

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Extração assistida por ultrassom e purificação de
ficocianinas da *Arthrospira (Spirulina) platensis***

Dissertação de Mestrado

Ingrid Rocha Teixeira

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Extração assistida por ultrassom e purificação de
ficocianinas da *Arthrospira (Spirulina) platensis***

Ingrid Rocha Teixeira

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Química como requisito para obtenção do título de
Mestre em Engenharia.

Orientadora: Dr.^a Ligia Damasceno Ferreira Marczak

Co-orientadora: Dr.^a Débora Pez Jaeschke

Colaboração: Dr.^a Giovana Domeneghini Mercali

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

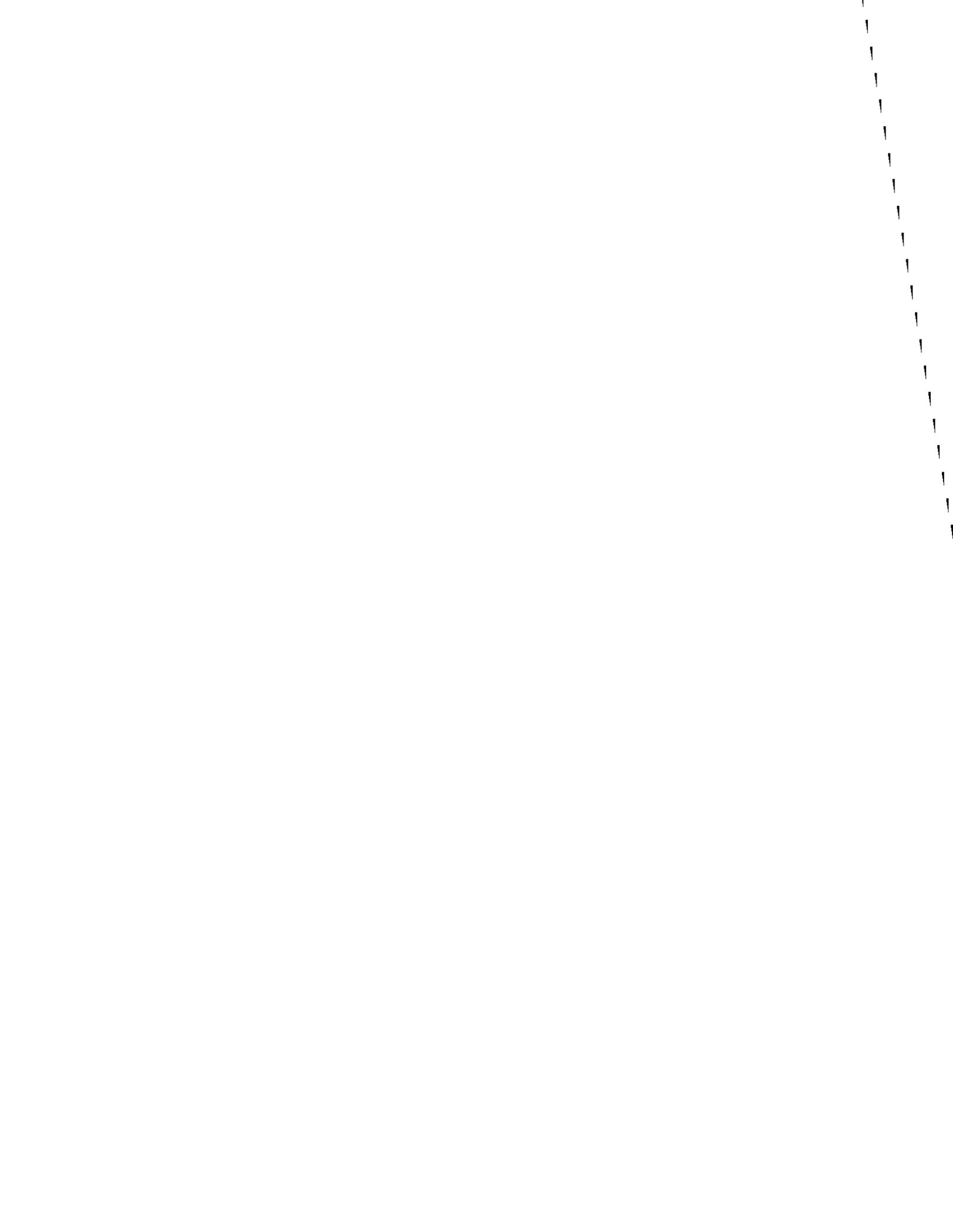
A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação Extração assistida por ultrassom e purificação de ficocianinas da *Arthrospira (Spirulina) platensis*, elaborada por Ingrid Rocha Teixeira, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Allan Morcelli – PUC-RS

Prof. Dra. Júlia Ribeiro Sarkis – UFRGS

Prof. Dr. Marcelo Farenzena – PPGEQ/UFRGS



Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por me conceder essa oportunidade e iluminar meus caminhos. Por ser meu guia e confidente nos momentos de dificuldades. À minha família, em especial à minha mãe e meu irmão, pelo constante apoio e incentivo em cada etapa que realizo da minha vida.

À professora Ligia Damasceno Ferreira Marczak que me orientou durante toda essa trajetória e me proporcionou a oportunidade de desenvolver a pesquisa no Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA). À professora Débora Pez Jaeschke, por toda disponibilidade, paciência e excelente co-orientação durante o desenvolvimento desse trabalho.

À professora Giovana Domeneghini Mercali pelo apoio e conhecimento compartilhado. Aos colegas do LATEPA, em especial Maria Helena Ferreira, bolsista de iniciação científica, pelo auxílio na execução dos experimentos.

À CAPES, pela concessão da bolsa, e à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por disponibilizar sua estrutura. Ambas possibilitaram a realização deste trabalho.

Enfim, gostaria de agradecer a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a concluir essa etapa da minha vida.

Obrigada a todos!

Resumo

Uma alternativa aos corantes sintéticos utilizados na indústria de alimentos são os corantes naturais, como os provenientes de microrganismos. Nesse sentido, a cianobactéria *Arthrospira (Spirulina) platensis* se destaca pelo elevado teor de ficocianina (C-PC), pigmento fotossintético acessório de cor azul, que apresenta atividade antioxidante, anti-inflamatória e anticarcinogênica. Todavia, para a obtenção desse pigmento de forma purificada e viável, a escolha do solvente extrator, do método de extração e purificação adequado tornam-se essenciais. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi estabelecer estratégias de extração e purificação de C-PC da *Spirulina platensis*. Inicialmente, buscou-se uma metodologia de extração baseada no uso de soluções salinas e aplicação de ultrassom (US), que proporcionasse alto rendimento e pureza das C-PC. Para tanto, realizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) cujas variáveis independentes foram a concentração da solução de salina (NH_4Cl e CaCl_2 , 1 - 20 g L^{-1}) e a amplitude do US (20 - 70%). Embora a solução de NH_4Cl tenha possibilitado extratos com maior teor de C-PC, a solução de CaCl_2 foi considerada um solvente mais seletivo, uma vez que proporcionou extratos com maior pureza e reduziu a coextração das clorofilas. A condição ótima de extração para a solução de CaCl_2 foi obtida aplicando-se 41% de amplitude e 8,5 g L^{-1} de concentração, resultando em extratos com teor de C-PC de $58 \pm 2 \text{ mg g}^{-1}$ e pureza de $0,96 \pm 0,03$. Para a etapa de purificação, utilizou-se técnicas de precipitação com sulfato de amônio e adsorção com carvão ativado e quitosana. Ao avaliar a purificação por precipitação com sulfato de amônio, a concentração ótima obtida foi de 50%, ocorrendo desnaturação desse pigmento para maiores concentrações. Para a técnica de precipitação por adsorção, o uso de quitosana apresentou efeito negativo na purificação dos extratos; o uso de carvão ativado, por sua vez, resultou em extratos com maior pureza. A combinação da extração assistida por US de C-PC da *Spirulina platensis* e a sua purificação por adsorção apresenta-se como uma metodologia atrativa para obtenção de extratos com alta concentração e pureza.

Palavras-chave: ficobiliproteínas, cianobactéria; força iônica; precipitação; pureza.

Abstract

An alternative to synthetic dyes used in the food industry are natural dyes, such as those from microorganisms. The cyanobacterium *Arthrospira (Spirulina) platensis* stands out for its high content of phycocyanin (C-PC), an accessory photosynthetic pigment of blue color, which has antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic activity. However, in order to obtain this pigment in a purified and viable form, the choice of solvent and the appropriate extraction and purification methods are essential. In this context, the objective of the present work was to establish strategies for extraction and purification of C-PC from *Spirulina platensis*. Initially, an extraction methodology, based on the use of saline solutions and application of ultrasound (US), was studied, aiming high extraction yield and purity. For this purpose, a central rotational composite design (DCCR) was carried out, with saline solution concentration (NH_4Cl and CaCl_2 , $1 - 20 \text{ g L}^{-1}$) and US amplitude (20 – 70%) as independent variable. Although the NH_4Cl solution resulted in extracts with higher C-PC content, the CaCl_2 solution was considered a more selective solvent, providing extracts with higher purity and lower chlorophylls co-extraction. The optimal extraction condition for the CaCl_2 solution was obtained by applying 41% of amplitude and 8.5 g L^{-1} of concentration, resulting in extracts with a C-PC content of $58 \pm 2 \text{ mg g}^{-1}$ and a purity of 0.96 ± 0.03 . For the purification step, precipitation with and adsorption with activated carbon and chitosan were performed. The purification based on precipitation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lead to an optimal concentration of 50 %, with a further denaturation of C-PC at higher concentrations. For the adsorption technique, chitosan had a negative influence the purification of the extracts; the use of activated carbon, in turn, resulted in extracts with greater purity. The combination of US-assisted extraction of C-PC from *Spirulina platensis* and its purification by adsorption is an attractive methodology for obtaining extracts with high concentration and purity.

Keywords: phycobiliproteins, cyanobacteria; ionic strength; precipitation; purity.

Lista de Figuras

Figura 1. Espectros de absorção das clorofilas e ficobiliproteínas.....	21
Figura 2. Organização estrutural do ficobilissomo.....	22
Figura 3. Microscopia das células da <i>Spirulina platensis</i>	23
Figura 4. Estrutura química da ficocianobilina.	25
Figura 5. Fenômeno da cavitação.	29
Figura 6. Inóculos para os experimentos de extração.....	36
Figura 7. Aparato experimental utilizado nos experimentos de ultrassom: a) gerador de potência; b) sonda de ultrassom; c) célula de extração;d) agitador magnético; e) banho termostático.	37
Figura 8. Estratégias de purificação das C-PC.	40
Figura 9. Teor de C-PC versus concentração e amplitude utilizando como solvente CaCl ₂	46
Figura 10. Pureza versus concentração e amplitude utilizando como solvente NH ₄ Cl..	48
Figura 11. Pureza versus concentração e amplitude utilizando como solvente CaCl ₂ ...	48
Figura 12. Fotografia dos extratos obtidos na extração via US com NH ₄ CL.....	49
Figura 13. Fotografia dos extratos obtidos na extração via US com CaCl ₂	49
Figura 14. Varredura dos extratos obtidos na extração via US com NH ₄ Cl.	49
Figura 15. Varredura dos extratos obtidos na extração via US com CaCl ₂	50
Figura 16. Extratos obtidos nas condições a) escolhidas para o NH ₄ Cl e b) otimizadas para CaCl ₂	51
Figura 17. Varredura dos extratos nas condições de extração escolhidas para o NH ₄ Cl e otimizadas para o CaCl ₂	52
Figura 18. Fotografias dos extratos: a) controle 1 (H ₂ O, 41 % US); b) controle 2 (8,5 g L ⁻¹ , 0 % US); e c) otimizado (8,5 g L ⁻¹ ,41 % US).	53

Figura 19. Varredura dos extratos obtidos.....	53
Figura 20. Varredura dos extratos obtidos.....	55
Figura 21. Fotografia dos extratos obtidos purificados com CA e CS.	58
Figura 22. Linhas de contorno de recuperação das C-PC (%) em função das concentrações de CA e CS	59
Figura 23. Linhas de contorno do grau de pureza em função das concentrações de CA e CS.	60
Figura 24. Extratos obtidos após a validação do ponto ótimo da purificação por adsorção com CA.....	61
Figura 25. Teor de C-PC no precipitado e sobrenadante em função das diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	63
Figura 26. Pureza no precipitado e sobrenadante em função das diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	64
Figura 27. Teor de C-PC no precipitado e sobrenadante em função das diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	66
Figura 28. Pureza no precipitado e sobrenadante em função das diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	66

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais grupos de cianobactérias.....	21
Tabela 2. Vantagens e limitações dos métodos convencionais de ruptura celular.	27
Tabela 3. Parâmetros avaliados na otimização da extração de C-PC via US.....	37
Tabela 4. Níveis dos parâmetros avaliados na purificação por adsorção.	39
Tabela 5. Teor de C-PC e pureza dos extratos obtidos na extração assistida por US com NH ₄ Cl.	43
Tabela 6. Teor de C-PC e pureza dos extratos obtidos na extração assistida por US com CaCl ₂	44
Tabela 7.Efeitos e coeficientes de regressão para o teor de C-PC obtidos para os sais NH ₄ Cl e CaCl ₂	45
Tabela 8. Efeitos e coeficientes de regressão para a pureza obtidos para os sais NH ₄ Cl e CaCl ₂	47
Tabela 9. Otimização multiobjetiva para pureza e teor de C-PC.	50
Tabela 10. Validação do modelo otimizado para o CaCl ₂	51
Tabela 11. Avaliação da força iônica e do US na extração de C-PC.	52
Tabela 12. Parâmetros da análise de cor dos extratos.	54
Tabela 13. Teor de C-PC e pureza dos extratos em função dos números de ciclos de congelamento/descongelamento	55
Tabela 14. Teor de C-PC e pureza dos extratos obtidos pelo método de congelamento/descongelamento e pelo método assistido por US nas condições otimizadas.	56
Tabela 15. Recuperação de C-PC (%) e pureza dos extratos obtidos na purificação por adsorção com CS e CA.....	57

Tabela 16. Efeitos e coeficiente de regressão para o percentual de recuperação das C-PC (%) e pureza após a purificação por afinidade com CA e CS.	59
Tabela 17.Otimização do grau de pureza na etapa de purificação por adsorção com CA.	61
Tabela 18. Avaliação do efeito da centrifugação adicional na otimização da purificação por adsorção com CA.	61
Tabela 19. Recuperação (%) das C-PC e pureza dos extratos obtidos em diferentes tempos de agitação.....	62
Tabela 20.Percentual de recuperação de C-PC e pureza utilizando a estratégia 1.	65
Tabela 21. Percentual de recuperação de C-PC e pureza em diferentes etapas do processo de purificação.	67

Lista de siglas, abreviaturas e símbolos

CA	Carvão ativado
C-PC	Ficocianina(s)
PBPs	Ficobiliproteínas
CS	Quitosana
NH ₄ Cl	Cloreto de amônia.
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
DCCR	Delineamento composto central rotacional
<i>S. platensis</i>	<i>Spirulina platensis</i>
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amônio
US	Ultrassom

Sumário

Capítulo 1 – Introdução	17
Capítulo 2 – Objetivos	19
Capítulo 3 - Fundamentação teórica e revisão bibliográfica	20
3.1 Cianobactérias.....	20
3.2. <i>Spirulina platensis</i>	22
3.3. Ficocianina.....	24
3.3. Extração das ficocianinas.....	26
3.4 Purificação de ficocianina.....	31
Capítulo 4 – Materiais e métodos.....	35
4.1 Inóculos para manutenção da microalga.....	35
4.2 Preparo da amostra.....	36
4.3 Extração das ficocianinas.....	36
4.3.1 Extração por congelamento/descongelamento.....	36
4.3.2 Extração assistida por ultrassom.....	36
4.4 Purificação dos extratos	38
4.4.1 Precipitação com sulfato de amônio	38
4.4.2 Purificação por adsorção com quitosana e carvão ativado	39
4.4.3 Combinação das técnicas de purificação	39
4.5 Métodos analíticos	40
4.5.1 Concentração de ficocianinas	40
4.5.2 Fator de recuperação de C-PC	41
4.5.3 Determinação da pureza.....	41
4.5.4 Análise de cor	41
4.6 Análise estatística	41
Capítulo 5 – Resultados e Discussão	43
5.1 Efeito da concentração de sal e ultrassom na extração das ficocianinas	43

5.2 Efeito da força iônica e do ultrassom na extração de ficocianinas	52
5.3 Extração por congelamento/descongelamento.....	55
5.4 Purificação por adsorção com quitosana e carvão ativado	57
5.5 Precipitação com sulfato de amônio	63
5.6 Estratégias de purificação	65
Capítulo 6 – Conclusões.....	68
REFERÊNCIAS	70

Capítulo 1 – Introdução

Devido à crescente conscientização por parte da população quanto aos efeitos deletérios dos corantes sintéticos utilizados na indústria de alimentos, tem-se intensificado a busca por corantes de fontes naturais obtidos por microrganismos. Nesse sentido, a *Arthospira plantensis*, anteriormente conhecida como *Spirulina platensis*, uma cianobactéria de coloração azul-esverdeada, vem sendo amplamente estudada por apresentar elevado teor de pigmentos, incluindo clorofila-a, β -caroteno, luteína e, principalmente, as ficobiliproteínas.

Dentre as ficobiliproteínas, a ficocianina é o principal pigmento encontrado na *Spirulina platensis*; é um pigmento de coloração azul, hidrossolúvel, com absorção máxima no comprimento de onda de 620 nm, que apresenta propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e anticarcinogênicas. Além de ser utilizada como corante na formulação de produtos alimentícios, o interesse pelas ficocianinas vem aumentando em virtude de suas propriedades nutricionais, bem como da sua capacidade fluorescente, a qual possibilita a sua utilização como marcador bioquímico para análises químicas e biológicas.

A obtenção das ficocianinas envolve a desintegração da membrana celular da cianobactéria, que normalmente começa com extração sólido-líquido utilizando solvente aquoso. No geral, a escolha do método de extração, o tipo de solvente, a temperatura e a razão biomassa/solvente são fatores com forte influência no rendimento do processo de extração. Várias técnicas de rompimento celular são utilizadas para a obtenção das ficocianinas e concentram grande parte dos estudos encontrados na literatura, destacando-se os métodos mecânicos convencionais, tais como maceração, moinhos de bolas, homogeneização e, principalmente, o congelamento/descongelamento.

Os métodos convencionais, embora apresentem alto rendimento, têm como desvantagens o maior tempo de extração e a necessidade de grande quantidade de solvente. Para contornar tais limitações, o uso dos métodos não convencionais, tais como o campo elétrico pulsado, campo elétrico moderado, ultrassom e micro-ondas, apresentam-se como uma boa alternativa. Dentre os métodos não convencionais, destaca-se a tecnologia do ultrassom, em virtude do menor tempo de processo proporcionado pelo

fenômeno da cavitação. Contudo, tal tecnologia, por ser mais abrasiva, resulta na extração de alguns componentes indesejáveis, responsáveis por reduzir a pureza do extrato.

O grau de pureza é um importante parâmetro que determina o campo de aplicação e o valor comercial das ficocianinas. Diversos protocolos que envolvem o uso de métodos não cromatográficos e cromatográficos em sequência têm sido relatados para a purificação desse pigmento. No geral, quanto maior o grau de pureza, maior o custo do processo, em função da complexidade e da quantidade de técnicas envolvidas. Nesse sentido, a otimização dos métodos de extração apresenta-se como uma importante ferramenta para a obtenção de extratos com maior pureza, com o intuito de minimizar as etapas de purificação. Recentemente, alguns estudos relatam que o uso de soluções salinas, como meio extrator, resulta na obtenção de extratos de ficocianinas com maior grau de pureza.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer uma metodologia de extração, baseada no uso de soluções salinas e ultrassom, que proporcionasse alto rendimento e pureza das ficocianinas provenientes da *Spirulina platensis*. Além disso, métodos de purificação de baixo custo foram avaliados para se definir uma estratégia que resultasse em extratos altamente concentrados e purificados em ficocianinas.

O presente documento está estruturado conforme descrito a seguir. No Capítulo 2 são apresentados os objetivos do trabalho. No Capítulo 3 é apresentada a fundamentação teórica e a revisão bibliográfica sobre os principais aspectos relacionados às cianobactérias, com ênfase nas ficocianinas e nos métodos de extração e purificação para obtenção desse pigmento. Em seguida, o Capítulo 4 apresenta os materiais e métodos utilizados, abordando as metodologias de extração, quantificação e purificação desse pigmento. Os resultados obtidos no presente trabalho estão apresentados e discutidos no Capítulo 5. Finalmente, no Capítulo 6 são apresentadas as principais conclusões do presente estudo e sugestões para trabalhos futuros.

Capítulo 2 – Objetivos

O presente trabalho apresentou dois objetivos gerais: i) propor uma metodologia de extração das ficocianinas provenientes da *Spirulina platensis* assistida por ultrassom e com o uso de soluções salinas; ii) avaliar métodos de purificação de baixo custo para a obtenção de extratos altamente concentrados e purificados em ficocianinas.

A partir dos objetivos gerais, tem-se os seguintes objetivos específicos:

- avaliar o emprego da solução de cloreto de amônio (NH_4Cl) e cloreto de cálcio (CaCl_2) como solventes de extração, identificando a concentração que maximize o rendimento e a pureza dos extratos brutos de ficocianina;
- avaliar a tecnologia do ultrassom para extração de ficocianina, identificando as melhores condições de operação do equipamento;
- comparar os resultados obtidos com o método convencional de congelamento/descongelamento;
- avaliar as técnicas de precipitação salina e precipitação por afinidade como metodologias para purificação do extrato bruto de ficocianinas na condição otimizada de extração.

Capítulo 3 - Fundamentação teórica e revisão bibliográfica

O presente capítulo apresenta, inicialmente, uma revisão bibliográfica sobre as cianobactérias e seus principais componentes bioativos, enfatizando-se as ficocianinas (C-PC) proveniente da cianobactéria *Spirulina platensis* (*S. platensis*). Na sequência, é apresentada uma revisão sobre os métodos de extração das C-PC, com destaque para a tecnologia de ultrassom. Por fim, são abordadas técnicas de purificação desse pigmento.

3.1 Cianobactérias

Pertencentes ao reino Monera, as cianobactérias, também conhecidas por algas azuis ou algas cianofíceas, estão entre as formas de vida mais primitivas da Terra. São microrganismos procarióticos e fotossintetizantes, com parede celular semelhante às bactérias gram-negativas. Em virtude da elevada tolerância às condições ambientais e climáticas, as cianobactérias podem ser cultivadas em diversos ambientes aquáticos, como água doce, salobra ou marinha. (Cetesb, 2013; Miranda, 2014; Singh *et al.*, 2005).

Os principais grupos de cianobactérias estão apresentados na Tabela 1. De acordo com sua morfologia, esses microrganismos podem ser encontrados na forma de talo unicelular, denominado cocóide, e talo filamentoso. Os unicelulares se apresentam como células individuais, suspensas ou em agregados, enquanto os filamentosos podem apresentar uma bainha, cujo filamento celular é designado como tricoma. Alguns dos talos filamentosos podem conter células especiais originadas de células vegetativas: esporos resistentes ao clima (acinetos) e de parede espessa (heterocistos) (Narciso, 2016; Singh; Kate; Banecjee, 2005).

Assim como as plantas, as cianobactérias realizam fotossíntese para obtenção de energia. No entanto, por não possuírem clorofila-b, elas absorvem luz principalmente na região azul e vermelha do espectro visível devido à presença da clorofila-a. Para compensar essa lacuna, esses microrganismos possuem as ficobiliproteínas (PBPs) que são responsáveis por absorver a porção de luz que não é absorvida pela clorofila, tornando o processo de fotossíntese mais eficiente. As PBPs estão localizadas nas ficobilissomas, os quais estão situadas sobre a superfície externa da membrana do tilacoide. (Hsieh-Lo *et al.*, 2019). O espectro de absorção das clorofilas e das PBPs é apresentado na Figura 1.

Tabela 1. Principais grupos de cianobactérias.

Morfologia	Ordem	Gênero
Unicelular ou Colonial	<i>Chroococcales</i>	<i>Gloeobacter</i>
		<i>Chroococcus</i>
		<i>Microcystis</i>
Unicelular ou Colonial	<i>Chamaesiphonales</i>	<i>Chamaesiphon</i>
		<i>Pleurocapsales</i>
		<i>Dermocarpa</i>
Filamentosa	<i>Nostocales</i>	<i>Oscillatoria</i>
		<i>Microcoleus</i>
		<i>Spirulina</i>
Filamentosa (Heterocistos)	<i>Nostocaceae</i>	<i>Anabaena</i>
	<i>Rivulariaceae</i>	<i>Nostoc</i>
	<i>Scytonemataceae</i>	<i>Cylindrospermum</i>
		<i>Calothrix</i>
Filamentosa (Acinetos)	<i>Stigonematales</i>	<i>Westiella</i>
		<i>Fisherella</i>
		<i>Stigonema</i>

Fonte: Adaptado de Singh; Kate; Banerjee (2005).

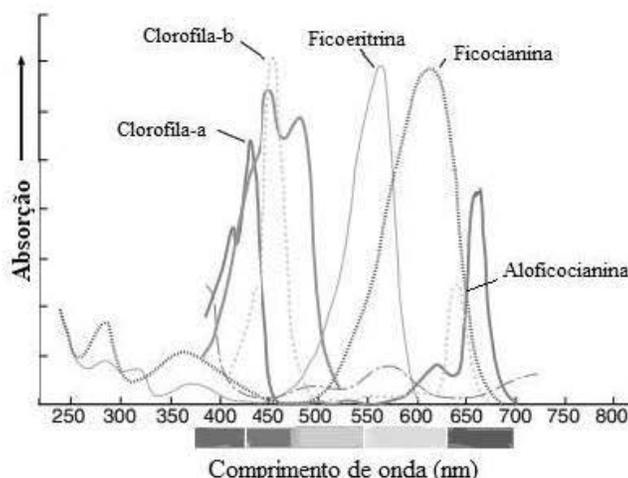


Figura 1. Espectros de absorção das clorofilas e ficobiliproteínas.

Fonte: Adaptado de Warren (2011).

Dependendo da cor e das propriedades de absorbância, as PBP's podem ser divididas em três principais classes: ficoeritrina (PE, de cor rosa brilhante ou vermelho), ficocianina (C-PC, de cor azul mais escuro) e aloficocianina (APC, de cor azul mais

claro) (Iter *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2006). Conforme representado na Figura 2, essas moléculas estão organizadas na forma de uma cascata de transferência de energia, indo da PE para a C-PC e, posteriormente, para a APC, de tal forma que a energia absorvida seja canalizada para o fotossistema II (Fernández-Rojas *et al.*, 2014; Hsieh-Lo *et al.*, 2019).

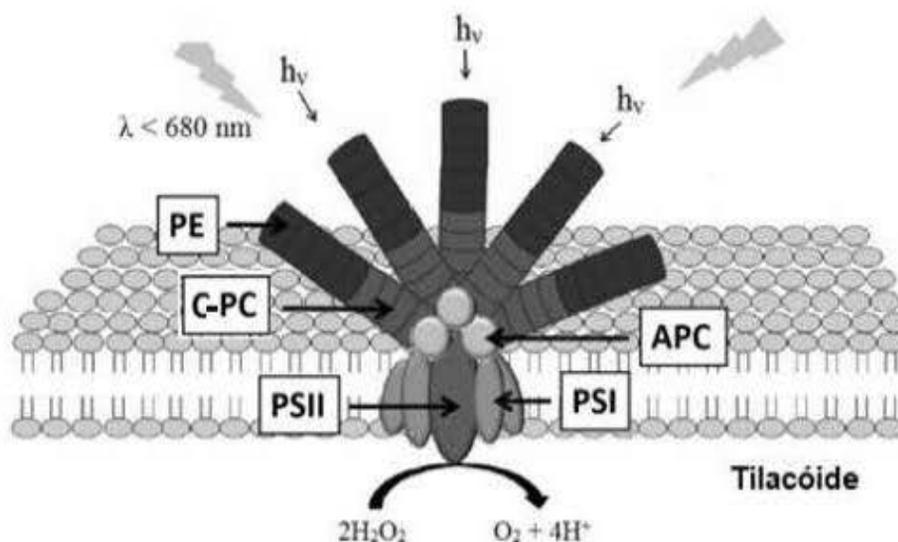


Figura 2. Organização estrutural do ficobilissomo.

PSII = fotossistemas II; PSI = fotossistemas I.

Fonte: Adaptado de Hsieh-Lo *et al.* (2019).

No geral, as cianobactérias se apresentam como uma importante fonte de pigmentos, lipídeos, proteínas e carboidratos. Temperatura e exposição ao sol são fatores que podem afetar fortemente a composição desses microrganismos (Narciso, 2016; Singh *et al.*, 2005). Recentemente, as cianobactérias vêm ganhando considerável atenção em virtude da ampla variedade de aplicações biotecnológicas dos seus componentes bioativos. Os pigmentos podem ser utilizados na indústria de alimentos, farmacêutica e como marcadores seletivos em técnicas sensíveis de fluorescência. Os lipídeos, por sua vez, podem ser considerados matéria-prima para a produção de biocombustíveis e alimentos. Ademais, do ponto de vista ambiental, esses microrganismos desempenham um importante papel no ciclo do carbono, oxigênio e nitrogênio (Hess, 2011; Narciso, 2016).

3.2. *Spirulina platensis*

Dentre as diferentes espécies de cianobactérias, a *S. platensis* concentra grande parte dos estudos que envolvem a extração das C-PC (Hsieh-Lo *et al.*, 2019; Singh *et al.*,

2005). A *Spirulina*, foi renomeada como *Arthrospira*, todavia, devido ao seu uso amplamente conhecido como alimento e suplemento dietético, os dois termos passaram a ser utilizados (Borba, V. A.; Ferreira Camargo, 2003). Esse microrganismo está inserido no reino Bactéria, da classe Cianofíceas, que apresenta um total de 13 espécies, das quais destaca-se, além da *S. platensis*, a *Spirulina fiastiformis* e a *Spirulina maximum* (Caetano, 2018; Lupatini *et al.*, 2016).

A *S. platensis* tem sido foco de importantes pesquisas biotecnológicas devido, principalmente, a sua importância nutricional. Em 1981, o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou sua comercialização como alimento/suplemento sem risco para a saúde humana. Atualmente, a *S. platensis* é a espécie de cianobactéria mais cultivada e comercializada em diversos países, como Alemanha, Brasil, Espanha, França, Canadá, Estados Unidos, entre outros, onde a administração pública e sanitária a aprovaram para o consumo humano, com uma produção anual superior a 5000 toneladas (Ali & Salch, 2012; Giraldo-Calderón *et al.*, 2018; Vernès *et al.*, 2019a).

Uma microscopia da célula da *S. platensis* é apresentada na Figura 3. Essa cianobactéria é filamentosa, caracterizada por um arranjo de células cilíndricas dispostas de forma helicoidal, denominadas tricomas, com comprimento que pode variar de 20 a 200 μm e largura de 5 a 6 μm . Sua reprodução acontece por divisão binária, em que ocorre a formação do hormogônio (tricoma), dando início a um novo filamento (Barros, 2010). No citoplasma, pode-se encontrar principalmente vacúolos e tilacóides (Lupatini *et al.*, 2016; Soares, 2013).

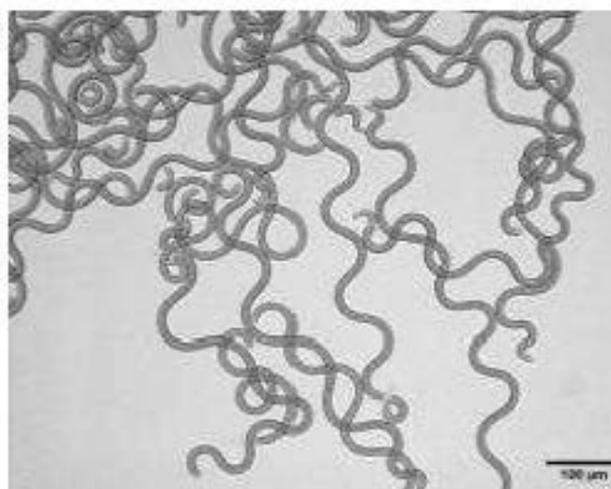


Figura 3. Microscopia das células da *Spirulina platensis*.

Fonte: Débora Pez Jaeschke (2019)

Geralmente, a *S. platensis* é encontrada em regiões tropicais e subtropicais, em meio aquático com elevado teor de carbonatos e bicarbonatos, ou seja, meios com pH alcalino e salinidade elevada (Ali & Saleh, 2012). Tais condições tornam seu cultivo bastante atrativo, pois os habitats extremos inibem o crescimento de microrganismos indesejados. Além disso, sua parede celular é facilmente rompida, o que facilita o acesso aos seus importantes componentes bioativos (Lupatini *et al.*, 2016). Sua composição pode variar em função do meio de cultivo, sendo comumente cerca de 50 -70 % (m/m) de proteínas, 10 -15 % (m/m) de carboidratos e 5-10 % (m/m) de lipídeos (De Moraes *et al.*, 2015). A C-PC é a principal PBP da *S. platensis* e pode constituir até 20% de seu peso seco (Fekrat *et al.*, 2018; Ferreira-Santos *et al.*, 2020; Martelli *et al.*, 2014).

3.3. Ficocianina

A C-PC é um pigmento solúvel em água, de coloração azul intensa, que se destaca na literatura como a fração proteica mais explorada da *S. platensis*. Esse pigmento apresenta ampla aplicabilidade comercial, podendo ser utilizado como corante na indústria alimentícia, para gomas de mascar, sorvetes, refrigerantes, doces, e em cosméticos, como batons e delineadores. A utilização da C-PC como substituto aos corantes sintéticos é promissora, pois além de fornecer aparência atrativa, pode incorporar valor nutricional aos alimentos (S. Hadiyanto *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2014). De acordo com a fonte de obtenção, a ficocianina pode ser classificada em três grupos: C-PC, R-PC e C-PCII, quando provenientes, respectivamente, de cianobactérias, algas vermelhas e cryptomonas (Hsieh-Lo *et al.*, 2019).

Independente da fonte de obtenção, a literatura reporta a importância de considerar as características físico-químicas desse pigmento, para executar processos de extração e purificação. O pH, a força iônica da solução e a temperatura são parâmetros essenciais para manter a estabilidade da C-PC (Chaiklahan *et al.*, 2012a; Ferreira-Santos *et al.*, 2020). No geral, a molécula apresenta instabilidade à luz, baixa temperatura de desnaturação (55°C) e mostra ter maior estabilidade para uma faixa de pHs entre 5-7 (Chaiklahan *et al.*, 2012a; Ferreira-Santos *et al.*, 2020; Martelli *et al.*, 2014).

A C-PC possui estrutura química composta por uma proteína e um componente não proteico, denominado ficocianobilina. A parte proteica da C-PC consiste em um monômero formado por duas subunidades em forma de hélice, chamadas alfa (α) e beta (β), com um cromóforo da bilina ligado à subunidade α e dois deles à subunidade β . Os

monômeros se reúnem para formar um trímero em forma de anel $(\alpha\beta)_3$, resultando em estruturas hexaméricas $[(\alpha\beta)_3]_2$. A ficocianobilina é o cromóforo responsável pela coloração azul da molécula, que consiste em um grupo tetrapirrol de cadeia aberta que se liga covalentemente à proteína por meio de uma ligação tio éter (Figura 4) (Fernández-Rojas *et al.*, 2014; Romay *et al.*, 2005).

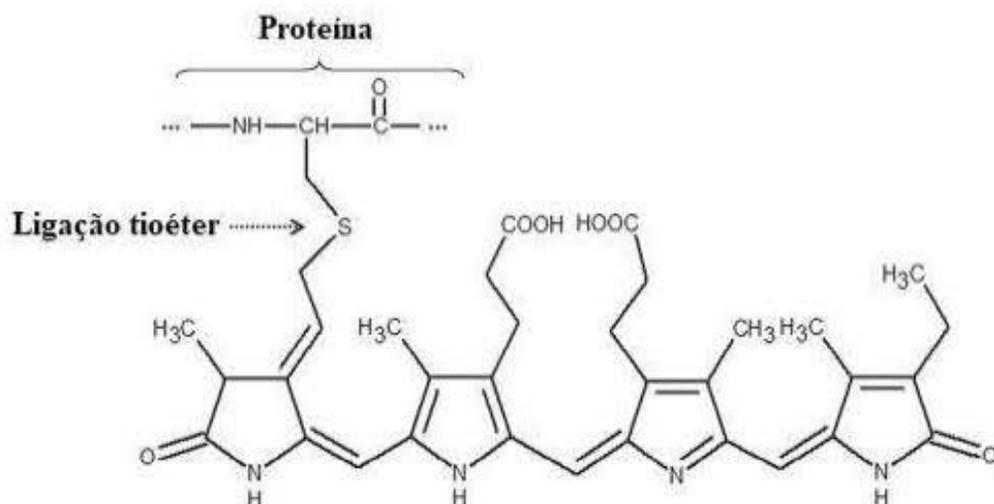


Figura 4. Estrutura química da ficocianobilina.

Fonte: Adaptado de Hsieh-Lo *et al.* (2019).

A C-PC apresenta elevado potencial antioxidante, uma vez que pode neutralizar a ação de espécies reativas de oxigênio, tais como o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), o radical alcóxila ($\text{RO}\cdot$) e o radical peróxila ($\text{ROO}\cdot$), resultando na inibição da peroxidação lipídica (Fernández-Rojas *et al.*, 2014; Piero Estrada *et al.*, 2001; Sekar & Chandramohan, 2008). De acordo com Romay & Gonzalez (2000), a C-PC foi capaz de proteger eritrócitos humanos contra lise induzida por radicais, apresentando atividade antioxidante 16 vezes maior do que o trolox e 20 vezes maior do que o ácido ascórbico. Além da atividade antioxidante, o interesse pela C-PC vem crescendo em virtude de suas propriedades anti-inflamatórias, anticarcinogênicas e neuroprotetoras (Sørensen *et al.*, 2013).

A aplicação e o valor comercial da C-PC dependem fortemente do seu grau de pureza. Esse parâmetro é avaliado com base na razão A_{620}/A_{280} , que corresponde à absorvância da C-PC a 620 nm e das outras proteínas a 280 nm. Fazendo-se um comparativo, conforme Cisneros & Rito-Palomares (2004) e Kuddus *et al.* (2013), o custo da C-PC com grau alimentício ($A_{620}/A_{280} \geq 0,7$) é cerca de 0,13 US\$ mg^{-1} , enquanto o

custo com grau de reagente ($0,7 > A_{620}/A_{280} < 3,9$) varia de 1 a 5 US\$ mg^{-1} ; o seu valor com grau analítico ($A_{620}/A_{280} \geq 4,0$), por sua vez, pode chegar a 15 US\$ mg^{-1} .

A maioria dos estudos relataram que o extrato bruto de C-PC apresenta baixo grau de pureza, sendo necessária uma etapa adicional de purificação no processo. No geral, os protocolos de purificação para C-PC requerem várias etapas e envolvem o uso de técnicas complexas e dispendiosas (Lee *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2009). Em suma, o grau de pureza está diretamente relacionado aos custos de produção, ou seja, quanto mais purificado o produto, maior o custo para obtê-lo (Silva *et al.*, 2009). Dessa forma, o uso de protocolos de purificação que utilizem técnicas simples é essencial para reduzir os custos de processo. Além disso, a escolha de um método de ruptura celular que resulte num extrato bruto de C-PC com alto rendimento e pureza também pode contribuir para a redução das etapas adicionais de purificação. A seguir, são apresentados maiores detalhes sobre os métodos de extração e purificação da C-PC.

3.3. Extração das ficocianinas

Durante os processos de extração sólido-líquido, um ou mais compostos são transferidos a partir do material biológico para o solvente. Inicialmente, ocorre a transferência de massa do solvente para a superfície do sólido, seguida pela difusão na matriz sólida, onde ocorre o contato com o soluto. Após a solubilização, a solução rica no soluto retorna para superfície por difusão molecular, sendo posteriormente, transferida para o meio de extração. Em virtude dos diversos fenômenos envolvidos, vários fatores podem ter efeito significativo sobre o rendimento da extração tais como temperatura, solvente e razão sólido/líquido (Jatobá *et al.*, 2016; Kotovicz, 2014; Su *et al.*, 2014). A C-PC pode ser extraída da biomassa seca, fresca ou congelada. Contudo, ainda não existem evidências se as características da biomassa afetam o rendimento da extração. No entanto, os métodos de pré-tratamento da biomassa podem resultar na perda de C-PC; alguns estudos relatam que parâmetros de secagem convencional, como tempo e temperatura, reduzem o teor de C-PC na biomassa, em virtude da sua baixa estabilidade térmica (Su *et al.*, 2014).

Diferentes métodos de ruptura celular têm sido empregados na extração da C-PC. Os métodos mais utilizados são o congelamento/descongelamento, homogeneização e moimento de bolas (S. H. Hadiyanto, 2016; Tavanandi *et al.*, 2018; Tavanandi &

Raghavarao, 2020). Esses métodos serão doravante chamados de métodos de extração convencionais e suas vantagens e limitações estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Vantagens e limitações dos métodos convencionais de ruptura celular.

Métodos	Vantagens	Limitações	Referências
Congelamento/ descongelação	Robusto; elevada pureza; boa reprodutibilidade.	Alto consumo de energia; tempo de processo elevado.	(Kannaujiya <i>et al.</i> , 2017; Narciso, 2016)
Moinho de bolas	Alta carga de biomassa; alta eficiência.	Alta demanda de energia quando utilizado em larga escala.	(Phong <i>et al.</i> , 2018)
Homogeneização	Menor extração de componentes indesejados; viável para aplicação em larga escala.	Alto consumo de energia;	(Ílter <i>et al.</i> , 2018; Show <i>et al.</i> , 2015)

Dentre os métodos convencionais, o congelamento/descongelação tem sido amplamente utilizado para a extração de C-PC. O método é comumente aplicado em laboratórios e empregado como metodologia de referência para comparação com novas técnicas (Horváth *et al.*, 2013; Ílter *et al.*, 2018; Sarada *et al.*, 1999). O congelamento/descongelação promove a extração através da dilatação seguida de ruptura da estrutura celular, em virtude da ação dos cristais de gelo formados durante o congelamento, que atuam como facas afiadas, e com posterior contração, durante o descongelamento (Soni *et al.*, 2006). Esses processos proporcionam mudanças nas condições de pressão exercida sobre a membrana celular e choque osmótico, devido a possíveis mudanças de concentração de eletrólitos em certas regiões, além de destruição física da estrutura celular pelos cristais de gelo (Roquebert & Bury, 1993).

Embora o congelamento/descongelação concentre grande parte dos estudos que envolvem a extração de C-PC, poucos autores avaliaram os efeitos do número de ciclos no rendimento da extração e na pureza dos extratos. Segundo Chittapun *et al.* (2020), o número de ciclos ótimo varia em função da morfologia celular da cianobactéria, sendo

um parâmetro que deve ser levado em consideração na seleção do processo de extração. Esse estudo evidenciou que maiores valores de rendimento e pureza foram obtidos com 3 ciclos para extração de C-PC da *Nostoc commune*, sendo observado uma redução nesses parâmetros para número de ciclos superior a 3.

Tavanandi *et al.* (2018) encontraram resultados semelhantes para a C-PC proveniente da *S. platensis*. Maior rendimento e pureza foram obtidos com 4 ciclos de congelamento/descongelamento, sendo que, para um aumento adicional no número de ciclos, embora fosse obtido um ligeiro aumento no rendimento, obteve-se uma redução da pureza. Em resumo, o congelamento/descongelamento é um método simples que possui como principal vantagem a alta pureza dos extratos, quando comparado com outros métodos convencionais. Todavia, o grande consumo de energia e tempo durante os ciclos torna seu uso inviável em escala industrial (Ferreira-Santos *et al.*, 2020).

Conforme observado na Tabela 2, os principais desafios dos métodos convencionais de extração são o elevado tempo de processo e o alto gasto energético. Como alternativa a esses métodos, pode-se citar a extração assistida por ultrassom, a extração com fluido supercrítico e a extração utilizando enzimas (S. H. Hadiyanto, 2016). Dentre esses métodos, muitos estudos têm utilizado o ultrassom para obtenção da C-PC, principalmente devido ao menor tempo de processo (S. H. Hadiyanto, 2016; Li *et al.*, 2020; Tavanandi *et al.*, 2018).

Extração assistida por ultrassom

A tecnologia de ultrassom (US) consiste na aplicação de ondas mecânicas, com frequências superiores à audição humana (de 20 kHz a 10 MHz). Nos líquidos, o fenômeno da cavitação é o principal efeito da propagação dessas ondas, cuja representação esquemática está mostrada na Figura 5. Esse fenômeno é caracterizado pela formação de bolhas devido às sucessivas zonas de compressão e rarefação. As bolhas de cavitação crescem e diminuem ao longo do ciclo da onda, podendo se tornar instáveis, e colapsar (Soria & Villamiel, 2010; Vernès *et al.*, 2019b).

O colapso das bolhas de cavitação leva a um aumento local de pressão e temperatura do meio, com curta duração de tempo, podendo chegar a temperatura na ordem de 5000 K e pressão de 1000 atm. Caso essa implosão ocorra próximo à parede celular da matriz vegetal, a energia gerada pode provocar um elevado impacto sobre a

superfície, ocasionando um aumento na sua permeabilidade, facilitando, desta forma, a liberação de compostos intracelulares (Greenly & Tester, 2015; Meregalli, 2017).

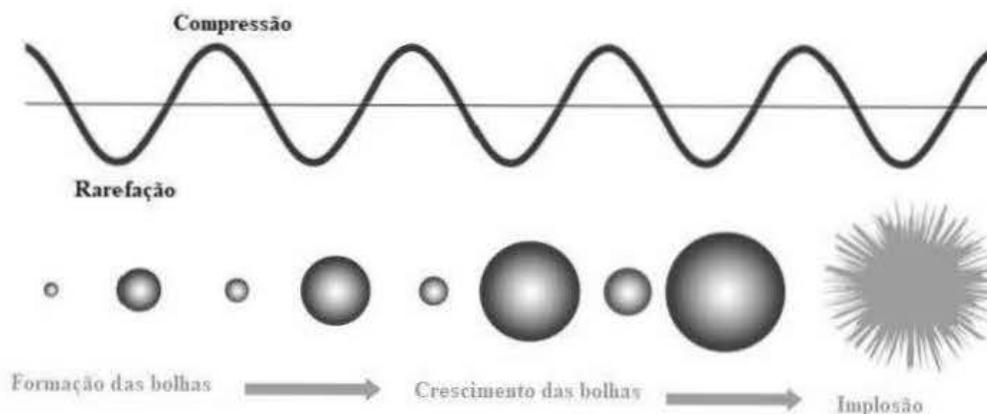


Figura 5. Fenômeno da cavitação.

Fonte: Adaptado de Sonotronic ultrasonics technology (2017).

Nos processos de extração, o US apresenta as seguintes vantagens: fácil operação, elevado rendimento, menor consumo de tempo, de energia e de solvente. Além disso, os equipamentos podem ser facilmente adaptados para operações em larga escala (Kannaujiya *et al.*, 2017; Phong *et al.*, 2018). Alguns autores estudaram o efeito dessa tecnologia para a extração da C-PC (S. Hadiyanto *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2020; Tavanandi *et al.*, 2018). S. Hadiyanto *et al.* (2016) relataram que a extração de C-PC por US apresentou efeito positivo em comparação com a extração convencional via Soxhlet. O US, além de ter aumentado o rendimento de 11,15% para 15,66%, reduziu o tempo de extração de 4 horas para 20 minutos.

Tavanandi *et al.* (2018) também avaliaram o uso do US, tanto de maneira individual, como em sinergia com métodos convencionais de extração (homogeneização, maceração e congelamento/descongelamento). Os resultados sugerem que apenas o US, para um tempo de extração de até 3 minutos, não apresentou boa eficiência (43,62%). Todavia, para todas as combinações do US com os métodos convencionais testados, foram observadas boa sinergia. US combinado com congelamento/descongelamento apresentou maior eficiência (91,62%), seguido pelo uso do US com maceração (83,45%).

A intensidade da sonificação, temperatura e tempo são parâmetros com grande influência na extração assistida por US. No geral, os processos de extração são favorecidos com a US de alta intensidade, caracterizado por baixa frequência (16-100 kHz) e potência elevada (normalmente $>1 \text{ W.cm}^{-2}$) (Soria & Villamiel, 2010). Segundo İlter *et al.* (2018), Li *et al.* (2020) e Tavanandi *et al.* (2018), os melhores rendimentos de

C-PC foram obtidos usando o US com amplitude entre 40 e 60 %, a temperatura é outro parâmetro que afeta fortemente a estabilidade da C-PC, sendo que temperaturas de extração acima de 55 °C podem ocasionar a desnaturação da proteína (Chaiklahan *et al.*, 2012b; S. H. Hadiyanto, 2016). Além da temperatura e da intensidade do US, o tempo também influencia o rendimento dos processos de extração. O aumento do tempo favorece a dissolução do composto alvo, resultando em um ganho de rendimento. Todavia, do ponto de vista econômico, longos tempos de extração são indesejáveis (Rafiqi *et al.*, 2019).

De maneira geral, o efeito da tecnologia do US apresenta resultados contraditórios no rendimento da extração das C-PC. İlter *et al.* (2018), ao avaliarem a extração das C-PC com o método do US, micro-ondas e o método convencional de homogeneização, nas condições otimizadas, observaram que o teor máximo desse pigmento foi obtido com a aplicação da tecnologia do US (98,84 mg g⁻¹). Resultado semelhante foi relatado por Moraes *et al.* (2011), ao evidenciarem que maiores rendimentos de extração das C-PC foram obtidas com US, quando comparados aos outros métodos de extração utilizados. Por outro lado, Liao *et al.* (2011) determinaram o rendimento da extração usando US e obtiveram 18,2 mg g⁻¹ de C-PC e pureza de 0,65, sendo que o método convencional de extração direta no solvente apresentou extratos mais purificados e com mesmo teor de pigmentos.

Com relação ao grau de pureza dos extratos, Tavanandi *et al.* (2018) avaliaram a extração assistida por US em comparação com outros métodos de extração convencionais e observaram que o US proporcionou extratos menos purificados. Nesse contexto, embora o US apresente comumente bons rendimentos na extração das C-PC, essa tecnologia apresenta como desvantagem menor especificidade. Por ser um tratamento mais abrasivo, além das C-PC, a tecnologia também libera para o meio outros compostos intracelulares. Como resultado, além da menor pureza, alguns trabalhos relatam que a cor azul, característica da C-PC, é usualmente suprimida e a cor verde, característica da clorofila, é observada (İlter *et al.*, 2018; D P Jaeschke *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020).

Em geral, observa-se que os trabalhos encontrados na literatura relacionados com a extração das C-PC via US analisam somente o rendimento de extração, não apresentando uma avaliação da qualidade dos extratos. Além disso, os trabalhos não avaliaram o uso dos métodos de purificação para obtenção desse pigmento. Assim sendo,

são necessários mais estudos acerca da adição de uma etapa de purificação dos extratos de C-PC.

3.4 Purificação de ficocianina

O grau de pureza é um importante parâmetro que determina aplicação da ficocianina (C-PC). Conforme descrito previamente, a avaliação deste parâmetro é obtida com base na razão entre a absorbância da C-PC a 620 nm e de outras proteínas a 280 nm. Purezas acima de 0,7 e 4,0 têm sido consideradas, respectivamente, de grau alimentício e analítico. Grande parte dos estudos relataram que os extratos brutos de C-PC apresentam baixa pureza, sendo indispensável uma etapa adicional de purificação para viabilizar sua comercialização (Lee *et al.*, 2016). A escolha do método de purificação depende das características físico-químicas da proteína de interesse, dos contaminantes presentes e da sua aplicabilidade (Sbeghen, 2017).

Embora a literatura apresente uma ampla variedade de trabalhos que envolvem a purificação da C-PC, poucos avaliaram a influência do meio de extração na pureza dos extratos bruto. Comumente, para a obtenção da C-PC, é utilizado o tampão sódio fosfato como solvente extrator (Martelli *et al.*, 2014; Sarada *et al.*, 1999; Tavanandi *et al.*, 2018). No entanto, recentemente, alguns estudos relatam que soluções salinas se apresentam como alternativas para a obtenção dessa proteína. Manirafasha *et al.* (2017) realizaram a extração da C-PC com solução de cloreto de amônia (NH₄Cl) e compararam os resultados com os obtidos utilizando o tampão sódio fosfato. Apesar de não apresentar diferença significativa em termo de concentração de C-PC, a solução de NH₄Cl proporcionou a obtenção de extratos mais puros. O estudo evidencia que o uso dessa solução é vantajoso pois extratos com maior pureza requerem um menor número de etapas de purificação. Outro fator a ser levado em consideração é o econômico, uma vez que o custo da solução com NH₄Cl é praticamente a metade do custo da solução de tampão sódio fosfato.

İlter *et al.* (2018) também avaliaram a extração de C-PC com solução de cloreto de cálcio (1,5%, m/v) em comparação com tampão sódio fosfato e água destilada. O trabalho avaliou diferentes solventes utilizando três métodos de ruptura celular: homogeneização, US e micro-ondas. Em todos os métodos testados, a solução salina de CaCl₂ resultou em extratos de C-PC com coloração mais azulada, quando comparado com os outros meios. Além disso, os extratos obtidos com tampão sódio fosfato e água destilada apresentaram coloração mais esverdeada, sendo um indicativo de maior

extração de clorofila. Os resultados encontrados por Íter *et al.* (2018) podem ser associados aos obtidos pelo estudo realizado por Li *et al.* (2020), que investigaram o efeito da força iônica no meio de extração de C-PC através de uma solução de cloreto de sódio em diferentes concentrações. Os pesquisadores evidenciaram que a coextração da clorofila pode ser minimizada com a adição de uma força iônica mínima de 5 g L⁻¹ de NaCl.

Vários trabalhos desenvolveram estratégias de purificação para obtenção das C-PC. A maioria dessas estratégias envolve etapas de precipitação, centrifugação, diálise e cromatografia (Patil & Raghavarao, 2007). Geralmente, os protocolos de purificação que apresentam etapas com cromatografia são mais eficazes (Pan-utai & Iamtham, 2019). No entanto, a cromatografia é uma técnica dispendiosa, que requer longo tempo de processo (Xi-Feng Zhang, Xin Wang, 2017). Além disso, se o objetivo é obter C-PC com grau alimentício, não existe a necessidade de várias etapas, nem o uso de técnicas complexas (Silva *et al.*, 2009). Nesse sentido, os métodos não cromatográficos, como a precipitação por sulfato de amônio, particionamento trifásico, precipitação por afinidade, dentre outros, se apresentam como técnicas simples e atrativas economicamente para a purificação da C-PC.

A seguir, são apresentados maiores detalhes sobre as técnicas de precipitação que foram utilizadas nas estratégias de purificação avaliadas no presente trabalho.

Precipitação com sulfato de amônio

A precipitação é uma técnica amplamente utilizada para purificação de proteínas, com fácil aplicabilidade, baixo custo e que requer equipamentos simples. A técnica consiste na perturbação química/física de uma determinada solução, que resulta num aglomerado de partículas insolúveis de proteínas, passíveis de isolamento em etapa posterior de separação. A precipitação é comumente induzida pela adição de sais neutros, tais como cloreto de sódio (NaCl), sulfato de sódio (Na₂SO₄) e, principalmente, o sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄, devido à alta solubilidade (Doonan, 1996).

Os sais neutros promovem a precipitação das proteínas mediante a redução da concentração de água superficial, que resulta na precipitação pelo fenômeno “salting out” (Santos Junior *et al.*, 2017). Dependendo do grau de pureza desejado, a precipitação pode atuar como única etapa de purificação. A literatura relata que a purificação de C-PC geralmente inclui a precipitação com sulfato de amônio, como etapa inicial (Manirafasha

et al., 2017). Kumar & Watal, (2014) empregaram esse procedimento no extrato bruto de C-PC com pureza de 0,75 e obtiveram, com solução de 65 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, uma recuperação de 80% de C-PC e pureza de 1,5. O estudo também evidenciou que uma etapa adicional, com cromatografia de troca iônica, proporcionou a obtenção de C-PC com grau analítico.

Além da utilização de uma etapa adicional, outra alternativa para aumentar a pureza é realizar a precipitação em duas etapas. Patel *et al.* (2005) utilizaram o método de precipitação fracionada com sulfato de amônio, para purificação do extrato bruto de C-PC com pureza inicial de 0,8. Inicialmente, com uma solução de 25% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, obtiveram grau de pureza de 0,82. Ao incluir uma segunda etapa de precipitação, com solução saturada (50 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), foi obtido uma pureza de 2,66. Kamble *et al.* (2013) também utilizaram precipitação fracionada do extrato bruto de C-PC com pureza inicial de 0,161. Após precipitação com solução saturada a 25% e 50%, a pureza aumentou, respectivamente, para 0,248 e 0,628.

A principal desvantagem associada a essa técnica de purificação é a necessidade de uma etapa de filtração para remoção do sal, para que não haja interferência nas próximas etapas de purificação.

Precipitação por afinidade

Reconhecidos como seguros pela *Food and Drug Administration* (FDA), carvão ativado (CA) e quitosana (CS, do inglês *chitosan*) possuem propriedades atrativas para o processo de purificação. CA é um material altamente poroso, com elevada área superficial, boa dispensabilidade e capacidade de adsorção, que pode adsorver fisicamente impurezas. A CS é um heteropolímero natural e biossorvente não tóxico, que contém grupos aminos e hidroxila com boa capacidade de ligação e quelação. Dessa forma, a combinação CA/CS possibilita que proteínas contaminantes sejam adsorvidas do meio (Fekrat *et al.*, 2018; Patil *et al.*, 2006).

Alguns trabalhos relatam que a introdução de uma etapa de precipitação por afinidade com CA e CS pode melhorar a qualidade do extrato bruto de C-PC (Liao *et al.*, 2011; Patil *et al.*, 2006). A precipitação por afinidade apresenta como vantagem a simplicidade, eficiência e tempo reduzido, quando comparada com outros métodos de purificação (Fekrat *et al.*, 2018). Gantar *et al.* (2012) utilizaram um extrato bruto proveniente da *Limnothrix* com pureza inicial de 2 e avaliaram o uso de CA e CS, na

concentração de 1 % (m/v) e 0,01 g L⁻¹, respectivamente. Após agitação por 15 minutos, os autores realizaram a precipitação com (NH₄)₂SO₄. Esse tratamento aumentou a pureza do extrato bruto para 3,6, e a sequencial saturação seletiva com sal elevou este parâmetro para 4,2.

Fekrat *et al.* (2019) também realizaram a purificação do extrato bruto de C-PC utilizando a técnica de purificação por afinidade, com diferentes concentrações de CS e CA e diferentes tempos de agitação. Na condição otimizada (0,24 % (m/v) de CS, 8,4 % (m/v) de CA e 10,2 minutos de agitação), os autores obtiveram um valor de 3,14 de pureza e 0,27 mg mL⁻¹ de concentração de C-PC, valores 1,7 e 1,2 vezes maiores, respectivamente, do que aqueles obtidos pelo método de precipitação com sulfato de amônio.

Conforme discutido anteriormente, a literatura reporta bons resultados com o uso da técnica de precipitação por afinidade com CA/CS, tanto como um método isolado de purificação, bem como no pré-tratamento da precipitação com sulfato de amônio para obtenção das C-PC. Contudo, não foram encontrados na literatura estudos que realizassem a comparação desse método isolado e em combinação com a precipitação salina. Assim sendo, faz-se necessário avaliar possíveis estratégias de purificação, identificando o efeito do uso desses métodos de forma isolada e em sinergia.

Capítulo 4 – Materiais e métodos

Esse capítulo apresenta a metodologia empregada para a realização do presente trabalho. Inicialmente, foram avaliadas as seguintes condições de extração: concentração da solução salina e amplitude da sonda de US. Em seguida, foi avaliado o efeito da força iônica e do ultrassom na condição otimizada com o melhor solvente extrator. Na sequência, foi realizada a extração das C-PC pelo método convencional de congelamento/descongelamento, e, por fim, a avaliação dos métodos de purificação de precipitação com sulfato de amônio e precipitação por adsorção. Além disso, são apresentadas as metodologias utilizadas para o cultivo da cianobactéria, bem como as metodologias de análise para a quantificação das C-PC.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Tecnologia e Processamento de Alimentos (LATEPA) localizado no Departamento de Engenharia Química da UFRGS.

4.1 Inóculos para manutenção da microalga

A cepa da cianobactéria *Arthrospira platensis* foi doada pelo banco de microalgas do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM), da Universidade Federal da Paraíba. Para manutenção dos cultivos, foram realizados inóculos a cada 7 dias utilizando o meio de cultivo Zarrouk modificado (Aiba, Ogawa, 1977), contendo os seguintes nutrientes: NaHCO_3 ($13,61 \text{ g L}^{-1}$), Na_2CO_3 ($4,03 \text{ g L}^{-1}$), K_2HPO_4 ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), NaNO_3 ($2,5 \text{ g L}^{-1}$), K_2SO_4 ($1,0 \text{ g L}^{-1}$), NaCl ($1,0 \text{ g L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ($0,2 \text{ g L}^{-1}$), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,04 \text{ g L}^{-1}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,01 \text{ g L}^{-1}$), EDTA ($0,03 \text{ g L}^{-1}$) e solução de micronutrientes (5 mL L^{-1}). A solução de micronutrientes foi composta de: EDTA (5 g L^{-1}), H_3BO_3 ($1,14 \text{ g L}^{-1}$), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($2,2 \text{ g L}^{-1}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($0,16 \text{ g L}^{-1}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($0,16 \text{ g L}^{-1}$), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($0,11 \text{ g L}^{-1}$).

Para a realização dos inóculos, utilizou-se em torno de 25 mL do inóculo anterior e 225 mL de meio de cultivo. Os inóculos foram mantidos em uma mesa agitadora a 180 rpm (Solab Científica, modelo SL 180/D, Brasil), em temperatura ambiente e com 300 klux de iluminância. Na Figura 6 é apresentada uma fotografia dos cultivos.

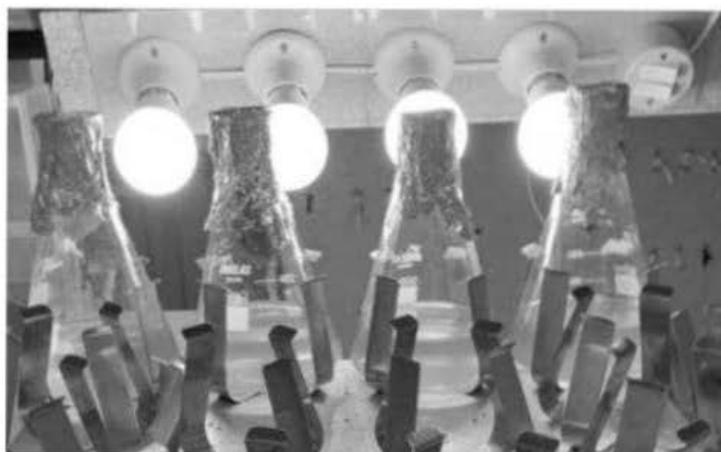


Figura 6. Inóculos para os experimentos de extração.

4.2 Preparo da amostra

Para o preparo da amostra, os cultivos foram mantidos em repouso durante 24 horas, à temperatura de 8 °C. Em seguida, a biomassa (parte superior) foi removida do meio de cultivo e armazenada em ultrafreezer (-43 °C) para posterior desidratação. Após congeladas, as amostras foram liofilizadas (Terroni, modelo LS6000, Brasil) durante, aproximadamente, 48 horas.

4.3 Extração das ficocianinas

4.3.1 Extração por congelamento/descongelamento

Os ensaios de ruptura celular por congelamento/descongelamento foram realizados em triplicata utilizando banho termostático (25 °C) e ultrafreezer (-43 °C). Para tanto, 5 mL de uma solução com concentração de 1 g L⁻¹ (biomassa/solvente) foram submetidas ao congelamento por 1 hora. Em seguida, as amostras foram mantidas por 15 minutos em banho termostático para o descongelamento e congeladas novamente. Esse procedimento de congelamento/descongelamento foi repetido a fim de se obter o número de ciclos ótimo em que a concentração de C-PC e pureza dos extratos fossem maximizadas. Ao final de cada ciclo, as amostras foram centrifugadas (11.200 g, 15 min, 4 °C), e os extratos obtidos (sobrenadantes) foram separados para análise da concentração de C-PC e pureza.

4.3.2 Extração assistida por ultrassom

A extração da C-PC assistida por US foi avaliada através do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2² com pontos axiais e 5 repetições no ponto central,

totalizando 13 experimentos. Os parâmetros analisados no planejamento, concentração da solução salina e amplitude ultrassônica, estão representados na Tabela 3. O planejamento fatorial foi utilizado para avaliar a influência de dois solventes: cloreto de cálcio (CaCl_2) e cloreto de amônio (NH_4Cl). Após a otimização, o solvente extrator que apresentou os melhores resultados na concentração de C-PC e pureza foi utilizado para realização do estudo de purificação e avaliação do efeito do US e força iônica.

Tabela 3. Parâmetros avaliados na otimização da extração de C-PC via US.

Parâmetros Estudados	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Concentração de sal (g L^{-1})	1	3,8	10,5	17,2	20
Amplitude (%)	20	27	45	63	70

A Figura 7 apresenta uma fotografia do aparato utilizado para a extração de C-PC assistida por US. Os experimentos foram realizados utilizando um equipamento do tipo sonda (VCX 750, Sonics and Materials Inc., EUA, 20 kHz, 750 W), uma célula de extração, que consistiu em um béquer encamisado, um agitador magnético, um banho de resfriamento e um sistema de by-pass; a profundidade de imersão da sonda de ultrassom foi mantida em 1,2 cm. O banho de resfriamento foi utilizado para manter a temperatura de extração em torno de $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, a fim de evitar a degradação das C-PC.

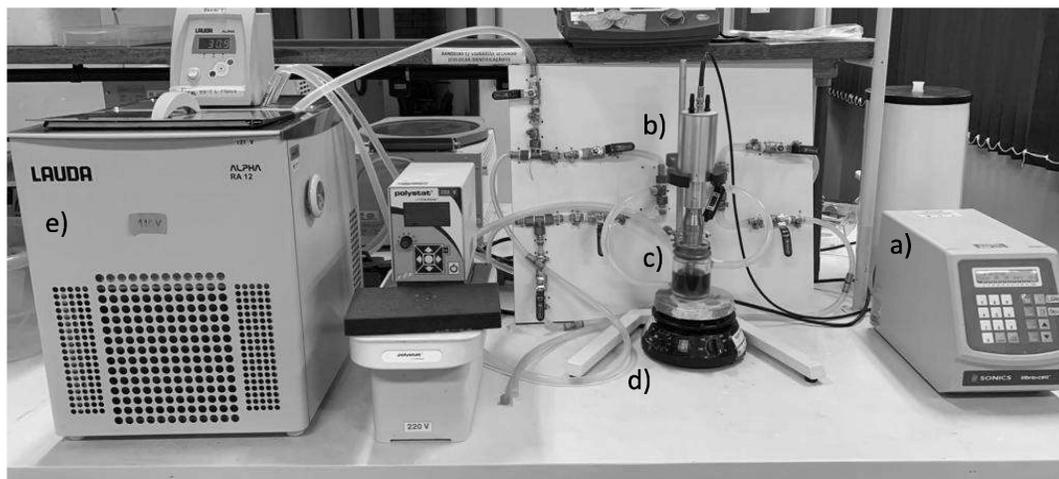


Figura 7. Aparato experimental utilizado nos experimentos de ultrassom: a) gerador de potência; b) sonda de ultrassom; c) célula de extração; d) agitador magnético; e) banho termostático.

Os experimentos de extração foram realizados em pulsos de 20 segundos on/off, totalizando 5 minutos de tratamento com US. Para isso, 70 mL de uma solução com concentração de 1 g L^{-1} (biomassa/solvente) foi utilizada em cada experimento de extração. Após os experimentos, as amostras foram imediatamente centrifugadas (11.200

g, 20 min, 4 °C) e, em seguida, o sobrenadante foi removido e analisado quanto à concentração de C-PC e pureza.

Após a otimização e validação das condições de extração, foi realizada a seleção do tipo e da concentração da solução salina para ser utilizado nos demais experimentos. Para isso, foi levado em consideração o solvente que proporcionou extratos com maior grau de pureza e menor coextração de clorofilas. A solução de CaCl_2 a $8,5 \text{ g L}^{-1}$ foi escolhida como meio de extração para as etapas posteriores.

Avaliação da influência da força iônica e do ultrassom no meio extrator

Para avaliar o efeito da força iônica na condição otimizada, foi realizada a extração das C-PC com água destilada e US a 41% de amplitude. Os resultados obtidos para o teor de C-PC, grau de pureza e qualidade dos extratos foram comparados com os experimentos da otimização realizados com a mesma intensidade do US e solução de $8,5 \text{ g L}^{-1} \text{ CaCl}_2$.

A influência do US também foi avaliada utilizando a condição otimizada de $8,5 \text{ g L}^{-1}$ de CaCl_2 , as mesmas condições de tempo e temperatura, contudo, sem a aplicação dessa tecnologia. Os resultados obtidos para o teor de C-PC, grau de pureza e qualidade dos extratos foram comparados com os experimentos da otimização com mesmo solvente extrator e aplicação do US a 41% de amplitude.

4.4 Purificação dos extratos

4.4.1 Precipitação com sulfato de amônio

A purificação do extrato bruto de C-PC foi realizada utilizando o método de purificação com sulfato de amônio. Para tanto, foram avaliadas diferentes concentrações desse sal (20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 %). As soluções foram preparadas a partir de uma solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, adicionando-se volumes correspondentes do extrato bruto de C-PC até as concentrações desejadas.

As amostras foram mantidas por 24 horas, no escuro, a uma temperatura de 4 °C e, posteriormente, centrifugadas a 13.000 g durante 15 min. Os sobrenadantes foram coletados, e os precipitados ressuspensos com o solvente extrator. Em seguida, realizou-se a leitura em espectrofotômetro de todas as amostras para posterior quantificação de ficocianina.

4.4.2 Purificação por adsorção com quitosana e carvão ativado

A purificação por adsorção foi avaliada através do delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^2 com pontos axiais e 5 repetições no ponto central. Os parâmetros analisados foram a concentração de carvão ativado (CA, granulometria de 14-25 mesh) e concentração de quitosana (CS, massa molecular média), conforme demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4. Níveis dos parâmetros avaliados na purificação por adsorção.

Parâmetros Estudados	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Concentração CA % (m/v)	1	2,6	6,5	10,4	12
Concentração de CS % (m/v)	0,1	0,5	1,6	2,6	3

Em cada experimento, foram adicionados 3 mL de extrato bruto de C-PC e as soluções de CS e CA. Em seguida, as amostras foram imediatamente agitadas por 10 min e centrifugadas a 13.000 g por 15 min. Posteriormente, a pureza e fator de recuperação de C-PC foram determinados.

Após as concentrações de CA e CS serem otimizadas através do planejamento experimental, foi realizado um experimento controle para analisar o efeito da centrifugação e um estudo avaliando os tempos de agitação (2, 5, 10, 15 e 30 min). Após a agitação, as amostras foram centrifugadas a 13.000 g por 15 min e foram avaliadas quanto ao fator de recuperação de C-PC e a pureza dos extratos.

4.4.3 Combinação das técnicas de purificação

As técnicas de purificação estudadas isoladamente nas etapas anteriores foram avaliadas de forma combinada utilizando diferentes estratégias: 1) precipitação salina seguida de uma etapa de filtração com membrana; 2) etapa de adsorção seguida de precipitação salina; e 3) etapas de adsorção e precipitação salina seguidas de etapa de filtração por membrana. A Figura 8 ilustra os fluxogramas utilizados nas três estratégias.

Na estratégia 1 avaliou-se a precipitação salina, na melhor condição de concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (50%), seguida de uma etapa de filtração com membrana (membrana hidrofílica de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com diâmetro de poro de 0,45 μm). Na estratégia 2 aplicou-se a precipitação por adsorção com CA (12 g L^{-1}) e a precipitação salina com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (utilizando diferentes concentrações). A terceira estratégia de purificação adotada consistiu em realizar uma etapa de filtração por membrana após as etapas de adsorção com CA (12 g L^{-1}) e precipitação salina com

solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturada a 50%. Após cada uma das etapas, os extratos foram centrifugados (13.000 g, 15 min, 4° C) e analisados quanto ao teor de C-PC e grau de pureza.

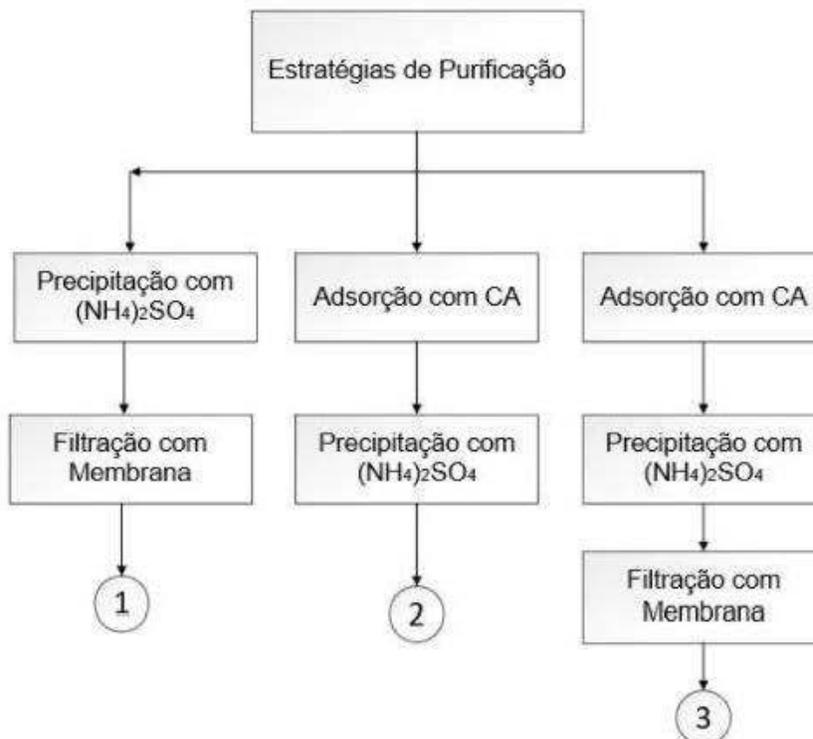


Figura 8. Estratégias de purificação das C-PC.

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 Concentração de ficocianinas

Para determinar a concentração de C-PC e avaliar o perfil de compostos extraídos, realizou-se uma varredura dos extratos em espectrofotômetro (PG Instruments, T80 UV-Vis, Reino Unido) em comprimentos de onda de 280 a 750 nm. A concentração de C-PC foi calculada de acordo com a Eq. 1 e a Eq. 2 (Bennett & Bogobad, 1973; Yoshikawa & Belay, 2008).

$$C - PC \text{ (mg mL}^{-1}\text{)} = \frac{A_{620\text{nm}} - 0,474 * A_{652\text{nm}}}{5,34} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$C - PC \text{ (mg g de biomassa}^{-1}\text{)} = \frac{C - PC \text{ (mg mL}^{-1}\text{)}}{C_{\text{suspensão}} \text{ (g mL}^{-1}\text{)}} \quad (\text{Eq. 2})$$

onde $A_{620\text{nm}}$ e $A_{652\text{nm}}$ são as absorvâncias a 620 nm e a 652 nm, respectivamente, e $C_{\text{suspensão}}$ é a concentração de biomassa inicial utilizada para os experimentos de extração.

4.5.2 Fator de recuperação de C-PC

O cálculo do fator de recuperação de C-PC após os experimentos de purificação foi efetuado com base na razão entre o teor de C-PC do extrato bruto e o teor de C-PC do extrato purificado, de acordo com a Eq. 3.

$$\text{Fator de recuperação (\%)} = \frac{\text{Teor de C - PC no extrato bruto}}{\text{Teor de C - PC no extrato purificado}} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

4.5.3 Determinação da pureza

A determinação da pureza dos extratos foi obtida por análise espectrofotométrica utilizando a relação de Abs_{620} e Abs_{280} , que pode ser calculada através da Eq. 4. A densidade óptica a 620 nm indica a absorvância máxima do pigmento ficocianina, e a 280 nm mede o pico de absorção máxima das proteínas na solução (Tavanandi *et al.*, 2018).

$$\text{Pureza} = \frac{Abs_{620\text{nm}}}{Abs_{280\text{nm}}} \quad (\text{Eq. 4})$$

4.5.4 Análise de cor

A análise de cor dos extratos de C-PC foi realizada em colorímetro (Hunter Lab Color Quest XE) no modo de reflectância especular excluída. Os parâmetros de cor L^* , a^* e b^* da escala CIELAB foram determinados. No espaço das cores, L^* expressa a luminosidade e a^* e b^* representam as coordenadas cromáticas. Os valores de L^* variam de 0 (totalmente preto) a 100 (totalmente branco). A coordenada de cromaticidade a^* representa coloração vermelha para valores positivos e verde para valores negativos; a coordenada b^* apresenta coloração azul para valores negativos e amarela para valores positivos.

4.6 Análise estatística

Os dados experimentais dos planejamentos fatoriais foram analisados usando um modelo de regressão polinomial, apresentado na Eq. 5:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 * X_1 + \beta_2 * X_2 + \beta_{11} * X_1^2 + \beta_{22} * X_2^2 + \beta_{12} * X_1 * X_2 \quad (\text{Eq. 5})$$

onde Y representa a variável independente, X_1 e X_2 representam as variáveis dependentes e β representa os coeficientes da equação.

Após a realização dos planejamentos fatoriais, os mesmos foram otimizados e validados no ponto ótimo. Esses experimentos de validação e os métodos analíticos foram realizados em triplicata. Os dados foram avaliados por análise de variância (ANOVA), teste *t-student* e teste de Tukey (95% de confiança) usando o software *Statistica* 13.5 (TIBCO Software Inc.).

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

Este capítulo apresenta os resultados que estão divididos em quatro etapas: (1) efeito da concentração de sal e US na extração das ficocianinas, otimização e validação das condições de extração; (2) efeito da força iônica e do US na condição otimizada; (3) avaliação das técnicas de purificação; e (4) definição das estratégias de purificação. Os resultados serão discutidos com foco na comparação da extração utilizando o método tradicional de congelamento/descongelamento e a tecnologia do US.

5.1 Efeito da concentração de sal e ultrassom na extração das ficocianinas

Nas Tabelas 5 e 6 são apresentados os valores obtidos para o teor de C-PC e pureza dos extratos em cada experimento do DCCR 2² empregado para avaliar a extração via US, utilizando como solvente extrator as soluções de NH₄Cl e CaCl₂, respectivamente.

Tabela 5. Teor de C-PC e pureza dos extratos obtidos na extração assistida por US com NH₄Cl.

Experimento	Concentração (g L ⁻¹)	Amplitude (%)	Teor de C-PC (mg g ⁻¹)	Pureza
1	3,8	27	64,8	0,57
2	17,2	27	66,2	0,63
3	3,8	63	70,5	0,54
4	17,2	63	71,9	0,57
5	1	45	62,3	0,49
6	20	45	67,6	0,59
7	10,5	20	58,6	0,64
8	10,5	70	68,6	0,56
9	10,5	45	69,56	0,59
10	10,5	45	69,3	0,58
11	10,5	45	67,6	0,59
12	10,5	45	70,9	0,59
13	10,5	45	68,7	0,59

Tabela 6. Teor de C-PC e pureza dos extratos obtidos na extração assistida por US com CaCl₂.

Experimento	Concentração (g L⁻¹)	Amplitude (%)	Teor de C-PC (mg g⁻¹)	Pureza
1	3,8	27	58,3	1,11
2	17,2	27	54,1	0,72
3	3,8	63	62,7	0,80
4	17,2	63	63,7	0,61
5	1,0	45	61,2	0,48
6	20,0	45	59,5	0,53
7	10,5	20	45,6	1,19
8	10,5	70	61,5	0,82
9	10,5	45	64,3	0,96
10	10,5	45	64,3	0,96
11	10,5	45	61,7	0,84
12	10,5	45	62,1	0,85
13	10,5	45	58,6	0,83

A análise dessas tabelas demonstra que o teor de C-PC e a pureza dos extratos variaram em função do tipo de sal e das diferentes condições de processo utilizadas: concentração salina e amplitude do US. O teor máximo de C-PC (71,9 mg g⁻¹) foi obtido com a solução 17,2 g L⁻¹ de NH₄Cl a 63% de amplitude. A máxima pureza (1,19), por sua vez, foi observada aplicando-se o US na amplitude de 20%, utilizando solução de CaCl₂ em concentração de 10,5 g L⁻¹.

A partir dos dados experimentais, os efeitos da concentração salina e da aplicação do US sobre o teor de C-PC dos extratos foram avaliados e utilizados para determinar os coeficientes da equação polinomial e estão apresentados na Tabela 7. A análise estatística mostrou que o efeito linear da amplitude afetou significativamente o teor de C-PC para ambos os solventes ($p < 0,05$). Para a extração com CaCl₂, o efeito quadrático da amplitude também apresentou significância. Por outro lado, a concentração salina não apresentou efeito significativo para os dois sais avaliados. Na tabela também são apresentados os coeficientes de determinação e o valor de F da análise de regressão do modelo. Como pode ser observado, para o sal NH₄Cl, obteve-se um coeficiente de

determinação não satisfatório de 0,680; esse valor foi o melhor obtido considerando a exclusão de alguns fatores não significativos. Isso indica que o modelo não foi adequado para representar os dados experimentais obtidos. Para o sal CaCl_2 , por outro lado, o coeficiente de determinação apresentou valor de 0,81 e valor de F calculado (21,66) superior ao F tabelado (4,10).

Tabela 7. Efeitos e coeficientes de regressão para o teor de C-PC obtidos para os sais NH_4Cl e CaCl_2 .

Fator	NH_4Cl			CaCl_2		
	Efeito	Coeficiente*	Valor p	Efeito	Coeficiente*	Valor p
Mean	68,17	-	0,00	62,16	62,03	0,00
C(L)	2,60	-	0,16	-1,38	-	-
A(L)	6,38	-	<0,05	9,22	4,61	<0,05
C(Q)	-2,19	-	0,11	-0,39	-	0,85
A(Q)	-3,57	-	0,11	-7,40	-3,67	<0,05
C(L)*A(L)	0,00	-	1,00	2,64	-	0,35
R ²		0,68			0,81	
F calculado		-			21,66	

- Os coeficientes foram obtidos para o modelo reduzido.

A Figura 9 apresenta o gráfico de superfície para o teor de C-PC quando utilizado o CaCl_2 como solvente. Os resultados indicam que baixas amplitudes de US proporcionaram extratos com menor teor de C-PC. Li *et al.*, (2020) avaliaram o efeito da amplitude do US na extração das C-PC e reportaram resultados semelhantes: a aplicação de US desempenhou um papel essencial no rompimento celular da *S. platensis* e liberação da C-PC. Além disso, nota-se o efeito quadrático da amplitude, uma vez que, ocorreu uma redução no teor das C-PC em altas amplitudes de US devido, provavelmente, à degradação desse composto; altas amplitudes podem promover a formação de radicais livres, bem como zonas de altas temperaturas e pressões, reduzindo a concentração das C-PC. Em amplitudes menores, o teor de C-PC foi mais baixo devido a menor intensidade do US, não sendo suficiente para o rompimento das células. Resultado semelhante foi relatado por Zhao *et al.* (2006) que, ao aplicarem a tecnologia do US na extração de uma variedade de componentes biológicos ativos, a exemplo dos carotenoides, relataram que altas intensidades de US podem degradar esses componentes. Assim, o uso do US com intensidade elevada pode ser um método de extração inviável para alguns componentes e uma otimização deve sempre ser conduzida para evitar essa degradação.

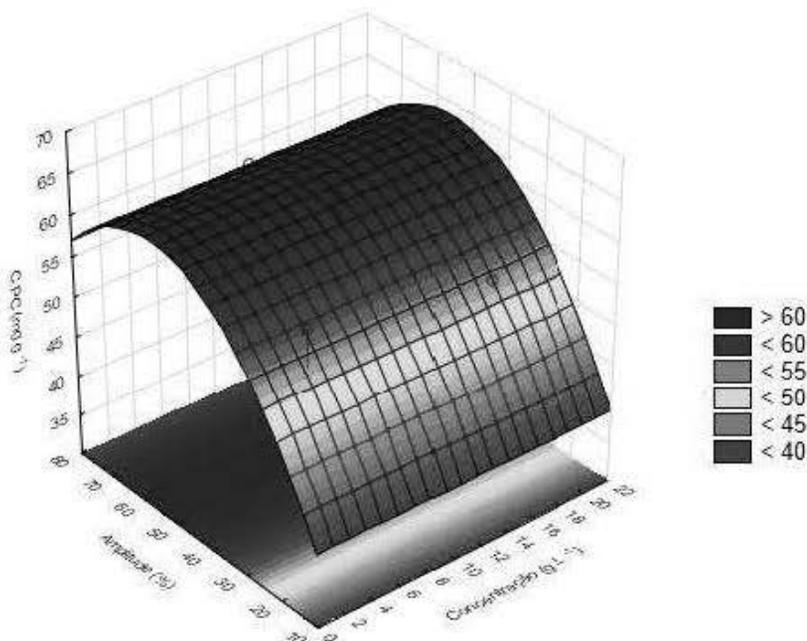


Figura 9. Teor de C-PC versus concentração e amplitude utilizando como solvente CaCl_2 .

No tocante ao grau de pureza, a Tabela 8 apresenta o valor dos efeitos e os coeficientes da equação do modelo polinomial obtidos a partir do planejamento fatorial. Verificou-se que tanto a amplitude do US quanto a concentração da solução salina influenciaram significativamente essa variável ($p < 0,05$). Quando utilizada a solução de NH_4Cl , apenas a interação entre as duas variáveis e o efeito quadrático do US não apresentaram efeito significativo. Para a solução de CaCl_2 , por sua vez, o efeito da amplitude linear e o efeito quadrático da concentração salina foram significativos. Os modelos foram obtidos considerando os efeitos significativos e, em alguns casos, alguns parâmetros não significativos (quando houve uma redução muito drástica do coeficiente de determinação). Após a obtenção dos modelos reduzidos, os modelos apresentaram R^2 de 0,92 e 0,83 para o NH_4Cl e CaCl_2 , respectivamente. Os modelos foram significativos uma vez que os valores de F calculados foram maiores que os F tabelados. Para o NH_4Cl o F tabelado foi de 4,07 e o F calculado foi de 30,66. Por outro lado, para o CaCl_2 o F tabelado e o calculado foram de 3,84 e 9,81, respectivamente.

Os resultados encontrados nesse trabalho estão em concordância com os obtidos por Manirafasha *et al.* (2017) que, ao avaliar a extração via congelamento/descongelamento com o NH_4Cl , constataram não haver influência significativa da concentração de solução salina (0,05; 0,75; 0,1; e 0,125 M) no teor de C-PC. Contudo, para a pureza dos extratos, verificou-se que essa variação na concentração

de sal apresentou significância, sendo obtido maior grau de pureza na concentração 0,05 M de NH₄Cl.

Tabela 8. Efeitos e coeficientes de regressão para a pureza obtidos para os sais NH₄Cl e CaCl₂.

Fator	NH ₄ Cl			CaCl ₂		
	Efeito	Coefficiente*	Valor p	Efeito	Coefficiente*	Valor p
Mean	0,59	0,58	0,00	0,89	0,89	0,00
C(L)	0,06	0,03	<0,05	-0,13	-0,06	0,12
A(L)	-0,05	-0,03	<0,05	-0,24	-0,12	<0,05
C(Q)	-0,04	-0,03	<0,05	-0,35	-0,18	<0,05
A(Q)	0,02	-	0,07	0,15	0,08	0,10
C(L)*A(L)	-0,02	-	0,09	0,10	-	0,35
R ²		0,92			0,83	
F calculado		30,66			9,81	

- Os coeficientes foram obtidos para o modelo reduzido.

As Figuras 10 e 11 apresentam as linhas de contorno para os sais NH₄Cl e CaCl₂, respectivamente. Observa-se, para ambos os sais, um efeito negativo da amplitude do US, ou seja, amplitudes mais baixas proporcionaram extratos com purezas mais elevadas. O efeito do US de alta intensidade impulsiona o colapso implosivo das bolhas de cavitação e intensas ondas de choques que podem romper as paredes da célula (Li *et al.*, 2020). Dessa maneira, a diminuição do grau de pureza pode ser atribuída à maior liberação de proteínas contaminantes que ocorre quando altas intensidades de US são aplicadas.

As figuras também evidenciam o efeito quadrático da concentração das soluções salinas na pureza dos extratos. Nesse sentido, observa-se um efeito crescente dessa variável em concentrações intermediárias e uma redução em concentrações elevadas. Manirafasha *et al.* (2017) relataram um efeito da concentração salina no grau de pureza, porém os pesquisadores não utilizaram técnicas de planejamento de experimento e superfície resposta para avaliar a influência dessa variável e não detectaram, conseqüentemente, um efeito quadrático. No presente trabalho, por meio do planejamento realizado, foi possível verificar que altas concentrações de sal, que aumentam os custos do processo, não proporcionaram a obtenção de extratos mais purificados. Assim, a otimização realizada permite a extração das C-PC de forma rápida e eficiente.

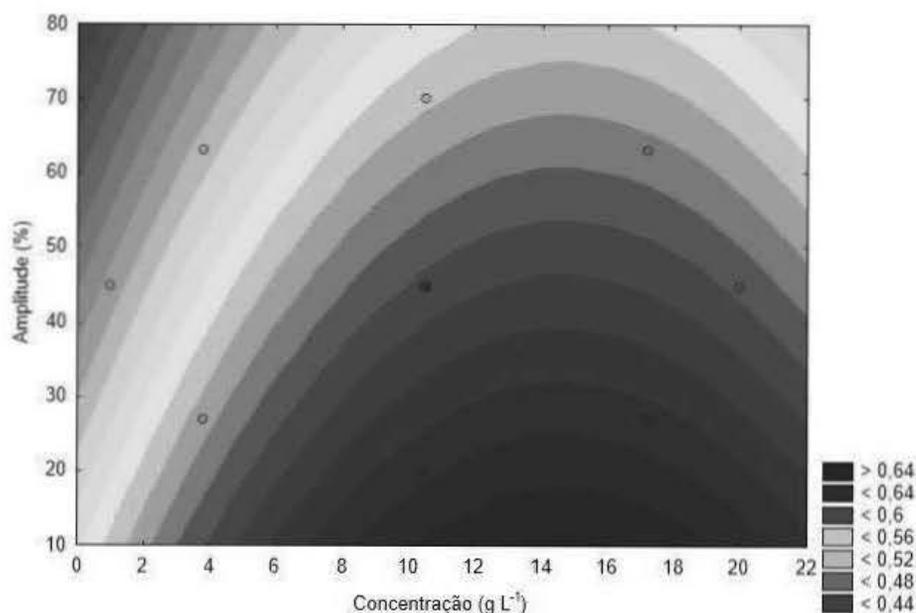


Figura 10. Pureza versus concentração e amplitude utilizando como solvente NH_4Cl .

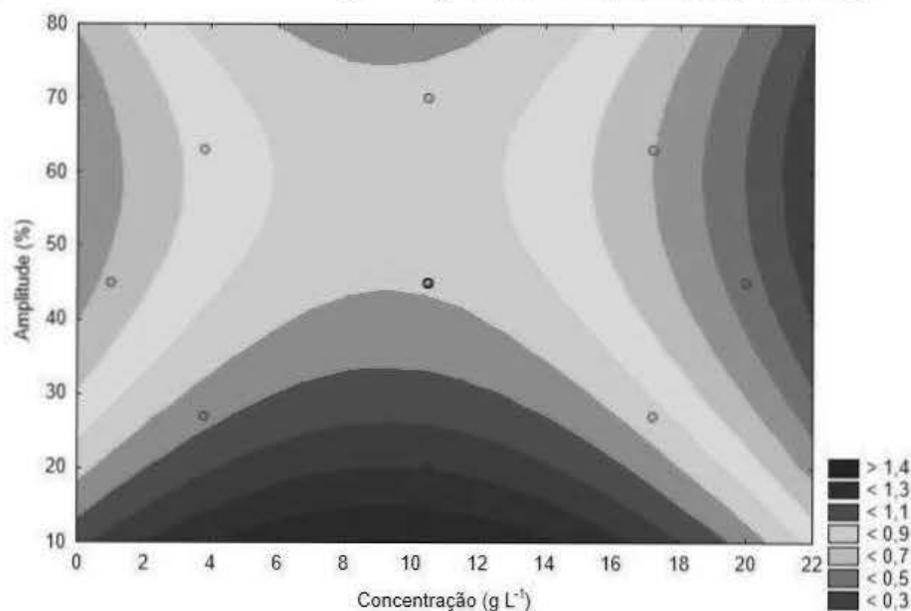


Figura 11. Pureza versus concentração e amplitude utilizando como solvente CaCl_2 .

Além da presença de proteínas nos extratos de baixa pureza, observou-se que esses também os apresentaram coloração esverdeada. As Figuras 12 e 13 mostram fotografias dos extratos obtidos com NH_4Cl e CaCl_2 , respectivamente. Observa-se que em alguns dos extratos obtidos com CaCl_2 e em todos os obtidos com NH_4Cl , a coloração azul, característica das C-PC, foi suprimida, sendo notada uma coloração com tom mais esverdeado. O aumento da cor verde nesses extratos, bem como a variação da tonalidade de azul, são indicativos da extração de clorofila, que é um componente indesejado no meio.

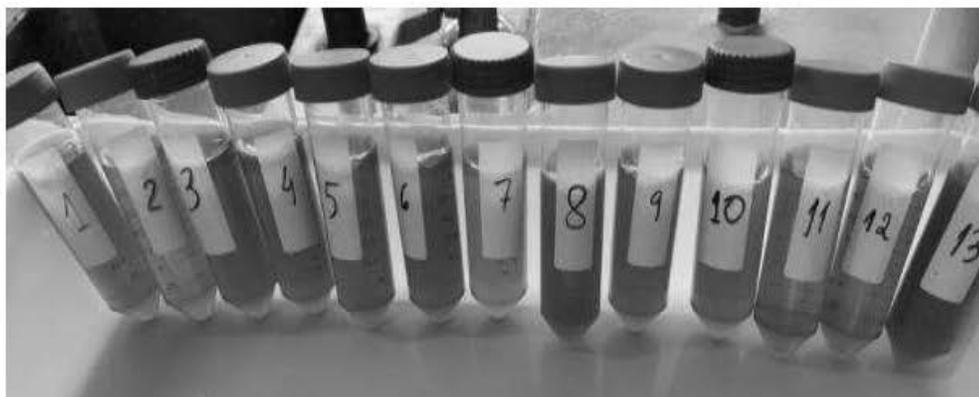


Figura 12. Fotografia dos extratos obtidos na extração via US com NH_4Cl .

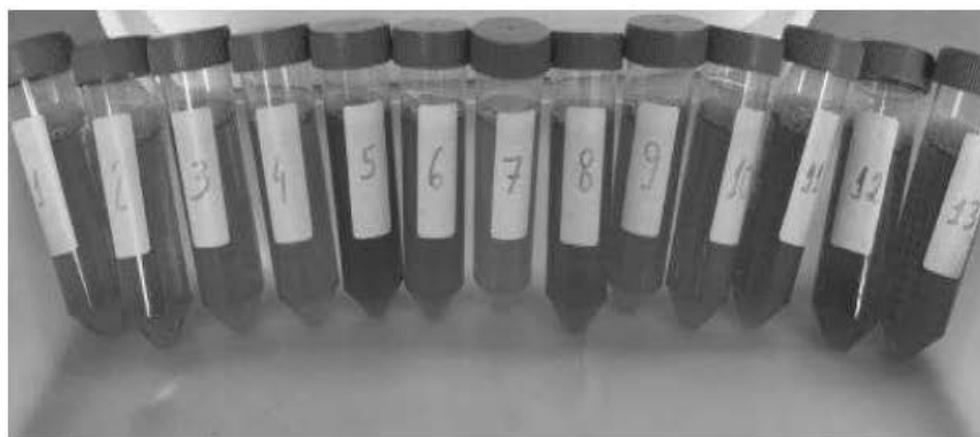


Figura 13. Fotografia dos extratos obtidos na extração via US com CaCl_2 .

Para analisar as diferentes colorações observadas, foi realizada uma análise das varreduras dos extratos, apresentadas nas Figuras 14 e 15. Os extratos que possuem tons mais esverdeados foram aqueles que apresentaram picos mais intensos na região de absorção das clorofilas. As clorofilas apresentam picos de absorção máxima nos comprimentos de onda entre 400-450 nm e 650-700 nm.

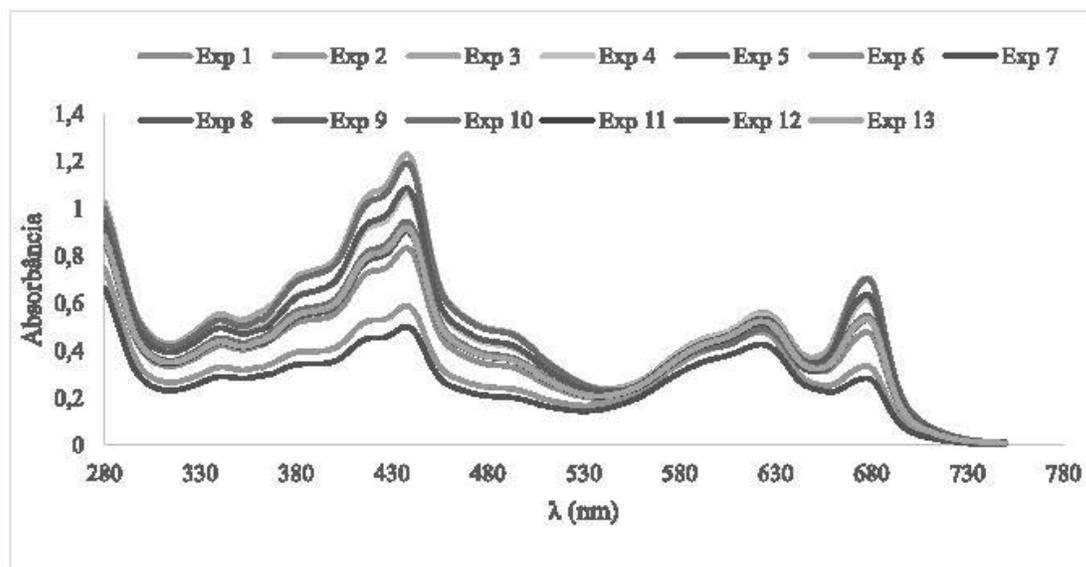


Figura 14. Varredura dos extratos obtidos na extração via US com NH_4Cl .

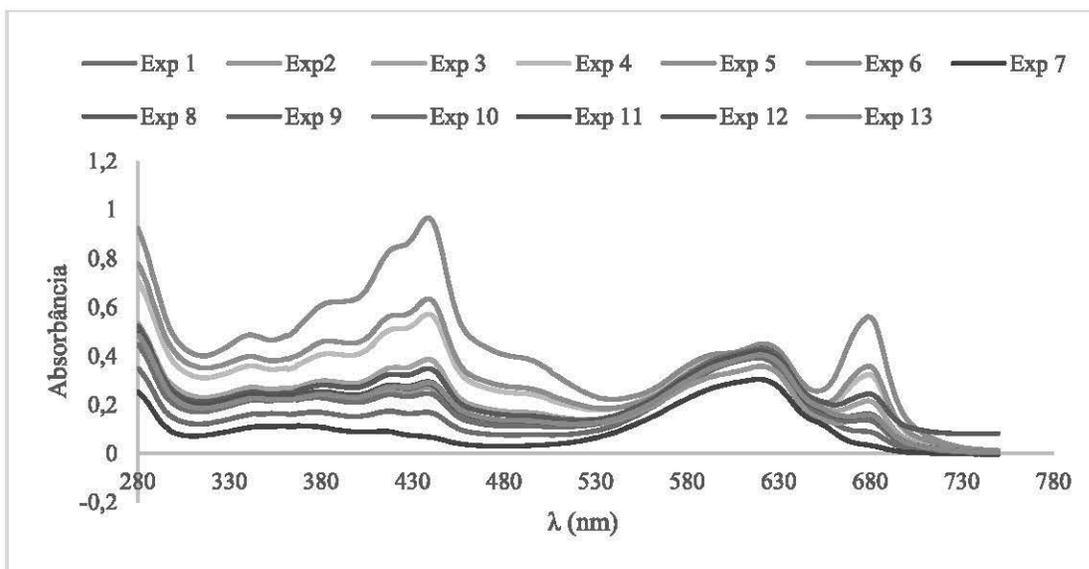


Figura 15. Varredura dos extratos obtidos na extração via US com CaCl_2 .

A partir dos modelos obtidos para o sal CaCl_2 , as condições ideais de extração (concentração da solução salina e amplitude do US) foram determinadas visando maximizar o teor de C-PC e a pureza dos extratos. Para o NH_4Cl , não foi possível obter uma condição otimizada, uma vez que o modelo para a concentração de C-PC não foi satisfatório. A fim de se realizar uma comparação entre os dois sais, escolheu-se uma condição de concentração salina que maximizasse a pureza (uma vez que essa variável não influenciou o teor de C-PC). Para a amplitude, optou-se pelo valor do ponto central para não prejudicar o rendimento da extração e, ao mesmo tempo, obter um grau de pureza satisfatório. A Tabela 9 apresenta o resultado da otimização multiobjetiva para o CaCl_2 e as condições experimentais escolhidas para o NH_4Cl .

Tabela 9. Otimização multiobjetiva para pureza e teor de C-PC.

Solvente	Concentração (g L^{-1})	Amplitude (%)	Pureza	Teor de C-PC (mg g^{-1})
NH_4Cl	15	45	-	-
CaCl_2	8,5	41	0,93	61

Os valores otimizados de pureza e teor de C-PC são obtidos quando se utiliza 41% de amplitude para o CaCl_2 . O resultado encontrado está de acordo com outros estudos, que relatam que os melhores rendimentos de extração foram obtidos em condições de amplitudes moderadas (40-50 %) (Li *et al.*, 2020; Tavanandi *et al.*, 2018). Após a otimização, foram realizados três experimentos de validação nas condições ideais de processo. A Tabela 10 apresenta a comparação entre o valor predito pelo modelo e o valor

experimental médio para o CaCl₂. Além disso, a tabela apresenta o valor experimental para o teor de C-PC e pureza dos extratos obtidos na condição escolhida para o sal NH₄Cl.

Tabela 10. Validação do modelo otimizado para o CaCl₂.

	Teor de C-PC (mg g ⁻¹)		Pureza	
	NH ₄ Cl	CaCl ₂	NH ₄ Cl	CaCl ₂
Valor Predito	-	61	-	0,93
Valor Experimental	68 ± 2	58±2	0,57 ± 0,01	0,96 ±0,03
Erro (%)	-	6	-	3

$$\text{Erro (\%)} = \frac{|\text{Valor}_{\text{experimental}} - \text{Valor}_{\text{predito}}|}{\text{Valor}_{\text{experimental}}} \times 100$$

Para o CaCl₂, os modelos estatísticos representaram bem tanto o teor de C-PC quanto a pureza dos extratos, uma vez que os erros entre os valores experimentais e os valores preditos foram baixos (menor do que 10 %). Os resultados encontrados demonstraram que a solução de NH₄Cl proporcionou extratos com maior teor de C-PC quando comparado com os extratos obtidos com o CaCl₂. Contudo, esses extratos apresentaram grau de pureza abaixo do mínimo requerido para comercialização desse pigmento (pureza de 0,7 para grau alimentício). Além disso, a pureza obtida usando a solução de NH₄Cl foi cerca de 1,7 vezes menor quando comparada com a solução de CaCl₂. A Figura 16 apresenta uma fotografia dos extratos obtidos utilizando as condições referidas para os dois sais. Nessas figuras observa-se que a coloração azulada, característica das C-PC e observada nos extratos com CaCl₂, foi suprimida por uma coloração de tom esverdeado nos extratos obtidos com NH₄Cl. Essa coloração esverdeada é atribuída à maior extração das clorofilas. Esse resultado pode ser confirmado pela análise de espectroscopia de varredura dos extratos, apresentado na Figura 17. Os extratos obtidos com o NH₄Cl apresentaram picos mais intensos na região de absorção das clorofilas (450-500 nm e 650-700 nm) quando comparados aos obtidos com o CaCl₂.

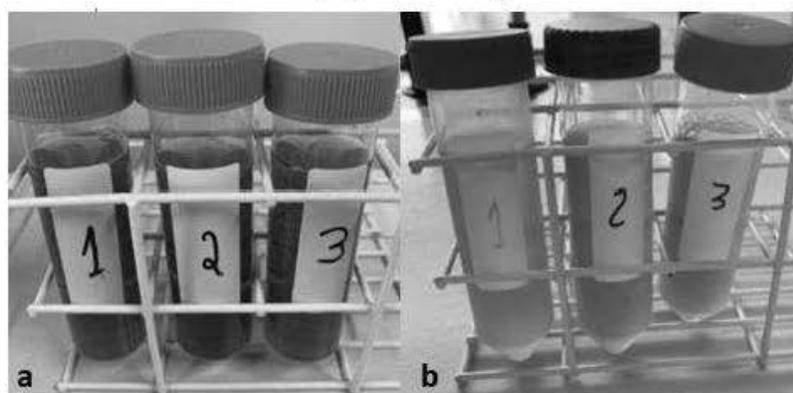


Figura 16. Extratos obtidos nas condições a) escolhidas para o NH₄Cl e b) otimizadas para CaCl₂.

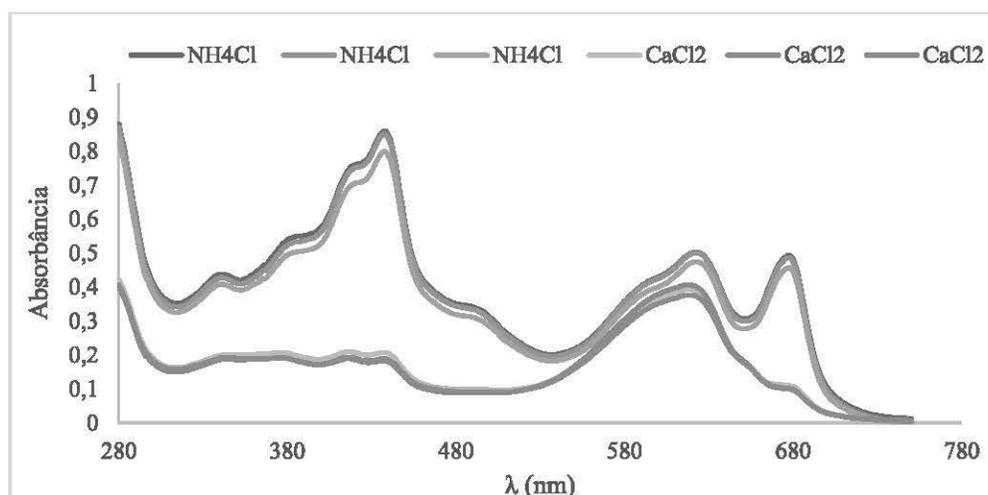


Figura 17. Varredura dos extratos nas condições de extração escolhidas para o NH_4Cl e otimizadas para o CaCl_2 .

Em virtude do exposto, embora o teor máximo de C-PC tenha sido obtido com a solução de NH_4Cl a 15 g L^{-1} , a solução de CaCl_2 a $8,5 \text{ g L}^{-1}$ mostrou ser um solvente extrator mais seletivo e proporcionou extratos com menor teor de clorofilas, maior pureza e com coloração azul. Esses resultados demonstram que o CaCl_2 pode reduzir etapas de purificação das C-PC, minimizando custos de produção. Dessa maneira, a condição de processo otimizada para solução de CaCl_2 foi utilizada para analisar o efeito do US e da força iônica, bem como para a análise das etapas adicionais de purificação.

5.2 Efeito da força iônica e do ultrassom na extração de ficocianinas

Experimentos controle foram realizados para avaliar o efeito da força iônica e do US na extração de C-PC. O experimento controle da força iônica foi realizado utilizando água como solvente na amplitude ótima de 41% (Controle 1) e o experimento controle do US foi conduzido sem a aplicação dessa tecnologia, na concentração ótima de $8,5 \text{ g L}^{-1}$ de CaCl_2 (Controle 2). Os resultados encontrados foram comparados com os obtidos para o experimento otimizado e são apresentados na Tabela 11. Além disso, a Figura 18 apresenta uma fotografia desses extratos.

Tabela 11. Avaliação da força iônica e do US na extração de C-PC.

Variável	Controle 1 (H_2O , 41 % US)	Controle 2 ($8,5 \text{ g L}^{-1}$, 0 % US)	Experimento otimizado ($8,5 \text{ g L}^{-1}$, 41 % US)
Teor de C-PC (mg g^{-1})	37 ± 1^b	10 ± 2^B	$57 \pm 2^{a,A}$
Pureza	$0,30 \pm 0,01^b$	$0,55 \pm 0,09^B$	$0,96 \pm 0,03^{a,A}$

média \pm desvio padrão; médias com letras diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa ($p < 0,05$). Letras minúsculas referem-se à comparação entre o controle 1 e o experimento otimizado; letras maiúsculas compararam o controle 2 e o experimento otimizado.

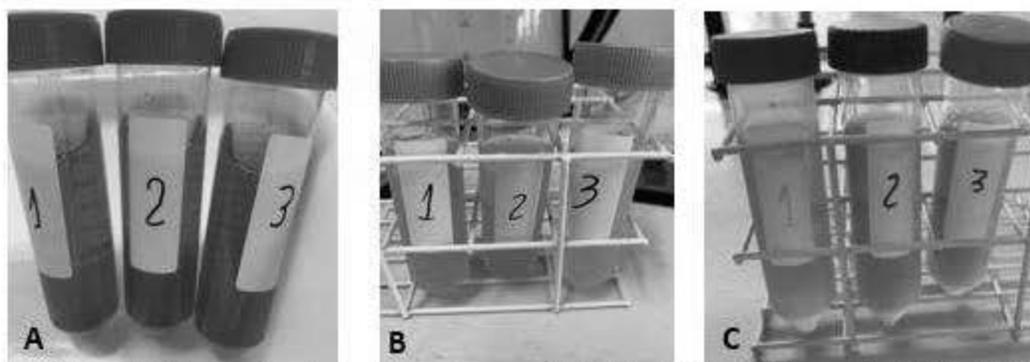


Figura 18. Fotografias dos extratos: a) controle 1 (H_2O , 41 % US); b) controle 2 ($8,5 g L^{-1}$, 0 % US); e c) otimizado ($8,5 g L^{-1}$, 41 % US).

Ao avaliar o efeito da força iônica na amplitude ótima, observa-se que a extração com solução salina proporcionou extratos com maior teor de C-PC e maior pureza, quando comparados aos obtidos com água destilada (Controle 1). Ademais, foi observada pelo aspecto visual e confirmada pela análise das espectroscopias de varredura (Figura 19) que a extração salina reduz a coextração das clorofilas, uma vez que, os picos de absorção atribuídos às clorofilas foram minimizados. Segundo Li *et al.* (2020) a força iônica no meio de extração pode aumentar a pureza dos extratos e minimizar a coextração das clorofilas.

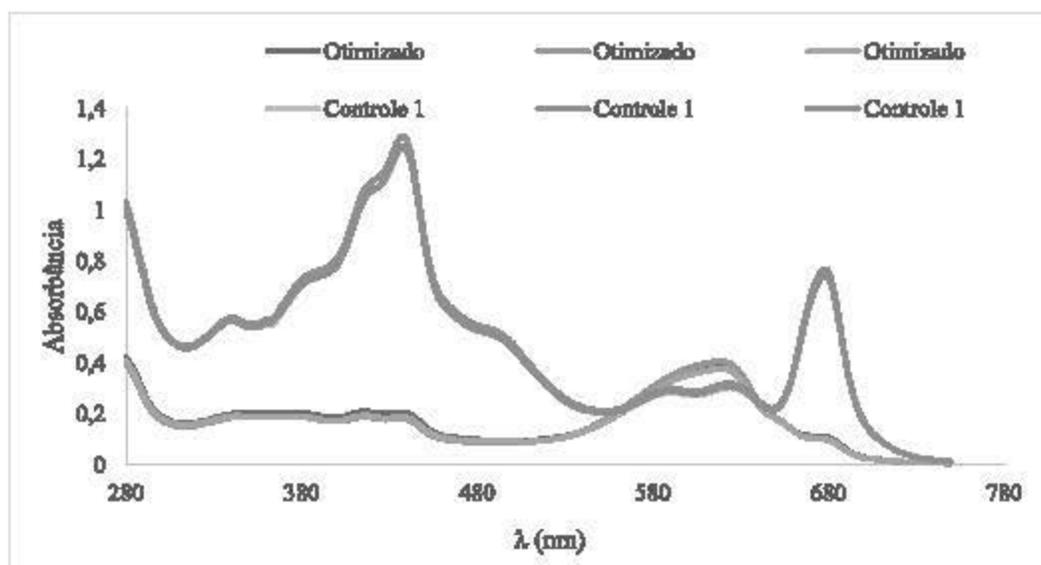


Figura 19. Varredura dos extratos obtidos

Iter *et al.* (2018), ao investigarem o efeito da solução de $CaCl_2$, tampão fosfato de sódio e água destilada como solvente de extração, evidenciaram que a solução de $CaCl_2$ (15 %, m/v) proporcionou extratos com tom de azul mais intenso, corroborando os resultados encontrados no presente trabalho. Contudo, os pesquisadores não avaliaram o

grau de pureza desses extratos, nem o efeito da coextração das clorofilas. A aplicação de US na condição otimizada, a 60% de amplitude por 16 min, extraiu $98,2 \pm 0,6 \text{ mg g}^{-1}$ de C-PC, resultado superior ao encontrado no presente trabalho. Nesse contexto, acredita-se que as variações nos resultados podem ser atribuídas à composição e estrutura celular da biomassa, que varia em função das condições de cultivo.

Além dos espectros de varredura, a análise de cor confirma o efeito positivo da força iônica no meio extrator. O valor de b^* mais negativo nos extratos obtidos com o CaCl_2 é um indicativo da coloração mais azulada que foi observada, sendo atribuído ao maior teor de C-PC e menor extração de clorofilas. Os resultados de cor estão representados na Tabela 12.

Tabela 12. Parâmetros da análise de cor dos extratos.

Parâmetro	Controle 1 (H₂O, 41 % US)	Experimento otimizado (8,5 g L⁻¹, 41 % US)
L*	$29,4 \pm 0,1^a$	$31,7 \pm 0,2^a$
a*	$-1,3 \pm 0,1^b$	$-4,5 \pm 0,1^a$
b*	$6,2 \pm 0,2^a$	$-1,8 \pm 0,1^b$

média \pm desvio padrão; médias com letras iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$).

Com relação à influência do US na extração das C-PC, foi observado um aumento no teor de C-PC de, aproximadamente, 5,4 vezes (Tabela 11). Esse efeito positivo do US é atribuído ao fenômeno da cavitação que danifica a membrana celular, aumentando a difusividade mássica do solvente nas células. Nesse sentido, o US promove maior rendimento de extração pois facilita a liberação dos componentes intracelulares (Ílter *et al.*, 2018). Os resultados obtidos com a tecnologia do US no presente trabalho estão de acordo com os encontrados por Tavanandi *et al.* (2018). Os pesquisadores, utilizando como solvente extrator tampão fosfato, avaliaram que a condição ótima de extração foi observada aplicando-se o US na amplitude de 50% por 2,5 min. Nessas condições, o teor de C-PC foi de $51,51 \text{ mg g}^{-1}$ e a pureza de 0,62.

A análise dos espectros de varredura (Figura 20) mostra que a altura dos picos de absorção a 620 nm é muito maior para as amostras extraídas com o US. Esse aumento na região de absorção das C-PC justifica a maior concentração do composto nos extratos obtidos com o US quando comparado com os extratos Controle 2 (sem US). Além disso, observa-se que o experimento com aplicação de US extraiu mais clorofilas, evidenciado

pelos picos na região de 450 a 500 nm. Esses resultados são corroborados pela análise visual da cor dos extratos (Figura 20). Os extratos obtidos sem o tratamento do US apresentam tons leves de azul, representativo da menor extração das C-PC. Sem o uso de US, maiores rendimentos podem ser alcançados aumentando o tempo de contato entre a biomassa e o solvente. Gorgich *et al.* (2020) relataram que, após 4 horas de extração utilizando solvente tampão fosfato de sódio, foi obtido um teor de C-PC de $42,3 \pm 0,4 \text{ mg g}^{-1}$. Com base nos resultados, a tecnologia de US se mostrou promissora para a extração rápida de C-PC, apresentando bons rendimentos de extração.

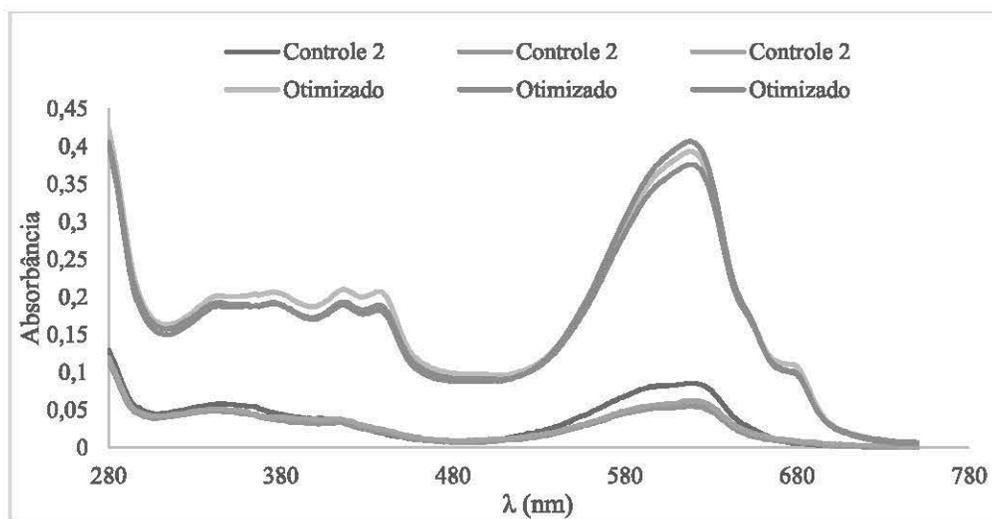


Figura 20. Varredura dos extratos obtidos.

5.3 Extração por congelamento/descongelamento

Os efeitos dos ciclos de congelamento/descongelamento sobre a concentração de C-PC e pureza foram avaliados a fim de encontrar o ciclo que maximizasse essas variáveis. A Tabela 13 apresenta os resultados em função do número de ciclos.

Tabela 13. Teor de C-PC e pureza dos extratos em função dos números de ciclos de congelamento/descongelamento.

	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4
Teor de C-PC (mg g^{-1})	39 ± 2^b	55 ± 6^a	$45 \pm 1^{a,b}$	38 ± 5^b
Pureza	$1,31 \pm 0,05^{a,b}$	$1,41 \pm 0,05^a$	$1,25 \pm 0,06^b$	$1,05 \pm 0,03^c$

média \pm desvio padrão; médias com letras iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$).

Com relação ao teor de C-PC, observa-se que com apenas um ciclo não foi possível extrair completamente esse pigmento. No segundo ciclo, o teor máximo de C-PC foi atingido ($55 \pm 6 \text{ mg g}^{-1}$), e, a partir do quarto ciclo, esse valor começa a decair, indicando uma possível degradação. Para a pureza, por outro lado, observa-se que maiores valores foram obtidos no primeiro e segundo ciclos de extração, sendo que, a partir do terceiro ciclo, esse parâmetro começa a reduzir significativamente. Essa redução no grau de pureza, além de ser associada à degradação do pigmento, pode também ser atribuída à maior extração de componentes indesejáveis no meio.

Os resultados encontrados nesse estudo sugerem que repetidos ciclos de congelamento/descongelamento podem degradar as C-PC e diminuir a pureza dos extratos. Chittapun *et al.* (2020) encontraram resultados semelhantes, sugerindo que o aumento do número de ciclos pode degradar as C-PC solúveis no extrato bruto, comprometendo a pureza. No trabalho realizado por Horváth *et al.* (2013), teores de C-PC máximos foram obtidos no segundo ciclo de congelamento/descongelamento, para três das quatro espécies de cianobactérias estudadas; após ser atingido o ciclo ótimo, os teores de C-PC decaíram.

De acordo com os resultados apresentados, conclui-se que a combinação que resulta no maior teor de C-PC e na maior pureza foi alcançada no segundo ciclo do processo. Comparando esse método de extração com o método assistido por US na condição otimizada (41 % de intensidade e $8,5 \text{ g L}^{-1}$ de CaCl_2), observa-se que a extração pelo congelamento/descongelamento resultou em extratos mais purificados, conforme representado na Tabela 14. Com relação ao teor de C-PC, não foi observado diferença significativa entre os dois métodos utilizados.

Tabela 14. Teor de C-PC e pureza dos extratos obtidos pelo método de congelamento/descongelamento e pelo método assistido por US nas condições otimizadas.

Variável	Congelamento/descongelamento	US
Teor de C-PC (mg g^{-1})	55 ± 6^a	58 ± 3^a
Pureza	$1,41 \pm 0,05^a$	$0,96 \pm 0,03^b$

média \pm desvio padrão; médias com a mesma letra minúscula na mesma linha não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$).

Embora o congelamento/descongelamento tenha proporcionado extratos mais purificados, a tecnologia do US possibilitou extratos com grau de pureza dentro dos limites aceitáveis para aplicação desse pigmento na indústria de alimentos. Além disso,

com apenas 5 min de aplicação do US, obteve-se um rendimento de extração semelhante ao encontrado com o congelamento/descongelamento. Assim sendo, levando-se em consideração as dificuldades associadas à aplicação do método convencional em larga escala, como o alto consumo de energia e o longo tempo de processo, a tecnologia de US mostra-se um método de extração bastante promissor. Dessa maneira, os próximos tópicos, relacionados às etapas adicionais de purificação, serão realizados utilizando os extratos obtidos através dessa tecnologia.

5.4 Purificação por adsorção com quitosana e carvão ativado

Os experimentos de purificação por adsorção foram realizados utilizando quitosana e carvão ativado em diferentes concentrações. A Tabela 15 mostra os resultados de recuperação de C-PC e o grau de pureza dos extratos obtidos em cada experimento do planejamento fatorial empregado. A análise da tabela evidencia que o percentual de recuperação de C-PC e o grau de pureza variaram em função das concentrações de adsorventes utilizados em cada experimento, sendo que o maior valor de pureza (1,71) foi obtido com 6,5 % (m/v) de CA e 0,1 % (m/v) de CS, enquanto o percentual máximo de recuperação de C-PC (96,0 %) foi obtido com 1 % (m/v) de CA e 1,6 % (m/v) de CS.

Tabela 15. Recuperação de C-PC (%) e pureza dos extratos obtidos na purificação por adsorção com CS e CA.

Experimento	CS %(m/v)	CA %(m/v)	Recuperação (%)	Pureza
1	0,5	2,6	90,7	1,27
2	2,6	2,6	95,1	0,85
3	0,5	10,4	78,7	1,62
4	2,6	10,4	82,7	1,28
5	0,1	6,5	83,5	1,71
6	3,0	6,5	85,5	1,12
7	1,6	1,0	96,0	0,99
8	1,6	12,0	77,4	1,46
9	1,6	6,5	84,4	1,29
10	1,6	6,5	85,6	1,30
11	1,6	6,5	86,4	1,25
12	1,6	6,5	83,4	1,35
13	1,6	6,5	81,6	1,19

A Figura 21 apresenta uma fotografia contendo o extrato bruto (sem numeração) e os extratos obtidos após os experimentos de purificação do planejamento experimental. Observa-se que os extratos purificados com CA e CS apresentaram um tom mais azulado e menor turbidez quando comparados com o extrato bruto, sem purificação.

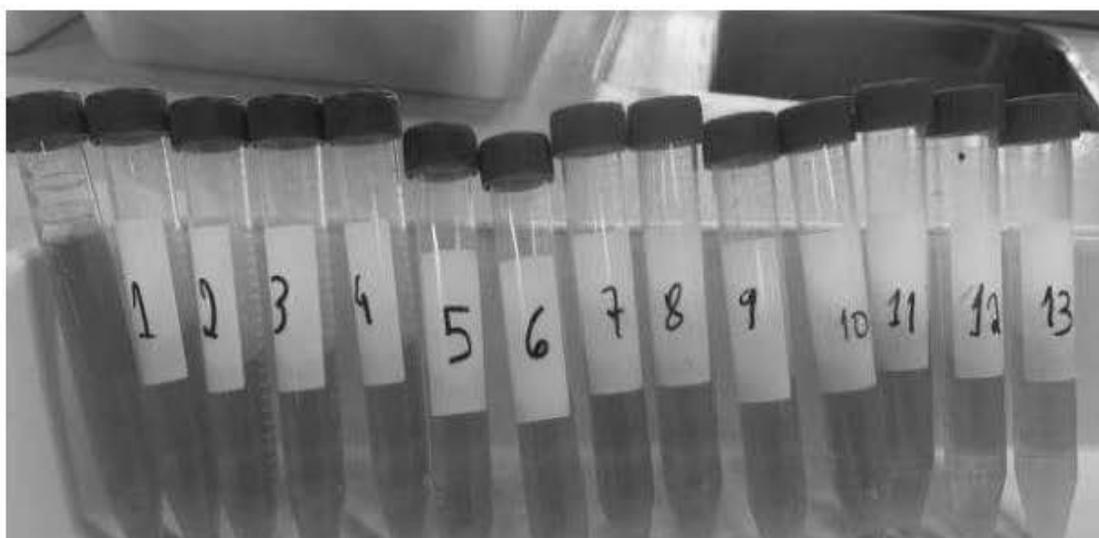


Figura 21. Fotografia dos extratos obtidos purificados com CA e CS.

Os efeitos da concentração de CS e CA no percentual de recuperação das C-PC e no grau de pureza dos extratos foram avaliados e utilizados para determinar os coeficientes da equação polinomial, que são apresentados na Tabela 16. Os modelos foram obtidos considerando apenas os efeitos significativos, e representaram os dados experimentais com um coeficiente de determinação R^2 de 0,94 tanto para o percentual de recuperação quando para pureza, respectivamente. Observa-se que os efeitos lineares da concentração de CA e da concentração de CS, além do efeito quadrática da concentração de CA, foram significativos no percentual de recuperação. Para o grau de pureza, verificou-se que os efeitos lineares das concentrações de CS e CA e o efeito quadrático da concentração de CS apresentaram significância.

Na Figura 22 são apresentadas as linhas de contorno da recuperação das C-PC. Nota-se uma redução no percentual dessa variável com o aumento da concentração de CA. Para a CS, tem-se um efeito contrário: quanto maior a concentração de CS, maior a recuperação. Fekrat *et al.* (2018), ao avaliarem a purificação das C-PC pelo método de adsorção com CA e CS, relataram que uma elevada concentração de CA pode ocasionar uma diminuição da adsorção das C-PC.

Tabela 16. Efeitos e coeficiente de regressão para o percentual de recuperação das C-PC (%) e pureza após a purificação por afinidade com CA e CS.

Fator	Recuperação (%)			Pureza		
	Efeito	Coeficiente	Valor p	Efeito	Coeficiente*	Valor p
		*				
Mean	84,21	85,56	0,00	1,29	1,25	0,00
CS (L)	2,85	1,40	<0,05	-0,40	-0,209	<0,05
CA (L)	-12,70	-6,34	<0,05	0,36	0,18	<0,05
CS (Q)	0,93	-	0,52	0,09	0,06	<0,05
CA(Q)	3,07	1,47	<0,05	-0,99	-	0,12
CA (L) * CS (L)	-0,22	-	0,90	0,04	-	0,52
R ²		0,94			0,94	
F calculado		46,89			44,37	

* Os coeficientes foram obtidos para o modelo reduzido.

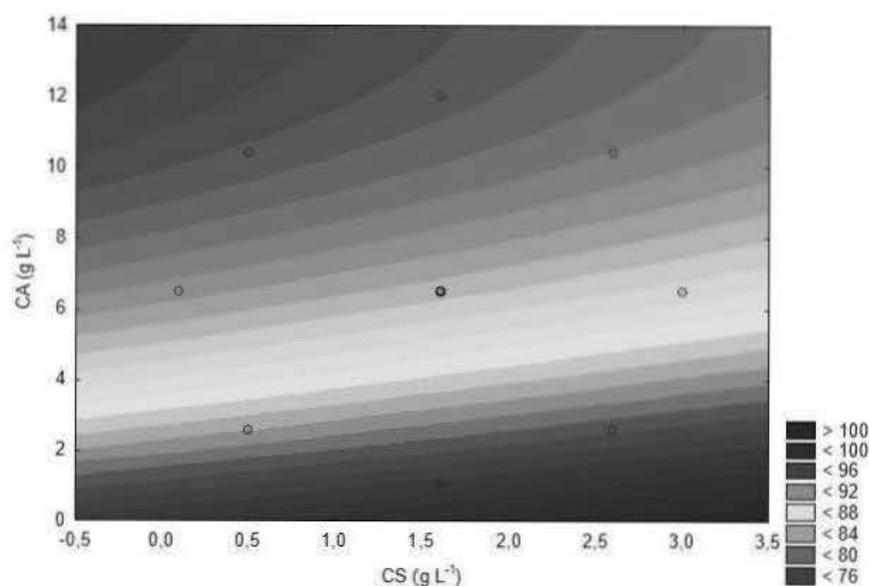


Figura 22. Linhas de contorno de recuperação das C-PC (%) em função das concentrações de CA e CS.

Com relação ao grau de pureza, as linhas de contorno (Figura 23) mostraram um efeito positivo em relação à concentração de CA, ou seja, maiores concentrações desse adsorvente proporcionaram extratos mais purificados. Fekrat *et al.* (2018) também constataram que a adição de CA no extrato bruto de C-PC elevou o grau de pureza. No entanto, esses pesquisadores relataram que concentrações elevadas desse adsorvente

induzem um efeito reverso, com uma redução no grau de pureza ocasionada pela adsorção das C-PC (e não de outras proteínas).

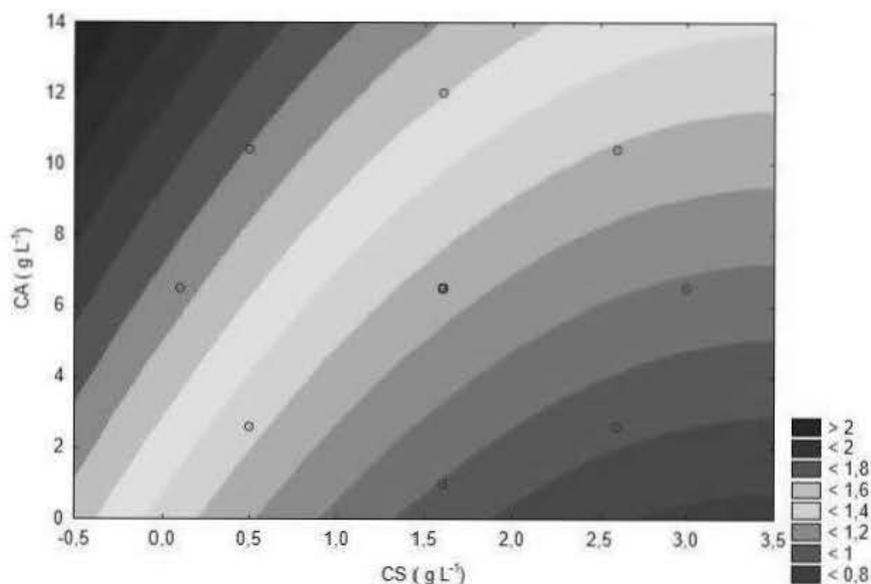


Figura 23. Linhas de contorno do grau de pureza em função das concentrações de CA e CS.

Com relação à concentração de CS, observa-se que o seu aumento reduziu o grau de pureza dos extratos. Esse efeito negativo difere de outros estudos reportados na literatura (Patil *et al.*, 2006). Liao *et al.* (2011) encontraram bons resultados ao utilizar a técnica de adsorção com CS na purificação das C-PC. Entretanto, diferente da CS utilizada no presente trabalho (que tem massa molecular média), esse estudo utilizou CS de baixa massa molecular. Dessa maneira, acredita-se que a massa molecular desse adsorvente tenha influenciado na purificação, sendo necessário um estudo mais aprofundado.

Considerando os resultados obtidos para o CS, optou-se por realizar a etapa de otimização apenas com o adsorvente CA. Além disso, uma vez que o percentual de recuperação das C-PC possui uma relação inversamente proporcional à purificação dos extratos (ou seja, extratos mais purificados têm um percentual de recuperação menor), levou-se em consideração, inicialmente, apenas a maximização do grau de pureza. Posteriormente, na etapa destinada à avaliação do tempo de agitação, tanto a concentração de C-PC quanto a pureza foram analisadas.

A condição ótima da purificação por adsorção está apresentada na Tabela 17. Essa tabela também apresenta a comparação entre o valor predito pelo modelo e o valor experimental obtido a partir de três experimentos realizados. Observa-se que o modelo polinomial representou bem o grau de pureza dos extratos após a purificação por adsorção

com CA uma vez que o erro experimental ficou abaixo de 10%. A Figura 24 apresenta uma fotografia dos extratos obtidos no experimento de validação.

Tabela 17. Otimização do grau de pureza na etapa de purificação por adsorção com CA.

Variável	Concentração de CA % (m/v)	Valor Predito	Valor Experimental Médio	%Erro
Pureza	12	1,79	1,82 ±0,05	1,59

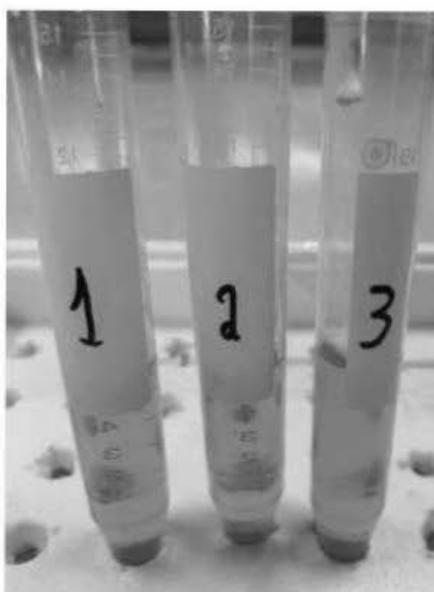


Figura 24. Extratos obtidos após a validação do ponto ótimo da purificação por adsorção com CA.

Após a purificação por adsorção com CA, o grau de pureza aumentou cerca de 1,5 vezes quando comparado com o extrato bruto (sem purificação). Contudo, testes cinéticos demonstraram haver influência da centrifugação adicional sobre esse aumento na pureza dos extratos. Sendo assim, foi realizado um experimento onde extratos sem a etapa de purificação (controle) foram centrifugados simultaneamente com os extratos purificados, a fim de verificar o real efeito do aumento do grau de pureza. A Tabela 18 apresenta os resultados desse estudo.

Tabela 18. Avaliação do efeito da centrifugação adicional na otimização da purificação por adsorção com CA.

Variável	Extrato Bruto	Controle	Adsorvido
Pureza	1,16 ^c	1,44 ± 0,01 ^b	1,82 ±0,05 ^a

média ± desvio padrão; médias com letras iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$).

Conforme pode ser observado, a centrifugação adicional do extrato sem a etapa de purificação (controle) elevou o grau de pureza. Contudo, o uso do adsorvente possibilitou a obtenção de extratos ainda mais purificados, um indicativo do efeito positivo dessa técnica de purificação. Não foram encontrados estudos na literatura que verificassem o efeito da centrifugação adicional; no geral, os autores comparam os resultados obtidos entre o extrato bruto e o purificado.

O grau de pureza máximo alcançado no presente trabalho, ao utilizar a etapa de purificação por adsorção, foi inferior aos relatados por Lee *et al.* (2016) e Fekrat *et al.* (2018). A maior pureza encontrada em outros estudos pode ser atribuída ao efeito da CS de baixa massa molecular e ao tamanho do poro do CA. Lee *et al.* (2016) utilizaram CA com granulometria de 20 a 40 mesh, mas não informaram a massa molecular da CS. Por outro lado, Fekrat *et al.* (2018) utilizaram CS de baixa massa molecular e CA com granulometria de 100 a 400 mesh. O presente estudo, por sua vez, utilizou CS de média massa molecular e CA com granulometria de 14 a 25 mesh. Diante do exposto, verifica-se a existência de uma lacuna de conhecimento quanto à influência das características dos adsorventes (massa molecular da CS e tamanho de poro do CA) para que seja possível estabelecer um método padrão que possa fornecer extratos mais purificados.

Após a otimização, foi realizado um teste na condição ótima a fim de avaliar a influência do tempo de agitação no percentual de recuperação das C-PC e na pureza dos extratos. A Tabela 19 apresenta os valores encontrados para essas variáveis em função do tempo de agitação.

Tabela 19. Recuperação (%) das C-PC e pureza dos extratos obtidos em diferentes tempos de agitação.

	2 min	5 min	10 min	15 min	30 min
Recuperação (%)	85 ± 1 ^a	83 ± 1 ^{a, b}	81 ± 1 ^b	75 ± 2 ^c	60 ± 1 ^d
Pureza	1,55 ± 0,04 ^c	1,68 ± 0,01 ^c	1,82 ± 0,01 ^b	1,88 ± 0,02 ^{a, b}	1,96 ± 0,01 ^a

média ± desvio padrão; médias com letras iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$).

Observa-se que com o aumento do tempo de agitação há uma diminuição da recuperação de C-PC, sobretudo para tempos maiores. Por outro lado, para o grau pureza, verifica-se um efeito positivo em função do tempo de agitação: quanto maior o tempo de agitação, maior a absorção de outras proteínas e, conseqüentemente, maior a pureza.

Fekrat *et al.* (2018) reportou resultados semelhantes em que o aumento do tempo de agitação reduziu o valor do teor C-PC; contudo, diferente do que foi encontrado no presente estudo, os pesquisadores evidenciaram que o grau de pureza também decaiu em tempos maiores de agitação.

O tempo de agitação de 10 min foi considerado o melhor para atingir o equilíbrio entre o percentual de recuperação de C-PC e o grau de pureza. Nessa condição, foram encontrados valores de pureza de 1,82 e um percentual de recuperação de 81%. Este resultado assemelha-se ao encontrado por Fekrat *et al.* (2018) que encontraram um tempo ótimo de agitação para etapa de purificação por adsorção de 10,2 min, atingindo pureza de 3,14, com rendimento de 79%.

5.5 Precipitação com sulfato de amônio

Para avaliar a eficiência da precipitação com sulfato de amônio na purificação do extrato bruto das C-PC, foram construídos gráficos do teor de C-PC e do grau de pureza no precipitado e no sobrenadante em função das diferentes concentrações da solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, conforme mostrado nas Figuras 25 e 26, respectivamente. Os pontos experimentais foram unidos por retas para melhor visualização.

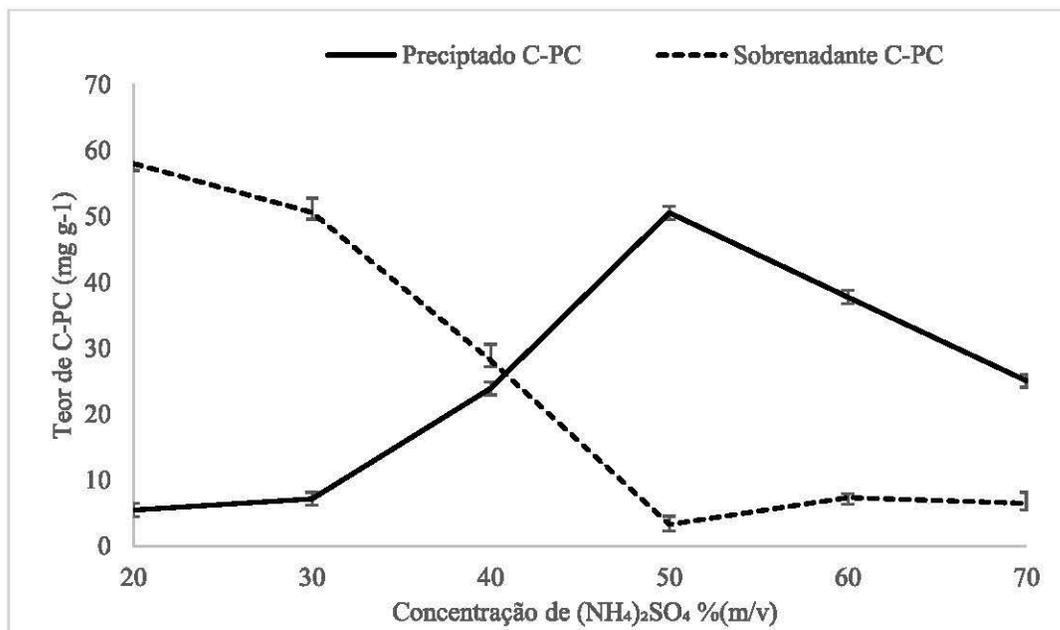


Figura 25. Teor de C-PC no precipitado e sobrenadante em função das diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

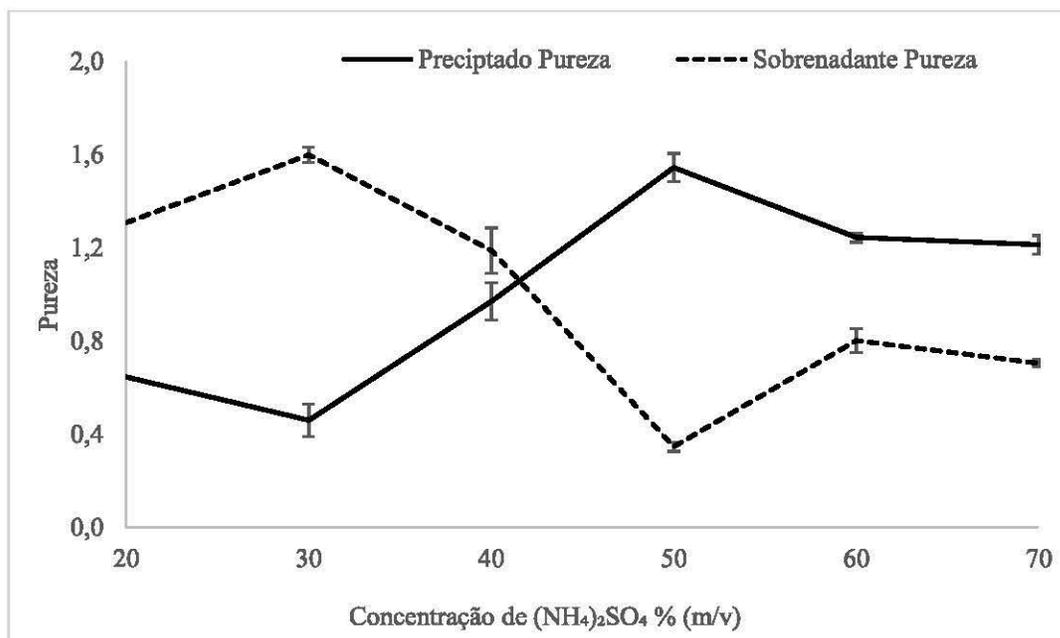


Figura 26. Pureza no precipitado e sobrenadante em função das diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Como pode ser observado na Figura 25, ao aumentar o nível de concentração do sal, o teor de C-PC encontrado no precipitado aumentou e, conseqüentemente, reduziu no sobrenadante. A concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que proporcionou extratos com maior pureza e teor de C-PC foi de 50%. Além disso, observou-se que, em concentrações acima da ótima, ocorreu uma redução do grau de pureza devido à degradação do pigmento de interesse.

No trabalho realizado por Gorgich *et al.* (2020), ao avaliarem a precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no extrato bruto de C-PC obtido com tampão fosfato de potássio, a condição ótima foi observada a 60 % de concentração. Além disso, diferente do presente estudo, o aumento da concentração do sal não afetou o teor das C-PC. Essa diferença pode ser atribuída à extração salina com CaCl_2 realizada anteriormente à purificação; acredita-se que o meio salino possibilitou que a condição ótima fosse obtida em uma menor concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A extração salina das C-PC seguida da etapa de precipitação com sal também apresentou bons resultados no trabalho realizado por Manirafasha *et al.* (2017). Na Figura 25 observa-se também, a degradação do pigmento em concentrações mais elevadas de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que pode ser atribuída à desnaturação das C-PC em função do excesso de sal.

5.6 Estratégias de purificação

Com o intuito de avaliar as técnicas de purificação em combinação, diferentes estratégias de purificação foram adotadas: 1) precipitação salina seguida de uma etapa de filtração com membrana; 2) etapa de adsorção seguida de precipitação salina; e 3) etapas de adsorção e precipitação salina seguidas de etapa de filtração por membrana.

Na estratégia 1, cujos resultados estão apresentados na Tabela 20, avaliou-se a precipitação salina, na melhor condição de concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (50%), seguida de uma etapa de filtração com membrana (hidrofílica de fluoreto de polivinilideno). Observa-se que o fator de recuperação no precipitado foi de 72 % e a pureza 1,55; após a filtração com membranas, o percentual de recuperação de C-PC diminuiu para 67 % e o grau de pureza aumentou para 2,07. Resultado semelhante foi encontrado por Kumar & Wattal, (2014) ao avaliarem a precipitação das C-PC com solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 65 %, alcançando extratos com pureza de 1,5 e fator de recuperação de 80%.

Tabela 20. Percentual de recuperação de C-PC e pureza utilizando a estratégia 1.

	Extrato bruto	Precipitação ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50%)	Filtração membrana
Recuperação (%)	100 ^a	72 ± 1 ^b	67 ± 1 ^c
Pureza	1,16 ^c	1,55 ± 0,02 ^b	2,07 ± 0,02 ^a

média ± desvio padrão; médias com letras iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$).

Na estratégia 2, a precipitação por adsorção com CA (12 g L⁻¹) e a precipitação salina com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (utilizando diferentes concentrações) foram aplicadas de forma sequencial. O grau de pureza e o teor de C-PC dos extratos, em função das diferentes saturações da solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, são apresentados nas Figuras 27 e 28.

Os gráficos mostram que a etapa de adsorção não modificou o comportamento geral do teor de C-PC e da pureza no precipitado e no sobrenadante. A concentração ótima de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ permaneceu em 50%, sendo observada, também, degradação das C-PC para valores superiores de concentração. Nessa condição foi encontrado um grau de pureza de 1,98 e um percentual de recuperação de 53 %.

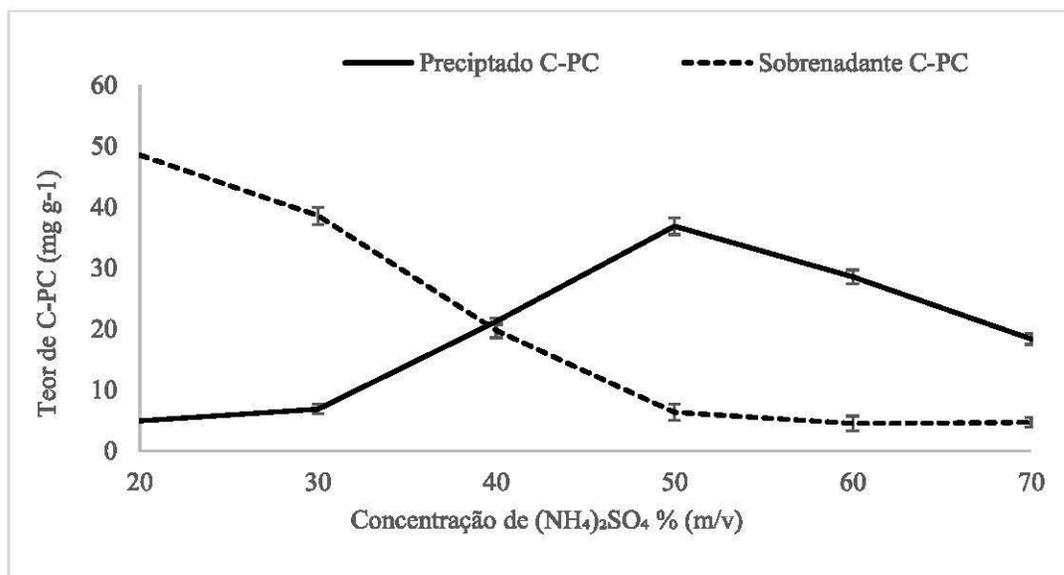


Figura 27. Teor de C-PC no precipitado e sobrenadante em função das diferentes concentrações de (NH₄)₂SO₄.

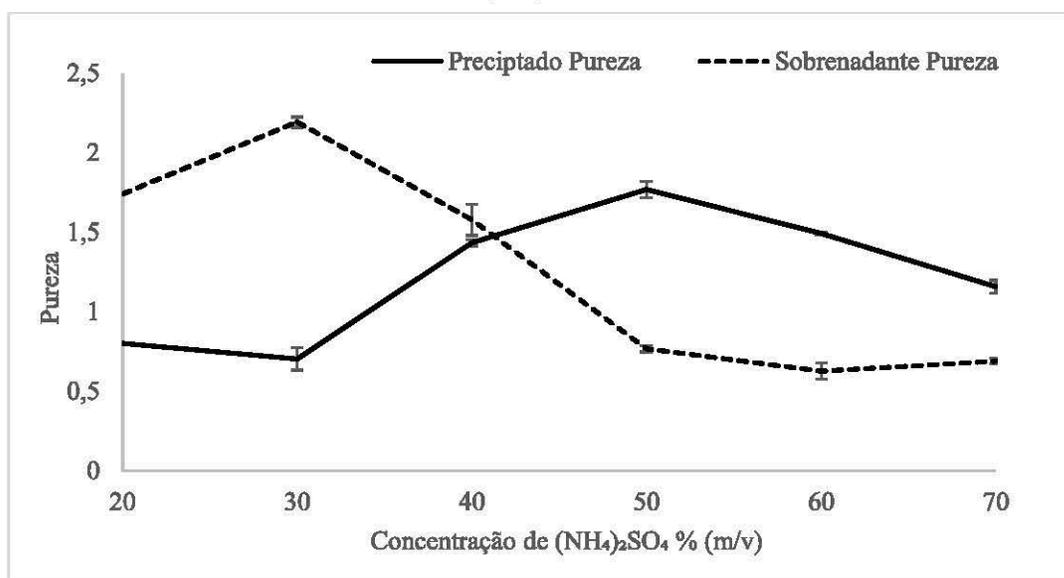


Figura 28. Pureza no precipitado e sobrenadante em função das diferentes concentrações de (NH₄)₂SO₄.

A terceira estratégia de purificação adotada consistiu em realizar uma etapa de filtração por membrana após as etapas de adsorção e precipitação salina. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 21, em que se observa que o grau pureza aumentou de 1,98 para 2,52 com a realização da etapa de filtração. Observa-se, também, que não houve diferença no percentual de recuperação da C-PC com a adição dessa etapa.

Tabela 21. Percentual de recuperação de C-PC e pureza em diferentes etapas do processo de purificação.

	Extrato Bruto	Adsorção CA	Precipitação (NH₄)₂SO₄, 50%	Filtração membrana
Recuperação (%)	100 ^a	81 ± 2 ^b	53 ± 1 ^c	51 ± 1 ^c
Pureza	1,16 ^d	1,81 ± 0,02 ^c	1,98 ± 0,01 ^b	2,52 ± 0,02 ^a

média ± desvio padrão; médias com letras iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$).

Embora o grau de pureza obtido com a aplicação das estratégias de purificação tenha sido maior do que a aplicação das técnicas isoladas, observa-se que o teor de recuperação das C-PC foi menor ao utilizar essas combinações. Maior grau de pureza e, conseqüentemente, menor fator de recuperação foram relatados no trabalho de Gantar *et al.* (2012), ao utilizar estratégia de purificação com precipitação por adsorção seguida de saturação fracionada com (NH₄)₂SO₄ encontrar extratos com grau de pureza de 4,2. O maior grau de pureza encontrado pelos pesquisadores pode ser atribuído a biomassa, bem como as diferenças das características dos adsorventes e a saturação do fracionamento.

De forma geral, observa-se que a aplicação de etapas de purificação em sequência, apesar de elevar o grau de pureza dos extratos, possuem impacto negativo no fator de recuperação. Nesse contexto, a estratégia a ser adotada depende da aplicação futura das C-PC. Comparando a precipitação por adsorção e a precipitação salina, a primeira é mais vantajosa considerando o menor tempo necessário para realizar a purificação, além de se apresentar como um método mais ambientalmente favorável.

Capítulo 6 – Conclusões

Nesse capítulo são apresentadas as principais conclusões do presente trabalho que teve como objetivos: i) propor uma metodologia de extração de ficocianinas provenientes da *Spirulina platensis* assistida por ultrassom utilizando soluções salinas e ii) avaliar métodos de purificação de baixo custo para a obtenção de extratos altamente concentrados e purificados em ficocianinas.

Com relação às condições de extração, a amplitude do US apresentou efeito significativo no teor de C-PC e na pureza dos extratos, enquanto a concentração da solução salina exibiu efeito apenas no grau de pureza. Dentre os solventes em estudo (NH_4Cl e CaCl_2), embora o teor máximo de C-PC tenha sido obtido com a solução de NH_4Cl , a solução de CaCl_2 proporcionou extratos com maior grau de pureza e menor teor de clorofilas. A condição ótima de extração para a solução de CaCl_2 foi de 41% de amplitude e concentração de $8,5 \text{ g L}^{-1}$, sendo essa a escolhida para a realização dos estudos de purificação.

Na condição otimizada de extração foi evidenciado que o US promove o rompimento celular de maneira eficiente e que a força iônica da solução de CaCl_2 , além de reduzir a coextração das clorofilas, proporcionou extratos mais purificados e com maior teor de C-PC. A comparação entre a extração assistida por US e o método convencional de congelamento/descongelamento mostrou que ambos os métodos apresentaram o mesmo desempenho em relação ao teor de C-PC, mas para o grau de pureza o método convencional apresentou melhores resultados.

A utilização de diferentes técnicas de purificação, isoladas ou em combinação, resultaram em extratos com diferentes graus de pureza de C-PC. Embora, a combinação das técnicas de purificação apresenta resultados satisfatórios em relação ao grau de pureza, uma menor recuperação do pigmento é observada. Individualmente, a técnica de adsorção com carvão ativado isolada se apresenta como um método mais vantajoso, em função da simplicidade e menor tempo de execução do processo, além de ser um método de purificação mais ambientalmente amigável.

Por fim, acredita-se que a combinação da extração assistida por US e a purificação por adsorção apresenta-se como uma metodologia atrativa para obtenção de extratos de C-PC com alta concentração e pureza. Nesse contexto, maiores estudos devem ser

realizados para padronização da técnica de precipitação por adsorção a fim de se obter extratos mais purificados.

Sugestões para trabalhos futuros

A partir desse estudo, pode-se elencar algumas sugestões para trabalhos futuros:

- avaliar as características dos adsorventes do método de purificação por adsorção: massa molecular da CS e tamanho de poro do CA;
- avaliar a estabilidade dos extratos obtidos com a tecnologia do US antes e após a purificação.

REFERÊNCIAS

- Aiba, S., & Ogawa, T. (1977). Assessment of growth yield of a blue-green alga, *Spirulina platensis*, in axenic and continuous culture. *Journal of General Microbiology*, 102(1), 179–182. <https://doi.org/10.1099/00221287-102-1-179>
- Ali, S. K., & Saleh, A. M. (2012). Spirulina - An overview. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(SUPPL.3), 9–15. <https://doi.org/10.1201/9780203025901.ch14>
- Barros, K. K. D. S. (2010). Produção de biomassa de *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) para alimentação humana. *Bdtd.Biblioteca.Ufpb.Br*, 112. http://bdtd.biblioteca.ufpb.br/tde_arquivos/15/TDE-2010-10-14T150702Z-687/Publico/arquivototal.pdf
- Bennett, A., & Bogobad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *Journal of Cell Biology*, 58(2), 419–435. <https://doi.org/10.1083/jcb.58.2.419>
- BORBA, V. A.; FERREIRA CAMARGO, L. S. (2003). CIANOBACTÉRIA *Arthrospira (Spirulina) platensis*: BIOTECNOLOGIA E APLICAÇÕES.
- CETESB. (2013). *Manual de Cianobactérias Planctônicas: legislação, orientações para o monitoramento e aspecto ambientais* (Issue July).
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., & Bunnag, B. (2012a). Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochemistry*, 47(4), 659–664. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.010>
- Chaiklahan, R., Chirasuwan, N., & Bunnag, B. (2012b). Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina* sp.: Influence of temperature, pH and preservatives. *Process Biochemistry*, 47(4), 659–664. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2012.01.010>
- Chittapun, S., Jonjaroen, V., Khumrangsee, K., & Charoenrat, T. (2020). C-phycocyanin extraction from two freshwater cyanobacteria by freeze thaw and pulsed electric field techniques to improve extraction efficiency and purity. *Algal Research*, 46(January), 101789. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101789>

- Cisneros, M., & Rito-Palomares, M. (2004). A simplified strategy for the release and primary recovery of c-phycoyanin produced by spirulina maxima. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 18(4), 385–390.
- De Morais, M. G., Vaz, B. D. S., De Morais, E. G., & Costa, J. A. V. (2015). Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/835761>
- Doonan, S. (1996). Bulk purification by fractional precipitation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 59, 135–144. <https://doi.org/10.1385/0-89603-336-8:135>
- Fekrat, F., Nami, B., Ghanavati, H., Ghaffari, A., & Shahbazi, M. (2018). Optimization of chitosan/activated charcoal-based purification of *Arthrospira platensis* phycocyanin using response surface methodology. *Journal of Applied Phycology*, 31(2), 1095–1105. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1626-8>
- Fernández-Rojas, B., Hernández-Juárez, J., & Pedraza-Chaverri, J. (2014). Nutraceutical properties of phycocyanin. *Journal of Functional Foods*, 11(C), 375–392. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.10.011>
- Ferreira-Santos, P., Nunes, R., De Biasio, F., Spigno, G., Gorgoglione, D., Teixeira, J. A., & Rocha, C. M. R. (2020). Influence of thermal and electrical effects of ohmic heating on C-phycoyanin properties and biocompounds recovery from *Spirulina platensis*. *Lwt*, 128(January). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109491>
- Gantar, M., Simović, D., Djilas, S., Gonzalez, W. W., & Miksovská, J. (2012). Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycoyanin from *Limnothrix* sp. strain 37-2-1. *Journal of Biotechnology*, 159(1–2), 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.02.004>
- Giraldo-Calderón, N. D., Romo-Buchelly, R. J., Arbeláez-Pérez, A. A., Echeverri-Hincapié, D., & Atehortúa-Garcés, L. (2018). Microalgae biorefineries: Applications and emerging technologies. *DYNA (Colombia)*, 85(205), 219–233. <https://doi.org/10.15446/dyna.v85n205.68780>
- Gorgich, M., Passos, M. L. C., Mata, T. M., Martins, A. A., Saraiva, M. L. M. F. S., & Caetano, N. S. (2020). Enhancing extraction and purification of phycocyanin from *Arthrospira* sp. with lower energy consumption. *Energy Reports*, 6(December), 312–318. <https://doi.org/10.1016/j.egyr.2020.11.151>

- Greenly, J. M., & Tester, J. W. (2015). Ultrasonic cavitation for disruption of microalgae. *Bioresource Technology*, 184, 276–279. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.036>
- Hadiyanto, S. H. (2016). Response surface optimization of ultrasound assisted extraction (UAE) of phycocyanin from microalgae *Spirulina platensis*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28(4), 227–234. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2015-05-193>
- Hadiyanto, S., Sutanto, H., & Suzery, M. (2016). Phycocyanin extraction from microalgae *Spirulina platensis* assisted by ultrasound irradiation: Effect of time and temperature. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 38(4), 391–398. <https://doi.org/10.14456/sjst-psu.2016.51>
- Hess, W. R. (2011). Cyanobacterial genomics for ecology and biotechnology. *Current Opinion in Microbiology*, 14(5), 608–614. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.07.024>
- Horváth, H., Kovács, A. W., Riddick, C., & Présing, M. (2013). Extraction methods for phycocyanin determination in freshwater filamentous cyanobacteria and their application in a shallow lake. *European Journal of Phycology*, 48(3), 278–286. <https://doi.org/10.1080/09670262.2013.821525>
- Hsieh-Lo, M., Castillo, G., Ochoa-Becerra, M. A., & Mojica, L. (2019). Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability. *Algal Research*, 42(March), 101600. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101600>
- İlter, I., Akyıl, S., Demirel, Z., Koç, M., Conk-Dalay, M., & Kaymak-Ertekin, F. (2018). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, 70(August 2017), 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.04.007>
- Jaeschke, D P, Sheffler, M. L., Mercali, G. D., & Marczak, L. D. (2020). Extração de ficocianinas da spirulina platensis assistida por ultrassom. 7º *Simpósio de Segurança Alimentar*, 55(51), 1–6.
- Jaeschke, Débora Pez. (2019). *Aplicação de tecnologias emergentes na extração de compostos de interesse a partir de microalgas*. [Tese (Doutorado)]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- Jatobá, A., Bellas, H., Marinho, A. R., Amaral, F. G., Salazar, M., Mateus, S., Lossio, C., Jatobá, A., Bellas, H., Koster, I., Bonfatti, R., Vidal, M. C. R., Carvalho, P. V. R., Rodrigues, Y. W., Medeiros, A. P., Reinert, F., Veiga, R. K., Gontijo, L. A., Federal, U., ... Brito, M. (2016). Aproveitamento do resíduo agroindustrial de juçara (*Euterpe edulis* Mart.): um estudo de diferentes técnicas de extração de compostos fenólicos e antocianinas usando altas pressões. *Revista Brasileira de Ergonomia*, 9(2), 10. <https://doi.org/10.5151/cidi2017-060>
- Kamble, S. P., Gaikar, R. B., Padalia, R. B., & Shinde, K. D. (2013). Extraction and purification of C-phycoyanin from dry Spirulina powder and evaluating its antioxidant, anticoagulation and prevention of DNA damage activity. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(8), 149–153. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.3826>
- Kannaujiya, V. K., Sundaram, S., & Sinha, R. P. (2017). Phycobiliproteins: Recent developments and future applications. In *Phycobiliproteins: Recent Developments and Future Applications*. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-6460-9>
- Kotovicz, V. (2014). *Extração rápida de compostos solúveis de erva-mate (Ilex paraguariensis) por ciclos de compressão e descompressão hidrostática: experimentos, modelagem e simulação*. (vol. 53, Issue 9) [Tese (Doutorado)]. Universidade Federal do Paraná.
- Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G., & Al-Hazimi, A. (2013). Recent developments in production and biotechnological applications of c-phycoyanin. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/742859>
- Kumar, D., & Wattal, D. (2014). *Extraction and purification of C-phycoyanin from Spirulina*. 19(June), 184–188. <https://doi.org/10.1007/s40502-014-0094-7>
- Lee, S. H., Lee, J. E., Kim, Y., & Lee, S. Y. (2016). The Production of High Purity Phycocyanin by *Spirulina platensis* Using Light-Emitting Diodes Based Two-Stage Cultivation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178(2), 382–395. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1879-5>
- Li, Y., Zhang, Z., Paciulli, M., & Abbaspourrad, A. (2020). Extraction of phycocyanin—A natural blue colorant from dried spirulina biomass: Influence of processing parameters and extraction techniques. *Journal of Food Science*, 85(3), 727–735.

<https://doi.org/10.1111/1750-3841.14842>

- Liao, X., Zhang, B., Wang, X., Yan, H., & Zhang, X. (2011). Purification of C-phycocyanin from spirulina platensis by single-step ion-exchange chromatography. *Chromatographia*, 73(3–4), 291–296. <https://doi.org/10.1007/s10337-010-1874-5>
- Lupatini, A. L., Colla, L. M., Canan, C., & Colla, E. (2016). Potential application of microalgae. *J Sci Food Agric*, 25.
- Manirafasha, E., Murwanashyaka, T., Ndikubwimana, T., Yue, Q., Zeng, X., Lu, Y., & Jing, K. (2017). Ammonium chloride: a novel effective and inexpensive salt solution for phycocyanin extraction from Arthrospira (Spirulina) platensis. *Journal of Applied Phycology*, 29(3), 1261–1270. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0989-y>
- Martelli, G., Folli, C., Visai, L., Daglia, M., & Ferrari, D. (2014). Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from Spirulina platensis for food industry applications. *Process Biochemistry*, 49(1), 154–159. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.10.008>
- Meregalli, M. M. (2017). *ESTUDO COMPARATIVO DE DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA CASCA DO ARAÇÁ-VERMELHO (Psidium cattleianum Sabine)* [Dissertação (Mestrado)]. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões.
- Miranda, M. A. da S. (2014). *Ocorrência de cianobactérias e cianotoxinas na água de cinco importantes rios no Estado de Minas Gerais Brasil* [Dissertação (Mestrado)]. Universidade do Porto.
- Moraes, C. C., Sala, L., Cerveira, G. P., & Kalil, S. J. (2011). C-Phycocyanin extraction from Spirulina platensis wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(1), 45–49. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322011000100006>
- Narciso, S. P. da C. (2016). *Estudo dos processos de extração e purificação de ficocianina de cianobactérias Tese de Mestrado* [Dissertação (Mestrado)]. Universidade do Porto.
- Pan-utai, W., & Iamtham, S. (2019). Extraction, purification and antioxidant activity of phycobiliprotein from Arthrospira platensis. *Process Biochemistry*, 82, 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.04.014>

- Patel, A., Mishra, S., Pawar, R., & Ghosh, P. K. (2005). Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. *Protein Expression and Purification*, *40*(2), 248–255. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.10.028>
- Patil, G., Chethana, S., Sridevi, A. S., & Raghavarao, K. S. M. S. (2006). Method to obtain C-phycocyanin of high purity. *Journal of Chromatography A*, *1127*(1–2), 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.073>
- Patil, G., & Raghavarao, K. S. M. S. (2007). *Aqueous two phase extraction for purification of C-phycocyanin*. *34*(November 2006), 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.11.026>
- Phong, W. N., Show, P. L., Ling, T. C., Juan, J. C., Ng, E. P., & Chang, J. S. (2018). Mild cell disruption methods for bio-functional proteins recovery from microalgae—Recent developments and future perspectives. *Algal Research*, *31*(April), 506–516. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.005>
- Piero Estrada, J. E., Bermejo Bescós, P., & Villar del Fresno, A. M. (2001). Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Farmaco*, *56*(5–7), 497–500. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(01\)01084-9](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(01)01084-9)
- Rafiqi, U. N., Gul, I., Saifi, M., Nasrullah, N., Ahmad, J., Dash, P., & Zainul Abidin, M. (2019). Cloning, identification, and in silico analysis of terpene synthases involved in the competing pathway of artemisinin biosynthesis pathway in *Artemisia annua* L. *Pharmacognosy Magazine*, *15*(62), S38–46. <https://doi.org/10.4103/pm.pm>
- ROMAY, C., & GONZALEZ, R. (2000). Phycocyanin is an Antioxidant Protector of Human Erythrocytes Against Lysis by Peroxyl Radicals. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *52*(4), 367–368. <https://doi.org/10.1211/0022357001774093>
- Romay, C., Gonzalez, R., Ledon, N., Remirez, D., & Rimbau, V. (2005). C-Phycocyanin: A Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects. *Current Protein & Peptide Science*, *4*(3), 207–216. <https://doi.org/10.2174/1389203033487216>
- Roquebert, M. F., & Bury, E. (1993). Effect of freezing and thawing on cell membranes of *Lentinus edodes*, the shiitake mushroom. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *9*(6), 641–647. <https://doi.org/10.1007/BF00369571>

- Santos Junior, A. G., Piraine, R. E. A., Cunha, R. C., Nizoli, L. Q., Andreotti, R., & Leite, F. P. L. (2017). AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA OBTENÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES. *Science And Animal Health*, 5(2), 166. <https://doi.org/10.15210/sah.v5i2.11387>
- Sarada, R., Pillai, M. G., & Ravishankar, G. A. (1999). Phycocyanin from *Spirulina* sp: Influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry*, 34(8), 795–801. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00153-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00153-8)
- Sbeghen, A. L. (2017). *Processo de separação por membranas na purificação de ficocianina de Spirulina sp.* [Dissertação (Mestrado)]. Universidade de Passo Fundo.
- Sekar, S., & Chandramohan, M. (2008). Phycobiliproteins as a commodity: Trends in applied research, patents and commercialization. *Journal of Applied Phycology*, 20(2), 113–136. <https://doi.org/10.1007/s10811-007-9188-1>
- Show, K. Y., Lee, D. J., Tay, J. H., Lee, T. M., & Chang, J. S. (2015). Microalgal drying and cell disruption - Recent advances. *Bioresource Technology*, 184, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.139>
- Silva, L. A., Kuhn, K. R., Moraes, C. C., Burkert, C. A. V., & Kalil, S. J. (2009). Experimental Design as a Tool for Optimization of C-Phycocyanin Purification by Precipitation from *Spirulina platensis*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(1), 5–12. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000100003>
- Singh, S., Kate, B. N., & Banecjee, U. C. (2005). Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(3), 73–95. <https://doi.org/10.1080/07388550500248498>
- Soares, A. P. (2013). ESTUDO DO PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA OBTENÇÃO DE FICOCIANINA A PARTIR DA MICROALGA *Spirulina platensis* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO [Dissertação (Mestrado)]. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9).
- Soni, B., Kalavadia, B., Trivedi, U., & Madamwar, D. (2006). Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata*-Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. *Process Biochemistry*, 41(9), 2017–2023. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.04.018>

- Sonotronic Ultrasonics Technology. (2017). *Sonication of Biosolids — SONOTRONIC*.
<http://www.sonotronic.de/technologies/ultrasonic/sonication-of-bio-solids>
- Sørensen, L., Hantke, A., & Eriksen, N. T. (2013). Purification of the photosynthetic pigment C-phycoyanin from heterotrophic *Galdieria sulphuraria*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(12), 2933–2938.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.6116>
- Soria, A. C., & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 21(7), 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.003>
- Su, C. H., Liu, C. S., Yang, P. C., Syu, K. S., & Chiu, C. C. (2014). Solid-liquid extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis*: Kinetic modeling of influential factors. *Separation and Purification Technology*, 123, 64–68.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.12.026>
- Sun, L., Wang, S., & Qiao, Z. (2006). Chemical stabilization of the phycocyanin from cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Journal of Biotechnology*, 121(4), 563–569.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.08.017>
- Tavanandi, H. A., Mittal, R., Chandrasekhar, J., & Raghavarao, K. S. M. S. (2018). Simple and efficient method for extraction of C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*. *Algal Research*, 31(August 2017), 239–251.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.008>
- Tavanandi, H. A., & Raghavarao, K. S. M. S. (2020). Ultrasound-assisted enzymatic extraction of natural food colorant C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*. *LWT*, 118, 108802. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108802>
- Vernès, L., Abert-Vian, M., El Maâtaoui, M., Tao, Y., Bornard, I., & Chemat, F. (2019a). Application of ultrasound for green extraction of proteins from spirulina. Mechanism, optimization, modeling, and industrial prospects. *Ultrasonics Sonochemistry*, 54, 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.02.016>
- Vernès, L., Abert-Vian, M., El Maâtaoui, M., Tao, Y., Bornard, I., & Chemat, F. (2019b). Application of ultrasound for green extraction of proteins from spirulina. Mechanism, optimization, modeling, and industrial prospects. *Ultrasonics Sonochemistry*, 54(January), 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.02.016>

- Warren, J. K. (2011). Evaporitic source rocks: mesohaline responses to cycles of “famine or feast” in layered brines. In *Quaternary carbonate and evaporite sedimentary facies and their ancient analogues* (Issue January 2011, pp. 315–392). John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781444392326.ch16>
- Xi-Feng Zhang, Xin Wang, G.-H. L. (2017). Ultrasound-Assisted Three Phase Partitioning of. *European Journal of Pure and Applied Chemistry*, 4(1), 1–15.
- Yoshikawa, N., & Belay, A. (2008). Single-laboratory validation of a method for the determination of c-phycoyanin and allophycoyanin in spirulina (*Arthrospira*) supplements and raw materials by spectrophotometry. *Journal of AOAC International*, 91(3), 524–529. <https://doi.org/10.1093/jaoac/91.3.524>
- Zhao, L., Zhao, G., Chen, F., Wang, Z., Wu, J., & Hu, X. (2006). Different effects of microwave and ultrasound on the stability of (all-E)-astaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 8346–8351. <https://doi.org/10.1021/jf061876d>