



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA



**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE NaCl NA PARTIÇÃO DE FICOCIANINA NO
SISTEMA BIFÁSICO AQUOSO PEG 1500 – CITRATO DE SÓDIO**

Lurian Martins Moraes

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau
de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Fevereiro – 2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA



**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE NaCl NA PARTIÇÃO DE FICOCIANINA NO
SISTEMA BIFÁSICO AQUOSO PEG 1500 – CITRATO DE SÓDIO**

Lurian Martins Moraes

Juliana de Souza Ferreira

Érika Otha Watanabe

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau
de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Fevereiro – 2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA



**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE NaCl NA PARTIÇÃO DE FICOCIANINA NO
SISTEMA BIFÁSICO AQUOSO PEG 1500 – CITRATO DE SÓDIO**

Lurian Martins Moraes

Juliana de Souza Ferreira
Faculdade de Engenharia Química – FEQ

Érika Otha Watanabe
Faculdade de Engenharia Química – FEQ

Homologado pela coordenação do Curso de
Biotecnologia em __/__/__

Nilson Nicolau Junior

Uberlândia – MG

Fevereiro – 2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA



**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE NaCl NA PARTIÇÃO DE FICOCIANINA NO
SISTEMA BIFÁSICO AQUOSO PEG 1500 – CITRATO DE SÓDIO**

Lurian Martins Mores

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Uberlândia, de de

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela Sua graça, por ter me dado força e ânimo para não desistir e continuar lutando pelo meu sonho.

Aos meus pais, José Luiz e Mara Lúcia, e ao meu namorado, Guilherme, pela paciência, carinho, motivação e apoio, que me fizeram não desanimar nos dias difíceis.

À Prof. (a) Dra. Juliana, por ter dividido muito dos seus conhecimentos comigo e por ter me proporcionado poder trabalhar e aprender com você.

Aos meus amigos de classe que conviveram comigo durante a graduação e me ajudaram em todos os momentos.

A todos os professores que tive ao longo do curso e que compartilharam seu conhecimento e sabedoria, colaborando para meu crescimento pessoal e profissional.

A Universidade Federal de Uberlândia, pelos recursos e apoio que permitiram que esta obra fosse realizada.

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar”.

Josué 1:9

RESUMO

Ficobiliproteínas são um conjunto de proteínas pigmentadas, hidrossolúveis e fluorescentes. A ficocianina é uma proteína de coloração azul intensa e é a maior constituinte dos ficobilissomas, estando presente tanto nas cianobactérias e nas algas vermelhas. Para a extração de compostos como as ficobiliproteínas, uma alternativa é o uso de sistemas bifásicos aquosos por não causar danos a biomoléculas. Entre os polímeros, o polietilenoglicol hidrofóbico (PEG) é o mais utilizado nos estudos de sistemas bifásicos aquosos na partição de proteínas devido a sua característica de possuir carga neutra e ser inerte e a outra fase pode ser um outro polímero como dextrana, ou um sal. Os sistemas formados por sais têm sido amplamente usados. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo investigar a partição de ficocianina, produzida pela cianobactéria *Nostoc* sp, por meio de sistemas bifásicos aquosos do tipo PEG 1500-citrato de sódio, na proporção de 10%-15,9% (m/m) com a adição de NaCl, variando a concentração deste sal de 0 a 8%. Os resultados obtidos mostraram que a melhor partição de ficocianina foi na proporção de 6% de NaCl. Para este valor, foram obtidos para a FC um coeficiente de partição (K) de 0,04, uma pureza (P) de 0,11 para a fase topo e 1,11 para a fase fundo e uma recuperação de 98,3%. Portanto, comprovou-se que a adição de um sal neutro como o NaCl favorece a partição de proteínas.

Palavras-chaves: ficocianina, *Nostoc* sp, cianobactérias, recuperação de biomoléculas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos.....	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 Ficobiliproteínas.....	2
2.2 Extração e purificação de ficobiliproteínas.....	4
2.3 Recuperação por sistema bifásico aquoso (SAB).....	5
2.4 Diagrama de fases.....	6
2.5 Sistema PEG-sal.....	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
3.1 Material.....	9
3.2 Metodologia.....	9
3.2.1 Manutenção das cianobactérias.....	9
3.2.2 Extração das ficocianinas.....	10
3.2.3 Ensaios de recuperação de ficocianina – Sistema PEG-sal.....	11
3.2.4 Métodos analíticos.....	12
4. RESULTADOS.....	14
5. DISCUSSÃO.....	15
6. CONCLUSÃO.....	17
7. REFERÊNCIAS.....	17

1. INTRODUÇÃO

As ficobiliproteínas são um conjunto de proteínas pigmentadas, hidrossolúveis e fluorescentes, divididas em quatro grupos distintos: ficoeritrina, ficocianina, ficoeritrocianina e aloficocianina. Essas proteínas têm apresentado grande potencial na área biotecnológica, podendo ser aplicadas em compostos antioxidantes, anti-inflamatórios, anticancerígenos, entre outros. Além disso, hoje são consideradas produtos naturais de alto valor agregado devido a sua aplicação em diferentes áreas industriais como a farmacêutica, alimentícia e de cosméticos (PAGELS, et al, 2019).

O processo de extração e purificação das ficobiliproteínas é um dos passos mais importantes para a identificação e quantificação dessas proteínas (SILVA, 2008). Logo, têm sido analisado técnicas de biosseparação mais eficientes e economicamente mais viáveis para a produção em larga escala, que possam ter maior rendimento na recuperação e que atinjam um alto grau de pureza (SANTOS, et al, 2015).

O método de biosseparação por meio de sistema bifásico aquoso tem apresentado características atrativas, sendo este formado por polímeros solúveis em água utilizando dois polímeros ou mesmo um sal inorgânico e um polímero (GRABER, et al, 2004; SILVA; et al. 2006; TEIXEIRA, 2020). Dentre as principais vantagens no uso dos sistemas bifásicos aquosos estão a alta capacidade e rendimento, baixa toxicidade dos produtos químicos formadores de fase e potencial de aumento de escala (ASENJO, J., ANDREWS, B., 2011; COTAS, A., et al 2021; SILVA, 2019; ZHAO et al. 2014).

O polietilenoglicol hidrofóbico (PEG) é um dos polímeros mais utilizado nos estudos de SABs devido a sua característica de possuir carga neutra e ser inerte (NEMATI-KANDE et al., 2023; PEREIRA et al., 2012). O sistema PEG-SAL, apresenta vantagens que permitem sua aplicação na separação de proteínas de forma rápida e contínua. Além disso, ele oferece um menor tempo de processo, acarretando também em um menor custo (OLIVEIRA, 2006; TEIXEIRA, 2020).

Diante do exposto, este projeto propõe o estudo da recuperação de ficocianinas de *Nostoc* sp. O grupo de pesquisa em que o trabalho será desenvolvido tem estudado o sistema bifásico aquoso para a purificação de ficobiliproteínas de cianobactérias, sendo elas a *Nostoc* sp e a *Anabaena variabilis* (Cottas et al., 2021, Teixeira, 2020).

Das etapas realizadas até o momento, observou-se que a única ficobiliproteínas quantificada foi a ficocianina e sistemas aquosos de polietilenoglicol (PEG) de diferentes tamanhos moleculares (1500 e 4000) combinados com diferentes sais (citrato de sódio, sulfato de amônio e fosfato de potássio) em diferentes proporções mostraram resultados promissores. Deu-se início a avaliação do SAB com PEG 1500-citrato de sódio com adição de NaCl em quatro concentrações distintas, a fim de avaliar o efeito do NaCl na partição de ficocianina.

Os resultados deste estudo contribuirão para levantar subsídios técnico-científicos para permitir o desenvolvimento de um processo que combine potencial de recuperação sem danos a compostos bioativos.

1.1 Objetivos

De forma a alcançar o objetivo de avaliar as melhores condições para recuperar a ficocianina por sistemas bifásicos aquosos compostos de PEG 1500 + citrato de sódio, tem-se como objetivo específico:

- Investigar o efeito do NaCl (sal neutro) ao sistema bifásico aquoso com PEG 1500 + citrato de sódio para recuperação de ficocianina, após sua extração por ciclos de congelamento e descongelamento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

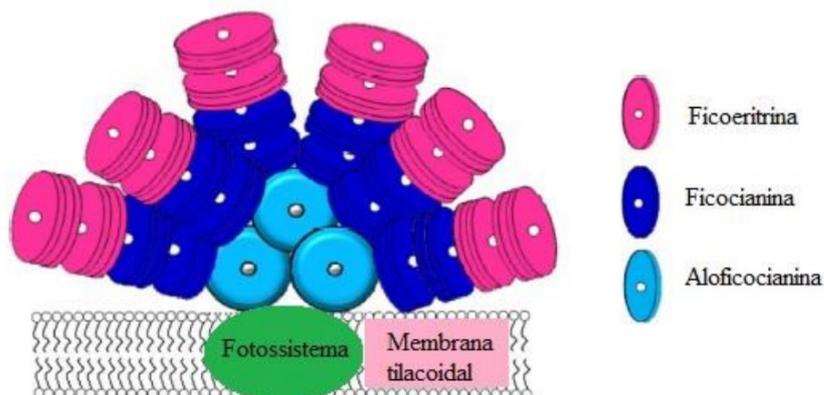
2.1 Ficobiliproteínas

Ficobiliproteínas são um conjunto de proteínas pigmentadas, hidrossolúveis e fluorescentes. São macromoléculas acessórias coletoras de luz, associadas aos chamados ficobilissomas que funcionam como componentes do aparelho fotossintético afim de otimizar a captura de luz e transferência de energia; estando presentes em cianobactérias, criptofíceas e algas vermelhas (RODRIGUES, 2017; TEIXEIRA, 2020).

De acordo com Rodrigues (2017, p. 28):

Em geral, a estrutura do ficobilissoma consiste em um núcleo (constituído por aloficocianina) rodeado por ficocianina e ficoeritrina (quando presente) organizadas na periferia da estrutura sob a forma de hastes. Sendo todas estas proteínas montadas através de interações específicas com os polipeptídeos ligantes.

Figura 1 – Estrutura do ficobilissoma.



Fonte: Castro (2018).

Com base na cor e em propriedades espectrais, as ficobiliproteínas são geralmente divididas em quatro categorias: ficocianina (FC; $\lambda_{\text{máx}} = 610 \sim 625 \text{ nm}$), aloficocianina (AFC; $\lambda_{\text{máx}} = 650 \sim 660 \text{ nm}$), ficoeritrina (FE; $\lambda_{\text{máx}} = 490 \sim 570 \text{ nm}$) e ficoeritrocianina (FEC; $\lambda_{\text{máx}} = 570 \sim 590 \text{ nm}$) (NOREÑA-CARO; BENTON, 2018; DIGNINO-LEONE, et al, 2022).

A ficocianina é uma proteína de coloração azul intensa e é a maior constituinte dos ficobilissomas, estando presente tanto nas cianobactérias e nas algas vermelha. Recentemente, observou-se que a ficocianina possui algumas propriedades terapêuticas, como ação antioxidante e tem sido usada como anti-inflamatório e hepatoprotetor (SANTIAGO-SANTOS; et al, 2004). A aloficocianina possui uma cor turquesa brilhante e detém os pigmentos ponte entre os ficobilissomas e as lamelas fotossintéticas. Já as ficoeritrinas apresentam coloração rosa intensa e a maior diversidade de cromóforos entre as ficobiliproteínas, sendo então responsável por facilitar a adaptação a mudanças ambientais, captando a luz do ambiente. Por outro lado, a ficoeritrocianina, que possui coloração roxo-azulada, é até o momento, a única que está presente exclusivamente em cianobactérias, sendo relacionada à intensidade e tipo de luz durante o crescimento (DIGNINO-LEONE, et al, 2022).

A aplicação das ficobiliproteínas tem se expandido nas áreas de cosméticos, medicamentos, alimentos, biotecnologia, entre outros. Na indústria alimentícia, a aplicação delas são como corantes naturais tem sido uma opção para substituir parcial ou completamente os corantes artificiais, reduzindo assim o risco de toxicidade dos alimentos. Já na área biotecnológica, estudos recentes mostraram a bioatividade das ficobiliproteínas como microrganismos anti-inflamatórios, antioxidantes, anticancerígenos etc.; possuindo também inúmeras aplicações em imunoenaios, histoquímica, detecção de espécies reativas de oxigênio

e atuando como agentes terapêuticos (DIGNINO-LEONE, et al, 2022; RODRIGUES, 2017). Devido a estas características, faz-se necessário atender à crescente demanda no mercado e melhorar a produção e purificação de ficobiliproteínas.

2.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE FICOBILIPROTEÍNAS

As ficobiliproteínas são pigmentos solúveis em água, extraídos como um complexo pigmento-proteína. Logo, sua extração é baseada na ruptura celular e liberação das proteínas da célula. Como a parede celular das cianobactérias é extremamente resistente, faz-se necessário o uso de diferentes técnicas de extração e purificação de ficobiliproteínas de cianobactérias.

Os métodos de extração para as ficobiliproteínas são diversos e podem ser baseados em variações na pressão osmótica, tratamentos químicos, ciclos de congelamento e descongelamento, maceração, fluido supercrítico, líquidos iônicos, extrusão, entre outros (CARLOS, 2020). A técnica de congelamento e descongelamento tem sido uma das técnicas mais estudadas para extração das ficobiliproteínas, apresentando maior quantidade de ficocianina que os demais métodos e apresentando algumas vantagens por ser um método simples, reproduzível e por não apresentar perdas significativas da capacidade biológica da proteína, embora possua dificuldade de ampliação de escala.

Dentre os fatores que afetam os métodos de extração, os que apresentam maior importância são o método de rompimento celular e razão solvente (tempo de extração, pH, temperatura, biomassa e tipo de solvente) (TEIXEIRA, 2020). Na literatura é possível identificar várias técnicas de extração de ficobiliproteínas, sendo que em alguns casos a extração pode até ser bem-sucedida e possuir altos valores de rendimento, mas podem apresentar algumas desvantagens como baixo teor de pureza e consumo energético elevado (CARLOS, 2020). Logo, a escolha do método de extração é primordial na obtenção de um produto de maior pureza, permitindo assim uma maior purificação.

Neste projeto, a ficocianina, que foi a única ficobiliproteína da *Nostoc* sp quantificada, será extraída por ciclos de congelamento e descongelamento em banho ultrassônico definido em trabalhos já desenvolvidos pelo grupo de pesquisa em projetos nesta linha de pesquisa (COTTAS et al., 2021)

A etapa de purificação das ficobiliproteínas geralmente envolve a combinação de várias técnicas, entre elas centrifugação, cromatografia, ultrafiltração, precipitação com sulfato de amônio e sistema bifásico aquoso (CARLOS, 2020; COTAS, 2021; TEIXEIRA, 2020). Como

a maior parte dos custos de produção estão nos passos de purificação, faz-se necessário o uso de técnicas de biosseparação eficientes, efetivas e econômicas para aplicação em maior escala. Ademais, estudos recentes mostraram que o sistema aquoso bifásico, pode ser usado para aumentar a pureza das ficobiliproteínas no processo de extração (TEIXEIRA, 2020).

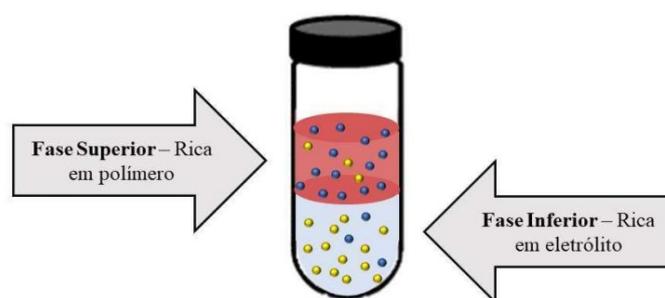
De acordo com Santiago-Santos et al. (2004):

O grau de pureza obtido com a purificação é quem determina a aplicação das ficobiliproteínas. Ficobiliproteínas com $A_{430}/A_{280} \leq 1,0$ são consideradas de baixa pureza, enquanto as com $A_{430}/A_{280} \geq 4,0$ são consideradas de alta pureza.

2.3 RECUPERAÇÃO POR SISTEMA BIFÁSICO AQUOSO (SAB)

Sistemas aquosos bifásicos são formados por polímeros solúveis em água utilizando dois polímeros ou mesmo um sal inorgânico e um polímero, que quando misturados em determinadas faixas de concentração e temperatura dividem-se em duas fases com composições diferentes (GRABER, T. et al, 2004; SILVA; et al. 2006). Após a separação das fases, o sistema de duas fases aquosas apresenta uma fase superior rica em polímero e uma fase inferior rica em eletrólito, sendo que ambas as fases são maioritariamente formadas por água (FELISBERTO, 2016). A formação deste sistema só acontece em condições específicas como de temperatura, concentração dos componentes, pressão e as condições termodinâmicas, sendo estas específicas para cada sistema bifásico aquoso (FARIA, 2021).

Figura 2 – Representação de um sistema bifásico aquoso.



Fonte: Adaptado de FARIA, 2021.

Estes sistemas têm sido empregados com a proposta de desenvolver bioprocessos para a recuperação e purificação de diversos produtos biológicos, incluindo as proteínas (ASENJO, J., ANDREWS, B., 2011). Este sistema apresenta vantagens com relação aos outros métodos mais comuns de extração e purificação como os de cromatografia, extração líquido-líquido, eletroforese etc. e por isso, têm ganhado espaço e notoriedade. Dentre as vantagens estão a

alternativa de operação contínua, facilidade de integração do processo, alta capacidade e rendimento, menor tempo de processo, baixo consumo de energia, baixa toxicidade dos produtos químicos formadores de fase, biocompatibilidade e potencial de aumento de escala. Além disso, como o componente majoritário é a água, apresenta menos impacto para o meio ambiente, utilizando solventes dentro da perspectiva da química verde. Logo, resulta em um ambiente ameno, favorável e estável para uso com biomoléculas, sendo que a ocorrência de perda de atividade biológica dificilmente ocorre sob essas condições (ASENJO, J., ANDREWS, B., 2011; COTAS, A., et al 2021; SILVA, 2019; ZHAO et al. 2014).

Os sistemas bifásicos aquosos apresentam grande dependência de diversos fatores, como a massa molar do polímero, efeito do pH do meio, efeito cátion, composição da mistura, temperatura, natureza dos componentes e do eletrólito, constituição do líquido iônico, dentre outros fatores dos quais os principais que influenciam a posição do equilíbrio em um sistema de duas fases aquosas são a massa molar do polímero, o tipo de sal e a concentração dos componentes. Por exemplo, muitas vezes, uma concentração suficientemente alta de sal em um único sistema polímero-água pode induzir a separação de fases para produzir uma fase inferior rica em sal e pobre em polímero que coexiste com a fase superior pobre em sal e rica em polímero (HATTI-KAUL, 2001). Portanto, faz-se necessário a construção de diagramas de fase, pois estes expressam as concentrações dos componentes do sistema (JUNIOR, A. e KILIKIAN, B. 2005; SILVA; et al. 2006).

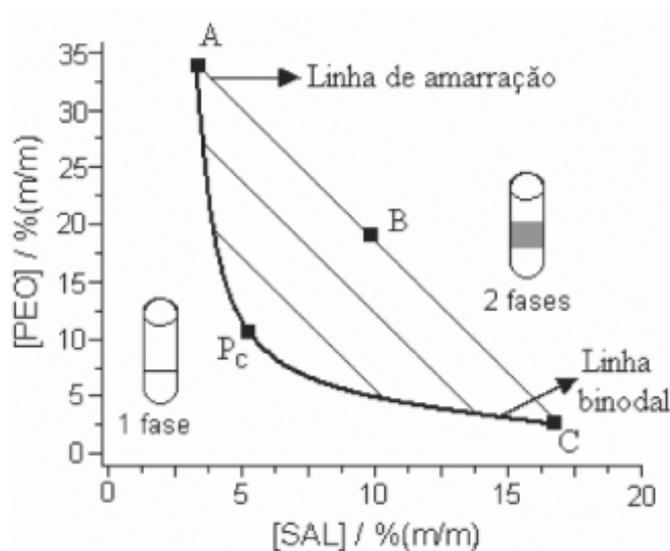
2.4 DIAGRAMA DE FASES

O diagrama de fases demarca a área de trabalho para um determinado sistema de duas fases e é uma impressão digital particular desse sistema sob condições definidas como, temperatura, pH e concentração do sal. Dentre as informações que podem ser obtidas a partir deste diagrama são: a concentração de componentes formadores de fase necessária para um sistema com duas fases que estão em equilíbrio, a concentração subsequente de componentes de fase nas fases superior e inferior e a razão entre os volumes das fases (HATTI-KAUL, 2000).

De acordo com HATTI-KAUL (2000):

Presente no diagrama está uma curva binodal, que divide uma região de concentrações de componentes que formarão duas fases aquosas imiscíveis (ou seja, acima da curva) daquelas que formarão uma fase (ou seja, na curva e abaixo dela). As coordenadas para todos os sistemas potenciais estarão em uma linha de ligação; a linha de amarração conecta dois nós no binodal, que representam a concentração final de componentes de fase na fase superior e inferior.

Figura 3 – Representação de um diagrama de fase expresso em coordenadas retangulares de um SAB formado por um polímero e um sal.



Fonte: SILVA et al, 2006.

A linha binodal identifica onde a região do sistema é homogêneo ou bifásico. A posição da binodal varia de acordo com o tipo e a massa molar do polímero, a natureza química do sal, pH do meio e a temperatura. Diferentes métodos são utilizados para obtenção da linha binodal, sendo comumente utilizados os de titulação turbidimétrica e de análise da composição das fases (FELISBERTO, 2016; SILVA, et al. 2006).

As linhas de amarração ligam os pontos no diagrama e determina a composição global do sistema, fornecendo a concentração dos solutos nas duas fases em equilíbrio. A obtenção destas linhas é de grande importância, pois são formadas por pontos de composição global do sistema. Assim, fornecem fases superiores com propriedades termodinâmicas intensivas como viscosidade, composição, densidade etc., idênticas, porém com propriedades extensivas como volume, massa etc., diferentes. O mesmo princípio aplica-se às fases inferiores (SILVA, et al. 2006; TEIXEIRA, 2020).

No ponto crítico, representado por Pc na figura 3, as propriedades físico-químicas, como volume e composição, são teoricamente iguais. Logo, quanto mais próximo do ponto crítico de um sistema, menor será a diferença das composições das fases. Sistemas de composição próxima ao ponto crítico são instáveis e devem ser evitados, pois pequenas mudanças podem levar o sistema à região monofásica (JUNIOR, A. e KILIKIAN, B. 2005; SILVA, 2019).

A relação de equilíbrio entre as fases superior e inferior no SAB é determinada pelo coeficiente de partição (K). O coeficiente de partição (K) é definido como: $K = \frac{C_t}{C_b}$, onde C_t e C_b representam as concentrações de equilíbrio da proteína particionada nas fases superior e inferior, respectivamente. Os resultados para os valores de K são analisados da seguinte forma: $K=1$: concentração de proteínas igual em ambas as fases, $K>1$: proteína particionou preferencialmente para a fase superior, e $K<1$: a proteína se concentrou na fase inferior. Então, quanto mais afastado de 1 K estiver, melhor será a recuperação da proteína.

As propriedades de hidrofobicidade, potencial elétrico, tamanho molecular, afinidade bioespecífica e conformação podem ser exploradas individualmente ou em conjunto para alcançar uma separação eficaz de uma certa proteína. Com base nos estudos já realizados, agora é reconhecido que vários fatores podem influenciar na partição, como: comprimento da linha de amarração, o peso molecular e tamanho dos polímeros, concentração do polímero e dos sais, força iônica do sal e pH (ASENJO; ANDREWS, 2011; SILVA, et al. 2008; TEIXEIRA, 2020).

2.5 SISTEMA PEG-SAL

Entre os polímeros, o polietilenoglicol hidrofóbico (PEG) é o mais utilizado nos estudos de sistemas bifásicos aquosos devido a sua característica de possuir carga neutra e ser inerte. A formação do sistema PEG-SAL foi observada pela primeira vez nos anos 50, por Albertsson, e desde então, o sistema PEG-SAL está sendo empregado na separação de proteínas em larga escala (NEMATI-KANDE et al., 2023; PEREIRA et al., 2012; SBRUZZI, 2010). Devido as suas propriedades, o PEG tem diversas aplicações em farmacêuticas, bioquímicas e biológicas.

O sistema PEG-SAL, quando comparado a outros sistemas apresenta vantagens que permitem sua aplicação na separação de proteínas de forma rápida e contínua. Aliado ao menor tempo de processo, o sistema PEG-SAL também apresenta um menor custo. Juntas, essas características estão correlacionadas a menor viscosidade e a maior diferença de densidade entre as fases. Por outro lado, apresentam algumas limitações como a desnaturação de biomoléculas em concentrações mais altas de sais (OLIVEIRA, 2006; TEIXEIRA, 2020).

A formação das fases no sistema PEG-sal está diretamente correlacionada com o efeito do sal, sais estes hidrofílicos, tais como sulfato, nitrato e fosfato, que podem ser utilizados na formação do sistema bifásico aquoso. Todavia, os sais de citrato são uma alternativa melhor visando a extração de materiais biológicos, visto que apresenta uma baixa toxicidade e alta

solubilidade. Além disso, devido as características do sal, a partição de proteínas em ambas as fases está diretamente relacionada à hidrofobicidade (NEMATIKANDE et al., 2023).

O efeito *salting out* – precipitação de proteínas em altas concentrações de sal – nos sistemas PEG-SAL podem atuar no aumento da linha de amarração ao retirar as proteínas da fase sal para a fase rica em PEG. Assim, se a solubilidade da proteína na fase rica em PEG não for satisfatória, pode ser que estas precipitem na interfase. Devido a isso, uma alternativa a ser analisada é a adição de um sal neutro como o NaCl, modificando o tipo de sal, a massa molar do PEG e a força iônica (AZEVEDO et al., 2009; BASKARAN et al., 2018; TEIXEIRA, 2020; SBRUZZI, 2010).

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Material

A cianobactéria utilizada neste trabalho, *Nostoc* sp. PCC 7423 foi gentilmente doada pelo laboratório de Cianobactérias e Fitotoxinas, do Instituto de Oceanografia da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) (Rio Grande, Brasil). Os demais reagentes usados para a manutenção das cepas e realização experimental foram adquiridos de fornecedores comerciais.

3.2 Metodologia

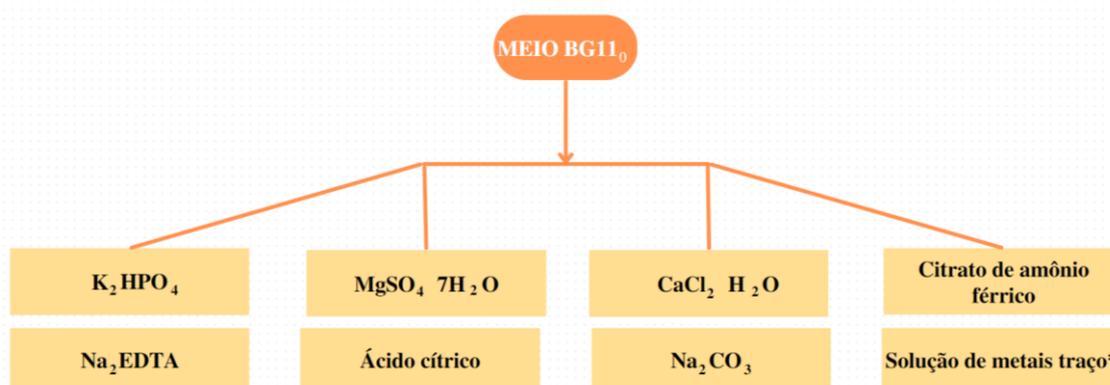
3.2.1 Manutenção das Cianobactérias

A cianobactéria *Nostoc* sp. será cultivada em meio basal BG11₀ (RIPPKA; DERUELLES; WATERBURY, 1979) em Erlenmeyers de 500 mL, a 30 °C em câmaras de fotoperíodo de 12h (escuro/claro) e luminosidade de aproximadamente 1550 lux, em ambiente aeróbico e com repiques a cada 15 dias.

A cepa de *Nostoc* sp mantida em meio basal BG11₀ (RIPPKA et al., 1979) foi utilizada para o ensaio de avaliação do efeito de NaCl na partição de ficocianina no sistema bifásico aquoso PEG-sal, a fim de melhorar a recuperação e purificação dos pigmentos extraídos.

A preparação do meio basal BG11₀ foi feita na proporção de 1L de água destilada para 1mL oito soluções diferentes, conforme apresentado na Figura 4.

Figura 4 – Soluções que compõem o meio basal BG11₀.



*ZnSO₄ 7H₂O, MnCl₂ 4H₂O, Na₂MoO₄ 2H₂O, CuSO₄ 5H₂O, CoCl₂ 6H₂O e H₃BO₃.

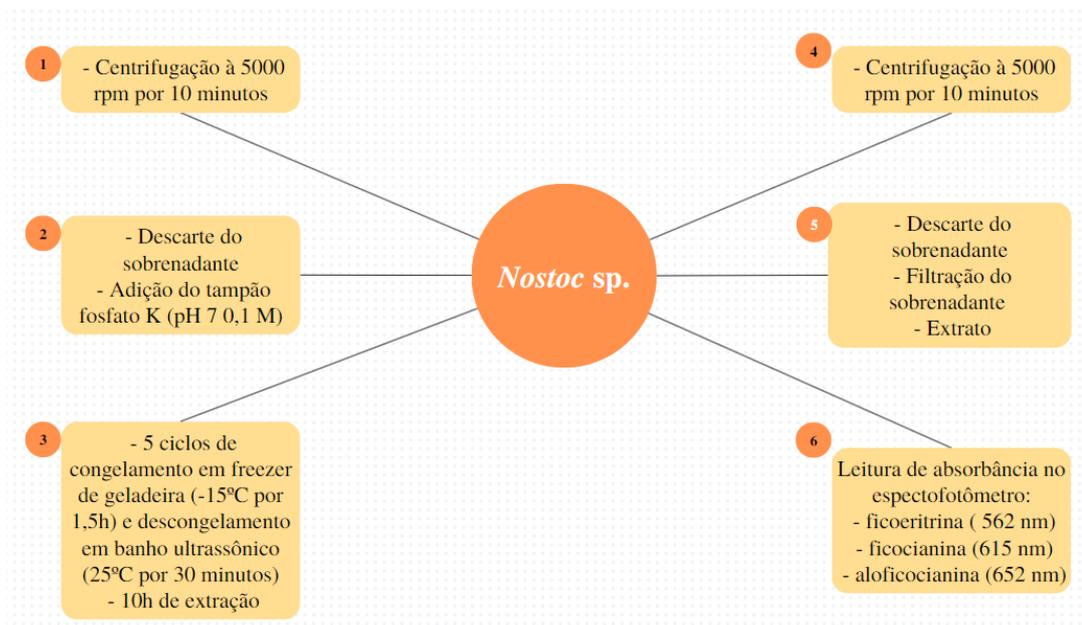
Fonte: A autora.

Com o meio basal BG11₀ devidamente preparado, este foi levado para autoclavagem para completa esterilização. Finalizado o processo de autoclavagem, o meio permaneceu em temperatura ambiente até completo resfriamento para, assim, serem realizados os repiques. Por fim, o restante do meio foi armazenado em geladeira à temperatura de 0°C a 8°C.

3.2.2 Extração das ficocianinas

Para os ensaios de extração da ficocianina, volumes da solução-mãe (manutenção da cepa) serão centrifugados e ao precipitado será adicionada solução aquosa de fosfato, 0,1 M e pH 7,0, usada como solvente. A ficocianina será extraída 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 (COTTAS et al., 2021). Em seguida, as amostras serão centrifugadas (5000 rpm), e o sobrenadante será filtrado através de filtros de 0,45 µm. Este filtrado será analisado para quantificação do teor de ficocianina e usado nos ensaios de recuperação por sistema bifásico aquoso.

Figura 5 – Etapas da preparação para a extração de ficocianina.



Fonte: Adaptado de TEIXEIRA, 2021.

3.2.3 Ensaios de recuperação de ficocianina – Sistema PEG-sal

Para os testes de sistema bifásico aquoso foi utilizado o sal de citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$). A proposta foi testar, pelo menos, quatro novas proporções entre citrato-sal, além das que já foram testadas em trabalhos anteriores (COTTAS, 2019), a fim de analisar os efeitos e as diferenças que os sais causam no SAB.

Primeiramente, foram preparadas soluções estoque de concentração conhecida para os seguintes componentes do sistema bifásico aquoso:

- Solução de PEG 1500 (50% m/m – solução feita a partir de 50% para 50%), sendo 65g de PEG e 65g de água destilada;
- Solução de citrato de sódio (para o branco 30% m/m, 32,45% m/m, 33,83% m/m e 35,33% m/m, para as concentrações de NaCl de 0%, 4%, 6% e 8%, respectivamente). De forma a manter sempre fixa a quantidade em massa de citrato de sódio de 15,9% no sistema bifásico aquoso.

As proporções de extrato foram mantidas constantes em todos os sistemas, tendo um total de 20g. Variou-se então, a composição de NaCl, sendo elas de 0%, 4%, 6% e 8%. Antes do preparo do sistema bifásico aquoso, o extrato foi analisado referente à pureza, a fim de ser comparado com os resultados após a recuperação.

Os tubos Falcon contendo a mistura: amostra + solução PEG-citrato + NaCl foram agitados em vórtex (1 min) e, em seguida, mantidos em banho termostatizado (15°C) até o equilíbrio. As fases superior e inferior serão separadas e analisadas por espectrofotometria para a quantificação da concentração de ficocianina.

Tabela 1 – Proporções dos sistemas bifásicos aquosos PEG 1500 (10%, m/m) – citrato de sódio (15,9%, m/m) com adição de NaCl (de 0%, 4%, 6% e 8%, m/m).

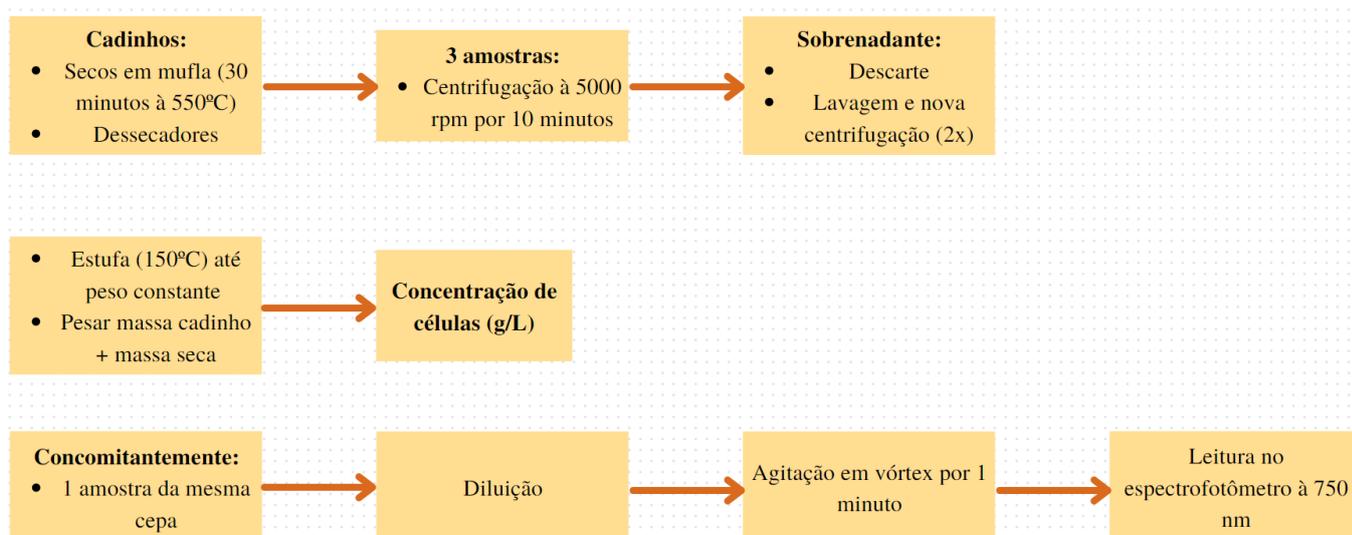
*Para cada uma das proporções, os sistemas foram realizados todos em triplicata.

PROPORÇÕES SAB CITRATO DE REFERÊNCIA				
	PEG (g)	CITRATO (g)	EXTRATO (g)	NaCl (g)
1º	4	10,6	5,4	0
2º	4	9,8	5,4	0,8
3º	4	9,4	5,4	1,2
4º	4	9	5,4	1,6

3.2.4 Métodos analíticos

a. Concentração celular: foi determinada por análise de absorbância da alíquota do meio de cultivo em espectrofotômetro e correlacionando com a concentração em massa seca de célula ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Esta medida é necessária para quantificar a concentração de células a amostra usada para extração da ficocianina. As etapas do procedimento da concentração celular são apresentadas na Figura 6.

Figura 6 – Etapas do processo de concentração celular e leitura de absorbância.



Fonte: Adaptado de TEIXEIRA, 2020.

b. Concentração de FBP: As amostras após as extrações ou separação das fases dos ensaios de recuperação, serão analisadas por espectrofotometria, e a concentração de ficocianina (mg.mL^{-1}) será calculada de acordo com as Equação 2 (BENNETT; BOGARD, 1973) e a pureza é dada pela Equação 3 (ABALDE et al., 1998).

$$C_{FC} = \frac{A_{615} - 0,474(A_{652})}{5,34} \quad (2)$$

$$P = \frac{A_{652}}{A_{280}}$$

$$P = \frac{A_{FBP}}{A_{280}} \quad (3)$$

Sendo A_{615} , A_{652} as absorvâncias nos comprimentos de onda 615 nm, 652 nm e A_{280} absorvância correspondente à proteína total.

c. Determinação de partição por SAB: A partir dos dados de concentração da ficocianina, calcula-se 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 4,

$$K = \frac{(C_{FBP})_{topo}}{(C_{FBP})_{fundo}} \quad (4)$$

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.

A razão de volume entre as fases (Vr), expressa pela razão entre o volume da fase topo (V_{TOPO}) e volume da fase fundo (V_{FUNDO}) no SAB, definida pela Equação 5 que é usada para determinar a recuperação ($R(\%)$) da ficocianina, encontrada preferencialmente em uma das fases, pela Equação 6 (BASKARAN et al., 2018).

$$Vr = \frac{V_{TOPO}}{V_{FUNDO}} \quad (5)$$

$$R(\%) = \frac{100}{1+(K.Vr)} \quad (6)$$

4. RESULTADOS

A avaliação da partição de FC por meio do SAB do tipo PEG-sal, foi demonstrada variando-se a concentração de NaCl adicionada ao sistema PEG 1500 (10%, m/m)-citrato de sódio (15,9%, m/m). As concentrações de NaCl foram investigadas nas proporções de 0% (m/m), 4% (m/m), 6% (m/m) e 8% (m/m), e os resultados são apresentados da Tabela 2.

A partir dos dados apresentados, é possível verificar que a FC migrou para a fase fundo, ou seja, a parte sal, corroborando os valores obtidos de coeficiente de partição (K). Quanto menor for o valor de K, mais a FC se concentrou na fase fundo. Logo, os menores valores de K foram observados nas concentrações de 4 e 6% de NaCl. Além disso, o aumento da concentração de NaCl indica que houve favorecimento na partição da FC no sistema PEG 1500-citrato de sódio, quando comparado ao SAB sem o sal neutro.

Tabela 2 – Resultado da purificação por meio do sistema bifásico aquoso PEG 1500-citrato de sódio + NaCl.

%NaCl	PM PEG	K-FC¹	P-FC²	R FC(%)³	Vr⁴
0	1500	0,25	0,26 - 0,97	89,4	0,47
4	1500	0,03	0,27 - 0,58	98,6	0,51
6	1500	0,04	0,11 - 1,11	98,3	0,45
8	1500	0,29	0,36 - 0,73	88,8	0,43

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

Os valores obtidos para pureza (P) na fase fundo não seguiram um padrão com relação ao aumento da concentração de NaCl. Na concentração de 0% de NaCl, a pureza foi de 0,97, enquanto na concentração de 4% houve uma diminuição para 0,58. Por outro lado, o melhor

valor de pureza foi identificado no SAB contendo 6% de NaCl (1,11), voltando a diminuir atingindo um valor de 0,43 para o SAB com 8% de NaCl.

Com relação à recuperação (R), observou-se a mesma tendência do coeficiente de partição (K), sendo que os maiores valores de recuperação foram observados nas concentrações de 4 e 6% de NaCl, com 98,6 e 98,3%, respectivamente.

De acordo com estes dados, observou-se que houve um efeito positivo na partição da ficocianina na proporção de 6% de NaCl. Para este valor, foram obtidos para a FC um coeficiente de partição (K) de 0,04, uma pureza (P) de 0,11 para a fase topo e 1,11 para a fase fundo e uma recuperação de 98,3%.

5. DISCUSSÃO

Há uma concentração máxima de NaCl que favorece a partição de proteínas, visto que em alguns casos a adição de NaCl muitas vezes muda a partição de proteínas alvo e contaminantes na mesma direção, além de poder desnaturar as proteínas (GU; GLATZ, 2007). Assim, a escolha dos sais para o SAB depende da capacidade de promover interações hidrofóbicas entre biomoléculas. Logo, a mudança do sistema de fases gera um efeito no comportamento da proteína particionada, levando a diferença de potencial elétrico em as fases, promovendo assim uma diferença de hidrofobicidade (GOJA, et al.; TEIXEIRA, 2020).

Bradoo, et al. (1999) avaliou o particionamento de lipases de *Bacillus stearithermophilus* SB-1 em sistema bifásico aquoso com a presença de eletrólitos, evidenciando que quando adicionado 3% de NaCl ao sistema, a mistura de lipases particionou completamente para a fase superior do PEG em pH 7,0 com uma purificação de 1,45 vezes. Gu e Glatz (2007) observaram que o valor de K da lisozima aumenta com cerca de 4,5% de adição de NaCl, particionando totalmente a lisozima para a fase superior. Por outro lado, a adição de mais NaCl apenas empurra a proteína de milho para a fase superior, além de diminuir o fator de purificação.

Segundo Goja (2013) há diversos fatores que influenciam o particionamento de biomoléculas nos SABs. As características do PEG que incluem concentração, peso e tamanho são fatores de relevância importante nas propriedades de formação de fase. Por exemplo, quanto maior o peso molecular do PEG, menor é a concentração necessária para a separação. O impacto da concentração de sal tem sido estudado, a fim de avaliar o aumento da concentração de sal que pode aumentar os coeficientes de partição na fase superior. Outros fatores como o tipo de

sal e o impacto do pH também implicam na partição de proteínas, visto que o sal ajuda a promover as interações hidrofóbicas e o pH afeta a carga da proteína alvo.

SARAVANAN, et al. (2008) estudou o a influência do peso molecular, pH e temperatura em SAB polietilenoglicol-poliácido acrílico (PEG-PAA). Ele observou que a partição de proteínas no sistema PEG-PAA é dependente do peso molecular do PEG, já que a partição foi maior quando a massa molecular o PEG foi menor. Também se notou que o coeficiente de partição diminui com o aumento da temperatura. Por outro lado, o coeficiente de partição aumentou com o aumento do pH do sistema.

Estudos mostram citratos como substitutos de sais inorgânicos como o citrato de sódio, que forma sistemas aquosos de duas fases com PEG que são adequados para a extração de biomoléculas. Por isso, os sais de citrato têm ganhado mais espaço entre os SABs por serem uma alternativa melhor visando a extração de materiais biológicos, já que possui uma baixa toxicidade, alta solubilidade e é biodegradável, podendo ser descartado em estações de tratamento de efluentes biológicos (RAHIMPOUR; BAHARVAND, 2009).

A purificação de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* ATCC 9642 em SABs do tipo PEG 6000 com 5% de tampão citrato foi abordada por Trentini, 2014. Os resultados apresentados para o PEG-citrato foram os melhores para fator de purificação e recuperação das enzimas na fase topo, mostrando que pode ser um método eficiente para o particionamento e recuperação de pectinases. Cottas (2019) também avaliou a partição de ficocianina em SAB do tipo PEG 1500-citrato de sódio e obteve uma recuperação de 76,67% quando o SAB foi composto por 13% de PEG e 14% de sal.

O grau de pureza da FC, geralmente, é classificado por meio de sua absorbância, A₆₂₀ nm. A pureza da FC para grau alimentício é de 0,7, para grau reativo de 3,9 e de 4,0 para grau analítico (PATIL et al., 2006; PORAV, 2020). Patil, et al. (2006) propôs a purificação de FC por meio de duas metodologias, sistemas de duas fases aquosas e cromatografia de troca iônica, respectivamente; sendo o valor obtido da purificação de 5,22. Teixeira (2020) também avaliou a recuperação de FC por meio se SAB PEG 1500-fosfato de potássio com adição de NaCl e obteve um grau de pureza de aproximadamente 1,27, quando a proporção de NaCl adicionada ao sistema foi de 6%.

Segundo Papadaki (2017) para a recuperação eficiente da FC, o nutriente deve ser extraído da biomassa de microalgas. Um método muito utilizado para pré-tratamento é a desidratação, isto por causa do seu alto teor de umidade, porém, a desidratação também pode

levar à diminuição do teor de FC. Bermejo e Ramos (2012) utilizaram o método de liofilização para estabilizar a FC para extração e posteriormente avaliar a recuperação dela por meio de cromatografia de adsorção em leito expandido, obtendo uma recuperação geral de 59%.

6. CONCLUSÃO

Através deste estudo, mostrou-se que a adição de NaCl ao sistema bifásico aquoso PEG 1500(10%, m/m) e citrato de sódio (15,9%) favoreceu a partição de ficocianina obtida da cianobactéria *Nostoc* sp.

Ao variar as concentrações do NaCl entre 0, 4%, 6% e 8% em massa, foi visto que a recuperação aumenta de 0 a 6%, atingindo o máximo em 6%.

Nesta condição de 6% (m/m) de NaCl, foram obtidos um coeficiente de partição (K) de 0,04, uma pureza (P) de 1,11 para a fase fundo e uma recuperação de 98,3%.

7. 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.

ASENJO, Juan A., ANDREWS, Barbara A. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. **Journal of Chromatography A**, vol 1218, Issue 49, 9 December 2011, pages 8826-8835. DOI <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.

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

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.

BERMEJO, Ruperto; RAMOS Amparo. Pilot scale recovery of phycocyanin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. **Chromatographia**, vol. 75, march 2012, pages 195-204. DOI <https://doi.org/10.1007/s10337-012-2200-1>

BERNARDO, Sérgio. Partição dos aminoácidos L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano, e da proteína insulina humana, em sistemas aquosos bifásicos contendo polímeros, copolímeros e sais. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)** – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

BRADDOO, S; SAXENA, R.K; GUPTA, R. Partitioning and resolution of mixture of two lipases from *Bacillus stearothermophilus* SB-1 in aqueous two-phase system. **Process Biochemistry**, vol. 35, october 1999, pages 57-62.

CARLOS, Thalita Adrielly Viana. Extração pressurizada de ficobiliproteínas da microalga *Arthrospira platensis* e avaliação da sua atividade antioxidante e citotoxicidade in vitro em linhagens cancerígenas. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)** – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.

CASTRO, Felipe Carolino de. Extração sólido-líquido de ficocianina de *Arthrospira platensis* usando líquido iônico prótico (2-HEAF): modelagem dos dados experimentais. **Monografia de Graduação**, Fortaleza, 2018.

COSTA, Angélica Ribeiro da. Partição de lactoferrina em sistemas aquosos bifásicos. **Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)** – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia, 2010.

COTTAS, A. et al. Evaluation of extraction methods and purification by aqueous two-phase systems of phycocyanin from *Anabaena variabilis* and *Nostoc sp.* **Brazilian Journal of Chemical Engineering** 38, 617-627 (2021). DOI <https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s43153-021-00131-4>

DAGNINO-LEONE, J. et al. Phycobiliproteins: Structural aspects, functional characteristics, and biotechnological perspectives. **Computation and Structural Biotechnology Journal**, vol. 20, 2022, pages 1506-1527. DOI <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.02.016>

ERIKSEN, Niels T. Production of phycocyanin – a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 80, 1-14, 2008. DOI <https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s00253-008-1542-y>

FARIA, Mayara Teodoro. Síntese verde de nanopartículas de ouro: detecção e quantificação de íons prata. **Dissertação (Mestre de pós-graduação em Engenharia Química)** – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2021.

FELISBERTO, Nehander Carlos Mendes. Novos dados de equilíbrio líquido-líquido para sistemas aquoso bifásico formados por polímero e eletrólito. **Trabalho de conclusão de curso (Licenciado em Química)** – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2016.

GRABER, T.A. et al. Liquid-liquid equilibrium of the aqueous two-phase system water + PEG 4000 + lithium sulfate at diferente temperatures – Experimental determination and correlation. **Journal of Chemical&Engineering Data** 2004 49(6), 1661-1664. DOI 10.1021/je0499216.

GU, Zhengrong; GLATZ, Charles E. Aqueous two-phase extraction for protein recovery from corn extracts. **Journal of Chromatography B**, vol. 845, january 2007, pages 38-50.

HATTI-KAUL, Rajni. Aqueous Two-Phase Systems. **Molecular Biotechnology**, volume 19, 2001, pages 269–277.

HATTI-KAUL, Rajni. Aqueous Two-Phase Systems – Methods and Protocols. **Humana Press Inc**, 2000.

MENEGOTTO, A. L. L et al. Utilização de sistema bifásico aquoso para recuperação de proteínas de *Spirulina Platensis*. **5º Congresso Brasileiro de Química**, João Pessoa, PB. ISBN 978-85-85905-25-5.

NEMATI-KANDE, Ebrahim, et al. Phase Diagrams of PEG 1000, 1500, 4000, 6000 + Lithium Citrate + Water ATPSs, and the Partitioning of Salbutamol at T = 298.15 K. **Scientific Reports**, vol. 13, nº 1, janeiro de 2023, p. 1045. DOI <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28046-9>.

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.

OLIVEIRA, Mayra C.; FILHO, Manoel A.; FILHO, Pedro A. Phase equilibrium and protein partitioning in queous two-phase systems containing ammonium carbamate and block copolymers PEO-PPO-PEO. **Biochemical Engineering Journal**, Vol 37, Issue 3, 15 December 2007, pages 311-318. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.05.010>

OLIVEIRA, Rosana Moura de. Equilíbrio de fases de sistemas bifásicos compostos por polietilenoglicol, sulfato de zinco, sulfato de cobre e citrato de sódio sob diferentes temperaturas. **Tese de Pós-Graduação**, Viçosa, Minas Gerais, 2006.

PAGELS, F. et al. Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, volume 37, Issue 3, May-Jun 2019, pages 422-443. DOI <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.010>.

PATIL, Ganapathi, et al. Method to obtain C-phycoyanin of high purity. *Journal of Chromatography A*, vol 1127, 15 september 2006, pages 76-81. DOI <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.073>

PESSOA JR, Adalberto; KILIKIAN, Beatriz Vahan. Purificação de produtos biotecnológicos. Barueri, SP: Manole, 2005.

PORAV, Alin Sebastian, et al. Sequential aqueous two-phase system for simultaneous purification of cyanobacterial phycobiliproteins. *Bioresource Technology*, vol 315, november 2020, 123794. DOI <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123794>

RAHIMPOUR, Farshad; BAHARVAND, Ali Reza. Phase Equilibrium in Aqueous Two-phase Systems Containing Poly (propylene glycol) and Sodium Citrate at Different pH. *International Science Index, Chemical and Molecular Engineering*, vol. 3, 2009.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J. B. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, volume. 111, issue 1, 1979, pages 1–61.

RODRIGUES, Renata Débora Pinto. Extração e purificação de ficobiliproteínas de *Spirulina (Arthrospira) platensis* com líquidos iônicos próticos. **Dissertação (Doutorado em Engenharia Química)** – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

SANTIAGO-SANTOS, M.C. et al. Exyraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. **Process Biochemistry**, volume 39, Issue 12, 29 October 2004, pages 2047-2052. DOI <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.10.007>

SANTOS, T. C. et al. Purificação de lipase produzida a partir *Yarrowia lipolytica* por meio do sistema aquoso bifásico e ultrafiltração. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, fev 2015, vol. 1 num. 2, ISSN 2359-1757.

SANTOS, V. C. et al. Avaliação da influência do emprego de termosseparação na destoxificação de hidrolisado de biomassa vegetal empregado na obtenção de produto biotecnológico. **X Encontro Latino-Americano de Iniciação Científica e VI Encontro Latino-Americano de Pós-Graduação** – Universidade do Vale do Paraíba, 2009.

SARAVANAN, Settu; et al. Aqueous two-phase poly (ethylene glycol) – poly (acrylic acid) system for protein partitioning: Influence of molecular weight, pH and temperature. **Process Biochemistry**, vol. 43, september 2008, pages 905-911.

SBRUZZI, Dalva. Análise da viabilidade econômica da purificação da bromelina das folhas de curauá em sistema bifásico aquoso. **Dissertação de Mestrado**, Campinas, São Paulo, 2010.

SILVA, Larissa Alburnio. Estudo do processo biotecnológico de produção, extração e recuperação do pigmento ficocianina da *Spirulina platensis*. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)** – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SILVA, M.C.H. et al. Sistema aquoso bifásico: uma alternativa eficiente para extração de íons. **Química Nova** 29 (6), dezembro 2006. DOI <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000600031>

SILVA, Michele Dorcília de Oliveira. Equilíbrio líquido-líquido em sistema bifásico formado por [Bmim] BF₄ + MgSO₄ + água em diferentes temperaturas. **Dissertação (Mestrado em Química)** – Universidade Federal de Alfenas, 2019.

SONANI, R.R. et al. Recent advances in production, purification and applications of phycobiliproteins. **World Journal of Biological Chemistry**, 26 fev 2016; 7(1): 100-109. DOI 10.4331/wjbc.v7.i1.100

TEIXEIRA, Leonel da Silva. Equilíbrio líquido-líquido de sistemas aquosos constituídos por copolímero tribloco e sal em diferentes temperaturas. **Dissertação (Mestre de pós-graduação em Engenharia Química)** – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

TEIXEIRA, Thales Azevedo. Produção de Ficocianina de *Nostoc sp* e *Anabaena variabilis* e recuperação por sistemas aquosos bifásicos. 2020. 139 f. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)** – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2021. DOI <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.748>

TRENTINI, Márcia Maria Santin. Purificação de pectinases produzidas por *Aspergillus niger* ATCC 9642 em sistemas aquosos bifásicos e precipitação por solventes orgânicos. **Tese de doutorado** em Engenharia de Alimentos, Erechim, 2014.