIMENTO *et al.*, 2011), levando a uma separação bem mais rápida (cerca de 30 minutos) do que sistemas Polímero/Polímero (cerca de 1 a 6 horas), dependendo do tamanho da proteína. No sistema PEG-sal a carga do ânion tem papel importante para formação de SAB's, sendo assim, ânions multivalentes são mais eficazes do que cátions monovalentes, em ordem fosfato (PO_4^{3-}) > citrato ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$) > sulfato (SO_4^{2-}) > hidroxila (OH^-) e quanto maior a carga do ânion, menor será a concentração do sal necessária para ocorrência da separação das fases. Em relação aos cátions a ordem para formar duas fases é $\text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{MgSO}_4 > \text{ZnSO}_4 > \text{Li}_2\text{SO}_4$, embora a contribuição do ânion seja maior para a separação de fases (OLIVEIRA, 2009). Uma desvantagem deste tipo de sistema é a separação e purificação de substâncias sensíveis à alta força iônica, sendo, nestes casos, preferível a utilização de sistemas polímero-polímero (IGBAL *et al.*, 2016).

Uma aplicação importante para o SAB PEG-sal em escala laboratorial está na separação de proteínas de dendritos celulares ou para purificação de uma proteína específica dentre outras proteínas. A maioria das partículas solúveis e particulados tendem a se particionar para a fase mais polar (fase sal ou fundo) enquanto as proteínas tendem a se particionar na fase hidrofóbica (fase polímero ou topo) (ASENJO e ANDREWS, 2012). Além disso, o SAB do tipo polímero-sal apresenta taxas de recuperação da ordem de 90% e fator de purificação de até 4, ou seja, o composto recuperado possui concentração 4 vezes maior que o componente inicial (IGBAL *et al.*, 2016).

2.6 FUNDAMENTO DA FORMAÇÃO DOS SAB

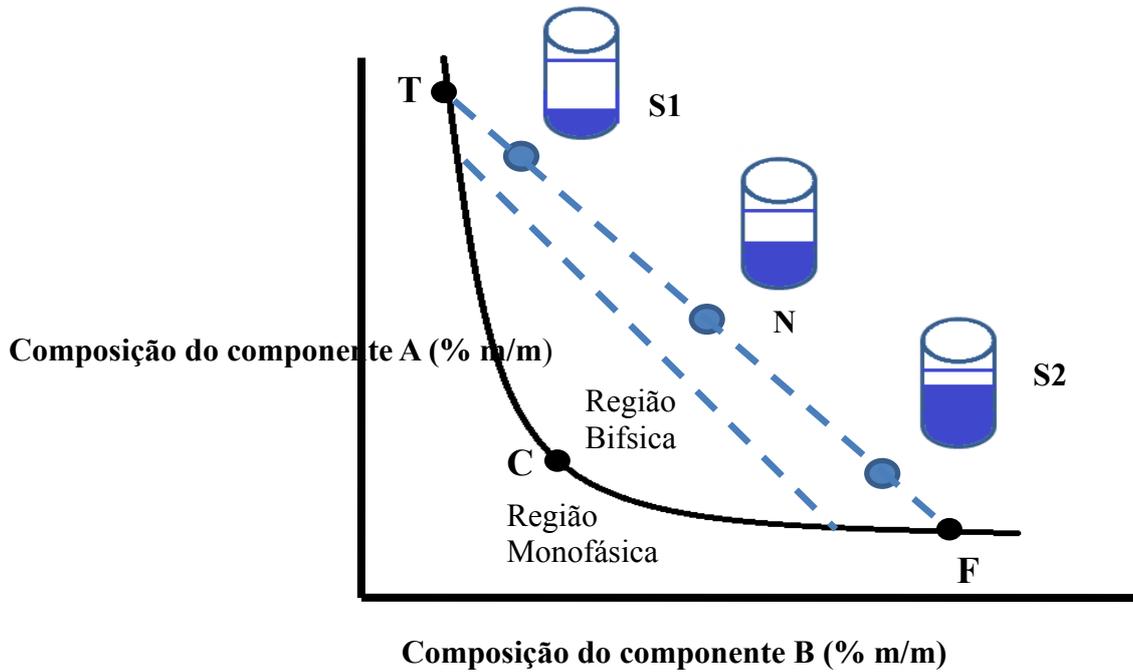
A formação de um sistema aquoso bifásico é dependente de interações moleculares entre seus componentes formadores, explorando a incompatibilidade entre soluções de dois polímeros ou entre solução polimérica e um sal de alta força iônica (SILVA e LOH, 2006; ASENJO e ANDREWS, 2012).

Nos sistemas polímero-polímero são formados agregados poliméricos, que causam exclusão estérica, ocasionando a separação dos polímeros nas duas diferentes fases. Em sistemas polímero-sal, a separação entre as fases está relacionada com a absorção de grande quantidade de água pelo sal utilizado, aumentando a hidrofobicidade da fase polimérica (IGBAL *et al.*, 2016).

Estes componentes formadores são responsáveis pelas propriedades termodinâmicas das duas fases, como distribuição dos diferentes componentes no sistema, da relação de volumes entre as fases e do coeficiente de partição dos solutos; sempre dependentes do estado termodinâmico do sistema, caracterizados por composição, temperatura e pressão (SILVA e LOH, 2006; IGBAL *et al.*, 2016).

O SAB pode ser apresentado na forma de diagramas de fase, que é uma representação do sistema sob certas condições, como temperatura e pH. Este diagrama fornece a identidade e a região de trabalho do sistema (IGBAL *et al.*, 2016). Um exemplo é o diagrama de fase, normalmente representado na forma retangular, mostrado na Figura 2.

Figura 2- Representação do diagrama de fases a uma dada temperatura e pH



Fonte: Adaptado de IGBAL *et al.* (2016).

A curva TCF é denominada curva binodal, uma curva de equilíbrio termodinâmico, que separa o sistema em duas regiões: monofásica e bifásica. A região monofásica é localizada ao exterior da curva binodal e a região bifásica, ao interior da curva. Uma característica importante da curva são as linhas de amarração, como representado pela reta TNF. Elas representam composições das fases topo (T), rica no componente A e fundo (F), rica no componente B, após uma amostra de composição global (N) atingir o equilíbrio termodinâmico. Além disso, todos os pontos da linha de amarração possuem composições iguais nas fases topo e fundo, mas com volumes relativos diferentes (S1 e S2), implicando em composições globais diferentes. A razão entre a massa da fase superior e inferior é calculada pela razão de comprimento das linhas NT e NF. Dessa forma, para concentrar um produto em uma das fases, essa fase deve necessariamente ter um pequeno volume relativo, como N mais próximo de T ou N mais próximo de F, como representado em S1 e S2 (ASENJO e ANDREWS, 2012; IGBAL *et al.*, 2016).

Outra característica importante do diagrama de fases é o ponto crítico, representado por C. Neste ponto as propriedades físico-químicas, como volume e composição, são teoricamente iguais. Dessa forma, quanto mais próximo do ponto crítico de um sistema, menor será a diferença das composições das fases e qualquer leve alteração na composição do sistema poderá provocar grandes mudanças, levando o sistema de uma fase para duas ou vice-versa (OLIVEIRA, 2009).

A relação de equilíbrio entre as fases superior e inferior no SAB é determinada pelo coeficiente de partição (K). Este coeficiente define a partição de uma substância entre as fases topo e fundo, definido pela Equação 1.

$$K = \frac{C_{Topo}}{C_{Fundo}} \quad (1)$$

sendo C_{Topo} a concentração da substância na fase topo e C_{Fundo} a concentração da substância na fase fundo.

Os fatores que podem influenciar os SABs para purificação de proteínas podem ser do próprio sistema: temperatura, pH, concentração e tipo de sal, força iônica do sal, massa molecular e tipo do polímero ou da própria proteína: hidrofobicidade, ponto isoelétrico, distribuição de cargas e massa molar (OLIVEIRA, 2009; ASENJO e ANDREWS, 2012).

A aplicação de SAB para recuperação de ficobiliproteínas de cianobactérias têm sido investigada em diferentes tipos de cepas e variando o peso molecular do PEG, tipo de sal e o valor do pH do sistema.

Rito-Palomares *et al.* (2001) avaliaram a recuperação de FC de *Spirulina máxima*, avaliando sistemas PEG-sal, para os PEG 1000 e PEG 1450, para os sais fosfato de potássio e sulfato de amônio, variando as composições do sistema e o pH. O melhor sistema encontrado foi para PEG 1450-fosfato de potássio, para o sistema formado com 7% (m/m) PEG e 20 % (m/m) de fosfato e pH 6,5. Foram avaliados dois estágios de recuperação por SAB, sendo no primeiro estágio obtido pureza de FC de 2,1 e no segundo de 2,4.

Patil e Raghvarao (2007) estudaram a recuperação de FC de *Spirulina platensis* por SAB do tipo PEG-sal, variando o peso molecular do polímero (1500, 4000 e 6000) e o tipo de sal (fosfato de sódio, fosfato de potássio, sulfato de magnésio, sulfato de sódio, sulfato e amônio e citrato de sódio). O melhor SAB observado foi o sistema PEG 4000-fosfato de potássio, obtendo maior pureza de FC, sendo de 2,75, tendo partido de um extrato com pureza de 1,18 e coeficiente de partição de FC de 10,47.

A recuperação de FC e AFC de *Spirulina platensis* foi investigada por Liu *et al.* (2012) que empregaram SAB do tipo PEG-fosfato, variando o peso molecular do PEG (2000, 4000 e 6000). O melhor resultado geral para SAB observado foi pra PEG 6000-fosfato de potássio, com coeficiente de partição para FC de 10,64 e de 0,57 para AFC, com pureza de FC de 0,82 obtida na fase topo.

A partir destes estudos, o presente trabalho visou a obtenção e recuperação de FBP para as cianobactérias *Nostoc sp.* e *Anabaena variabilis*, pouco estudadas na literatura, investigando o potencial destas cepas.

O processo foi avaliado desde o cultivo das cianobactérias, investigando o efeito da suplementação de aditivos ao meio basal, analisando sua influência no crescimento celular e produção de FBP, até sua recuperação por SAB do tipo PEG-sal, buscando definir os principais parâmetros significativos para aumentar a produção e pureza das FBP.

CAPÍTULO 3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

As linhagens das cianobactérias utilizadas neste trabalho, *Nostoc* sp. PCC 7423 e *Anabaena variabilis* ATCC 29413, foram gentilmente doadas pelo Laboratório de Cianobactérias e Ficotoxinas da FURG (Rio Grande, RS).

Permeado de soro de leite em pó (77% lactose), adquirido da empresa Sooro Concentrado Indústria de Produtos Lácteos Ltda, foi utilizado nos testes de produção de ficobiliproteínas. Os demais reagentes usados para manutenção do inóculo, assim como nos ensaios experimentais e nas análises físico-químicas possuíram pureza analítica.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Manutenção das cianobactérias

As cianobactérias *Anabaena variabilis* e *Nostoc* sp. foram cultivadas em meio basal BG11o em Erlenmeyers de 250 e 500 mL, a 30°C, luminosidade de 1.553 lux, com fotoperíodo de 12 h, em ambiente aeróbico e com repiques periódicos de 14 dias. Na Figura 3 mostra-se a câmara de fotoperíodo usada para manutenção das cianobactérias e ensaios experimentais.

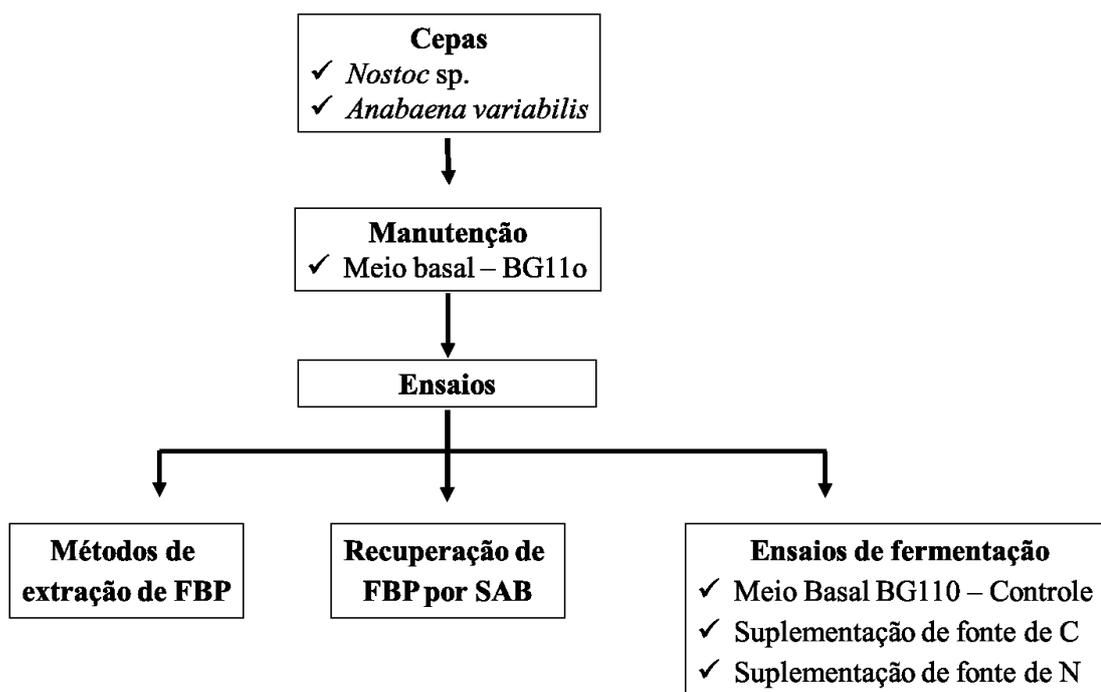
Figura 3 – Câmara de fotoperíodo mantida a 30°C, luminosidade de 1.553 lux e fotoperíodo de 12 h



Ambas as cepas mantidas em meio basal (BG11o) foram usadas nos ensaios para: (i) determinação do melhor método de extração de ficobiliproteínas; (ii) avaliação do sistema PEG-

sal que proporcione maior recuperação destes pigmentos por sistemas aquosos bifásicos e (iii) investigação do efeito da suplementação de fonte de carbono e de nitrogênio na produção de ficobiliproteínas por cianobactérias por fermentação, sendo que nestes ensaios, ao meio basal foram adicionados açúcar e nitrato de sódio (Figura 4).

Figura 4 - Ensaios realizados usando as cianobactérias *Anabaena variabilis* e *Nostoc* sp.



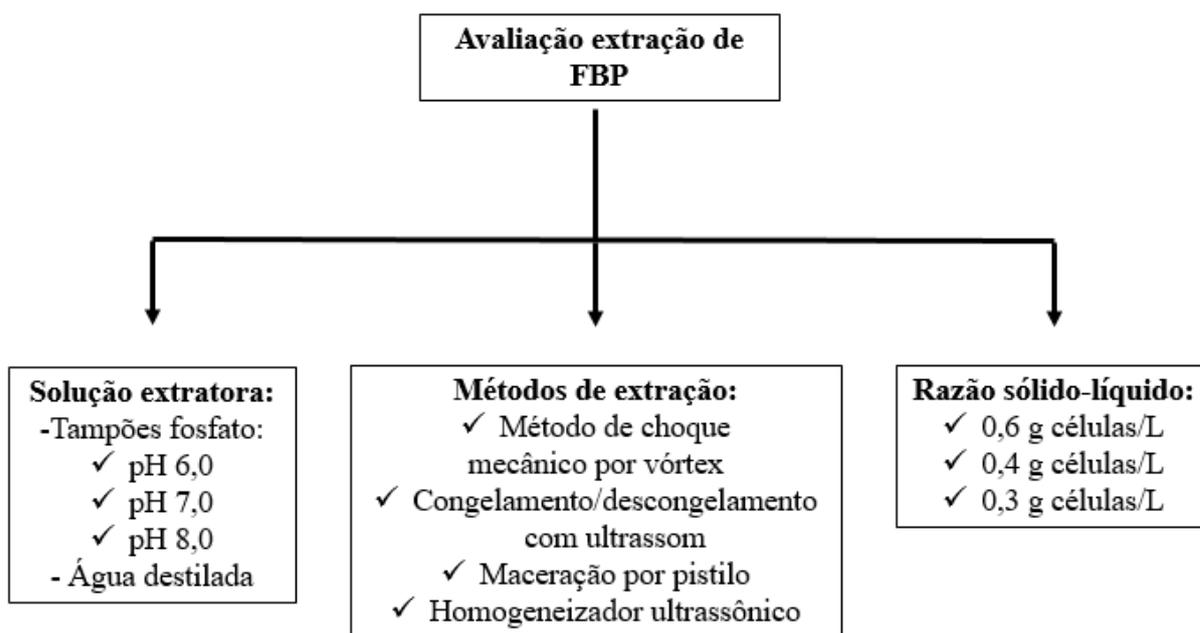
Fonte: O autor.

Os procedimentos de repique, assim como o preparo dos ensaios para estudo da produção de FBP pelas cianobactérias, foram feitos em câmara de fluxo laminar, com os cuidados de assepsia com álcool 70% e luz UV, utilizando vidrarias e o meio de cultivo previamente esterilizados em autoclave à 121 °C por 20 min, a fim de eliminar qualquer contaminação.

3.2.2 Análise do processo de extração de FBP

Para a análise do processo de extração das FBP, foram investigados parâmetros e diferentes técnicas, a fim de obter maiores concentrações de FBP e maiores purezas do extrato obtido. Para este fim, foram analisados: solução extratora, método de extração e razão sólido-líquido (relação massa de célula e volume de solução extratora). Resume-se, na Figura 5, o processo utilizado.

Figura 5 - Fluxograma dos ensaios para avaliação do processo de extração das FBP.



Fonte: O autor.

Em todos os ensaios, 10 mL de inóculo (ver item 3.2.7) foi coletado, e mediu-se a concentração celular para garantir que o valor se mantivesse constante. Em seguida, foi centrifugado a 5000 rpm, o sobrenadante foi descartado e se completou o volume com 10 mL de solução extrator.

Nos ensaios para se avaliar a melhor solução extratora, foi fixado o método de extração de rompimento mecânico por vórtex (Phoenix Luferco AP 56) com esferas de vidro. Foi empregada razão sólido-líquido de 1 g de células/L e 1,1g de esferas de vidro por mL de solução extratora, em tubos Falcon de 50 mL. O processo foi repetido 3 vezes, sendo que, para cada ciclo, a amostra ficou sob agitação em vórtex por 5 min seguida de 2 min em banho de gelo (SOUSA, 2016). Estes testes foram restritos à *Nostoc* sp. e foram empregados os principais tampões citados pela literatura para extração de FBP (tampões fosfato 0,1 M de pH 6, pH 7, pH 8) e água destilada (AJAYAN *et al.*, 2012; JOHNSON *et al.*, 2014; MITTAL *et al.*, 2017). A escolha da melhor solução extratora foi baseada na maior extração de FBP e na maior pureza de extrato obtida.

A partir da análise da melhor solução extratora, foram analisados diferentes métodos de extração de FBP, sendo estes: ciclos de congelamento e descongelamento combinado com ultrassom, choque mecânico por vórtex com esferas de vidro, fragmentação por maceração com pistilo e rompimento celular por homogeneizador ultrassônico, utilizando a solução extratora definida no ensaio anterior (MANIRAFASHA *et al.*, 2016; MITTAL *et al.*, 2017).

Primeiramente, para comparação dos métodos de extração, foram utilizadas amostras de uma mesma cepa, a partir de uma mesma concentração celular de cada cianobactéria e a razão massa celular/volume de solução extratora foi fixada como 1 g/L.

Apresentam-se na Tabela 1 as características de cada processo de extração. Para o método de congelamento e descongelamento por banho ultrassônico, a amostra 15 mL contida em tubo Falcon foi congelada em refrigerador comercial (-15°C) por 1,5 h e descongelada dentro de banho ultrassônico (Thornton) por 30 min com temperatura de 25°C, durante 5 ciclos.

O rompimento mecânico com esferas de vidro foi realizado seguindo as mesmas condições empregadas no teste para escolha da solução extratora.

Na maceração manual utilizou-se o pistilo e 1,1 g de esfera de vidro por mL de solução extratora durante 45 minutos.

No método utilizando homogeneizador ultrassônico, 15 mL de amostra foi submetida a ciclos de pulso/descanso de 1:1 s cada, totalizando 20 minutos de processo.

Tabela 1 – Condições experimentais dos ensaios para avaliação dos métodos de extração

Método de Extração	Características	Ciclos	Tempo (min)	Referência Adaptada
Congelamento/ Descongelamento por banho ultrassônico	-15°C 1,5h e 25°C por 30 min	5	600	Mittal <i>et al.</i> (2017)
Agitação Vórtex	5 min vórtex e 2 min banho de gelo	3	21	Sousa (2016)
Maceração	Maceração pistilo por 45 min	1	45	Rito-Palamares <i>et al.</i> (2001)
Homogeneizador Ultrassônico	1 s de pulso: 1 s de descanso	10	20	Falleiros (2016)

Após a extração, foi realizada a centrifugação das amostras a 10.000 g por 10 min, separando o sobrenadante (produto de interesse) do pellet (dejetos celulares). Por fim cada sobrenadante foi filtrado em filtros de 0,14 µm.

Para cada extrato, foi realizada a varredura espectral de modo a investigar a presença dos picos de absorbância característicos das FBP, sendo ficoeritrina (FE, $\lambda = 562$ nm), ficocianina (FC, $\lambda = 615$ nm) e aloficocianina (AFC, $\lambda = 652$ nm).

Após a escolha do melhor método de extração de FBP e solução extratora, foram testadas diferentes razões sólido/líquido 0,6; 0,4 e 0,3 g de biomassa/L de solução extratora, de

modo a determinar a saturação de FBP extraídas e a condição que promova a obtenção do maior teor de FBP no sobrenadante. Os resultados foram comparados com os obtidos usando 1 g/L. Estes ensaios foram realizando usando somente para *Nostoc* sp. Além disso, assim como para os testes anteriores com razão sólido-líquido de 1 g/L, 10 mL de inóculo foi coletado, mediu-se a concentração celular, e após centrifugação e descarte do sobrenadante, foram completados com diferentes volumes de solução extratora para se obter a razão sólido-líquido desejada, conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Razões sólido-líquido para extração de FC de *Nostoc* sp. por ciclo de congelamento e descongelamento em banho ultrassônico

Razão S/L (g/L)	Volume tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 (mL)
0,6	14
0,4	21
0,3	28

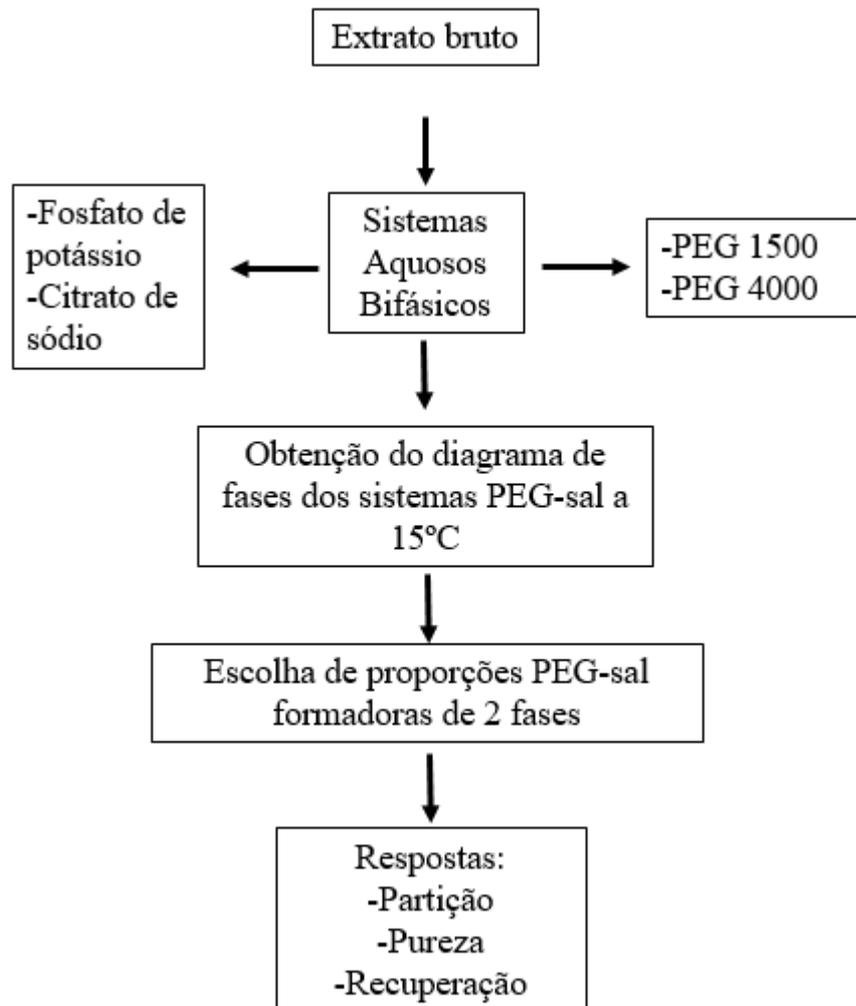
3.2.3 Estudo do processo de recuperação das FBP

Sistemas Aquosos Bifásicos do tipo PEG-sal foram utilizados no processo de recuperação de FBP, variando o peso molecular do polímero e o tipo de sal. Foram investigados dois tipos de PEG, com pesos moleculares 1500 e 4000, e dois sais, fosfato de potássio e citrato de sódio, para analisar o efeito do tipo de íon na partição e o efeito do pH do sistema, uma vez que os sais citados são neutro e básico, respectivamente.

Os extratos empregados nesta etapa foram obtidos pelo método de extração estabelecido no item 3.2.2.

O fluxograma do processo de recuperação das FBP utilizado é mostrado na Figura 6.

Figura 6 - Fluxograma do processo de recuperação de FBP por SAB



Fonte: O autor.

3.2.4 Obtenção do diagrama de fase

De modo a definir as proporções de PEG e sal para formação dos SAB, que levam à formação de sistema bifásico, primeiramente, foi necessário a obtenção do diagrama de fases para cada sistema.

Os diagramas de fase para os SAB PEG-sal foram obtidos por turbidimetria, sendo determinada a curva binodal do sistema, ou seja, a curva de equilíbrio que separa as regiões de uma e duas fases (HARAGUCHI *et al.*, 2004; OLIVEIRA, 2009; PIRDASHTI *et al.*, 2015; BARBOSA *et al.*, 2016).

Foram preparadas soluções estoque de concentrações conhecidas: solução de PEG 1500 50% (m/m), solução de PEG 4000 50% (m/m), soluções de citrato de sódio, fosfato de potássio e sulfato de amônio 30 % (m/m). Em tubos Falcon de 15 mL, foram pipetadas amostras de 5

mL da solução de PEG, variando de 50% até 5% (v/v), sempre com diluições utilizando água deionizada. Os tubos foram colocados em um suporte dentro do banho termostático a 15°C. Após 1 h no banho, foi acrescentada a cada amostra volumes de 30 µL solução de sal com micropipeta automática de modo a atingir a turbidez no sistema, sendo este volume utilizado para o cálculo do equilíbrio líquido-líquido (curva binodal). O procedimento foi realizado para os dois tipos de PEG e para os dois sais (fosfato de potássio e citrato de sódio) e todos os experimentos foram realizados em duplicata, com tempo de equilíbrio de 24 h.

3.2.5 Obtenção dos SAB

Os sistemas aquosos bifásicos foram preparados a partir da análise das curvas de equilíbrio, de modo a escolher uma composição global na região de 2 fases. As proporções foram escolhidas de modo a manter constante a porcentagem de extrato utilizado em todos os sistemas (27%, m/m), variando apenas as composições de PEG e sal, em um total de 20 g. As três proporções dos SABs empregadas foram as mesmas para cada tipo de PEG, e estão representadas na Tabela 3.

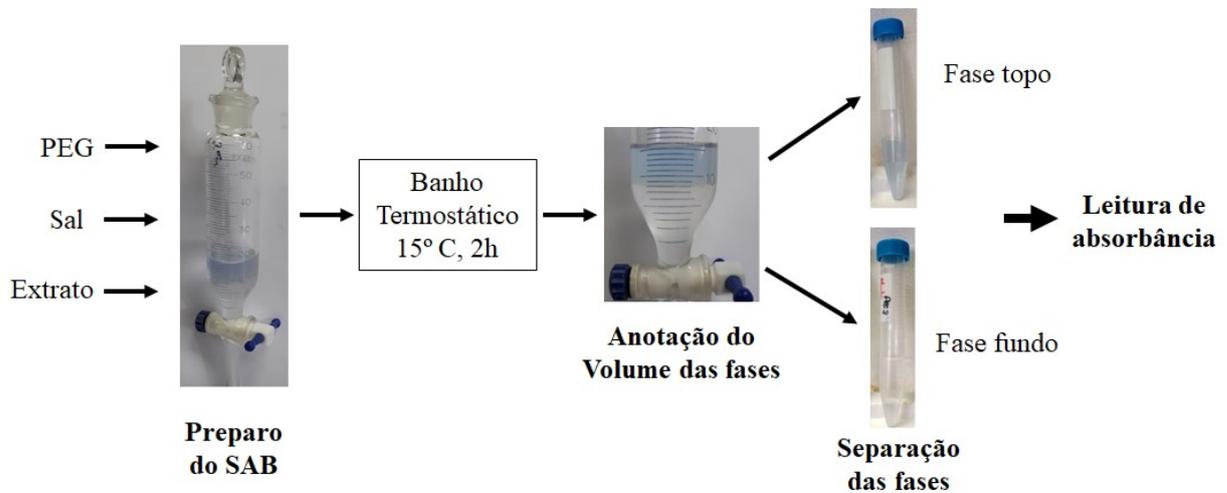
Tabela 3 - Composições dos SABs PEG 1500-sais e PEG 4000-sais

	% (m/m) PEG	% (m/m) Sal	% (m/m) Extrato	Massa Total do Sistema (g)
1ª Proporção	13	14,0	27	20
2ª Proporção	10	15,9	27	20
3ª Proporção	20	9,9	27	20

Para cada uma das proporções, os sistemas foram realizados empregando o extrato obtido de cada cianobactéria, todos em triplicata. Foi feito o sistema branco, sendo o extrato substituído por tampão fosfato (0,1 M e pH 7,0), usado como solução extratora. Antes do preparo de cada SAB, analisou-se o extrato quanto à pureza de cada FBP de modo ser comparada após a recuperação.

As etapas adotadas nestes procedimentos são ilustradas na Figura 7.

Figura 7 - Procedimento para recuperação de FBP por SAB



Os SABs foram preparados em funil de separação graduado, sendo mantidos em equilíbrio por 2 h no banho termostático a 15° C. Após isso, mediu-se o volume de cada fase em equilíbrio após a separação das fases, e separou-se a fase topo por pipeta Pasteur e fundo pelo funil.

Após a separação das fases, fez-se a leitura de absorbância e foram calculadas concentração e pureza de cada FBP em ambas as fases (ver item 3.2.7.3). A partir das concentrações de cada FBP no topo e no fundo, foi possível calcular o coeficiente de partição (K), que é um coeficiente adimensional que define a relação com que uma substância se divide nas fases topo e fundo, definido pela Equação 2.

$$K = \frac{[\text{Ficobiliproteína}]_{\text{topo}}}{[\text{Ficobiliproteína}]_{\text{fundo}}} \quad (2)$$

em que $[\text{Ficobiliproteína}]_{\text{topo}}$ e $[\text{Ficobiliproteína}]_{\text{fundo}}$ representam a concentração (mg/mL) das proteínas de interesse na fase de topo e na fase de fundo, respectivamente.

Se o coeficiente de partição for maior que 1 significa que o composto é encontrado em maior quantidade na fase topo; se for menor que 1 o composto é preferencialmente encontrado na fase fundo; e em caso de coeficiente ser igual ou próximo a 1, o composto se particiona de forma igualitária em ambas as fases.

Foi calculado também a razão de volume entre as fases (Vr), definida como a razão entre o volume da fase topo (V_{TOPO}) e volume da fase fundo (V_{FUNDO}) no SAB, definida pela Equação 3.

$$Vr = \frac{V_{TOPO}}{V_{FUNDO}} \quad (3)$$

A recuperação de FBP (R) nas fases foi definida de acordo com a Equação 4 (BASKARAN *et al.*, 2018).

$$R(\%) = \frac{100}{1 + (K.Vr)^{-1}} \quad (4)$$

que representa a porcentagem de cada FBP encontrada preferencialmente em uma de suas fases, apenas a partir dos parâmetros, como coeficiente de partição (K) e razão de volume entre as fases (Vr).

3.2.6. Avaliação do efeito da suplementação do meio com fonte de carbono e de nitrogênio na produção de FBP

No presente trabalho também foram estudados os efeitos da adição, ao meio de cultivo basal, de lactose proveniente de permeado de soro e de glicose P.A., como fontes de carbono orgânico, e de nitrato de sódio, como fonte de nitrogênio, visando o aumento na concentração de biomassa e a maior produção de FBP por fermentação. A escolha de NaNO_3 como fonte de nitrogênio, se baseou em uma das variações existentes da composição do meio de cultivo BG11o, sendo esta chamada de BG11N.

A proposta de suplementação do meio para promover o aumento do teor de FBP por cianobactérias foi mostrada na literatura, como nos trabalhos de Lebedeva *et al.* (2005) e de Khattar *et al.* (2015). Lebedeva *et al.* (2005) estudaram diferentes fatores que aumentam e quantidade e qualidade de FBP, dentre eles a glicose, adicionada ao meio de cultivo para a cianobactéria *Calothrix* sp. e verificaram efeito positivo na obtenção de FBP. Khattar *et al.* (2015) estudaram diferentes fontes de carbono orgânico (glicose, frutose e sacarose) e diferentes fontes de nitrogênio (nitrato e nitrito de potássio) ao meio de cultivo de *Anabaena fertilissima* na investigação aumento da produtividade de FBP.

Os ensaios foram todos realizados sob agitação de 150 rpm em mesa agitadora e sob fotoperíodo de 12 h, com intensidade de luz de 1.553 lux.

A primeira análise foi baseada na adição de 2 g/L de glicose P.A. ou de 2 g/L de lactose proveniente do permeado de soro de leite ao meio BG11o, de modo a analisar seu efeito no crescimento celular, comparado ao meio controle (meio basal BG11o). Nesta etapa, somente

Nostoc sp. foi utilizada na proporção de 10% de inóculo e 90% de meio (v/v), com volume total de 100 mL, utilizando Erlenmeyers de 250 mL.

Ao se definir a fonte de carbono baseado nos resultados do primeiro teste, na segunda análise, considerou variar a concentração do açúcar além de suplementar o meio também com nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, considerando a fonte de carbono. Novamente, empregou-se somente a cepa de *Nostoc* sp., com inóculo de 10% em volume de inóculo. Foram analisados seis tipos de meio cultivo, conforme Tabela 4.

Tabela 4 - Suplementação ao meio basal com açúcar e/ou NaNO₃ durante fermentação por *Nostoc* sp. 10% (v/v), 30 °C

Meio de cultivo	Caçúcar (g/L)	C _{NaNO₃} (mM)
1 (controle)	0	0
2	2	0
3	0	2 (0,17 g/L)
4	2	2 (0,17 g/L)
5	5	2 (0,17 g/L)
6	2	5 (0,425 g/L)

Em seguida, foi avaliado o aumento da concentração inicial de inóculo ao se utilizar 20% em volume de inóculo de *Nostoc* sp. Foram preparados 4 meios de cultivo diferentes, conforme Tabela 5.

Tabela 5 - Suplementação ao meio de cultivo utilizando fonte de carbono e/ou nitrato para *Nostoc* sp. 20% (v/v)

Meio de cultivo	Caçúcar (g/L)	C _{NaNO₃} (mM)
1 (controle)	0	0
2	0	2 (0,17 g/L)
3	2	2 (0,17 g/L)
4	5	5 (0,425 g/L)

A partir dos dados obtidos usando a cepa *Nostoc* sp., ensaios de fermentação para investigar o efeito da suplementação do meio de basal BG11o com fonte de carbono orgânico e nitrogênio também foram realizados com a cepa de *Anabaena variabilis*. Foi usado volume de inóculo de 20% e os meios de cultivo são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Suplementação ao meio de cultivo utilizando fonte de carbono e/ou nitrato para *Anabaena variabilis* 20% (v/v)

Meio de cultivo	Caçúcar (g/L)	C _{NaNO3} (mM)
1 (controle)	0	0
2	2	0
3	0	2 (0,17 g/L)
4	2	2 (0,17 g/L)
5	5	2 (0,17 g/L)
6	2	5 (0,425 g/L)

Em todos os ensaios, amostras foram retiradas ao longo da fermentação para acompanhamento do crescimento celular e ao final do processo, o teor de ficobiliproteínas foi medido após extração. O método de extração de FBP empregado nesta etapa foi definido pela investigação da melhor técnica de extração destes pigmentos que correspondeu a uma das etapas abordadas neste trabalho (ver item 3.2.2).

3.2.7 Métodos analíticos

3.2.7.1 Concentração Celular

A determinação do crescimento celular foi realizada por análise de absorbância da alíquota do meio de cultivo em espectrofotômetro (Shimadzu UV mini-1240) e correlacionando com a concentração em massa seca de célula (g/L).

Para se obter a curva de calibração, a concentração de massa seca de célula foi determinada por gravimetria. Uma amostra de volume conhecido das cepas em manutenção (câmara de fotoperíodo a 1.553 lux, a 30 °C, com ciclo claro/escuro de 12 h) foi coletada e submetida à centrifugação de 5000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado, adicionou-se água destilada e a amostra foi novamente centrifugada. O procedimento de lavagem foi realizado 2 vezes. Após o descarte do sobrenadante, o pellet foi transferido para um cadinho previamente seco em mufla (30 min, 550 °C) e pesado. Levou-se à estufa a 105 °C até peso constante e, em seguida, mediu-se a massa do conjunto cadinho mais a massa seca. A partir da massa de células e do volume da amostra, tem-se a concentração de células em g/L.

Paralelamente, a amostra da mesma cepa em manutenção foi coletada e prepararam-se diluições, sendo que, para cada uma delas, fez-se a leitura de absorbância, sendo o comprimento de onda de 610 nm para *Anabaena variabilis* e 650 nm para *Nostoc* sp, que foram determinados

por varredura espectral. Para o branco, foi usado água destilada. As curvas de calibração padrão (concentração de célula *versus* absorvância) estão dispostas no Apêndice A (Figuras A.1 e A.2).

Durante os ensaios, toda amostra coletada seguiu o mesmo procedimento de centrifugação e de 2 lavagens com água destilada antes da leitura da absorvância.

3.2.7.2 Concentração de açúcares

A quantificação dos açúcares foi realizada por cromatografia líquida de alto desempenho HPLC (High Performance Liquid Chromatography). A amostra foi filtrada em filtro 0,22 µm e injetada no cromatógrafo marca Shimadzu modelo LC-20A Promience, equipado com coluna SUPELCOGEL C-610H. As concentrações de glicose e lactose foram determinadas por detector de índice de refração. As análises foram realizadas utilizando ácido fosfórico (0,1 %) como fase móvel sendo a vazão da bomba de 0,5 mL/min, temperatura do forno de 32 °C e volume de injeção de 20 µL.

3.2.7.3 Concentração de FBP

As amostras após as extrações ou separação das fases dos ensaios de recuperação, foram analisadas por espectrofotometria ((Shimadzu UV mini-1240), de acordo com o comprimento de onda para cada FBP, sendo FE $\lambda = 562$ nm, FC $\lambda = 615$ nm e AFC $\lambda = 652$ nm e para proteína total – $\lambda = 280$ nm (AJAYAN *et al.*, 2012).

A concentração de cada FBP (mg.mL⁻¹) foi calculada de acordo com as Equações 5, 6 e 7, respectivamente (BENNETT e BOGORAD, 1973; LIU *et al.*, 2012).

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

$$[AFC] = \frac{A_{652} - 0,208.(A_{615})}{5,09} \quad (6)$$

$$[FE] = \frac{A_{562} - 2,41.(FC) - 0,849.(AFC)}{9,62} \quad (7)$$

A pureza (P) das FBP foi calculada também por espectrofotometria pela proporção entre os valores de absorvância da proteína de interesse pela absorvância de proteína total, de acordo com a Equação 8 (ABALDE *et al.*, 1998).

$$P = \frac{A_{FBP}}{A_{280}} \quad (8)$$

sendo A_{FBP} absorvância característica de cada FBP e A_{280} absorvância correspondente a proteína total.

3.2.7.4. Concentração de proteína total

De modo a determinar a concentração de proteínas totais de forma mais precisa após cada método de extração, utilizou-se o método de Bradford, utilizando o padrão soro de albumina bovina (AJAYAN *et al.*, 2012). A curva de calibração padrão utilizada, para macroensaio, está disposta no Apêndice A (Figura A.3).

CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE FICOBILIPROTEÍNAS

Nesta seção serão apresentados os resultados dos seguintes estudos: análise da solução extratora, do método de extração e da razão sólido-líquido (relação massa de célula e volume de solução extratora). Estas análises foram realizadas empregando *Nostoc* sp. Para *Anabaena variabilis* foram testados os mesmos métodos de extração, usando a solução extratora e a razão sólido-líquido que apresentaram melhores resultados nos ensaios com a *Nostoc* sp..

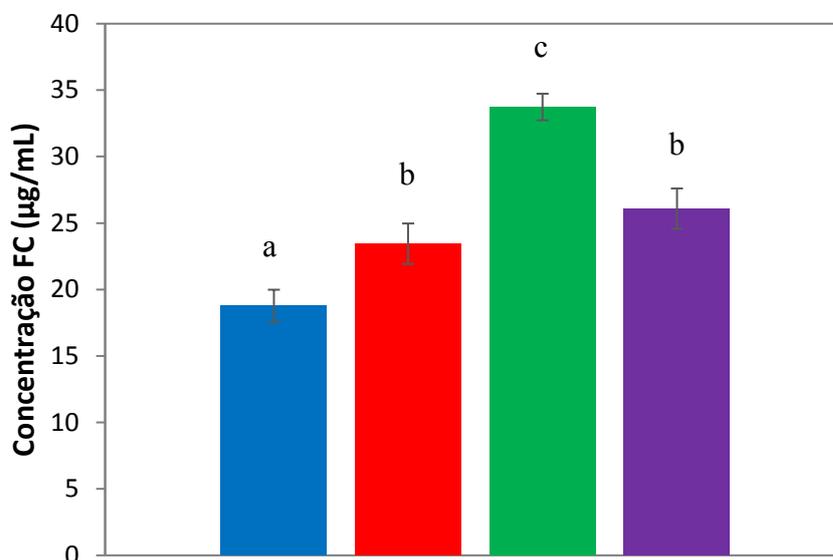
4.1.1 Avaliação da melhor solução extratora de FBP de *Nostoc* sp.

O método de extração utilizado para análise da melhor solução extratora foi o método de choque mecânico por vórtex com esferas de vidro, tendo sido realizados 3 ciclos de 5 minutos de rompimento combinados com 2 minutos da amostra no banho de gelo. Utilizou-se a razão de 1,1 g de esferas de vidro por mL de solução extratora e a análise foi realizada para uma cepa de *Nostoc* sp. com razão sólido-líquido de 1 g/L.

Sabendo que a ficocianina é a mais estudada na literatura e geralmente encontrada em maior teor dentre as ficobiliproteínas, determinou-se somente sua concentração nesta etapa e os resultados obtidos para cada solução extratora analisada são mostrados na Figura 8.

Pela Figura 8, observa-se que todas as soluções utilizadas foram capazes de extrair FC, sendo que a maior extração de FC foi obtida com tampão fosfato 0,1 M de pH 7,0 com obtenção de 33,7 µg/mL, apresentando concentração 29% maior que a segunda melhor solução extratora, o tampão fosfato pH 8,0. A solução extratora tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 é muito reportada na literatura para extração de FC (AJAYAN *et al.*, 2012; JOHNSON *et al.*, 2014), devido ao pH neutro, sendo um ambiente biocompatível para proteínas.

Figura 8 - Concentração de FC extraída por cada solução extratora usando o método de rompimento mecânico por vórtex e choque de esferas de vidro. Água destilada (■), Tampão fosfato: pH 6,0 (■), pH 7,0 (■) e pH 8,0 (■)

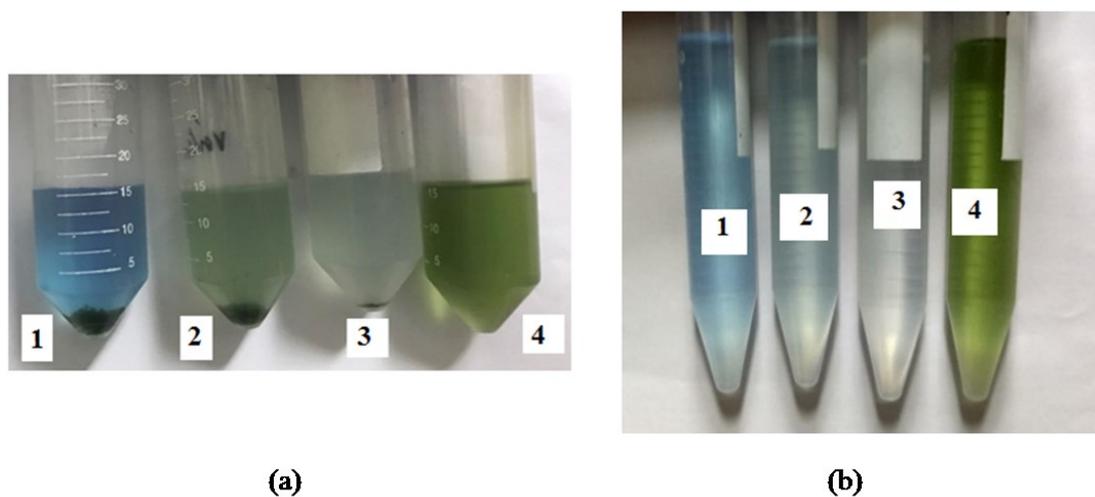


Valores representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes entre as colunas representam diferença estatística do Teste Tukey com $p < 0,05$.

4.1.2 Avaliação do método de extração

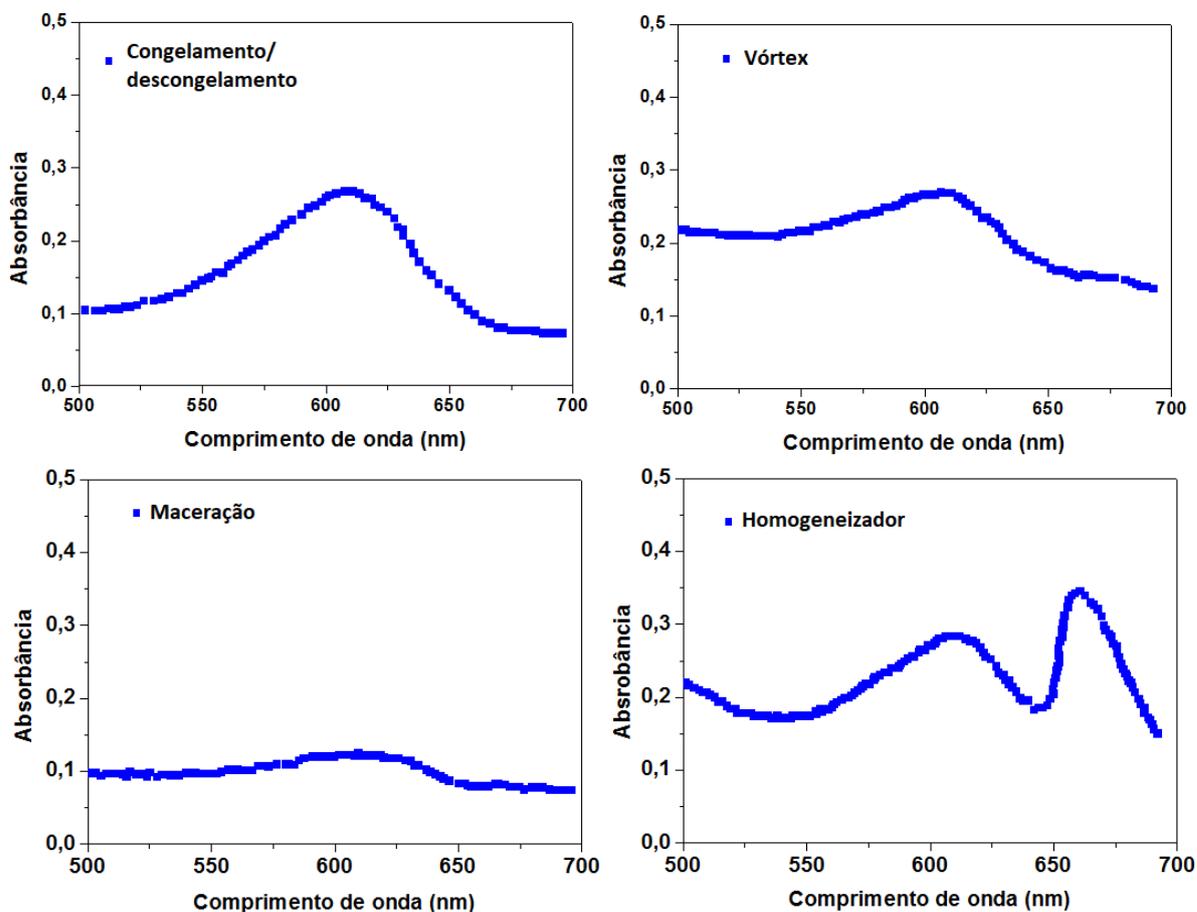
Para avaliação de diferentes métodos de extração, foi fixada solução extratora tampão fosfato pH 7,0 e ilustram-se na Figura 9 os extratos obtidos nos experimentos que empregaram a cepa de *Nostoc* sp., pelos diferentes métodos de extração testados, antes (a) e após (b) a centrifugação e filtração.

Figura 9 - Extratos obtidos pela cepa de *Nostoc* sp., pelos diferentes métodos de extração, (a) antes e (b) após filtração e centrifugação a 10.000 rpm. 1 - Ciclos de Congelamento/descongelamento; 2- Vórtex e esferas de vidro; 3- Almofariz e pistilo e 4- Homogeneizador ultrassônico



Ao comparar as Figuras 9(a) e 9(b), pode-se verificar que após a centrifugação, todos os extratos ficaram translúcidos, podendo ser analisados com mais precisão por espectrofotometria.

Para identificar as características do extrato obtido pelos diferentes métodos de extração e confirmar a presença de cada FBP, foi realizada a varredura espectral por espectrofotometria, verificando a presença de seus respectivos picos de absorvância máxima que, sendo estes: FE $\lambda = 562$ nm, FC $\lambda = 615$ nm e AFC $\lambda = 652$ nm (AJAYAN *et al.*, 2012). As varreduras espectrais para os extratos obtidos são mostradas na Figura 10.

Figura 10 - Varredura espectral dos extratos obtidos para *Nostoc* sp.

Pela Figura 10, notam-se picos acentuados de absorbância na região de 615 nm para todos os extratos, indicando presença de FC, e pico na região de 675 nm no espectro 4 indicando presença de clorofila no extrato. Outras informações importantes obtidas da varredura espectral estão relacionadas com a pureza, onde o espectro do método de congelamento e descongelamento apresentou o pico mais acentuado de absorbância em 615 nm e menor amplitude das linhas interferentes, indicando maior pureza de FBP no extrato. Além disso, não foram encontrados picos de absorbância nas regiões de 540-575 nm e 640-660 nm em nenhum dos extratos analisados, desconsiderando as presenças de FE e AFC para os extratos de *Nostoc* sp. Dessa forma, elas não serão consideradas nas análises e cálculos de FBP nos próximos ensaios de extração, assim como nas demais etapas que compõem este estudo (análise de sistemas aquosos bifásicos e produção de FBP).

Para cada extrato obtido foram analisadas pureza e concentração de FC, conforme a Tabela 7.

Tabela 7 - Pureza obtida do extrato da *Nostoc* sp.

Método de Extração	Pureza (FC)	[FC] ($\mu\text{g/mL}$)
Congelamento/descongelamento	$0,54 \pm 0,01$	$32,8 \pm 1,00$
Vórtex	$0,38 \pm 0,03$	$29,1 \pm 1,67$
Maceração	$0,22 \pm 0,03$	$10,5 \pm 1,54$
Homogeneizador	$0,34 \pm 0,01$	$30,1 \pm 0,77$

Pela Tabela 7 verifica-se maior concentração de FC nos métodos de congelamento e descongelamento por ultrassom ($32,8 \mu\text{g/mL}$), vórtex ($29,1 \mu\text{g/mL}$) e homogeneizador ultrassônico ($30,1 \mu\text{g/mL}$), indicando que o método de maceração ($10,5 \mu\text{g/mL}$) não foi eficiente para extração. Quanto à pureza, o método do ciclo de congelamento e descongelamento por ultrassom apresentou a maior pureza ($0,54$), mostrando ser o mais eficiente dentre os métodos testados.

De modo a realizar uma análise mais precisa da concentração de proteínas em cada extrato, foi realizado o método de Bradford (AJAYAN *et al.*, 2012). Os resultados estão dispostos na Tabela 8.

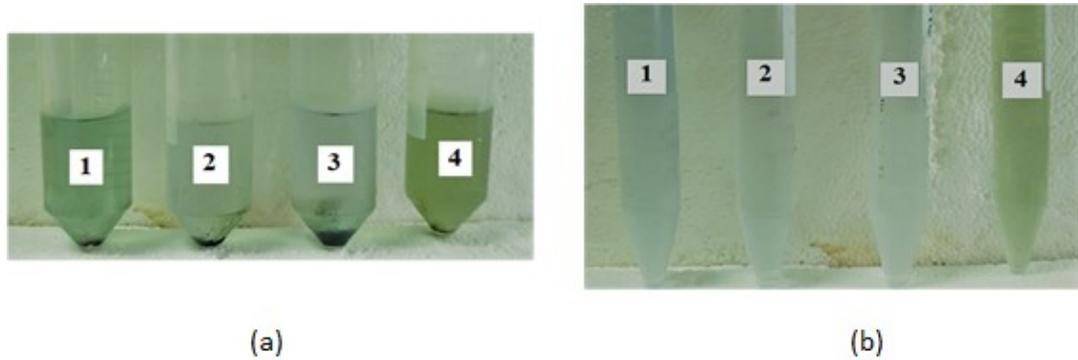
Tabela 8 - Concentração total de proteínas para cada extrato medida por Bradford

Método de Extração	[Proteína Total] (mg/mL)
Congelamento/descongelamento	$0,24 \pm 0,01$
Vórtex	$0,12 \pm 0,01$
Maceração	$0,05 \pm 0,00$
Homogeneizador	$0,17 \pm 0,01$

Nota-se maior concentração de proteína no extrato de congelamento e descongelamento, confirmando este método como o de melhor extração de proteínas para a *Nostoc* sp..

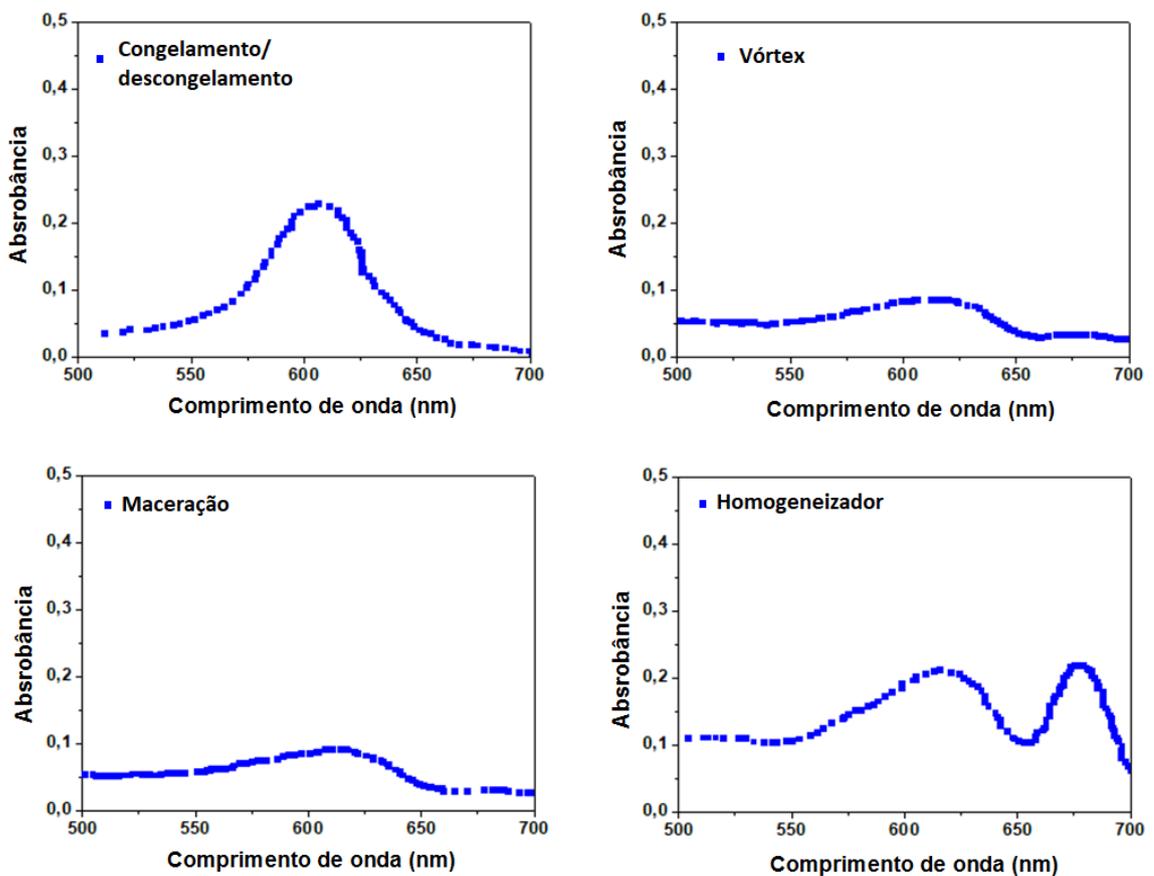
Os mesmos procedimentos foram realizados para os extratos obtidos a partir da cepa de *Anabaena variabilis*. Os extratos obtidos após cada método de extração são mostrados na Figura 11 antes (a) e após (b) centrifugação e filtração.

Figura 11 - Extratos obtidos pela cepa de *Anabaena variabilis* pelos diferentes métodos de extração. 1 - Ciclos de Congelamento/descongelamento; 2- Vórtex e esferas de vidro; 3- Almofariz e pistilo e 4- Homogeneizador ultrassônico



Do mesmo modo para identificar as características de cada extrato obtido pelos diferentes métodos de extração e confirmar a presença de cada FBP foi realizada a varredura espectral para cada amostra, representada pela Figura 12.

Figura 12 - Varredura espectral dos extratos obtidos para *Anabaena variabilis*



Pela varredura espectral, a tendência dos espectros de *Nostoc* sp. foi encontrada também para *Anabaena variabilis*, com maior pureza e absorvância na região de 615 nm para o extrato proveniente do congelamento e descongelamento, presença de absorvância característica de clorofila para o extrato utilizando homogeneizador e ausência de picos de absorvância para FE e FC. Para a cepa de *Anabaena variabilis*, também foi considerada apenas a presença de FC nas análises futuras.

As análises de pureza e concentração de FC obtidas estão representadas na Tabela 9.

Tabela 9 - Pureza e concentração obtida dos extratos da *Anabaena variabilis*

Método de Extração	Pureza FC	[FC] ($\mu\text{g/mL}$)
Congelamento/descongelamento	$0,59 \pm 0,03$	$34,6 \pm 1,27$
Vórtex	$0,41 \pm 0,05$	$12,6 \pm 1,73$
Maceração	$0,37 \pm 0,03$	$13,7 \pm 1,27$
Homogeneizador	$0,50 \pm 0,02$	$30,6 \pm 0,31$

Os resultados para concentração de proteína total, obtido pelo método de Bradford, estão mostrados na Tabela 10.

Tabela 10 - Concentração de proteínas totais em cada extrato para *Anabaena variabilis*

Método de Extração	[Proteína Total] (mg/mL)
Congelamento/descongelamento	$0,27 \pm 0,01$
Vórtex	$0,13 \pm 0,00$
Maceração	$0,16 \pm 0,00$
Homogeneizador	$0,21 \pm 0,01$

De acordo com a Tabelas 9 e 10, o extrato obtido por congelamento e descongelamento com ultrassom apresentou a maior concentração de FC ($34,6 \mu\text{g/mL}$) e proteína total ($0,27 \text{ mg/mL}$), como também verificado para a cepa de *Nostoc* sp.

A escolha do método de extração é fundamental para obtenção de FBP, uma vez que sua qualidade depende do tipo de método utilizado.

Conforme discutido, as amostras extraídas pelo método de ciclos de congelamento e descongelamento apresentaram apenas um pico de absorção na região de 615 nm (ficocianina), com menor amplitude das linhas interferentes. Neste tipo de extração, durante o congelamento

lento (temperaturas entre -20 e -4 °C), ocorre a formação de cristais de gelo maiores, com ruptura das membranas celulares, o que justifica a liberação de compostos intracelulares como as FBP, sendo mais facilmente extraídos com auxílio de uma solução extratora (COLLA e PRENTICE-HERNANDEZ, 2003). Realizando o descongelamento no banho ultrassônico, a extração é mais efetiva devido às características do método de sonicação como alto rendimento e menor tempo de processo (MANIRAFASHA *et al.*, 2016).

O método de congelamento e descongelamento combinado com ultrassom não é reportado na literatura, mas a combinação de seus efeitos apresentou melhores resultados do que quando realizados de forma separada, conforme reportado por Mittal *et al.* (2017). A utilização apenas de congelamento e descongelamento, em 10 ciclos de congelamento por 3 horas a -40°C e descongelamento a temperatura de 27°C, obteve concentração específica de ficocianina de 0,17 mg/g de biomassa seca e a utilização apenas de ultrassonicação, à 30° C, com amplitude de 120 µm e 10 min, apresentou concentração específica de 0,11 mg/g biomassa seca para *Gelidium pusillum* (Rhodophyta). O presente trabalho, combinando congelamento e descongelamento com ultrassom, partindo de uma razão sólido-líquido de 1 g/L, obteve concentração específica de FC de 32,8 mg/g para *Nostoc* sp. e 34,6 mg/g para *Anabaena variabilis*.

Em trabalhos realizados anteriormente por este mesmo grupo de pesquisa, foi testado a utilização de ciclos de congelamento e descongelamento, alterando tempo e temperatura do processo. Diferentemente do indicado pela literatura, onde conseguiram extrair somente pelos ciclos, em nenhuma das condições avaliadas foi obtido extrato contendo FBP, indicado pelo sobrenadante sem a cor característica destes pigmentos. Diante destes resultados, é possível sugerir que, primeiramente, pode haver diferenças dependendo da cepa utilizada e também que a combinação dos processos, como mostrado este trabalho, levou a um efeito sinérgico, melhorando consideravelmente a extração das FBP.

Métodos que desintegram ou esmagam as células (vórtex, maceração e homogeneizador) apresentam mais interferentes e contaminantes. Métodos por trituração em homogeneizador apresentam picos na região de 680 nm e 430 nm, indicando presença de clorofila (representando a coloração verde obtida no extrato). Já métodos de esmagamento (vórtex e maceração) apresentam picos de menor amplitude, ocasionados pela presença de resquícios e detritos celulares presentes no extrato (SILVA, 2008).

A escolha de métodos utilizando baixas temperaturas se deve à pureza do extrato obtido. Silveira *et al.* (2007) demonstraram que ao aumentar a temperatura da extração, outras

proteínas e lipídeos acabavam sendo extraídas junto com as FBP, além de poder ocasionar sua desnaturação, gerando redução de sua pureza no extrato bruto.

Desse modo, o método de extração escolhido para obtenção do extrato bruto das cianobactérias *Nostoc* sp. e *Anabaena variabilis* foi o método de congelamento e descongelamento com ultrassom, pelas vantagens de maior pureza obtida no extrato bruto, maior quantidade de FBP obtida e maior capacidade para extração, levando em conta a utilização de congeladores comerciais na etapa de congelamento.

4.1.3 Avaliação da melhor razão sólido-líquido

Fixada a solução extratora tampão fosfato 0,1 M e pH 7,0 e o método de extração por congelamento e descongelamento com ultrassom, foi realizado o estudo para a razão sólido-líquido (massa de célula/volume de tampão fosfato) capaz de obter maior massa de FC durante a extração.

As concentrações e massas de FC obtidas, para cada razão sólido-líquido estão mostradas na Tabela 11.

Tabela 11 - Concentração de FC obtidas nas diferentes razões S/L para *Nostoc* sp.

Razão S/L (g/L)	C _{FC} (µg/mL)	C _{FC} específica (mg FC/g célula)
1,0	32,80 ± 1,00	32,80
0,6	19,15 ± 0,33	31,92
0,4	16,93 ± 0,04	42,32
0,3	10,19 ± 0,06	33,97

Analisando as razões sólido-líquido, nota-se que, ao aumentarmos o volume de solução extratora em 40% (razão de 1,0 para 0,6), ocorre redução de 2,8% na concentração específica de FC extraídas. Por outro lado, ao aumentarmos o volume de solução extratora em 110% (razão de 1 para 0,4), ocorre aumento de 29% da concentração específica de FC extraída, sendo a razão da qual se obteve a maior concentração obtida. Ao aumentar o volume da solução extratora em 180% (razão 1 para 0,3), ocorre aumento de apenas 3,6% na concentração de FC obtida, não justificando sua utilização. Desse modo, a razão sólido-líquido utilizada nos demais experimentos foi fixada como 0,4 g células/L de solução extratora utilizada.

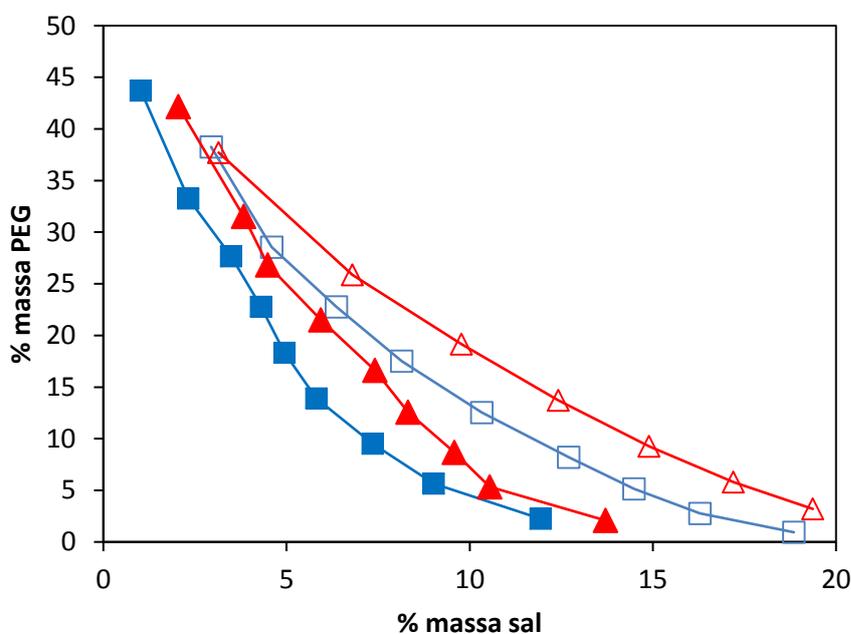
Assim sendo, a partir da avaliação dos procedimentos de extração de FC das cianobactérias *Nostoc* sp. e *Anabaena variabilis*, cultivadas em meio basal BG11o, foi definida a condição para se obter um extrato com o maior teor de FC aplicando o método de congelamento e descongelamento com ultrassom, solução extratora tampão fosfato 0,1 M pH 7,0 e razão sólido-líquido de 0,4 g/L.

Nestas condições, foram obtidos extratos de ambas cianobactérias para a posterior etapa deste trabalho, o processo de recuperação de FBP por sistemas aquosos bifásicos do tipo PEG-sal.

4.2 ESTUDO DO PROCESSO DE RECUPERAÇÃO DAS FBP

Os sistemas aquosos bifásicos avaliados neste estudo para recuperação de FC de cianobactérias utilizaram PEG 1500 e PEG-4000 e os sais fosfato de potássio e citrato de sódio. De modo a definir as proporções a serem avaliadas, primeiramente, determinaram-se as curvas binodais para cada um destes sistemas, indicadas no diagrama de fases da Figura 13.

Figura 13 - Diagrama de fase PEG-sais a 15 ° C. PEG 1500-fosfato de potássio (□), PEG 1500-citrato de sódio (△), PEG 4000-fosfato de potássio (■) e PEG 4000-citrato de sódio (▲)



A partir do diagrama de fase obtido, verifica-se que a formação do sistema bifásico foi facilitada nos sistemas formados com fosfato de potássio e pelo uso do PEG de maior peso molecular, uma vez que uma menor quantidade deste sal ou uma menor quantidade de PEG

4000 permitem ampliar a região de duas fases. Tomando como pontos para ilustrar esta observação, pode-se comparar as curvas binodais PEG 1500 para ambos os sais. Ao escolher a concentração de PEG de 22,8% (m/m), uma concentração superior a 6,4 % (m/m) de fosfato de potássio é suficiente para obter duas fases, enquanto que para o citrato de sódio, esta porcentagem é cerca de 9%. De forma semelhante, observando as duas curvas binodais PEG 1500 e 4000 para fosfato de potássio, para a concentração do sal de 6,4%, a concentração do polímero é reduzida de 22,8% para o PEG 1500 para, aproximadamente, 12,5%, ou seja, com uma quantidade 45% menor de PEG 4000 já é possível se ter uma separação de fases.

Com relação ao efeito do peso molecular do polímero, este resultado está de acordo com a literatura (ASENJO e ANDREWS, 2012), ou seja, quanto maior o peso molecular do PEG, uma menor concentração é necessária para se atingir a região bifásica do diagrama de fases.

De acordo com a literatura, a influência do sal na formação do sistema bifásico é complexa e depende da força iônica do sal, das cargas dos cátions e ânions e da solubilidade do sistema.

Baskaran *et al.* (2018) ao estudarem SABs formados por PEG 600 e os sais fosfato de potássio, sulfato de amônio e sulfato de sódio, verificaram que o sistema formado por fosfato de potássio apresentou maior facilidade de formar sistema bifásico. Apesar de não apresentar dados de solubilidade dos sais nestes sistemas, estes autores sugerem que esta facilidade se deve ao fosfato de potássio ser mais solúvel.

A solubilidade não é o único parâmetro a ser considerado na formação dos SABs, deve-se considerar também o efeito da carga dos íons. No trabalho desenvolvido por De Souza *et al.* (2013), foram analisados sais que possuíam o mesmo cátion (Na^+) e foi verificado que os sistemas com citrato de sódio também levaram a menores regiões bifásicas do que os sistemas contendo fosfato de sódio.

Com base nos diagrama de fases, estabeleceram-se as proporções de 13% PEG – 14% sal, 10% PEG – 15,9% sal e 20% PEG – 9,9% sal, que estão localizados na região de duas fases para os quatro diagramas e, em seguida, foram preparados SABs para PEG 1500 e PEG 4000 com os sais citrato de sódio e fosfato de potássio, de modo a estudar a partição das FBP em entre as fases topo e fundo.

Os extratos iniciais utilizados para recuperação por SAB de cada cianobactéria, cultivada em meio BG110, estão mostrados na Figura 14, com suas respectivas concentrações e purezas de FC, apresentados na Tabela 12.

Figura 14 - Extratos utilizados para purificação por SAB. 1- Extrato *A. variabilis* após ciclos de congelamento e descongelamento, 2- Extrato de *A. variabilis* após centrifugação e filtração; 3- Extrato de *Nostoc* sp. após os ciclos de congelamento e descongelamento; 4- Extrato de *Nostoc* sp. após centrifugação e filtração

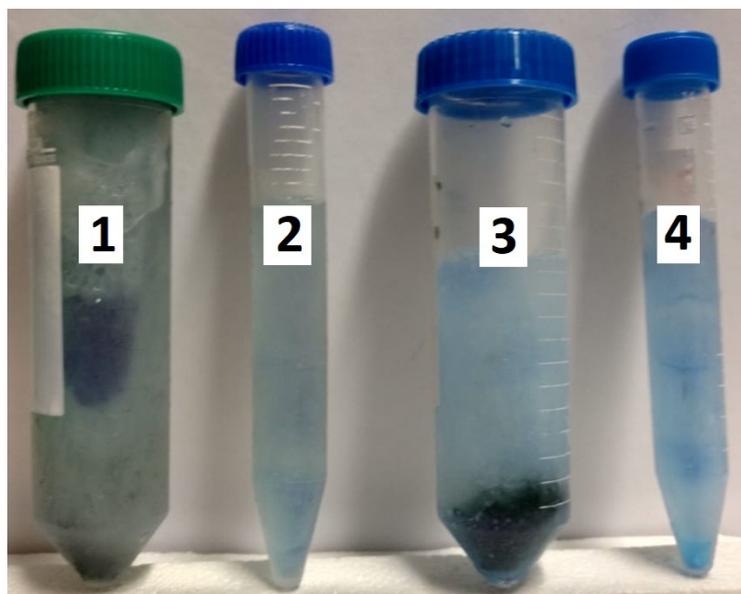


Tabela 12 - Concentração e pureza de FC dos extratos iniciais utilizados para separação por SAB

Cepa	A ₂₈₀	A ₆₁₅	Pureza FC	[FC] (µg/mL)
<i>Anabaena variabilis</i>	0,435	0,292	0,548	32,87
<i>Nostoc</i> sp.	0,288	0,184	0,638	28,1

Para os extratos de *Anabaena variabilis*, os resultados das 3 proporções utilizadas são mostrados nas Tabelas 13, 14 e 15.

Tabela 13 - 1ª Proporção SAB para extrato de *A. variabilis* (13% PEG e 14% sal)

Sal	PM PEG	K-FC ¹	P-FC ²	R FC(%) ³	Vr ⁴	pH
Fosfato de Potássio	1500	5,44	1,11 ± 0,02	81,76 ± 0,13	0,82	7,17 ± 0,04
Citrato de Sódio	4000	2,77	0,96 ± 0,04	67,77 ± 0,10	0,76	
	1500	4,57	0,88 ± 0,01	83,54 ± 0,11	1,11	8,31 ± 0,04
	4000	1,74	0,82 ± 0,01	56,66 ± 0,21	0,75	

¹ coeficiente de partição, ² pureza, ³ recuperação, ⁴ razão de volume (topo/fundo)

Tabela 14 - 2ª Proporção SAB para extrato de *A. variabilis* (10% PEG e 15,9% sal)

Sal	PM PEG	K-FC ¹	P-FC ²	R FC(%) ³	Vr ⁴	pH
Fosfato de Potássio	1500	5,74	1,12 ± 0,02	82,40 ± 0,11	0,80	7,17 ± 0,04
Citrato de Sódio	4000	3,93	1,00 ± 0,03	79,22 ± 0,14	0,58	8,31 ± 0,04
Fosfato de Sódio	1500	5,89	0,83 ± 0,01	72,49 ± 0,07	0,44	8,31 ± 0,04
Citrato de Potássio	4000	5,00	1,02 ± 0,02	71,85 ± 0,14	0,51	8,31 ± 0,04

¹ coeficiente de partição, ² pureza, ³ recuperação, ⁴ razão de volume (topo/fundo)

Tabela 15 - 3ª Proporção SAB para extrato de *A. variabilis* (20% PEG e 9,9% sal)

Sal	PM PEG	K-FC ¹	P-FC ²	R FC(%) ³	Vr ⁴	pH
Fosfato de Potássio	1500	4,02	0,91 ± 0,02	91,87 ± 0,11	1,62	7,17 ± 0,04
Citrato de Sódio	4000	3,21	1,06 ± 0,05	83,60 ± 0,14	1,59	8,31 ± 0,04
Fosfato de Sódio	1500	3,66	0,94 ± 0,03	92,42 ± 0,15	1,45	8,31 ± 0,04
Citrato de Potássio	4000	2,30	0,70 ± 0,01	80,16 ± 0,06	1,76	8,31 ± 0,04

¹ coeficiente de partição, ² pureza, ³ recuperação, ⁴ razão de volume (topo/fundo)

De acordo com as Tabelas 13 a 15, primeiramente notam-se coeficientes de partição maiores que 1, indicando para todos os SABs a partição preferencial da FC pela fase topo, ou seja, a fase rica em PEG. Esse comportamento é atribuído à maior afinidade da FC com PEG (PATIL *et al.*, 2008).

Com relação à variação do peso molecular do PEG, principalmente para as proporções entre PEG e sal de 13% PEG e 14% sal (1ª proporção) e de 20% PEG e 9,9% sal (3ª proporção), nota-se que diminuindo o peso molecular do PEG, ocorre aumento da recuperação de FC e aumento do coeficiente de partição para ambos os sais. A maior recuperação de FC em PEG de peso molecular mais baixo está relacionada com o aumento do volume livre disponível para proteína na fase topo, uma vez que o tamanho da cadeia carbônica da molécula de PEG diminui (PATIL e RAGHVARAO, 2007; LIU *et al.*, 2012). As maiores recuperações são obtidas na 3ª proporção (91,87% para o fosfato de potássio e 92,42% para o citrato de sódio, ambas para o PEG 1500), sendo que a razão de volume entre as fases é a maior entre as proporções PEG-sal analisadas, aumentando ainda mais o volume livre disponível para a FC.

Ao se analisar os resultados a respeito do tipo de sal, nota-se que para o sal fosfato de potássio foram obtidos os maiores coeficientes de partição, sendo os melhores, 5,44 e 5,74,

resultados para a 1ª proporção (13% PEG e 14% sal) e para a 2ª proporção (10% PEG e 15,9% sal), respectivamente, que foram as proporções com maiores teores de sal. Para a recuperação, o efeito do sal é pronunciado para PEG de maior peso molecular (PEG 4000) e quando o teor de sal é maior, ou sejam 1ª e 2ª proporções. Nestas proporções, o uso do fosfato de potássio levou a uma recuperação 11% e 8% maior do que com o citrato de sódio, respectivamente, para a 1ª e a 2ª proporção. Para a 3ª proporção, não há diferença considerável da porcentagem de recuperação da FC entre os sais.

O efeito do sal é abordado na partição de proteínas por Asenjo e Andrews (2012). Eles explicaram que o peso molecular e a hidrofobicidade da proteína também devem ser levados em consideração. As proteínas, cada uma com seu peso molecular e sua conformação tridimensional, estão sujeitas a efeitos estéricos impostos pelos componentes do sistema, que estão relacionados com o efeito de volume livre, ou seja, o volume disponível para o soluto de migrar para uma fase. Ao se analisar a recuperação de diferentes proteínas, em sistemas PEG-sal com diferentes concentrações de NaCl (usado para aumentar o efeito *salting-out*), não houve uma correlação clara entre peso molecular da proteína e coeficiente de partição. Com relação à hidrofobicidade, o efeito de partição foi maior para proteínas mais hidrofóbicas.

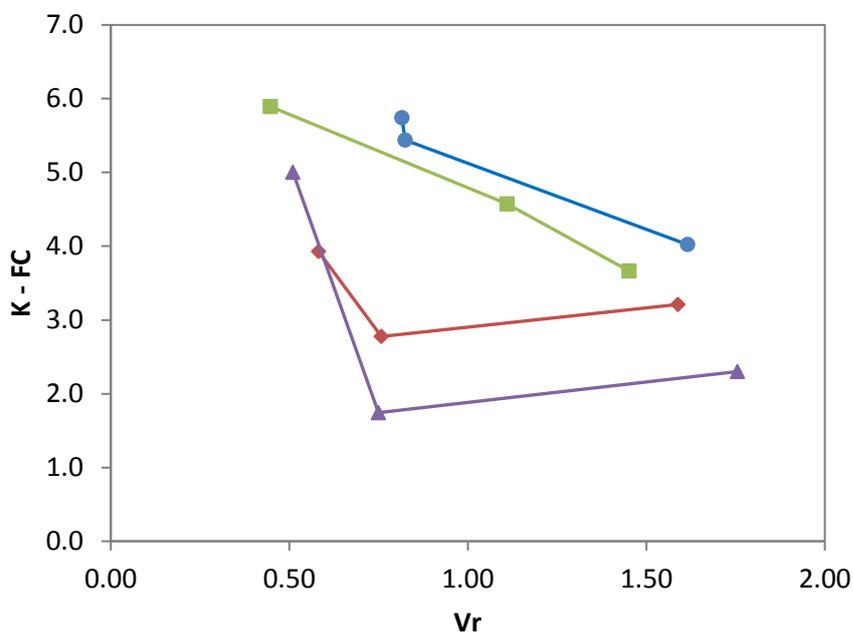
A respeito da pureza, para a *Anabaena variabilis*, não há grandes diferenças entre o tipo de sal e o peso molecular, sendo que os maiores valores estão na faixa de 1,00 a 1,12. Entretanto, pode-se observar as maiores purezas encontradas nos sistemas PEG-fosfato, sendo 1,11 para 1ª proporção com PEG 1500, 1,12 para 2ª proporção com PEG 1500 e 1,06 para 3ª proporção com PEG 4000. Patil *et al.* (2008) reportaram comportamento de maior pureza obtida para sistemas PEG-fosfato devido ao ambiente biocompatível, relacionado com a alta estabilidade da ficocianina na faixa de pH entre 5 e 8.

A pureza está relacionada ao fracionamento da FC na fase topo em contrapartida de outras proteínas e compostos contidos no extrato utilizado, que se particionarão para fase fundo ou interface do SAB e, portanto, há uma maior absorção obtida no seu comprimento de onda característico ($\lambda = 615$ nm), juntamente com a diminuição da absorbância relacionada a proteína total ($\lambda = 280$ nm).

A máxima pureza encontrada dentre os SABs avaliados para o extrato de *Anabaena variabilis* foi para o sistema PEG-fosfato de potássio da 2ª proporção, com pureza de 1,12, contra 0,67 do extrato inicial, representando um aumento de pureza de 66%.

A relação entre o coeficiente de partição da FC (K-FC) e a razão de volume entre as fases (V_r) é ilustrada na Figura 15.

Figura 15 - Efeito Vr em relação ao K-FC para *Anabaena variabilis*. PEG 1500-fosfato de K (●), PEG-4000-fosfato de K (◆), PEG 1500-citrato de Na (■) e PEG 4000-citrato de Na (▲)



Observa-se pela Figura 15 que, para os sistemas de PEG 1500, à medida que a relação entre os volumes das fases diminui o coeficiente de partição aumenta, tendo-se os maiores valores K-FC, 5,89 para o citrato de sódio e 5,74 para o fosfato de potássio, para Vr iguais a 0,44 e 0,82, respectivamente. Este resultado condiz com a influência do PEG já discutida. Para o PEG 1500, à medida que a sua concentração diminuiu, houve um maior de volume livre permitindo a maior migração da FC para a fase topo. Já para os sistemas de PEG 4000, não houve uma tendência clara entre o coeficiente de partição e a relação entre as fases, apresentando um valor mínimo para K-FC, para ambos os sais, na região de Vr igual a 0,75, que corresponde à primeira proporção (13% PEG e 14% sal).

Para os extratos de *Nostoc* sp., os resultados das 3 proporções utilizadas são mostrados nas Tabelas 16, 17 e 18.

Tabela 16 - 1ª Proporção SAB para extrato de *Nostoc* sp. (13% PEG e 14% sal)

Sal	PM PEG	K-FC ¹	P-FC ²	R FC(%) ³	Vr ⁴	pH
Fosfato de Potássio	1500	6,04	0,96 ± 0,03	82,92 ± 0,10	0,80	7,17 ± 0,04
	4000	5,37	0,88 ± 0,06	80,60 ± 0,06	0,77	
Citrato de Sódio	1500	3,15	1,2 ± 0,02	76,67 ± 0,40	1,04	8,31 ± 0,04
	4000	3,48	0,71 ± 0,01	73,31 ± 0,15	0,79	

¹ coeficiente de partição, ² pureza, ³ recuperação, ⁴ razão de volume (topo/fundo)

Tabela 17 - 2ª Proporção SAB para extrato de *Nostoc* sp. (10% PEG e 15,9% sal)

Sal	PM PEG	K-FC ¹	P-FC ²	R FC(%) ³	Vr ⁴	pH
Fosfato de Potássio	1500	6,36	1,34 ± 0,04	79,10 ± 0,06	0,595	7,17 ± 0,04
	4000	5,09	0,99 ± 0,04	73,36 ± 0,06	0,540	
Citrato de Sódio	1500	3,88	0,69 ± 0,01	67,05 ± 0,20	0,524	8,31 ± 0,04
	4000	1,99	0,87 ± 0,01	48,65 ± 0,15	0,474	

¹ coeficiente de partição, ² pureza, ³ recuperação, ⁴ razão de volume (topo/fundo)

Tabela 18 - 3ª Proporção SAB para extrato de *Nostoc* sp. (20% PEG e 9,9% sal)

Sal	PM PEG	K-FC ¹	P-FC ²	R FC(%) ³	Vr ⁴	pH
Fosfato de Potássio	1500	4,02	0,87 ± 0,04	87,04 ± 0,15	1,67	7,17 ± 0,04
	4000	2,61	0,68 ± 0,02	81,27 ± 0,15	1,66	
Citrato de Sódio	1500	4,75	0,69 ± 0,01	64,85 ± 0,06	2,06	8,31 ± 0,04
	4000	1,87	0,63 ± 0,01	79,17 ± 0,20	2,03	

¹ coeficiente de partição, ² pureza, ³ recuperação, ⁴ razão de volume (topo/fundo)

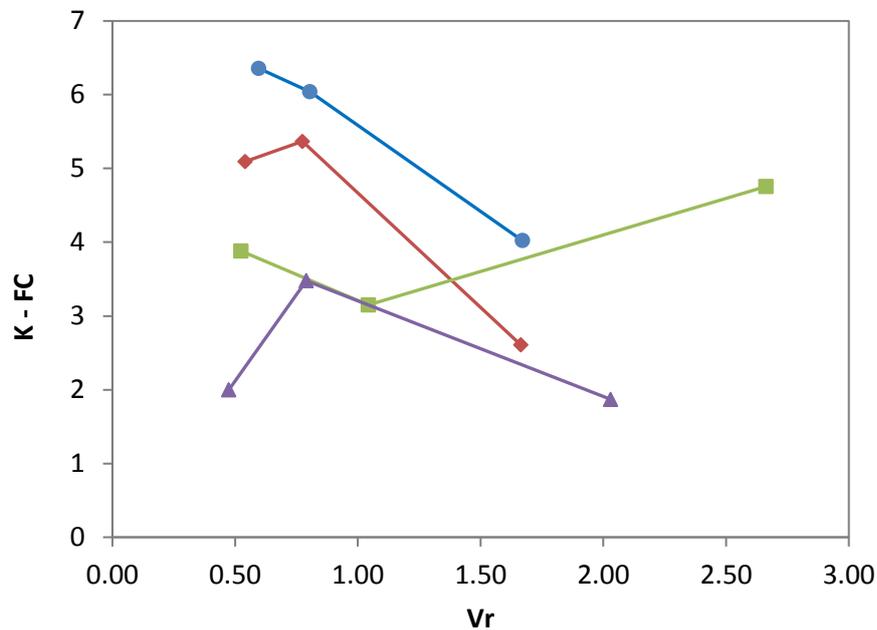
De acordo com as tabelas, do mesmo modo como ocorrido para o extrato de *Anabaena variabilis*, ocorreu aumento da recuperação de FC com a diminuição do peso molecular do PEG e todos os coeficientes de partição obtidos são maiores que 1, indicando partição da FC para a fase topo.

A relação entre peso molecular de PEG e recuperação de FC, mostrou à mesma tendência observada para o extrato de *Anabaena variabilis*, com aumento da recuperação com a diminuição do peso molecular do PEG, com exceção para PEG 4000-citrato de sódio para 3ª proporção.

Uma comparação importante entre os extratos é a menor recuperação de FC para os extratos de *Nostoc* sp., principalmente, para os sistemas PEG-citrato de sódio, podendo indicar alguma diferença estrutural da FC de cada cianobactéria. Pode-se citar também a ocorrência de precipitação da interface destes sistemas no caso particular do extrato de *Nostoc* sp., o que pode influenciar seus parâmetros de recuperação e separação. Patil e Raghvarao (2007) também relataram a precipitação de FC na interface de sistemas de PEG com peso molecular acima de 4000, o que corrobora com os resultados deste trabalho, uma vez que o peso molecular PEG comercial é um valor aproximado.

Os coeficientes de partição da FC apresentaram mesmo comportamento em relação aos SABs com extrato de *Anabaena variabilis*, sendo obtidos os maiores valores para os sistemas de PEG 1500. A relação entre coeficiente de partição e razão de volume entre as fases é mostrada na Figura 16.

Figura 16 - Efeito Vr em relação ao K-FC para *Nostoc* sp. PEG 1500-FP (●), PEG-4000-FP (◆), PEG 1500-CS (■) e PEG 4000 (▲)



A relação Vr com K-FC mostra um efeito parecido com o sistema utilizando extrato de *Anabaena variabilis* apenas para o sistema PEG 1500-fosfato de potássio. O sistema de PEG 1500-citrato apresentou comportamento semelhante aos sistemas de PEG 4000 utilizando o extrato anterior, ou seja, comportamento de mínimo, sendo que K-FC tende ao mínimo valor na região de Vr igual a 1. Os sistemas PEG-4000 apresentam comportamento de máximo valor para K-FC na região de 0,75 de Vr.

Os sistemas PEG 1500 também apresentaram pureza superior aos sistemas PEG 4000, novamente com exceção do sistema PEG 4000-citrato de sódio para 3ª proporção.

O maior valor de pureza de FC também foi obtido para o sistema PEG 1500-fosfato de potássio da 2ª proporção, sendo 1,34, 20% maior que a máxima pureza encontrada após purificação do extrato de *Anabaena variabilis*. Comparando com o valor inicial de pureza do extrato da *Nostoc* sp., 0,638, houve um aumento de 2,1 vezes na pureza após purificação por SAB, aumento de pureza próximo ao encontrado como fator de purificação por Patil *et al.* (2008), de 2,11, na purificação de FC obtida de *Spirulina platensis*.

Na busca pelo melhor SAB, a variável termodinâmica mais usualmente utilizada na escolha é o coeficiente de partição, juntamente com a maior pureza. Como o sistema PEG 1500-fosfato de potássio possui maior coeficiente de partição para *Nostoc* sp. (K-FC 6,36) e o segundo maior para *Anabaena variabilis* (K-FC 5,74) e maiores purezas para ambos extratos

para a 2ª proporção PEG-sal, este pode ser considerado o melhor SAB encontrado para purificação de FC a partir dos extratos destas cianobactérias.

Na literatura, os melhores SAB do tipo PEG-sal relatados também têm sido PEG-fosfato de potássio. Rito-Palomares *et al.* (2001) encontraram o melhor SAB para purificação de FC de *Spirulina maxima* no PEG 1450-fosfato de potássio, obtendo pureza final de FC de 2,1 partindo da pureza inicial de 0,7. Patil e Raghvarao (2007) relataram o melhor sistema sendo PEG 4000-fosfato de potássio, obtendo K-FC de 10,47 e pureza final de 2,75 (pureza inicial de 1,18) para FC, além da recuperação de 90,57% na fase topo, para extrato de *Spirulina platensis*. Liu *et al.* (2012) também estudando a purificação de FC para *Spirulina platenis*, observaram o melhor sistema sendo PEG 6000-fosfato de potássio, atingindo pureza de 0,82 (pureza inicial de 0,5), K-FC de 10,64 e recuperação de 57% para FC para extração por SAB em um estágio.

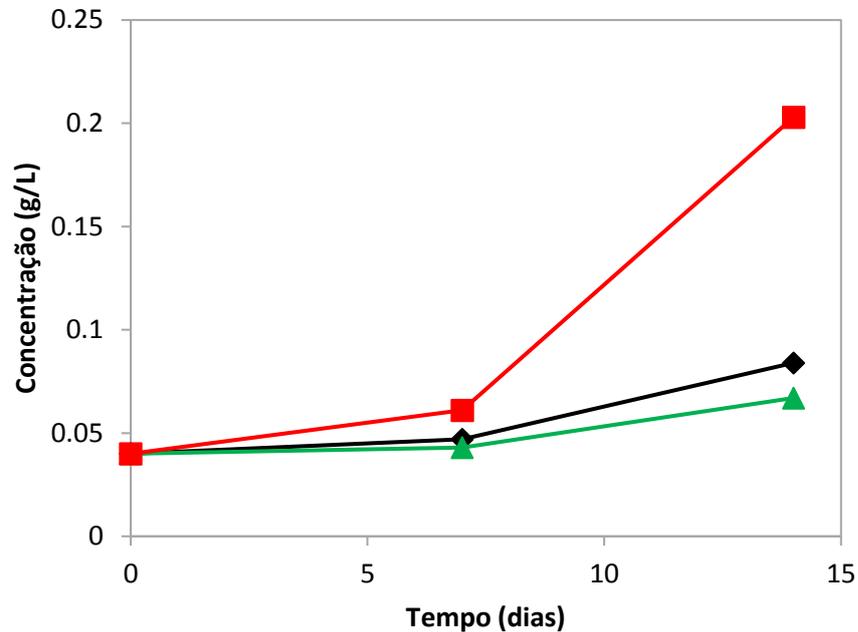
4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO COM FONTE DE CARBONO E DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE FICOCIANINA POR CIANOBACTÉRIAS

As cianobactérias são agentes com alto potencial para produção de diversos metabólitos, hidrogênio, fármacos, antimicrobianos e as ficobiliproteínas. Como a produção de metabólitos é influenciada pelas condições de cultivo, neste estudo foram abordados quatro parâmetros e seus efeitos foram investigados quanto à produção de ficocianina e ao crescimento de biomassa. O tipo de fonte de carbono e a concentração inicial de inóculo foram avaliados em ensaios somente com a *Nostoc sp.* A partir das condições que indicaram maiores concentrações celulares e de ficocianina, os parâmetros concentração de fonte de carbono e concentração de fonte de nitrogênio foram avaliados tanto para *Nostoc sp.* como para *Anabaena variabilis*.

4.3.1 Avaliação do efeito do tipo de fonte de carbono na suplementação do meio controle (BG11o)

No primeiro ensaio, avaliou-se a influência da fonte de carbono (2 g/L) suplementado ao meio basal BG11o, sendo elas a glicose P.A. e a lactose proveniente de permeado de soro de leite. Este teste foi realizado com *Nostoc sp.* empregando uma concentração inicial de 10% (v/v) de inóculo, correspondendo a uma concentração inicial de 0,04 g/L, por 14 dias. O perfil de concentração celular em função do tempo é apresentado na Figura 17.

Figura 17 - Perfil de concentração celular para diferentes meios: BG11o, BG11o suplementado com permeado de soro de leite (teor de lactose, 2 g/L) e BG11o suplementado com glicose (2 g/L) e. Controle (◆), PSL (▲), Glicose (■).

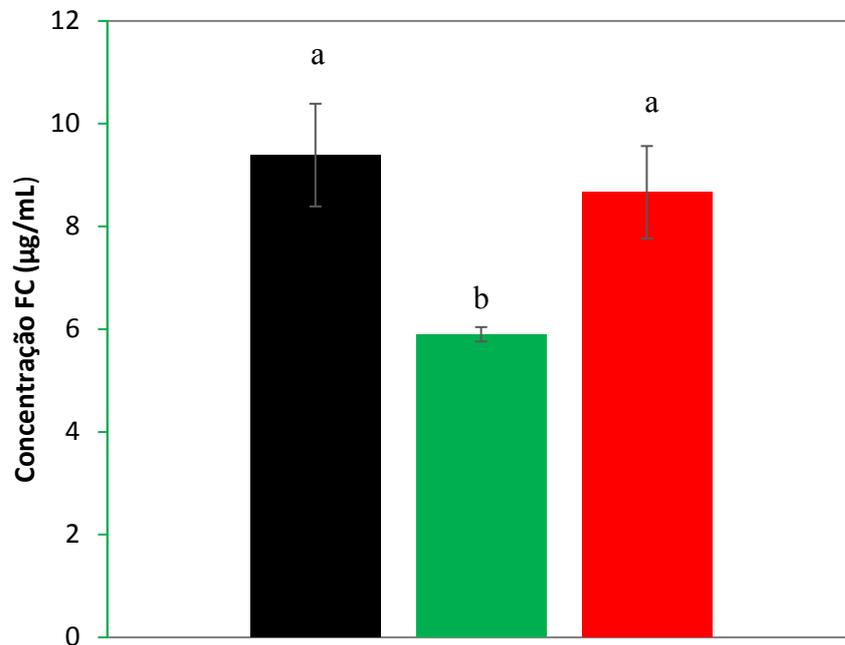


Observa-se pela Figura 17 que o meio suplementado com permeado de soro de leite (PSL) não favoreceu o crescimento de biomassa, não havendo diferença expressiva nas concentrações ao final de 14 dias entre as *Nostoc* sp. cultivada em meio BG11o e o meio contendo o PSL, sendo as concentrações 0,09 g/L e 0,07 g/L, respectivamente.

Para o meio contendo glicose como fonte de carbono, houve um crescimento 2,4 vezes maior do que o observado no meio BG11o. Apesar de a lactose ser um açúcar utilizado por vários microrganismos, neste caso, os demais constituintes do PSL podem não ter favorecido o crescimento da biomassa. De acordo com a especificação do PSL, ele possui no mínimo 80% de lactose e 3% de proteína e máximo de 1,5% de gordura e de 6% de cinzas (ROMÃO, 2015).

O efeito do tipo de açúcar também foi investigado quanto à produção de ficocianina, com resultados apresentados na Figura 18.

Figura 18 - Obtenção de FC para meios com adição de fonte de carbono orgânico para *Nostoc* sp. Controle (■), PSL (■) e Glicose (■)

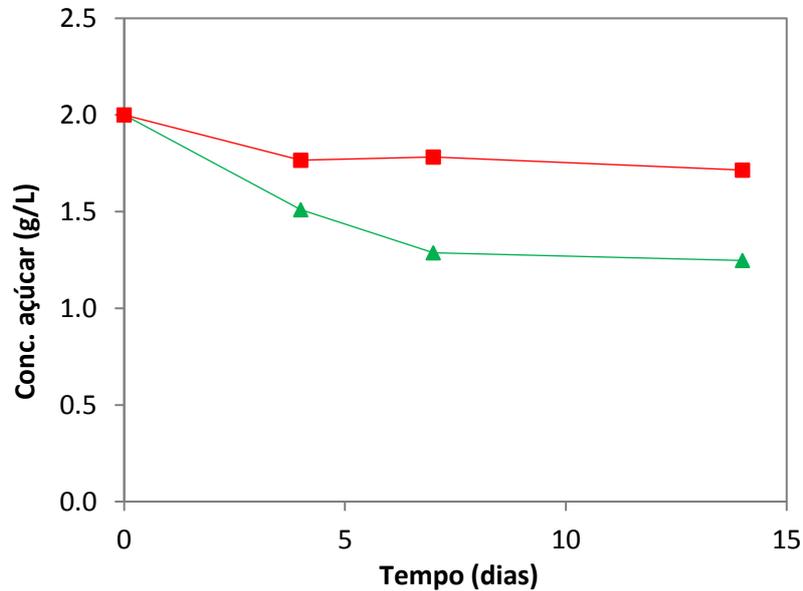


Valores representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes entre as colunas representam diferença estatística do Teste Tukey com $p < 0,05$.

Pela Figura 18, a concentração de FC para o ensaio controle (meio basal BG11₀) foi de 9,39 $\mu\text{g/mL}$, para o meio com permeado foi de 5,9 $\mu\text{g/mL}$ e para o meio contendo glicose foi de 8,66 $\mu\text{g/mL}$. Esses dados indicam que a sua concentração de FC não foi influenciada positivamente pela adição do permeado e que as concentrações obtidas pelo meio controle e pelo meio contendo glicose não apresentam diferenças estatísticas. Apesar do crescimento da biomassa, não houve o aumento da produção de ficocianina.

Com relação ao consumo de açúcar, ilustrado na Figura 19, nota-se que a lactose apresentou maior consumo ao longo de 14 dias de processo do que a glicose. A lactose foi consumida em 38%, enquanto a glicose em 14%.

Figura 19 - Perfil de consumo de açúcar para diferentes meios: BG11o, BG11o suplementado com glicose (2 g/L) e BG11o suplementado com permeado de soro de leite (teor de lactose, 2 g/L). Lactose (▲), Glicose(■)



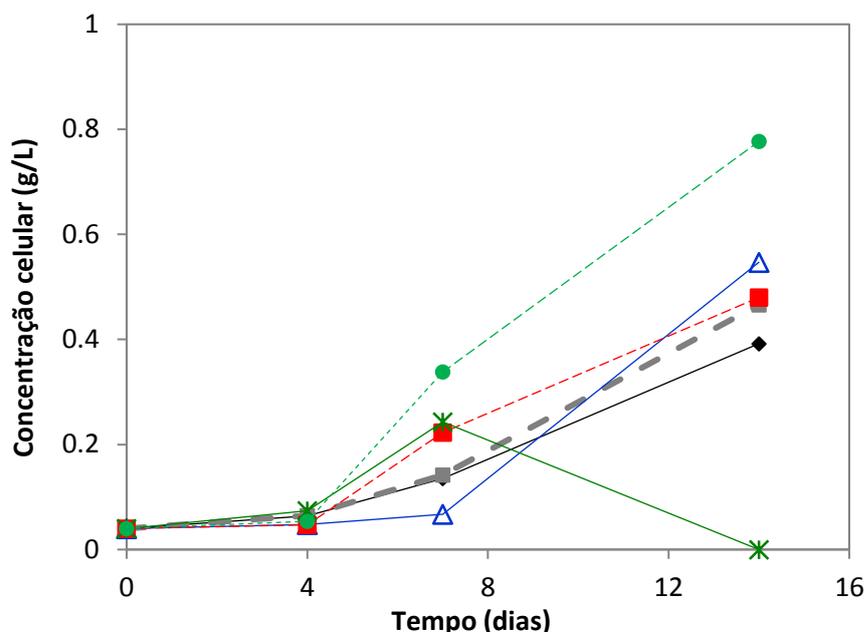
Apesar destes resultados preliminares não indicarem o aumento da concentração de FC pela adição do açúcar ao meio de cultivo, nos testes seguintes ainda foi mantida a suplementação de açúcar, uma vez que na literatura é relatado o efeito positivo de uma fonte de carbono (LEBEDEVA *et al.*, 2005; KHATTAR *et al.*, 2015).

Estes novos testes foram realizados com a glicose, uma vez que houve um aumento maior de biomassa, e não há interferências de constituintes como no caso do PSL. Nestes testes, alterou-se a concentração desta fonte de carbono e verificou-se o efeito da adição de nitrato ao meio BG11o.

4.3.2 Avaliação do efeito da concentração de glicose e de nitrato de sódio na suplementação do meio controle (BG11o) no cultivo de *Nostoc* sp.

Os resultados para avaliação do efeito da suplementação de fonte de nitrogênio ao meio de cultivo BG11o, com e sem presença de glicose, para a cepa de *Nostoc* sp., utilizando inóculo de 10% de volume (concentração inicial de células de 0,06 g/L) por 14 dias, estão dispostos na Figura 20.

Figura 20 - Crescimento celular pela suplementação de fonte de nitrogênio e glicose para *Nostoc* sp. para inóculo de 10% (v/v). Controle (◆), Glicose 2 g/L (■), Nitrato 2 mM (△), Glicose 2 g/L + Nitrato 2 mM (■), Glicose 5 g/L + Nitrato 2 mM (*), Glicose 2 g/L + Nitrato 5 mM (●)

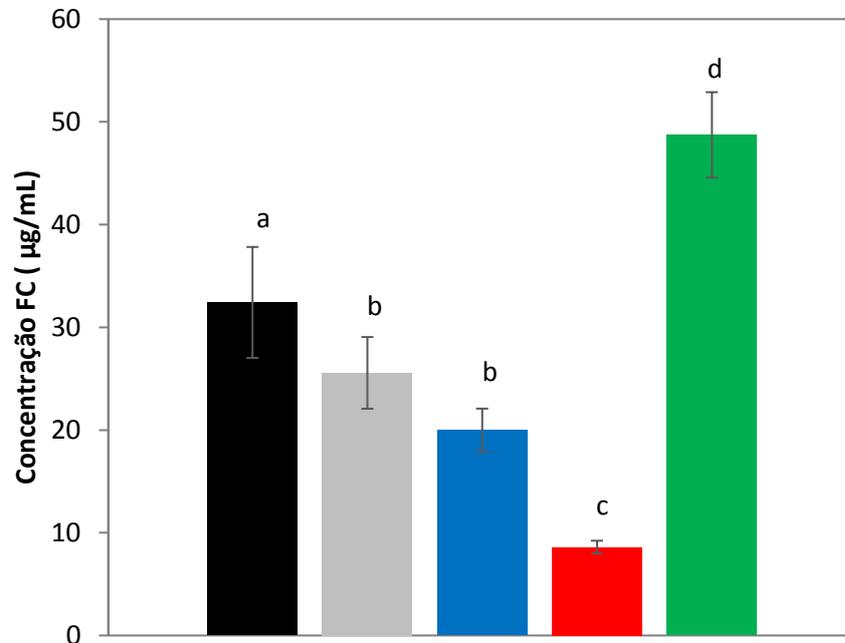


Pode-se notar que todos os meios de cultivo com suplementação de glicose e/ou de nitrato apresentaram maior concentração final de células que o meio controle, sendo a diferença mais evidente a partir do sétimo dia de cultivo, exceto o meio com glicose 5 g/L combinado com nitrato 2 mM.

Observando a adição somente de glicose (2 g/L) ou de nitrato de sódio (2 mM), o aumento maior foi para o meio enriquecido com nitrato, sendo 0,55 g/L contra 0,47 g/L para o meio com glicose. Ao adicionar ambos componentes ao meio basal, nas mesmas concentrações, a concentração final de biomassa foi de 0,48 g/L, semelhante ao teste com meio suplementado somente com glicose. E, mantendo a concentração de nitrato (2mM) e aumentando a concentração de glicose de 2 para 5 g/L, houve morte celular após o 7º dia, indicando inibição pela fonte de carbono. Entretanto, ao se elevar a concentração de nitrato de 2 para 5 mM, mantendo a concentração de glicose em 2 g/L, verifica-se o efeito positivo no aumento da concentração de células que atingiu 0,77 g/L.

Com relação à síntese de FC, analisou-se sua produtividade ao final dos 14 dias do ensaio, com as concentrações mostradas na Figura 21.

Figura 21 - Obtenção de FC para os ensaios com suplementação de fonte de nitrogênio e glicose para *Nostoc* sp. com inóculo de 10% (v/v) para 14 dias de cultivo. Controle (■), Glicose 2 g/L (■), Nitrato 2 mM (■), Glicose 2 g/L+ Nitrato 2 mM (■), Glicose 2 g/L + Nitrato 5 mM (■)



Valores representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes entre as colunas representam diferença estatística do Teste Tukey com $p < 0,05$.

Pode-se notar que o meio combinando glicose 2 g/L e NaNO_3 5 mM favoreceu o aumento da concentração de FC em 50% em relação ao meio controle, atingindo 48,73 $\mu\text{g/mL}$. Para as demais suplementações não foi verificado aumento da concentração de FC em relação ao meio controle. A adição de glicose (2 g/L) e/ou nitrato (2 mM) prejudicou a produção de FC, com teores entre 8,60 e 25,56 $\mu\text{g/mL}$.

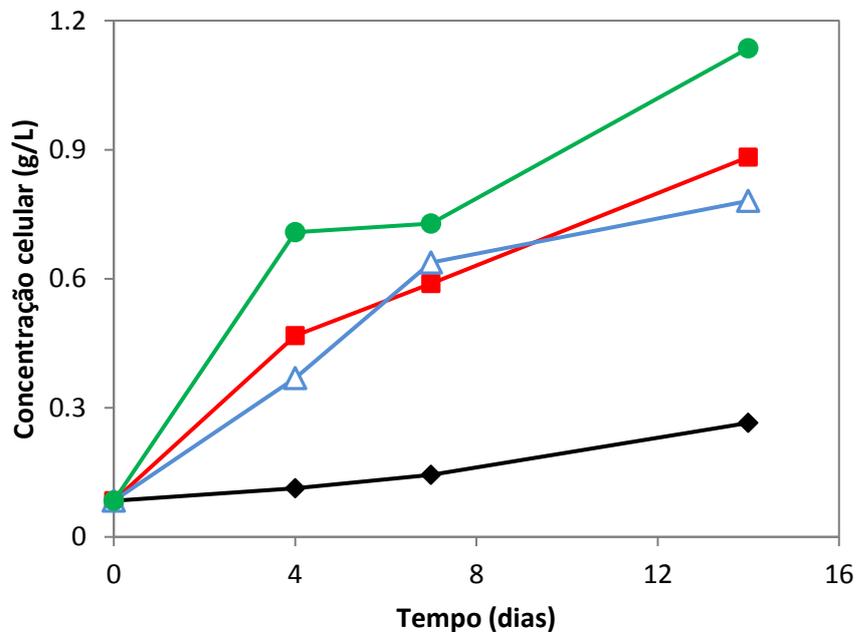
Na literatura são reportados resultados com diferentes comportamentos para a adição de glicose ao meio de cultivo para produção de FC e de aumento de produtividade de FC adicionando fontes de nitrogênio, como nitrato. A combinação da suplementação com os dois compostos ainda não foi investigada.

Lebedeva *et al.* (2005) estudaram a combinação de fontes de carbono orgânico com colorações de luz verde e vermelha no cultivo de *Calothrix* sp. A adição de glicose (10 g/L) combinada com luz vermelha, indicou aumento na razão entre FC/AFC obtida de 2,7 e diminuição da razão FE/AFC obtida de 5,25, mostrando a capacidade da glicose em aumentar a produtividade de FC.

Khattar *et al.* (2015), analisando a produção de *Anabaena fertilissima* obtiveram 46,5 % e 32 % de aumento na produção de FC adicionando nitrato 2 mM e 5 mM de nitrato ao meio cultivo controle, respectivamente. A adição de glicose 5 g/L ao meio controle provocou redução de 40% na concentração de FC.

Diante destes resultados, optou-se por dobrar a concentração do inóculo para 20 % (v/v), partindo-se de concentração inicial celular de 0,12 g/L, repetindo algumas das condições já testadas e ainda analisando o efeito de 5 g/L de glicose combinado com NaNO₃ 5 mM ao meio de cultivo (basal BG11o), como mostrado na Figura 22.

Figura 22 - Crescimento celular pela suplementação de fonte de nitrogênio e glicose para *Nostoc* sp. para inóculo de 20% (v/v). Controle (◆), Nitrato 2 mM (△), Glicose 2 g/L + Nitrato 2 mM (■), Glicose 5 g/L + Nitrato 5 mM (●)

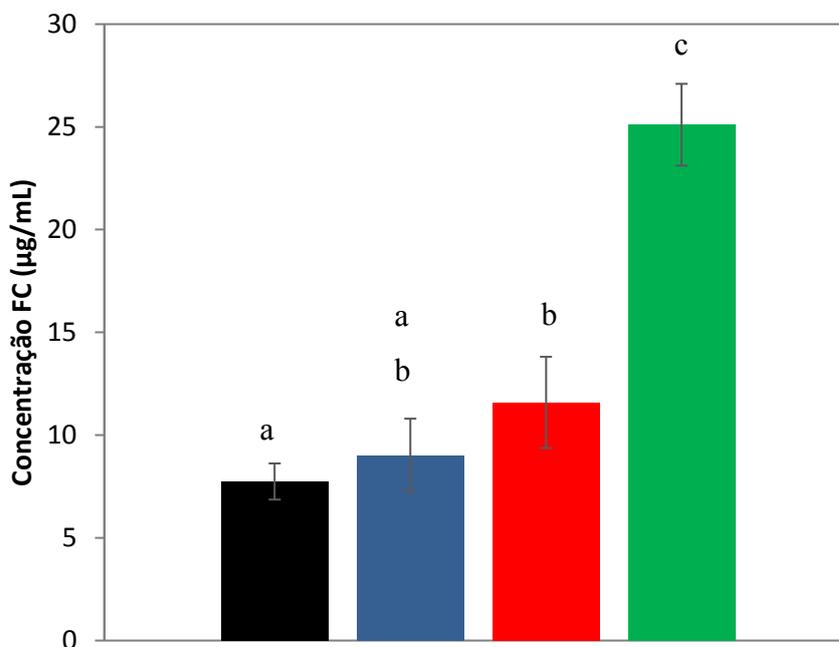


Pode-se observar novamente que a suplementação provocou aumento na concentração celular de 3 a 4 vezes em relação ao meio controle. Verifica-se que, para 20 % (v/v) de inóculo o meio contendo 2 g/L de glicose e 2 mM de nitrato de sódio atingiu uma concentração de 0,88 g/L superior em 10 % em relação ao meio suplementado apenas com nitrato 2 mM, com comportamento contrário ao obtido do ensaio com 10 % (v/v) inóculo.

O meio contendo 5 g/L de glicose e 5 mM de nitrato apresentou aumento da concentração celular de 29% em relação meio de 2g/L de glicose e 2 mM de nitrato, evidenciando o efeito positivo da adição dos dois compostos nesta razão para produção de biomassa, com uma concentração final de 1,14 g/L.

Em relação à obtenção de FC, mostram-se na Figura 23 os resultados obtidos em 14 dias de cultivo.

Figura 23 - Concentração de FC para os ensaios com suplementação de fonte de nitrogênio e glicose para *Nostoc* sp. com inóculo de 20% (v/v) em 14 dias. Controle (■), Nitrato 2 mM (■), Glicose 2 g/L + Nitrato 2 mM (■), Glicose 5 g/L + Nitrato 5 mM (■)



Valores representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes entre as colunas representam diferença estatística do Teste Tukey com $p < 0,05$.

De acordo com a Figura 23, o efeito da suplementação de nitrato e glicose juntos nesta concentração de inóculo foi capaz de influenciar positivamente o aumento da concentração de FC, desta vez com o meio de glicose 2 g/L e nitrato 2 mM com concentração acima da obtida pelo meio controle (11,60 contra 7,74 $\mu\text{g/mL}$), podendo estar relacionado com a proporção de inóculo/meio. Portanto, verifica-se que o enriquecimento do meio, desde que para uma densidade celular adequada, favorece tanto o crescimento celular como a síntese de ficocianina, sendo possível obter 25,11 $\mu\text{g/mL}$, 3,2 vezes superior ao teor encontrado usando meio basal.

Experimentos realizados com concentração de 10 g/L de glicose, com presença de 2, 5 e 10 mM de NaNO_3 , mostraram que houve morte celular já com 4 dias de ensaio, devido ao excesso de concentração de substrato (glicose) no meio de cultivo.

Para se ter uma clareza maior de como a combinação de nitrato de sódio e glicose pode influenciar a produção de FC e de biomassa, pode-se analisar o parâmetro razão g NaNO_3 /g glicose, como mostrado na Tabela 19.

Tabela 19 - Consolidado para avaliação do meio de cultivo para *Nostoc* sp.

Ensaio	V _{Inóculo} (% v/v)	C _{glic} (g/L)	C _{NaNO₃} (mM)	Razão N/G (g nitr/g glic)	C _{celular} (g/L)	C _{FC} (µg/mL)
1	10	0	0	***	0,38	32,42
2	10	2	0	0	0,47	25,56
3	10	0	2	***	0,55	19,98
4	10	2	2	0,09	0,48	8,6
5	10	5	2	0,03	Nd	Nd
6	10	2	5	0,21	0,78	48,73
7	20	0	0	***	0,27	7,74
8	20	0	2	***	0,80	9,02
9	20	2	2	0,09	0,88	11,60
10	20	5	5	0,09	1,13	25,11

Nd – não calculado devido a perda do ensaio devido morte celular

*** – razão não existente

Os ensaios com melhores resultados para inóculo de 20%, tiveram razão de 0,09 g nitrato/g glicose, com maior crescimento celular e concentração de FC para 5 g/L de glicose e 5 mM de nitrato (1,13 g/L e 25,11 µg/mL, respectivamente).

Porém, ao se analisar os dados do ensaio com 10% (v/v) de inóculo, observa-se que, quanto maior essa razão, maior foi o crescimento celular e maior concentração de FC, sendo que o meio com 2 g/L de glicose e 5 mM de nitrato (ou seja, 0,21 g nitrato/g glicose) obteve crescimento celular 1,6 vezes e concentração de FC 5,7 vezes maior do que o meio com 2 g/L de glicose e 2 mM de nitrato (0,09 g nitrato/g glicose). Para o caso da razão mais baixa (0,03), houve morte celular (5 g/L de glicose e 2 mM de nitrato).

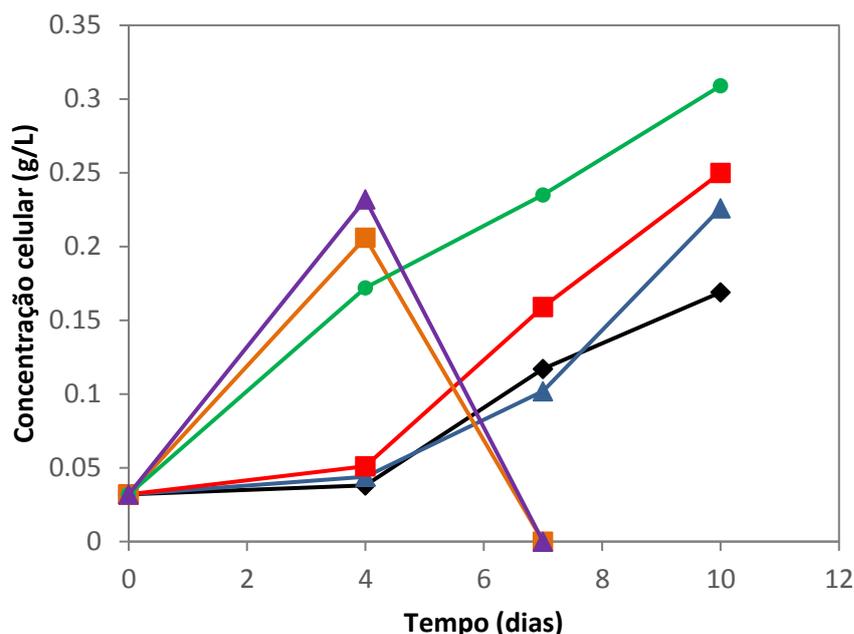
Destes resultados, notou-se que a adição conjunta das fontes de carbono e de nitrogênio proporcionou uma síntese maior de ficocianina pelas cianobactérias.

4.3.3 Avaliação do efeito da concentração de glicose e de nitrato de sódio na suplementação do meio controle (BG11o) no cultivo de *Anabaena variabilis*

Diante dos resultados obtidos ao se analisar a obtenção de FC por *Nostoc* sp., verificou-se o potencial desta síntese também para *Anabaena variabilis*, fixado o volume de inóculo de 20 % (v/v), com concentração celular inicial de 0,04 g/L, em ensaios de 10 dias.

Os resultados para avaliação do efeito do enriquecimento do meio basal BG11 com fonte de nitrogênio e com glicose, são mostrados na Figura 24.

Figura 24 - Crescimento celular pela suplementação de fonte de nitrogênio e glicose para *Anabaena variabilis* para inóculo de 20% (v/v). Controle (◆), Nitrato 2 mM (△), Glicose 2 g/L (■), Glicose 2 g/L + Nitrato 2 mM (■), Glicose 2 g/L + Nitrato 5 mM (●), Glicose 5 g/L + Nitrato 2 mM (▲)

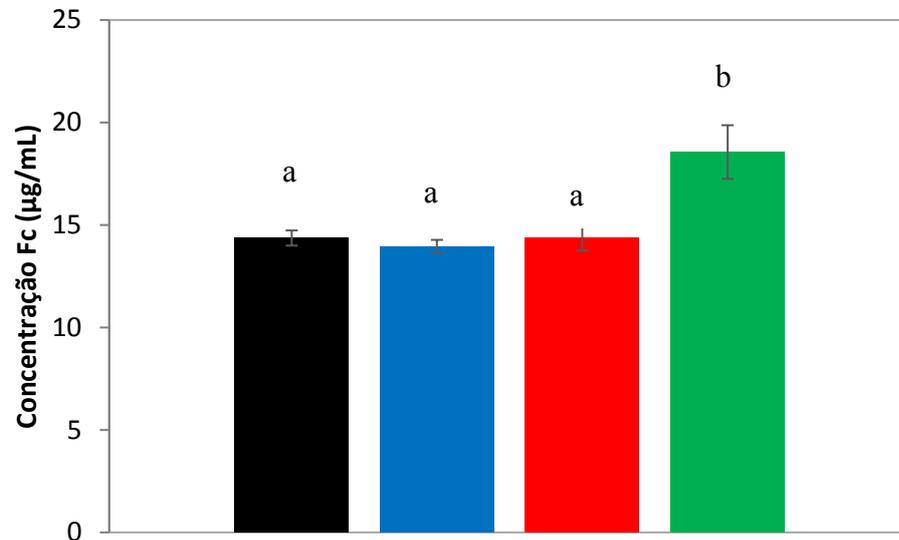


Pela Figura 24, nota-se primeiramente que as suplementações obtiveram concentração celular acima do meio controle, a partir de 10 dias. Observa-se também a mesma tendência verificada para os ensaios com *Nostoc* sp., com a melhor condição obtida para 2 g/L de glicose e 5 mM de nitrato (0,31 g/L), sendo 50% maior que a concentração do meio controle.

Para *Anabaena variabilis*, ensaios com a concentração fixa de nitrato de sódio de 2 mM e concentração de glicose de 2 g/L ou 5 g/L de glicose resultaram em morte celular a partir de 4 dias, provavelmente por excesso de substrato. O resultado do meio contendo 2 g/L de glicose e 2 mM diferiu do obtido para a cepa de *Nostoc* sp., que havia apresentado concentração celular maior que do controle, indicando uma diferença de assimilação do substrato entre as cepas.

A respeito do teor FC produzido por *Anabaena variabilis*, os resultados estão dispostos na Figura 25.

Figura 25 - Concentração de FC para os ensaios com suplementação de fonte de nitrogênio e glicose para *Anabaena variabilis* com inóculo de 20% em 10 dias. Controle (■), Nitrato 2 mM (■), Glicose 2 g/L (■), Glicose 2 g/L + Nitrato 5 mM (■)



Letras diferentes entre as colunas representam diferença estatística do Teste Tukey com $p < 0,05$.

Pela Figura 25, observa-se que em 10 dias, a adição isolada de glicose (2 g/L) ou de nitrato (2 mM) não influenciou a concentração de FC por *A. variabilis*, sendo que o teor ficou em torno de 14 µg/mL para estas condições e para o teste em meio basal.

Nota-se também na figura em questão, que o efeito combinado da glicose 2 g/L com nitrato 5 mM, favoreceu a concentração de FC, obtendo-se 18,6 µg/mL, o que representa aumento de 29% em relação ao controle. Este favorecimento na obtenção de FC também foi observado para a cepa de *Nostoc* sp. com inóculo de 10% (v/v), e no enriquecimento simultâneo de 2 g/L de glicose com 2 mM de nitrato e de 5 g/L de glicose com 5 mM de nitrato, com 20 % (v/v) de inóculo, indicando ser as composições a serem trabalhadas de modo a aumentar a concentração de FC nestas cepas.

De forma semelhante ao observando para os testes com *Nostoc* sp. foi realizado um consolidado dos experimentos utilizando a cepa de *Anabaena variabilis* de modo a melhor visualizar o efeito da razão N/G, para o período de 10 dias. Os resultados são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20 - Consolidado para avaliação do meio de cultivo para *Anabaena variabilis*

Ensaio	VInóculo (% v/v)	C _{glic} (g/L)	C _{NaNO₃} (nM)	Razão N/G (g nitr/g glic)	C _{celular} (g/L)	C _{FC} (µg/mL)
1	20	0	0	***	0,16	14,37
2	20	2	0	0	0,23	13,95
3	20	0	2	***	0,25	14,38
4	20	2	2	0,09	Nd	Nd
5	20	2	5	0,21	0,31	18,56
6	20	5	2	0,03	Nd	Nd

Nd – não calculado devido a perda do ensaio devido à morte celular

*** – razão não existente

Para a cepa de *Anabaena variabilis*, a melhor razão N/G obtida foi 0,21 (2 g/L de glicose combinada com 5 mM de nitrato), obtendo-se 0,31 g/L de concentração celular e 18,56 µg/mL de FC em 10 dias de cultivo. Esta razão é a mesma da qual obteve-se melhor resultado para a cepa de *Nostoc* sp. com inóculo de 10% (v/v).

De acordo com a avaliação da suplementação ao meio de cultivo basal (BG11o), pode-se constatar que a adição de nitrato ou glicose de forma isolada, pouco contribui para obtenção de FC. Por outro lado, quando combinadas em razões específicas (entre 0,09 e 0,21 g nitrato/g glicose) ocorre aumento na concentração de FC.

De acordo com os resultados obtidos, os objetivos do trabalho foram alcançados, uma vez que foi possível aumentar o teor de ficocianina de cianobactérias recuperada ao combinar os métodos de ciclos de congelamento e descongelamento com ultrassom, sendo que na literatura, os métodos são aplicados isoladamente. Com relação à recuperação por sistemas aquosos bifásicos PEG-sal, obtiveram-se porcentagens de recuperação e coeficientes de partição da mesma ordem de grandeza que em trabalhos já realizados, sendo que foram atingidas purezas superiores a 0,9 com o máximo de 1,12 e 1,34 para extratos de *A. variabilis* e *Nostoc* sp, respectivamente. Estes valores de pureza permitem a aplicação na área de indústria alimentícia que exige uma pureza acima de 0,7.

Além disso, neste estudo foi encontrada ainda uma condição de suplementação ao meio de cultivo basal, que proporcionou maior produção de ficocianina, ao adicionar-se simultaneamente glicose e nitrato de sódio, uma combinação ainda não foi abordada na literatura.

Deve-se ressaltar que as cepas empregadas foram pouco exploradas até o momento, sendo que através deste trabalho foi mostrado o potencial destas cianobactérias na obtenção de ficocianina.

CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES E ETAPAS FUTURAS

5.1 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos conclui-se que:

- ✓ A melhor solução extratora de FBP foi o tampão fosfato pH 7,0 0,1 M, com 33,7 µg/mL.
- ✓ A ficocianina FBP predominante encontrada nos extratos tanto para *Nostoc* sp. quanto *Anabaena variabilis*.
- ✓ O método de extração que obteve maior concentração e pureza de FC foi método de congelamento e descongelamento no banho ultrassônico. As condições do processo foram 5 ciclos de congelamento de 1,5 h em -15°C e descongelamento a 25 °C no banho ultrassônico por 30 min, obtendo-se concentração de FC de 32,8 µg/mL com pureza de 0,545 para *Nostoc* sp. e concentração de FC 34,6 µg/mL com pureza de 0,593 para *Anabaena variabilis*.
- ✓ A razão sólido-líquido que obteve maior extração de FC foi de 0,4 g/L, obtendo concentração específica de FC 42,33 mg FC/g célula.
- ✓ O melhor SAB encontrado foi para o sistema PEG 1500-fosfato de potássio, na 2ª proporção (PEG 10% e sal 15,9%), obtendo recuperação de 79,10%, K-FC de 6,359 e pureza final de 1,34 o extrato de *Nostoc* sp. e recuperação de 82,10%, K-FC de 5,734 e pureza final de 1,116 para o extrato de *Anabaena variabilis*.
- ✓ A melhor suplementação do meio de cultivo basal para produção de FC foi obtida com combinação de glicose e nitrato de sódio, sendo a composição de 2 g/L de glicose e 5 mM de NaNO₃, com concentração de 48,73 µg/mL para *Nostoc* sp. com 10 % (v/v) de inóculo em 14 dias e 18,57 µg/mL para *Anabaena variabilis* com 20% (v/v) de inóculo em 10 dias
- ✓ Foi possível obtenção de pureza de FC para grau alimentar, acima de 0,7.

5.2 SUGESTÕES PARA ETAPAS FUTURAS

Como sugestões para trabalhos futuros, têm-se:

- **Para recuperação de FBP por SAB:**

- ✓ Testar diferentes sais: sulfato de amônio, fosfato de sódio, sulfato de sódio e PEG com diferentes pesos moleculares (400 e 600).
 - ✓ Avaliar a adição de NaCl.
 - ✓ Avaliar recuperação de FBP por SAB em série (LIU *et al.* 2012).
 - ✓ Testar Copolímero em bloco ao invés do PEG.
 - ✓ Avaliar a separação da FC do PEG através de membranas de ultrafiltração.
- **Para cultivo e produção de FBP:**
- ✓ Avaliar o cultivo anaeróbio das cianobactérias.
 - ✓ Investigar a variação do fotoperíodo para cultivo das cianobactérias.
 - ✓ Testar diferentes colorações de luz.
 - ✓ PCC para otimizar o cultivo e obtenção de FBP.
 - ✓ avaliar o uso de efluentes contendo glicose (integração entre tratamento de efluentes e obtenção de produto de valor agregado, com redução do custo de matéria-prima).
- **Aplicações para as FBP**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALDE, J., BETANCOURT, L., TORRES, E., CID, A., BARWELL, C. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. **Plant Science**, v. 136(1), p. 109-120, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00113-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00113-7)

AJAYAN, K. V., SELVARAJU, M., THIRUGNANAMOORTHY, K. Enrichment of chlorophyll and phycobiliproteins in *Spirulina platensis* by the use of reflector light and nitrogen sources: An in-vitro study. **Biomass and Bioenergy**, v. 47, p. 436-441, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.09.012>

ASENJO, J. A., ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: Phase separation and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1238, p. 1-10, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.049>

BARBOSA, A. A., BONOMO, R. C. F., MARTINS, C. V., FONTAN, R. C. I., JÚNIOR, E. C. S., MINIM, L. A., PIGNATA, M. C. Equilibrium Data and Physical Properties of Aqueous Two Phase Systems Formed by PEG (1500 and 4000) g·mol⁻¹ + Sodium Sulfate + Water at Different Temperatures and pH 2. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 61(1), p. 3-11, 2016. <https://doi.org/10.1021/je5008586>

BASKARAN, D., CHINNAPPAN, K., MANIVASAGAN, R., MAHADEVAN, D. K. Partitioning of crude protein from aqua waste using PEG 600-inorganic salt Aqueous Two-Phase Systems. **Chemical Data Collections**, v. 15-16, p. 143-152, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2018.05.004>

BENNETT, A., BOGORAD, L. Complementary chromatic adaption in a filamentous blue-green alga. **The Journal of Cell Biology**, v. 58, p. 419-435, 1973. <https://doi.org/10.1083/jcb.58.2.419>

BERMAN-FRANK, I.; LUNDGREN, P.; CHEN, Y. B.; KUPPER, H.; KOLBER, Z.; BIRGITTA, B.; FALKOWSKI, P. Segregation of nitrogen fixation and oxygenic photosynthesis

in the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. **Science**, v. 294 (5546), p. 1534-1537, 2001. <https://doi.org/10.1126/science.1064082>

BORSARI, R. R. J.; MORIOKA, L. R.; RIBEIRO, M. L. L.; BUZATO, J. B. Mixotrophic growth of *Nostoc* sp. on glucose, sucrose and sugarcane molasses for Phycobiliprotein production. **Acta Scientiarum-Biological Sciences**, v. 29 (1), p. 9-13, 2007. <https://doi.org/10.4025/actascibiols.v29i1.121>

CHENG, J., XIA, A., SONG, W., SU, H., ZHOU, J., CEN, K. Comparison between heterofermentation and autofermentation in hydrogen production from *Arthrospira (Spirulina) platensis* wet biomass. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37(8), p. 6536-6544, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.025>

CHETHANA, S.; NAYAK, C. A.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 679-687, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.12.021>

COLLA, L. M., PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Congelamento e descongelamento - sua influência sobre os alimentos, **Vetor**, Rio Grande, 13: 53-66, 2003. <https://periodicos.furg.br/vetor/article/view/428>

DE SOUZA, E. C., DINIZ, R. S., DOS REIS COIMBRA, J. S., DE OLIVEIRA LEITE, M., ROCHA DOS SANTOS, G., DA CRUZ RODRIGUES, A. M., MELLER DA SILVA, L. H. Measurements and Modeling of Liquid-Liquid Equilibrium of Polyethylene Glycol 400, Sodium Phosphate, or Sodium Citrate Aqueous Two-Phase Systems at (298.2, 308.2, and 318.2 K.) **Journal of Chemical & Engineering Data**, v.58(7), p. 2008-2017, 2013. <https://doi.org/10.1021/je400190f>

DOUST, A. B., MARAI, C. N. J., HARROP, S. J., WILK, K. E., CURMI, P. M. G., SCHOLES, G. D. Developing a structure-function model for the cryptophyte phycoerythrin 545 using ultrahigh resolution crystallography and ultrafast laser spectroscopy. **Journal of Molecular Biology**, v.344(1), p.135-153, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.09.044>

FALLEIROS, L. N. S. S. Produção e caracterização de β -galactosidase de *Kluyvermyces marxianus*. **Tese de Doutorado**, Engenharia Química Universidade Federal de Uberlândia - UFU, 2016.

GANTT, E. Phycobilisomes. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 32 (1), p. 327-347, 1981. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.32.060181.001551>

GUO-QING, H., XIU-YAN, Z., XING-JUN, T., QI-HE, C., HUI, R. Partitioning and Purification of Extracellular β -1, 3-1, 4-glucanase in Aqueous Two-Phase Systems. **Journal of Zhejiang University Science B**, v.6(8), p.825-831, 2005. <https://doi.org/10.1631/jzus.2005.B0825>

HARAGUCHI, L. H., MOHAMED, R. S., LOH, W., PESSÔA FILHO, P. A. Phase equilibrium and insulin partitioning in aqueous two-phase systems containing block copolymers and potassium phosphate. **Fluid Phase Equilibria**, v. 215(1), p. 1-15, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0378-3812\(03\)00368-6](https://doi.org/10.1016/S0378-3812(03)00368-6)

HEMLATA, AFREEN, S., FATMA, T. Extraction, purification and characterization of phycoerythrin from *Microchaete* and its biological activities. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.13, p.84-89, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.11.012>

IGBAL, M., TAO, Y., XIE, S., ZHU, Y., CHEN, D., WANG, X., YUAN, Z. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. **Biological Procedures Online**, v.18(1), p.1-18, 2016. <https://doi.org/10.1186/s12575-016-0048-8>

İLTER, I., AKYIL, S., DEMIREL, Z., KOÇ, M., CONK-DALAY, M., KAYMAK-ERTEKIN, F. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 70, p. 78-88, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.04.007>

JACINAVICIUS, F. R., GAMA JUNIOR, W. A., AZEVEDO, M. T. P., SANTANNA, C. Manual para cultivo de cianobactérias. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 2013.

https://www.infraestruturameioambiente.sp.gov.br/institutodebotanica/wp-content/uploads/sites/235/2013/09/virtuais_4cianobact%C3%A9rias.pdf

JOHNSON, E. M., KUMAR, K., DAS, D. Physicochemical parameters optimization, and purification of phycobiliproteins from the isolated *Nostoc* sp. **Bioresource Technology**, v. 166, p.541-547, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.097>

KASTING, J. F.; SIEFERT, J. L. Life and the evolution of Earth's atmosphere. **Science**, v. 296 (5570), p.1066-1068, 2002. <https://doi.org/10.1126/science.1071184>

KEHR, J. C., GATTE PICCHI, D., DITTMANN, E. Natural product biosyntheses in cyanobacteria: A treasure trove of unique enzymes. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 7, 1622-1635, 2011. <https://doi.org/10.3762/bjoc.7.191>

KHATOON, H., KOK LEONG, L., ABDU RAHMAN, N., MIAN, S., BEGUM, H., BANERJEE, S., ENDUT, A. Effects of different light source and media on growth and production of phycobiliprotein from freshwater cyanobacteria. **Bioresource Technology**, v. 249, p. 652-658, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.10.052>

KHATTAR, J. I. S., KAUR, S., KAUSHAL, S., SINGH, Y., SINGH, D. P., RANA, S., GULATI, A. Hyperproduction of phycobiliproteins by the cyanobacterium *Anabaena fertilissima* PUPCCC 410.5 under optimized culture conditions. **Algal Research**, v. 12, p. 463-469, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.007>

KUMAR, D., DHAR, D. W., PABBI, S., KUMAR, N., WALIA, S. Extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (CCC540). **Indian Journal of Plant Physiology**, v.19(2), p.184-188, 2014. <https://doi.org/10.1007/s40502-014-0094-7>

LAUCERI, R., CHINI ZITTELLI, G., MASERTI, B., TORZILLO, G. Purification of phycocyanin from *Arthrospira platensis* by hydrophobic interaction membrane chromatography. **Algal Research**, v.35, p.333-340, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.09.003>

LEBEDEVA, N. V., BOICHENKO, V. A., SEMENOVA, L. R., PRONINA, N. A., STADNICHUK, I. N. Effects of glucose during photoheterotrophic growth of the cyanobacterium *Calothrix* sp. PCC 7601 capable for chromatic adaptation. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.52(2), p.235-241, 2005. <https://doi.org/10.1007/s11183-005-0036-3>

LIU, Y., FENG, Y., LUN, J. Aqueous two-phase countercurrent distribution for the separation of c-phycoerythrin and allophycoerythrin from *Spirulina platensis*. **Food and Bioprocess Technology**, v.90(2), p.111-117, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.08.002>

MANIRAFASHA, E., NDIKUBWIMANA, T., ZENG, X., LU, Y., JING, K. Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. **Biochemical Engineering Journal**, v.109, p.282-296, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.025>

MITTAL, R.; TAVANANDI, H. A.; MANTRI, V. A.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Ultrasound assisted methods for enhanced extraction of phycobiliproteins from marine macroalgae, *Gelidium pusillum* (Rhodophyta). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 38, p. 92-103, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.02.030>

MOHAMMADI-GOURAJI, E., SOLEIMANIAN-ZAD, S., GHIACI, M. Phycocyanin enriched yogurt and its antibacterial and physicochemical properties during 21 days of storage, **LWT- Food Science and Technology**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.057>

MOLICA, R.; AZEVEDO, S. Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas. **Oecologia Brasiliensis**, v.13(2), p.229-246, 2009. <https://doi.org/10.4257/oeco.2009.1302.02>

MORAES, C. C., DE MEDEIROS BURKERT, J. F., KALIL, S. J. C-phycoerythrin extraction process for large-scale use. **Journal of Food Biochemistry**, v.34, p.133-148. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2009.00317.x>

NASCIMENTO, K. S., YELO, S., CAVADA, B. S., AZEVEDO, A. M., AIRES-BARROS, M. R. Liquid-Liquid Equilibrium data for Aqueous Two-Phase Systems composed of

Ethylene Oxide Propylene Oxide Copolymers. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 56(2), p.190-194, 2011. <https://doi.org/10.1021/je1006532>

NWOBA, E. G., PARLEVLIET, D. A., LAIRD, D. W., ALAMEH, K., MOHEIMANI, N. R. Sustainable phycocyanin production from *Arthrospira platensis* using solar-control thin film coated photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 141, p. 232-238, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.10.024>

OLIVEIRA, F. C. Estudo da partição da proteína ovomucoide em sistemas aquosos bifásicos e em resinas aniônica ou hidrofóbica. **Dissertação de Mestrado**, Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa - MG, 2009.

ORES, J. DA C., AMARANTE, M. C. A. DE, KALIL, S. J. Co-production of carbonic anhydrase and phycobiliproteins by *Spirulina* sp. and *Synechococcus nidulans*. **Bioresource Technology**, v.219, p.219-227, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.133>

PAN-UTAI, W.; IAMTHAM, S. Physical extraction and extrusion entrapment of C-phycocyanin from *Arthrospira platensis*. **Journal of King Saud University - Science**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.05.026>

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(15), p.7393-7396, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.028>

PATIL, G., RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycocyanin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34(2), p. 156-164, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.11.026>

PIRDASHTI, M., MOVAGHARNEJAD, K., ROSTAMI, A. A., AKBARPOUR, P., KETABI, M. Liquid-Liquid Equilibrium Data, Viscosities, Densities, Conductivities, and Refractive Indexes of Aqueous Mixtures of Poly(ethylene glycol) with Trisodium Citrate at Diffe-

rent pH. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 60(11), p. 3423-3429, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.5b00705>

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Corantes artificiais em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.14 (2), p. 237-250, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200005>

PRASANNA, R.; SOOD, A.; JAISWAL, P.; NAYAK, S.; GUPTA, V.; CHAUDHARY, V.; JOSHI, M.; NATARAJAN, C. Rediscovering cyanobacteria as valuable sources of bioactive compounds. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 119-134, 2010. <https://doi.org/10.1134/S0003683810020018>

RASTOGI, R. P., SONANI, R. R., PATEL, A. B., MADAMWAR, D. Occurrence of a functionally stable photoharvesting single peptide allophycocyanin α -subunit (16.4 kDa) in the cyanobacterium *Nostoc* sp. R76DM. **RSC Advances**, v. 5(106), p. 87598-87608, 2015. <https://doi.org/10.1039/C5RA14508B>

RASTOGI, R. P.; SINHA, R. P. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 27 (4), p. 521-539, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.009>

RITO-PALOMARES; M.; NUÑEZ, L.; AMADOR, D. Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for c-phycoyanin recovery from *Spirulina maxima*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 76, p. 1273-1280, 2001. <https://doi.org/10.1002/jctb.507>

RIZZO, R. F., SANTOS, B. DO N. C. DOS, CASTRO, G. F. P. DA S. DE, PASSOS, T. S., NASCIMENTO, M. DE A., GUERRA, H. D., LIMA-ARAÚJO, K. G. DE. Production of phycobiliproteins by *Arthrospira platensis* under different light conditions for application in food products. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 35(2), p. 247-252, 2015. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6463>

RODRIGUES, D. B., MENEZES, C. R., MERCADANTE, A. Z., JACOB-LOPES, E., ZEPKA, L. Q. Bioactive pigments from microalgae *Phormidium autumnale*. **Food Research International**, v.77, p.273-279, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.027>

ROMÃO, B. B. Otimização das variáveis que influenciam a produção de hidrogênio por fermentação escura. **Tese de Doutorado**, Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia - UFU, 2015.

RUIZ-RUIZ, F., BENAVIDES, J., RITO-PALOMARES, M. Scaling-up of a B-phycoerythrin production and purification bioprocess involving aqueous two-phase systems: Practical experiences. **Process Biochemistry**, v. 48(4), p. 738-745, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.010>

SARAVANAN, S., RAO, J. R., NAIR, B. U., RAMASAMI, T. Aqueous Two-Phase Poly (ethylene glycol)-poly (acrylic acid) system for protein partitioning: Influence of molecular weight, pH and temperature. **Process Biochemistry**, v.43(9), pp. 905-911, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.04.011>

SHARMA, N. K., TIWARI, S. P., TRIPATHI, K., RAI, A. K. Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): facts and challenges. **Journal of Applied Phycology**, v. 23(6), p. 1059-1081, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9626-3>

SILVA, L. A. Estudo do processo biotecnológico de produção, extração e recuperação do pigmento ficocianina da *Spirulina platensis*. **Universidade Federal Do Paraná - UFPR**, 2008.

SILVA, L. H. M; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, v. 29, n.6, p. 1345-1351, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600033>

SILVEIRA, S. T.; BURKERT, J. F. M.; COSTA, J. A. V.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bio-resource Technology**, v.98, p.1629-1634, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.050>

SONANI, R. R., SINGH, N. K., KUMAR, J., THAKAR, D., MADAMWAR, D. Concurrent purification and antioxidant activity of phycobiliproteins from *Lyngbya* sp. A09DM: An antioxidant and anti-aging potential of phycoerythrin in *Caenorhabditis elegans*. **Process Biochemistry**, v.49(10), p.1757-1766, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.06.022>

SOUSA, L. M. Avaliação das condições de cultivo na fotofermentação da microalga *Chamydomonas reinhardtii*. **Dissertação de Mestrado**, Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia - UFU, 2016.

TAMAGNINI, P., LEITÃO, E., OLIVEIRA, P., FERREIRA, D., PINTO, F., HARRIS, D. J., LINDBLAD, P. Cyanobacterial hydrogenases: diversity, regulation and applications. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31(6), p. 692-720, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00085.x>

TYRELL, T. The relative influences of nitrogen and phosphorus on oceanic primary production. **Nature**, v. 400, p.525-531, 1999. <https://doi.org/10.1038/22941>

VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (*Arthospira*): Physiology, Cell Biology and Biotechnology. **Journal of Applied Phycology**, v. 9 (3), p. 295-296, 1997.

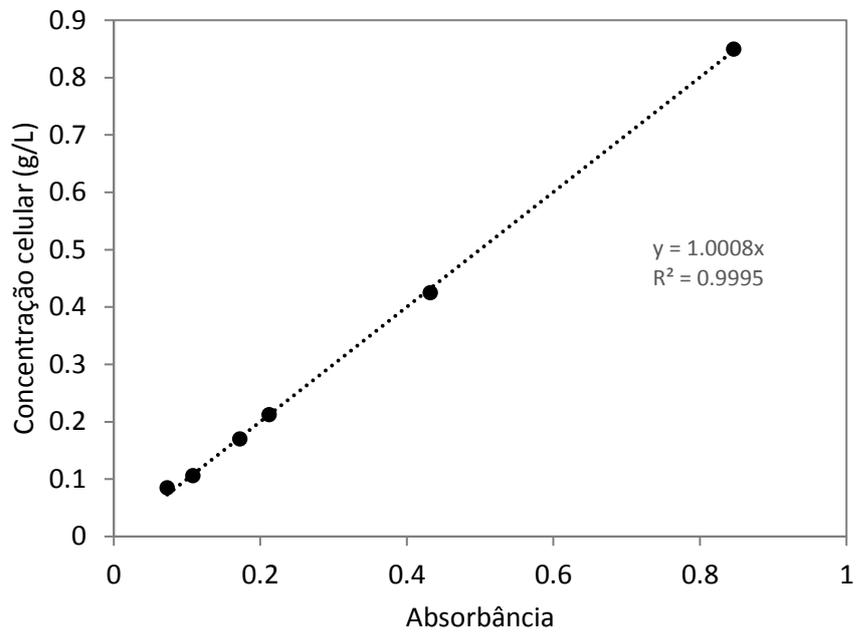
YADAV, S., SINHA, R. P., TYAGI, M. B., KUMAR, A. Cyanobacterial secondary metabolites. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2(2), p. 144-167, 2011.

YOON, J. H., CHOI, S. S., PARK, T. H. The cultivation of *Anabaena variabilis* in a bubble column operating under bubbly and slug flows. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 430-436, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.061>

ZHAO, L.; PENG, Y; GAO, J; CAI, W. Bioprocess intensification: An Aqueous Two-Phase Process for the Purification of C-phycocyanin from dry *Spirulina platensis*. **European Food Research and Technology**, v. 238, n.3, p. 451-457, 2014.
<https://doi.org/10.1007/s00217-013-2124-5>

APÊNDICE A

Figura A.1 – Curva de calibração para crescimento celular *Nostoc* sp.



Anexo A.2 – Curva de calibração para crescimento celular *Anabaena variabilis*

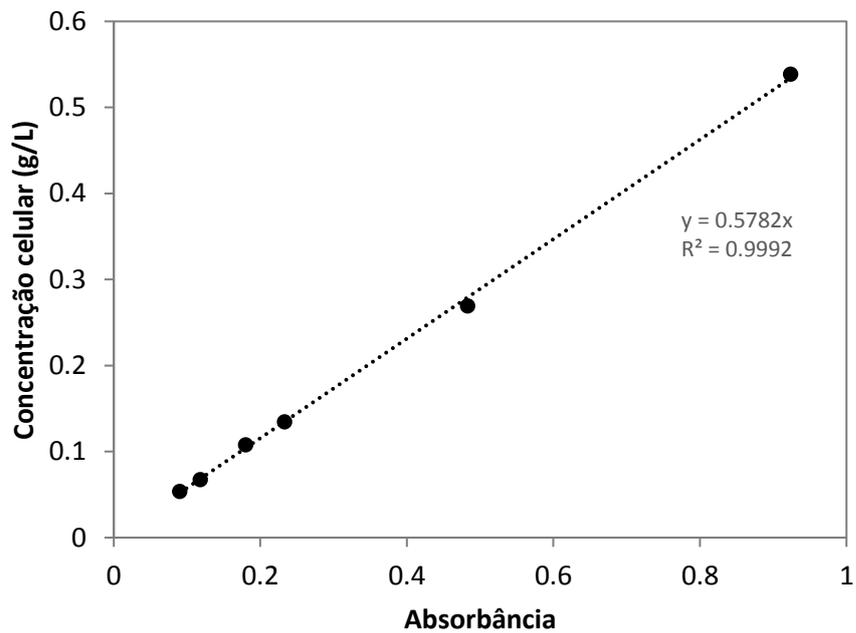


Figura A.3 – Curva de calibração para Macroensaio pelo método de Bradford

