



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**PRODUÇÃO DE FICOCIANINA DE *Nostoc* sp. E *Anabaena variabilis* E
RECUPERAÇÃO POR SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

Thales Azevedo Teixeira

Uberlândia – MG

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**PRODUÇÃO DE FICOCIANINA DE *Nostoc* sp. E *Anabaena variabilis* E
RECUPERAÇÃO POR SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

Thales Azevedo Teixeira

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.

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

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

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

T266 2020	<p>Teixeira, Thales Azevedo, 1991- Produção de ficocianina de <i>Nostoc</i> sp. e <i>Anabaena</i> <i>variabilis</i> e recuperação por sistemas aquosos bifásicos [recurso eletrônico] / Thales Azevedo Teixeira. - 2020.</p> <p>Orientadora: Juliana de Souza Ferreira. Coorientador: Eloízio Júlio Ribeiro. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Engenharia Química. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.748 Inclui bibliografia.</p> <p>1. Engenharia química. I. Ferreira, Juliana de Souza, 1975-, (Orient.). II. Ribeiro, Eloízio Júlio, 1952-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Engenharia Química. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 66.0</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE THALES AZEVEDO TEIXEIRA 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 19 DE NOVEMBRO DE 2020.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro
Coorientador PPGEQ/UFU

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

Prof. Dr.^a Fabiana Regina Xavier Batista
FEQUI/UFU

Prof. Dr. Gustavo Araújo Teixeira
Departamento de Engenharia de Alimentos/ICTE/UFTM



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química
Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1K, Sala 206 - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34)3239-4249 - www.ppgeq.feq.ufu.br - secppgeq@feq.ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Engenharia Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 20/2020, PPGEQ				
Data:	19 de novembro de 2020	Hora de início:	08:30	Hora de encerramento:	11:30
Matrícula do Discente:	11822EQU018				
Nome do Discente:	Thales Azevedo Teixeira				
Título do Trabalho:	Produção de ficocianina de <i>Nostoc sp.</i> e <i>Anabaena variabilis</i> e recuperação por sistemas aquosos bifásicos				
Área de concentração:	Desenvolvimento de Processos Químicos				
Linha de pesquisa:	Engenharia Bioquímica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Coleta e seleção de cepas e estudo da produção, purificação e utilização de enzimas e bioprodutos em processos industriais				

Reuniu-se por meio de webconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, assim composta: Professores Doutores: Gustavo Araújo Teixeira - ICTE/UFTM; Érika Ohta Watanabe - FEQU/UFU; Fabiana Regina Xavier Batista - PPGEQ/UFU; Eloízio Júlio Ribeiro - PPGEQ/UFU, coorientador e Juliana de Souza Ferreira - PPGEQ/UFU, orientadora do candidato.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dra. Juliana de Souza Ferreira, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Juliana de Souza Ferreira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 19/11/2020, às 11:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erika Ohta Watanabe, Professor(a) do Magistério Superior**, em 19/11/2020, às 11:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana Regina Xavier Batista, Professor(a) do Magistério Superior**, em 19/11/2020, às 11:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eloizio Julio Ribeiro, Professor(a) do Magistério Superior**, em 19/11/2020, às 11:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Araújo Teixeira, Usuário Externo**, em 19/11/2020, às 15:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2397764** e o código CRC **284A63CC**.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo apoio, amor incondicional, incentivo constante, confiança, exemplo e educação que me deram durante a vida. Aos meus irmãos Thais e Thiago, pelo incentivo e companheirismo. Ao Kaio, pela compreensão, carinho, companheirismo e apoio nos momentos difíceis.

Agradeço também à minha orientadora Juliana, pela confiança em mim depositada, incentivo, pelos conhecimentos transmitidos, discussões e profissionalismo no desenvolvimento do trabalho.

Ao Arthur, pelo apoio nas atividades e transmissão de conhecimentos os quais me auxiliaram durante a realização deste trabalho. Aos alunos de IC, Luis e Warley pela companhia e apoio nas atividades.

À minha família e amigos por estarem sempre ao meu lado e proporcionarem momentos alegres e divertidos.

A todos os mestrandos, doutorandos, funcionários e professores do NUCBIO, pela companhia, ajuda e carinho durante todo este tempo de trabalho.

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

À CAPES pela concessão da bolsa.

À UFU, CNPq e FAPEMIG

RESUMO

As cianobactérias são organismos capazes de produzir uma diversidade de biocompostos de alto valor agregado, dentre eles, as ficobiliproteínas (FBP), pigmentos usados como corantes naturais para alimentos e produtos cosméticos, bem como marcadores fluorescentes moleculares. Este trabalho teve como objetivo o estudo do processo de produção e recuperação de FBP das cianobactérias, *Nostoc* sp. e *Anabaena variabilis*. Das FBPs, apenas ficocianina (FC), foi detectada no extrato de ambas as cepas. O meio de cultivo das cianobactérias foi modificado para avaliar o efeito da concentração de fonte de carbono (glicose) e da fonte de nitrogênio (nitrato de sódio) e do efeito da cor (branca, amarela, azul, verde e vermelha) sobre o crescimento de biomassa e de síntese da FC. Para a etapa de recuperação da FC, foi escolhido o sistema aquoso bifásico (SAB), técnica atrativa para biomoléculas, por apresentar grande quantidade de água nas duas fases, proporcionando um ambiente não tóxico e compatível. Neste sentido, foram avaliados o efeito da adição do NaCl ao SAB do tipo PEG-fosfato de potássio, na recuperação da FC. Além disso, investigou-se também o SAB empregando copolímeros tri-bloco de diferentes cadeias de PEO (poli (óxido de etileno)) (F68, L62 e L64) e o tipo de sal (citrato de sódio e fosfato de potássio) em diferentes proporções, para testar o aumento da recuperação e pureza inicial da FC. Os copolímeros são termossensíveis, podendo ser recuperados e reutilizados por aquecimento, diferente do PEG. Assim, foi avaliada também a recuperação por termosseparação dos copolímeros utilizados. Na avaliação do efeito de parâmetros de cultivo, o melhor resultado foi encontrado na suplementação ao meio de cultivo para a cepa de *Nostoc* sp. de 2 g.L⁻¹ de glicose e 5 mM de nitrato de sódio de forma combinada, obtendo concentrações de FC de 133,03 mg.g⁻¹ e concentração celular de 0,53 g.L⁻¹. Com relação ao efeito da cor da luz, de forma geral, a luz branca foi a cor que mais favoreceu o crescimento celular e quando combinada ao ensaio com suplementação, apresentou cerca de 0,43 g.L⁻¹ para ambas as cepas estudadas após os 14 dias de cultivo. Para a produção de FC, na condição de suplementação do meio, a luz vermelha apresentou melhor resposta para as duas cepas, equivalentes a 141,97 mg.g⁻¹ para *Nostoc* sp. e 161,06 mg.g⁻¹ para *A. variabilis*. O estudo de recuperação da FC por SAB, indicou o efeito positivo do “*salting-out*” com a adição de cloreto de sódio (NaCl), com 6% (m/m) sendo a melhor condição para *Nostoc* sp., atingindo pureza (*P*) de 1,13, recuperação (*R*) de 84,5% e coeficiente de partição (*K*) igual a 9,46. Já para *A. variabilis*, as melhores condições foram para adição de 6 e 8% (m/m), atingindo (*P*) de 1,16, (*R*) de 83,35% e (*K*) de 9,80. Para o SAB do tipo copolímero-sal, e proporção 25% copolímero e 8% sal, L64+fosfato de potássio foi o melhor sistema para a recuperação da FC dos extratos das duas cepas, sendo que ocorreu a partição da proteína na fase fundo, alcançando (*R*) equivalente a 83,40% para cepa de *Nostoc* sp. e 86,76 % para *A. variabilis*. Ao alterar a proporção para 15% copolímero e 12% sal, a FC migrou para a fase topo, sendo que o sistema F68+fosfato de potássio possibilitou melhor resultado para as duas cepas, alcançando (*R*) de 86,46% para *Nostoc* sp. e 86,83% para *A. variabilis*. Na etapa de recuperação do copolímero por termosseparação, foi possível recuperar o L62 (94,50%) e o L64 (96,54%). Para o copolímero F68, não houve separação de fases na faixa de temperatura testada. O estudo mostrou que maiores teores de ficocianina podem ser obtidos ao modificar o meio de cultura das cianobactérias, principalmente com a suplementação de fontes de carbono e nitrogênio, e que a recuperação deste pigmento é viável por SAB, tanto para meios constituídos de PEG como copolímeros.

Palavras-chave: ficobiliproteína, copolímero, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, biomassa, partição.

ABSTRACT

Cyanobacteria are organisms capable of producing a diversity of biocomposites with high added value, including phycobiliproteins (PBP), which are pigments used as natural dyes for food and cosmetic products, as well as molecular fluorescent markers. This work aimed to study the process of production and recovery of PBP from cyanobacteria, *Nostoc* sp. and *Anabaena variabilis*. The only PBP detected in the extract of both strains was phycocyanin (PC). The medium of cyanobacteria was modified to evaluate the effect of the concentration of carbon source (glucose) and nitrogen source (sodium nitrate) and the effect of color (white, yellow, blue, green and red) on biomass growth and PC synthesis. For the PC recovery stage, the aqueous two-phase system (ATPS) was chosen, as an attractive technique for biomolecules, as it presents a large amount of water in both phases, providing a non-toxic and compatible environment. In this sense, the effect of adding NaCl to ATPS of PEG-potassium phosphate on PC recovery was evaluated. Furthermore, it was also tested ATPS using tri-block copolymers of different chains of PEO (poly (ethylene oxide)) (F68, L62 and L64) and the type of salt (sodium citrate and potassium phosphate) in different proportions, to test the increase in PC recovery and initial purity. Copolymers are thermo-sensitive and can be recovered and reused by heating, different from PEG. Thus, recovery was also evaluated by terms of separation of the copolymers used. In respect to the effect of cultivation parameters, the best result was found in supplementing the medium for the *Nostoc* sp. of 2 g.L⁻¹ of glucose and 5 mM of sodium nitrate in a combined form, obtaining PC concentrations of 133.03 mg.g⁻¹ and cell concentration of 0.53 g.L⁻¹. Regarding the effect of the color of light, in general, using white light allowed the highest cell growth and when combined with the supplementation assay, it presented about 0.43 gL⁻¹ for both strains studied after 14 days of cultivation. For the production of PC, under supplementation of the medium, the red light showed better response for both strains, equivalent to 141.97 mg.g⁻¹ for *Nostoc* sp. and 161.06 mg.g⁻¹ for *A. variabilis*. The study of PC recovery by ATPS, indicated the positive effect of “salting-out” with the addition of sodium chloride (NaCl), with 6% (w/w) being the best condition for *Nostoc* sp., Reaching purity (*P*) of 1,13, recovery (*R*) of 84.5% and partition coefficient (*K*) equal to 9.46. As for *A. variabilis*, the best conditions were for adding 6 and 8% (w/w), reaching (*P*) 1.16, (*R*) 83.35% and (*K*) 9.80. For ATPS of the copolymer-salt type, and 25% copolymer and 8% salt ratio, L64 + potassium phosphate was the best system for the recovery of PC from the extracts of the two strains, with the protein partitioning occurring in the bottom phase, reaching (*R*) equivalent to 83.40% for *Nostoc* sp. and 86.76% for *A. variabilis*. In the second proportion, 15% copolymer and 12% salt, the PC migrated to the top phase, with the F68 + potassium phosphate system providing a better result for both strains, reaching (*R*) of 86.46% for *Nostoc* sp. and 86.83% for *A. variabilis*. In the step of recovering the copolymer by thermal separation, it was possible to recover L62 (94.50%) and L64 (96.54%). For the F68 copolymer, there was no phase separation in the tested temperature range. The study showed that higher levels of phycocyanin can be obtained by modifying the medium of cyanobacteria, especially with the supplementation of carbon and nitrogen sources, and that the recovery of this pigment is viable by ATPS, both for PEG and copolymer media.

Keywords: phycobiliprotein, copolymer, carbon source, nitrogen source, biomass, partition .

SIMBOLOGIA E ABREVIATURAS

Aloficocianina – AFC

Ficobiliproteínas – FBP

Ficoeritrina – FE

Ficocianina – FC

Ficobilissoma - FBS

Sistema Aquoso Bifásico – SAB

Polietilenoglicol – PEG

Coefficiente de Partição – K

Recuperação – R (%)

Razão volumétrica entre as fases – V_r

Poli (óxido de etileno) - PEO

Poli (óxido de propileno) - PPO

Óxido de etileno – EO

Óxido de propileno - PO

Temperatura crítica inferior de solução (TCIS)

Índice de refração - IR

High Performance Liquid Chromatography - HPLC

Pureza – P

Tie Lie Length - TLL

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organização celular de uma cianobactéria.	18
Figura 2 - Estrutura do ficobilissomo.	21
Figura 3 - Diagrama das diferentes etapas envolvidas na produção de ficobiliproteínas.	23
Figura 4 - Representação de um sistema aquosos bifásico.	27
Figura 5 - Diagrama de fases retangular.	29
Figura 6 - Reciclo da fase polimérica e extração da proteína alvo em um SAB constituído por polímero termossensível.	34
Figura 7 - Estrutura química do copolímero tribloco PEO-PPO-PEO.	35
Figura 8 - (a) Molécula de copolímero tribloco, (b) SAB formado por copolímero tribloco + sal, (c) Complexo extratante (compostos hidrofóbicos) particionados preferencialmente na fase enriquecida com copolímero devido a sua solubilização nos núcleos das micelas.	35
Figura 9 - (a) Câmara de fotoperíodo; (b) mesa agitadora.	38
Figura 10 - Ensaio realizados utilizando as cepas de cianobactérias <i>Anabaena</i> <i>variabilis</i> e <i>Nostoc</i> sp.	39
Figura 11 - Erlenmeyers envoltos com papel celofane de diferentes cores, com o objetivo de promover iluminação cromática no interior da câmara de fotoperíodo em mesa agitadora.	42
Figura 12 - Espectro de transmissão de luz para as diferentes cores de celofane.	42
Figura 13- Método de congelamento e descongelamento combinado com ultrassom para extração das FBP.	44
Figura 14 - Fluxograma do processo de recuperação de FBP por SAB com adição de NaCl.	45
Figura 15 - Procedimento para recuperação de FBP por SAB do tipo PEG-sal com adição de NaCl.	47
Figura 16 - Copolímeros L62, L64 e F68, respectivamente.	48
Figura 17 - Fluxograma do processo de recuperação de FBP por SAB formado por copolímero-SAL.	48
Figura 18 - Procedimento para recuperação das FBP por SAB do tipo copolímero-sal.	51
Figura 19 - Varredura espectral obtida para as cepas de (a) <i>Nostoc</i> sp. PCC 7423 e ..	57

Figura 20 - Concentração celular para 10% de inóculo: (a) influência isolada de glicose; (b) influência de glicose combinada com 2 mM de nitrato de sódio; (c) influência de glicose combinada com 5 mM de nitrato de sódio e (d) influência de nitrato de sódio para meios com 1g.L ⁻¹ e 2 g.L ⁻¹ de glicose.....	59
Figura 21 - Concentração celular para 20% de inóculo: (a) influência isolada de glicose; (b) influência de glicose combinada com 2 mM de nitrato de sódio; (c) influência de glicose combinada com 5 mM de nitrato de sódio e (d) influência de nitrato de sódio para meios com 1g.L ⁻¹ e 2 g.L ⁻¹ de glicose.....	61
Figura 22 - Concentração de FC obtida para 10% de inóculo para <i>Nostoc</i> sp. para cada suplementação*.....	64
Figura 23 - Concentração de FC obtida para 20% de inóculo para <i>Nostoc</i> sp. para cada suplementação*.....	65
Figura 24 - Perfil de crescimento celular por 14 dias, em diferentes qualidades de luz em meio basal BG11 ₀ para <i>Nostoc</i> sp. Luz branca (○), luz azul (▲), luz vermelha (●), luz verde (■), luz amarela (■).....	69
Figura 25 - Perfil de crescimento celular por 14 dias, em diferentes qualidades de luz, em meio basal BG11 ₀ com suplementação de 2 g.L ⁻¹ de glicose e 5 mM de nitrato de sódio para <i>Nostoc</i> sp. Luz branca (○), luz azul (▲), luz vermelha (●), luz verde (■), luz amarela (■).....	69
Figura 26 - Perfil de crescimento celular por 14 dias, em diferentes qualidades de luz em meio basal BG11 ₀ para <i>Anabaena variabilis</i> . Luz branca (○), luz azul (▲), luz vermelha (●), luz verde (■), luz amarela (■).....	70
Figura 27 - Perfil de crescimento celular por 14 dias, em diferentes qualidades de luz, em meio basal BG11 ₀ com suplementação de 0,5 g.L ⁻¹ de glicose e 2 mM de nitrato de sódio para <i>Anabaena variabilis</i> . Luz branca (○), luz azul (▲), luz vermelha (●), luz verde (■), luz amarela (■).....	71
Figura 28 - Concentração específica de FC por 14 dias, sob diferentes qualidades de luz, em meio basal BG11 ₀ , para <i>Nostoc</i> sp. Luz branca (□), luz azul (■), luz vermelha (■), luz verde (■), luz amarela (■).....	73
Figura 29 - Concentração específica de FC por 14 dias, sob diferentes qualidades de luz em meio basal BG11 ₀ com suplementação de 2 g.L ⁻¹ de glicose e 5 mM de nitrato de sódio, para <i>Nostoc</i> sp. Luz branca (□), luz azul (■), luz vermelha (■), luz verde (■), luz amarela (■).....	73

Figura 30 - Concentração específica de FC por 14 dias, sob diferentes qualidades de luz, em meio basal BG11 ₀ , para <i>Anabaena variabilis</i> . Luz branca (□), luz azul (■), luz vermelha (■), luz verde (■), luz amarela (■).....	75
Figura 31 - Concentração específica de FC por 14 dias, sob diferentes qualidades de luz em meio basal com suplementação de 0,5 g.L ⁻¹ de glicose e 2 mM de nitrato de sódio para <i>Anabaena variabilis</i> . Luz branca (□), luz azul (■), luz vermelha (■), luz verde (■), luz amarela (■).....	75
Figura 32 - Partição da FC para a fase topo rica em PEG.	79
Figura 33 - Partição da FC para fase fundo rica em sal, para proporção 25% copolímero/8% sal.	82
Figura 34 - Partição da FC para fase topo rica em copolímero, para proporção 15% copolímero/15% sal.	85

Figura 20 - Concentração celular para 10% de inóculo: (a) influência isolada de glicose; (b) influência de glicose combinada com 2 mM de nitrato de sódio; (c) influência de glicose combinada com 5 mM de nitrato de sódio e (d) influência de nitrato de sódio para meios com 1g.L ⁻¹ e 2 g.L ⁻¹ de glicose.....	59
Figura 21 - Concentração celular para 20% de inóculo: (a) influência isolada de glicose; (b) influência de glicose combinada com 2 mM de nitrato de sódio; (c) influência de glicose combinada com 5 mM de nitrato de sódio e (d) influência de nitrato de sódio para meios com 1g.L ⁻¹ e 2 g.L ⁻¹ de glicose.....	61
Figura 22 - Concentração de FC obtida para 10% de inóculo para <i>Nostoc</i> sp. para cada suplementação*.....	64
Figura 23 - Concentração de FC obtida para 20% de inóculo para <i>Nostoc</i> sp. para cada suplementação*.....	65
Figura 24 - Perfil de crescimento celular por 14 dias, em diferentes qualidades de luz em meio basal BG11 ₀ para <i>Nostoc</i> sp. Luz branca (○), luz azul (▲), luz vermelha (●), luz verde (■), luz amarela (■).....	69
Figura 25 - Perfil de crescimento celular por 14 dias, em diferentes qualidades de luz, em meio basal BG11 ₀ com suplementação de 2 g.L ⁻¹ de glicose e 5 mM de nitrato de sódio para <i>Nostoc</i> sp. Luz branca (○), luz azul (▲), luz vermelha (●), luz verde (■), luz amarela (■).....	69
Figura 26 - Perfil de crescimento celular por 14 dias, em diferentes qualidades de luz em meio basal BG11 ₀ para <i>Anabaena variabilis</i> . Luz branca (○), luz azul (▲), luz vermelha (●), luz verde (■), luz amarela (■).....	70
Figura 27 - Perfil de crescimento celular por 14 dias, em diferentes qualidades de luz, em meio basal BG11 ₀ com suplementação de 0,5 g.L ⁻¹ de glicose e 2 mM de nitrato de sódio para <i>Anabaena variabilis</i> . Luz branca (○), luz azul (▲), luz vermelha (●), luz verde (■), luz amarela (■).....	71
Figura 28 - Concentração específica de FC por 14 dias, sob diferentes qualidades de luz, em meio basal BG11 ₀ , para <i>Nostoc</i> sp. Luz branca (□), luz azul (■), luz vermelha (■), luz verde (■), luz amarela (■).....	73
Figura 29 - Concentração específica de FC por 14 dias, sob diferentes qualidades de luz em meio basal BG11 ₀ com suplementação de 2 g.L ⁻¹ de glicose e 5 mM de nitrato de sódio, para <i>Nostoc</i> sp. Luz branca (□), luz azul (■), luz vermelha (■), luz verde (■), luz amarela (■).....	73

Figura 30 - Concentração específica de FC por 14 dias, sob diferentes qualidades de luz, em meio basal BG11 ₀ , para <i>Anabaena variabilis</i> . Luz branca (□), luz azul (■), luz vermelha (■), luz verde (■), luz amarela (■).....	75
Figura 31 - Concentração específica de FC por 14 dias, sob diferentes qualidades de luz em meio basal com suplementação de 0,5 g.L ⁻¹ de glicose e 2 mM de nitrato de sódio para <i>Anabaena variabilis</i> . Luz branca (□), luz azul (■), luz vermelha (■), luz verde (■), luz amarela (■).....	75
Figura 32 - Partição da FC para a fase topo rica em PEG.	79
Figura 33 - Partição da FC para fase fundo rica em sal, para proporção 25% copolímero/8% sal.	82
Figura 34 - Partição da FC para fase topo rica em copolímero, para proporção 15% copolímero/15% sal.	85

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organização celular de uma cianobactéria.	18
Figura 2 - Estrutura do ficobilissomo.	21
Figura 3 - Diagrama das diferentes etapas envolvidas na produção de ficobiliproteínas.	23
Figura 4 - Representação de um sistema aquosos bifásico.	27
Figura 5 - Diagrama de fases retangular.	29
Figura 6 - Reciclo da fase polimérica e extração da proteína alvo em um SAB constituído por polímero termossensível.	34
Figura 7 - Estrutura química do copolímero tribloco PEO-PPO-PEO.	35
Figura 8 - (a) Molécula de copolímero tribloco, (b) SAB formado por copolímero tribloco + sal, (c) Complexo extratante (compostos hidrofóbicos) particionados preferencialmente na fase enriquecida com copolímero devido a sua solubilização nos núcleos das micelas.	35
Figura 9 - (a) Câmara de fotoperíodo; (b) mesa agitadora.	38
Figura 10 - Ensaio realizados utilizando as cepas de cianobactérias <i>Anabaena variabilis</i> e <i>Nostoc sp.</i>	39
Figura 11 - Erlenmeyers envoltos com papel celofane de diferentes cores, com o objetivo de promover iluminação cromática no interior da câmara de fotoperíodo em mesa agitadora.	42
Figura 12 - Espectro de transmissão de luz para as diferentes cores de celofane.	42
Figura 13- Método de congelamento e descongelamento combinado com ultrassom para extração das FBP.	44
Figura 14 - Fluxograma do processo de recuperação de FBP por SAB com adição de NaCl.	45
Figura 15 - Procedimento para recuperação de FBP por SAB do tipo PEG-sal com adição de NaCl.	47
Figura 16 - Copolímeros L62, L64 e F68, respectivamente.	48
Figura 17 - Fluxograma do processo de recuperação de FBP por SAB formado por copolímero-SAL.	48
Figura 18 - Procedimento para recuperação das FBP por SAB do tipo copolímero-sal.	51
Figura 19 - Varredura espectral obtida para as cepas de (a) <i>Nostoc sp.</i> PCC 7423 e ..	57

Figura 20 - Concentração celular para 10% de inóculo: (a) influência isolada de glicose; (b) influência de glicose combinada com 2 mM de nitrato de sódio; (c) influência de glicose combinada com 5 mM de nitrato de sódio e (d) influência de nitrato de sódio para meios com 1g.L ⁻¹ e 2 g.L ⁻¹ de glicose.....	59
Figura 21 - Concentração celular para 20% de inóculo: (a) influência isolada de glicose; (b) influência de glicose combinada com 2 mM de nitrato de sódio; (c) influência de glicose combinada com 5 mM de nitrato de sódio e (d) influência de nitrato de sódio para meios com 1g.L ⁻¹ e 2 g.L ⁻¹ de glicose.....	61
Figura 22 - Concentração de FC obtida para 10% de inóculo para <i>Nostoc</i> sp. para cada suplementação*.....	64
Figura 23 - Concentração de FC obtida para 20% de inóculo para <i>Nostoc</i> sp. para cada suplementação*.....	65
Figura 24 - Perfil de crescimento celular por 14 dias, em diferentes qualidades de luz em meio basal BG11 ₀ para <i>Nostoc</i> sp. Luz branca (○), luz azul (▲), luz vermelha (●), luz verde (■), luz amarela (■).....	69
Figura 25 - Perfil de crescimento celular por 14 dias, em diferentes qualidades de luz, em meio basal BG11 ₀ com suplementação de 2 g.L ⁻¹ de glicose e 5 mM de nitrato de sódio para <i>Nostoc</i> sp. Luz branca (○), luz azul (▲), luz vermelha (●), luz verde (■), luz amarela (■).....	69
Figura 26 - Perfil de crescimento celular por 14 dias, em diferentes qualidades de luz em meio basal BG11 ₀ para <i>Anabaena variabilis</i> . Luz branca (○), luz azul (▲), luz vermelha (●), luz verde (■), luz amarela (■).....	70
Figura 27 - Perfil de crescimento celular por 14 dias, em diferentes qualidades de luz, em meio basal BG11 ₀ com suplementação de 0,5 g.L ⁻¹ de glicose e 2 mM de nitrato de sódio para <i>Anabaena variabilis</i> . Luz branca (○), luz azul (▲), luz vermelha (●), luz verde (■), luz amarela (■).....	71
Figura 28 - Concentração específica de FC por 14 dias, sob diferentes qualidades de luz, em meio basal BG11 ₀ , para <i>Nostoc</i> sp. Luz branca (□), luz azul (■), luz vermelha (■), luz verde (■), luz amarela (■).....	73
Figura 29 - Concentração específica de FC por 14 dias, sob diferentes qualidades de luz em meio basal BG11 ₀ com suplementação de 2 g.L ⁻¹ de glicose e 5 mM de nitrato de sódio, para <i>Nostoc</i> sp. Luz branca (□), luz azul (■), luz vermelha (■), luz verde (■), luz amarela (■).....	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais cianobactérias fixadoras de nitrogênio.	19
Quadro 2 - Constituintes dos SAB (polímero/copolímero+ sal+ água) recentemente estudados.	28

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais cianobactérias fixadoras de nitrogênio.	19
Quadro 2 - Constituintes dos SAB (polímero/copolímero+ sal+ água) recentemente estudados.	28

Figura 30 - Concentração específica de FC por 14 dias, sob diferentes qualidades de luz, em meio basal BG11 ₀ , para <i>Anabaena variabilis</i> . Luz branca (□), luz azul (■), luz vermelha (■), luz verde (■), luz amarela (■).....	75
Figura 31 - Concentração específica de FC por 14 dias, sob diferentes qualidades de luz em meio basal com suplementação de 0,5 g.L ⁻¹ de glicose e 2 mM de nitrato de sódio para <i>Anabaena variabilis</i> . Luz branca (□), luz azul (■), luz vermelha (■), luz verde (■), luz amarela (■).....	75
Figura 32 - Partição da FC para a fase topo rica em PEG.	79
Figura 33 - Partição da FC para fase fundo rica em sal, para proporção 25% copolímero/8% sal.	82
Figura 34 - Partição da FC para fase topo rica em copolímero, para proporção 15% copolímero/15% sal.	85

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais cianobactérias fixadoras de nitrogênio.	19
Quadro 2 - Constituintes dos SAB (polímero/copolímero+ sal+ água) recentemente estudados.	28

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais cianobactérias fixadoras de nitrogênio.	19
Quadro 2 - Constituintes dos SAB (polímero/copolímero+ sal+ água) recentemente estudados.	28

Figura 20 - Concentração celular para 10% de inóculo: (a) influência isolada de glicose; (b) influência de glicose combinada com 2 mM de nitrato de sódio; (c) influência de glicose combinada com 5 mM de nitrato de sódio e (d) influência de nitrato de sódio para meios com 1g.L ⁻¹ e 2 g.L ⁻¹ de glicose.....	59
Figura 21 - Concentração celular para 20% de inóculo: (a) influência isolada de glicose; (b) influência de glicose combinada com 2 mM de nitrato de sódio; (c) influência de glicose combinada com 5 mM de nitrato de sódio e (d) influência de nitrato de sódio para meios com 1g.L ⁻¹ e 2 g.L ⁻¹ de glicose.....	61
Figura 22 - Concentração de FC obtida para 10% de inóculo para <i>Nostoc</i> sp. para cada suplementação*.....	64
Figura 23 - Concentração de FC obtida para 20% de inóculo para <i>Nostoc</i> sp. para cada suplementação*.....	65
Figura 24 - Perfil de crescimento celular por 14 dias, em diferentes qualidades de luz em meio basal BG11 ₀ para <i>Nostoc</i> sp. Luz branca (○), luz azul (▲), luz vermelha (●), luz verde (■), luz amarela (■).....	69
Figura 25 - Perfil de crescimento celular por 14 dias, em diferentes qualidades de luz, em meio basal BG11 ₀ com suplementação de 2 g.L ⁻¹ de glicose e 5 mM de nitrato de sódio para <i>Nostoc</i> sp. Luz branca (○), luz azul (▲), luz vermelha (●), luz verde (■), luz amarela (■).....	69
Figura 26 - Perfil de crescimento celular por 14 dias, em diferentes qualidades de luz em meio basal BG11 ₀ para <i>Anabaena variabilis</i> . Luz branca (○), luz azul (▲), luz vermelha (●), luz verde (■), luz amarela (■).....	70
Figura 27 - Perfil de crescimento celular por 14 dias, em diferentes qualidades de luz, em meio basal BG11 ₀ com suplementação de 0,5 g.L ⁻¹ de glicose e 2 mM de nitrato de sódio para <i>Anabaena variabilis</i> . Luz branca (○), luz azul (▲), luz vermelha (●), luz verde (■), luz amarela (■).....	71
Figura 28 - Concentração específica de FC por 14 dias, sob diferentes qualidades de luz, em meio basal BG11 ₀ , para <i>Nostoc</i> sp. Luz branca (□), luz azul (■), luz vermelha (■), luz verde (■), luz amarela (■).....	73
Figura 29 - Concentração específica de FC por 14 dias, sob diferentes qualidades de luz em meio basal BG11 ₀ com suplementação de 2 g.L ⁻¹ de glicose e 5 mM de nitrato de sódio, para <i>Nostoc</i> sp. Luz branca (□), luz azul (■), luz vermelha (■), luz verde (■), luz amarela (■).....	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais cianobactérias fixadoras de nitrogênio.	19
Quadro 2 - Constituintes dos SAB (polímero/copolímero+ sal+ água) recentemente estudados.	28

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais cianobactérias fixadoras de nitrogênio.	19
Quadro 2 - Constituintes dos SAB (polímero/copolímero+ sal+ água) recentemente estudados.	28

Figura 30 - Concentração específica de FC por 14 dias, sob diferentes qualidades de luz, em meio basal BG11 ₀ , para <i>Anabaena variabilis</i> . Luz branca (□), luz azul (■), luz vermelha (■), luz verde (■), luz amarela (■).....	75
Figura 31 - Concentração específica de FC por 14 dias, sob diferentes qualidades de luz em meio basal com suplementação de 0,5 g.L ⁻¹ de glicose e 2 mM de nitrato de sódio para <i>Anabaena variabilis</i> . Luz branca (□), luz azul (■), luz vermelha (■), luz verde (■), luz amarela (■).....	75
Figura 32 - Partição da FC para a fase topo rica em PEG.	79
Figura 33 - Partição da FC para fase fundo rica em sal, para proporção 25% copolímero/8% sal.	82
Figura 34 - Partição da FC para fase topo rica em copolímero, para proporção 15% copolímero/15% sal.	85

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais cianobactérias fixadoras de nitrogênio.	19
Quadro 2 - Constituintes dos SAB (polímero/copolímero+ sal+ água) recentemente estudados.	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condição de suplementação ao meio BG11 ₀ para a cepa de <i>Nostoc</i> sp., utilizando glicose e nitrato de sódio para um volume inicial de inóculo de 10% e 20%.....	41
Tabela 2 - Composições dos SABs PEG-1500-fosfato de potássio com adição de NaCl. Massa total do sistema, 20g.....	46
Tabela 3 - Composição dos SABs F68-sais, L64-sais e L62-sais, para a primeira etapa.	50
Tabela 4 - Efeito da concentração de NaCl no sistema SAB (PEG 1500 – fosfato de potássio) para recuperação de FC do extrato de <i>Nostoc</i> sp.....	77
Tabela 5 - Efeito da concentração de NaCl no sistema SAB (PEG 1500 – fosfato de potássio) para recuperação de FC do extrato de <i>Anabaena variabilis</i>	78
Tabela 6- Resultados obtidos para a 1 ^a Proporção de SAB no extrato obtido da cepa de <i>Anabaena variabilis</i> (25% copolímero e 8% sal).	80
Tabela 7 - Resultados obtidos para a 1 ^a Proporção de SAB no extrato obtido da cepa de <i>Nostoc</i> sp. (25% copolímero e 8% sal).	82
Tabela 8 - Resultados obtidos para a 2 ^a Proporção de SAB no extrato obtido da cepa de <i>Anabaena variabilis</i> (15% copolímero e 15% sal).	84
Tabela 9 - Resultados obtidos para a 2 ^a Proporção de SAB no extrato obtido da cepa de <i>Nostoc</i> sp. (15% copolímero e 15% sal).	84
Tabela 10 – Temperaturas de “cloud point” e recuperação para os copolímeros F68, L64 e L62.	87

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais cianobactérias fixadoras de nitrogênio.	19
Quadro 2 - Constituintes dos SAB (polímero/copolímero+ sal+ água) recentemente estudados.	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condição de suplementação ao meio BG11 ₀ para a cepa de <i>Nostoc</i> sp., utilizando glicose e nitrato de sódio para um volume inicial de inóculo de 10% e 20%.....	41
Tabela 2 - Composições dos SABs PEG-1500-fosfato de potássio com adição de NaCl. Massa total do sistema, 20g.....	46
Tabela 3 - Composição dos SABs F68-sais, L64-sais e L62-sais, para a primeira etapa.	50
Tabela 4 - Efeito da concentração de NaCl no sistema SAB (PEG 1500 – fosfato de potássio) para recuperação de FC do extrato de <i>Nostoc</i> sp.....	77
Tabela 5 - Efeito da concentração de NaCl no sistema SAB (PEG 1500 – fosfato de potássio) para recuperação de FC do extrato de <i>Anabaena variabilis</i>	78
Tabela 6- Resultados obtidos para a 1 ^a Proporção de SAB no extrato obtido da cepa de <i>Anabaena variabilis</i> (25% copolímero e 8% sal).	80
Tabela 7 - Resultados obtidos para a 1 ^a Proporção de SAB no extrato obtido da cepa de <i>Nostoc</i> sp. (25% copolímero e 8% sal).	82
Tabela 8 - Resultados obtidos para a 2 ^a Proporção de SAB no extrato obtido da cepa de <i>Anabaena variabilis</i> (15% copolímero e 15% sal).	84
Tabela 9 - Resultados obtidos para a 2 ^a Proporção de SAB no extrato obtido da cepa de <i>Nostoc</i> sp. (15% copolímero e 15% sal).	84
Tabela 10 – Temperaturas de “cloud point” e recuperação para os copolímeros F68, L64 e L62.	87

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Cianobactérias.....	18
2.2	Ficobiliproteínas.....	21
2.3	Otimização para produção de FBP.....	22
2.4	Extração e purificação	24
2.5	Purificação por sistema aquoso bifásico (SAB).....	26
2.6	Diagrama de fases e coeficiente de partição (K)	28
2.7	Sistema PEG-Sal	31
2.8	Copolímeros triblocos	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	Material.....	37
3.2	Metodologia	37
3.2.1	Manutenção das Cianobactérias	37
3.2.2	Avaliação do efeito da suplementação do meio basal com fonte de carbono e nitrogênio na produção de FBP.....	39
3.2.3	Análise do efeito de diferentes qualidades de luz	41
3.2.4	Análise do efeito combinado de diferentes qualidades de luz e melhor resposta para suplementação do meio basal	43
3.2.5	Estudo do processo de recuperação das FBP	43
3.2.5.1	Extração das FBP.....	43
3.2.5.2	Sistema PEG-SAL com adição de NaCl.....	44
3.2.5.3	Sistema Copolímero tri-bloco-SAL	47
3.2.5.3.1	Obtenção do diagrama de fases	49
3.2.5.3.2	Obtenção dos SAB	49
3.2.6	Recuperação do Copolímero por Termosseparação	51

3.2.6.1	Determinação do “ <i>Cloud point</i> ”	51
3.2.6.2	Determinação da composição de fase	52
3.2.6.3	Recuperação do copolímero	52
3.2.7	Métodos analíticos.....	53
3.2.7.1	Concentração celular.....	53
3.2.7.2	Concentração de açúcares	54
3.2.7.3	Concentração de FBP.....	54
3.2.7.4	Análise do extrato após purificação por SAB	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1	Análise da presença de FBP nos extratos de <i>Nostoc sp.</i> e <i>Anabaena variabilis</i> 57	
4.2	Avaliação da suplementação de glicose e nitrato ao meio de cultivo para crescimento celular e produção de ficocianina	58
4.2.1	Crescimento celular	58
4.2.2	Ficobiliproteínas (FBP).....	63
4.3	Avaliação do efeito da qualidade da luz para crescimento celular e produção de ficocianina.....	68
4.3.1	Avaliação do efeito da qualidade da luz para o crescimento celular no cultivo de <i>Nostoc sp.</i> e <i>Anabaena variabilis.</i>	68
4.3.2	Avaliação do efeito da qualidade da luz para produção de ficocianina no cultivo de <i>Nostoc sp.</i> e <i>Anabaena variabilis.</i>	72
4.4	Avaliação do efeito da adição de NaCl ao sistema SAB do tipo PEG-Sal para recuperação das FBPs.....	77
4.5	Avaliação do processo de recuperação por SAB do tipo Copolímero-Sal para recuperação das FBPs.....	80
4.6	Avaliação do processo de recuperação do copolímero por Termosseparação	87
5	CONCLUSÕES E ETAPAS FUTURAS	89
5.1	Conclusões.....	89
5.2	Sugestões para trabalhos futuros.....	90

6 REFERÊNCIAS.....	92
APÊNDICE A.....	103

1 INTRODUÇÃO

Pesquisas em biocompostos têm aumentado nas últimas décadas, trazendo consigo um avanço nos estudos em microrganismos como as cianobactérias, devido à possibilidade de aplicações comerciais em diferentes áreas, como indústrias alimentícias, sejam elas relacionadas à nutrição humana ou animal; indústrias químicas e farmacêuticas; ou ainda aplicados no tratamento de resíduos, e na produção de energia, entre outros (KEITHELLAKPAM et al., 2015; PATEL et al., 2018).

As cianobactérias são organismos fotossintéticos presentes em diversos ambientes, sejam eles naturais ou modificados pelo homem, sendo crescente o número de estudos sobre a sua estrutura, os mecanismos de fotossíntese, fixação de nitrogênio e outros nutrientes e a relação destes aspectos com a produção de compostos bioativos de alto valor agregado (GUEDES et al., 2013).

Mais especificamente, pode-se ressaltar os estudos para obtenção e recuperação de ficobiliproteínas (FBP), que são os principais metabólitos produzidos pelas cianobactérias, associados ao complexo de captação de luz na fotossíntese, denominado ficobilissoma. Esses pigmentos podem ser usados como corantes naturais para alimentos e produtos cosméticos, bem como marcadores fluorescentes moleculares, dependendo do grau de pureza (NOREÑA-CARO; BENTON, 2018). Podem ser divididas em três classes, baseadas em seu comprimento de onda de máximo de absorção, ficoeritrina (FE, $\lambda_{\max} = 490 \sim 570$ nm, pigmento vermelho), ficocianina (FC, $\lambda_{\max} \sim 610 \sim 625$ nm, pigmento azul) e aloficocianina (AFC $\lambda_{\max} \sim 650 \sim 660$ nm, pigmento verde azulado) (KHATTAR et al., 2015; WILDMAN; BOWEN, 1974).

Diversos são os fatores que influenciam o crescimento de biomassa e o processo de produção de metabólitos nas cianobactérias. Os principais são fatores abióticos, que incluem luz, temperatura, pH, salinidade e composição e concentração de nutrientes do meio de cultivo, os quais afetam diretamente o metabolismo do organismo (GUTU; KEHOE, 2012; REIS et al., 1998).

A respeito de sua purificação, um parâmetro importante no estudo das ficobiliproteínas é a pureza que é calculada pela relação entre a taxa de absorbância à 620 nm e à 280 nm. A FC com pureza acima de 0,7 é considerada como grau alimentício, 3,9 como grau reativo e acima de 4 como grau analítico (RITO-PALOMARES; NUEZ; AMADOR, 2001). Diversos são os métodos utilizados para a purificação de ficobiliproteínas, sendo que a maioria deles possui diversas etapas envolvidas, o que representa uma desvantagem, uma vez que quanto

maior o número de etapas, menor é o rendimento desta etapa do processo para obtenção do produto final. Nesse sentido, surge a necessidade de um método de purificação que seja tanto eficiente quanto economicamente viável e que alcance alta pureza e rendimento. O método de biosseparação que tem apresentado características atrativas é o sistema aquoso bifásico (SAB), que consiste em um método de extração líquido-líquido formado por duas fases composto por dois polímeros imiscíveis ou um polímero e um sal acima de sua concentração crítica (saturação). 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 (RUIZ-RUIZ; BENAVIDES; RITO-PALOMARES, 2013; SANTHI et al., 2020).

Em trabalho anterior desenvolvido por este grupo de pesquisa (COTTAS, 2019; COTTAS et al., 2020), a produção de ficobiliproteínas foi avaliada ao estudar o efeito da concentração de glicose e de nitrato de sódio do meio de cultivo, indicando que a suplementação favoreceu tanto o aumento de biomassa como a síntese de pigmento. Além disso, o estudo da recuperação das ficobiliproteínas por SAB também foi investigado ao testar o efeito do peso molecular do PEG (1500 e 4000), o tipo de sal (fosfato de potássio e citrato de sódio) e a razão de volume (volume fase topo/volume fase fundo), ao obter recuperação acima de 79%, coeficiente de partição superior a 5,7 e pureza de grau alimentício. Verificou-se ainda que a principal ficobiliproteína foi a ficocianina para ambas as cepas *Nostoc* sp. e *Anabaena variabilis*.

Assim, este trabalho tem como objetivo dar continuidade ao estudo tanto da produção de biomassa e de ficocianina (FC) a partir das cianobactérias *Nostoc* sp. e *Anabaena variabilis*, ao avançar na investigação de variáveis/parâmetros que não foram encontrados na literatura, como por exemplo o emprego de sistemas aquosos bifásicos (SAB) dos tipos PEG-sal (efeito “salting-out”) e copolímeros tri-bloco para a recuperação de ficobiliproteínas (FBP).

A seguir são apresentados os objetivos específicos deste trabalho:

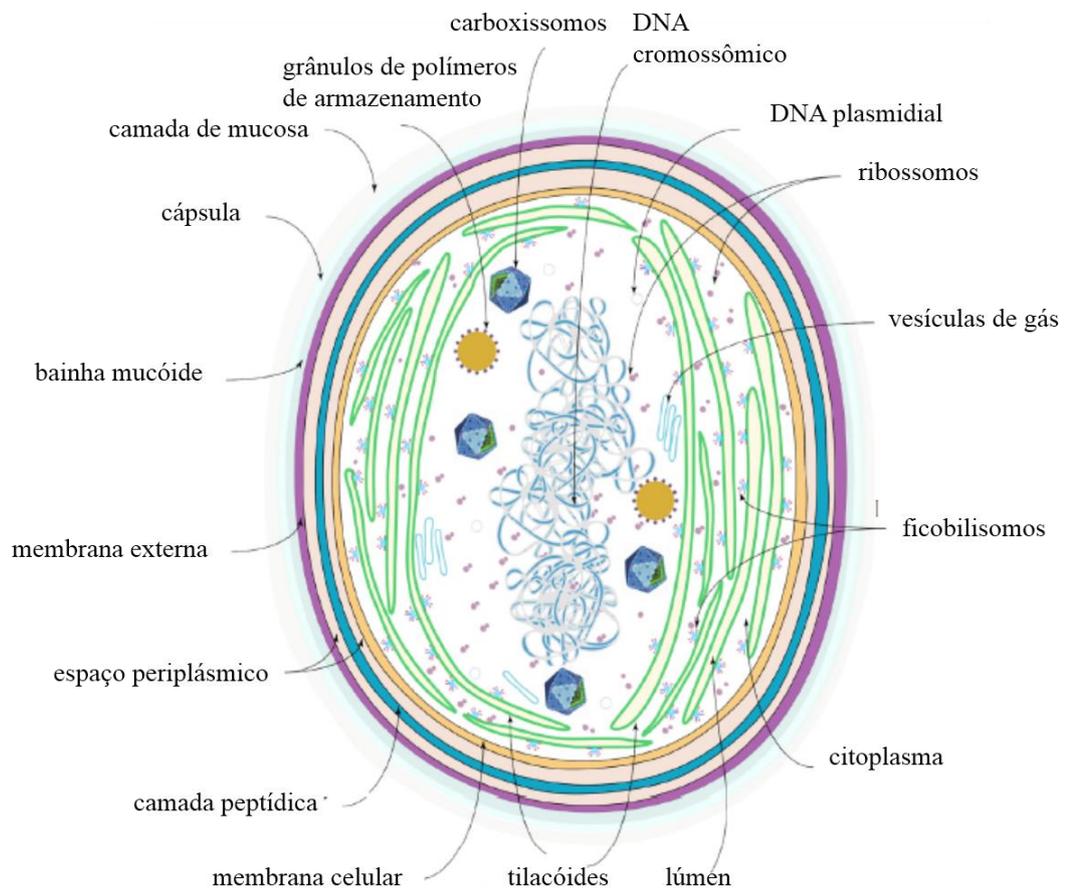
- Avaliar influência de diferentes qualidades de luz (amarelo, vermelho, azul e verde) sob as condições de meio suplementado com fonte de carbono orgânico e nitrogênio, previamente definidas.
- Investigar o efeito da adição do NaCl ao sistema aquoso bifásico do tipo PEG-sal para recuperação de FC.
- Estudar o sistema aquoso bifásico do tipo copolímero-sal para recuperação da FC, incluindo a construção do diagrama de fases, a análise do efeito do peso molecular do polímero e o tipo de sal utilizado e testar a recuperação do copolímero por termosseparação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cianobactérias

As cianobactérias são seres procariontes fotoautotróficos, fixadores de nitrogênio, também conhecidas por algas azuis ou verdes, e vivem em diversos tipos de habitats aquáticos e terrestres, naturais e artificiais. Possuem diversas características estruturais semelhantes às bactérias, mas devido ao seu teor de clorofila a e outros compostos, são classificadas como algas. A organização geral de uma célula de cianobactéria é apresentada na Figura 1 (KHATOON et al., 2018; KUMAR et al., 2019).

Figura 1 - Organização celular de uma cianobactéria.



Fonte: Adaptado de NOREÑA-CARO; BENTON (2018).

As cianobactérias possuem diferentes formas e tamanhos, que abrangem cerca de 150 gêneros identificados até o momento. Apresentam características de fósseis encontrados cerca

de 3,5 bilhões de anos atrás. Esses organismos evoluíram a capacidade de utilizar o oxigênio para realizar a fotossíntese, o que mais tarde deu origem ao desenvolvimento das algas e plantas eucariontes. Portanto, por serem responsáveis por grande parte do oxigênio presente no nosso ambiente atualmente, possuem um grande significado evolutivo (CHITTORA et al., 2020; HAGEMANN; HESS, 2018).

Apresentam a capacidade de fixação do nitrogênio atmosférico através de células especiais denominadas heterocistos. Por meio de uma metodologia desenvolvida para quantificação de nitrogênio fixado pelas cianobactérias fixadoras de N₂, foi possível classificá-las em três grupos distintos: unicelular, não-heterocisto filamentosa e heterocisto filamentosa, como apresenta o Quadro 1 (GAUTAM et al., 2019; VAISHAMPAYAN et al., 2001).

Quadro 1 - Principais cianobactérias fixadoras de nitrogênio.

Unicelular	Não-heterocisto filamentosa	Heterocisto filamentosa
<i>Aphanothece</i>	<i>Lyngbya</i>	<i>Anabaena</i>
<i>Croococidiopsis</i>	LPP group	<i>Anabaenopsis</i>
<i>Dermocarpa</i>	<i>Microcoleus chthonoplastes</i>	<i>Aulosira</i>
<i>Gloeocapsa (Gloeothece)</i>	<i>Myxosarcina</i>	<i>Calothrix</i>
<i>Myxosarcina</i>	<i>Oscillatoria</i>	<i>Camptylonema</i>
<i>Pleurocapsa group</i>	<i>Plectonema boryanum</i>	<i>Chlorogloea</i>
<i>Synechococcus</i>	<i>Pseudoanabaena</i>	<i>Chlorogloeopsis</i>
<i>Xenococcus</i>	<i>Shizothrix</i>	<i>Cylindrospermum</i>
	<i>Trichodesmium</i>	<i>Fischerella</i>
		<i>Gloeotrichia</i>
		<i>Haplosiphon</i>
		<i>Mastigocladus</i>
		<i>Nodularia</i>
		<i>Nostoc</i>
		<i>Nostochopsis</i>
		<i>Rivularia</i>
		<i>Scytonema</i>
		<i>Scytonematopsis</i>
		<i>Stigonema</i>
		<i>Tolypothrix</i>
		<i>Westiella</i>
		<i>Westiellopsis</i>

Fonte: Adaptado de VAISHAMPAYAN et al.(2001).

Durante sua evolução, as cianobactérias desenvolveram uma adaptação cromática, que lhe deram a capacidade de dominar diversos ambientes iluminados. Os principais pigmentos fotossintéticos das cianobactérias são clorofilas e ficobilinas. Semelhante às plantas superiores, as cianobactérias também contêm carotenóides, responsáveis pela absorção de luz e por protegerem a célula de possíveis danos causados pela luminescência. Produzem como principal metabólito as ficobiliproteínas (FBP), em um complexo denominado ficobilissoma, responsável pela captação de luz na fotossíntese. As FBP são proteínas pigmentadas que possuem diversas aplicações como corantes naturais para alimentos e produtos cosméticos, marcadores fluorescentes moleculares, entre outros a depender de seu grau de pureza (KEITHELLAKPAM et al., 2015; NOREÑA-CARO; BENTON, 2018; PATEL et al., 2018).

De fato, as cianobactérias têm sido consideradas como uma rica fonte de metabólitos secundários com potencial biotecnológico e aplicações no campo farmacológico. Atualmente, a produção de compostos bioativos para fins comerciais e aplicações médicas também é responsável pelo aumento do interesse em estudar esses organismos. É certo que, juntamente com a produção de toxinas potentes, as cianobactérias produzem muitas substâncias que têm mostrado resultados satisfatórios e encorajadores em termos antifúngicos, antibióticos, anti-HIV, anticoagulantes, anti-inflamatórios, antiprotozoários, antituberculosos, antivírus e anticancerígenos (ARIAS et al., 2017; VIJAYAKUMAR; MENAKHA, 2015).

Para o cultivo de cianobactérias, os cinco principais parâmetros abióticos críticos que determinam o sucesso de crescimento do sistema destes organismos fotossintéticos são luz, dióxido de carbono e água, em diferentes meios de cultivo, sob condições controladas de pH e temperatura, processo este denominado de “*upstream*”, que representa a produção de biomassa e concentração ou acúmulo de seus compostos. Posteriormente existe o processo “*downstream*”, representado pelos métodos de extração, recuperação e purificação destes compostos (PULZ; GROSS, 2004).

Em relação à adição de fontes de carbono, como o primeiro nutriente necessário para o crescimento e produção de metabólitos, sua adição ao meio de cultura de cianobactérias as torna mixotróficas, o que significa que elas não dependem apenas da atividade fotossintética; com a vantagem de menos perda de biomassa durante a fase de escuro, condição que aumenta a produção de ficocianina (ANDRADE; COSTA, 2007; KOVAČ et al., 2017).

O nitrogênio segue as fontes de carbono como segundo nutriente mais requerido em relação à produção de biomassa e acúmulo de FBP, sendo as duas variáveis mais importantes a serem analisadas visando a otimização do meio de cultivo. Para as cianobactérias, a fonte

destes dois nutrientes e as quantidades necessárias podem variar entre as espécies (MANIRAFASHA et al., 2016; PAGELS et al., 2019)

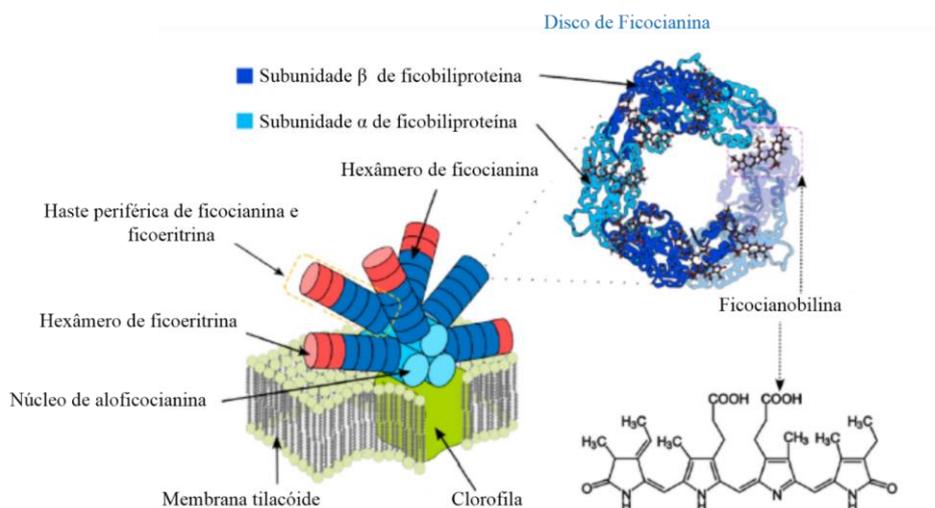
2.2 Ficobiliproteínas

Ficobiliproteínas (FBPs), são uma família de proteínas pigmentadas e são os principais produtos metabólicos associados ao complexo de captação de luz no fotossistema, chamado de ficobilissoma (FBS), presente em cianobactérias, algas vermelhas, criptomônadas e cianelas (RANJITHA; KAUSHIK, 2005). São moléculas solúveis em água, compostas de proteínas e cromóforos, chamados ficobilinas, ligados covalentemente via cisteína (RÜMBELI et al., 1987).

As FBPs são geralmente divididas em três diferentes categorias de acordo com o seu espectro de absorção: ficoeritrina (FE, $\lambda_{\max} = 490 \sim 570$ nm, pigmento vermelho), ficocianina (FC, $\lambda_{\max} \sim 610 \sim 625$ nm, pigmento azul) e aloficocianina (AFC $\lambda_{\max} \sim 650 \sim 660$ nm, pigmento verde azulado) (KHATTAR et al., 2015; NOREÑA-CARO; BENTON, 2018).

A disposição das ficobiliproteínas em um ficobilissoma é apresentado na Figura 2. Sua estrutura permite que os pigmentos sejam dispostos geometricamente de uma maneira a exercerem a função de captar e absorver a luz na região de 470 e 660 nm e transferir com eficiência a energia para a clorofila A. A transferência de energia no interior do ficobilissoma ocorre na seguinte sequência: de ficoeritrina \rightarrow ficocianina \rightarrow alofocianina \rightarrow clorofila A. (MANIRAFASHA et al., 2016; NOREÑA-CARO; BENTON, 2018).

Figura 2 - Estrutura do ficobilissomo.



Fonte: Adaptado de NOREÑA-CARO; BENTON (2018).

A FC está presente em praticamente todas as espécies de cianobactérias e possui aplicação em diferentes domínios, como aditivos alimentares, alimentos naturais, cosméticos, farmacêuticos e medicina. Possui aplicação farmacêutica, uma vez que apresenta propriedades antiinflamatória, anticancerígena e antioxidante, antitumoral e propriedades hepatoprotetoras. Além disso, é utilizada em diagnósticos devido a sua propriedade fluorescente em um comprimento de onda específico. Alguns estudos ainda relatam seu efeito na hipertensão e diabetes (ORES; AMARANTE; KALIL, 2016; SAINI; PABBI; SHUKLA, 2018). O valor comercial da FC depende de 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 entre 0,50 e 1,50 é considerada como grau alimentício para uso como corante por exemplo, entre 1,50 e 2,50 como grau reativo usada como biomarcador, e acima de 4,0 como grau analítico para uso e aplicações biomédicas e como agente terapêutico (BENAVIDES; RITO-PALOMARES, 2005; DA SILVA FIGUEIRA; MORAES; KALIL, 2018; RITO-PALOMARES; NUEZ; AMADOR, 2001).

A AFC é amplamente utilizada em técnicas bioquímicas, como nas sondas proteicas fluorescentes. Também tem sido relatado possuir propriedades antioxidantes e antienterovirais (RASTOGI et al., 2016).

A FE apresenta como principal característica sua coloração avermelhada, o que possibilita sua principal aplicação como corante nas indústrias alimentícia e de cosméticos, além da sua utilização em ensaios imunológicos (BECKER, 2004).

Devido a sua distribuição limitada e às dificuldades em sua purificação, esses pigmentos apresentam alto custo e obtê-los em forma pura é um empreendimento potencialmente atraente. Vários métodos podem ser empregados para a extração e purificação de FBPs. Um método que funcione bem em um organismo, pode não ser o método de escolha para outro organismo (ROMÁN et al., 2002). Além disso, alterar as condições de cultivo de forma a favorecer a síntese destes pigmentos pelas cianobactérias promove a obtenção de uma maior quantidade extraída específica (MOGANY et al., 2018)

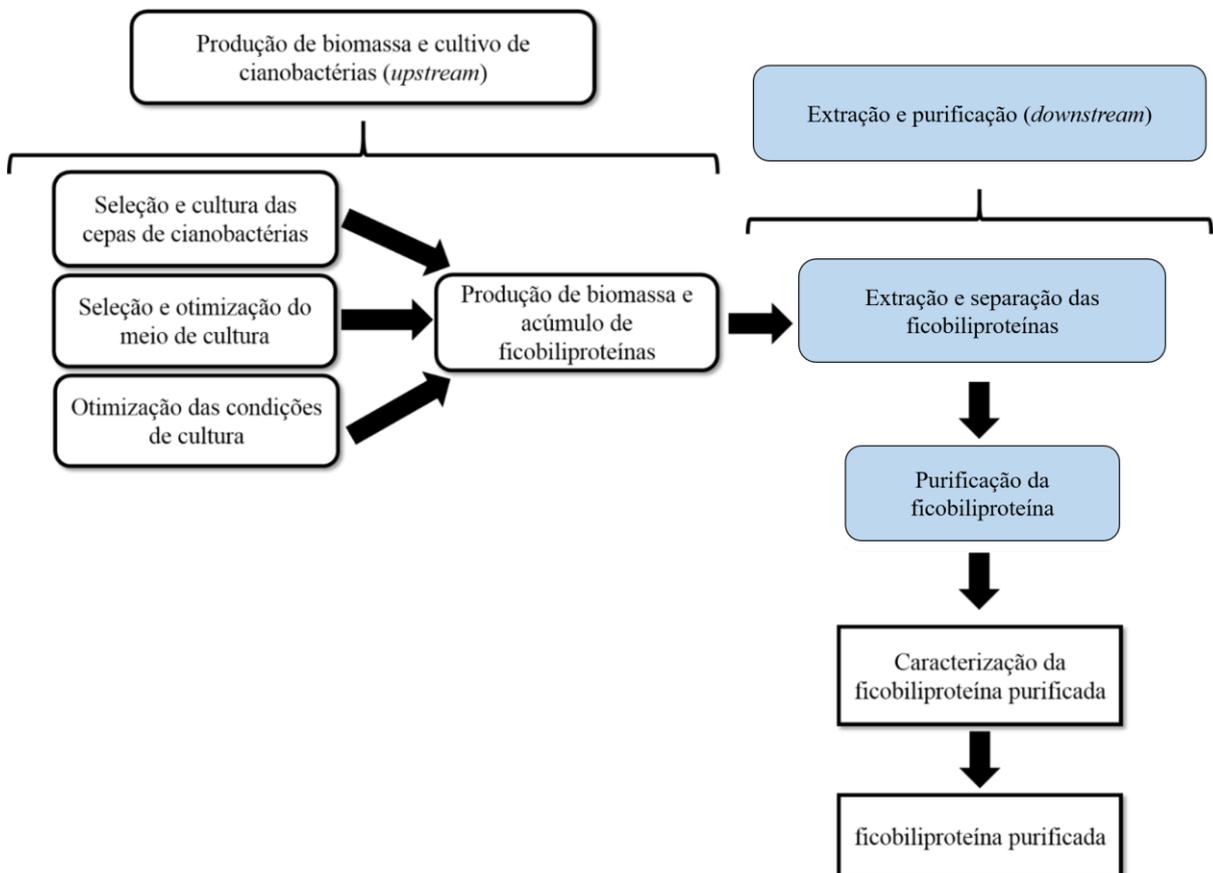
2.3 Otimização para produção de FBP

As cianobactérias adquiriram ao longo de sua evolução, a capacidade de adaptação a diferentes condições. A maioria destas condições são responsáveis por provocar “estresse” no organismo e este, como resposta, por meio de seu mecanismo de defesa, produz diferentes compostos e substâncias naturais das quais, grande parte, possui um alto valor agregado.

Portanto, deve-se levar em conta a otimização destas condições, as quais afetam diretamente a produção do metabólito específico o qual se deseja obter (ANDERSON et al., 1983; GUEDES et al., 2013).

A produção de metabólitos de cianobactérias, como em especial as ficobiliproteínas, pode ser dividida em duas etapas, como mostra a Figura 3. O processo chamado “*upstream*”, que inclui a produção de biomassa e acúmulo de metabólitos e o processo “*downstream*”, que inclui os métodos de extração e purificação (MANIRAFASHA et al., 2016; MOLINA GRIMA et al., 2003).

Figura 3 - Diagrama das diferentes etapas envolvidas na produção de ficobiliproteínas.



Fonte: Adaptado de MANIRAFASHA et al. (2016).

Diversos são os fatores que influenciam no crescimento e processo de produção de metabólitos nas cianobactérias. Os principais são fatores abióticos, que incluem luz, temperatura, concentração de nutrientes, pH, salinidade e composição química do meio de cultivo, os quais afetam diretamente o metabolismo do organismo (GUTU; KEHOE, 2012; REIS et al., 1998).

Por serem organismos fotoautotróficos, as taxas de fotossíntese e crescimento de cianobactérias são diretamente afetadas por características físicas do ambiente, especialmente a luz. Esse recurso pode variar tanto em termos de qualidade (cor), quanto em intensidade de luz e tempo de exposição (fotoperíodo ou ciclos escuro/claro), e afetam diretamente o crescimento destes organismos (GUTU; KEHOE, 2012). SCHULZE et al. (2014), observaram que durante a atividade fotossintética e outras rotas específicas reguladas pela luz, os principais processos metabólicos ocorrem, desde o aumento da biomassa até o acúmulo de metabólitos. Em termos de qualidade da luz, por exemplo KEITHELLAKPAM et al. (2015), mostraram que diferentes comprimentos de onda podem melhorar a produção de pigmentos fotossintéticos, como as ficobiliproteínas, e concluíram que estes pigmentos são diretamente relacionados e influenciados pela composição da luz fornecida à cultura.

Com relação à otimização do meio de cultivo, os dois nutrientes mais requeridos para o crescimento e produção de metabólitos, são a glicose e o nitrogênio (MANIRAFASHA et al., 2016). ZHANG; ZHANG; CHEN (1999), mostraram o aumento da concentração de ficocianina com a adição de uma quantidade específica de glicose e observaram que, com o aumento da intensidade luminosa, a quantidade ótima de glicose diminuía. ANDRADE; COSTA (2007), observaram que a eficiência da mixotrofia é muito dependente das espécies e não pode ser aplicada como regra para todos os organismos.

Quando a cianobactéria é fixadora de nitrogênio, a adição de nitrogênio pode alterar a produção de ficobiliproteínas. Como foi observado em algumas cepas de *Anabaena* e *Nostoc*, a presença de nitrato não alterou apenas a quantidade total de FBP, mas também a proporção de FC, AFC e FE. Entretanto para algumas cepas, a adição de nitrogênio prejudicou a produção (KHATTAR et al., 2015; TASNEEM FATMA, 2009). PAGELS et al. (2019), mostraram que a suplementação de NaNO_3 não é linear, e a concentração ideal vai depender da espécie utilizada.

2.4 Extração e purificação

Com o objetivo de tornar possível sua aplicação industrial e aumentar o seu valor comercial, diversas são as técnicas utilizadas para extração e purificação de ficobiliproteínas de cianobactérias. Em relação ao seu valor comercial, por exemplo, o valor da ficocianina para utilização na indústria alimentícia (pureza de aproximadamente 0,7, definida pela relação entre as absorvâncias obtidas em 620nm e 280nm) pode chegar a valores em torno de US\$

0,13 por mg, enquanto considerando alta pureza, maior ou igual a 4, a mg de ficocianina pode chegar a US\$ 15 (RITO-PALOMARES; NUEZ; AMADOR, 2001).

A dificuldade em se extrair compostos de alto valor, como as ficobiliproteínas de cianobactérias, está no fato de que estas possuem uma parede celular bastante rígida e espessa, além é claro do tamanho da célula do organismo. Diversos são os métodos utilizados para a extração, como, por exemplo, aqueles que provocam uma ruptura mecânica da parede celular como sonicação (MORENO et al., 1997; RODRIGUES et al., 2018; SUN; WANG; QIAO, 2006), vórtex com esferas de vidro (BENAVIDES; RITO-PALOMARES, 2005; BENEDETTI et al., 2006; RITO-PALOMARES; NUEZ; AMADOR, 2001), congelamento e descongelamento (LIU; FENG; LUN, 2012; SONI et al., 2006) ou até mesmo sistemas de alta pressão ou ainda por extração osmótica química, como o tampão fosfato por exemplo (YU et al., 2017).

Em relação à extração química clássica (tampão fosfato), a sua aplicação está baseada no fato de que as ficobiliproteínas apresentam uma alta solubilidade em solventes aquosos e principalmente devido a sua polaridade, que basicamente é feito pela adição do solvente (tampão fosfato) à biomassa, o que promove a sua solubilização, por meio de agitação ou aquecimento (ABD EL-BAKY; EL-BAROTY, 2012; SANTIAGO et al., 2004).

A escolha do método de extração a ser utilizado é de primordial importância, e está diretamente relacionado com a composição do organismo, estabilidade e resistência de sua parede celular. Seja o método químico, enzimático, mecânico, ou a combinação deles, com o principal objetivo de reduzir suas limitações, quando realizados de forma separada (PAN-UTAI; IAMTHAM, 2019).

Alguns estudos recentes têm mostrado que o sistema aquoso bifásico (SAB), pode ser usado para aumentar a pureza das ficobiliproteínas no processo de extração (BENAVIDES; RITO-PALOMARES, 2005; RITO-PALOMARES; NUEZ; AMADOR, 2001).

Para a etapa de purificação, diversos são os métodos utilizados, sejam eles centrifugação por gradiente de densidade (BEKASOVA; MUSLIMOV; KRASNOVSKIĀ, 1984; DUCRET et al., 1996), precipitação com sulfato de amônio (BENEDETTI et al., 2006; MINKOVA et al., 2007), coluna de cromatografia (BINDER; WILSON; ZUBER, 1972), ultrafiltração (PATIL et al., 2006).

2.5 Purificação por sistema aquoso bifásico (SAB)

Muitos são os métodos utilizados para a purificação de ficobiliproteínas (centrifugação por gradiente de densidade, precipitação com sulfato de amônia + separação por HPLC, cromatografia em coluna, ultrafiltração, limpeza por carvão/quitosana, eletroforese capilar, cromatografia de duas fases, entre outras), sendo que a maioria deles possui diversas etapas envolvidas, o que representa uma desvantagem, uma vez que quanto maior o número de etapas, menor é o rendimento do processo de purificação. Além disso, a reprodução destes métodos em escala maior representa um trabalho árduo e de alto custo. Para aplicação em larga escala, surge a necessidade de um método de recuperação que contribua para se obter um processo economicamente viável e que alcance alta pureza e rendimento. Neste contexto, tem-se a recuperação por sistemas aquosos bifásicos (SAB) (RUIZ-RUIZ; BENAVIDES; RITO-PALOMARES, 2013; SANTHI et al., 2020).

Esse sistema pode se tornar a melhor alternativa para muitas biomoléculas no processo de purificação, especialmente no início da etapa “*downstream*”, tendo sido aplicado para separação e purificação de diferentes metabólitos, tais como α -antitripsina humana do leite de ovelha transgênico, purificação de anticorpos monoclonais (mABs), tPA de sobrenadantes CHO e VLPs recombinantes (partículas semelhantes a vírus) de células de levedura, bem como a utilização do SAB para purificação e concentração de corantes naturais de importância comercial de uma variedade de fontes (ASENJO; ANDREWS, 2011; MITTAL; SHARMA; RAGHAVARAO, 2019).

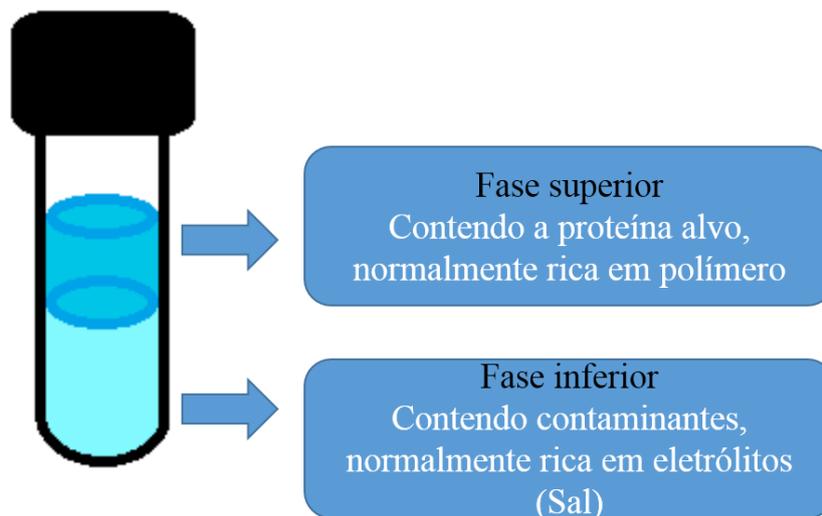
A recuperação do SAB consiste na mistura de dois polímeros ou de um polímero e um sal em uma determinada concentração, o que garante a formação de duas fases em equilíbrio. No entanto, nem todo polímero e nem todo sal podem ser utilizados para este fim (DE OLIVEIRA; DE ABREU FILHO; PESSÔA FILHO, 2007).

A alta concentração de água do SAB promove um ambiente neutro e não-tóxico favorável à atividade biológica. O curto tempo de processo, a eficiência da separação, a baixa taxa de poluição, o baixo custo e a possibilidade de reciclo e reuso de seus componentes, faz deste sistema um método extremamente competitivo se comparado com outros métodos (LIU; FENG; LUN, 2012; PATIL et al., 2006; RITO-PALOMARES; NUEZ; AMADOR, 2001).

No SAB, o soluto específico o qual se deseja separar, particiona seletivamente para uma fase, enquanto as biomoléculas contaminantes (proteínas, polissacarídeos, lipídios, etc.) para a outra fase (Figura 4), e para que isso ocorra é preciso que certas condições termodinâmicas sejam atendidas (temperatura, pressão e composição). Deste modo, o SAB não

somente purifica o soluto alvo, mas também o concentra em uma fase, após uma escolha adequada das proporções dos volumes de fase (AGUILAR; MARCO, 2008; CHENTIR et al., 2018).

Figura 4 - Representação de um sistema aquosos bifásico.



Fonte: O autor.

Os sistemas normalmente utilizados são aqueles formados por pares polietilenoglicol (PEG, dextran ou sal. Sistemas do tipo polímero/sal são vantajosos por serem mais econômicos, apresentarem uma baixa viscosidade de fase, e exigirem menos tempo de separação de fases quando comparado com sistema polímero/polímero. Os sistemas que estão sendo estudados são apresentados no Quadro 2. A razão para esse interesse é clara: ao aumentar o número de sistemas, expandem-se as possibilidades de separação de determinada molécula, uma vez que alguns sistemas são favoráveis para uma determinada separação, mas não para outras (IGARASHI, 2003; TEIXEIRA, 2009).

Recentemente, há disponibilidade da classe de polímeros sintéticos, mais especificamente, os copolímeros em bloco PEO-PPO-PEO que tem chamado a atenção para a formação de novos SABS. Sua utilização tem mostrado resultados positivos em relação ao coeficiente de partição para valores mais extremos, o que representou um aumento na eficiência e seletividade no processo de separação e purificação (DA SILVA et al., 2006; DE OLIVEIRA; DE ABREU FILHO; PESSÔA FILHO, 2007; HARAGUCHI et al., 2004; ROGERS; ZHANG, 1996).

Quadro 2 - Constituintes dos SAB (polímero/copolímero+ sal+ água) recentemente estudados.

Polímero ou copolímero	Sal
PEG 400	$K_2HPO_4 + KH_2PO_4$ ou Cs_2CO_3
PEG 600	$K_2HPO_4 + KH_2PO_4$, $K_3C_6H_5O_7$, $(NH_4)_2SO_4$ ou $Na_3C_6H_5O_7$
PEG 1000	$K_2HPO_4 + KH_2PO_4$, $K_3C_6H_5O_7$, $(NH_4)_2SO_4$, Cs_2CO_3 , Cs_2SO_4 ou $Na_3C_6H_5O_7$
PEG 1450	$K_2HPO_4 + KH_2PO_4$, $K_3C_6H_5O_7$, $(NH_4)_2SO_4$ ou $Na_3C_6H_5O_8$
PEG 1500	$K_2HPO_4 + KH_2PO_4$, Na_2SO_4 , Li_2SO_4 , $MgSO_4$, $Na_3C_6H_5O_7$ ou $NH_4NH_2CO_2$
PEG 1550	Na_2SO_4 ou $(NH_4)_2SO_4$
PEG 2000	H_3PO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, K_2CO_3 , $NaOH$, KOH ou $(NH_4)_2SO_4$
PEG 3000	$K_2HPO_4 + KH_2PO_4$
PEG 3350	$NaSO_4$, Li_2SO_4 , $MgSO_4$ ou $Na_3C_6H_5O_7$
PEG 3400	$K_2HPO_4 + KH_2PO_4$ ou $(NH_4)_2SO_4$
PEG 3500	Na_2SO_4 , Li_2SO_4 ou $MgSO_4$
PEG 4000	Na_2SO_4 , $LiSO_4$, $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $Na_3C_6H_5O_7$, $NaNO_3$, $CsCO_3$, Cs_2SO_4 , $Na_2C_4H_4O_6$, $NH_4NH_2CO_2$, $(NH_4)_2HPO_4$ ou $K_2HPO_4 + KH_2PO_4$
PEG 6000	$K_2HPO_4 + KH_2PO_4$, $NH_4NH_3CO_2$, $NaSO_4$, Li_2SO_4 , $ZnSO_4$, $MgSO_4$, $Na_2C_4H_4O_4$ ou $NaCHO_2$
PEG 8000	$K_2HPO_4 + KH_2PO_4$ ou $Na_3C_6H_5O_7$
PEG 1000	$MgSO_4$
PEG 12000	$(NH_4)_2SO_4$
PEG 20000	$K_2HPO_4 + KH_2PO_4$ ou $CuSO_4$
L35	$K_2HPO_4 + KH_2PO_4$, Na_2SO_4 , Li_2SO_4 ou $MgSO_4$
L62	$K_2HPO_4 + KH_2PO_4$
L64	$(NH_4)_2SO_4$ OU $K_2HPO_4 + KH_2PO_4$
F38	$NH_4NH_2CO_2$
F68	$K_2HPO_4 + KH_2PO_4$, $NaSO_4$, Li_2SO_4 , $MgSO_4$ ou $NH_4NH_2CO_2$

Fonte: TEIXEIRA (2009).

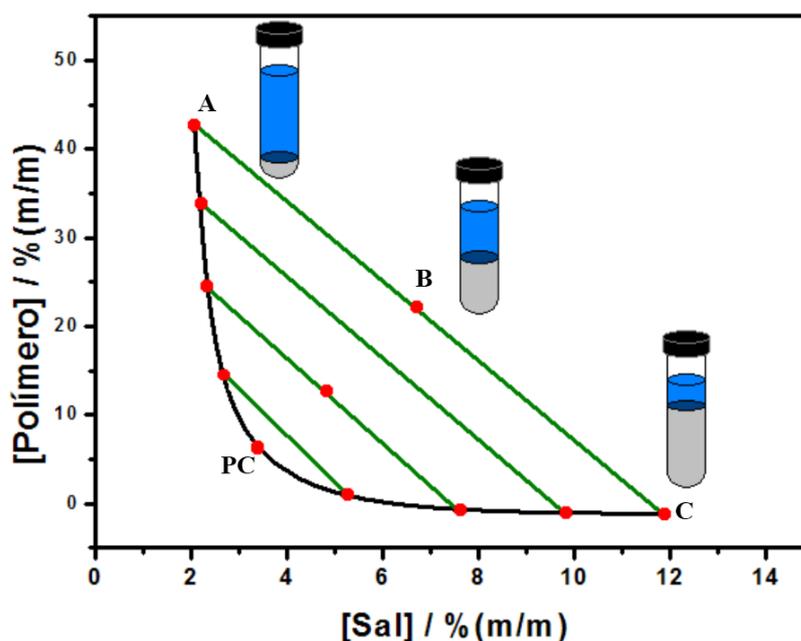
2.6 Diagrama de fases e coeficiente de partição (K)

Para a formação de um SAB é imprescindível que as proporções e concentrações de cada componente sejam conhecidas e determinadas. Esses valores são afetados diretamente

pelas interações intermoleculares dos componentes do sistema (ESPITIA-SALOMA et al., 2014; ZASLAVSKY, 1994).

A composição química das duas fases de um SAB pode ser representada pelo diagrama de fases retangular (Figura 5). Esta representação gráfica é essencial para o estudo do resultado das interações entre os constituintes do SAB, ou seja, a distribuição dos diferentes componentes no sistema e a relação de volume entre as fases. As composições em equilíbrio termodinâmico representadas no diagrama então relacionadas à variação da energia livre de Gibbs do sistema, da diferença de potencial elétrico, do coeficiente de partição de um soluto específico, entre outros, e contribuem para o estudo das condições que governam a partição de um soluto no SAB (DA SILVA et al., 2006; NIEMEC, 2008).

Figura 5 - Diagrama de fases retangular.



Fonte: TEIXEIRA (2009).

Nos diagramas de fases retangulares para um SAB, a composição do eletrólito é representada pela abscissa e a composição do polímero é representada pela ordenada. Na Figura 5, por exemplo, estão representados a composição global (B), que formarão sistemas com duas ou apenas uma fase, a composição da fase superior (A) e inferior (C), a curva binodal (A-PC-C), que separa a região bifásica da região monofásica, e é diretamente afetada pela massa molar do polímero, pela natureza do eletrólito, pela temperatura e pelo pH do sistema. Estão representadas também no diagrama as linhas de amarração, que ligam os

pontos no diagrama e representam a composição de suas fases em equilíbrio (ALBERTSSON, 1960; IGARASHI, 2003; IQBAL et al., 2016).

As linhas de amarração são formadas por pontos de composição global do sistema com propriedades intensivas (densidade, viscosidade, composição, etc) iguais, mas com propriedades extensivas (massa, volume, etc.) diferentes. Tanto para a fase inferior como para a fase superior (DA SILVA et al., 2006; ZASLAVSKY, 1994).

À medida que se aproxima do ponto C (Figura 5), obtêm-se composições globais que resultarão em SAB com volume de fase inferior maior. Em contrapartida, quanto mais próximo do ponto A (Figura 5), o SAB resultante tem volume superior maior. No ponto PC (Figura 5), uma pequena alteração nas concentrações das fases ou da temperatura pode transformar o sistema de duas fases em uma solução homogênea com a diminuição da diferença entre as propriedades termodinâmicas das fases (ALBERTSSON, 1987; OLIVEIRA, 1999; TEIXEIRA, 2009).

A temperatura tem uma forte influência em relação à formação do SAB, sendo responsável por aumentar ou diminuir as concentrações limites necessárias para a formação de duas fases, de acordo com o sistema (ALEXANDRIDIS; ALAN HATTON, 1995; CHU, 1995).

Para a separação de proteínas entre duas fases aquosas dos SABs, normalmente é utilizado um parâmetro denominado coeficiente de partição (K), e tomado como um padrão comparativo para a eficiência da separação do soluto no SAB, e sendo definido pela Equação 1.

$$K = \frac{C_s}{C_i} \quad (1)$$

O coeficiente de partição, K, representa a concentração de proteína na fase superior (C_s) em relação à concentração da proteína na fase inferior (C_i). K será igual a 1 quando a concentração de proteínas for igual em ambas as fases, o que significa que o soluto particionou igualmente entre as fases. Se K for maior que 1, significa que a proteína particionou preferencialmente para a fase superior, e se for menor que 1, significa que ela se concentrou na fase inferior. Ou seja, quanto mais afastado de 1 for o valor de K, melhor será a recuperação da proteína alvo (ASENJO; ANDREWS, 2011; CABRAL; AIRES-BARROS, 1993; OLIVEIRA, 1999).

As principais condições que influenciam na partição de uma proteína em um SAB são aquelas atribuídas ao próprio sistema como tipo de componente do sistema, massa molar do polímero, concentração do polímero e dos sais, tipo de íon presente, força iônica e pH, e aqueles atribuídos ao tipo da proteína alvo, como massa molar, carga, hidrofobicidade e conformação, e presença de ligantes específicos (FRANCO; ANDREWS; ASENJO, 1996a).

2.7 Sistema PEG-Sal

Comparado a outros sistemas, o sistema PEG-SAL apresenta vantagens com relação a sua aplicação em larga escala por possuir menor custo e menor tempo de processo, esse último devido a maior diferença de densidade entre as fases e menor viscosidade, o que facilita todo o processo de purificação e separação de biomoléculas (FRANCO; ANDREWS; ASENJO, 1996a; IQBAL et al., 2016).

A partição de diferentes proteínas em ambas as fases, depende primordialmente dos componentes do SAB e de suas propriedades, uma vez que estes fatores estão diretamente relacionados à hidrofobicidade de fase. Sabe-se que os constituintes do SAB são hidrofílicos, entretanto a hidrofobicidade relativa do sistema varia. Assim, ainda que as fases do SAB sejam hidrofílicas, a fase topo (PEG) é mais hidrofóbica e menos polar. Por isso, na maioria das vezes, a proteína irá se acumular nesta fase do PEG.

Com relação à composição do SAB, os sais mais utilizados para esse sistema são os fosfatos de sódio e de potássio, por serem endotérmicos e apresentarem uma cinética de dissociação em água mais rápida. O citrato, por exemplo, foi utilizado para a partição da albumina de soro bovina (BSA) e insulina e o sulfato de magnésio, utilizado na partição da α -amilase (BENEDETTI et al., 2006; DA SILVA et al., 2006; SCHIMIDT; VENTOM; ASENJO, 1994; SVENSSON et al., 1997).

Com relação à contribuição dos eletrólitos formadores do sistema ao processo de separação, foi observado que diferentes cátions, bem como diferentes ânions apresentam capacidades distintas em promover a separação de fases. Os ânions multivalentes são mais eficazes do que cátions monovalentes e seguem a seguinte ordem: fosfato (PO_4^{3-}) > citrato ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$) > sulfato (SO_4^{2-}) > hidroxila (OH^-), normalmente quanto maior a carga do ânion, menor será a concentração do sal necessária para o efeito de separação de fases. Para os cátions a ordem segue: $\text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{MgSO}_4 > \text{ZnSO}_4 > \text{Li}_2\text{SO}_4$, tal ordem é consequência das energias de interação efetuadas entre os cátions e os segmentos de EO (óxido de etileno) da

molécula do PEG e do aumento da entropia translacional das moléculas de água, que são liberadas durante a consolidação das interações (IQBAL et al., 2016; MARTINS et al., 2008).

LIU et al. (2012) estudaram a recuperação das ficobiliproteínas FC e AFC de *Spirulina plantesis* ao utilizarem o SAB composto de PEG e fosfato de potássio e variarem o peso molecular do PEG (2000, 4000 e 6000). Encontraram resultados satisfatórios para o sistema PEG 6000/fosfato de potássio, com coeficientes de partição para FC equivalentes a 10,64 e para AFC, 0,57 e pureza de FC de 0,82 para partição na fase topo.

A recuperação da FC também foi investigada por RITO-PALOMARES et al. (2001) das cepas de *Spirulina máxima*. Estes autores estudaram o efeito da composição e variação do pH ao sistema PEG/ fosfato de amônio e fosfato de potássio. O sistema PEG 1450-fosfato de potássio (7% (m/m) de PEG e 20% (m/m) de fosfato de potássio) com pH 6,5 apresentou os maiores resultados de pureza de FC, avaliados em 2 etapas, sendo que na primeira obteve uma pureza de 2,1 e na segunda uma pureza de 2,4.

Para se aumentar o potencial de separação da proteína alvo de outras biomoléculas do sistema, a hidrofobicidade de fase pode ser manipulada ao mudar a massa molar do PEG, o tipo de sal, a força iônica na fase sal pela adição de um sal neutro como o NaCl (“*salting-out*”) e pela variação das linhas de amarração (AZEVEDO et al., 2009; BASKARAN et al., 2018).

Mais especificamente sobre a influência de sais como NaCl, este sal contém íons de diferentes hidrofobicidades e os íons hidrofóbicos forçam a partição dos íons contrários para a fase mais hidrofóbica e vice-versa (ASENJO; ANDREWS, 2011; IQBAL et al., 2016; SCHIMIDT; VENTOM; ASENJO, 1994).

FRANCO; ANDREWS; ASENJO (1996b) estabeleceram um método para estudar o efeito da hidrofobicidade na superfície da proteína no processo de partição do SAB. Eles notaram um aumento duas vezes maior no poder de separação com a adição de NaCl ao sistema PEG-fosfato, o que mostra um efeito importante no sistema para a hidrofobicidade.

IQBAL et al. (2016) mostraram que baixas concentrações de NaCl (< 1 M) não exercem efeito sobre o SAB, entretanto, altas concentrações de sal (> 1 M) apresentaram efeito sobre o diagrama de fases. O aumento da linha de amarração do SAB em sistemas PEG-SAL tende a particionar a proteína para a fase rica em PEG devido ao efeito “*salting-out*” (insolubilização) e, se a solubilidade das proteínas nesta fase não for suficientemente elevada, ocorrerá a precipitação destas na interface (IGARASHI, 2003; KULA; KRONER; HUSTEDT, 1982).

2.8 Copolímeros triblocos

Recentemente, com o objetivo de otimizar e reduzir as desvantagens atribuídas aos sistemas SAB comumente utilizados para recuperação e purificação de biomoléculas, como PEG + dextrana (polissacarídeo) e PEG + sal, um novo sistema SAB formado por copolímeros tribloco e sais inorgânicos tem chamado a atenção (DA SILVA et al., 2006; KITAHARA; KAMIHIRA; TAKEUCHI, 1993; VIRTUOSO et al., 2010). Esse sistema apresenta baixo custo se comparado ao alto valor da dextrana e possui maior facilidade de separação da proteína-alvo da fase polimérica, uma vez que o copolímero tribloco é uma classe de polímero termosensível, o que torna possível a reciclagem da fase polimérica para posteriores extrações, como mostra a Figura 6, e faz do SAB um sistema vantajoso não somente em termos econômicos, mas também ambientais (JOHANSSON; KARLSTRÖM; TJERNELD, 1997; SHOW et al., 2011; WANG et al., 2016).

Polímeros termosensíveis podem ser separados de soluções aquosas a uma temperatura específica, chamada temperatura de “*cloud point*” ou temperatura crítica inferior de solução (TCIS).

Em relação aos copolímeros, esses podem separar-se da solução aquosa e precipitarem-se como um sólido, um gel ou um líquido, a depender da constituição de sua molécula. Normalmente, polímeros que se precipitam no estado líquido são preferidos, uma vez que nestes casos a separação das fases é mais definida e também por possuírem menor temperatura de separação.

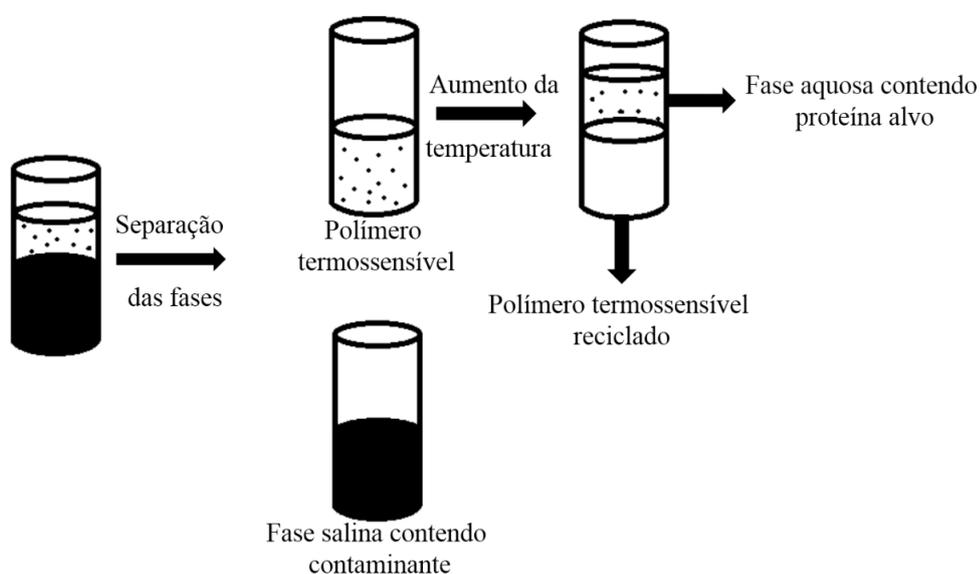
Copolímeros possuem a propriedade termosensível, e quanto maior a sua cadeia de poli (óxido de propileno) (PPO) menor será sua temperatura de “*cloud point*” e quanto maior a porcentagem de poli (óxido de etileno) (PEO) na molécula, maior será sua temperatura de “*cloud point*”. O PEG, por exemplo, possui 100% de sua molécula composta por óxido de etileno (EO), o que faz com que sua temperatura de termosseparação seja superior a 100 °C, considerada alta para a maioria das biomoléculas. Essa, talvez seja a principal vantagem da utilização do copolímero sobre o sistema PEG-sal para extrações em larga escala, uma vez que sua separação exige menores temperaturas. Entretanto, para que não ocorra a desnaturação da proteína, fazendo com que a etapa se torne uma desvantagem no processo de recuperação, deve-se observar sua temperatura de desativação durante a etapa de termosseparação caso sua partição seja na fase topo, rica em copolímero.

AMID et al. (2014), no processo de purificação da enzima amilase de *Hylocereus polyrhizus* utilizando o polímero termosensível EOPO 2500 (30% (m/m) e um solvente

orgânico (2-propanol 15% (m/m)), avaliaram a termosseparação do polímero, alcançando 97% de recuperação a uma temperatura de 65° C.

NG et al. (2012), ao estudarem a recuperação de *Bacillus cerus* ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase) e o reciclo dos componentes de fase no SAB, avaliaram a termosseparação do polímero utilizado (EOPO 3900), ao utilizarem um banho a 65° C, obtendo uma recuperação de 80% do polímero.

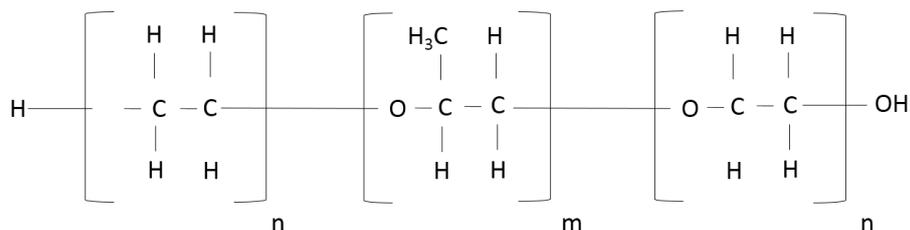
Figura 6 - Reciclo da fase polimérica e extração da proteína alvo em um SAB constituído por polímero termossensível.



Fonte: Adaptado de IGARASHI (2003).

Os copolímeros tribloco PEO-PPO-PEO, são formados por três cadeias homogêneas diferentes: um bloco de poli (óxido de etileno) (PEO), um bloco de poli (óxido de propileno) (PPO), e um bloco simétrico de PEO, conforme representado na Figura 7. São denominados de acordo com seu fabricante, e podem ser chamados de Symperonic (produzido pela ICI, Surfactants, Cleveland, EUA) e Pluronic (produzido pela BASF, Alemanha). Seu nome comercial normalmente é composto por uma letra que indica seu estado físico à temperatura ambiente (L para líquido, F para flocos, e P para pasta) seguida por um ou dois números, onde o primeiro representa o tamanho da cadeia de PPO em uma escala padronizada, e o segundo representa a fração mássica de EO no polímero. Por exemplo, os polímeros F68, L64 e L62, são flocos e líquidos respectivamente em temperatura ambiente, e possuem blocos de PPO de mesmo tamanho (aprox. 1800 g.mol⁻¹), mas frações mássicas de PEO diferentes (80%, 40% e 20%, respectivamente) (DE OLIVEIRA; DE ABREU FILHO; PESSÔA FILHO, 2007; HARAGUCHI et al., 2004).

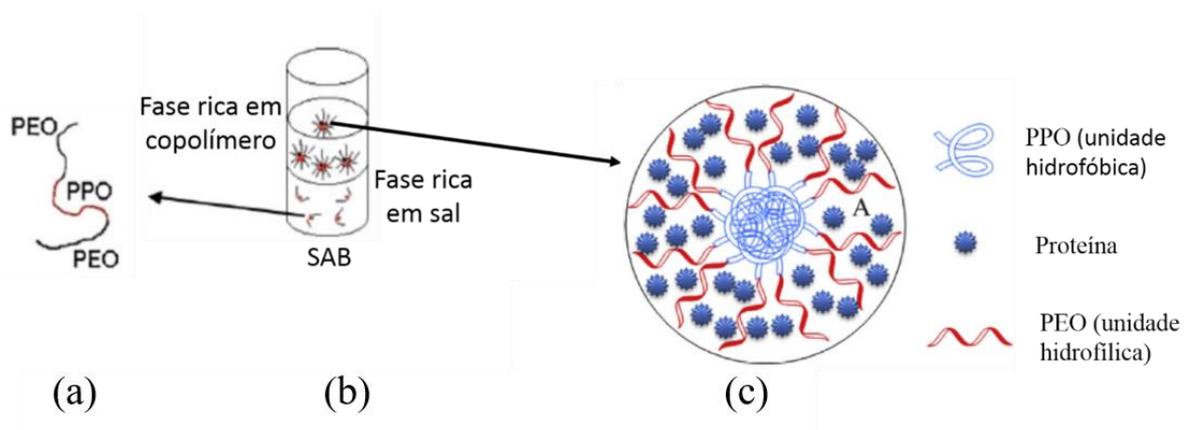
Figura 7 - Estrutura química do copolímero tribloco PEO-PPO-PEO.



Fonte: Adaptado de DA SILVA et al. (2006).

Esta categoria de copolímeros apresenta estruturas auto-organizadas chamadas de micelas. O fenômeno de micelização ocorre devido à diferença de hidrofobicidade entre os seus grupos PPO (unidade hidrofóbica) e PEO (unidade hidrofílica) que constituem a macromolécula. Deste modo, SABs formados por copolímeros tribloco são ótimas opções para extração de solutos hidrofóbicos (Figura 8) (ALEXANDRIDIS; ALAN HATTON, 1995; RODRIGUES et al., 2008; WANG et al., 2016).

Figura 8 - (a) Molécula de copolímero tribloco, (b) SAB formado por copolímero tribloco + sal, (c) Complexo extratante (compostos hidrofóbicos) particionados preferencialmente na fase enriquecida com copolímero devido a sua solubilização nos núcleos das micelas.



Fonte: Adaptado de RODRIGUES et al. (2008); WANG et al. (2016).

Os primeiros estudos com o uso de copolímeros tribloco para formação de SAB começaram com KITAHARA; KAMIHIRA; TAKEUCHI (1993), que estudaram a partição de proteínas por sistema SAB formado por F68 e sulfato de amônio, e SKUSE et al. (1992), que estudaram a partição de proteínas em sistemas formados por hidroxilpropilcelulose e P105.

HARAGUCHI et al. (2004), estudaram a partição da insulina por SAB formados por L62, L64 ou F68 e fosfato de potássio, e mostraram que ao alterarem a cadeia de PEO o coeficiente de partição muda de 5,0 para mais de 50,0, o que representa um aumento bastante considerável.

DE OLIVEIRA; DE ABREU FILHO; PESSÔA FILHO (2007), determinaram diagramas de fase a 4 °C e 25 °C para os copolímeros F38 e F68, ao estudarem a partição de diferentes proteínas bovinas por SAB formados pelos copolímeros F38 ou F68 e carbamato de amônio, e observaram que a depender do tamanho da cadeia do polímero, da temperatura, do comprimento da linha de amarração e do tipo de proteína, altos graus de separação podem ser alcançados. Concluíram que sistemas formados por F38 e carbamato de amônio podem ser uma boa alternativa em processos “*downstream*” para proteínas.

Com relação à recuperação de ficobiliproteínas, não foram encontrados na literatura consultada, estudos de sistemas aquosos bifásicos constituídos de copolímeros empregados para a recuperação deste pigmento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

As cepas de cianobactérias utilizadas neste trabalho, *Nostoc* sp. PCC 7423 e *Anabaena variabilis* ATCC, foram gentilmente doadas pelo laboratório de Cianobactérias e Fitotoxinas, do Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) (Rio Grande, Brasil).

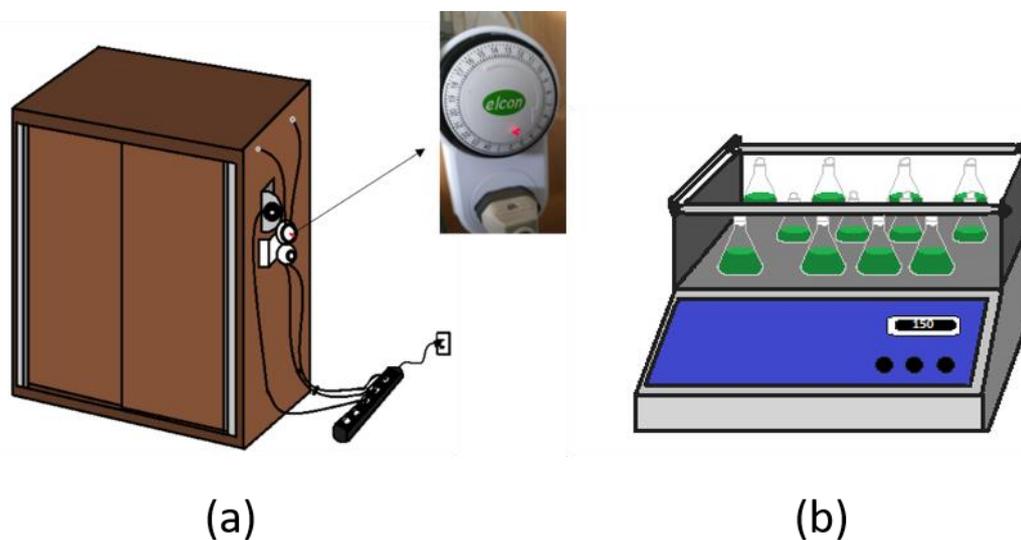
Os copolímeros tri-bloco F68, L62 e L4, utilizados na etapa de purificação por SAB, foram gentilmente doados pela BASF (São Paulo, Brasil). Os demais reagentes usados, com pureza analítica, para manutenção das cepas, assim como nos ensaios experimentais e nas análises físico-químicas foram adquiridos de fornecedores comerciais.

3.2 Metodologia

3.2.1 Manutenção das Cianobactérias

As cianobactérias *Anabaena variabilis* e *Nostoc* sp. foram cultivadas em meio basal BG11₀ em Erlenmeyers de 250 e 500 mL, a 30 °C e luminosidade de aproximadamente 1553 lux, com fotoperíodo de 12h, em ambiente aeróbico e com repiques periódicos de 15 dias. A Figura 9 ilustra a câmara de fotoperíodo e a mesa agitadora utilizados, para manutenção e armazenamento das cepas de cianobactérias e para os ensaios experimentais realizados de produção de ficobiliproteínas.

Figura 9 - (a) Câmara de fotoperíodo; (b) mesa agitadora.



Fonte: O autor.

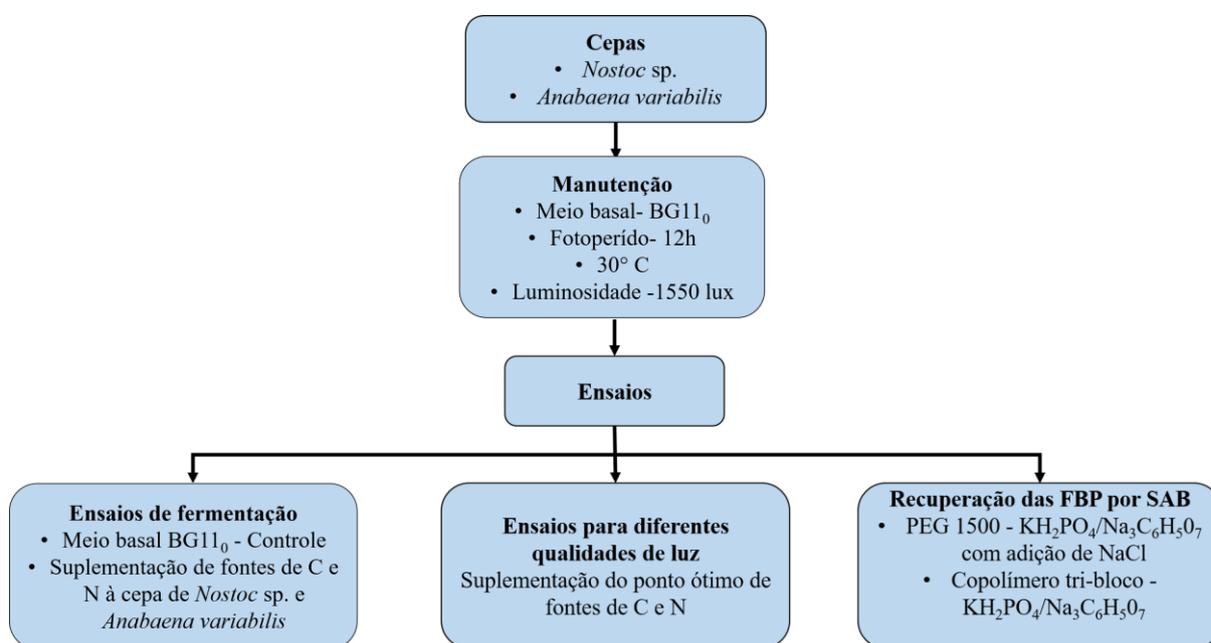
Ambas as cepas foram mantidas em meio basal BG11₀. O meio basal foi preparado de forma que, para cada 1 L de água destilada, foi adicionado 1 mL de cada umas das seguintes soluções: K_2HPO_4 ($30,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $MgSO_4\cdot 7H_2O$ ($75,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $CaCl_2\cdot 2H_2O$ ($36 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), citrato de amônio férrico ($6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $Na_2\cdot EDTA$ (Ácido Etileno Diamino Tetracético Na_2 , $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), ácido cítrico ($6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), Na_2CO_3 ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e solução de metais traço. A solução de metais traço utilizada possui a seguinte composição: $ZnSO_4\cdot 7H_2O$ ($0,222 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $MnCl_2\cdot 4H_2O$ ($1,81 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $Na_2MoO_4\cdot 2H_2O$ ($0,39 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $CuSO_4\cdot 5H_2O$ ($0,079 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $CoCl_2\cdot 6H_2O$ ($0,04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e H_3BO_3 ($2,86 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). O pH final foi mantido entre 7,4 – 7,6. (RIPPKA; DERUELLES; WATERBURY, 1979).

As duas cepas de cianobactérias mantidas em BG11₀, foram utilizadas para os seguintes ensaios:

- (i) Investigação do efeito de suplementação de glicose como fonte de carbono e nitrato de sódio com fontes de nitrogênio, combinado com a análise do efeito dos inóculos de 10% v/v ($0,04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e 20% v/v ($0,08 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), para *Nostoc* sp.;
- (ii) Ensaios para avaliação dos efeitos de diferentes qualidades de luz, combinados com os melhores resultados para suplementação de fontes de carbono e nitrogênio para a produção de biomassa e ficobiliproteínas, para ambas as cepas;

- (iii) Avaliação do SAB, composto por PEG-sal com adição de NaCl para melhorar a recuperação e purificação dos pigmentos extraídos de ambas as cepas;
- (iv) Estudo do efeito da utilização de copolímeros tri-bloco na formação de SAB com o objetivo de otimizar os efeitos do sistema para recuperação dos pigmentos extraídos das cepas, incluindo a recuperação do copolímero por termosseparação (Figura 10).

Figura 10 - Ensaio realizados utilizando as cepas de cianobactérias *Anabaena variabilis* e *Nostoc* sp.



Fonte: O autor.

Todos os ensaios realizados com as cepas de cianobactérias, sejam eles manutenção, repique, análises e preparos dos ensaios de fermentação para produção de FBP, foram feitos em câmara de fluxo laminar, com os devidos cuidados de assepsia usando álcool 70% e luz UV. As vidrarias utilizadas e o meio de cultivo foram previamente esterilizados em autoclave a 121 °C durante 20 minutos, a fim de eliminar qualquer contaminante.

3.2.2 Avaliação do efeito da suplementação do meio basal com fonte de carbono e nitrogênio na produção de FBP

Os testes realizados nesta etapa foram uma complementação do estudo realizado por COTTAS (2019). Dessa forma, foi possível agrupar os resultados e avaliar o efeito da suplementação de glicose e nitrato de sódio ao meio de cultivo da cepa de *Nostoc* sp.

Com o propósito de aumentar a produção de biomassa e de ficocianina obtidos das cepas de *Nostoc* sp., este trabalho investigou o efeito do volume inicial de inóculo de 10% v/v (0,04 g.L⁻¹) e 20% v/v (0,08 g.L⁻¹) e da suplementação do meio de cultivo basal BG11₀, ao utilizar glicose (0 – 2,0 g.L⁻¹) como fonte de carbono orgânico e nitrato de sódio (0 – 5 mM) como fonte de nitrogênio.

Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 125 mL sob agitação de 150 rpm em mesa agitadora do tipo orbital (Scilogex, modelo SK-0330-Pro) em câmara de fotoperíodo construída na IES, com temperatura controlada em 30°C, luminosidade de 1,553 lux utilizando de LED (8 W) com fotoperíodo de 12h, em meio aeróbico.

Para as condições de cultivo, foram avaliadas duas proporções de volume inicial de inóculo, 10% v/v (0,04 g.L⁻¹) e 20% v/v (0,08 g.L⁻¹) e 90 e 80% de meio basal (v/v), com volume total de 50 mL e suplementação combinada com adição de glicose como fonte de carbono orgânico e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio ao meio de controle (BG11₀). Os ensaios foram realizados em triplicata.

As diferentes composições combinadas de glicose e nitrato de sódio, para a cepa de *Nostoc* sp. são apresentadas na Tabela 1, sendo que o ensaio “controle” é composto apenas pelo meio basal BG11₀.

Tabela 1 - Condição de suplementação ao meio BG11₀ para a cepa de *Nostoc sp.*, utilizando glicose e nitrato de sódio para um volume inicial de inóculo de 10% e 20%.

Meio	C _{glicose} (g·L ⁻¹)	C _{Nitrato de Sódio} (mM)
Controle	0	0
M1	0,5	0
M2	1,0	0
M3	2,0	0
M4	0	2,0
M5	0,5	2,0
M6	1,0	2,0
M7	2,0	2,0
M8	5,0	2,0
M9	1,0	5,0
M10	2,0	5,0
M11	5,0	5,0

Em todos os ensaios, amostras foram retiradas em 4, 7 e 14 dias de fermentação para acompanhamento do crescimento celular e ao final do processo, o teor de ficobiliproteínas foi medido após extração.

3.2.3 Análise do efeito de diferentes qualidades de luz

O efeito de diferentes qualidades de luz (branca, azul, verde e vermelha) na produção de FBP pelas cepas de *Nostoc sp.* e *Anabaena variabilis*, foram avaliados nesta etapa.

Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 125 mL, 10% v/v (0,04 g·L⁻¹) de inóculo, sob agitação de 150 rpm em mesa agitadora em uma câmara de fotoperíodo, com a temperatura controlada em 30°C com fotoperíodo de 12h, em meio aeróbico. Os repiques foram realizados a cada 15 dias.

Para efeito de luz branca, foi utilizada a própria iluminação da estufa de manutenção e ensaios experimentais, promovida por lâmpadas de LED. Para efeitos da luz azul, verde, vermelha e amarela, os Erlenmeyers foram expostos à mesma iluminação, filtrada por uma camada de papel celofane da cor específica, e envolto ao redor dos tubos de ensaio, com o

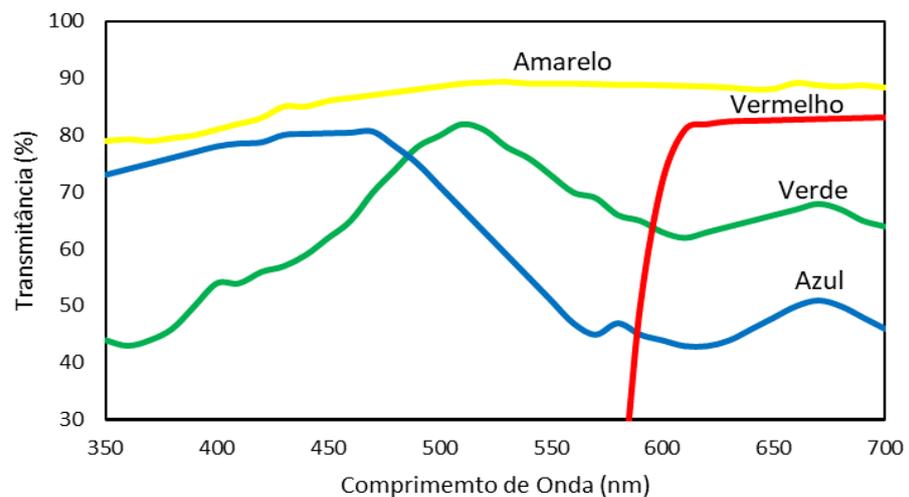
objetivo de promover a iluminação cromática (Figura 11). As irradiações recebidas pelas células dentro dos frascos, medida por um luxímetro digital (Modelo Light Meter 401025) foram de 1553, 416, 913, 1392, 1194 lux para as luzes branca, vermelha, azul, amarela e verde, respectivamente. O espectro de transmissão para os papéis celofane nas diferentes cores, foi medido em espectrofotômetro (Shimadzu UV mini-1240, Shimadzu, Kyoto, Japan) (Figura 12).

Figura 11 - Erlenmeyers envoltos com papel celofane de diferentes cores, com o objetivo de promover iluminação cromática no interior da câmara de fotoperíodo em mesa agitadora.



Fonte: O autor.

Figura 12 - Espectro de transmissão de luz para as diferentes cores de celofane.



Fonte: O autor.

3.2.4 Análise do efeito combinado de diferentes qualidades de luz e suplementação do meio basal

Para a avaliação do efeito combinado da luz e suplementação do meio para crescimento celular e produção de ficocianina, foram utilizadas as cepas de *Nostoc* sp. e *Anabaena variabilis*.

O teste seguiu o mesmo procedimento para luz (item 3.2.3), mas nestes ensaios, os meios foram suplementados com a condição de suplementação que apresentou maior produção de biomassa e FC nos testes de suplementação. Para a cepa de *Nostoc* sp., os meios foram suplementados com 2 g.L⁻¹ de glicose e 5 mM de nitrato de sódio (item 3.2.2). Para a cepa de *Anabaena variabilis*, os meios foram suplementados com 0,5 g.L⁻¹ de glicose e 2 mM de nitrato de sódio, esta condição foi escolhida a partir dos resultados obtidos por COTTAS et al. (2020) nos testes realizados com a cepa.

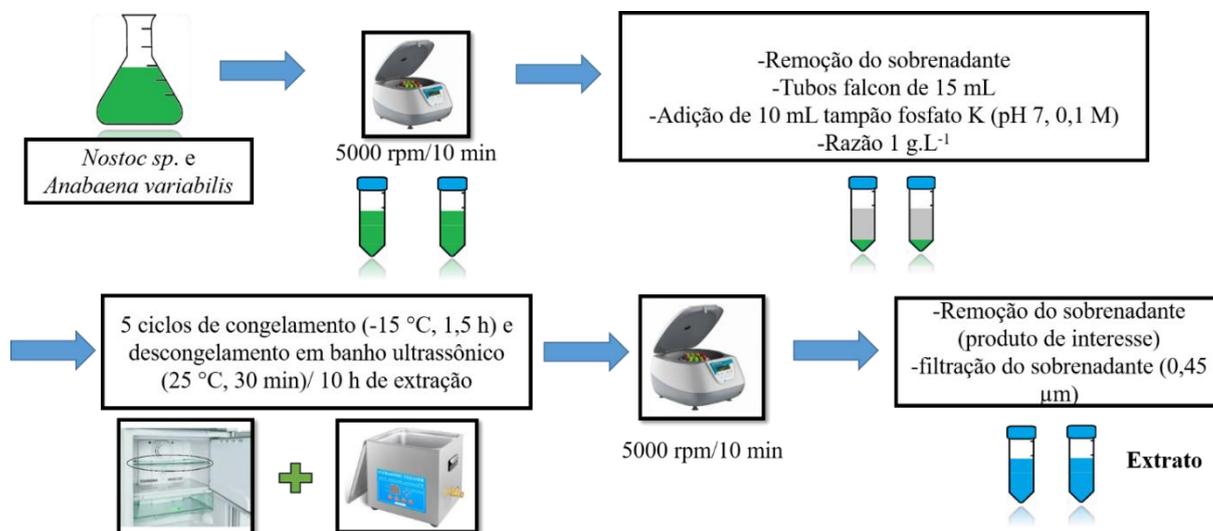
Em todos os ensaios, amostras foram retiradas em 4, 7 e 14 dias de fermentação para acompanhamento do crescimento celular e, ao final do processo, o teor de ficobiliproteínas foi medido após extração.

3.2.5 Estudo do processo de recuperação das FBP

3.2.5.1 Extração das FBP

O método utilizado para extração das ficobiliproteínas foi o congelamento e descongelamento combinado com o método de ultrassom (Figura 13). A extração foi realizada a concentração de 0,5 g.L⁻¹, em tubos falcon de 15 mL e volume total de 10 mL. Primeiro, a solução extratora de fosfato, 0,1 M e pH 7,0, foi adicionada ao “pellet” após centrifugação (Thermo Scientific Megafuge 8, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) a 5000 rpm. Esta etapa foi seguida por 5 ciclos de congelamento (-15 °C por 1,5 h) e descongelamento em banho ultrassônico (25 °C por 30 min), somando um tempo total de 10 horas de extração. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (5000 rpm), e o sobrenadante foi separado (produto de interesse), do “pellet” (biomassa e detritos celulares) e então filtrada através de filtros de 0,45 µm (COTTAS et al., 2020).

Figura 13- Método de congelamento e descongelamento combinado com ultrassom para extração das FBP.



Fonte: O autor.

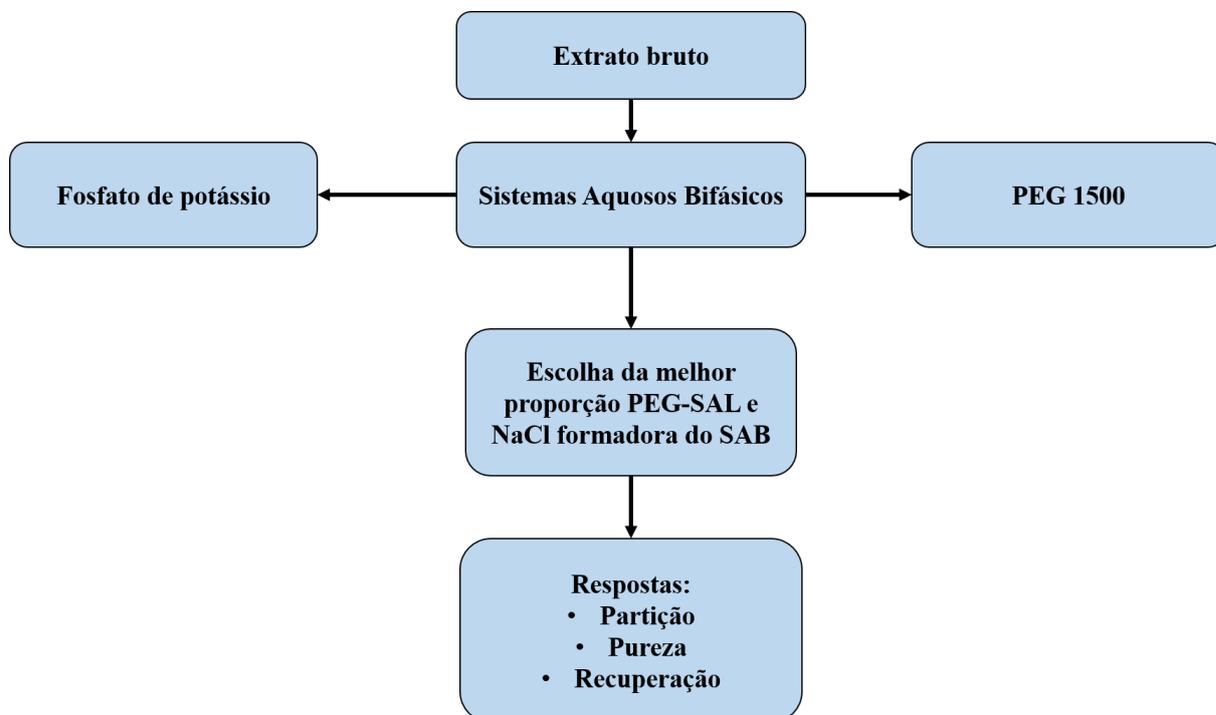
3.2.5.2 Sistema PEG-SAL com adição de NaCl

COTTAS (2019) ao estudar o processo de recuperação de ficobiliproteínas por SAB, utilizando as cepas *Nostoc sp.* e *Anabaena variabilis*, avaliou dois tipos de PEG, com pesos moleculares 1500 e 4000, e dois sais, fosfato de potássio e citrato de sódio. Neste estudo, o sistema PEG-fosfato de potássio, na proporção PEG 10% e sal 15,9%, foi aquele que apresentou maiores resultados para a partição da FC.

A partir deste estudo, Sistemas Aquosos Bifásicos do tipo PEG-SAL com adição de NaCl foram utilizados no processo de recuperação de FBP. Para o SAB, PEG 1500 e fosfato de potássio foram analisados ao variar a proporção de NaCl adicionado ao sistema.

O fluxograma do processo de recuperação das FBP utilizado é mostrado na Figura 14.

Figura 14 - Fluxograma do processo de recuperação de FBP por SAB com adição de NaCl.



Fonte: O autor.

Os sistemas aquosos bifásicos foram preparados mantendo-se as proporções do resultado encontrado nos estudos de COTTAS (2019), para analisar o efeito do tipo de íon na partição e o efeito do pH do sistema. Em seus testes, as proporções foram escolhidas de modo a manter constantes a porcentagem de extrato utilizado em todos os sistemas (27%, m/m), e a massa total do sistema de 20 g.

Para este estudo, foi realizado o mesmo procedimento, mas utilizando apenas o sal fosfato de potássio e variando apenas as composições de NaCl adicionados ao SAB, sendo utilizadas as composições de 6%, 8% e 10% m/m, que representam concentrações >1M (ANDREWS; ASENJO, 2010; IQBAL et al., 2016).

Com o objetivo de manter constante a massa total do sistema em 20 g, após adição do NaCl, para cada sistema foi preparada uma “solução mãe” mais concentrada do sal utilizado (fosfato de potássio), diminuindo sua quantidade em massa, mas mantendo sua proporção e seu pH.

Todos os sistemas foram preparados em mássica, sendo realizados um teste para cada sal. As proporções empregadas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Composições dos SABs PEG-1500-fosfato de potássio com adição de NaCl. Massa total do sistema, 20g.

	Branco*	1ª Proporção	2ª Proporção	3ª Proporção
% PEG (m/m)	10	10	10	10
% Sal (m/m)	15,9	15,9	15,9	15,9
% Extrato (m/m)	27	27	27	27
% NaCl (m/m)	0	6	8	10

*Foi feito um branco para cada proporção de NaCl, onde o extrato foi substituído por tampão fosfato (0,1 M e pH 7,0), usado como solução extratora.

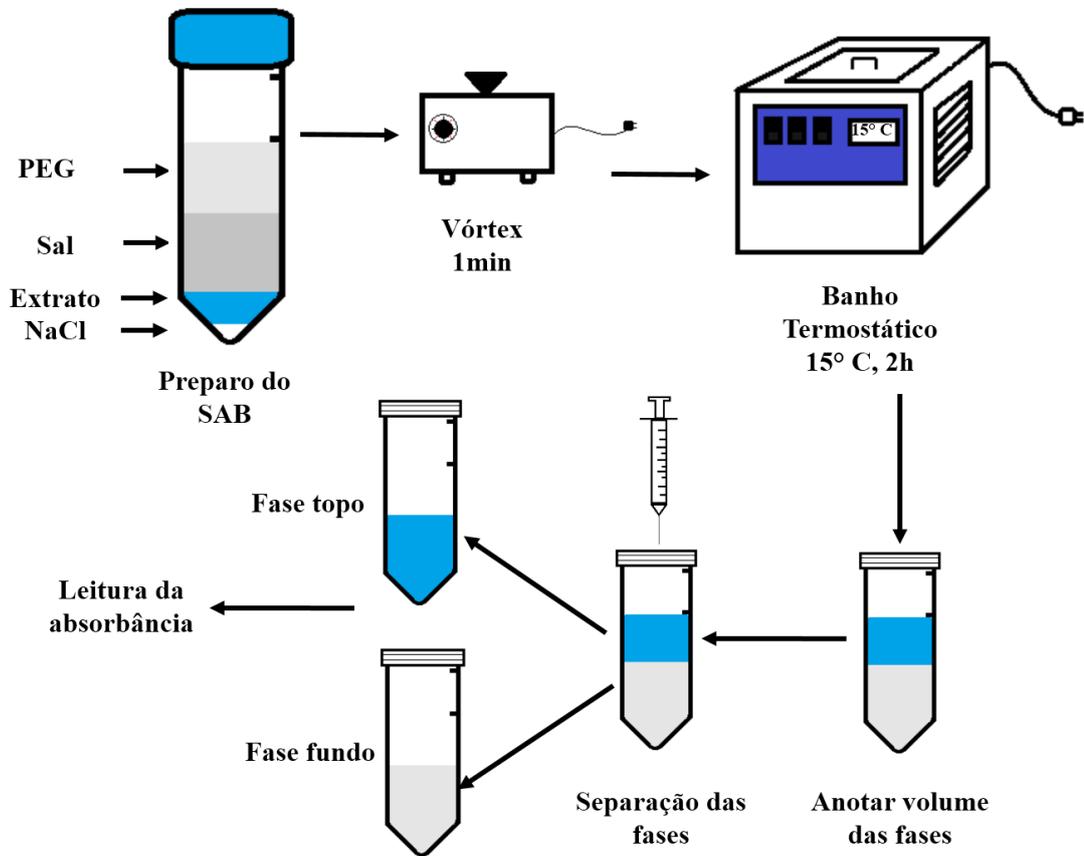
Para cada uma das proporções, os sistemas foram realizados empregando o extrato obtido de cada cianobactéria, todos em triplicata. Antes do preparo de cada SAB, analisou-se o extrato quanto à pureza de cada FBP, de modo a ser comparada após a recuperação.

Foram preparadas antecipadamente soluções estoque de concentração conhecida para os seguintes componentes do SAB: solução de PEG 1500 (50% m/m), soluções de fosfato de potássio (para o branco 30% m/m, para a 1ª Proporção de NaCl 33,83% m/m, para a 2ª Proporção de NaCl 35,33% m/m e para a 3ª Proporção de NaCl 37% m/m).

As etapas adotadas neste procedimento são ilustradas na Figura 15.

Os SABs foram preparados em tubos falcon de 50 mL, em seguida com o objetivo de homogeneizar a mistura, os tubos foram agitados em vortex, durante 30 segundos. Após isso, as amostras foram mantidas em equilíbrio por 2 h em banho termostático (tempo suficiente para alcançar o equilíbrio e assegurar a completa separação das fases), a 15 °C.

Figura 15 - Procedimento para recuperação de FBP por SAB do tipo PEG-sal com adição de NaCl.



Fonte: O autor.

Posteriormente, foram medidos os volumes das fases em equilíbrio e separação das mesmas utilizando uma seringa, com objetivo de reduzir a perturbação do sistema.

3.2.5.3 Sistema Copolímero tri-bloco-SAL

Sistemas Aquosos Bifásicos do tipo copolímero tribloco-sal, foram utilizados nesta etapa de recuperação de FBP, variando o peso molecular do copolímero e o tipo de sal. Foram investigados três tipos de copolímeros, L62, L64 e F68. Esses copolímeros diferem-se em relação ao estado físico à temperatura ambiente (F para “flocos” e L para “líquido”) (Figura 16) e em relação à quantidade de unidades de EO (óxido de etileno), com o segundo número representando o peso aproximado da fração de EO: F68 possui 2 x 76 unidades de EO o que representa 80% (m/m) de PEO (poli (óxido de etileno)) na molécula, enquanto L62 e L64 possuem 20% (2 x 6 unidades de EO) e 40% (2 x 13 unidades de EO), respectivamente.

Todos possuem blocos de PPO (poli (óxido de propileno) de mesmo tamanho (aprox. 1800 g.mol⁻¹) compostos por cerca de 29-30 unidades de PO, denotado pelo número “6” em seus nomes (HARAGUCHI et al., 2004).

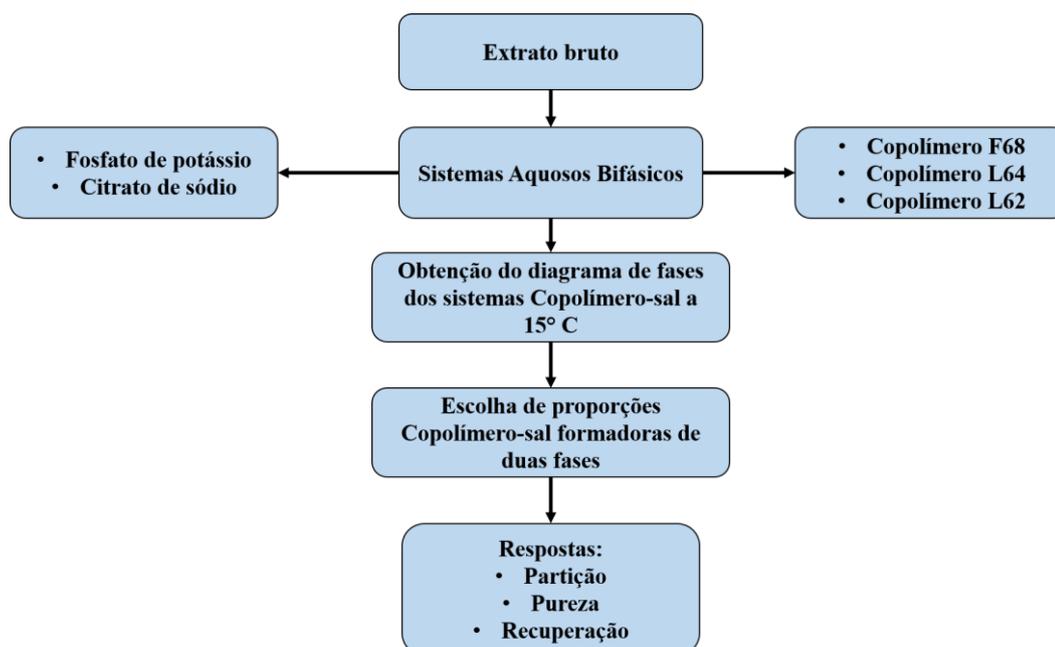
Figura 16 - Copolímeros L62, L64 e F68, respectivamente.



Fonte: O autor.

O fluxograma do processo de recuperação das FBP utilizado é mostrado na Figura 17.

Figura 17 - Fluxograma do processo de recuperação de FBP por SAB formado por copolímero-SAL.



Fontes: O autor.

3.2.5.3.1 Obtenção do diagrama de fases

De modo a definir as proporções de copolímero 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, uma vez que não foram encontrados na literatura diagramas de fase para todos os sistemas estudados (ANDRADE; COSTA, 2007; HARAGUCHI et al., 2004; KITAHARA; KAMIHIRA; TAKEUCHI, 1993).

Os diagramas de fase para os SAB copolímero tribloco-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 (BARBOSA et al., 2016; HARAGUCHI et al., 2004; OLIVEIRA, 2009).

Foram preparadas soluções estoque de concentrações conhecidas: solução de copolímero F68 30% (m/m), solução de copolímero L64 50% (m/m), L62 50% (m/m), soluções de citrato de sódio e fosfato de potássio 30% (m/m). Em tubos Falcon de 15 mL, foram pipetadas amostras de 5 mL da solução de copolímero, 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, foram acrescentados a cada amostra volumes de 30 µL da 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 três tipos de copolímero 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 72 h, com o objetivo de assegurar que o equilíbrio foi alcançado, e permitir completa separação de fases.

3.2.5.3.2 Obtenção dos SAB

Ao comparar os diagramas de fase obtidos neste estudo com aqueles disponíveis na literatura HARAGUCHI et al. (2004), e observado que as curvas binodais são próximas, duas composições globais foram adotadas para avaliar o efeito dos SABs compostos de copolímero e sal. Essas duas proporções em que se variou a % de copolímero (L62, L64 e F68) e sal (citrato de sódio e fosfato de potássio), fixando a quantidade de extrato em 27% e a massa total do sistema em 20g, são apresentadas na Tabela 3. Os pontos das composições globais correspondem a dois comprimentos de linhas de amarração diferentes, sendo a 1ª proporção com TLL (tie line length) em torno de 25% copolímero e 8% sal e a 2ª proporção com TLL

em torno de 15% copolímero e 12% sal. Na segunda composição apenas o sal fosfato de potássio foi testado.

Tabela 3 - Composição dos SABs F68-sais, L64-sais e L62-sais, para a primeira etapa.

Copolímero	%Copolímero (m/m)	%Sal (m/m)	%Extrato (m/m)	Massa Total do Sistema (g)
1^a	25	8	27	20
2^a	15	12	27	20

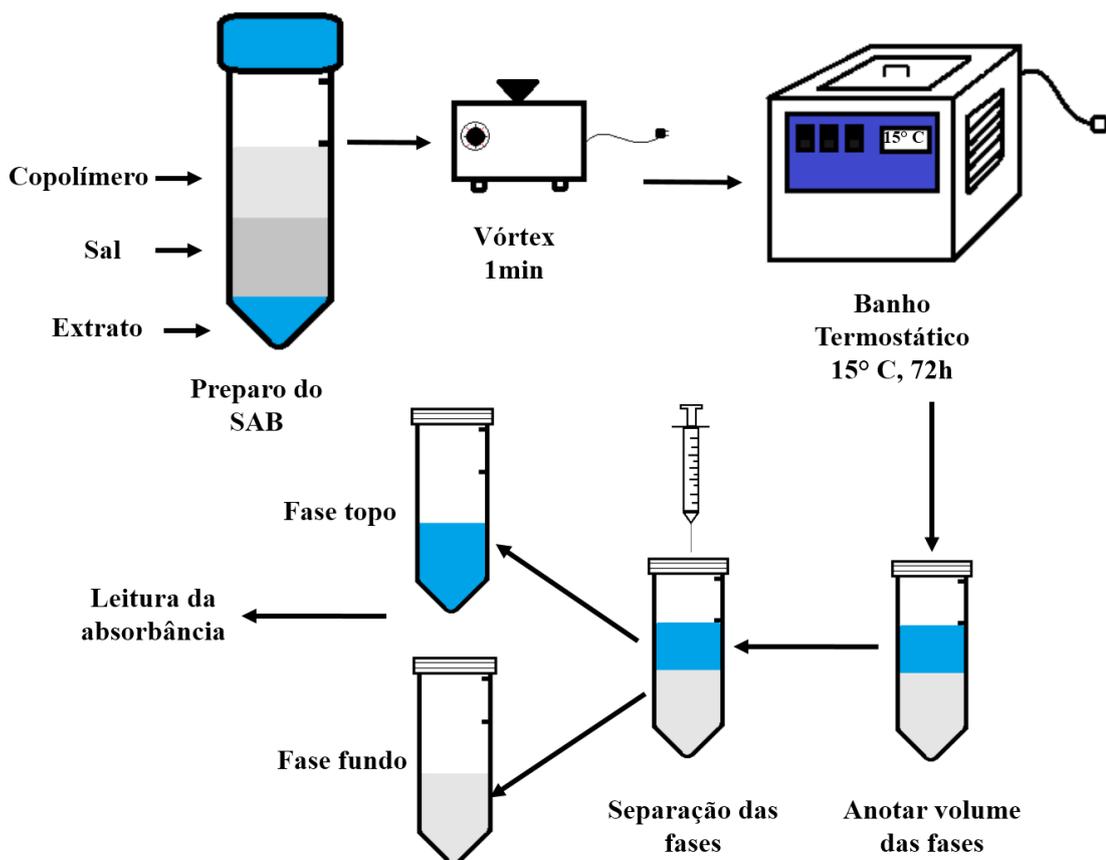
Para cada uma das proporções, os sistemas foram preparados empregando o extrato obtido de cada cianobactéria, todos em triplicata. Foi feito o sistema branco, sendo o extrato substituído por tampão fosfato (0,1 M e pH 7,0), usado como solução extratora.

Foram preparadas antecipadamente soluções estoque de concentração conhecida para os seguintes componentes do SAB: solução de copolímero (30% m/m para o F68 e 50% m/m para o L64 e o L62), soluções de citrato de sódio e fosfato de potássio (35% m/m).

Antes do preparo de cada SAB, analisou-se o extrato quanto a pureza de cada FBP de modo a ser comparado a recuperação.

As etapas adotadas neste procedimento são ilustradas na Figura 18.

Figura 18 - Procedimento para recuperação das FBP por SAB do tipo copolímero-sal.



Fonte: O autor.

3.2.6 Recuperação do Copolímero por Termosseparação

3.2.6.1 Determinação do “*Cloud point*”

As temperaturas de “*cloud point*” para as soluções dos três copolímeros utilizados (L62, L64 e F68) foram determinadas na concentração de 10% (m/m). Foram preparadas amostra de 10 g em tubos falcon de 15ml, com apenas água e copolímero. Os tubos foram levados para um banho termostático onde a temperatura foi aumentada lentamente (1 °C / min), até que a turbidez fosse observada no sistema. A temperatura na qual a solução de copolímero começou a se tornar turva foi determinada como a temperatura de “*cloud point*”.

3.2.6.2 Determinação da composição de fase

As curvas de calibração para concentração dos copolímeros em massa (Concentração de copolímero *versus* Índice de refração) foram determinadas a 20 °C utilizando um refratômetro de bancada (Refratômetro ABBE, escala de refração 1300-1720nD Mod. 2WAJ-Biobrix), e estão dispostas no Apêndice A (Figuras A.1, A.2 e A.3).

Para se obter a curva de calibração, foram preparadas amostras de soluções de cada copolímero nas concentrações de 0%, 5%, 10%, 16% e 20%. Para cada concentração foi retirada uma alíquota e feita a leitura do seu índice de refração (IR).

3.2.6.3 Recuperação do copolímero

Amostras de fase topo rica em copolímero, obtidas após etapa de partição da proteína por sistema aquoso bifásico (SAB) foram utilizadas na etapa de recuperação dos copolímeros (L62, L64 e F68).

Para tanto, primeiramente as amostras de fase topo foram pesadas em novos tubos de massa conhecida e diluídas em uma razão de 1:2, e em seguida foram calculadas as concentrações de copolímero por meio da leitura do índice de refração (IR), utilizando um refratômetro de bancada a 20 °C.

Para a separação térmica, as amostras diluídas foram aquecidas 20 °C acima da temperatura de “*cloud point*” (de modo a garantir o equilíbrio do sistema após retirado do banho e levado para a centrífuga), sejam elas 77 °C para L62 e aproximadamente 96 °C para L64 e F68 por 5 min. A separação térmica do copolímero L62 foi realizada em banho termostático com temperatura máxima de aquecimento de 80 °C. Como o banho não suporta temperaturas superiores a 80 °C, as amostras dos copolímeros L64 e F68 foram colocadas em béquer de vidro com água aquecida em Bico de Bunsen. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 min de modo a garantir a completa separação térmica das fases. Uma vez que a separação das fases foi obtida, a fase topo aquosa com a presença da proteína alvo foi separada da fase fundo com o copolímero recuperado. A amostra de copolímero recuperada na fase fundo foi então pesada e diluída a uma razão de 1:3, e então feito o cálculo de sua concentração por meio da leitura do índice de refração (IR), utilizando um refratômetro de bancada a 20 °C (PERSSON et al., 1999; PERSSON et al., 2000).

A concentração de copolímero recuperado (R_{cop}) após a termosseparação é definida pela Equação 2 (NG et al., 2012).

$$R_{cop} = \frac{m_{termosep}}{m_{inicial}} \times 100\% \quad (2)$$

Onde a $m_{termosep}$ representa a massa de copolímero recuperada na fase fundo após a termosseparação, e $m_{inicial}$ representa a massa total da amostra de fase topo rica em copolímero obtida na etapa de partição da proteína por SAB.

3.2.7 Métodos analíticos

3.2.7.1 Concentração celular

A determinação do crescimento celular foi realizada por análise de absorvância da alíquota do meio de cultivo em espectrofotômetro (Shimadzu UV mini-1240) e correlacionando com a concentração em massa seca de célula (g.L^{-1}).

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 duas 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^{-1} .

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 absorvância, sendo o comprimento de onda de 610 nm para *Anabaena variabilis* e 750 nm para *Nostoc* sp. (OJIT et al., 2015; MOGANY et al., 2018), que foram determinados por varredura espectral. Para o

branco, foi usado água destilada. As curvas de calibração padrão (concentração de célula *versus* absorbância), estão dispostas no Apêndice A (Figuras A.4 e A.5).

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

3.2.7.2 Concentração de açúcares

A quantificação do consumo de glicose 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 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⁻¹, 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 3, 4 e 5, respectivamente (BENNETT; BOGARD, 1973; LIU; FENG; LUN, 2012).

$$C_{FC} = \frac{A_{615} - 0,474(A_{652})}{5,34} \quad (3)$$

$$C_{AFC} = \frac{A_{652} - 0,208(A_{615})}{5,09} \quad (4)$$

$$C_{FE} = \frac{A_{562} - 2,41C_{FC} - 0,849C_{AFC}}{5,34} \quad (5)$$

A pureza (P) das FBP foi calculada também por espectrofotometria pela proporção entre os valores de absorbância da proteína de interesse pela absorbância de proteína total, de acordo com a Equação 6 (ABALDE et al., 1998),

$$P = \frac{A_{FBP}}{A_{280}} \quad (6)$$

sendo A_{FBP} absorbância característica de cada FBP (FC, AFC ou FE) e A_{280} absorbância correspondente à proteína total.

3.2.7.4 Análise do extrato após purificação por SAB

Após a separação das fases, fez-se a leitura de absorbância e foram calculadas concentração e pureza de cada FBP pelo método citado no 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 7,

$$K = \frac{(C_{FBP})_{topo}}{(C_{FBP})_{fundo}} \quad (7)$$

Em que $(C_{FBP})_{topo}$ e $(C_{FBP})_{fundo}$ 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 (V_r), definida como a razão entre o volume da fase topo (V_{TOPO}) e volume da fase fundo (V_{FUNDO}) no SAB, definida pela Equação 8.

$$Vr = \frac{V_{TOPO}}{V_{FUNDO}} \quad (8)$$

A recuperação de FBP (R) nas fases foi definida de acordo com a Equação 9 (BASKARAN et al., 2018),

$$R(\%) = \frac{100}{1 + (K.Vr)^{-1}} \quad (9)$$

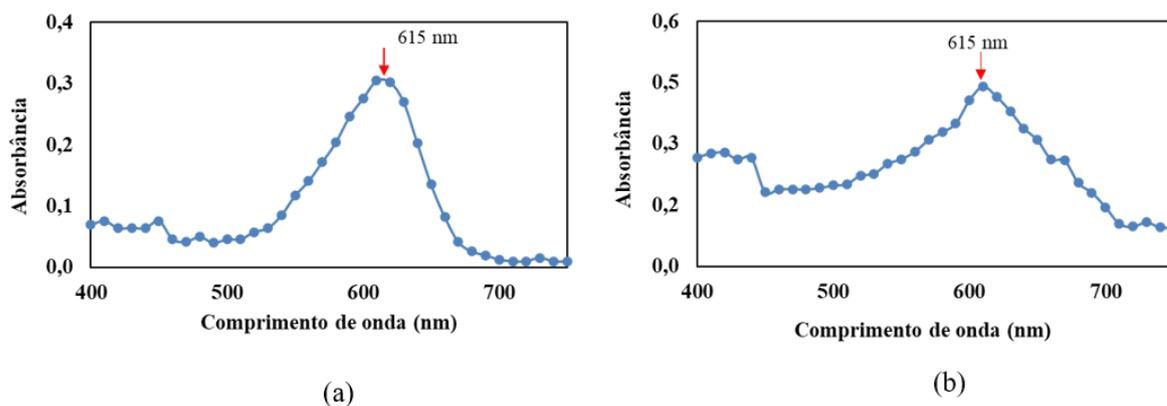
Que representa a porcentagem de cada FBP encontrada preferencialmente em uma de suas fases, apenas a partir dos parâmetros, como coeficiente de partição (K) e razão de volume entre as fases (Vr).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da presença de FBP nos extratos de *Nostoc* sp. e *Anabaena variabilis*

Com intuito de verificar se as três ficobiliproteínas são sintetizadas em quantidades suficientes para serem detectadas por absorvância e, em seguida, quantificadas pelas Equações (3) a (4), realizou-se a varredura espectral do extrato bruto de ambas as cepas, conforme ilustra a Figura 19.

Figura 19 - Varredura espectral obtida para as cepas de (a) *Nostoc* sp. PCC 7423 e (b) *Anabaena variabilis* ATCC.



Fonte: O autor.

De acordo com a Figura 19, as varreduras espectrais não revelaram picos característicos de FE, escala de 560-570 nm, assim, a sua presença nos extratos de *Nostoc* sp. e *Anabaena variabilis* não pôde ser confirmada (RIZZO, 2014). Na escala de 610-620 nm, é possível notar um pico distinto para as duas cepas, o que indica uma maior concentração de FC nos extratos. A presença de AFC não deve ser excluída, uma vez que o pico de absorvância em 652 nm pode ter sido encoberto pelo pico em 615 nm (MOGANY et al., 2018). O fato de o pico de FC esconder o pico de AFC indica que a concentração de FC nos extratos é muito maior do que AFC. Por essas razões, apenas FC foi analisada para ambas as cepas.

4.2 Avaliação da suplementação de glicose e nitrato ao meio de cultivo para crescimento celular e produção de ficocianina

Carbono orgânico e fontes de nitrogênio são os principais suplementos ao meio de cultura de cianobactérias capazes de influenciarem a produção de metabólitos destes organismos. Nesse sentido, foram avaliados a influência da adição de glicose e nitrato de sódio ao meio basal BG11₀, bem como a razão inicial de inóculo, no crescimento celular e produção de ficocianina de *Nostoc* sp. PCC 7423.

Os resultados apresentados nesta seção correspondem a ensaios que deram continuidade ao estudo de COTTAS (2019), sendo que condições experimentais foram repetidas e novas condições foram realizadas de forma a ampliar as faixas de concentração de glicose e de nitrato de sódio analisadas.

A discussão a seguir é referente aos resultados de ambos os estudos, o atual e de COTTAS (2019) e consta no manuscrito: COTTAS, A., G; TEIXEIRA, T. A.; CUNHA, W., R., RIBEIRO, E., J., FERREIRA., J. DE S. Effect of glucose and sodium nitrate on the cultivation of *Nostoc* sp. PCC 7423 and production of phycobiliproteins, submetido ao periódico Brazilian Journal of Chemical Engineering e se encontra em análise.

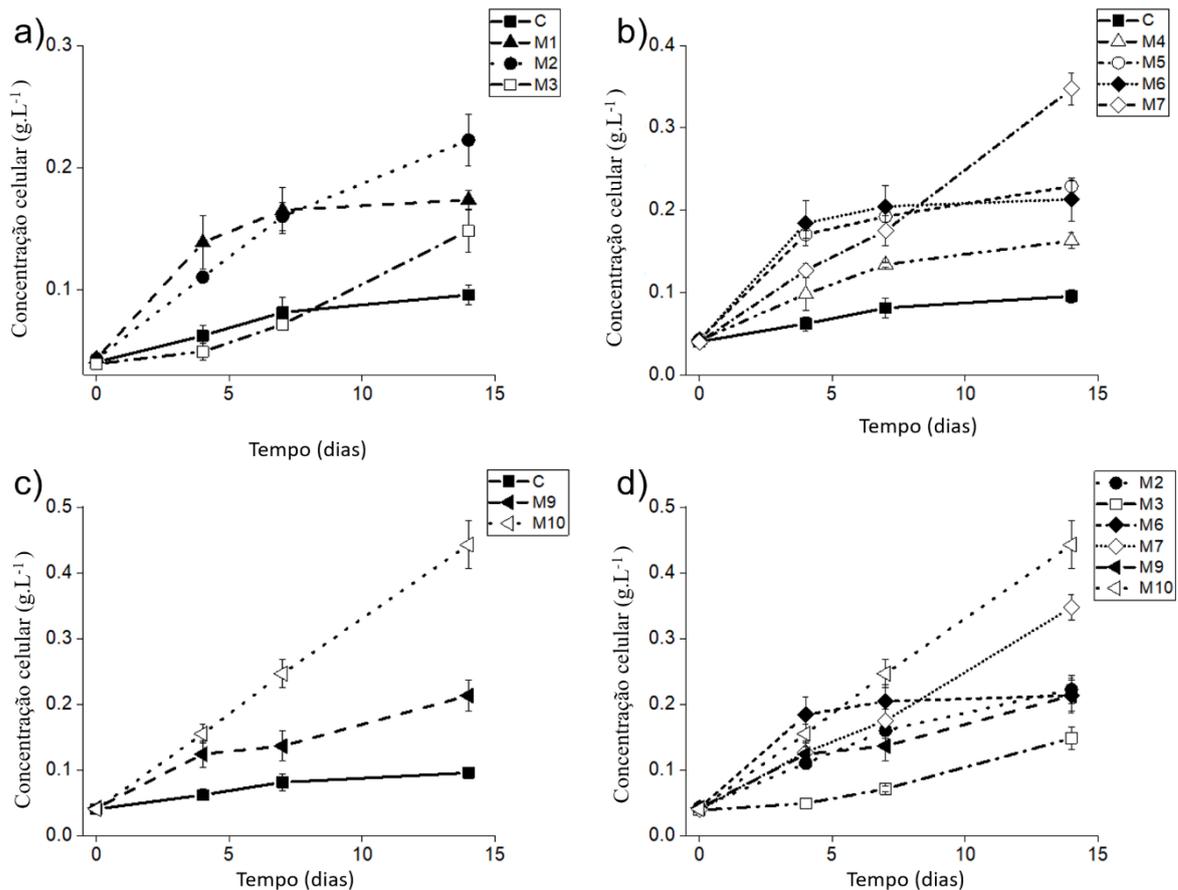
4.2.1 Crescimento celular

Comparado ao meio de cultura autotrófico, o meio mixotrófico apresenta maiores resultados em relação ao crescimento celular de microrganismos, sendo que, normalmente, a adição de carbono orgânico aumenta a taxa específica de crescimento celular. Além disso, o nitrogênio tem efeito sobre o metabolismo energético e a biossíntese na cianobactéria, e sua ausência afeta a fotossíntese, a respiração e o crescimento celular. Em relação ao metabolismo celular, nitrogênio na forma de nitrato contribui para a produção de duas moléculas de glutamato, uma usada como substrato para o metabolismo celular e a outra para a biossíntese de metabólitos (MANIRAFASHA et al., 2016).

Neste estudo, o crescimento celular da cepa de *Nostoc* sp. foi avaliado para diferentes condições ao suplementar o meio de cultivo com glicose e nitrato de sódio, para os volumes iniciais de 10% v/v (0,04 g.L⁻¹) e 20% v/v (0,08 g.L⁻¹) de inóculo, e os perfis de concentração

celular para os dois inóculos em função do tempo são mostrados nas Figuras 21 (a – d) e Figuras 22 (a – d), respectivamente.

Figura 20 - Concentração celular para 10% de inóculo: (a) influência isolada de glicose; (b) influência de glicose combinada com 2 mM de nitrato de sódio; (c) influência de glicose combinada com 5 mM de nitrato de sódio e (d) influência de nitrato de sódio para meios com 1g.L⁻¹ e 2 g.L⁻¹ de glicose.



Os valores representam a média \pm o desvio padrão, obtidos em triplicata.

De acordo com a Figura 20, todas as suplementações apresentaram um maior crescimento celular quando comparados com o meio controle em 14 dias de cultivo. Os ensaios para os meios M8 e M11 não foram plotados pois, sob essas condições, morte celular foi observada. A morte celular foi observada pela perda da cor característica das células das cianobactérias, ao apresentarem uma cor esbranquiçada indicando a degradação de suas estruturas, provavelmente devido ao excesso de substrato combinado com a pequena concentração de inóculo.

Os meios de cultura suplementados com glicose de forma isolada (Figura 20 (a)) apresentaram um efeito positivo para o crescimento celular, ao atingir a maior concentração

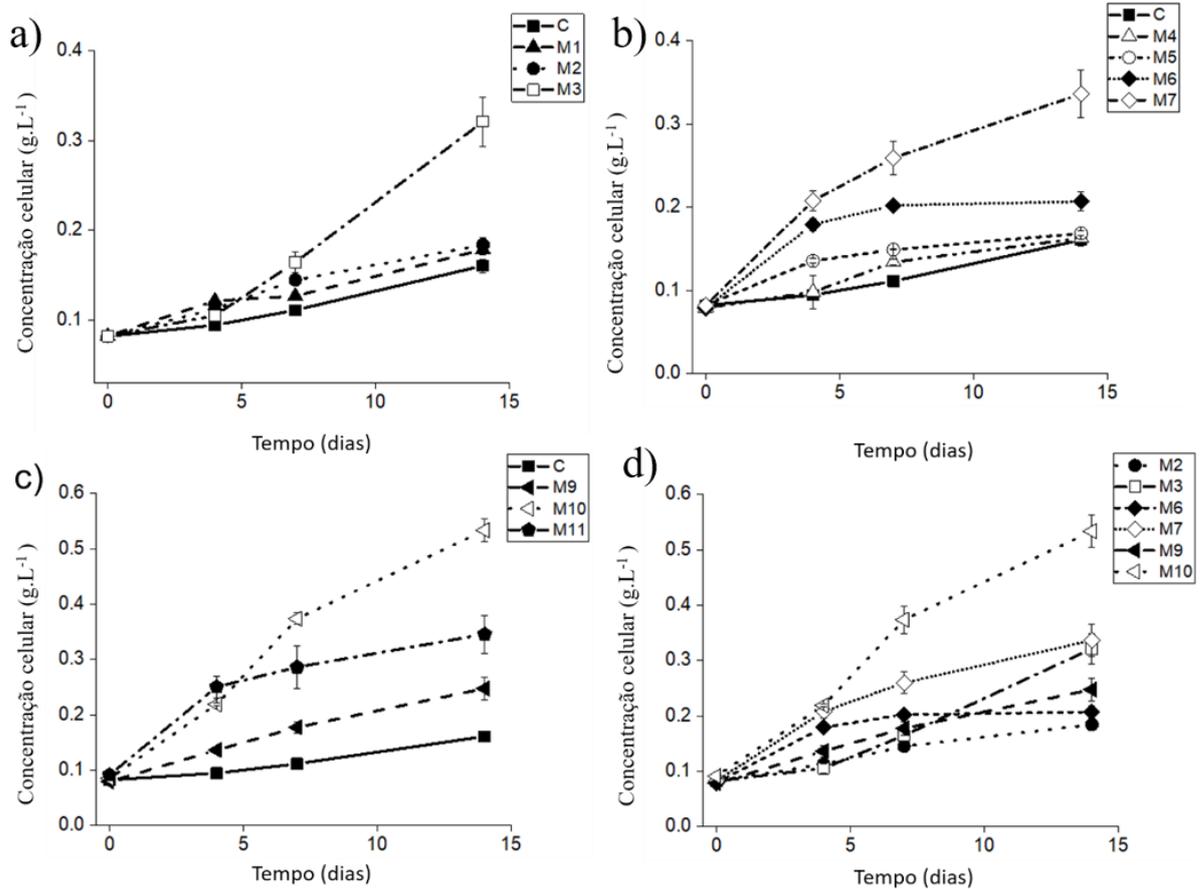
(0,22 g.L⁻¹) para a adição de 1 g.L⁻¹ de glicose (M2) ao se comparar ao meio controle (0,10 g.L⁻¹). O meio M3 (2 g.L⁻¹ de glicose) apresentou uma menor concentração celular ao se comparar ao meio M2, provavelmente devido à grande quantidade de glicose no meio de cultura, o que causou inibição em relação à baixa concentração inicial de inóculo.

Para os meios de cultura contendo 2 mM de nitrato de sódio (Figura 20 (b)), à medida que se aumenta a concentração de glicose adicionada ao meio, maior é a concentração celular obtida, alcançando um crescimento celular máximo de 0,35 g.L⁻¹ para o meio M7 (2 g.L⁻¹ de glicose). Foi possível notar que a suplementação de nitrato de sódio (M4) de forma isolada promoveu um pequeno aumento na concentração celular em comparação ao meio controle. Portanto, em comparação com os ensaios sem adição de nitrato de sódio, este experimento indicou que a suplementação combinada de glicose e nitrato possibilitou exceder o limite de substrato, que causa a inibição do crescimento celular, e ambos são necessários estar presentes no meio de cultura com o objetivo de se obter melhorias em relação ao crescimento celular.

Em relação ao meio contendo 5 mM de nitrato de sódio (Figura 20 (c)), a maior concentração (0,44 g.L⁻¹) foi obtida ao adicionar 2 g.L⁻¹ de glicose (M10), o que representa 4,4 vezes maior do que o meio controle e 2,1 vezes maior do que o meio M9 (1 g.L⁻¹ de glicose). Apesar do incremento da fonte de nitrogênio para 5 mM neste meio, houve morte celular do meio de cultura quando a concentração de glicose foi 5 g.L⁻¹, devido à inibição causada pela alta concentração de substrato ao volume inicial de inóculo (10% v/v).

A Figura 20 (d) apresenta as curvas de crescimento celular para os meios suplementados com 1 e 2 g.L⁻¹ de glicose e 2 e 5 mM de nitrato de sódio. É possível notar que, independentemente da concentração da fonte de nitrogênio, meios com 1 g.L⁻¹ de glicose (M6 e M9) não apresentaram diferença significativa ao alcançarem uma concentração celular de 0,21 g.L⁻¹. Para o meio suplementado com 2 g.L⁻¹ de glicose, o incremento na concentração de nitrato de sódio foi responsável por um aumento na concentração celular, alcançando 0,44 g.L⁻¹ (M10), 3 vezes maior do que o meio onde não houve suplementação de nitrato de sódio (M3) e 1,27 vezes maior do que o meio suplementado com 2 mM (M7).

Figura 21 - Concentração celular para 20% de inóculo: (a) influência isolada de glicose; (b) influência de glicose combinada com 2 mM de nitrato de sódio; (c) influência de glicose combinada com 5 mM de nitrato de sódio e (d) influência de nitrato de sódio para meios com 1 g.L⁻¹ e 2 g.L⁻¹ de glicose.



Os valores representam a média \pm o desvio padrão, obtidos em triplicata.

De acordo com a Figura 21, todos os ensaios de suplementação alcançaram uma concentração celular maior do que o meio controle.

Os meios suplementados com glicose de forma isolada (Figura 21 (a)) apresentaram diferentes tendências para aqueles observados para 10% de inóculo, onde apenas o meio M3 (2 g.L⁻¹ de glicose) foi capaz de aumentar significativamente a concentração celular (0,32 g.L⁻¹), o que representa uma concentração 2 vezes maior do que o controle. Esses testes mostraram que, com 20% v/v de inóculo, não houve inibição do crescimento celular pela concentração de substrato.

Em relação aos meios suplementados com 2 mM de nitrato de sódio (Figura 21 (b)), uma tendência similar para as duas concentrações iniciais de inóculo pôde ser observada, uma vez que o aumento na concentração de glicose causou um crescimento na concentração celular, alcançando o ponto máximo para o meio M7 (2 g.L⁻¹ de glicose), sendo 0,34 g.L⁻¹, mesmo valor médio em relação ao inóculo de 10%, sem diferença significativa para o teste de Tukey (p <0,05).

Para os meios suplementados com 5 mM de nitrato de sódio (Figura 21 (c)), a condição de cultivo que apresentou maiores resultados foi também para o M10 (2 g.L⁻¹ de glicose), alcançando 0,53 g.L⁻¹, 3,3 vezes maior do que o controle e 1,2 vezes maior do que a mesma condição para 10% de inóculo. Esse excesso de nitrogênio permitiu o aumento da concentração de glicose sem causar inibição no crescimento celular, assim como meio M11 (5 g.L⁻¹ de glicose) pôde ser analisado, alcançando uma concentração celular de 0,35 g.L⁻¹, mas 46% menor do que o meio M10, indicando que existe uma condição limite para suplementação do meio.

Ao se comparar a suplementação do meio com 1 g.L⁻¹ e 2 g.L⁻¹ (Figura 21 (d)), é possível notar que a suplementação com nitrato de sódio não apresentou um resultado significativo para os meios com 1 g.L⁻¹ de glicose, sendo M6 (2 mM) 1,28, M2 (sem adição de nitrato de sódio) 1,14 e M9 (5 mM) 1,54 vezes maior do que o controle, respectivamente. Para 2 g.L⁻¹ de glicose, o aumento na concentração celular devido à adição de nitrato de sódio foi mais efetivo, sendo M3 (sem adição de nitrato de sódio) e M7 (2 mM) 2 vezes maior do que o meio controle, e M10 (5 mM) apresentou a maior concentração celular, sendo 3,3 vezes maior do que o meio controle.

Portanto, os ensaios confirmaram a indicação de que a suplementação de fontes de carbono e nitrogênio deve ser realizada de forma combinada e proporcional ao volume inicial de inóculo. Uma maior concentração de glicose foi requerida quando mais nitrogênio foi adicionado em 20% v/v de inóculo.

Além disso, os resultados encontrados para suplementação com altas concentrações de glicose de 5 g.L⁻¹ e nitrato de sódio de 2 mM e 5 mM (M8 e M11) para 10% de inóculo e de 2 mM (M8) para 20% de inóculo corrobora com o que é encontrado na literatura, mesmo que o crescimento da cianobactéria dependa de uma adequada suplementação de macronutrientes (nitrogênio e fósforo) e fontes de carbono (orgânico e inorgânico), o excesso de nutrientes pode causar um efeito tóxico no metabolismo celular, responsável pela inibição do crescimento e produção de metabólitos até a morte celular (KHATOON et al., 2018; MANIRAFASHA et al., 2016).

Entre todas as condições e para as duas condições de inóculo, a condição de cultivo que apresentou maiores resultados de crescimento celular foi o meio M10 (2 g.L⁻¹ de glicose e 5 mM de nitrato de sódio), alcançando uma concentração celular 3 vezes maior que o meio controle, indicando ser uma alternativa interessante para a produção de *Nostoc* sp.

Em estudos anteriores, a condição ótima de concentração de glicose e nitrogênio para diferentes cepas variou em relação àquela encontrada neste trabalho para a cepa de *Nostoc* sp. Isso ocorre devido à produção de biomassa ser uma propriedade específica para cada cepa, e possuir diferentes respostas de assimilação para cada tipo de substrato e concentração usados, principalmente em culturas mixotróficas (KOVÁČ et al., 2017).

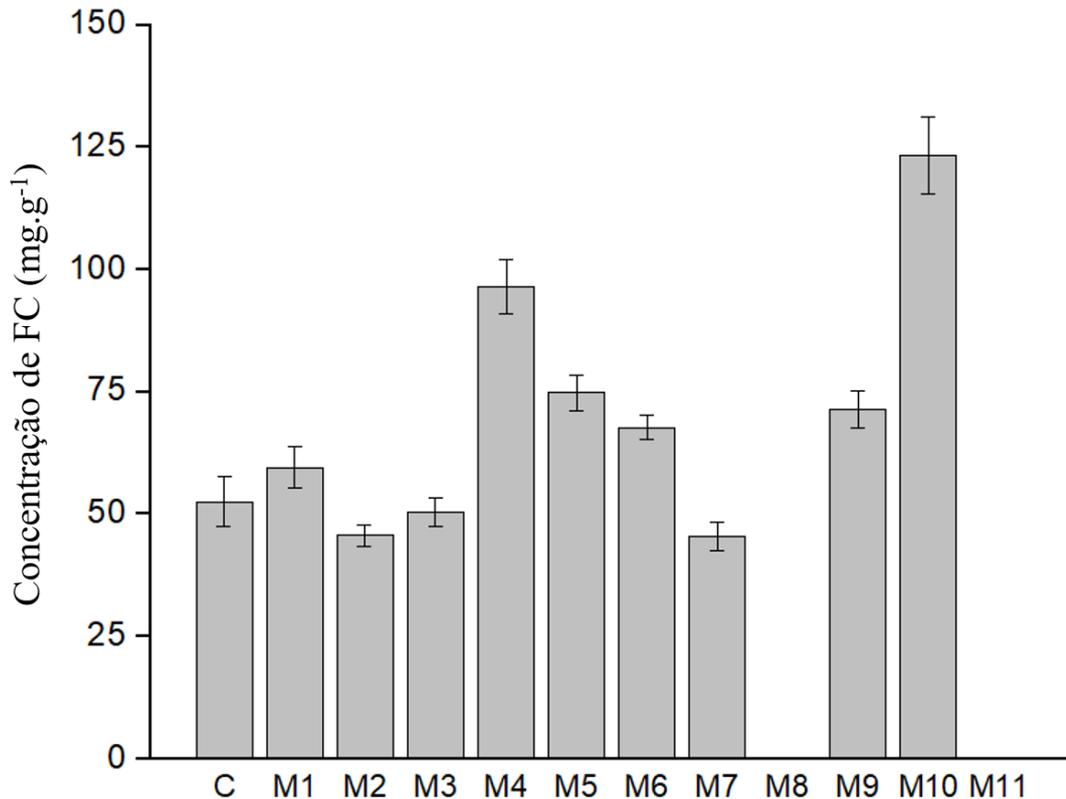
Por exemplo, KAUSHAL et al. (2017) estudaram o crescimento celular para a cepa *Nodularia sphaerocarpa* e usaram o meio de cultivo Chu-10 (sem nitrogênio) em pH 8, como controle, durante 8 dias de cultivo. Suplementos com concentração de KNO₃ e NaNO₂ de 2, 5 e 10 mM e 5 g.L⁻¹ de glicose foram avaliados. O crescimento celular obtido foi similar ao apresentado neste estudo baseado no meio de controle com 0,16 g.L⁻¹, alcançando um aumento efetivo para os meios suplementados com 5 mM de KNO₃ (aumento de 30%), 10 mM de NaNO₂ (aumento de 27%) e 5 g.L⁻¹ de glicose (aumento de 23%). COTTAS et al. (2020) avaliaram o efeito da suplementação ao meio basal BG11₀ de glicose de forma isolada (0,5; 1; 2 e 5 g.L⁻¹) e combinada com NaNO₃ (2 e 5 mM) no acúmulo de biomassa da cepa *Anabaena variabilis*, em 10 dias de cultivo. A condição mais efetiva para o crescimento celular foi obtida para a suplementação combinada de glicose 1,0 g.L⁻¹ e 5 mM de nitrato de sódio, alcançando 0,45 g.L⁻¹, 81% maior do que o meio controle.

4.2.2 Ficobiliproteínas (FBP)

Ficobiliproteínas possuem aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Nesse sentido, fatores que aumentam a produção e concentração destes pigmentos devem ser explorados com o objetivo de tornar o processo economicamente viável (KAUSHAL et al., 2017; KHATTAR et al., 2015).

O efeito da suplementação ao meio de cultura visando o aumento na produção de FC no cultivo da cepa de *Nostoc* sp. foi investigado para os volumes iniciais de inóculo de 10% v/v (0,04 g.L⁻¹) e 20% v/v (0,08 g.L⁻¹). Os resultados para 10% e 20% de inóculo são apresentados pelas Figuras 22 e 23, respectivamente.

Figura 22 - Concentração de FC obtida para 10% de inóculo para *Nostoc* sp. para cada suplementação*



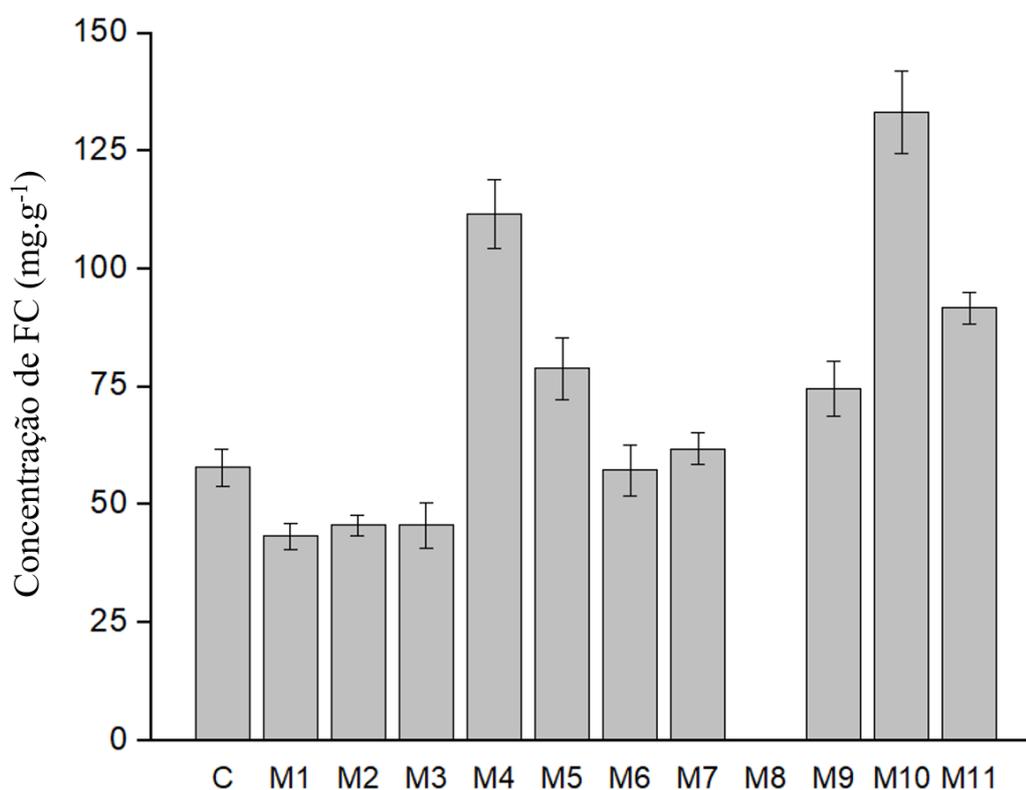
Os valores representam a média \pm o desvio padrão, obtidos em triplicata. *M8 e M11 não puderam ser analisados devido à morte celular.

De acordo com a Figura 22, os meios suplementados com glicose de forma isolada (M1, M2 e M3) não mostraram vantagem em relação ao aumento da concentração específica de FC, com uma menor concentração ou estatisticamente igual ao controle (teste de Tukey $p < 0,05$).

Entre os meios suplementados com 2 mM de nitrato de sódio (M4, M5, M6, M7 e M8), a condição que apresentou maior concentração de FC foi para o meio com ausência de glicose (M4), alcançando uma concentração específica de FC de 96, 51 mg.g⁻¹, 84% maior do que o meio controle. Para as outras condições, enquanto a concentração de glicose aumentou de 0 a 2 g.L⁻¹, uma queda na concentração específica de FC foi observada até alcançar a mesma concentração do meio controle. Em relação ao meio com 5 mM de nitrato de sódio (M9 e M10), o aumento na quantidade de glicose foi responsável por um acréscimo significativo na concentração específica de FC, como indicado pelo M9 (1 g.L⁻¹ de glicose)

com 71, 38 mg.g⁻¹ e M10 (2 g.L⁻¹ de glicose) obtendo o maior resultado entre todas as condições estudadas, alcançando 123, 17 mg.g⁻¹, cerca de 2,3 vezes maior do que o meio controle. Para uma alta concentração de glicose (5 g.L⁻¹), morte celular foi observada após os 14 dias de cultivo.

Figura 23 - Concentração de FC obtida para 20% de inóculo para *Nostoc* sp. para cada suplementação*



*Os valores representam a média ± o desvio padrão, obtidos em triplicata. *M8 não pôde ser analisado devido à morte celular.*

A FC obtida para os meios com volume com 20% v/v de inóculo é mostrada na Figura 23. Os meios suplementados com glicose de forma isolada (M1, M2 e M3) apresentaram uma queda na concentração específica de FC obtida, com valores na mesma ordem (44 mg.g⁻¹), 18% menor do que o meio controle. Nos meios suplementados com 2 mM de nitrato (M4, M5, M6 e M8), o comportamento obtido foi similar ao de 10% de inóculo, representado pela queda na concentração específica de FC, com o aumento na concentração de glicose. Nessa condição, o meio sem suplementação de glicose (M4) foi aquele que apresentou maior concentração de FC, obtendo 111, 66 mg.g⁻¹ de FC, cerca de 2 vezes maior do que o meio

controle. Para os meios suplementados com 5 Mm de nitrato de sódio, a maior concentração específica de FC foi obtida para a suplementação combinada de 2 g.L⁻¹ de glicose, alcançando 133,03 mg.g⁻¹, aproximadamente 2,3 vezes maior do que o meio controle.

Para o volume de inóculo de 20% v/v, a adição de glicose de forma isolada não promoveu um aumento na concentração específica de FC, obtendo um valor igual ou até mesmo menor do que o meio controle. A suplementação de forma isolada de 2 mM de nitrato de sódio foi capaz de causar um aumento na concentração específica de FC cerca de 2 vezes maior em relação ao meio de controle e 15,69% maior do que o ensaio usando 10% v/v, e uma tendência similar foi observada, ou seja, ao se aumentar a concentração de glicose, a concentração específica de FC foi a mesma para o meio sem suplementação.

A suplementação combinada de glicose e nitrato de sódio (5 Mm) intensificou a biossíntese desta ficobiliproteína, obtendo a máxima concentração do pigmento para o meio M10 (2 g.L⁻¹ de glicose e 5 mM de nitrato de sódio), alcançando uma concentração de 133,03 mg.g⁻¹ para 20% v/v, a qual não foi estatisticamente diferente de 123,17 mg.g⁻¹ para 10% v/v de inóculo, pelo teste de Tukey (p <0,05). Além disso, como foi discutido anteriormente, para um maior volume de inóculo, não houve inibição ao se suplementar o meio com 5 g.L⁻¹ e 5 mM de nitrato de sódio (M11), e para esta condição, a concentração específica de FC encontrada foi 91,59 mg.g⁻¹.

Esses resultados corroboram com a literatura, de modo que o aumento da concentração específica de FC por meio da suplementação com fontes de nitrogênio é justificado devido a sua fundamental função na produção de FBPs, que são estruturas responsáveis pelo seu armazenamento na célula. A variação de nitrogênio na célula, causada por escassez ou estresse celular, forçam a célula a utilizar o nitrogênio presente nas FBP para a manutenção celular, sendo responsável por um decréscimo na sua concentração (JOHNSON; KUMAR; DAS, 2014; PAGELS et al., 2019). Assim, a suplementação de fontes de nitrogênio ao meio de cultura tende a favorecer a produção de FBP.

A melhor fonte de assimilação de nitrogênio nas cianobactérias é diversa e dependente da cepa. A produção de cianobactérias normalmente inclui o uso de nitratos, os quais reduzem-se a nitrito e, então, a amônia para, finalmente, ser incorporado pelos componentes de armazenamento. Nitrato é uma fonte de nitrogênio, presente na maioria dos meios de cultivo de cianobactérias (Chu-10, Algal, BG11₀ e Zarrouk) e está presente na maioria dos estudos como comparação para efeitos de produção de FBP (PAGELS et al., 2019). KHAZI; DEMIREL; DALAY (2018) compararam o uso de nitrato (NaNO₃ e KNO₃) e amônia em três espécies diferentes, *Phormidium* sp., *Pseudoscillatoria* sp. e *Spirulina platensis*. As duas

primeiras cepas obtiveram melhor resposta para o crescimento celular com a suplementação de amônia e a última na presença de nitrato, provavelmente devido à grande variação de pH e concentração de amônia. AJAYAN; SELVARAJU; THIRUGNANAMOORTHY (2012) observaram ao estudarem a cepa de *Spirulina plantesis* que a mesma tem preferência pela ureia como fonte de nitrogênio quando comparada com nitrato, a fonte mais comum utilizada. SOLTANI et al. (2007), estudaram cepas do gênero *Fischerella* e KAUSHAL et al. (2017) estudaram o gênero *Nodularia*, e obtiveram altas concentrações de FBP ao suplementarem o meio de cultivo com nitrato como fonte de nitrogênio. TASNEEM FATMA (2009) ao estudarem as cepas de *Anabaena* sp. observaram que a produção de FC aumentou quando o meio de cultivo foi suplementado com fontes de nitrogênio.

A condição mais favorável para obtenção de FBP a partir de modificações e suplementações do meio de cultivo varia na literatura. KHATTAR et al. (2015) analisaram a suplementação ao meio de cultivo com o objetivo de se obter FBP da cepa de *Anabaena fertilíssima*, ao modificar o meio de cultivo Chu-10 (sem nitrogênio) em pH 7,5 e 8 dias de cultivo. A fonte de carbono orgânico que apresentou maiores resultados para obtenção de FC foi sacarose 5 g.L^{-1} , atingindo uma concentração de $389,5 \text{ mg.g}^{-1}$, 73% maior do que o controle. Em relação à glicose, a maior concentração de FC obtida foi para a suplementação de 2 mM de nitrito, atingindo $361,5 \text{ mg.g}^{-1}$ e 2 mM de nitrato, atingindo uma concentração de $330,7 \text{ mg.g}^{-1}$, valores na ordem de 50% maior em relação ao meio controle.

KAUSHAL et al. (2017) ao avaliarem a obtenção de FC da cepa de *Nodularia sphaerocarpa*, com a suplementação do meio de cultura com nitrato de potássio, nitrito de sódio e glicose de forma isolada, e utilização do meio de controle Chu-10 (sem nitrogênio) em pH 8 durante 8 dias de cultivo obtiveram um aumento considerável na concentração de FC, ao suplementarem o meio com 5 g.L^{-1} de glicose, 5 mM de nitrato de potássio e 5 mM de nitrito de sódio, promovendo um aumento na concentração de FC cerca de 90% maior em relação ao meio de controle, alcançando 220 mg.g^{-1} , na condição de 5 mM de nitrato de sódio.

COTTAS et al. (2020) em um estudo similar investigaram a suplementação ao meio basal BG11₀, utilizando glicose e nitrato de sódio, de forma isolada e de forma combinada, para obtenção de FC da cepa de *Anabaena variabilis*, em 10 dias de cultivo. A condição que apresentou maiores concentrações de FC foi a suplementação de forma combinada de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose e 2 mM de nitrato de sódio, alcançando uma concentração de $78,43 \text{ mg.g}^{-1}$ de FC, 42% maior do que o meio de controle.

A suplementação ao meio de cultivo basal BG11₀ promoveu um aumento na concentração celular assim como na concentração específica de FC obtida da cepa *Nostoc* sp.

PCC 7423, e, ainda que a concentração de FC seja menor do que em outras cepas encontradas na literatura, o presente estudo apresentou a condição de suplementação de forma combinada de fontes de carbono orgânico e fontes de nitrogênio, ainda pouco estudada, a qual apresentou resultados duas vezes maior ao se comparar com o meio de cultivo basal e podendo ser explorada para estudos com diferentes cepas. Além disso, o conhecimento de que meios de cultivo contendo nitrogênio e fontes de carbono favorecem a produção de FBP, possibilita a integração deste processo com a reutilização de resíduos agroindustriais ou subprodutos que normalmente apresentam ambas as fontes.

4.3 Avaliação do efeito da qualidade da luz para crescimento celular e produção de ficocianina

Durante a atividade fotossintética e outras vias reguladas pela luz que os principais processos metabólicos acontecem, desde a mudança na densidade celular até o acúmulo de compostos específicos (SCHULZE et al., 2014). Assim, o efeito de diferentes qualidades de luz (branca, azul, vermelha, verde e amarela) de forma isolada e combinada com a adição de glicose e nitrato de sódio ao meio basal BG11₀, a partir dos resultados do estudo de suplementação do meio de cultivo, foram avaliados para crescimento celular e acúmulo de ficocianina para as cepas de *Nostoc* sp. e *Anabaena variabilis* e serão apresentados nesta seção.

Para verificar se a qualidade da luz resultaria no aumento da FE e da AFC, fez-se novamente a varredura dos extratos brutos, após os ensaios com diferentes qualidades de luz. Entretanto, o espectro foi semelhante ao obtido para a análise apresentada nas Figura 19 e 20, e, portanto, somente FC foi quantificada.

4.3.1 Avaliação do efeito da qualidade da luz para o crescimento celular no cultivo de *Nostoc* sp. e *Anabaena variabilis*.

Os resultados para avaliação do crescimento celular pelo efeito da qualidade da luz de forma isolada e combinada com a suplementação ao meio de cultivo BG11₀ de 2 g.L⁻¹ de glicose e 5 mM de nitrato de sódio e volume inicial de inóculo de 10 % v/v (0,4 g.L⁻¹) durante 14 dias de cultivo para a cepa de *Nostoc* sp. estão apresentados nas Figuras 24 e 25, respectivamente.

Figura 24 - Perfil de crescimento celular por 14 dias, em diferentes qualidades de luz em meio basal BG11₀ para *Nostoc* sp. Luz branca (○), luz azul (▲), luz vermelha (●), luz verde (■), luz amarela (■).

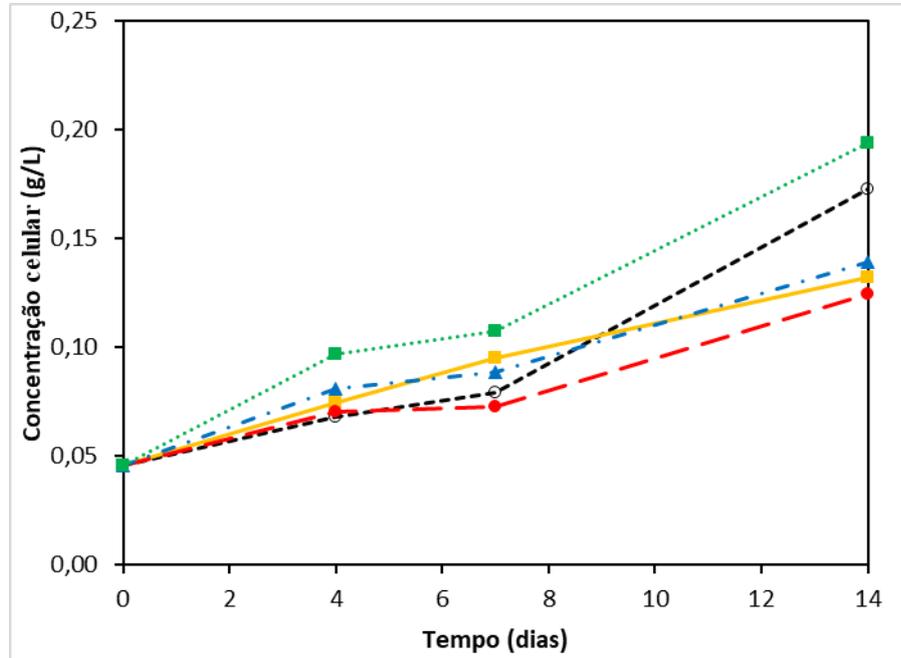
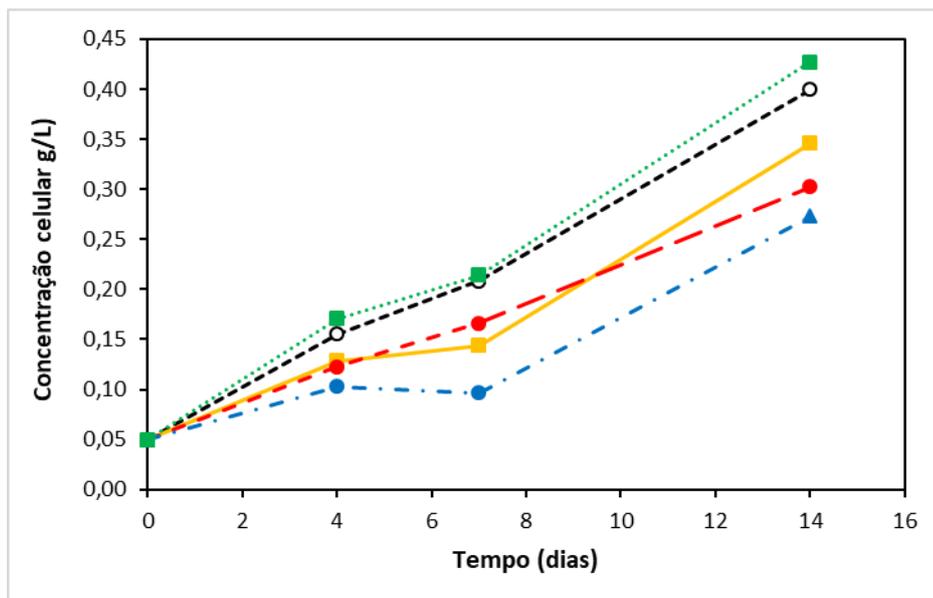


Figura 25 - Perfil de crescimento celular por 14 dias, em diferentes qualidades de luz, em meio basal BG11₀ com suplementação de 2 g.L⁻¹ de glicose e 5 mM de nitrato de sódio para *Nostoc* sp. Luz branca (○), luz azul (▲), luz vermelha (●), luz verde (■), luz amarela (■).



É possível observar, pela Figura 24, que nos ensaios em que se cultivou a *Nostoc* sp. em meio basal sob diferentes qualidades de luz, que o crescimento celular foi ligeiramente

favorecido pelo uso das luzes verde ($0,19 \text{ g.L}^{-1}$) e branca ($0,17 \text{ g.L}^{-1}$), obtendo uma maior concentração de biomassa após 14 dias, sendo a concentração de biomassa 1,5 vezes maior em comparação às luzes azul, vermelha e amarela que atingiu cerca de $0,13 \text{ g/L}$ ao final dos 14 dias.

No caso da suplementação ao meio de cultivo com 2 g.L^{-1} de glicose e 5 mM de nitrato sob efeito das diferentes qualidades de luz (Figura 25), as luzes verde e branca apresentaram novamente efeito positivo para crescimento celular no cultivo da cepa de *Nostoc* sp., quando comparada às outras cores de luz. Sob a luz verde, a concentração celular após 14 dias de cultivo foi de $0,43 \text{ g.L}^{-1}$, cerca de 1,56 vezes maior do que a luz azul nas mesmas condições. Na comparação dos dados entre o meio com e sem suplementação, verifica-se o aumento da biomassa pela suplementação do meio basal com glicose e nitrato de sódio, obtendo-se, sob a luz verde, um incremento de 2,2 vezes na concentração celular em relação à condição, sem suplementação ao meio BG11₀ (Figura 24).

Foram avaliados também os efeitos da qualidade da luz de forma isolada e combinada com a suplementação ao meio de cultivo BG11₀ de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose e 2 mM de nitrato de sódio e volume inicial de inóculo de 10% v/v ($0,4 \text{ g.L}^{-1}$) durante 14 dias para concentração celular no cultivo da cepa de *Anabaena variabilis*, e os resultados são apresentados nas Figuras 26 e 27 a seguir.

Figura 26 - Perfil de crescimento celular por 14 dias, em diferentes qualidades de luz em meio basal BG11₀ para *Anabaena variabilis*. Luz branca (○), luz azul (▲), luz vermelha (●), luz verde (■), luz amarela (■).

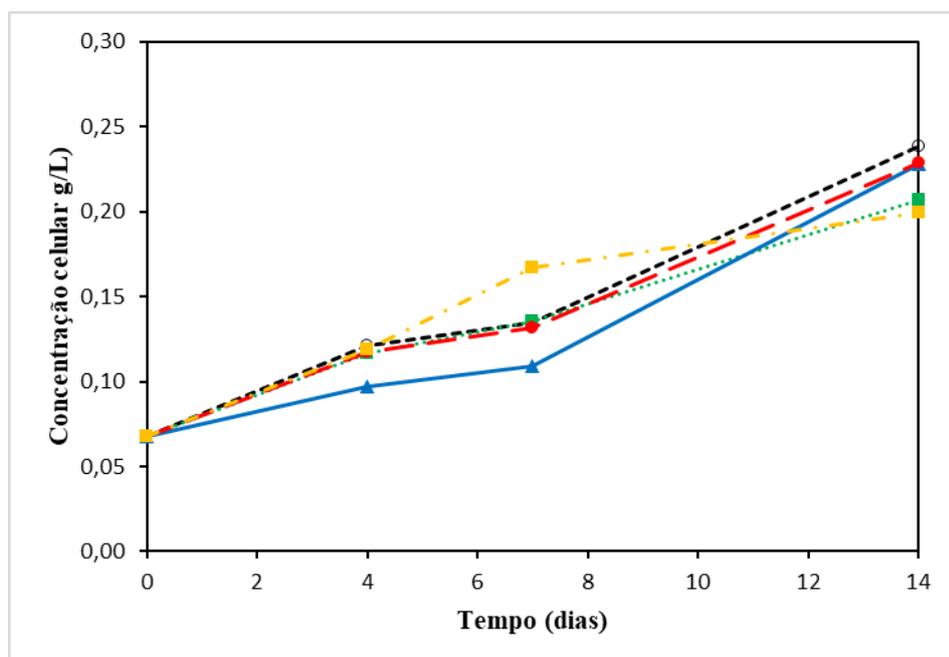
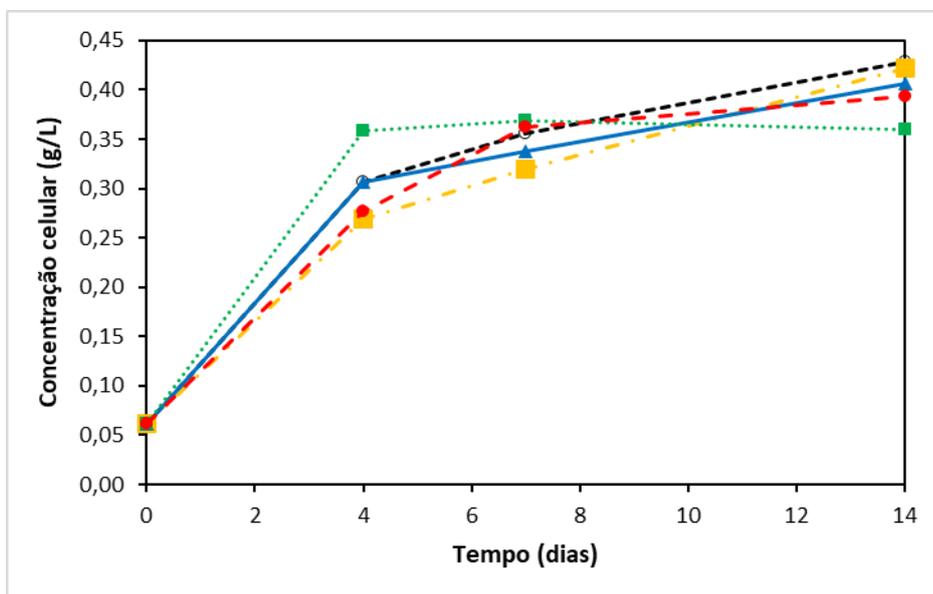


Figura 27 - Perfil de crescimento celular por 14 dias, em diferentes qualidades de luz, em meio basal BG11₀ com suplementação de 0,5 g.L⁻¹ de glicose e 2 mM de nitrato de sódio para *Anabaena variabilis*. Luz branca (○), luz azul (▲), luz vermelha (●), luz verde (■), luz amarela (■).



Quando a cepa de *Anabaena variabilis* foi submetida a diferentes qualidades de luz em meio BG11₀ (Figura 26) ou em meio BG11₀ suplementado (Figura 27), para todas as variações de cores de luz, o comportamento para o crescimento celular não apresentou diferenças tão significativas quanto às aquelas apresentadas para a cepa de *Nostoc* sp.

A condição de luz branca apresentou um ligeiro aumento no crescimento celular após 14 dias de cultivo para a cepa de *Anabaena variabilis*, tanto para o meio BG11₀ quanto para a condição de suplementação, equivalente a 0,24 g.L⁻¹ (Figura 26) e 0,43 g.L⁻¹ (Figura 27), respectivamente. É possível notar ainda que, diferente do que foi observado nos ensaios com *Nostoc* sp., sob a luz verde, a cepa de *Anabaena variabilis* apresentou a menor concentração celular após os 14 dias de cultivo, e para o teste com suplementação ao meio de cultivo, a diferença entre as outras cores foi ainda maior, apresentando concentração constante a partir do 4º dia (Figura 27). Entretanto, assim como para a cepa de *Nostoc* sp., a luz branca continuou tendo um efeito positivo para a cepa de *Anabaena variabilis* no acúmulo de biomassa, sob as outras cores ao final dos 14 dias de cultivo.

Em geral, o crescimento celular para as duas cepas estudadas foi favorecido sob a condição de luz branca. Essa observação está de acordo com o que foi reportado por KAUSHAL et al. (2017), que, em seus estudos obtiveram uma maior concentração celular no cultivo da cepa de *Nodularia sphaerocarpa* PUPCCC 420.1 sob a luz branca.

De modo semelhante, MADHYASTHA; VATSALA (2007), por exemplo, reportaram uma maior produção de biomassa no cultivo de *Spirulina fusiformis*, sob a condição de luz branca, seguida pelas luzes azul e verde. Segundo estes autores, isso aconteceu pelo fato de alguns pigmentos fotossintéticos absorverem comprimentos de onda específicos para serem sintetizados (para ficocianina, normalmente as luzes vermelha, amarela e verde), e a depender da qualidade de luz incidida, estes pigmentos podem absorver esses fótons e promover uma carência dos mesmos no acúmulo de biomassa. De acordo com VADIVELLOO et al. (2016), a principal razão pela qual a luz branca favoreceu o crescimento celular no cultivo da cepa de *Nodularia sphaerocarpa* sob a luz branca é o fato de ela receber maior irradiação nesta condição, comparada com as outras cores.

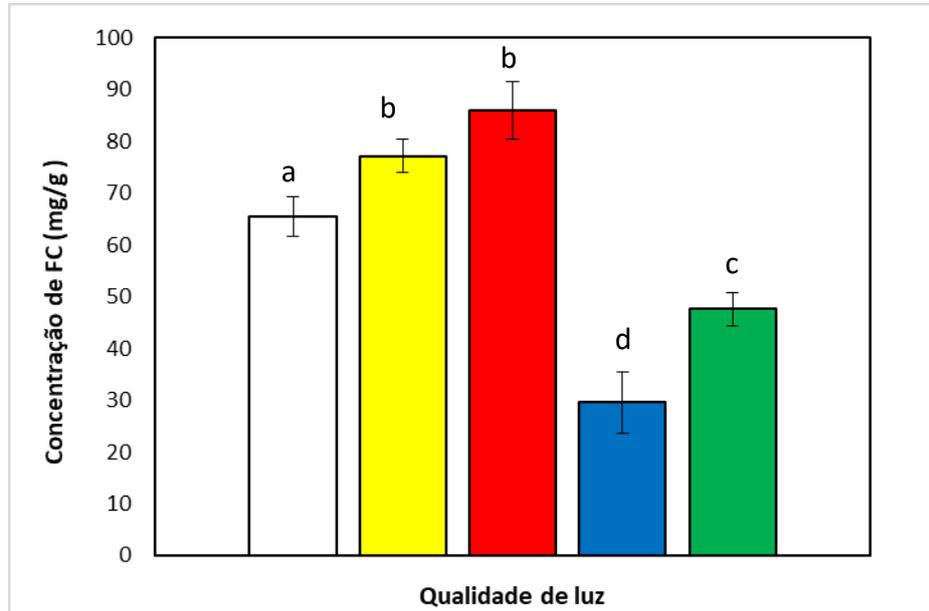
Ainda neste estudo, no trabalho desenvolvido por KLEPACZ-SMÓŁKA et al. (2020), os autores reportaram que, sob a luz azul, o crescimento celular de cianobactérias é significativamente mais lento, com menor produção de biomassa e justificam que o fator limitante neste caso, além da mudança na intensidade luminosa, é o fato de as cianobactérias usarem a luz azul com menos eficiência para a fotossíntese do que a maioria dos eucariontes fotoautotróficos.

Entretanto, há registros na literatura, em que foram verificadas tendências diferentes daquelas obtidas no atual trabalho. VELU; NARAYANASWAMY; BALAN (2015), ao estudarem a cepa de *Calothrix elenkinii*, obteve uma maior concentração celular para o cultivo sob luz vermelha, seguida das luzes azul e verde.

4.3.2 Avaliação do efeito da qualidade da luz para produção de ficocianina no cultivo de *Nostoc* sp. e *Anabaena variabilis*.

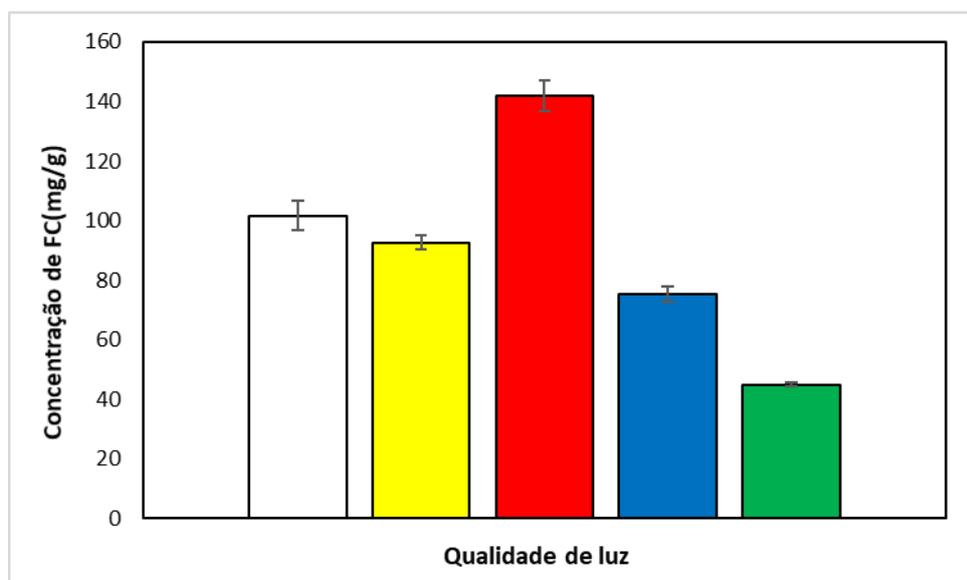
Os resultados para avaliação da produção de ficocianina pelo efeito da qualidade da luz, para o cultivo da *Nostoc* sp. em meio basal e, em seguida, de forma combinada com a suplementação ao meio de cultivo BG11₀ de 2 g.L⁻¹ de glicose e 5 mM de nitrato de sódio e volume inicial de inóculo de 10% v/v (0,4 g.L⁻¹) durante 14 dias estão apresentados nas Figuras 28 e 29, respectivamente.

Figura 28 - Concentração específica de FC por 14 dias, sob diferentes qualidades de luz, em meio basal BG11₀, para *Nostoc* sp. Luz branca (□), luz azul (■), luz vermelha (■), luz verde (■), luz amarela (■).



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

Figura 29 - Concentração específica de FC por 14 dias, sob diferentes qualidades de luz em meio basal BG11₀ com suplementação de 2 g.L⁻¹ de glicose e 5 mM de nitrato de sódio, para *Nostoc* sp. Luz branca (□), luz azul (■), luz vermelha (■), luz verde (■), luz amarela (■).



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

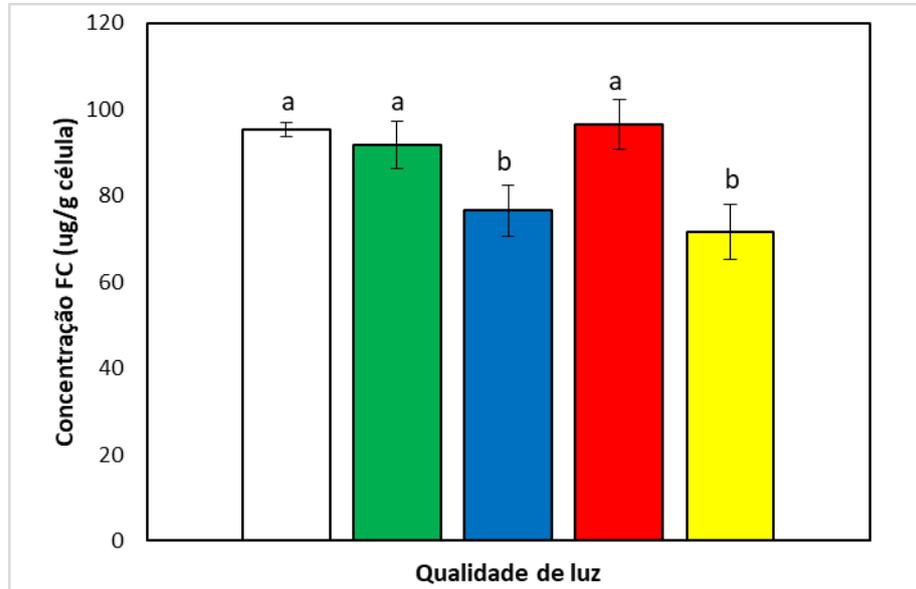
No cultivo da cepa de *Nostoc* sp., ao se variar as qualidades de luz em meio basal BG11₀ (Figura 28), o efeito para produção de ficocianina foi maior quando a cepa foi exposta às luzes vermelha e amarela, atingido uma concentração específica de 86,02 mg.g⁻¹ de FC para a luz vermelha, sem diferença significativa (teste de Tukey) para a luz amarela que produziu ao final dos 14 dias de cultivo 77,11 mg.g⁻¹ de FC, seguida pela luz branca, com uma concentração específica de 65,45 mg.g⁻¹ de FC. Ainda na Figura 28, a luz azul foi aquela que apresentou a menor concentração específica de FC (29,53 mg.g⁻¹), quase 3 vezes menor do que a melhor condição (Luz vermelha), seguida pela luz verde, que obteve uma concentração específica final de 47,69 mg.g⁻¹ de FC.

Quando foi adicionado ao meio de cultivo BG11₀ 2 g.L⁻¹ de glicose e 5 mM de nitrato de sódio sob diferentes qualidades de luz (Figura 29), a luz vermelha continuou exercendo o maior efeito positivo para a produção de ficocianina após os 14 dias, equivalente a 141,97 mg.g⁻¹, cerca 1,6 vezes maior para o cultivo na mesma condição de luz sem suplementação (Figura 28), seguida pela luz branca (101,73 mg.g⁻¹) e amarela (92,74 mg.g⁻¹). As luzes azul e verde continuaram com menor efeito para a produção específica de FC, atingindo uma concentração de final de 75,44 mg.g⁻¹ e 44,97 mg.g⁻¹, respectivamente.

Vale ressaltar que o efeito da qualidade de luz para o crescimento de biomassa de *Nostoc* sp. não seguiu a mesma tendência sobre a síntese de FC. A luz branca e verde foram as que mais favorecem o aumento da biomassa, enquanto as luzes vermelha e amarela promoveram o incremento na produção do pigmento.

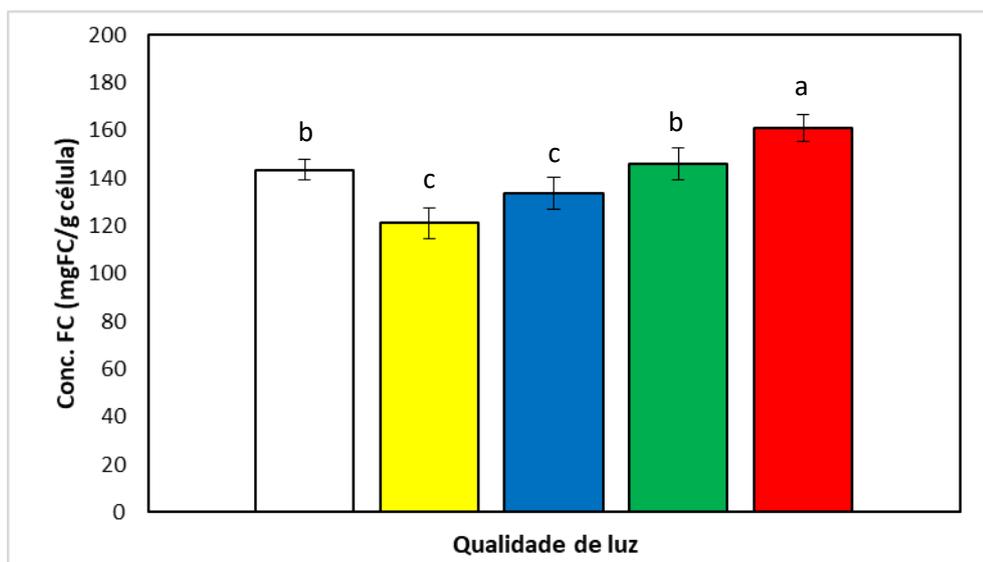
Os mesmos testes foram realizados para a cepa de *Anabaena variabilis* com o objetivo de analisar os efeitos da qualidade da luz de forma isolada e combinada com a suplementação ao meio de cultivo BG11₀ de 0,5 g.L⁻¹ de glicose e 2 mM de nitrato de sódio e volume inicial de inóculo de 10% v/v (0,4 g.L⁻¹), durante 14 dias, para produção de ficocianina, e os resultados são apresentados nas Figuras 30 e 31.

Figura 30 - Concentração específica de FC por 14 dias, sob diferentes qualidades de luz, em meio basal BG110, para *Anabaena variabilis*. Luz branca (□), luz azul (■), luz vermelha (■), luz verde (■), luz amarela (■).



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

Figura 31 - Concentração específica de FC por 14 dias, sob diferentes qualidades de luz em meio basal com suplementação de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose e 2 mM de nitrato de sódio para *Anabaena variabilis*. Luz branca (□), luz azul (■), luz vermelha (■), luz verde (■), luz amarela (■).



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

As maiores concentrações específicas de FC para a cepa de *Anabaena variabilis*, ao se variar as cores de luz em seu cultivo (Figura 30), foram obtidas para as luzes vermelha, branca e verde (96,52 mg.g⁻¹, 95,42 mg.g⁻¹ e 91,80 mg.g⁻¹, respectivamente). Ainda que a diferença na produção de FC ao se utilizar diferentes cores de luz para o cultivo da cepa não tenha sido tão expressivo quanto para a cepa de *Nostoc* sp., nota-se sua capacidade de adaptação em diferentes cores de luz ao utilizar fontes de energia em diferentes comprimentos de onda.

O efeito da suplementação do meio de cultivo com 0,5 g.L⁻¹ de glicose e 2 mM de nitrato de sódio, juntamente com o efeito das cores de luz (Figura 31), apresentou resultados positivos para a produção de FC, e assim como foi verificado no ensaio com *Nostoc* sp. (Figura 29), a máxima concentração de FC foi obtida para a luz vermelha (161,06 mg.g⁻¹), 1,67 maior para o cultivo na mesma condição de luz sem suplementação (Figura 30), seguida pelas luzes branca (143,51 mg.g⁻¹) e verde (146,11 mg.g⁻¹).

As duas cepas estudadas foram capazes de adaptarem seu fotossistema para a produção de FC quando aplicadas a diferentes qualidades de luz em seus cultivos, provando que a FC é diretamente relacionada e influenciada pela composição da luz fornecida à cultura.

Neste trabalho, as maiores concentrações de FC foram obtidas para o meio basal, para os testes sob as luzes vermelho e amarelo para *Nostoc* sp, e vermelho, verde e branco, para *Anabaena variabilis*. Ao suplementar o meio com fonte de carbono e nitrogênio, para ambas as cepas, a luz vermelha foi a única que produziu teores do pigmento maiores em relação à luz branca. De acordo com PAGELS et al. (2019), é esperado que a cor vermelha favoreça a síntese da FC, pois corresponde ao comprimento de onda de maior absorção da luz.

Observa-se que, de fato, a qualidade da luz influencia a adaptação das cianobactérias a produção de FC e que este efeito pode encontrar diferenças entre as espécies, uma vez que teores de FC abaixo daqueles encontrados no ensaio sob a luz branca foram obtidos para a luz verde e azul, para *Nostoc* sp. e azul e amarelo, para *A. variabilis*, independente da composição do meio testada.

Ou seja, mesmo que seja esperado que a síntese da FBP aumente sob a incidência de luz, cujo comprimento de onda seja aquele que apresentar maior absorção, diferenças foram observadas neste estudo, assim como em trabalhos encontrados na literatura. Portanto, a adaptação para diferentes qualidades de luz não é horizontal e varia de acordo com a espécie.

LEE et al. (2017) observaram que, uma maior concentração de FC é produzida sob luz vermelha no cultivo da cepa de *Nostoc* sp. NK. Isso pode ser facilmente explicado pela necessidade de as cianobactérias absorverem uma faixa específica de luz, de modo a garantir a

eficiência fotossintética. O mesmo efeito foi observado no cultivo de duas cepas de *Pseudanabaena* por KHAN et al. (2019). OJIT et al. (2015), ao investigarem a produção de ficobiliproteínas por *Anabaena circinalis*, encontraram uma maior concentração de FC para a luz branca.

KAUSHAL et al. (2017), determinaram uma maior produção de FC para a cepa de *Nodularia sphaerocarpa* PUPCCC 420.1 para a luz verde, e ainda, há relatos que, sob luz azul, algumas espécies de *Anabaena* aumentaram sua produção total de FC (KHATTAR et al., 2015; TASNEEM FATMA, 2009). Esse efeito inesperado na produção de FC pode ser associado aos fotorreceptores nas faixas de azul e violeta, unidades semelhantes ao criptocromo, que podem ativar a via biosintética de algumas FBP (KUMAR et al., 2018).

4.4 Avaliação do efeito da adição de NaCl ao sistema SAB do tipo PEG-Sal para recuperação das FBPs

O efeito de “*salting-out*” foi avaliado de forma isolada nesta etapa para o SAB do tipo PEG-sal, ao se variar a concentração de NaCl adicionado ao sistema, PEG 1500/fosfato de potássio. A presença de 0% (m/m), 6% (m/m), 8% (m/m) e 10% (m/m) de NaCl foi investigada na recuperação de FC dos extratos obtidos das cepas de *Nostoc* sp. e *Anabaena variabilis*, e os resultados são apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Efeito da concentração de NaCl no sistema SAB (PEG 1500 – fosfato de potássio) para recuperação de FC do extrato de *Nostoc* sp.

NaCl (%)	K-FC ¹	P-FC ²	R FC (%) ³	Vr ⁴	pH
0	6,26	1,04 ± 0,05	76,49 ± 0,17	0,52	7,17 ± 0,04
6	9,46	1,13 ± 0,02	84,50 ± 0,6	0,58	
8	6,24	0,963 ± 0,09	78,02 ± 0,4	0,57	
10	2,52	0,913 ± 0,04	56,9 ± 0,62	0,49	

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

Tabela 5 - Efeito da concentração de NaCl no sistema SAB (PEG 1500 – fosfato de potássio) para recuperação de FC do extrato de *Anabaena variabilis*.

NaCl (%)	K-FC ¹	P-FC ²	R FC(%) ³	Vr ⁴	pH
0	5,27	1,16 ± 0,04	73,32 ± 0,87	0,52	7,17 ± 0,04
6	8,44	1,27 ± 0,01	81,80 ± 0,89	0,53	
8	9,80	1,23 ± 0,09	83,35 ± 0,64	0,51	
10	8,25	1,19 ± 0,01	78,59 ± 0,03	0,44	

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

A partir da Tabela 4, referente à recuperação de FC do extrato bruto de *Nostoc* sp., foi possível notar o efeito positivo na partição da FC quando 6% de NaCl (1 M) como um sal secundário foi adicionado ao sistema. Para esse ponto, foram obtidos para a FC uma pureza (P) de 1,13, recuperação (R) de 84,5% e coeficiente de partição (K) 9,46, o que representam aumentos de cerca de 9%, 10% e 50%, respectivamente para o sistema sem a adição do NaCl. Entretanto, efeito contrário foi observado para a adição de 8 e 10% de NaCl, de modo que com o aumento da concentração do sal a partição da proteína foi desfavorecida, com queda nos valores de todos os parâmetros analisados, mostrando que existe um limite e seu ponto ótimo é 6% (1 M).

Ao se adicionar NaCl ao sistema aquoso bifásico para a recuperação de FC da cepa de *Anabena variabilis* (Tabela 5), foi observado aumento em todos os parâmetros para as concentrações de 6 e 8%, sem diferenças significativas entre eles, exceto para o coeficiente de partição que aumentou de 8,44 para 9,80, com a adição de 8% de NaCl. Ao se comparar este ponto com o sistema sem adição de NaCl, foi possível notar aumento na recuperação (R) de 73,82% para 83,35% no coeficiente de partição (K) de 5,27 para 9,80 e na pureza (P) de 1,16 para 1,23. Entretanto, com o aumento da concentração de NaCl (10%), o comportamento para a partição da FC foi negativo, com queda nos valores de todos os parâmetros analisados.

Segundo GOJA et al. (2013), há uma condição ótima de concentração de sais neutros (neste caso o NaCl) que favorece a partição, visto que acima desta concentração pode ocorrer desnaturação das proteínas que se deseja recuperar.

Este resultado corrobora com a descrição sobre a influência da adição de sais neutros, como o NaCl, ao sistema bifásico aquoso, que favorece a partição por gerar uma diferença de potencial elétrico entre as duas fases, o que promove o aumento da diferença de hidrofobicidade (BARBOSA et al., 2011; GOJA et al., 2013; MONTALVO-HERNÁNDEZ;

RITO-PALOMARES; BENAVIDES, 2012). E o efeito “*salting-out*” está diretamente relacionado com a dependência da hidrofobicidade para a partição da proteína no SAB. Portanto, o efeito “*salting-out*” promove a migração da proteína da fase rica em sal (fase fundo) para a fase rica em polímero (fase topo) (Figura 32) (ASENJO; ANDREWS, 2011; IQBAL et al., 2016; SCHIMIDT; VENTOM; ASENJO, 1994).

Além disso, ocorre um aumento na força iônica e, conseqüentemente, um aumento da migração de compostos de baixo peso molecular para a fase polimérica, principalmente, se o tamanho do PEG for inferior a 4000, como é o caso deste trabalho.

Figura 32 - Partição da FC para a fase topo rica em PEG.



Fonte: O autor.

Algumas publicações mostraram claramente que proteínas hidrofóbicas podem ser separadas de seus contaminantes de uma forma eficiente em SABs do tipo PEG-sal com a adição do NaCl em concentrações acima de 1 M. ASENJO; ANDREWS (2011), em estudos com SABs do tipo PEG/sal, encontraram um efeito positivo para a partição de proteínas ao adicionarem 8,8% de NaCl ao sistema, e observaram que a fase rica em PEG tornou-se mais negativa com a adição deste sal neutro e como consequência, atraiu as proteínas carregadas positivamente.

A partição de proteínas modificadas derivadas de β -lactoglobulina e BSA foi avaliada por FRANCO; ANDREWS; ASENJO (1996b), que utilizaram PEG-1500/fosfato de potássio, e a melhor condição de partição foi obtida na presença de 6% de NaCl no SAB. CASCONE; ANDREWS; ASENJO (1991), verificaram ao adicionarem NaCl ao sistema PEG/sal um aumento no coeficiente de partição para a proteína taumatina aumentando sua afinidade com a

fase rica em PEG. O mesmo resultado foi reportado por SCHIMIDT; VENTOM; ASENJO, (1994), sendo este efeito de forma mais expressiva, ao utilizarem uma proteína ainda mais hidrofóbica, a α -amilase.

4.5 Avaliação do processo de recuperação por SAB do tipo Copolímero-Sal para recuperação das FBPs

Os sistemas aquosos bifásicos avaliados neste estudo para a recuperação de FC das cianobactérias *Nostoc* sp. e *Anabaena variabilis* utilizaram os copolímeros tribloco L62, L64 e F68, 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, dispostos no Apêndice A (Figuras A.6 e A.7).

A partir dos diagramas de fase obtidos, verifica-se que a formação dos sistemas bifásicos para os três copolímeros é facilitada para o sal fosfato de potássio, visto que uma menor quantidade do sal e dos copolímeros é necessária para a formação do sistema de duas fases, em relação ao sal citrato de sódio.

Com base nos diagramas de fases, duas composições globais do SAB para os três copolímeros (L62, L64 e F68) e os dois sais (fosfato de potássio e citrato de sódio), foram usadas para avaliar o potencial de recuperação da FC pelo sistema composto por copolímeros em bloco) (Tabela 3, item 3.2.5.3.2).

A primeira composição global (1ª proporção) do SAB foi de 25% copolímero/8% sal e os resultados encontrados para este teste com os extratos obtidos das cepas de *Anabaena variabilis* e *Nostoc* sp. são apresentados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6- Resultados obtidos para a 1ª Proporção de SAB no extrato obtido da cepa de *Anabaena variabilis* (25% copolímero e 8% sal).

Copolímero	Sal	K-FC ¹	P-FC ²	R FC(%) ³	Vr ⁴	pH
F68	Fosfato de Potássio	0,21	0,82 ± 0,02	63,86	2,74	7,17 ± 0,04
	Citrato de Sódio	0,15	0,79 ± 0,01	69,65	2,87	8,31 ± 0,04
L64	Fosfato de Potássio	0,11	1,02 ± 0,01	84,30	1,66	7,17 ± 0,04

	Citrato de Sódio	0,22	0,95 ± 0,04	72,95	1,69	8,31 ± 0,04
L62	Fosfato de Potássio	0,34	1,02 ± 0,08	69,75	1,27	7,17 ± 0,04
	Citrato de Sódio	0,43	0,91 ± 0,001	62,27	1,4	8,31 ± 0,04

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

Tabela 7 - Resultados obtidos para a 1ª Proporção de SAB no extrato obtido da cepa de *Nostoc* sp. (25% copolímero e 8% sal).

Copolímero	Sal	K-FC ¹	P-FC ²	R FC(%) ³	Vr ⁴	pH
F68	Fosfato de Potássio	0,21	0,87 ± 0,02	62,61	2,80	7,17 ± 0,04
	Citrato de Sódio	0,15	0,79 ± 0,01	69,08	2,87	8,31 ± 0,04
L64	Fosfato de Potássio	0,09	1,16 ± 0,05	86,76	1,61	7,17 ± 0,04
	Citrato de Sódio	0,22	0,73 ± 0,07	73,11	1,68	8,31 ± 0,04
L62	Fosfato de Potássio	0,21	0,92 ± 0,04	78,01	1,30	7,17 ± 0,04
	Citrato de Sódio	0,2	0,90 ± 0,04	77,25	1,50	8,31 ± 0,04

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

De acordo com as Tabelas 6 e 7, os coeficientes de partição calculados para todos os ensaios foram menores do que 1 indicando, para esta proporção de SAB, a partição preferencial da FC pela fase fundo, ou seja, a fase rica em sal (Figura 33).

Figura 33 - Partição da FC para fase fundo rica em sal, para proporção 25% copolímero/8% sal.



Fonte: O autor.

Pelo fato da proteína, neste caso, particionar preferencialmente para a fase fundo rica em sal, Equação 9, utilizada para partição preferencial para a fase topo rica em copolímero, foi modificada e resultou na Equação 10 utilizada aqui para o cálculo da recuperação (BASKARAN et al., 2018).

$$R(\%) = \frac{100}{1 + (K_p \cdot V_r)} \quad (10)$$

A partir dos resultados apresentados nas Tabelas 6 e 7, foi possível observar em todos os ensaios o efeito superior do sal fosfato de potássio sobre o citrato de sódio para a partição da FC, apresentando valores superiores para pureza (P) e recuperação (R), em ambos os extratos avaliados.

Com relação à variação do copolímero empregado, nota-se que para a partição da FC do extrato obtido da cepa de *Anabaena variabilis* (Tabela 6) o SAB formado pelo copolímero L64+fosfato de potássio foi aquele que apresentou melhor resultado para recuperação (R), equivalente a 83,40%, e menor coeficiente de partição (0,11). Em relação à pureza (P), foram encontrados os mesmos valores para o SAB formado pelo copolímero L62+fosfato de potássio, equivalente a 1,02. Nesta 1ª proporção, os menores valores para partição (P) e recuperação (R), foram determinados para o sistema formado pelo copolímero F68, o que apresenta maior peso molecular dentre os três copolímeros, com 80% de sua composição sendo de PEO (poli (óxido de etileno)). L64 é o intermediário em peso (40% da molécula composta por PEO), seguido pelo L62, o mais leve, com uma porcentagem de 20% de PEO em sua molécula.

Efeito semelhante foi observado na partição da FC para o extrato obtido da cepa de *Nostoc* sp. (Tabela 7), sendo que o copolímero L64+fosfato de potássio apresentou melhores resultados para pureza (P) e recuperação (R), equivalente a 1,16 e 86,76%, respectivamente, e um menor coeficiente de partição (0,09), seguido pelos sistemas L62+fosfato de potássio com pureza (P) de 0,92 e recuperação (R) de 78% e F68+fosfato de potássio, com pureza (P) de 0,87 e recuperação (R) de 62%.

Com relação a este sistema, em que a FC foi recuperada na fase fundo (sal), vale destacar que, mesmo assim é possível estabelecer um processo de etapas de purificação seguintes. WANG et al. (2016) propõe a recuperação do polissacarídeo *lycium barbarum*

(PLB) da fase fundo por diálise, e subsequente recuperação do copolímero da fase topo por termosseparação.

Após análise dos resultados obtidos para a primeira proporção de SAB (25% copolímero/8% sal), de modo a obter um sistema que permita a partição da FC para a fase topo e, neste caso, a recuperação tanto do copolímero e do pigmento se faz por simples etapas de centrifugação e termosseparação, dispensando a diálise, foi estabelecida uma segunda proporção para todos os sistemas, sendo 15% copolímero/ 15% sal. Para esta 2ª proporção, os testes foram realizados apenas com sal fosfato de potássio e os resultados de recuperação por SAB a partir dos extratos obtidos das cepas de *Anabaena variabilis* e *Nostoc* sp. estão expostos nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.

Tabela 8 - Resultados obtidos para a 2ª Proporção de SAB no extrato obtido da cepa de *Anabaena variabilis* (15% copolímero e 15% sal).

Copolímero	K-FC¹	P-FC²	R FC (%)³	Vr⁴	pH
F68	8,80 ± 0,18	0,96 ± 0,01	86,83 ± 0,25	0,75	7,17 ± 0,04
L64	6,72 ± 0,3	0,88 ± 0,02	80,75 ± 0,7	0,63	7,17 ± 0,04
L62	6,04 ± 0,2	0,87 ± 0,01	78,35 ± 0,55	0,60	7,17 ± 0,04

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

Tabela 9 - Resultados obtidos para a 2ª Proporção de SAB no extrato obtido da cepa de *Nostoc* sp. (15% copolímero e 15% sal).

Copolímero	K-FC¹	P-FC²	R FC (%)³	Vr⁴	pH
F68	8,52 ± 0,33	0,94 ± 0,01	86,46 ± 0,4	0,75	7,17 ± 0,04
L64	7,62 ± 0,18	0,85 ± 0,02	82,85 ± 0,5	0,63	7,17 ± 0,04
L62	6,39 ± 0,16	0,87 ± 0,01	78,61 ± 0,4	0,58	7,17 ± 0,04

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

De acordo com as Tabelas 8 e 9, os coeficientes de partição encontrados para todos os ensaios foram maiores do que 1, diferente daqueles encontrados para a 1ª proporção de SAB, indicando a partição preferencial da FC pela fase topo, ou seja, a fase rica em copolímero (Figura 34).

Figura 34 - Partição da FC para fase topo rica em copolímero, para proporção 15% copolímero/15% sal.



Fonte: O autor.

Para a partição da FC no extrato de *Anabaena variabilis* na 2ª proporção testada (Tabela 8), o efeito do copolímero foi melhor quanto maior a proporção de PEO na molécula, ou seja, o F68 apresentou melhores resultados para coeficiente de partição (K), pureza (P) e recuperação (R), equivalentes a 8,80, 0,96 e 86,83%, respectivamente. É possível notar ainda que, quanto maior foi o valor da razão de volume do sistema (V_r) melhores foram os resultados de partição, tendência diferente daquela da 1ª proporção.

Resultados semelhantes foram encontrados para a partição da FC no extrato de *Nostoc* sp. (Tabela 9), sendo que o SAB formado pelo copolímero F68 apresentou melhores resultados para coeficiente de partição (K), pureza (P) e recuperação (R), equivalentes a 8,52, 0,94 e 86,46%, respectivamente. O efeito da proporção de PEO (80% > 40% > 20%) na molécula também foi observado, à medida que esta foi diminuindo, as respostas de recuperação (pureza (P), recuperação (R), e coeficiente de partição (K)), diminuíram assim como a razão de volume (V_r).

Pela análise dos resultados encontrados no estudo do sistema aquoso bifásico formado por copolímero/sal, fica evidente que os principais efeitos na partição da FC são o “volume livre” e o efeito da hidrofobicidade. Em termos gerais, o efeito de “volume livre” está relacionado com o tamanho da molécula a ser particionada no sistema, uma vez que ela apresente um tamanho definido (peso molecular e diâmetro hidrodinâmico), assim como sua geometria (conformação tridimensional), ela está sujeita aos efeitos estéricos impostos pelos constituintes do sistema. Esses efeitos estéricos estão normalmente relacionados ao volume

livre de água disponível para o soluto a ser fracionado para uma fase em específico (ASENJO; ANDREWS, 2011; RABELO; TAMBOURGI; PESSOA, 2004). Esse comportamento foi observado para a 1ª proporção testada (25% copolímero/8% sal), sendo que a alta concentração do copolímero promoveu uma diminuição do volume livre na fase topo, e ainda que existisse uma afinidade entre a FC e o copolímero pelo efeito da hidrofobicidade, este não foi suficiente para promover a partição em direção a esta fase, e a partícula particionou para a fase fundo, por apresentar um maior volume livre.

Para a 2ª proporção testada (15% copolímero/ 15% sal), foi observado o efeito contrário, com a hidrofobicidade exercendo seu maior efeito, uma vez que esta proporção possibilitou um volume livre suficiente para que a FC fosse atraída para a fase topo, sob o principal efeito de hidrofobicidade. Esse efeito já foi discutido anteriormente neste trabalho, e assim como no sistema PEG-sal, o sistema copolímero-sal apresenta a fase topo rica em copolímero, menos hidrofílica do que a fase fundo rica em sal, assim, a FC, por apresentar características hidrofóbicas é atraída pela fase rica em copolímero (fase topo).

HARAGUCHI et al. (2004), estudaram o efeito dos mesmos copolímeros utilizados neste trabalho, e apresentaram diagramas de fases para os sistemas formados por copolímero/fosfato de potássio para a partição da insulina. Nesse trabalho, os autores relatam o efeito direto da hidrofobicidade (ao variar o peso molecular do copolímero), da temperatura e do pH para a partição da proteína, e encontraram o sistema composto pelo copolímero F68 (mais hidrofóbico) como aquele que apresentou melhor resultado para a partição da insulina. Segundo eles, ainda que a hidrofobicidade exerça grande influência sobre a partição da proteína, ela não pode ser tomada como único fator responsável, assim estudos mais aprofundados sobre o efeito da natureza e comportamento dos constituintes estruturais do copolímero na fase topo devem ser aprofundados.

DE OLIVEIRA; DE ABREU FILHO; PESSÔA FILHO (2007), determinaram diagramas de fase a 4 °C e 25 °C para os copolímeros F38 e F68, ao estudarem a partição de diferentes proteínas bovinas por SAB formados pelos copolímeros F38 ou F68 e carbamato de amônio. Observaram que a partição da proteína é diretamente dependente de aspectos que estão relacionados com as características específicas de cada proteína e do sistema utilizado. Por exemplo, as proteínas BSA e β -lactoglobulina particionaram preferencialmente para a fase fundo rica em sal, enquanto a lisozima e a α -lactalbumina concentraram-se na fase topo rica em copolímero. Observaram para a proteína γ -albumina partição preferencial para a fase fundo rica em sal em sistemas contendo F38, e para a fase topo rica em copolímero em

sistemas contendo F68. Concluíram que em geral, sistemas formados por F38 e carbamato de amônio podem ser uma boa alternativa em processos “*dowstream*” para proteínas.

4.6 Avaliação do processo de recuperação do copolímero por Termosseparação

A recuperação do copolímero foi avaliada nesta etapa, para soluções com concentração de 10% (m/m) do copolímero. Para determinar a temperatura a ser usada na termosseparação, foi necessária a determinação das temperaturas de “*cloud point*”, cujos valores e as porcentagens de recuperações para os três copolímeros, são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Temperaturas de “*cloud point*” e recuperação para os copolímeros F68, L64 e L62.

Copolímero	% de PEO	" <i>Cloud point</i> " (°C)	% de copolímero recuperado
F68	80	Sem separação	Sem separação
L64	40	67	96,54 ± 4,40
L62	20	52	94,50 ± 2,26

Em relação às temperaturas de “*cloud point*”, a partir da Tabela 10, nota-se que quanto maior a porcentagem de PEO na molécula, maior é a temperatura necessária para a termosseparação.

Para a etapa de termosseparação, as temperaturas utilizadas foram 20 °C acima da temperatura de “*cloud point*”, equivalentes a 87 °C para a solução de L64 e 72 °C para a solução de L62. Devido à limitação da temperatura máxima do banho termostático (80 °C), a termosseparação para o L64 foi realizada em béquer aquecido em Bico de Bunsen.

Foi possível a obtenção dos “*cloud points*” para os copolímeros L64 e L62, utilizando o banho termostático, uma vez que este suporta temperatura máxima de 80 °C. Comportamento diferente foi verificado para o copolímero F68, o qual devido a limitação do banho termostático, não foi possível realizar a termosseparação e nem a determinação do “*cloud point*”, uma vez que essa temperatura é acima de 80 °C.

A respeito da recuperação, para os copolímeros L62 e L64 foram obtidos valores similares de 94,50% ± 2,26 e 96,54% ± 4,40, respectivamente.

PATEL et al. (2004), estudaram a cinética de desnaturação da ficocianina isolada de *Spirulina platensis* em diferentes faixas de pH, e observaram que a proteína perde sua estabilidade a partir de 65 °C para pH 7. Portanto a termosseparação nas temperaturas de

“*cloud point*” encontradas neste trabalho são desfavoráveis para a estabilidade da ficocianina, e assim a necessidade pela busca de estratégias para diminuição dessa temperatura. Uma dessas estratégias é a adição de Na_2SO_4 ao sistema (JOHANSSON; KARLSTRÖM; TJERNELD, 1997). PERSSON et al. (2000), no estudo de polímeros termosensíveis para a formação de SAB, observaram que ao adicionarem 330 mM de Na_2SO_4 às soluções de 2 % de copolímero houve uma diminuição das temperaturas de “*cloud point*” de 65 °C para 21 °C, a qual representa uma temperatura aceitável para a estabilidade da maioria das biomoléculas. Em seus estudos encontraram uma grande dependência da concentração do copolímero com a temperatura de “*cloud point*”, que aumenta à medida que se usa concentrações mais elevadas. JOHANSSON; KARLSTROEM; TJERNELD (1993), entretanto notaram que, para alguns copolímeros randômicos, a dependência da concentração de copolímero não é tão significativa no intervalo de 2 a 30 % (m/m), o que indica que esta dependência está relacionada também ao tipo de copolímero.

5 CONCLUSÕES E ETAPAS FUTURAS

5.1 Conclusões

A partir dos resultados obtidos conclui-se que:

➤ Cultivo (Suplementação ao meio de cultivo basal):

- As condições de suplementação necessárias para se alcançar uma maior concentração celular e produção de FBP, são específicas para cada cepa de cianobactéria.
- A variação da razão de inóculo de 10 para 20 % não apresentou diferença significativa para o acúmulo de biomassa e produção de FC.
- A condição de suplementação combinada de 2 g.L⁻¹ de glicose e 5 mM de nitrato de sódio ao meio de cultivo basal BG11₀, foi aquela que apresentou melhor resultado para o cultivo da cepa de *Nostoc* sp, atingindo uma concentração celular de 0,44 g.L⁻¹ para 10% (v/v) de inóculo e 0,53 g.L⁻¹ para 20% (v/v) de inóculo, e uma concentração de FC específica de 123,17 mg.g⁻¹ para 10% (v/v) de inóculo e 133,03 mg.g⁻¹ para 20% (v/v) de inóculo, em 14 dias de cultivo.

➤ Cultivo (Luz):

- Para a cepa de *Nostoc* sp. tanto para o meio basal como para o meio com suplementação, o crescimento celular foi favorecido sob as condições de luz branca. Para a produção de FC, no ensaio sem suplementação, as luzes vermelha e amarela apresentaram melhor resultado (86,02 mg.g⁻¹), e para o ensaio com suplementação, a luz vermelha apresentou melhor resultado (141,97 mg.g⁻¹) para produção de FC.
- A condição de luz branca apresentou melhor resposta também no crescimento celular após 14 dias de cultivo para a cepa de *Anabaena variabilis*, tanto para o meio BG11₀ quanto para a condição de suplementação, equivalente a 0,24 g.L⁻¹ e 0,43 g.L⁻¹, respectivamente. Em relação à produção de FC, no ensaio sem suplementação, as melhores respostas foram para as luzes vermelha, branca e verde (96,52 mg.g⁻¹, 95,42 mg.g⁻¹ e 91,80 mg.g⁻¹, respectivamente). Para o ensaio com suplementação, a luz vermelha apresentou melhor resultado (161,06mg.g⁻¹) para produção de FC.

➤ SAB (Efeito da adição de NaCl ao sistema SAB do tipo PEG-Sal):

- Para a partição da FC do extrato de *Nostoc* sp., o melhor resultado obtido foi na concentração de 6% de NaCl (1 M), atingindo pureza (P) de 1,13, recuperação (R) de 84,5% e coeficiente de partição (K) 9,46.

- Para a partição da FC do extrato de *Anabaena variabilis*, o melhor resultado foi obtido para a adição do NaCl nas concentrações de 6 e 8%, sem diferenças significativas, equivalentes a pureza (P) de 1,16, recuperação (R) de 83,35% e coeficiente de partição (K) de 9,80.

➤ SAB (Sistema Copolímero-sal):

- Para a partição da FC do extrato de *Nostoc* sp., nas condições do primeiro ensaio (25% copolímero / 8% sal), houve partição da FC para a fase fundo. O melhor SAB foi aquele formado pelo copolímero L64 + fosfato de potássio, ao apresentar uma recuperação (R), de 83,40%, e menor coeficiente de partição de 0,11. Nas condições do segundo ensaio (15% copolímero / 15% sal, com a partição da FC para a fase topo, o melhor SAB foi aquele formado pelo copolímero F68 + fosfato de potássio, apresentando pureza (P) de 0,94, recuperação (R) de 86,46%.

- Para a partição da FC do extrato de *Anabaena variabilis*, nas condições do primeiro ensaio, houve partição da FC para a fase fundo, o melhor SAB foi também aquele formado pelo copolímero L64 + fosfato de potássio, ao apresentar uma recuperação (R), equivalente a 86,76%, pureza (P) de 1,16 coeficiente de partição equivalente a 0,09. Nas condições do segundo ensaio, com a partição da FC para a fase topo, o melhor SAB foi aquele formado pelo copolímero F68 + fosfato de potássio, apresentando pureza (P) de 0,96 e recuperação (R) de 86,83%.

➤ Recuperação do Copolímero (Termosseparação):

- Foi possível apenas a recuperação dos copolímeros L62 e L64 por termosseparação, equivalentes a $94,50\% \pm 2,26$ e $96,54\% \pm 4,40$, respectivamente. Não foi possível a recuperação do copolímero F68 por termosseparação, pela limitação de temperatura máxima do ensaio experimental.

5.2 Sugestões para trabalhos futuros

➤ Cultivo:

- Avaliar o efeito do fotoperíodo.
- Investigar outras fontes de carbono, incluindo aqueles provenientes de sub-produtos ou resíduos agroindustriais.
- Realizar ensaios avaliando a cinética por vários dias, acompanhando consumo de glicose, nitrato, crescimento celular, pH e produção de FC.

➤ Recuperação de Ficocianina

- Analisar o efeito da concentração de células na etapa de extração.
- Avaliar o efeito do NaCl ao sistema SAB com copolímero e sal.
- Para o sistema PEG-sal como etapa subsequente testar o método de ultrafiltração.
- Extrações múltiplas para o sistema PEG-sal.
- Na etapa de recuperação do copolímero, testar a adição Na_2SO_4 , com o objetivo de alcançar menores temperaturas de “*cloud point*” e testar a termosseparação para todos os copolímeros.
- Avaliar o número máxima de reutilização dos copolímeros.

6 REFERÊNCIAS

ABALDE, J. et al. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. **Plant Science**, v. 136, n. 1, p. 109–120, 1998. doi:10.1016/S0168-9452(98)00113-7.

ABD EL-BAKY, H. H.; EL-BAROTY, G. S. Characterization and bioactivity of phycocyanin isolated from *Spirulina maxima* grown under salt stress. **Food and Function**, v. 3, n. 4, p. 381–388, 2012. <https://doi.org/10.1039/C2FO10194G>.

AGUILAR, O.; MARCO, R.-P. Processing of soybean (*Glycine max*) extracts in aqueous two-phase systems as a first step for the potential recovery of recombinant proteins. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology**, v. 83, n. 3, p. 286–293, 2008. <https://doi.org/10.1002/jctb.1805>.

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>.

ALBERTSSON, P. A. Partition of cell particles and macromolecules. **Analytical Biochemistry**, v. 161, n. 1, p. 227, 1987. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300368220>

ALBERTSSON, P.-A. **Partition of cell particles and macromolecules in polymer two-phase system**, v. 24, n. 1, p. 309-341, 1960. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60244-2](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60244-2).

ALEXANDRIDIS, P.; ALAN HATTON, T. Poly(ethylene oxide)poly(propylene oxide)poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 96, n. 1–2, p. 1–46, 1995. [https://doi.org/10.1016/0927-7757\(94\)03028-X](https://doi.org/10.1016/0927-7757(94)03028-X).

AMID, M. et al. A novel aqueous two phase system composed of a thermo-separating polymer and an organic solvent for purification of thermo-acidic amylase enzyme from red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) peel. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6635-6650, 2014. <https://doi.org/10.3390/molecules19056635>.

ANDERSON, L. K. et al. Regulation of *Nostoc* sp. phycobilisome structure by light and temperature. **Journal of Bacteriology**, v. 155, n. 3, p. 1407–1416, 1983. DOI:0021-9193/83/091407-10\$02.00/0.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. **Aquaculture**, v. 264, n. 1–4, p. 130–134, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.021>.

ARIAS, D. M. et al. Cultivation and selection of cyanobacteria in a closed photobioreactor

used for secondary effluent and digestate treatment. **Science of the Total Environment**, v. 587–588, p. 157–167, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.097>.

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 49, p. 8826–8835, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.051>.

AZEVEDO, A. M. et al. Partitioning of human antibodies in polyethylene glycol-sodium citrate aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 65, n. 1, p. 14–21, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.12.010>.

BARBOSA, A. A. et al. 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 and Engineering Data**, v. 61, n. 1, p. 3–11, 2016. <https://doi.org/10.1021/je5008586>.

BARBOSA, J. M. P. et al. Purification of lipase produced by a new source of Bacillus in submerged fermentation using an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 32, p. 3853–3858, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.10.035>.

BASKARAN, D. et al. 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>.

BECKER, W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. London: Blackwell Science, 2004. p.312-351. DOI:10.1002/9780470995280.

BEKASOVA, O. D.; MUSLIMOV, I. A.; KRASNOVSKIĀ, A. A. Fractionation of phycobilisomes from the blue-green alga Nostoc muscorum. **Molekuliarnaia biologii**, v. 18, n. 1, p. 262–271, 1984. PMID: 6423967.

BENAVIDES, J.; RITO-PALOMARES, M. Potential aqueous two-phase processes for the primary recovery of colored protein from microbial origin. **Engineering in Life Sciences**, v. 5, n. 3, p. 259–266, 2005. <https://doi.org/10.1002/elsc.200420073>.

BENEDETTI, S. et al. Purification and characterization of phycocyanin from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 833, n. 1, p. 12–18, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.10.010>.

BENNETT, A.; BOGARD, L. Complementary chromatic adaption in a filamentous blue-green alga. **The Journal of Cell Biology**, v. 58, p. 419–435, 1973. DOI: 10.1083/jcb.58.2.419.

BINDER, A.; WILSON, K.; ZUBER, H. Volume 20, number 1 FEBS LETTERS January 1972. **FEBS Letters**, v. 20, n. 1, p. 5–10, 1972.

CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, R. M. Liquid-liquid extraction of biomolecules using

aqueous two-phase systems. **Recovery process for biological materials**, p. 273–201, 1993.

CASCONE, O.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. Partitioning and purification of thaumatin in aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, n. 8, p. 629–635, 1991. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(91\)90076-M](https://doi.org/10.1016/0141-0229(91)90076-M).

CHENTIR, I. et al. Stability, bio-functionality and bio-activity of crude phycocyanin from a two-phase cultured Saharian *Arthrospira* sp. strain. **Algal Research**, v. 35, n. May, p. 395–406, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.09.013>.

CHITTORA, D. et al. Cyanobacteria as a source of biofertilizers for sustainable agriculture. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 22, n. November 2019, p. 100737, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100737>.

CHU, B. Structure and Dynamics of Block Copolymer Colloids. **Langmuir**, v. 11, n. 2, p. 414–421, 1995. <https://doi.org/10.1021/la00002a009>.

COTTAS, A. G. **Avaliação do processo de produção de ficobiliproteínas de cianobactérias e purificação por sistema aquosos bifásicos**. Tese de Mestrado, Engenharia Química Universidade Federal de Uberlândia – UFU, 2019.

COTTAS, A. G. et al. Influence of Medium Composition on the Production of Phycocyanin from *Anabaena variabilis*. **Industrial Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 45–49, 2020. <https://doi.org/10.1089/ind.2019.29196.agc>.

DA SILVA FIGUEIRA, F.; MORAES, C. C.; KALIL, S. J. C-phycocyanin purification: Multiple processes for different applications. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 3, p. 1117–1128, 2018. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20180353s20170160>.

DA SILVA, M. D. C. H. et al. Sistema aquoso bifásico: Uma alternativa eficiente para extração de íons. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1332–1339, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600031>.

DE OLIVEIRA, M. C.; DE ABREU FILHO, M. A. N.; PESSÔA FILHO, P. DE A. Phase equilibrium and protein partitioning in aqueous two-phase systems containing ammonium carbamate and block copolymers PEO-PPO-PEO. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, n. 3, p. 311–318, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.05.010>.

DUCRET, Axel et al. Isolation, characterization and electron microscopy analysis of a hemidiscoidal phycobilisome type from the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. **European journal of biochemistry**, v. 236, n. 3, p. 1010-1024, 1996. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.01010.x>.

ESPITIA-SALOMA, E. et al. Continuous aqueous two-phase systems devices for the recovery of biological products. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, n. 2, p. 101–112, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.05.006>.

FRANCO, T. T.; ANDREWS, A. T.; ASENJO, J. A. Conservative chemical modification of proteins to study the effects of a single protein property on partitioning in aqueous two-phase

systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 3, p. 290–299, 1996a. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960205\)49:3<290::AID-BIT7>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960205)49:3<290::AID-BIT7>3.0.CO;2-F).

FRANCO, T. T.; ANDREWS, A. T.; ASENJO, J. A. Use of chemically modified proteins to study the effect of a single protein property on partitioning in aqueous two-phase systems: Effect of surface hydrophobicity. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 3, p. 300–308, 1996b. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960205\)49:3<300::AID-BIT8>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960205)49:3<300::AID-BIT8>3.0.CO;2-O).

GAUTAM, K. et al. Growth and secretome analysis of possible synergistic interaction between green algae and cyanobacteria. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 127, n. 2, p. 213–221, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.07.005>.

GOJA, A. M. et al. Aqueous Two-Phase Extraction Advances for Bioseparation. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 4, n. 1, p. 1–8, 2013. DOI: 10.4172/2155-9821.1000140.

GUEDES, A. C. et al. Photobioreactors for cyanobacterial culturing. **Cyanobacteria: An Economic Perspective**, p. 270–292, 2013. DOI:10.1002/9781118402238.

GUTU, A.; KEHOE, D. M. Emerging perspectives on the mechanisms, regulation, and distribution of light color acclimation in cyanobacteria. **Molecular Plant**, v. 5, n. 1, p. 1–13, 2012. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr054>.

HAGEMANN, M.; HESS, W. R. Systems and synthetic biology for the biotechnological application of cyanobacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 94–99, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.008>.

HARAGUCHI, L. H. et al. Phase equilibrium and insulin partitioning in aqueous two-phase systems containing block copolymers and potassium phosphate. **Fluid Phase Equilibria**, v. 215, n. 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).

IGARASHI, L. Extração de Biomoléculas em Sistemas de Duas Fases Aquosas Convencionais e com Polímeros Termossensíveis. 2003.

IQBAL, M. et al. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. **Biological Procedures Online**, v. 18, n. 1, p. 1–18, 2016. <https://doi.org/10.1186/s12575-016-0048>.

JOHANSSON, H. O.; KARLSTROEM, G.; TJERNELD, F. Experimental and theoretical study of phase separation in aqueous solutions of clouding polymers and carboxylic acids. **Macromolecules**, v. 26, n. 17, p. 4478–4483, 1993. <https://doi.org/10.1021/ma00069a012>.

JOHANSSON, H. O.; KARLSTRÖM, G.; TJERNELD, F. Temperature-induced phase partitioning of peptides in water solutions of ethylene oxide and propylene oxide random copolymers. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1335, n. 3, p. 315–325, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(96\)00150-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(96)00150-X).

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>.

- KAUSHAL, S. et al. Phycobiliprotein production by a novel cold desert cyanobacterium *Nodularia sphaerocarpa* PUPCCC 420.1. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 4, p. 1819–1827, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1093-7>.
- KEITHELLAKPAM, O. S. et al. Effect of external pH on cyanobacterial phycobiliproteins production and ammonium excretion. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 3, n. 04, p. 38–42, 2015. DOI: 10.7324/JABB.2015.3408.
- KHAN, Z. et al. A comparative study of phycobiliprotein production in two strains of *Pseudanabaena* isolated from Arctic and tropical regions in relation to different light wavelengths and photoperiods. **Polar Science**, v. 20, p. 3–8, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.polar.2018.10.002>.
- KHATOON, H. et al. 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. et al. 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>.
- KHAZI, M. I.; DEMIREL, Z.; DALAY, M. C. Evaluation of growth and phycobiliprotein composition of cyanobacteria isolates cultivated in different nitrogen sources. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 3, p. 1513–1523, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1398-1>
- KITAHARA, T.; KAMIHIRA, M.; TAKEUCHI, H. Application of pluronic F68 for aqueous two-phase extraction of proteins. **Journal of chemical engineering of Japan**, v. 26, n. 2, p. 183–188, 1993. <https://doi.org/10.1252/jcej.26.183>.
- KLEPACZ-SMÓŁKA, A. et al. Effect of light colour and photoperiod on biomass growth and phycocyanin production by *Synechococcus* PCC 6715. **Bioresource Technology**, v. 313, n. April, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123700>.
- KOVAČ, D. et al. The production of biomass and phycobiliprotein pigments in filamentous cyanobacteria: the impact of light and carbon sources. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 539–545, 2017. <https://doi.org/10.1134/S000368381705009X>.
- KULA, M.-R.; KRONER, K. H.; HUSTEDT, H. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. p. 73–118, 1982. https://doi.org/10.1007/3-540-11699-0_11.
- KUMAR, J. et al. **Cyanobacteria: Applications in Biotechnology**. In: (Ed.). **Cyanobacteria**: Elsevier, 2019. p.327-346.
- LEE, N. K. et al. Higher production of C-phycocyanin by nitrogen-free (diazotrophic) cultivation of *Nostoc* sp. NK and simplified extraction by dark-cold shock. **Bioresource Technology**, v. 227, p. 164–170, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.053>.
- LIU, Y.; FENG, Y.; LUN, J. Aqueous two-phase countercurrent distribution for the

separation of c-phycoerythrin and allophycoerythrin from *Spirulina platensis*. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 2, p. 111–117, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.08.002>.

MADHYASTHA, H. K.; VATSALA, T. M. Pigment production in *Spirulina fusciformis* in different photophysical conditions. **Biomolecular Engineering**, v. 24, n. 3, p. 301–305, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2007.04.001>.

MANIRAFASHA, E. et al. 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>.

MARTINS, J. P. et al. Liquid-liquid equilibria of an aqueous two-phase system containing poly(ethylene) glycol 1500 and sulfate salts at different temperatures. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 53, n. 1, p. 238–241, 2008. <https://doi.org/10.1021/jc700538z>.

MINKOVA, K. et al. Improved procedure for separation and purification of *Arthrocnemum africanum* phycobiliproteins. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 4, p. 647–651, 2007. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9274-5>.

MITTAL, R.; SHARMA, R.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two-phase extraction of R-Phycocyanin from marine macro-algae, *Gelidium pusillum*. **Bioresource Technology**, v. 280, p. 277–286, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.044>.

MOGANY, T. et al. Elucidating the role of nutrients in C-phycoerythrin production by the halophilic cyanobacterium *Eubacterium* sp. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 4, p. 2259–2271, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1477-3>.

MOLINA GRIMA, E. et al. Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics. **Biotechnology Advances**, v. 20, n. 7–8, p. 491–515, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00050-2).

MONTALVO-HERNÁNDEZ, B.; RITO-PALOMARES, M.; BENAVIDES, J. Recovery of crocins from saffron stigmas (*Crocus sativus*) in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1236, p. 7–15, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.012>.

MORENO, A. et al. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of C-phycoerythrin and allophycoerythrin from *Spirulina platensis*. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 53, n. 3, p. 321–326, 1997. <https://doi.org/10.1107/S0907444996015582>.

NG, H. S. et al. Recovery of *Bacillus cereus* cyclodextrin glycosyltransferase and recycling of phase components in an aqueous two-phase system using thermo-separating polymer. **Separation and Purification Technology**, v. 89, p. 9–15, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.12.028>.

NIEMEC, A. B. **Propriedades de soluções de copolímeros estatísticos em comparação com copolímeros em bloco: diagramas de fase binários e interação com surfatantes**. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas– Unesp, 2018.

NOREÑA-CARO, D.; BENTON, M. G. Cyanobacteria as photoautotrophic biofactories of high-value chemicals. **Journal of CO2 Utilization**, v. 28, n. May, p. 335–366, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2018.10.008>.

OJIT, S. K. et al. The response of phycobiliproteins to light qualities in *Anabaena circinalis*. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 3, n. 03, p. 1–6, 2015. DOI: 10.7324/JABB.2015.3301.

OLIVEIRA, F. C. DE. **Estudo da partição da proteína ovomucoide em sistemas aquosos bifásicos e em resinas aniônica ou hidrofóbica**. Tese de Pós-graduação, Ciências e Tecnologia de Alimentos Universidade Federal de Viçosa– UFV, 2009.

OLIVEIRA, L. A. DE. **Caracterização do sistema bifásico aquoso polietilenoglicol-goma do cajueiro**. Tese de Mestrado, Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas–Unicamp, 1999.

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>.

PAGELS, F. et al. Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 3, p. 422–443, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.010>.

PAN-UTAI, W.; IAMTHAM, S. Physical extraction and extrusion entrapment of C-phycoerythrin from *Arthrospira platensis*. **Journal of King Saud University - Science**, v. 31, n. 4, p. 1535–1542, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.05.026>.

PATEL, A. et al. Kinetic studies on thermal denaturation of C-phycoerythrin. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 41, p. 254–257, 2004. ISSN: 0301-1208.

PATEL, H. M. et al. Structural characterization and antioxidant potential of phycoerythrin from the cyanobacterium *Geitlerinema* sp. H8DM. **Algal Research**, v. 32, n. April, p. 372–383, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.04.024>.

PATIL, G. et al. Method to obtain C-phycoerythrin of high purity. **Journal of Chromatography A**, v. 1127, n. 1–2, p. 76–81, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.073>.

PERSSON, Josefine et al. Purification of recombinant proteins using thermoseparating aqueous two-phase system and polymer recycling. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology**, v. 74, n. 3, p. 238–243, 1999. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199903\)74:3<238::AID-JCTB29>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199903)74:3<238::AID-JCTB29>3.0.CO;2-Z).

PERSSON, J. et al. Aqueous polymer two-phase systems formed by new thermoseparating polymers. **Bioseparation**, v. 9, n. 2, p. 105–116, 2000. <https://doi.org/10.1023/A:1008167603733>.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied**

Microbiology and Biotechnology, v. 65, n. 6, p. 635–648, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>.

RABELO, A. P. B.; TAMBOURGI, E. B.; PESSOA, A. Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 807, n. 1, p. 61–68, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.03.029>.

RANJITHA, K.; KAUSHIK, B. D. Purification of phycobiliproteins from *Nostoc muscorum*. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 64, n. 5, p. 372–375, 2005. ISSN: 0975-1084 (Online); 0022-4456 (Print).

RASTOGI, R. P. et al. Characterization and antioxidant functions of mycosporine-like amino acids in the cyanobacterium *Nostoc* sp. R76DM. **Algal Research**, v. 16, p. 110–118, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.009>.

REIS, A. et al. Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp. **Bioresource Technology**, v. 66, n. 3, p. 181–187, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00064-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00064-9).

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1–61, 1979. <https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>.

RITO-PALOMARES, M.; NUEZ, L.; AMADOR, D. Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for c-phycoerythrin recovery from *Spirulina maxima*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 76, n. 12, p. 1273–1280, 2001. <https://doi.org/10.1002/jctb.507>.

RIZZO, R. F. Produção de ficobiliproteínas por *Arthrospira platensis* sob diferentes condições de iluminação e avaliação de sua estabilidade, visando aplicação em alimentos. Tese de Pós-graduação, Ciências Aplicadas e Produtos para a Saúde, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense–UFF, 2014.

RODRIGUES, G. D. et al. Liquid-liquid extraction of metal ions without use of organic solvent. **Separation and Purification Technology**, v. 62, n. 3, p. 687–693, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.03.032>.

RODRIGUES, R. D. P. et al. Ultrasound-assisted extraction of phycobiliproteins from *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* using protic ionic liquids as solvent. **Algal Research**, v. 31, n. November 2017, p. 454–462, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.021>.

ROGERS, R. D.; ZHANG, J. Effects of increasing polymer hydrophobicity on distribution ratios of TcO₄ in polyethylene/poly(propylene glycol)-based aqueous biphasic systems. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 680, n. 1–2, p. 231–236, 1996. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00389-4](https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00389-4).

ROMÁN, R. B. et al. Recovery of pure b-phycoerythrin from the microalga *porphyridium cruentum*. **Journal of Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 73–85, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00385-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00385-6).

- 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, n. 4, p. 738–745, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.010>.
- RÜMBELI, R. et al. γ -N-Methylasparagine in phycobiliproteins from the cyanobacteria *Mastigocladus laminosus* and *Calothrix*. **FEBS Letters**, v. 221, n. 1, p. 1–2, 1987. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80341-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80341-1).
- SAINI, D. K.; PABBI, S.; SHUKLA, P. Cyanobacterial pigments: Perspectives and biotechnological approaches. **Food and Chemical Toxicology**, v. 120, p. 616–624, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.002>.
- SANTHI, J. V. et al. Differential partitioning of coconut whey proteins and fat using aqueous two phase extraction. **Fluid Phase Equilibria**, v. 503, p. 112314, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2019.112314>.
- SANTIAGO, P. A. et al. Estudo da produção de beta-galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 567–572, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612004000400015>.
- SCHIMIDT, A. S.; VENTOM, A. M.; ASENJO, J. A. Partitioning and purification of α -amylase in aqueous two-phase systems. **Enzyme and microbial technology**, v. 16, n. 2, p. 131–142, 1994. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90076-0](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90076-0).
- SCHULZE, P. S. C. et al. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 8, p. 422–430, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.06.001>.
- SHOW, P. L. et al. Direct recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* in recycling aqueous two-phase flotation. **Separation and Purification Technology**, v. 80, n. 3, p. 577–584, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.06.013>.
- SKUSE, D. R. et al. Hydroxypropyl cellulose/poly(ethylene glycol)-co-poly(propylene glycol) aqueous two-phase systems: System characterization and partition of cells and proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 10, p. 785–790, 1992. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(92\)90093-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(92)90093-4).
- SOLTANI, N. et al. Sources, Growth and some metabolic features of cyanobacterium *Fischerella* sp. FS18 in different combined nitrogen. **Jornal of sciences of Slamic republic of Iran**, v. 18, n. 2, p. 123–128, 2007. <https://www.sid.ir/en/Journal/ViewPaper.aspx?ID=85206>.
- SONI, B. et al. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata*-Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 2017–2023, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.04.018>.
- SUN, L.; WANG, S.; QIAO, Z. Chemical stabilization of the phycocyanin from cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Biotechnology**, v. 121, n. 4, p. 563–569, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.08.017>.

Microbiology and Biotechnology, v. 65, n. 6, p. 635–648, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>.

RABELO, A. P. B.; TAMBOURGI, E. B.; PESSOA, A. Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 807, n. 1, p. 61–68, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.03.029>.

RANJITHA, K.; KAUSHIK, B. D. Purification of phycobiliproteins from *Nostoc muscorum*. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 64, n. 5, p. 372–375, 2005. ISSN: 0975-1084 (Online); 0022-4456 (Print).

RASTOGI, R. P. et al. Characterization and antioxidant functions of mycosporine-like amino acids in the cyanobacterium *Nostoc* sp. R76DM. **Algal Research**, v. 16, p. 110–118, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.009>.

REIS, A. et al. Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp. **Bioresource Technology**, v. 66, n. 3, p. 181–187, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00064-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00064-9).

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1–61, 1979. <https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>.

RITO-PALOMARES, M.; NUEZ, L.; AMADOR, D. Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for c-phycoerythrin recovery from *Spirulina maxima*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 76, n. 12, p. 1273–1280, 2001. <https://doi.org/10.1002/jctb.507>.

RIZZO, R. F. Produção de ficobiliproteínas por *Arthrospira platensis* sob diferentes condições de iluminação e avaliação de sua estabilidade, visando aplicação em alimentos. Tese de Pós-graduação, Ciências Aplicadas e Produtos para a Saúde, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense–UFF, 2014.

RODRIGUES, G. D. et al. Liquid-liquid extraction of metal ions without use of organic solvent. **Separation and Purification Technology**, v. 62, n. 3, p. 687–693, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.03.032>.

RODRIGUES, R. D. P. et al. Ultrasound-assisted extraction of phycobiliproteins from *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* using protic ionic liquids as solvent. **Algal Research**, v. 31, n. November 2017, p. 454–462, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.021>.

ROGERS, R. D.; ZHANG, J. Effects of increasing polymer hydrophobicity on distribution ratios of TcO₄ in polyethylene/poly(propylene glycol)-based aqueous biphasic systems. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 680, n. 1–2, p. 231–236, 1996. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00389-4](https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00389-4).

ROMÁN, R. B. et al. Recovery of pure b-phycoerythrin from the microalga *porphyridium cruentum*. **Journal of Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 73–85, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00385-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00385-6).

- 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, n. 4, p. 738–745, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.010>.
- RÜMBELI, R. et al. γ -N-Methylasparagine in phycobiliproteins from the cyanobacteria *Mastigocladus laminosus* and *Calothrix*. **FEBS Letters**, v. 221, n. 1, p. 1–2, 1987. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80341-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80341-1).
- SAINI, D. K.; PABBI, S.; SHUKLA, P. Cyanobacterial pigments: Perspectives and biotechnological approaches. **Food and Chemical Toxicology**, v. 120, p. 616–624, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.002>.
- SANTHI, J. V. et al. Differential partitioning of coconut whey proteins and fat using aqueous two phase extraction. **Fluid Phase Equilibria**, v. 503, p. 112314, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2019.112314>.
- SANTIAGO, P. A. et al. Estudo da produção de beta-galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 567–572, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612004000400015>.
- SCHIMIDT, A. S.; VENTOM, A. M.; ASENJO, J. A. Partitioning and purification of α -amylase in aqueous two-phase systems. **Enzyme and microbial technology**, v. 16, n. 2, p. 131–142, 1994. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90076-0](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90076-0).
- SCHULZE, P. S. C. et al. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 8, p. 422–430, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.06.001>.
- SHOW, P. L. et al. Direct recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* in recycling aqueous two-phase flotation. **Separation and Purification Technology**, v. 80, n. 3, p. 577–584, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.06.013>.
- SKUSE, D. R. et al. Hydroxypropyl cellulose/poly(ethylene glycol)-co-poly(propylene glycol) aqueous two-phase systems: System characterization and partition of cells and proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 10, p. 785–790, 1992. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(92\)90093-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(92)90093-4).
- SOLTANI, N. et al. Sources, Growth and some metabolic features of cyanobacterium *Fischerella* sp. FS18 in different combined nitrogen. **Jornal of sciences of Slamic republic of Iran**, v. 18, n. 2, p. 123–128, 2007. <https://www.sid.ir/en/Journal/ViewPaper.aspx?ID=85206>.
- SONI, B. et al. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata*-Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 2017–2023, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.04.018>.
- SUN, L.; WANG, S.; QIAO, Z. Chemical stabilization of the phycocyanin from cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Biotechnology**, v. 121, n. 4, p. 563–569, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.08.017>.

NOREÑA-CARO, D.; BENTON, M. G. Cyanobacteria as photoautotrophic biofactories of high-value chemicals. **Journal of CO2 Utilization**, v. 28, n. May, p. 335–366, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2018.10.008>.

OJIT, S. K. et al. The response of phycobiliproteins to light qualities in *Anabaena circinalis*. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 3, n. 03, p. 1–6, 2015. DOI: 10.7324/JABB.2015.3301.

OLIVEIRA, F. C. DE. **Estudo da partição da proteína ovomucoide em sistemas aquosos bifásicos e em resinas aniônica ou hidrofóbica**. Tese de Pós-graduação, Ciências e Tecnologia de Alimentos Universidade Federal de Viçosa– UFV, 2009.

OLIVEIRA, L. A. DE. **Caracterização do sistema bifásico aquoso polietilenoglicol-goma do cajueiro**. Tese de Mestrado, Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas–Unicamp, 1999.

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>.

PAGELS, F. et al. Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 3, p. 422–443, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.010>.

PAN-UTAI, W.; IAMTHAM, S. Physical extraction and extrusion entrapment of C-phycoerythrin from *Arthrospira platensis*. **Journal of King Saud University - Science**, v. 31, n. 4, p. 1535–1542, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.05.026>.

PATEL, A. et al. Kinetic studies on thermal denaturation of C-phycoerythrin. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 41, p. 254–257, 2004. ISSN: 0301-1208.

PATEL, H. M. et al. Structural characterization and antioxidant potential of phycoerythrin from the cyanobacterium *Geitlerinema* sp. H8DM. **Algal Research**, v. 32, n. April, p. 372–383, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.04.024>.

PATIL, G. et al. Method to obtain C-phycoerythrin of high purity. **Journal of Chromatography A**, v. 1127, n. 1–2, p. 76–81, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.073>.

PERSSON, Josefine et al. Purification of recombinant proteins using thermoseparating aqueous two-phase system and polymer recycling. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology**, v. 74, n. 3, p. 238–243, 1999. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199903\)74:3<238::AID-JCTB29>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199903)74:3<238::AID-JCTB29>3.0.CO;2-Z).

PERSSON, J. et al. Aqueous polymer two-phase systems formed by new thermoseparating polymers. **Bioseparation**, v. 9, n. 2, p. 105–116, 2000. <https://doi.org/10.1023/A:1008167603733>.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied**

Microbiology and Biotechnology, v. 65, n. 6, p. 635–648, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>.

RABELO, A. P. B.; TAMBOURGI, E. B.; PESSOA, A. Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 807, n. 1, p. 61–68, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.03.029>.

RANJITHA, K.; KAUSHIK, B. D. Purification of phycobiliproteins from *Nostoc muscorum*. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 64, n. 5, p. 372–375, 2005. ISSN: 0975-1084 (Online); 0022-4456 (Print).

RASTOGI, R. P. et al. Characterization and antioxidant functions of mycosporine-like amino acids in the cyanobacterium *Nostoc sp. R76DM*. **Algal Research**, v. 16, p. 110–118, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.009>.

REIS, A. et al. Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc sp.* **Bioresource Technology**, v. 66, n. 3, p. 181–187, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00064-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00064-9).

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1–61, 1979. <https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>.

RITO-PALOMARES, M.; NUEZ, L.; AMADOR, D. Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for c-phycoerythrin recovery from *Spirulina maxima*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 76, n. 12, p. 1273–1280, 2001. <https://doi.org/10.1002/jctb.507>.

RIZZO, R. F. Produção de ficobiliproteínas por *Arthrospira platensis* sob diferentes condições de iluminação e avaliação de sua estabilidade, visando aplicação em alimentos. Tese de Pós-graduação, Ciências Aplicadas e Produtos para a Saúde, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense–UFF, 2014.

RODRIGUES, G. D. et al. Liquid-liquid extraction of metal ions without use of organic solvent. **Separation and Purification Technology**, v. 62, n. 3, p. 687–693, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.03.032>.

RODRIGUES, R. D. P. et al. Ultrasound-assisted extraction of phycobiliproteins from *Spirulina (Arthrospira) platensis* using protic ionic liquids as solvent. **Algal Research**, v. 31, n. November 2017, p. 454–462, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.021>.

ROGERS, R. D.; ZHANG, J. Effects of increasing polymer hydrophobicity on distribution ratios of TcO₄ in polyethylene/poly(propylene glycol)-based aqueous biphasic systems. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 680, n. 1–2, p. 231–236, 1996. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00389-4](https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00389-4).

ROMÁN, R. B. et al. Recovery of pure b-phycoerythrin from the microalga *porphyridium cruentum*. **Journal of Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 73–85, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00385-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00385-6).

SVENSSON, M. et al. Partitioning of hydrophobic amino acids and oligopeptides in aqueous two-phase system containing self-aggregating block copolymer. Effects of temperature, salts and surfactants. **Journal of Chromatography A**, v. 761, n. 1–2, p. 91–101, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00830-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00830-8).

TASNEEM FATMA, H. Screening of cyanobacteria for phycobiliproteins and effect of different environmental stress on its yield. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83, n. 4, p. 509–515, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9837-y>.

TEIXEIRA, L. DA S. **Equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos constituídos por copolímero tribloco e sal em diferentes temperaturas**. Tese de Pós-graduação, Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa– UFV, 2009.

VADIVELLOO, A. et al. Photosynthetic performance of two *Nannochloropsis* spp. under different filtered light spectra. **Algal Research**, v. 19, p. 168–177, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.08.014>.

VAISHAMPAYAN, A. et al. Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. **Botanical Review**, v. 67, n. 4, p. 453–516, 2001. <https://doi.org/10.1007/BF02857893>.

VELU, V.; NARAYANASWAMY, A.; BALAN, K. S. I.J.S.N., Enhancing the phycobilin pigment synthesis in *calothrix elenkinii* through optimization of light conditions. **Internal Journal of Science and Nature**, v. 6, n. 1, p. 88–91, 2015. I.J.S.N., VOL.6 (1) 2015: 88-91 ISSN 2229 –6441.

VIJAYAKUMAR, S.; MENAKHA, M. Pharmaceutical applications of cyanobacteria-A review. **Journal of Acute Medicine**, v. 5, n. 1, p. 15–23, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jacme.2015.02.004>.

VIRTUOSO, L. S. et al. Equilibrium phase behavior of triblock copolymer + sodium or + potassium hydroxides + water two-phase systems at different temperatures. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 55, n. 9, p. 3847–3852, 2010. <https://doi.org/10.1021/jc100335y>.

WANG, Y. et al. Integrated method of thermosensitive triblock copolymer-salt aqueous two phase extraction and dialysis membrane separation for purification of lycium barbarum polysaccharide. **Food Chemistry**, v. 194, p. 257–264, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.016>.

WILDMAN, R. B.; BOWEN, C. C. Phycobilisomes in blue green algae. **Journal of Bacteriology**, v. 117, n. 2, p. 866–881, 1974. <https://jb.asm.org/content/jb/117/2/866.full.pdf>.

YU, P. et al. Purification and bioactivities of phycocyanin. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 18, p. 3840–3849, 2017. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1167668>.

ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous two-phase partitioning: physical chemistry and bioanalytical applications**. CRC press, 1994.

SVENSSON, M. et al. Partitioning of hydrophobic amino acids and oligopeptides in aqueous two-phase system containing self-aggregating block copolymer. Effects of temperature, salts and surfactants. **Journal of Chromatography A**, v. 761, n. 1–2, p. 91–101, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00830-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00830-8).

TASNEEM FATMA, H. Screening of cyanobacteria for phycobiliproteins and effect of different environmental stress on its yield. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83, n. 4, p. 509–515, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9837-y>.

TEIXEIRA, L. DA S. **Equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos constituídos por copolímero tribloco e sal em diferentes temperaturas**. Tese de Pós-graduação, Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa– UFV, 2009.

VADIVELLOO, A. et al. Photosynthetic performance of two *Nannochloropsis* spp. under different filtered light spectra. **Algal Research**, v. 19, p. 168–177, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.08.014>.

VAISHAMPAYAN, A. et al. Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. **Botanical Review**, v. 67, n. 4, p. 453–516, 2001. <https://doi.org/10.1007/BF02857893>.

VELU, V.; NARAYANASWAMY, A.; BALAN, K. S. I.J.S.N., Enhancing the phycobilin pigment synthesis in *calothrix elenkinii* through optimization of light conditions. **Internal Journal of Science and Nature**, v. 6, n. 1, p. 88–91, 2015. I.J.S.N., VOL.6 (1) 2015: 88-91 ISSN 2229 –6441.

VIJAYAKUMAR, S.; MENAKHA, M. Pharmaceutical applications of cyanobacteria-A review. **Journal of Acute Medicine**, v. 5, n. 1, p. 15–23, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jacme.2015.02.004>.

VIRTUOSO, L. S. et al. Equilibrium phase behavior of triblock copolymer + sodium or + potassium hydroxides + water two-phase systems at different temperatures. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 55, n. 9, p. 3847–3852, 2010. <https://doi.org/10.1021/je100335y>.

WANG, Y. et al. Integrated method of thermosensitive triblock copolymer-salt aqueous two phase extraction and dialysis membrane separation for purification of lycium barbarum polysaccharide. **Food Chemistry**, v. 194, p. 257–264, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.016>.

WILDMAN, R. B.; BOWEN, C. C. Phycobilisomes in blue green algae. **Journal of Bacteriology**, v. 117, n. 2, p. 866–881, 1974. <https://jb.asm.org/content/jb/117/2/866.full.pdf>.

YU, P. et al. Purification and bioactivities of phycocyanin. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 18, p. 3840–3849, 2017. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1167668>.

ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous two-phase partitioning: physical chemistry and bioanalytical applications**. CRC press, 1994.

- 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, n. 4, p. 738–745, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.010>.
- RÜMBELI, R. et al. γ -N-Methylasparagine in phycobiliproteins from the cyanobacteria *Mastigocladus laminosus* and *Calothrix*. **FEBS Letters**, v. 221, n. 1, p. 1–2, 1987. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80341-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80341-1).
- SAINI, D. K.; PABBI, S.; SHUKLA, P. Cyanobacterial pigments: Perspectives and biotechnological approaches. **Food and Chemical Toxicology**, v. 120, p. 616–624, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.002>.
- SANTHI, J. V. et al. Differential partitioning of coconut whey proteins and fat using aqueous two phase extraction. **Fluid Phase Equilibria**, v. 503, p. 112314, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2019.112314>.
- SANTIAGO, P. A. et al. Estudo da produção de beta-galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 567–572, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612004000400015>.
- SCHIMIDT, A. S.; VENTOM, A. M.; ASENJO, J. A. Partitioning and purification of α -amylase in aqueous two-phase systems. **Enzyme and microbial technology**, v. 16, n. 2, p. 131–142, 1994. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90076-0](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90076-0).
- SCHULZE, P. S. C. et al. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 8, p. 422–430, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.06.001>.
- SHOW, P. L. et al. Direct recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* in recycling aqueous two-phase flotation. **Separation and Purification Technology**, v. 80, n. 3, p. 577–584, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.06.013>.
- SKUSE, D. R. et al. Hydroxypropyl cellulose/poly(ethylene glycol)-co-poly(propylene glycol) aqueous two-phase systems: System characterization and partition of cells and proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 10, p. 785–790, 1992. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(92\)90093-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(92)90093-4).
- SOLTANI, N. et al. Sources, Growth and some metabolic features of cyanobacterium *Fischerella* sp. FS18 in different combined nitrogen. **Jornal of sciences of Slamic republic of Iran**, v. 18, n. 2, p. 123–128, 2007. <https://www.sid.ir/en/Journal/ViewPaper.aspx?ID=85206>.
- SONI, B. et al. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata*-Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 2017–2023, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.04.018>.
- SUN, L.; WANG, S.; QIAO, Z. Chemical stabilization of the phycocyanin from cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Biotechnology**, v. 121, n. 4, p. 563–569, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.08.017>.

SVENSSON, M. et al. Partitioning of hydrophobic amino acids and oligopeptides in aqueous two-phase system containing self-aggregating block copolymer. Effects of temperature, salts and surfactants. **Journal of Chromatography A**, v. 761, n. 1–2, p. 91–101, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00830-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00830-8).

TASNEEM FATMA, H. Screening of cyanobacteria for phycobiliproteins and effect of different environmental stress on its yield. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83, n. 4, p. 509–515, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9837-y>.

TEIXEIRA, L. DA S. **Equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos constituídos por copolímero tribloco e sal em diferentes temperaturas**. Tese de Pós-graduação, Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa– UFV, 2009.

VADIVELLOO, A. et al. Photosynthetic performance of two *Nannochloropsis* spp. under different filtered light spectra. **Algal Research**, v. 19, p. 168–177, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.08.014>.

VAISHAMPAYAN, A. et al. Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. **Botanical Review**, v. 67, n. 4, p. 453–516, 2001. <https://doi.org/10.1007/BF02857893>.

VELU, V.; NARAYANASWAMY, A.; BALAN, K. S. I.J.S.N., Enhancing the phycobilin pigment synthesis in *calothrix elenkinii* through optimization of light conditions. **Internal Journal of Science and Nature**, v. 6, n. 1, p. 88–91, 2015. I.J.S.N., VOL.6 (1) 2015: 88-91 ISSN 2229 –6441.

VIJAYAKUMAR, S.; MENAKHA, M. Pharmaceutical applications of cyanobacteria-A review. **Journal of Acute Medicine**, v. 5, n. 1, p. 15–23, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jacme.2015.02.004>.

VIRTUOSO, L. S. et al. Equilibrium phase behavior of triblock copolymer + sodium or + potassium hydroxides + water two-phase systems at different temperatures. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 55, n. 9, p. 3847–3852, 2010. <https://doi.org/10.1021/je100335y>.

WANG, Y. et al. Integrated method of thermosensitive triblock copolymer-salt aqueous two phase extraction and dialysis membrane separation for purification of lycium barbarum polysaccharide. **Food Chemistry**, v. 194, p. 257–264, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.016>.

WILDMAN, R. B.; BOWEN, C. C. Phycobilisomes in blue green algae. **Journal of Bacteriology**, v. 117, n. 2, p. 866–881, 1974. <https://jb.asm.org/content/jb/117/2/866.full.pdf>.

YU, P. et al. Purification and bioactivities of phycocyanin. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 18, p. 3840–3849, 2017. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1167668>.

ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous two-phase partitioning: physical chemistry and bioanalytical applications**. CRC press, 1994.

SVENSSON, M. et al. Partitioning of hydrophobic amino acids and oligopeptides in aqueous two-phase system containing self-aggregating block copolymer. Effects of temperature, salts and surfactants. **Journal of Chromatography A**, v. 761, n. 1–2, p. 91–101, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00830-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00830-8).

TASNEEM FATMA, H. Screening of cyanobacteria for phycobiliproteins and effect of different environmental stress on its yield. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83, n. 4, p. 509–515, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9837-y>.

TEIXEIRA, L. DA S. **Equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos constituídos por copolímero tribloco e sal em diferentes temperaturas**. Tese de Pós-graduação, Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa– UFV, 2009.

VADIVELLOO, A. et al. Photosynthetic performance of two *Nannochloropsis* spp. under different filtered light spectra. **Algal Research**, v. 19, p. 168–177, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.08.014>.

VAISHAMPAYAN, A. et al. Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. **Botanical Review**, v. 67, n. 4, p. 453–516, 2001. <https://doi.org/10.1007/BF02857893>.

VELU, V.; NARAYANASWAMY, A.; BALAN, K. S. I.J.S.N., Enhancing the phycobilin pigment synthesis in *calothrix elenkinii* through optimization of light conditions. **Internal Journal of Science and Nature**, v. 6, n. 1, p. 88–91, 2015. I.J.S.N., VOL.6 (1) 2015: 88-91 ISSN 2229 –6441.

VIJAYAKUMAR, S.; MENAKHA, M. Pharmaceutical applications of cyanobacteria-A review. **Journal of Acute Medicine**, v. 5, n. 1, p. 15–23, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jacme.2015.02.004>.

VIRTUOSO, L. S. et al. Equilibrium phase behavior of triblock copolymer + sodium or + potassium hydroxides + water two-phase systems at different temperatures. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 55, n. 9, p. 3847–3852, 2010. <https://doi.org/10.1021/je100335y>.

WANG, Y. et al. Integrated method of thermosensitive triblock copolymer-salt aqueous two phase extraction and dialysis membrane separation for purification of lycium barbarum polysaccharide. **Food Chemistry**, v. 194, p. 257–264, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.016>.

WILDMAN, R. B.; BOWEN, C. C. Phycobilisomes in blue green algae. **Journal of Bacteriology**, v. 117, n. 2, p. 866–881, 1974. <https://jb.asm.org/content/jb/117/2/866.full.pdf>.

YU, P. et al. Purification and bioactivities of phycocyanin. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 18, p. 3840–3849, 2017. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1167668>.

ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous two-phase partitioning: physical chemistry and bioanalytical applications**. CRC press, 1994.

Microbiology and Biotechnology, v. 65, n. 6, p. 635–648, 2004. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>.

RABELO, A. P. B.; TAMBOURGI, E. B.; PESSOA, A. Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO-PPO-PEO block copolymers. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 807, n. 1, p. 61–68, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.03.029>.

RANJITHA, K.; KAUSHIK, B. D. Purification of phycobiliproteins from *Nostoc muscorum*. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 64, n. 5, p. 372–375, 2005. ISSN: 0975-1084 (Online); 0022-4456 (Print).

RASTOGI, R. P. et al. Characterization and antioxidant functions of mycosporine-like amino acids in the cyanobacterium *Nostoc* sp. R76DM. **Algal Research**, v. 16, p. 110–118, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.009>.

REIS, A. et al. Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp. **Bioresource Technology**, v. 66, n. 3, p. 181–187, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00064-9](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00064-9).

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1–61, 1979. <https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>.

RITO-PALOMARES, M.; NUEZ, L.; AMADOR, D. Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for c-phycoerythrin recovery from *Spirulina maxima*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 76, n. 12, p. 1273–1280, 2001. <https://doi.org/10.1002/jctb.507>.

RIZZO, R. F. Produção de ficobiliproteínas por *Arthrospira platensis* sob diferentes condições de iluminação e avaliação de sua estabilidade, visando aplicação em alimentos. Tese de Pós-graduação, Ciências Aplicadas e Produtos para a Saúde, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense–UFF, 2014.

RODRIGUES, G. D. et al. Liquid-liquid extraction of metal ions without use of organic solvent. **Separation and Purification Technology**, v. 62, n. 3, p. 687–693, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2008.03.032>.

RODRIGUES, R. D. P. et al. Ultrasound-assisted extraction of phycobiliproteins from *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* using protic ionic liquids as solvent. **Algal Research**, v. 31, n. November 2017, p. 454–462, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.021>.

ROGERS, R. D.; ZHANG, J. Effects of increasing polymer hydrophobicity on distribution ratios of TcO₄ in polyethylene/poly(propylene glycol)-based aqueous biphasic systems. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 680, n. 1–2, p. 231–236, 1996. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00389-4](https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00389-4).

ROMÁN, R. B. et al. Recovery of pure b-phycoerythrin from the microalga *porphyridium cruentum*. **Journal of Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 73–85, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00385-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00385-6).

SVENSSON, M. et al. Partitioning of hydrophobic amino acids and oligopeptides in aqueous two-phase system containing self-aggregating block copolymer. Effects of temperature, salts and surfactants. **Journal of Chromatography A**, v. 761, n. 1–2, p. 91–101, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00830-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00830-8).

TASNEEM FATMA, H. Screening of cyanobacteria for phycobiliproteins and effect of different environmental stress on its yield. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83, n. 4, p. 509–515, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9837-y>.

TEIXEIRA, L. DA S. **Equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos constituídos por copolímero tribloco e sal em diferentes temperaturas**. Tese de Pós-graduação, Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa– UFV, 2009.

VADIVELLOO, A. et al. Photosynthetic performance of two *Nannochloropsis* spp. under different filtered light spectra. **Algal Research**, v. 19, p. 168–177, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.08.014>.

VAISHAMPAYAN, A. et al. Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. **Botanical Review**, v. 67, n. 4, p. 453–516, 2001. <https://doi.org/10.1007/BF02857893>.

VELU, V.; NARAYANASWAMY, A.; BALAN, K. S. I.J.S.N., Enhancing the phycobilin pigment synthesis in *calothrix elenkinii* through optimization of light conditions. **Internal Journal of Science and Nature**, v. 6, n. 1, p. 88–91, 2015. I.J.S.N., VOL.6 (1) 2015: 88-91 ISSN 2229 –6441.

VIJAYAKUMAR, S.; MENAKHA, M. Pharmaceutical applications of cyanobacteria-A review. **Journal of Acute Medicine**, v. 5, n. 1, p. 15–23, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jacme.2015.02.004>.

VIRTUOSO, L. S. et al. Equilibrium phase behavior of triblock copolymer + sodium or + potassium hydroxides + water two-phase systems at different temperatures. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 55, n. 9, p. 3847–3852, 2010. <https://doi.org/10.1021/je100335y>.

WANG, Y. et al. Integrated method of thermosensitive triblock copolymer-salt aqueous two phase extraction and dialysis membrane separation for purification of lycium barbarum polysaccharide. **Food Chemistry**, v. 194, p. 257–264, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.016>.

WILDMAN, R. B.; BOWEN, C. C. Phycobilisomes in blue green algae. **Journal of Bacteriology**, v. 117, n. 2, p. 866–881, 1974. <https://jb.asm.org/content/jb/117/2/866.full.pdf>.

YU, P. et al. Purification and bioactivities of phycocyanin. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 18, p. 3840–3849, 2017. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1167668>.

ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous two-phase partitioning: physical chemistry and bioanalytical applications**. CRC press, 1994.

SVENSSON, M. et al. Partitioning of hydrophobic amino acids and oligopeptides in aqueous two-phase system containing self-aggregating block copolymer. Effects of temperature, salts and surfactants. **Journal of Chromatography A**, v. 761, n. 1–2, p. 91–101, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00830-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00830-8).

TASNEEM FATMA, H. Screening of cyanobacteria for phycobiliproteins and effect of different environmental stress on its yield. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83, n. 4, p. 509–515, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9837-y>.

TEIXEIRA, L. DA S. **Equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos constituídos por copolímero tribloco e sal em diferentes temperaturas**. Tese de Pós-graduação, Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa– UFV, 2009.

VADIVELLOO, A. et al. Photosynthetic performance of two *Nannochloropsis* spp. under different filtered light spectra. **Algal Research**, v. 19, p. 168–177, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.08.014>.

VAISHAMPAYAN, A. et al. Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. **Botanical Review**, v. 67, n. 4, p. 453–516, 2001. <https://doi.org/10.1007/BF02857893>.

VELU, V.; NARAYANASWAMY, A.; BALAN, K. S. I.J.S.N., Enhancing the phycobilin pigment synthesis in *calothrix elenkinii* through optimization of light conditions. **Internal Journal of Science and Nature**, v. 6, n. 1, p. 88–91, 2015. I.J.S.N., VOL.6 (1) 2015: 88-91 ISSN 2229 –6441.

VIJAYAKUMAR, S.; MENAKHA, M. Pharmaceutical applications of cyanobacteria-A review. **Journal of Acute Medicine**, v. 5, n. 1, p. 15–23, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jacme.2015.02.004>.

VIRTUOSO, L. S. et al. Equilibrium phase behavior of triblock copolymer + sodium or + potassium hydroxides + water two-phase systems at different temperatures. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 55, n. 9, p. 3847–3852, 2010. <https://doi.org/10.1021/je100335y>.

WANG, Y. et al. Integrated method of thermosensitive triblock copolymer-salt aqueous two phase extraction and dialysis membrane separation for purification of lycium barbarum polysaccharide. **Food Chemistry**, v. 194, p. 257–264, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.016>.

WILDMAN, R. B.; BOWEN, C. C. Phycobilisomes in blue green algae. **Journal of Bacteriology**, v. 117, n. 2, p. 866–881, 1974. <https://jb.asm.org/content/jb/117/2/866.full.pdf>.

YU, P. et al. Purification and bioactivities of phycocyanin. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 18, p. 3840–3849, 2017. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1167668>.

ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous two-phase partitioning: physical chemistry and bioanalytical applications**. CRC press, 1994.

- 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, n. 4, p. 738–745, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.010>.
- RÜMBELI, R. et al. γ -N-Methylasparagine in phycobiliproteins from the cyanobacteria *Mastigocladus laminosus* and *Calothrix*. **FEBS Letters**, v. 221, n. 1, p. 1–2, 1987. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80341-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80341-1).
- SAINI, D. K.; PABBI, S.; SHUKLA, P. Cyanobacterial pigments: Perspectives and biotechnological approaches. **Food and Chemical Toxicology**, v. 120, p. 616–624, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.002>.
- SANTHI, J. V. et al. Differential partitioning of coconut whey proteins and fat using aqueous two phase extraction. **Fluid Phase Equilibria**, v. 503, p. 112314, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2019.112314>.
- SANTIAGO, P. A. et al. Estudo da produção de beta-galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 567–572, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612004000400015>.
- SCHIMIDT, A. S.; VENTOM, A. M.; ASENJO, J. A. Partitioning and purification of α -amylase in aqueous two-phase systems. **Enzyme and microbial technology**, v. 16, n. 2, p. 131–142, 1994. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90076-0](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90076-0).
- SCHULZE, P. S. C. et al. Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 8, p. 422–430, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.06.001>.
- SHOW, P. L. et al. Direct recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* in recycling aqueous two-phase flotation. **Separation and Purification Technology**, v. 80, n. 3, p. 577–584, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.06.013>.
- SKUSE, D. R. et al. Hydroxypropyl cellulose/poly(ethylene glycol)-co-poly(propylene glycol) aqueous two-phase systems: System characterization and partition of cells and proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 10, p. 785–790, 1992. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(92\)90093-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(92)90093-4).
- SOLTANI, N. et al. Sources, Growth and some metabolic features of cyanobacterium *Fischerella* sp. FS18 in different combined nitrogen. **Jornal of sciences of Slamic republic of Iran**, v. 18, n. 2, p. 123–128, 2007. <https://www.sid.ir/en/Journal/ViewPaper.aspx?ID=85206>.
- SONI, B. et al. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata*-Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 2017–2023, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.04.018>.
- SUN, L.; WANG, S.; QIAO, Z. Chemical stabilization of the phycocyanin from cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Biotechnology**, v. 121, n. 4, p. 563–569, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.08.017>.

SVENSSON, M. et al. Partitioning of hydrophobic amino acids and oligopeptides in aqueous two-phase system containing self-aggregating block copolymer. Effects of temperature, salts and surfactants. **Journal of Chromatography A**, v. 761, n. 1–2, p. 91–101, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00830-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00830-8).

TASNEEM FATMA, H. Screening of cyanobacteria for phycobiliproteins and effect of different environmental stress on its yield. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83, n. 4, p. 509–515, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9837-y>.

TEIXEIRA, L. DA S. **Equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos constituídos por copolímero tribloco e sal em diferentes temperaturas**. Tese de Pós-graduação, Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa– UFV, 2009.

VADIVELLOO, A. et al. Photosynthetic performance of two *Nannochloropsis* spp. under different filtered light spectra. **Algal Research**, v. 19, p. 168–177, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.08.014>.

VAISHAMPAYAN, A. et al. Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. **Botanical Review**, v. 67, n. 4, p. 453–516, 2001. <https://doi.org/10.1007/BF02857893>.

VELU, V.; NARAYANASWAMY, A.; BALAN, K. S. I.J.S.N., Enhancing the phycobilin pigment synthesis in *calothrix elenkinii* through optimization of light conditions. **Internal Journal of Science and Nature**, v. 6, n. 1, p. 88–91, 2015. I.J.S.N., VOL.6 (1) 2015: 88-91 ISSN 2229 –6441.

VIJAYAKUMAR, S.; MENAKHA, M. Pharmaceutical applications of cyanobacteria-A review. **Journal of Acute Medicine**, v. 5, n. 1, p. 15–23, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jacme.2015.02.004>.

VIRTUOSO, L. S. et al. Equilibrium phase behavior of triblock copolymer + sodium or + potassium hydroxides + water two-phase systems at different temperatures. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 55, n. 9, p. 3847–3852, 2010. <https://doi.org/10.1021/je100335y>.

WANG, Y. et al. Integrated method of thermosensitive triblock copolymer-salt aqueous two phase extraction and dialysis membrane separation for purification of lycium barbarum polysaccharide. **Food Chemistry**, v. 194, p. 257–264, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.016>.

WILDMAN, R. B.; BOWEN, C. C. Phycobilisomes in blue green algae. **Journal of Bacteriology**, v. 117, n. 2, p. 866–881, 1974. <https://jb.asm.org/content/jb/117/2/866.full.pdf>.

YU, P. et al. Purification and bioactivities of phycocyanin. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 18, p. 3840–3849, 2017. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1167668>.

ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous two-phase partitioning: physical chemistry and bioanalytical applications**. CRC press, 1994.

ZHANG, X. W.; ZHANG, Y. M.; CHEN, F. Application of mathematical models to the determination optimal glucose concentration and light intensity for mixotrophic culture of *Spirulina platensis*. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 5, p. 477–481, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00114-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00114-9).

SVENSSON, M. et al. Partitioning of hydrophobic amino acids and oligopeptides in aqueous two-phase system containing self-aggregating block copolymer. Effects of temperature, salts and surfactants. **Journal of Chromatography A**, v. 761, n. 1–2, p. 91–101, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(96\)00830-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(96)00830-8).

TASNEEM FATMA, H. Screening of cyanobacteria for phycobiliproteins and effect of different environmental stress on its yield. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 83, n. 4, p. 509–515, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00128-009-9837-y>.

TEIXEIRA, L. DA S. **Equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos constituídos por copolímero tribloco e sal em diferentes temperaturas**. Tese de Pós-graduação, Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa– UFV, 2009.

VADIVELLOO, A. et al. Photosynthetic performance of two *Nannochloropsis* spp. under different filtered light spectra. **Algal Research**, v. 19, p. 168–177, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.08.014>.

VAISHAMPAYAN, A. et al. Cyanobacterial biofertilizers in rice agriculture. **Botanical Review**, v. 67, n. 4, p. 453–516, 2001. <https://doi.org/10.1007/BF02857893>.

VELU, V.; NARAYANASWAMY, A.; BALAN, K. S. I.J.S.N., Enhancing the phycobilin pigment synthesis in *calothrix elenkinii* through optimization of light conditions. **Internal Journal of Science and Nature**, v. 6, n. 1, p. 88–91, 2015. I.J.S.N., VOL.6 (1) 2015: 88-91 ISSN 2229 –6441.

VIJAYAKUMAR, S.; MENAKHA, M. Pharmaceutical applications of cyanobacteria-A review. **Journal of Acute Medicine**, v. 5, n. 1, p. 15–23, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jacme.2015.02.004>.

VIRTUOSO, L. S. et al. Equilibrium phase behavior of triblock copolymer + sodium or + potassium hydroxides + water two-phase systems at different temperatures. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 55, n. 9, p. 3847–3852, 2010. <https://doi.org/10.1021/je100335y>.

WANG, Y. et al. Integrated method of thermosensitive triblock copolymer-salt aqueous two phase extraction and dialysis membrane separation for purification of lycium barbarum polysaccharide. **Food Chemistry**, v. 194, p. 257–264, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.016>.

WILDMAN, R. B.; BOWEN, C. C. Phycobilisomes in blue green algae. **Journal of Bacteriology**, v. 117, n. 2, p. 866–881, 1974. <https://jb.asm.org/content/jb/117/2/866.full.pdf>.

YU, P. et al. Purification and bioactivities of phycocyanin. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 18, p. 3840–3849, 2017. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1167668>.

ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous two-phase partitioning: physical chemistry and bioanalytical applications**. CRC press, 1994.

ZHANG, X. W.; ZHANG, Y. M.; CHEN, F. Application of mathematical models to the determination optimal glucose concentration and light intensity for mixotrophic culture of *Spirulina platensis*. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 5, p. 477–481, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00114-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00114-9).

APÊNDICE A

Figura A.1 – Curva de calibração para concentração do copolímero L62 em massa.

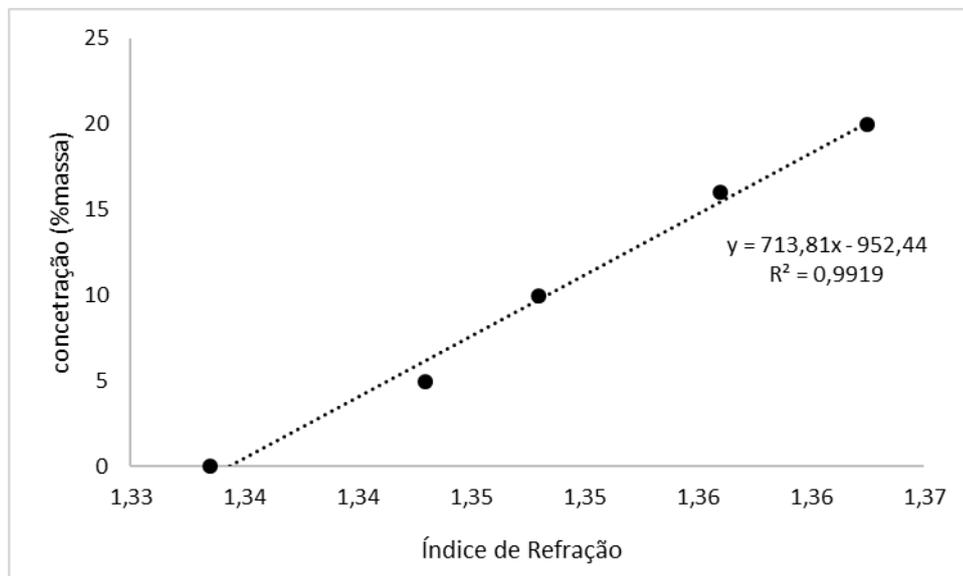


Figura A.2– Curva de calibração para concentração do copolímero L64 em massa.

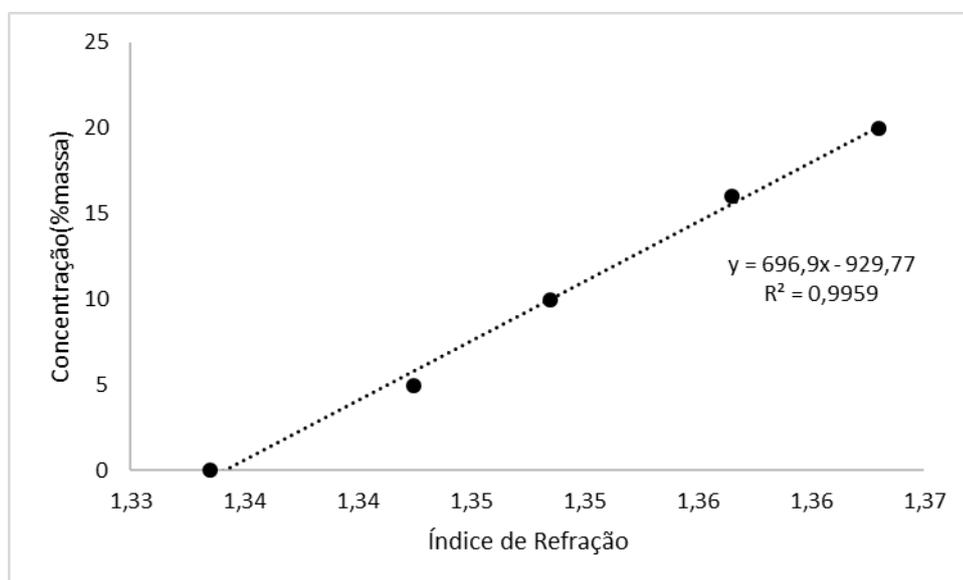


Figura A.3– Curva de calibração para concentração do copolímero F68 em massa.

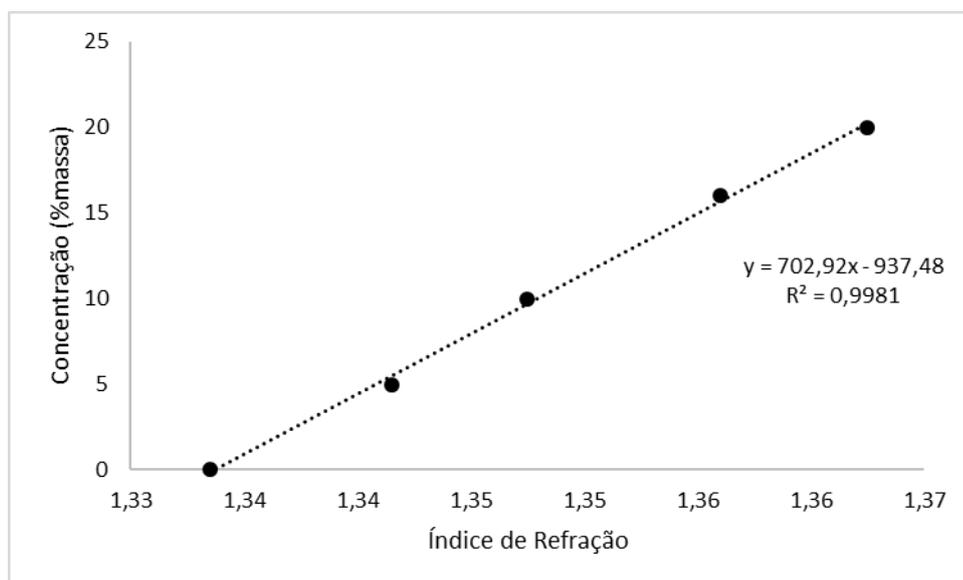
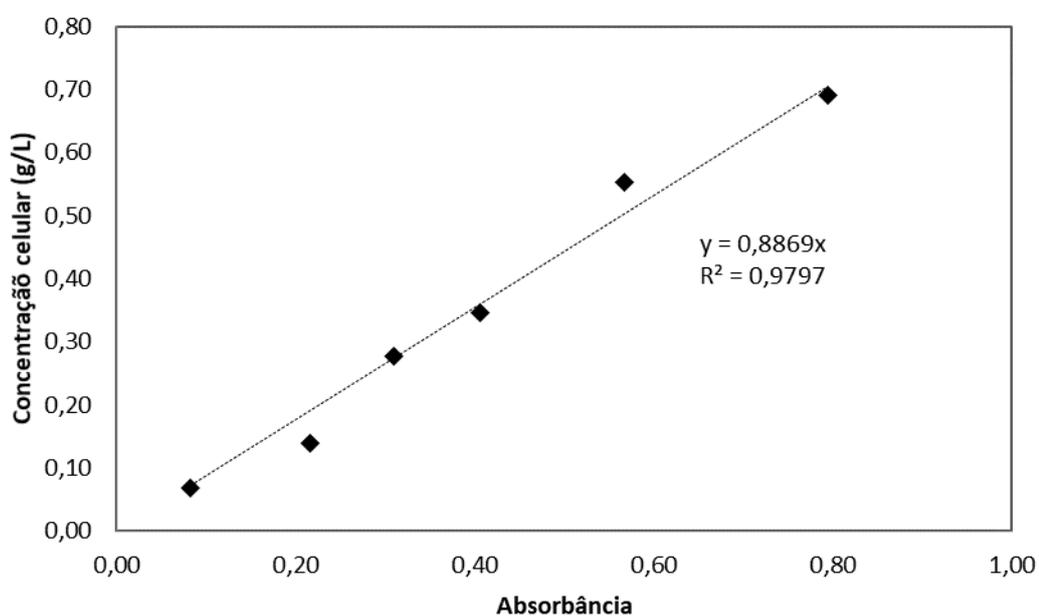
Figura A.4 – Curva de calibração para crescimento celular *Nostoc* sp.

Figura A.5 – Curva de calibração para crescimento celular *Anabaena variabilis*.

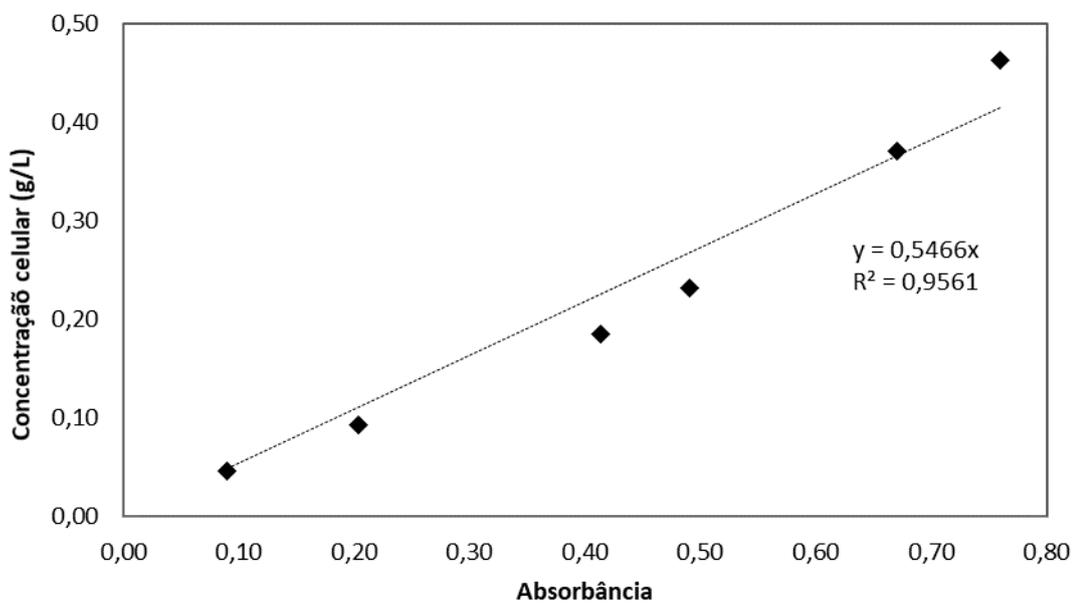


Figura A.6 – Diagramas de fase copolímero/sal a 15 °C para o copolímero L62. fosfato de potássio (■) e citrato de sódio (◆).

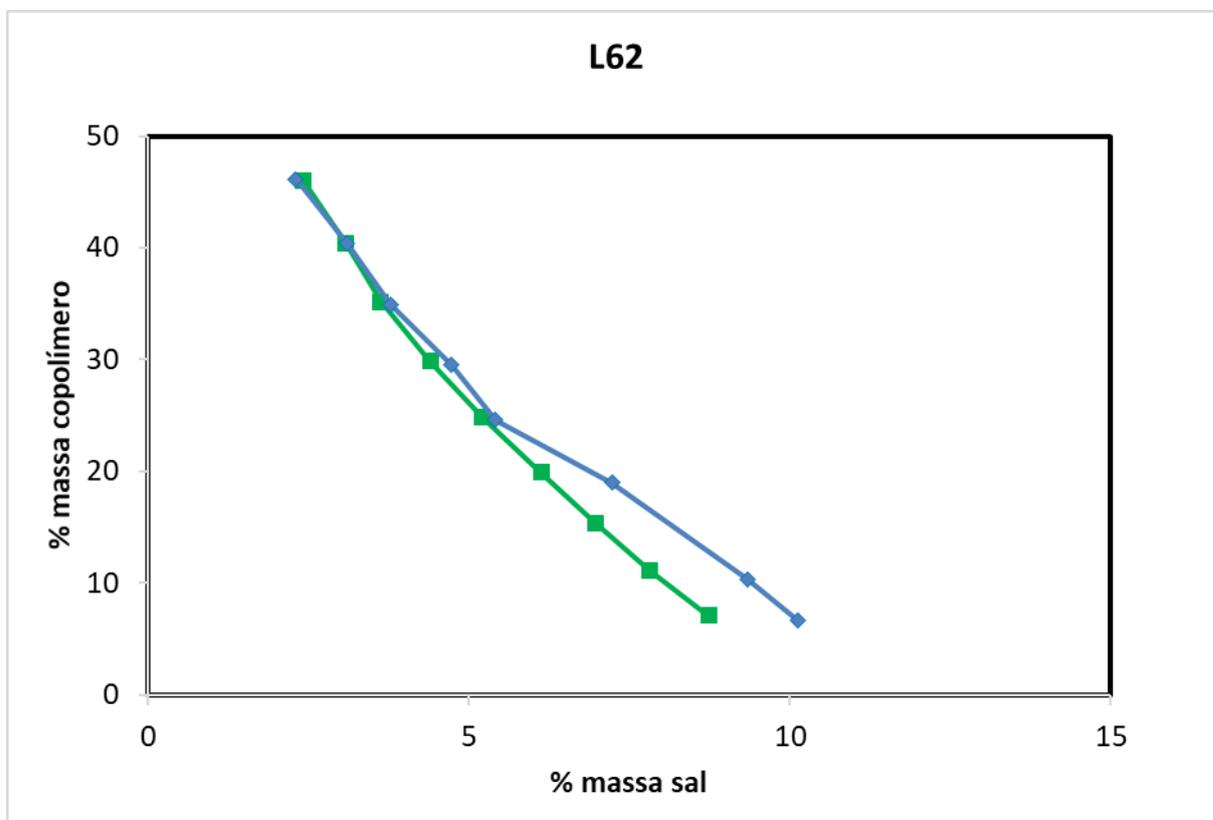


Figura A.7 – Diagramas de fase copolímero/sal a 15 °C para o copolímero L64. fosfato de potássio (■) e citrato de sódio (◆).

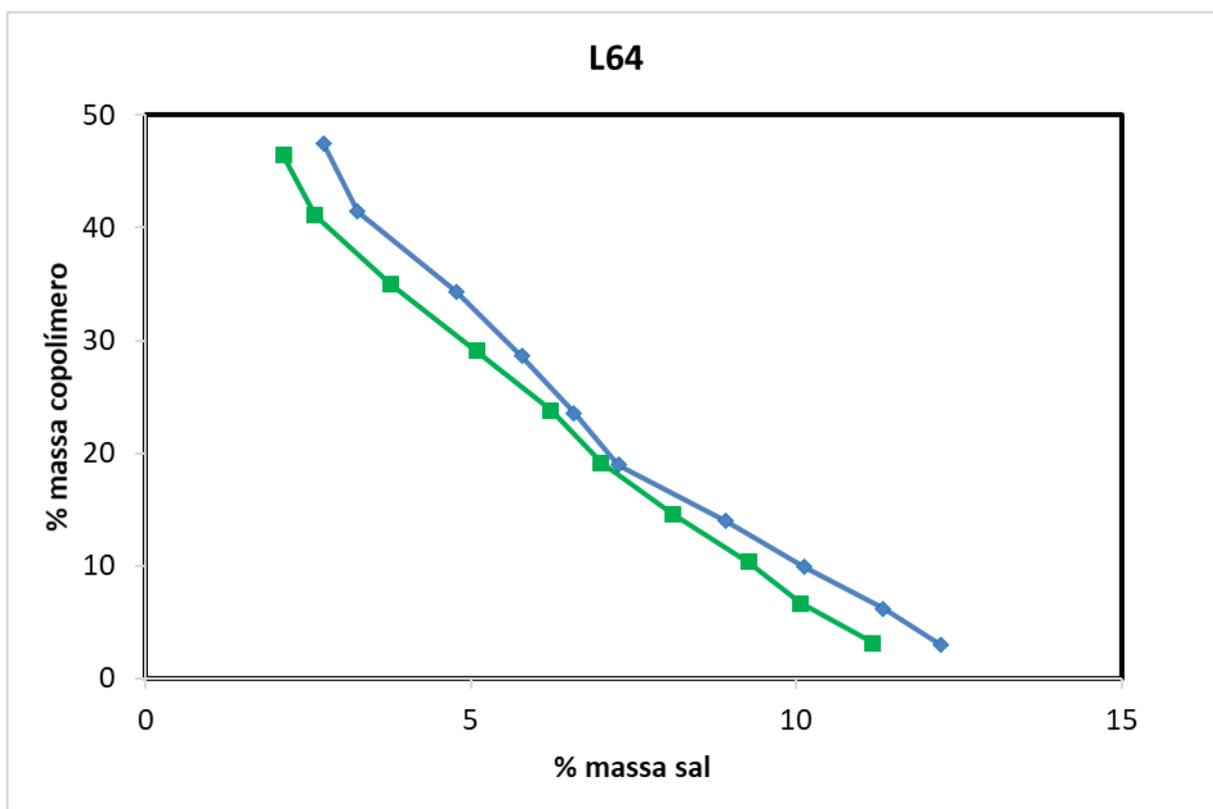


Figura A.8 – Diagramas de fase copolímero/sal a 15 °C para o copolímero F68. fosfato de potássio (■) e citrato de sódio (◆).

