



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PURIFICAÇÃO DE C-FICOCIANINA POR DIFERENTES TÉCNICAS E AVALIAÇÃO
DA ESTABILIDADE DA COR EM SORVETE

MARINA CAMPOS ASSUMPÇÃO DE AMARANTE

PROF.^a DR.^a SUSANA JULIANO KALIL

Orientadora

DR.^a LUISA SALA

Coorientadora

RIO GRANDE, RS

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PURIFICAÇÃO DE C-FICOCIANINA POR DIFERENTES TÉCNICAS E AVALIAÇÃO
DA ESTABILIDADE DA COR EM SORVETE

MARINA CAMPOS ASSUMPÇÃO DE AMARANTE

Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para
obtenção do título de mestre
em Engenharia e Ciência de
Alimentos

PROF.^a DR.^a SUSANA JULIANO KALIL
Orientadora

DR.^a LUISA SALA
Coorientadora

RIO GRANDE, RS

2019

Ficha catalográfica

A485p Amarante, Marina Campos Assumpção de.
Purificação de c-ficocianina por diferentes técnicas e avaliação da estabilidade da cor em sorvete / Marina Campos Assumpção de Amarante. – 2019.
158 f.

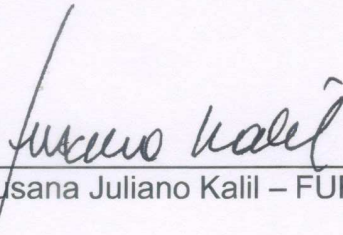
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2019.
Orientadora: Dra. Susana Juliano Kalil.
Coorientadora: Dra. Luisa Sala.

1. Cromatografia de Troca Iônica 2. Precipitação 3. Ultrafiltração
4. *Spirulina* 5. Matriz Alimentar 6. Biocorante 7. Atividade Antioxidante
I. Kalil, Susana Juliano II. Sala, Luisa III. Título.

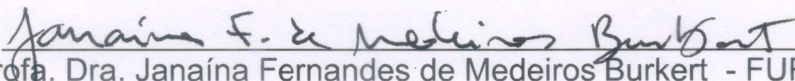
CDU 664.38

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Marina Campos Assumpção de Amarante e aprovada em 26 de março de 2019, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



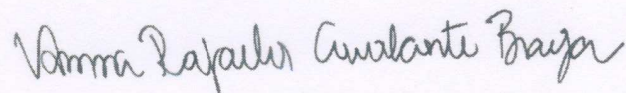
Profa. Dra. Susana Juliano Kalil - FURG



Profa. Dra. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert - FURG



Prof. Dr. Luiz Antonio de Almeida Pinto - FURG



Profa. Dra. Anna Rafaela Cavalcante Braga - UNIFESP

Aos meus pais, Ndia e Marcos, que me criaram para abraçar o mundo,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Nádía e Marcos, por todo amor, apoio, dedicação e confiança. Sobretudo, agradeço por tudo o que sacrificaram para que eu e meus irmãos tivéssemos uma vida melhor, para que pudéssemos estudar e realizar nossos sonhos. Obrigada por comemorarem minhas conquistas e, principalmente, por me erguerem durante minhas frustrações. Amo vocês!

Agradeço a minha família: meus irmãos, Rafael, Vitor e Tatiana, e meus tios, Fátima, Antônio e João. Obrigada pelo apoio em todas as horas, pela paciência e por entenderem minhas ausências.

Agradeço a minha orientadora, Professora Susana, por ser, como ela mesmo diz, minha “mãe científica”. Hoje vejo que este termo não poderia ser mais adequado, já que foste tu quem me introduziu ao mundo da pesquisa ao me dar a primeira oportunidade acadêmica, quando ainda era aluna da graduação. Acredito que tudo que conquistei na academia desde então foram consequências desta primeira oportunidade que me deste, e por isso sou eternamente grata. Obrigada pela confiança que sempre tivestes em mim, pelos ensinamentos profissionais e pessoais e por me guiar ao longo desta caminhada. És um de meus maiores exemplos!

Agradeço a minha querida amiga e coorientadora, Luisa, por todo o carinho, dedicação e confiança. Lui, obrigada por aceitar essa “bucha”, pois sem teu apoio diário tudo teria sido muito mais difícil. Obrigada por me ensinar muito e por sentar comigo para estudar o que ainda não sabíamos. Obrigada por me socorrer sempre que eu ia atrás de ti com um problemão, o que não foram poucas vezes, e por me confortar quando tudo dava errado. Obrigada por tua amizade, pelas palhaçadas e risadas, que tornavam os meus dias muito mais divertidos. És um anjo que a Prof. Susana colocou em minha vida!

Agradeço ao meu melhor amigo e amor, Vinícius. *“I was just an only child of the universe, and then I found you. You are the sun and I am just the planets spinning around you”*.

Obrigada pelo teu apoio e incentivo incondicional, e por trazer o melhor de mim sempre. Obrigada por ouvir minhas frustrações e por estar lá quando só o que eu precisava era de um abraço. Obrigada pelas risadas, paciência e parceria, e por entender todas as minhas ausências. Te amo!

Agradeço aos meus queridos amigos, Henrique (“É só a Marina tocar na alga que já faz uma ficocianina!”), Cláudia, Bruna, Diego, Guilherme, Victoria, Leonardo, Laura e Ikram. Obrigada pelo incentivo sempre, e por tornarem minha vida mais alegre e divertida. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, seja ao vivo ou por Skype, seja nas horas boas ou nas ruins. Amo vocês!

Agradeço as minhas colegas e amigas, Gabrielle, Thais, Andressa, Joana (o outro anjo que a Prof. Susana colocou na minha vida!), Jéssica, Camila, Nathiéli e Igreine. Obrigada pelos ensinamentos, choros, risadas e pelo apoio diário de vocês. Gabi, obrigada pelas conversas, às

vezes científicas, mas na maior parte não, e pela tua paciência comigo. “Infelizmente, não tem no Brasil, meninas”.

Agradeço também ao meu querido amigo Pablo pela parceria, pelos almoços semanais e por ouvir sobre minhas vitórias e frustrações. Do TCC para a vida!

Agradeço a nossa técnica, Ana, por cuidar de nós todos os dias no laboratório, pelos ensinamentos, incentivos e conversas.

Aos meus bolsistas de iniciação científica, Júnior, Andressa e Caroline. Obrigada por me deixarem compartilhar o pouco conhecimento que tenho com vocês e por toda a ajuda para desenvolver este trabalho. Júnior, obrigada por fazerem mais alegres os dias em que ficávamos até tarde no laboratório.

Agradeço a família do Vinícius – Elisandra, Vó Marli (in memoriam), Vó Ivone e Vô Cyro, pelo carinho, preocupação e apoio sempre.

Agradeço as técnicas Rejane, pelos momentos de descontração e amizade, e Aline, por auxiliar muito no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço a Professora Caroline Moraes da UNIPAMPA pelo auxílio e por esclarecer várias dúvidas durante os ensaios de cromatografia. Agradeço também as Professoras Anna Rafaela e Veridiana da UNIFESP por me receberem em seus laboratórios e auxiliarem nas análises de atividade antioxidante. Rafa, obrigada por me receber em tua casa com tua família e por me ensinar muito!

Agradeço a Professora Eliana, pelos ensinamentos, carinho e apoio, e por me ajudar na busca de novos desafios.

Agradeço aos professores da banca examinadora, pelas valiosas contribuições para a melhoria deste trabalho e por esclarecerem diversas dúvidas ao longo de seu desenvolvimento.

Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande, por ser minha segunda casa durante todos estes anos e por proporcionar ambiente e ensino de qualidade para todos.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

[...] Mas se eu pintar um horizonte infinito e caminhar do jeito que eu acredito, eu vou chegar em um lugar só meu.

Lucas Silveira

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Recuperação (%) e pureza de C-ficocianina obtida por diferentes técnicas de purificação.37

ARTIGO 1

Tabela 1 – Condições cromatográficas dos ensaios de purificação de C-FC por CTI com eluição por gradiente de pH. 61

Tabela 2 – Parâmetros de purificação dos ensaios comparando modos de eluição. 63

Tabela 3 – Ensaios de purificação de C-ficocianina por cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH..... 69

ARTIGO 2

Tabela 1 – Seleção da massa molar de corte da membrana de ultrafiltração para purificação de C-FC extraída a partir da biomassa úmida.93

Tabela 2 – Pureza, fator de purificação e recuperação de C-FC em cada etapa dos *designs* de purificação.96

Tabela 3 – Atividade antioxidante do extrato bruto e purificado de C-FC frente aos radicais ABTS^{•+} ($\mu\text{mol}_{\text{TE}}\cdot\text{g}^{-1}$) e peroxila (ORAC, $\mu\text{mol}_{\text{TE}}\cdot\text{g}^{-1}$). 100

ARTIGO 3

Tabela 1 – Formulação de sorvete à base de leite, com e sem adição de C-FC..... 114

Tabela 2 – Atividade antioxidante dos sorvetes com e sem C-FC, após digestão *in vitro*, frente aos radicais ABTS^{•+} ($\mu\text{mol}_{\text{TE}}\cdot\text{g}^{-1}$) e peroxila (ORAC, $\mu\text{mol}_{\text{TE}}\cdot\text{g}^{-1}$). 121

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organização estrutural do ficobilissomo em cianobactérias.....	32
Figura 2 – Estrutura da ficocianobilina ligada à cadeia α através do resíduo de cisteína 84. .	34
Figura 3 – Modos de operação dos PSM (a) escoamento convencional (b) escoamento tangencial.....	42

ARTIGO 1

Figura 1 – Cromatograma do ensaio utilizando eluição por combinação de degrau e gradiente de NaCl.....	64
Figura 2 – Cromatograma do ensaio utilizando eluição por gradiente de pH.	65
Figura 3 – Cromatograma do ensaio utilizando C-FC extraída de biomassa seca e eluída com gradiente de pH.....	67
Figura 4 – Cromatograma do Ensaio 9: Eluição com tampão citrato 0,05 mol.L ⁻¹ em gradiente de pH de 6,2 – 3,0.....	72
Figura 5 – Cromatograma do Ensaio 11: Eluição com degrau de NaCl 0,08 mol.L ⁻¹ seguido de gradiente de pH com tampão citrato 0,05 mol.L ⁻¹ pH 6,2 – 3,0.....	73

ARTIGO 2

Figura 1 – Sequências de purificação (<i>designs</i>) para purificação de C-FC extraída seletivamente.	88
Figura 2 – Fluxos de permeado nos ensaios de seleção da membrana de ultrafiltração.	95

ARTIGO 3

Figura 1 – Parâmetros de estabilidade da cor ao longo do tempo dos sorvetes adicionados de C-ficocianina.	119
Figura 2 – Parâmetros de estabilidade da cor ao longo do tempo dos sorvetes controle (sem adição de C-ficocianina).....	119

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: RESUMO GERAL, ABSTRACT GERAL, INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS	19
RESUMO	21
ABSTRACT	23
1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
CAPÍTULO II: REVISÃO DA LITERATURA	29
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
3.1 <i>Spirulina (Arthrospira)</i>	31
3.2 FICOBILIPROTEÍNAS	32
3.2.1 C-ficocianina	33
3.3 PURIFICAÇÃO DE C-FICOCIANINA	35
3.3.1 Cromatografia de troca iônica	36
3.3.2 Precipitação com sulfato de amônio	40
3.3.3 Diafiltração/ultrafiltração	41
3.4 APLICAÇÃO E ESTABILIDADE DE C-FICOCIANINA EM MATRIZES ALIMENTARES.....	43
3.5 PROPRIEDADES BIOATIVAS DA C-FICOCIANINA.....	46
3.5.1 Atividade antioxidante da C-ficocianina	47
3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	51
ARTIGO 1: PURIFICAÇÃO DE C-FICOCIANINA EM ETAPA ÚNICA: CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA	53
RESUMO	55
1 INTRODUÇÃO	57
2 MATERIAL E MÉTODOS	59
2.1 CULTIVO DA CIANOBACTÉRIA <i>Spirulina platensis</i> LEB-52 E EXTRAÇÃO DE C-FICOCIANINA A PARTIR DE BIOMASSA ÚMIDA (EXTRAÇÃO SELETIVA).....	59
2.2 PURIFICAÇÃO DE C-FICOCIANINA POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA	60
2.2.1 Resina e coluna cromatográfica	60
2.2.2 Cromatografia de troca iônica: eluição por gradiente salino e por gradiente de pH	60
2.2.3 Cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH	60
2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	62
2.3.1 Concentração, pureza, recuperação e fator de purificação de C-ficocianina	62
2.3.2 Concentração de biomassa	62
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
3.1 COMPARAÇÃO ENTRE TIPOS DE ELUIÇÃO NA CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA PARA PURIFICAÇÃO DE C-FICOCIANINA	63
3.2 PURIFICAÇÃO DE C-FICOCIANINA POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA COM ELUIÇÃO POR GRADIENTE DE PH	67
4 CONCLUSÃO	75
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

ARTIGO 2: PURIFICAÇÃO DE C-FICOCIANINA EXTRAÍDA DA BIOMASSA ÚMIDA DE *Spirulina (Arthrospira) platensis* LEB-52 POR DIFERENTES *DESIGNS*

.....	81
RESUMO	83
1 INTRODUÇÃO	85
2 MATERIAL E MÉTODOS	86
2.1 CULTIVO DA CIANOBACTÉRIA <i>Spirulina platensis</i> LEB-52 E EXTRAÇÃO DE C-FICOCIANINA A PARTIR DE BIOMASSA ÚMIDA (EXTRAÇÃO SELETIVA).....	86
2.2 SELEÇÃO DA MEMBRANA DE ULTRAFILTRAÇÃO.....	87
2.3 <i>DESIGNS</i> DE PURIFICAÇÃO DE C-FICOCIANINA.....	87
2.3.1 Purificação de C-FC extraída seletivamente por precipitação fracionada com sulfato de amônio.....	88
2.3.2 Purificação de C-FC extraída seletivamente por diafiltração/ultrafiltração.....	89
2.3.3 Purificação de C-FC extraída seletivamente por cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH.....	89
2.3.4 Purificação de C-FC extraída seletivamente por ultrafiltração utilizando tubos Vivaspin® 15 Turbo.....	89
2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E PURIFICADO DE C-FC.....	90
2.4.1 Preparo dos extratos antioxidantes de C-FC.....	90
2.4.2 Atividade antioxidante empregando o radical ABTS ^{•+}	90
2.4.3 Atividade antioxidante frente ao radical peroxila.....	90
2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	91
2.5.1 Concentração, pureza, recuperação e fator de purificação de C-ficocianina.....	91
2.5.2 Concentração de biomassa.....	92
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	92
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
3.1 MASSA MOLAR DE CORTE DA MEMBRANA DE ULTRAFILTRAÇÃO.....	92
3.2 <i>DESIGNS</i> DE PURIFICAÇÃO DE C-FC EXTRAÍDA SELETIVAMENTE.....	95
3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E PURIFICADO DE C-FC.....	100
4 CONCLUSÃO	102
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

ARTIGO 3: APLICAÇÃO DE C-FICOCIANINA COMO CORANTE ALIMENTAR EM SORVETES E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA COR E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....

.....	107
RESUMO	109
1 INTRODUÇÃO	111
2 MATERIAL E MÉTODOS	112
2.1 CULTIVO DA CIANOBACTÉRIA <i>Spirulina platensis</i> LEB-52 E EXTRAÇÃO DE C-FICOCIANINA A PARTIR DE BIOMASSA ÚMIDA (EXTRAÇÃO SELETIVA).....	112
2.2 PURIFICAÇÃO DE C-FC EXTRAÍDA SELETIVAMENTE POR ULTRAFILTRAÇÃO.....	113
2.3 APLICAÇÃO DE C-FICOCIANINA EM SORVETE À BASE DE LEITE.....	113
2.3.1 Avaliação da estabilidade da cor da C-FC em sorvete à base de leite.....	113
2.3.2 Digestão <i>in vitro</i> dos sorvetes.....	115
2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS SORVETES APÓS A DIGESTÃO.....	115
2.4.1 Preparo dos extratos antioxidantes de C-FC.....	115
2.4.2 Atividade antioxidante empregando o radical ABTS ^{•+}	116
2.4.3 Atividade antioxidante frente ao radical peroxila.....	116

2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	117
2.5.1 Concentração e pureza de C-ficocianina	117
2.5.2 Concentração de biomassa.....	117
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	117
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	118
3.1 ESTABILIDADE DA COR DE C-FC QUANDO APLICADA EM SORVETE.....	118
3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS SORVETES APÓS DIGESTÃO <i>IN VITRO</i>	121
4 CONCLUSÃO.....	123
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124
CAPÍTULO IV: CONCLUSÃO GERAL	129
4 CONCLUSÃO GERAL	131
5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	133
CAPÍTULO V: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
APÊNDICES.....	153
APÊNDICE 1	155

CAPÍTULO I

RESUMO GERAL, ABSTRACT GERAL, INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

RESUMO

A C-ficocianina (C-FC) é uma ficobiliproteína que representa até 20 % da fração proteica de *Spirulina*, e possui propriedades antioxidantes, hepatoprotetoras, anti-inflamatórias, neuroprotetoras e anticancerígenas. De acordo com a sua pureza, esta proteína pode ser utilizada como corante azul em alimentos e cosméticos, podendo ser aplicada também na indústria de biotecnologia, em diagnósticos e na medicina. Portanto, devido ao seu alto valor agregado e ampla gama de aplicações, é importante ampliar os estudos de técnicas de purificação de C-FC que permitam obter esta proteína com diferentes purezas e elevada recuperação. Dentre estas técnicas, a cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente salino é uma das mais utilizadas. No entanto, a eluição por gradiente de pH também se mostra eficiente em purificar esta ficobiliproteína com elevada recuperação, mas é pouco reportada na literatura para este fim. As empresas do ramo alimentício têm procurado remover todos os corantes artificiais de suas linhas de produção, substituindo-os por corantes naturais, devido à preocupação com saúde e segurança alimentar. Assim, são necessários estudos de avaliação da estabilidade da cor dos biocorantes quando em contato com os outros componentes da matriz alimentícia. No que diz respeito às propriedades bioativas, a atividade antioxidante da C-FC isolada já foi investigada por diversos métodos, no entanto, existem poucos relatos na literatura quanto à atividade desta proteína em matrizes alimentares. Neste contexto, esta dissertação foi dividida em três artigos. No primeiro artigo, o objetivo foi purificar a C-ficocianina extraída seletivamente a partir de biomassa úmida de *Spirulina platensis* LEB-52 por cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH. Diferentes parâmetros foram estudados, como o pH de alimentação, a adição de sal no tampão de eluição e o uso de diferentes tampões e volumes de eluição. Os melhores resultados foram obtidos utilizando eluição combinando degrau com 0,08 mol.L⁻¹ de NaCl e gradiente de pH com tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ pH 6,2 – 3,0, resultando em duas frações de C-FC com purezas de 4,2 e 3,5 e recuperações de 32,6 e 49,5%, respectivamente. No segundo artigo, o objetivo foi estudar diferentes *designs* para purificar a C-FC extraída seletivamente utilizando as técnicas de precipitação fracionada, ultrafiltração e cromatografia de troca iônica, além de avaliar a capacidade antioxidante da C-FC bruta e purificada. O *design* que resultou em maior pureza com maior recuperação foi o composto por ultrafiltração seguida de cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH, pois resultou em C-FC com pureza de 3,9, fator de purificação de 4,9 vezes, e recuperação de 79,7 %. A C-FC purificada apresentou capacidades de sequestro dos radicais ABTS^{•+} (161,66 μmol_{TE}.g⁻¹) e peroxila (1211,41 μmol_{TE}.g⁻¹) significativamente superiores às do extrato bruto. No terceiro artigo, o objetivo foi avaliar a estabilidade da cor ao longo do tempo de sorvetes adicionados de C-FC e a capacidade antioxidante dos produtos após digestão *in vitro*. Os sorvetes adicionados de C-FC apresentaram cor estável durante 273 d. Além disso, após digestão *in vitro*, os sorvetes adicionados de C-FC apresentaram atividades antioxidantes de 1362,62 e 134,63 μmol_{TE}.g⁻¹ frente aos radicais ABTS^{•+} e peroxila, respectivamente, sendo estes valores cerca de 13 e 2 vezes superiores aos dos sorvetes controle digeridos. Desta forma, neste estudo foi possível obter C-FC com elevada pureza e recuperação, e, além disso, este biocorante apresentou cor estável em sorvete e bioatividade, demonstrando a potencial aplicação da C-FC como corante natural em substituição aos sintéticos.

Palavras-chave: Cromatografia de troca iônica. Precipitação. Ultrafiltração. *Spirulina*. Matriz alimentar. Biocorante. Atividade antioxidante.

C-PHYCOCYANIN PURIFICATION BY DIFFERENT TECHNIQUES AND EVALUATION OF COLOR STABILITY IN ICE CREAM

ABSTRACT

C-phycoerythrin (C-PC) is a phycobiliprotein that accounts for up to 20 % of the protein fraction of *Spirulina*, and presents antioxidant, hepatoprotective, anti-inflammatory, neuroprotective and anticancer properties. Depending on its purity grade, this protein can be used as a blue dye in food and cosmetics, and can also be applied in the biotechnology industry, in diagnostics and in medicine. Thus, due to its high added-value and wide range of applications, it is important to expand the studies of C-PC purification techniques that allow for the obtainment of this protein with different purities and high recovery. Among these techniques, ion exchange chromatography with salt gradient elution is one of the most used. However, pH gradient elution also appears to be efficient in purifying this phycobiliprotein with high recovery, but it is poorly reported in the literature for this purpose. Food companies have sought to remove all artificial dyes from their production lines, replacing them with natural dyes, due to a growing concern for food safety. Therefore, studies are required to evaluate the color stability of the biocolorants when in contact with the other components of the food matrix. Regarding its bioactive properties, the antioxidant activity of the isolated C-PC has already been investigated by several methods, however, there are few reports in the literature regarding the activity of this protein in food matrices. In this context, this dissertation was divided into three articles. In the first article, the aim was to purify C-phycoerythrin selectively extracted from the wet biomass of *Spirulina platensis* LEB-52 by ion gradient chromatography with pH gradient elution. Different parameters were studied, such as loading pH, addition of salt in the elution buffer and the use of different buffers and elution volumes. The best results were obtained using elution combining a step with 0.08 mol.L⁻¹ NaCl and a pH gradient with 0.05 mol.L⁻¹ citrate buffer pH 6.2 – 3.0, resulting in two C-PC fractions with purities of 4.2 and 3.5 and recoveries of 32.6 and 49.5%, respectively. In the second article, the aim was to study different designs to purify the selectively extracted C-PC using fractional precipitation, ultrafiltration and ion exchange chromatography, as well as to evaluate the antioxidant capacity of the crude and purified C-PC. The design that resulted in high purity with high recovery consisted in ultrafiltration followed by ion exchange chromatography with pH gradient elution, resulting in C-PC with purity of 3.9, purification factor of 4.9-fold, and recovery of 79.7 %. The purified C-PC presented significantly higher scavenging capacities for ABTS^{•+} (161.66 μmol_{TE}.g⁻¹) and peroxy (1211.41 μmol_{TE}.g⁻¹) radicals when compared to the crude extract. In the third article, the aim was to evaluate the color stability over time of C-PC-added ice creams and the antioxidant capacity of the products after *in vitro* digestion. The C-PC-added ice creams presented color stability for 273 d. In addition, after the *in vitro* digestion, the C-PC-added ice creams presented antioxidant activities of 1362.62 and 134.63 μmol_{TE}.g⁻¹ against ABTS^{•+} and peroxy radicals, respectively, and these values were about 13 and 2 times higher than the achieved by the control ice creams after digestion. Therefore, in this study it was possible to obtain C-PC with high purity and recovery, and, moreover, this biocompound presented a stable color in ice cream and bioactivity, demonstrating the application potential of C-PC as a natural dye replacing synthetic colorants.

Key-Words: Ion exchange chromatography. Precipitation. Ultrafiltration. *Spirulina*. Food matrix. Biocolorant. Antioxidant activity.

1 INTRODUÇÃO

A C-ficocianina (C-FC) pertence ao grupo das ficobiliproteínas, as quais são proteínas coletoras de luz, que auxiliam na transferência de energia durante a fotossíntese. Por ser um pigmento azul natural, a C-FC vem atraindo interesse comercial das indústrias de alimentos e de cosméticos. Além disso, estudos vêm mostrando que a C-FC possui propriedades antioxidantes (ROMAY et al., 1998; SONANI et al., 2017), anti-inflamatórias (ROMAY; LEDÓN; GONZÁLEZ, 1998), neuroprotetoras (PENTÓN-ROL et al., 2011), anticancerígenas e antitumorais (DENIZ; OZEN; YESIL-CELIK TAS, 2016; LIAO et al., 2016; LIU et al., 2000; SILVA et al., 2018).

Embora a C-FC possua suas propriedades e efeitos biológicos comprovados, as aplicações deste biocomposto, e conseqüentemente o seu valor comercial, dependem de sua pureza, a qual é definida como a razão entre a absorvância máxima à 620 nm e a absorvância à 280 nm. Assim, quando a pureza da C-FC é acima de 0,7 é considerada de grau alimentar, e quando acima de 4,0 é considerada de grau analítico (RITO-PALOMARES; NUÑEZ; AMADOR, 2001).

A C-FC pode representar até 20 % da fração proteica de *Spirulina* (COHEN, 1997) e pode ser obtida tanto da biomassa seca como da biomassa úmida. No entanto, a secagem da biomassa pode acarretar na perda de até 50 % do conteúdo intracelular desse biocorante (SARADA; PILLAI; RAVISHANKAR, 1999). Portanto, para atingir maiores rendimentos de extração e maior pureza do extrato, é necessário utilizar a biomassa úmida e métodos de extração mais seletivos.

O maior objetivo na recuperação e purificação de bioprodutos é a otimização de cada operação unitária, a fim de resultar no menor número de etapas possível para concentrar e/ou purificar a molécula alvo até o grau desejado. Diferentes técnicas já foram propostas para a purificação de C-FC extraída da biomassa seca de *Spirulina platensis* LEB-52, além da combinação de algumas destas (FIGUEIRA, 2014; MORAES; KALIL, 2009). No entanto, devido ao seu alto valor agregado e ampla aplicação, é importante ampliar os estudos de seqüências de purificação de C-FC que permitam obter esta proteína com diferentes purezas e com elevada recuperação.

Dentre as técnicas de purificação de proteínas, a cromatografia de troca iônica é uma mais utilizadas, pois é relativamente simples, apresenta alta resolução e versatilidade, e oferece grande incremento no fator de purificação (MORAES; KALIL, 2014). A importância de fatores como pH, temperatura, características do gradiente de eluição e força iônica devem

ser estudados ao propor um novo processo de purificação para determinada proteína (SILVEIRA et al., 2008). A cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de NaCl é amplamente utilizada para a purificação de C-FC (ABALDE et al., 1998; PATEL et al., 2005; PATIL et al., 2006; SILVEIRA et al., 2008; TANTIRAPAN; SUWANWONG, 2014), tendo sido otimizada para colunas de leito fixo e expandido pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia e Biosseparações (MORAES et al., 2011; MORAES; KALIL, 2009). No entanto, a eluição por gradiente de pH mostra-se potencialmente eficiente para a purificação de C-FC com alta recuperação e ainda é pouco explorada na literatura (KUMAR et al., 2014; YAN et al., 2011).

A indústria de alimentos vem buscando cada vez mais substituir os corantes sintéticos, os quais são potencialmente tóxicos, por corantes naturais. As cores azuis não são incomuns na natureza (NEWSOME; CULVER; VAN BREEMEN, 2014), mas sua aplicação na indústria de alimentos é limitada pelas características da matriz alimentícia onde o pigmento é disperso, e pelas interações com os outros componentes da matriz (BATISTA et al., 2006). A C-FC já é utilizada na indústria como corante azul natural em alimentos e cosméticos, mas são poucos os estudos avaliando a estabilidade da cor deste corante em matrizes alimentícias (DEWI; KURNIASIH; PURNAMAYATI, 2018; JESPERSEN et al., 2005; MOHAMMADI-GOURAJI; SOLEIMANIAN-ZAD; GHIACI, 2019).

No que diz respeito às propriedades bioativas da C-FC, a sua atividade antioxidante tem sido extensivamente estudada na literatura, uma vez que atualmente há grande apelo ao consumo de compostos naturais com efeitos biológicos. No entanto, existem poucos trabalhos avaliando a atividade antioxidante da C-FC em matrizes alimentares (BERTOLIN et al., 2011a, 2011b; SOUZA et al., 2009).

Diante do exposto, o presente trabalho visa preencher algumas lacunas da literatura, principalmente com relação à utilização de processos de purificação da C-FC que resultem em elevada recuperação e pureza, e com relação à avaliação da estabilidade da cor e dos efeitos biológicos deste biocorante em alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Purificar C-ficocianina extraída seletivamente a partir de biomassa úmida de *Spirulina platensis* LEB-52 por diferentes técnicas, e estudar a estabilidade da cor da C-FC em sorvete à base de leite.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar a purificação de C-ficocianina por cromatografia de troca iônica comparando a eluição por gradiente de pH com a eluição por combinação de degrau e gradiente salino;
- Estudar diferentes parâmetros (pH de alimentação, adição de sal na etapa de eluição e utilização de diferentes tampões e volumes de eluição) da técnica de cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH para purificação de C-FC extraída da biomassa úmida;
- Definir a massa molar de corte da membrana de ultrafiltração para purificação de C-ficocianina extraída a partir de biomassa úmida;
- Aplicar as técnicas de precipitação fracionada com sulfato de amônio, diafiltração/ultrafiltração e cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH em diferentes *designs* de purificação de C-FC extraída a partir da biomassa úmida;
- Avaliar a estabilidade da cor da C-FC com grau de pureza alimentar em sorvete à base de leite durante 273 d;
- Avaliar a atividade antioxidante da C-ficocianina com diferentes graus de pureza e quando aplicada em sorvete.

CAPÍTULO II
REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Spirulina* (*Arthrospira*)

O gênero *Spirulina*, também chamado de *Arthrospira* (GUPTA, 2016), refere-se à cianobactérias da ordem *Oscillatoriales*. Estes são organismos fotossintéticos, unicelulares, filamentosos e que se dividem exclusivamente por fissão binária. São reconhecidas por arranjam-se em tricomas cilíndricos multicelulares, formando hélices esquerdas ou direitas fechadas ao longo de todo o comprimento. A cor das cepas é variável, podendo ser desde verde azuladas até vermelhas. Os membros desse gênero ocorrem geralmente em águas doces, marinhas e salobras (HOLT, 1994).

Existem evidências do consumo de *Spirulina* por humanos que datam do início do século XVI (VONSHAK; RICHMOND, 1988). Essa cianobactéria vem sendo consumida como alimento por ser fonte de proteínas, as quais representam 46 – 63 % do seu peso seco (*Spirulina platensis*) (BECKER, 2007). Além disso, a biomassa de *Spirulina* é rica em nutrientes, uma vez que contém todos os aminoácidos essenciais, bem como vitaminas, minerais, carotenoides e ácidos graxos essenciais (HOLMAN; MALAU-ADULI, 2013). As paredes celulares de cianobactérias não possuem material celulósico e assemelham-se com a estrutura de bactérias gram-negativas, não apresentando barreiras para enzimas proteolíticas, o que resulta na sua alta digestibilidade (RICHMOND, 2004).

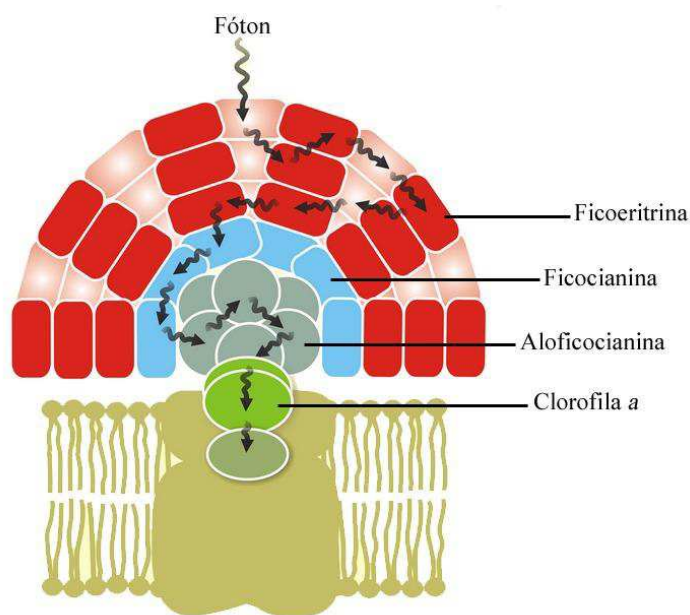
Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* já demonstraram que o consumo de *Spirulina* possui efeitos benéficos à saúde, apresentando, por exemplo, atividade antioxidante (GAD et al., 2011), anticancerígena (OH et al., 2011) e imunomodulatória (HAYASHI; KATOH; OKUWAKI, 1994). Além disso, o cultivo de *Spirulina* tem sido extensivamente estudado para obtenção de muitos bioprodutos de interesse comercial, como polissacarídeos (KURD; SAMAVATI, 2015), ácidos graxos (AMBROZOVA et al., 2014), carotenoides (DEY; RATHOD, 2013), clorofila (AJAYAN; SELVARAJU; THIRUGNANAMOORTHY, 2012), anidrase carbônica (ORES; AMARANTE; KALIL, 2016; SALA et al., 2018) e ficobiliproteínas (AJAYAN; SELVARAJU; THIRUGNANAMOORTHY, 2012; ORES; AMARANTE; KALIL, 2016; SALA et al., 2018). As ficobiliproteínas extraídas de *Spirulina*, em especial a C-ficocianina, destacam-se pelo seu alto valor agregado e suas possíveis aplicações.

3.2 FICOBILIPROTEÍNAS

As ficobiliproteínas são um grupo de proteínas coletoras de luz compostas por uma porção de apoproteína covalentemente ligada à cromóforos tetrapirrólicos de cadeia linear, chamados ficobilinas (ERIKSEN, 2008). Nas cianobactérias e rodófitas (algas vermelhas), as ficobiliproteínas são incorporadas em ficobilissomos, os quais estão localizados na superfície externa da membrana tilacoide (ZILINSKAS; GREENWALD, 1986), e promovem a captação de luz e migração de energia durante a fotossíntese (MACCOLL, 1998). As principais ficobiliproteínas em cianobactérias são a ficoeritrina (FE), a aloficocianina (AFC) e a C-ficocianina (C-FC) (BENNETT; BOGORAD, 1973), as quais possuem máxima absorção de luz nos comprimentos de onda de 540, 650 e 620 nm, respectivamente. Nessas regiões de absorção, a clorofila *a* possui baixa absorvidade (MACCOLL, 1998). Visualmente, as ficoeritrinas possuem cor vermelha, as aloficocianinas são azuis/esverdeadas e as ficocianinas possuem cor azul (ROMÁN et al., 2002).

Os ficobilissomos possuem um núcleo central de AFC, e os hexâmeros de C-FC e FE encontram-se empilhados ao redor do núcleo, formando estrutura na forma de haste (ERIKSEN, 2008) (Figura 1). As ficobiliproteínas possuem seus cromóforos arranjados de tal maneira a permitir a migração de energia rápida e direcionada através do ficobilissomo para a clorofila *a*, principal pigmento absorvedor de luz na fotossíntese (MACCOLL, 1998).

Figura 1 – Organização estrutural do ficobilissomo em cianobactérias.



Adaptado de: GOVINDJEE; SHEVELA (2011).

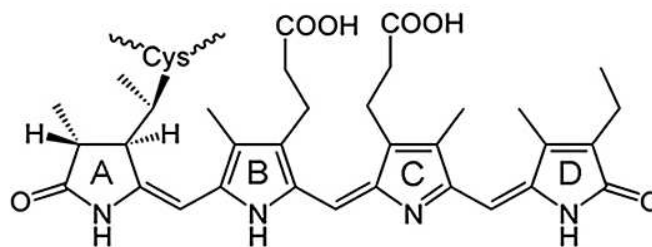
As ficobiliproteínas possuem aplicação como marcadores fluorescentes em diversas análises, como na citometria de fluxo, na separação de células ativada por fluorescência, histoquímica e, de forma limitada, em imunoenaios e na detecção de espécies reativas de oxigênio (GLAZER, 1994). Também devido às propriedades espectroscópicas das ficobiliproteínas, estas podem ser utilizadas como marcadores em eletroforese em gel, focagem isoeétrica e cromatografia de permeação em gel (KUDDUS et al., 2013). Além disso, são utilizadas como corantes naturais em alimentos e cosméticos, substituindo corantes sintéticos, uma vez que estes geralmente são tóxicos, carcinogênicos, ou não seguros, podendo causar alergias (ROMÁN et al., 2002), dependendo da concentração em que são adicionados (SOLTAN; SHEHATA, 2012).

3.2.1 C-ficocianina

C-ficocianina é um pigmento antena encontrado principalmente em cianobactérias e algas eucarióticas, utilizado para aumentar a eficiência da fotossíntese, coletando energia em comprimento de onda onde a clorofila tem baixa absorção (KUDDUS et al., 2013). A C-FC é composta por duas subunidades relativamente homólogas que se encontram ligadas aos cromóforos deste biocorante, os quais são chamados de ficocianobilinas (Figura 2). A cadeia α possui uma ficocianobilina ligada ao resíduo de cisteína 84 através de ligação tioéter, e a cadeia β possui duas ficocianobilinas ligadas às cisteínas 84 e 155 (ERIKSEN, 2008). A C-ficocianina é encontrada em solução como uma mistura de monômeros ($\alpha\beta$), trímeros ($\alpha_3\beta_3$), hexâmeros ($\alpha_6\beta_6$) e/ou outros oligômeros (MACCOLL, 1998). A massa molar da C-FC em cianobactérias é dependente do tipo de oligômero presente, variando de 81 a 131 kDa, enquanto que as subunidades variam entre 15 – 19 kDa (subunidade α) e 24 kDa (subunidade β) (PATEL et al., 2005). Com relação ao ponto isoeletrico da C-FC, vários valores dentro da faixa de pH 4,6 – 5,8 têm sido reportados (ABALDE et al., 1998; LIU et al., 2000; PATIL; RAGHAVARAO, 2007; SANTIAGO-SANTOS et al., 2004).

Por ser um pigmento azul natural, a C-FC vêm atraindo interesse comercial devido às suas aplicações como corante em bebidas energéticas, refrescos, confeitos, doces, e cosméticos (MISHRA et al., 2010). Esta ficobiliproteína também possui aplicação na indústria de biotecnologia, em diagnósticos e na medicina (ERIKSEN, 2008), como biomarcador fluorescente e em tratamentos médicos.

Figura 2 – Estrutura da ficocianobilina ligada à cadeia α através do resíduo de cisteína 84.



Fonte: MINIC et al. (2016).

A C-FC é comercializada de acordo com a sua pureza, a qual é avaliada utilizando a razão entre a absorvância do cromóforo da C-FC (620 nm) e das proteínas (280 nm). Assim, pureza maior ou igual a 0,7 indica C-FC de grau alimentar, enquanto que pureza igual ou maior que 4,0 é considerada de grau analítico (RITO-PALOMARES; NUÑEZ; AMADOR, 2001). A pureza deste produto influencia o seu valor de mercado, o qual aumenta consideravelmente com a pureza, e as suas possíveis aplicações. Por exemplo, a C-FC de pureza (A_{620}/A_{280}) superior a 4,0 é utilizada em tratamentos médicos e como biomarcador em diagnósticos; de pureza entre 2,5 e 3,5 pode ser utilizada como corante e biomarcador; de pureza entre 1,5 e 2,5 pode ser utilizada como corante em cosméticos; e de pureza entre 0,5 e 1,5 é indicada como corante na indústria alimentícia (DELHI NUTRACEUTICALS, 2019). A empresa Soley Biotechnology Institute[®] comercializa a C-FC (abril/2019) com pureza de 0,5 – 0,7 por US\$ 0,21 o grama; pureza de 0,7 – 1,5 por US\$ 0,32 o grama; pureza de 1,5 – 2,5 por US\$ 136,00 o grama; pureza de 2,5 – 3,5 por US\$ 1.505,00 o grama; e a C-FC com pureza maior ou igual a 4,0 por US\$ 4.657,00 o grama.

A produtividade de C-FC em microalgas e cianobactérias é dependente da produtividade de biomassa e do conteúdo intracelular de C-FC (ERIKSEN, 2008). A C-FC pode representar até 20 % da fração proteica de *Spirulina* (COHEN, 1997), a qual possui certificado GRAS (*Generally Recognized as Safe*), fazendo dessa cianobactéria uma fonte atrativa dessa ficobiliproteína. Além disso, a C-FC pode ser obtida tanto da biomassa seca como da biomassa úmida de *Spirulina*; no entanto, a secagem da biomassa pode acarretar na perda de até 50 % do conteúdo intracelular desse biocorante, devido à sua sensibilidade à temperatura e possivelmente por encontrar-se em uma posição periférica no ficobilissomo (SARADA; PILLAI; RAVISHANKAR, 1999). Moraes, Burkert e Kalil (2010) reportam rendimento de extração de C-FC de 82,5 mg.g⁻¹ (base seca) a partir de biomassa seca de *Spirulina platensis* LEB-52. No entanto, ao utilizarem biomassa úmida, Ores, Amarante e Kalil (2016) obtiveram

rendimento de extração de C-FC de 90 mg.g⁻¹ (base seca) a partir de *Spirulina* sp. LEB 18 e Sarada, Pillai e Ravishankar (1999) atingiram rendimento de extração de 194,7 mg.g⁻¹ (base seca) a partir de *Spirulina platensis* (CFTRI).

Por ser um produto intracelular, os estudos de obtenção de C-FC utilizam diferentes métodos de ruptura celular para extração da ficobiliproteína, como por exemplo congelamento e descongelamento (SINGH; KUDDUS; THOMAS, 2010), extração assistida por ultrassom (ORES; AMARANTE; KALIL, 2016), secagem, congelamento e moagem (SILVEIRA et al., 2007) e extração assistida por campos magnéticos pulsados (MARTÍNEZ et al., 2017). Recentemente, no estudo de Sala, Moraes e Kalil (2018) no Laboratório de Microbiologia e Biosseparações, foi possível realizar a extração seletiva de C-FC a partir de biomassa úmida de *Spirulina platensis* LEB-52 utilizando ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) no pré-tratamento da biomassa para desestabilização da parede celular e tampão Tris-SO₄ para extração da C-ficocianina. O extrato obtido apresentou pureza de 1,03 (grau alimentar) e rendimento de extração de 129,9 mg.g⁻¹, sem a utilização de nenhuma etapa de purificação. Os demais métodos de ruptura celular e extração de C-FC a partir da biomassa seca de *Spirulina platensis* LEB-52 descritos na literatura apresentam pureza máxima de C-FC de 0,60 (MORAES; BURKERT; KALIL, 2010; SILVEIRA et al., 2007).

3.3 PURIFICAÇÃO DE C-FICOCIANINA

A recuperação e purificação de bioprodutos (*downstream process*) engloba todas as etapas do processo desde a extração celular até o produto final purificado (JUNGBAUER, 2013). A purificação de determinados produtos frequentemente compreende uma sequência de técnicas que encarecem muito o processo de produção e podem resultar em perdas significativas do produto. Assim, é importante o desenvolvimento de novas formas de simplificar o processo de purificação (CHASE, 1994).

A purificação de proteínas geralmente envolve a separação de apenas uma espécie que pode representar uma fração muito pequena de uma mistura contendo muitas outras proteínas, todas possuindo essencialmente as mesmas características gerais. Portanto, durante o desenvolvimento de um processo de purificação é necessário explorar ao máximo as propriedades que diferem a proteína alvo das demais. As principais propriedades exploradas são solubilidade, carga, tamanho e especificidade (DOONAN; CUTLER, 2004).

As primeiras etapas da purificação de qualquer produto biotecnológico envolvem, tradicionalmente, técnicas pouco específicas e de baixa resolução, como as técnicas de

precipitação, centrifugação, ultrafiltração, sistema aquoso bifásico, ou a combinação das mesmas (WHEELWRIGHT, 1989). Em seguida, utilizam-se técnicas mais específicas e de alta resolução, principalmente cromatografia de troca iônica, afinidade ou interação hidrofóbica, podendo ser necessária mais de uma etapa cromatográfica. A finalização geralmente é feita com uma etapa de cromatografia de permeação em gel, secagem, cristalização ou liofilização do produto de interesse (PESSOA JR; KLIKIAN, 2005).

A C-ficocianina pode ser purificada por diversas técnicas (Tabela 1), e devido ao seu alto valor agregado muitos processos têm sido explorados na literatura. Somente no grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia e Biosseparações, a C-FC extraída da biomassa seca de *S. platensis* LEB-52 já foi purificada por sistema aquoso bifásico (ANTELO et al., 2010), precipitação com sulfato de amônio (SILVA et al., 2009), cromatografia de troca iônica em leito fixo (MORAES; KALIL, 2009; SILVEIRA et al., 2008) e leito expandido (MORAES et al., 2011, 2015), cromatografia de permeação em gel (MORAES; KALIL, 2009) e ultrafiltração (FIGUEIRA, 2014; SALA; MORAES; KALIL, 2018), bem como pela combinação de algumas dessas técnicas (FIGUEIRA, 2014; MORAES; KALIL, 2009).

3.3.1 Cromatografia de troca iônica

A técnica de cromatografia de troca iônica (CTI) é uma das mais utilizadas para a separação de proteínas, pois é uma técnica simples, de alta resolução e versátil, e que oferece grande incremento no fator de purificação. Esta técnica está baseada na atração reversível da molécula alvo carregada em solução (fase móvel) pelos grupos carregados da resina trocadora de íons (fase estacionária) com carga contrária às moléculas alvo (MORAES; KALIL, 2014).

A etapa de eluição das proteínas adsorvidas na resina é crucial na cromatografia de troca iônica, e deve ser realizada visando a maior resolução possível, ou seja, a melhor separação da proteína alvo das demais moléculas em solução. A fase móvel da eluição deve reduzir a afinidade da proteína pela resina, e isso é realizado pelo aumento da força iônica (através do aumento da concentração de sal na fase móvel) ou pela mudança na carga da proteína (através de alteração no pH) (WHEELWRIGHT, 1991). Na eluição isocrática a composição da fase móvel é mantida constante; na eluição por gradiente, a fase móvel sofre mudança gradual (em termos de pH ou aumento da força iônica), e na eluição por degrau (*step*) a fase móvel é alterada em etapas (HAGEL, 2001).

Tabela 1 – Recuperação (%) e pureza de C-ficocianina obtida por diferentes técnicas de purificação.

Micro-organismo	Métodos de ruptura celular	Técnicas de purificação	Recuperação (%)	Pureza	Referência
<i>Arthrospira platensis</i> FACHB-314	Congelamento e descongelamento com cloreto de amônio*	Precipitação com fosfato de amônio	-	2,8	Manirafasha et al. (2017)
<i>Calothrix</i> sp.	Tratamento com lisozima*	Cromatografia de troca iônica e cromatografia de interação hidrofóbica	80,0	3,5	Santiago-Santos et al. (2004)
<i>Galdieria sulphuraria</i>	Congelamento e homogeneizador*	Precipitação com sulfato de amônio	71,0	0,7	Sørensen, Hantke e Eriksen (2013)
<i>Spirulina platensis</i>	Homogeneizador*	Sistema aquoso bifásico	78,8	4,3	Chethana et al. (2015)
<i>Spirulina platensis</i> LEB-52	Secagem, congelamento e moagem**	Precipitação com sulfato de amônio	83,8	0,9	Silva et al. (2009)
<i>Spirulina platensis</i> LEB-52	Secagem, congelamento e moagem**	Precipitação com sulfato de amônio, diálise e cromatografia de troca iônica	44,0	4,0	Moraes e Kalil (2009)
<i>Spirulina platensis</i> LEB-52	Secagem, congelamento e moagem**	Cromatografia de troca iônica em leito expandido	60,0	2,9	Moraes et al. (2011)
<i>Spirulina</i> sp.	Congelamento, sonicação, congelamento e descongelamento*	Precipitação com sulfato de amônio, diálise e cromatografia de troca iônica	45,6	4,4	Patel et al. (2005)
<i>Synechococcus</i> sp. IO9201	Congelamento e descongelamento*	Cromatografia de interação hidrofóbica e cromatografia de troca iônica	76,6	4,8	Abalde et al. (1998)
<i>Synechococcus</i> sp. R42DM	Tratamento com detergente e ultrassom*	Precipitação com sulfato de amônio, diálise e cromatografia de troca iônica	-	4,0	Sonani et al. (2017)

*Extração com biomassa úmida; **Extração com biomassa seca; - Não informado.

Moraes e Kalil (2009) estudaram a eluição da C-FC extraída a partir da biomassa seca de *S. platensis* LEB-52 por gradiente linear ($0 - 1 \text{ mol.L}^{-1}$) e por degrau ($0,1$ e $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$) de NaCl em coluna cromatográfica de troca iônica em leito fixo com a resina trocadora de ânions forte Q-Sepharose Fast Flow. Os melhores resultados foram obtidos com o gradiente linear de NaCl em pH 7,5, o qual forneceu pureza de 1,7 (fator de purificação de 5,7 vezes) e recuperação de 82,0 % de C-FC. Além disso, os autores estudaram diferentes *designs* envolvendo as técnicas de precipitação fracionada com sulfato de amônio (0-20/20-50 %) e diálise, CTI com eluição por gradiente de NaCl, e permeação em gel. Os melhores resultados foram obtidos pela sequência de purificação composta por precipitação e diálise seguida de CTI, sem a utilização da permeação em gel. Adicionalmente, para a otimização desta sequência de purificação, foi estudada a eluição da etapa de CTI pela combinação de degrau ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) e gradiente ($0,1 - 1 \text{ mol.L}^{-1}$) de NaCl em dois valores de pH (7,5 e 5,0). Ao final do processo de purificação em pH 7,5 foi obtida C-FC com pureza de 3,6 e recuperação de 44,7 %. No entanto, ao final do processo com eluição em pH 5,0, obteve-se C-FC com pureza de 4,0 e recuperação de 44,0 %, apresentando fator de purificação de 6,3 vezes.

O pH é um dos parâmetros mais importantes na CTI, o qual afeta a ligação das proteínas, uma vez que determina a carga da molécula alvo e do trocador iônico. Em valores de pH acima do ponto isoelétrico (pI) as proteínas ficam carregadas negativamente, e abaixo do pI ficam carregadas positivamente. Ao utilizar o gradiente de pH para a eluição em coluna de troca iônica, as diferentes proteínas eluem em faixas estreitas de pH com valores mais ou menos iguais aos seus valores de pI (PEPAJ et al., 2006). Assim, as proteínas carregadas negativamente, adsorvidas em resinas trocadoras de ânions, devem ser eluídas por diminuição do valor de pH, para que as cargas tornem-se mais neutras; enquanto que as proteínas carregadas positivamente, adsorvidas em resinas trocadoras de cátions, devem ser eluídas pelo aumento do valor de pH (KARLSSON; HIRSH, 2011). Portanto, a CTI com eluição por gradiente de pH é uma técnica eficiente para a separação de proteínas que possuem cargas líquidas próximas (AHAMED et al., 2007).

O gradiente linear de pH em colunas de troca iônica pode ser gerado de duas formas. Na técnica chamada de “*chromatofocusing*”, aplica-se tampão de valor de pH diferente do pH das etapas de alimentação e lavagem da resina, utilizando-se da própria capacidade tamponante da resina para gerar o gradiente de pH na saída da coluna (SLUYTERMAN; ELGERMA, 1978). No *chromatofocusing* são normalmente utilizadas resinas trocadoras iônicas fracas e o gradiente linear de pH é gerado pela titulação mútua das fases móvel e estacionária (LIU; ANDERSON, 1997). As maiores limitações desta técnica são que o gradiente de pH gerado é

frequentemente pouco extenso e o controle da inclinação do gradiente é limitado (AHAMED et al., 2007), além de ser necessário o uso de tampões de baixa concentração na fase móvel para que a inclinação do gradiente não seja exagerada e para resultar em resolução razoável (SLUYTERMAN; ELGERMA, 1978; SLUYTERMAN; WIJDENES, 1978).

Outro modo de gerar gradiente linear de pH é pela mistura de duas soluções de valores de pH diferentes de forma externa à coluna cromatográfica, técnica chamada apenas de “gradiente de pH” ou “*gradient chromatofocusing*” (ANDERSEN et al., 2004; LIU; ANDERSON, 1997). Esta técnica combina a formação de um gradiente externo à coluna (gradiente de entrada) e a formação de um gradiente dentro da coluna (gradiente interno). Assim, é possível superar algumas desvantagens do *chromatofocusing*, podendo-se controlar a inclinação do gradiente de pH na saída da coluna e utilizar tampões de concentração mais elevada na fase móvel (LIU; ANDERSON, 1997; SHAN; ANDERSON, 2001). Além disso, é possível gerar um gradiente de pH independentemente da capacidade tamponante e da dinâmica de adsorção da resina (SHAN; ANDERSON, 2002).

A eluição por gradiente de pH é pouco explorada na literatura para obtenção de C-FC purificada, sendo encontrados poucos trabalhos utilizando este tipo de eluição, porém sempre aplicada após uma etapa de precipitação com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) e diálise (KUMAR et al., 2014; YAN et al., 2011). No estudo de Yan et al. (2011) foi utilizado tampão acetado de sódio 0,02 mol.L⁻¹ contendo 0,05 mol.L⁻¹ de NaCl e gradiente de pH 5,0 – 3,6, resultando em pureza final de C-FC (extraída de *S. platensis*) de 5,6 e recuperação de 67,0 %. No trabalho realizado por Kumar et al. (2014), os autores utilizaram tampão acetato com gradiente de pH 5,1 – 3,7, obtendo C-FC (extraída de *S. platensis* CCC540) com pureza de 4,6, e recuperação de apenas 14,0 %. Neste último trabalho ocorreu grande perda de C-FC durante a diálise para a retirada do sulfato de amônio, o que pode explicar a baixa recuperação de C-FC.

Além desses estudos, a eluição por gradiente de pH foi utilizada para a purificação de outras ficobiliproteínas após etapa de precipitação com (NH₄)₂SO₄ e diálise: Su et al. (2010) purificaram aloficocianina de *S. platensis*, obtendo pureza final de 5,0 e recuperação de 43,0 % e Liu et al. (2005) purificaram R-ficoeritrina de *Polysiphonia urceolata*, onde foi obtida pureza de 5,6 e recuperação de 67,0 %, sendo que ambos autores utilizaram tampão fosfato contendo 0,05 mol.L⁻¹ de NaCl e gradiente de pH 5,6 – 4,0. Assim, a cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH mostra-se bastante eficiente para a purificação de ficobiliproteínas, sendo possível obter elevadas purezas com apenas uma etapa cromatográfica.

3.3.2 Precipitação com sulfato de amônio

A estabilidade de uma proteína é resultante das suas interações iônicas, dipolo-dipolo e hidrofóbicas (ENGLARD; SEIFTER, 1990). No entanto, variações de temperatura, pH, concentração de sal, presença de solventes orgânicos e polímeros podem desencadear o processo de precipitação (SANTOS; CARVALHO; ROQUE, 2017). A forma mais comum de causar a precipitação seletiva de proteínas é através do aumento da concentração de sais em solução, efeito chamado de *salting out*. A adição de altas concentrações salinas à uma solução de proteínas causa a precipitação através da remoção da água de solvatação de regiões hidrofóbicas na superfície da proteína, fazendo com que essas regiões interajam entre si, resultando na agregação. Portanto, a precipitação, a qual pode ser direta ou fracionada (em etapas), é muito utilizada nas primeiras etapas de purificação de proteínas, aplicada no extrato clarificado, a fim de obter-se uma purificação inicial do produto (DOONAN, 2004).

O sal mais utilizado para a precipitação fracionada de proteínas é o sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), pois sua solubilidade varia pouco em ampla faixa de temperatura, está disponível em estado relativamente puro para ser utilizado em grandes quantidades de forma econômica, e fornece ótima estabilidade para as proteínas em solução. Além do sal a ser utilizado, outro fator importante é a saturação deste sal. Na saturação de 25 % geralmente precipitam particulados e pré-agregados ou proteínas de alta massa molar, portanto, utiliza-se saturação ao redor deste valor na primeira etapa do fracionamento (SCOPE, 2010). A próxima etapa do fracionamento deve causar a precipitação da proteína alvo, portanto adiciona-se mais sal a fim de chegar à saturação final desejada. A desvantagem dessa técnica de purificação é a necessidade de uma etapa de diálise ou diafiltração para remoção do sal, para que não haja interferência nas próximas etapas de purificação (HARRIS, 2001).

Silva et al. (2009) otimizaram a purificação de C-FC extraída da biomassa seca de *S. platensis* LEB-52 por precipitação fracionada com sulfato de amônio (0-20/20-50 %), obtendo pureza de 0,8, recuperação de 83,8 % e concentração de 1,66 mg.mL⁻¹. Patel et al. (2005) também utilizaram precipitação fracionada com sulfato de amônio com saturação de 0-25/25-50 % para purificação de C-FC de *Spirulina* sp., obtendo pureza de 2,6 (fator de purificação de 3,3 vezes) e recuperação de 81,5 %. No entanto, neste último estudo, a etapa de saturação de 25-50 % foi realizada duas vezes, o que justifica a elevada pureza obtida.

3.3.3 Diafiltração/ultrafiltração

Membranas podem ser definidas como barreiras que separam duas fases e que restringem, total ou parcialmente, o transporte de uma ou várias espécies químicas (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006). Processos de separação por membranas (PSM) estão sendo muito utilizados na reação, clarificação e em processos de recuperação para a produção de moléculas, partículas e emulsões. PSM são vantajosos pois são seletivos, dispõem de alta área de superfície por unidade de volume e possuem o potencial de controlar o nível de contato e/ou a mistura entre duas fases (CHARCOSSET, 2006). Além disso, minimizam os custos do processo, tem flexibilidade operacional, são de fácil aumento de escala, possuem alta produtividade e mantém a pureza dos produtos em condições ambientes (ZIN et al., 2016), apresentando baixa exigência energética e alto fluxo de permeado em baixas pressões (LUJÁN-FACUNDO et al., 2015). PSM são muito aplicados na indústria de alimentos, principalmente para a concentração, recuperação e fracionamento de proteínas e hidrolisados de proteínas (SØTOFT et al., 2015; ZIN et al., 2016). Os PSM mais empregados na concentração e purificação de macromoléculas são os que utilizam a diferença de pressão como força motriz, sendo estes: microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa (WIBISONO et al., 2014).

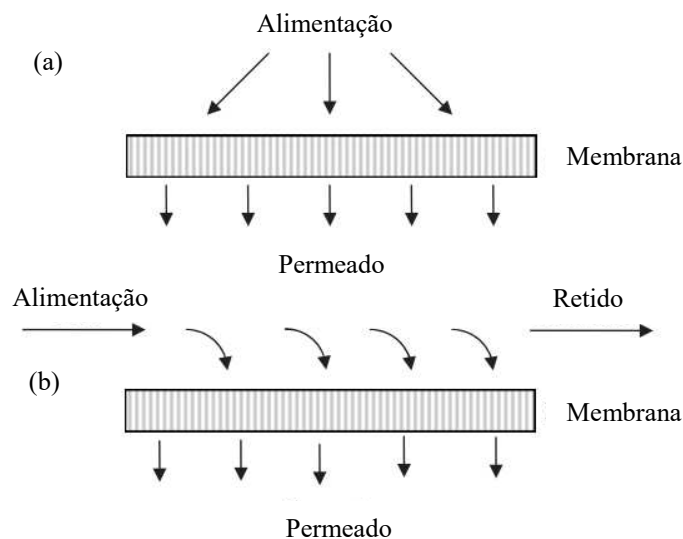
A ultrafiltração (UF) é uma técnica de separação por membranas semipermeáveis, que utiliza baixas pressões para a separação por tamanho molecular, forma e/ou carga de espécies em solução (SCHRATTER, 2004). Membranas de ultrafiltração possuem poros que variam de 5 a 100 nm, retendo moléculas de massa molar na faixa de 1 kDa a 1 MDa. Assim, a UF é idealmente utilizada para concentrar macromoléculas biológicas e polímeros uma vez que utiliza temperaturas e pressões relativamente baixas e não envolve mudança de fase ou adição de aditivos químicos, garantindo mínima degradação, desativação e/ou desnaturação. Além disso, os processos de ultrafiltração são mais econômicos que outras técnicas de purificação mais sofisticadas, como a cromatografia, e são de simples operação e aumento ou diminuição de escala (CUI, 2005).

No entanto, uma grande desvantagem desta tecnologia é a redução do fluxo do permeado com o tempo, devido à polarização de concentração e a incrustação da membrana (*fouling*). Na polarização de concentração ocorre um gradiente de concentração dos solutos retidos na superfície da membrana ou perto dela, e pode ser reversível. Por outro lado, no *fouling* ocorre o depósito de solutos na superfície da membrana, formando uma camada de gel,

ou a adsorção dos solutos nos poros da membrana, o que é irreversível (SAXENA et al., 2009; ZIN et al., 2016).

Com relação ao modo de operação, os PSM podem ser operados em escoamento convencional ou em escoamento tangencial (Figura 3). Na ultrafiltração com escoamento convencional, o permeado passa através da membrana e o soluto é retido, acumulando-se na superfície da membrana (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006). Na ultrafiltração com escoamento tangencial, o fluido a ser filtrado escoava paralelamente à superfície da membrana, enquanto o permeado escoava transversalmente a mesma devido a diferença de pressão. O escoamento tangencial é geralmente utilizado pois reduz a polarização por concentração (CHARCOSSET, 2006).

Figura 3 – Modos de operação dos PSM (a) escoamento convencional (b) escoamento tangencial.



Adaptado de: CHARCOSSET (2006).

Membranas de UF geralmente são especificadas quanto à sua retenção nominal, a qual se refere à massa molar que será 95 % retida ou rejeitada pela membrana (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006). Membranas de UF podem ser moldadas a partir de vários polímeros, sendo polisulfona, polietersulfona e celulose regenerada os de maior interesse em aplicações biotecnológicas e biofarmacêuticas (VAN REIS; ZYDNEY, 2001).

A diafiltração (DF) é uma técnica de ultrafiltração utilizada para remover completamente, substituir ou diminuir a concentração de sais e/ou solventes de soluções contendo proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos e outras biomoléculas (SCHWARTZ, 2003). A

DF é utilizada para auxiliar na purificação e consiste na adição do tampão utilizado na ultrafiltração. Esse processo pode ser realizado de dois modos: contínuo e descontínuo (WHEELWRIGHT, 1991). No modo descontínuo, o qual ocorre em ciclos, o extrato a ser purificado é diluído com tampão (em quantidade equivalente ao volume permeado) antes da concentração. No modo contínuo, o tampão é adicionado continuamente no sistema, e o volume é mantido constante durante toda a operação (FOLEY, 2006).

Figueira (2014) estudou a purificação da C-FC extraída da biomassa seca de *S. platensis* LEB-52 utilizando a diafiltração/ultrafiltração, avaliando temperatura, pH, pressão e número de ciclos de diafiltração com tampão fosfato de sódio $0,025 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,5, através de delineamento experimental. Os resultados mostraram que a temperatura e a aplicação de diafiltração causaram influência significativa sob a recuperação e o fator de purificação da C-FC, respectivamente. Os melhores resultados foram obtidos com membrana de retenção nominal de 50 kDa, à 25 °C, com pressão de 1 kgf.cm^{-2} e 6 ciclos de diafiltração realizada previamente à concentração por ultrafiltração. A purificação da C-FC por esse processo resultou em fator de purificação de 1,8 vezes, pureza de 0,9 e recuperação de aproximadamente 90,0 %.

3.4 APLICAÇÃO E ESTABILIDADE DE C-FICOCIANINA EM MATRIZES ALIMENTARES

Um número crescente de empresas globais fabricantes de alimentos, incluindo as empresas Nestlé[®], Mars[®], Campbell's[®], e Kellogg's[®], têm procurado remover todos os corantes artificiais de suas linhas de produção, substituindo-os por corantes naturais ou idênticos a estes. Isto porque, nos últimos anos vêm acontecendo uma mudança de hábitos no mercado consumidor, principalmente com relação à preocupação com saúde e segurança alimentar.

Em 2013, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a utilização de C-FC em doces e gomas de mascar na forma de “extrato de Spirulina” pela empresa Mars[®], tornando-a o primeiro corante azul natural aprovado para uso nos Estados Unidos. Com isto, a Nestlé[®] também começou a utilizar C-FC como corante azul em chocolates sob a denominação de “extrato de Spirulina”. No entanto, a C-FC já era comercializada com a mesma denominação por empresas japonesas, como a Earthrise[®] em parceria com a Dainippon Ink & Chemicals[®] (produto chamado LinaBlue[®]) e a Japan Algae[®] (produto Spirulina Blue[®]), bem como pela empresa francesa Naturex[®] (produto NATcolorTM). As empresas Soley Biotechnology Institute[®] (Turquia) e Delhi Nutraceuticals[®] (Nova Deli) também comercializam a

C-ficocianina, porém em forma de extrato de C-FC, em cápsulas ou em pó, com diferentes graus de pureza.

O *Code of Federal Regulations* (CFR) dos Estados Unidos, o qual regulamenta o uso de aditivos corantes isentos de certificações (Título 21, Capítulo 1, Subcapítulo A, Parte 73), atualmente permite o uso de ficocianina (na forma de “extrato de Spirulina”) em confeitos, incluindo doces e goma de mascar, glace, sorvetes e sobremesas congeladas, revestimento e coberturas de sobremesas, mistura e pó de bebidas, iogurtes, cremes, pudins, queijo cottage, gelatina, farinha de rosca, cereais prontos para comer (excluindo os cereais extrusados), e formulações de revestimento aplicadas a cápsulas e comprimidos de suplementos dietéticos. Além disso, permite que a ficocianina esteja diluída em EDTA dissódico sem ultrapassar a concentração de EDTA de 1 % (em massa do diluente) (CFR, 2019). Uma vez que a quantidade utilizada do “extrato de Spirulina” como aditivo de cor é auto limitante, não há um limite superior da quantidade permitida do aditivo ou do conteúdo de ficocianina, desde que sejam respeitadas as boas práticas de fabricação. Por outro lado, na União Europeia é autorizado o uso do “extrato de Spirulina” como aditivo de cor em alimentos em geral, na quantidade necessária (LEHTO et al., 2017). No Brasil, não há nenhuma informação quanto ao uso de C-FC como aditivo alimentar; porém, quanto ao consumo de *Spirulina*, a ANVISA recomenda a ingestão diária máxima de 1,6 g (BRASIL, 2018).

No entanto, o uso de qualquer corante natural em alimentos requer conhecimento detalhado da sua estabilidade frente à possíveis processos de degradação, a fim de otimizar a produção industrial, embalagem e armazenamento dos produtos coloridos (JESPERSEN et al., 2005). Além disso, a utilização de corantes naturais em alimentos é limitada pela natureza da matriz alimentícia onde o pigmento é disperso, e pelas interações com os outros componentes da matriz, como proteínas, polissacarídeos, lipídeos, açúcares, sais, entre outros (BATISTA et al., 2006). Segundo Newsome, Culver e Van Breemen (2014), as cores azuis não são incomuns na natureza, mas são extremamente difíceis de replicar em alimentos e bebidas, e o uso de C-FC para a maioria das aplicações em produtos é limitado pela falta de estabilidade frente ao calor, à luz e às condições ácidas.

Um dos produtos comerciais à base de C-FC, chamado LinaBlue[®], é utilizado em gomas de mascar, sorvetes à base de frutas, picolés, doces, refrigerantes, produtos lácteos e *wasabi*, e possui algumas de suas propriedades físico-químicas disponibilizadas ao consumidor. As empresas Earthrise[®] e Dainippon Ink & Chemicals[®] alegam que a cor do produto é estável em faixa de pH 4,5 – 8,0 e que quando aplicado em matriz contendo leite, ovos ou outros ingredientes proteicos, a estabilidade da cor é aumentada. Além disso, as empresas recomendam

adicionar o produto no alimento em temperaturas baixas ou a cerca de 60 °C, esfriando imediatamente após a adição. A cor deteriora quando exposto à luz, no entanto, sua estabilidade pode ser melhorada em soluções de sacarose ou quando adicionado no alimento em conjunto com um agente antioxidante. Além disso, as empresas informam que o produto precipita em soluções de álcool 100 %, mas pode ser dissolvido em soluções com menos de 20 % de álcool (DAINIPPON INK & CHEMICALS, 2018; EARTHRISE, 2018).

No que diz respeito a estabilidade da cor da C-FC quando aplicada em matriz alimentícia, apenas os estudos de Jespersen et al. (2005), Dewi, Kurniasih e Purnamayati (2018) e Mohammadi-Gouraji, Soleimanian-Zad e Ghiaci (2019) foram encontrados. Jespersen et al. (2005) verificaram que apesar de possuir menor estabilidade frente ao calor e à luz, a C-FC foi considerada mais versátil do que corantes como o gardênia azul e o índigo, apresentando cor azul brilhante quando aplicada em balas de goma e no revestimento de doces. No entanto, o biocorante desnaturou quando aplicado em balas duras, e não pôde ser utilizado em refrigerantes, uma vez que estes produtos possuem pH muito baixo. Além disso, os doces contendo C-FC perderam a cor quando expostos à luz por 24 h. Embora estes autores não tenham descrito nenhum método utilizado para aplicação da C-FC nas matrizes alimentares, informaram que para a maioria das aplicações industriais o corante é afixado em uma base de goma arábica, o que limita a solubilidade da C-FC. Dewi, Kurniasih e Purnamayati (2018) aplicaram diferentes concentrações (0, 1, 3 e 5 %) de C-FC microencapsulada em balas de goma, e verificaram que a cor azul foi intensificada proporcionalmente com o aumento da concentração de C-FC adicionada. Isto indica que a C-FC não desnaturou durante o processamento da bala, que envolvia a homogeneização dos constituintes à 40 °C (DEWI; KURNIASIH; PURNAMAYATI, 2018).

No estudo de Mohammadi-Gouraji, Soleimanian-Zad e Ghiaci (2019), C-FC purificada por sistema aquoso bifásico foi adicionada em iogurtes nas concentrações de 0, 2, 4 e 8 % (m/m) e as propriedades físico-químicas e antibacteriológicas dos produtos foram avaliadas. Neste estudo, a adição de C-FC não apresentou efeito inibitório no crescimento das bactérias lácticas e não afetou a vida de prateleira dos iogurtes, além de diminuir a sinérese dos produtos. No entanto, os iogurtes adicionados de C-FC apresentaram viscosidade mais baixa do que os controles. Além disso, não foi observada alteração na cor azul ao longo de 21 d, e a luminosidade dos iogurtes diminuiu com o aumento da concentração de C-FC adicionada. Por fim, o iogurte contendo 4 % de C-FC não apresentou diferença significativa do controle com relação à aceitabilidade do produto quando submetido à análise sensorial.

A aplicação da C-FC em produtos como alimentos infantis, doces e sorvetes é interessante devido a sua cor azul brilhante. Sorvetes são coloides alimentícios complexos, contendo ar, glóbulos de gordura e cristais de gelo dispersos em solução congelada de proteínas, sais, polissacarídeos e açúcares (GOFF; VERESPEJ; SMITH, 1999). Estes produtos são apreciados por pessoas de todas as idades por fornecerem sensação de frescor, e podem possuir elevado valor nutritivo quando produzidos à base de leite. Assim, o desenvolvimento de novos produtos que sejam atrativos aos consumidores é uma preocupação dos fabricantes de sorvete (KARAMAN et al., 2014).

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 266 de 22 de setembro de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2005), gelados comestíveis são produtos congelados obtidos a partir de emulsão de gorduras e proteínas ou de mistura de água e açúcar(es). Estes produtos podem ser adicionados de outros ingredientes desde que não descaracterizem o produto. Além disso, a utilização de ingrediente que não é usado tradicionalmente como alimento pode ser autorizada, desde que seja comprovada a segurança de uso em atendimento ao Regulamento Técnico específico. A resolução estabelece ainda a densidade aparente mínima de 475 g.L^{-1} como requisito específico de gelados comestíveis. A RDC nº 3 de 15 de janeiro de 2007 (BRASIL, 2007), a qual regulamenta a atribuição de aditivos e seus limites máximos em gelados comestíveis, não faz menção à C-FC ou ao “extrato de Spirulina” como aditivos de cor, portanto, o uso de C-FC como corante em sorvetes ainda não é regulamentado no Brasil. No entanto, gelados comestíveis como os sorvetes à base de leite são matrizes alimentares atraentes para o estudo da estabilidade da cor da C-FC, devido à relativa facilidade de produção e estocagem.

3.5 PROPRIEDADES BIOATIVAS DA C-FICOCIANINA

Diversos estudos vêm demonstrando que a C-FC possui propriedades bioativas, tendo apresentado efeito antioxidante (ROMAY et al., 1998; SONANI et al., 2017), hepatoprotetor (BHAT; MADYASTHA, 2000; NAGARAJ et al., 2012), anti-inflamatório (ROMAY; LEDÓN; GONZÁLEZ, 1998), neuroprotetor (PENTÓN-ROL et al., 2011; RIMBAU et al., 1999), antidiabético (OU et al., 2013), hipocolesterolêmico (NAGAOKA et al., 2005), anticancerígeno e antitumoral (DENIZ; OZEN; YESIL-CELIKTAS, 2016; LIAO et al., 2016; LIU et al., 2000; SILVA et al., 2018). Além disso, estudos *in vivo* mostraram que a administração de C-FC também evitou diversas anomalias fisiológicas, como encefalopatia hepática (SATHYASAIKUMAR et al., 2007), aterosclerose (RISS et al., 2007), melanogênese

(WU et al., 2011), lesão de isquemia-reperfusão no coração (KHAN et al., 2006) e colite (GONZÁLEZ et al., 1999).

Alguns autores atribuem estes efeitos ao cromóforo da C-FC, a ficocianobilina (PCB) (BHAT; MADYASTHA, 2000; HIRATA et al., 2000), devido à sua grande similaridade com a bilirrubina, produto resultante da degradação do grupo heme, e que é conhecida por ser um antioxidante natural no plasma e eficaz contra espécies reativas de oxigênio *in vivo* (STOCKER; GLAZER; AMES, 1987). De fato, a PCB apresenta propriedades anticancerígena (KONÍCKOVÁ et al., 2014), anti-inflamatória (MARÍN-PRIDA et al., 2013), ateroprotetora (STRASKY et al., 2013) e nefroprotetora (ZHENG et al., 2013). No entanto, diversos estudos de produção de apo-C-ficocianina e até de purificação de cromopeptídeos de PCB, sugerem que a fração apoproteica também possui propriedade antioxidante e anticâncer significativa e que a holoproteína de C-FC apresenta efeitos maiores do que apenas a PCB purificada (CHERDKIATIKUL; SUWANWONG, 2014; GUAN et al., 2009; MINIC et al., 2016; PLEONSIL; SOOGARUN; SUWANWONG, 2013).

3.5.1 Atividade antioxidante da C-ficocianina

A capacidade antioxidante da C-FC tem sido extensamente estudada, uma vez que há grande apelo ao consumo de compostos naturais como suplementos alimentares. Os primeiros autores a descreverem a atividade antioxidante da C-FC foram Romay et al. (1998), que relataram que esta ficobiliproteína foi capaz de sequestrar os radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e alcóxila ($\text{RO}\cdot$) e o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), além de inibir a peroxidação lipídica microsomal hepática. Desde então, diversos estudos expuseram a capacidade da C-FC de sequestrar oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (TAPIA et al., 1999), ácido hipocloroso (HOCl) (ROMAY et al., 2000), radical peróxido ($\text{ROO}\cdot$) (BENEDETTI et al., 2010; LISSI et al., 2000), radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) (BERMEJO; PIÑERO; VILLAR, 2008), peroxinitrito (ONOO^-) (BHAT; MADYASTHA, 2001), óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) (THANGAM et al., 2013) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FERNÁNDEZ-ROJAS et al., 2014), além de radicais livres não naturais, como o $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (CHEN; WONG, 2008; ÍLTER et al., 2018) e o DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) (MADHYASTHA; SIVASHANKARI; VATSALA, 2009; SONANI et al., 2017).

Assim, diversos métodos de determinação da capacidade antioxidante já foram estudados para o extrato de C-FC, incluindo capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC) (BENEDETTI et al., 2010), habilidade de redução férrica do plasma (FRAP) (SONI;

TRIVEDI; MADAMWAR, 2008), oxidação de íons ferrosos (FOX) e ensaios de poder de redução (MADHYASTHA; SIVASHANKARI; VATSALA, 2009). No entanto, existem poucos trabalhos avaliando a atividade antioxidante da C-FC em matrizes alimentares, sendo encontrados estudos com charque (BERTOLIN et al., 2011b), sistemas lipídicos (SOUZA et al., 2009) e pescado salgado-seco (BERTOLIN et al., 2011a).

3.5.1.1 Atividade antioxidante empregando o radical ABTS^{•+}

O método de determinação da capacidade antioxidante pelo radical ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)) foi desenvolvido por Miller et al. (1993) e era originalmente baseado na ativação da metamioglobina com peróxido de hidrogênio na presença de ABTS para produzir o cátion radical, na presença ou ausência de compostos antioxidantes. No entanto, uma forma mais apropriada do método foi desenvolvida por Re et al. (1999), a qual consiste na descoloração do radical à 734 nm e envolve a produção do cromóforo verde-azulado ABTS^{•+} através da reação entre ABTS e persulfato de potássio previamente à reação com o composto antioxidante.

A adição de antioxidantes doadores de hidrogênio ao cátion radical pré-formado reduz o ABTS^{•+} até certo ponto em uma escala de tempo, que depende da atividade antioxidante, da concentração do antioxidante e da duração da reação. Assim, o sequestro do cátion radical ABTS^{•+} é determinado em função da concentração e expressa em equivalentes de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), o qual é um análogo solúvel em água da vitamina E, e utilizado como padrão nas mesmas condições de reação. O método é aplicável ao estudo de antioxidantes solúveis em água e lipossolúveis, compostos puros e extratos alimentares (RE et al., 1999).

O método ABTS é muito utilizado por ser simples, rápido e depende apenas de um espectrofotômetro para registrar as mudanças na absorvância da reação. No entanto, por ser colorimétrico, deve-se ter cuidado com a utilização deste método para determinação da capacidade antioxidante de compostos coloridos, incluindo componentes naturais coloridos de alimentos e seus aditivos (OLSZOWY; DAWIDOWICZ, 2018). Portanto, este método não deve ser aplicado para a estimativa das propriedades antioxidantes de substâncias que absorvem luz no comprimento de onda da reação (734 nm).

3.5.1.2 Atividade antioxidante frente ao radical peroxila

O método chamado de capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC) foi desenvolvido por Cao, Alessio e Cutler (1993), e determina a atividade antioxidante frente ao radical peroxila induzido pelo 2,2'-azobis(2-amidinopropano)di-hidroclorato (AAPH). Originalmente, a ficobiliproteína β -ficoeritrina era utilizada como molécula-alvo fluorescente, e a perda de fluorescência durante a reação indicava a extensão da oxidação causada pela sua reação com o radical peroxila. O efeito protetor do antioxidante, ou seja, a sua capacidade de retardar o decaimento da fluorescência, é medido pela avaliação da área abaixo da curva cinética de perda de fluorescência (AUC) da amostra em comparação ao branco. No entanto, devido a certa instabilidade da β -ficoeritrina, esta foi substituída pela fluoresceína como molécula-alvo fluorescente (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001). Assim como no método ABTS, o resultado é expresso em relação a uma quantidade conhecida de Trolox (CAO; ALESSIO; CUTLER, 1993).

O mecanismo de reação dá-se pela transferência de um átomo de hidrogênio e este método é muito utilizado no meio acadêmico e nas indústrias de suplementos alimentares e dietéticos (SHALABY; SHANAB, 2013). Além disso, o método de ORAC fornece uma medida direta da capacidade antioxidante de quebra de cadeia hidrofílica frente ao radical peroxila (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001). No entanto, há poucos estudos na literatura utilizando o método de ORAC para determinação da capacidade antioxidante de C-FC.

3.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos de extração celular de C-FC utilizados na literatura até o momento são pouco específicos, causando liberação de impurezas e fragmentos celulares, o que acarreta em mais etapas de purificação. Assim, a fim de se obter maior rendimento de extração e grau de pureza do extrato de C-FC é preciso utilizar métodos de ruptura celular mais seletivos. A extração seletiva de C-FC a partir da biomassa úmida de *S. platensis* LEB-52 é interessante pois resulta em um extrato de pureza em torno de 1,0 sem nenhuma etapa de purificação, permitindo sua aplicação direta como corante na indústria de alimentos. Se maiores graus de pureza forem desejados ou necessários, diferentes técnicas de purificação podem ser aplicadas neste extrato, o que provavelmente simplificará o processo de purificação, diminuindo os custos de processamento deste bioproduto.

A cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de NaCl é amplamente utilizada para a purificação de C-FC, apresentando alto fator de purificação. No entanto, a eluição por gradiente de pH é potencialmente eficiente para obtenção de C-FC purificada e ainda é pouco explorada na literatura para este fim. Além disso, devido ao alto valor agregado da C-FC e sua ampla aplicação, não só na indústria de alimentos, como também na biotecnologia e medicina, é importante ampliar os estudos de sequências de purificação que permitam obter diferentes graus de pureza desta proteína. Adicionalmente, há escassez de informações na literatura sobre a estabilidade da cor da C-FC quando aplicada em matriz alimentícia. Visto que a aplicação de C-FC como corante em alimentos é a mais explorada atualmente, é preciso avaliar esta estabilidade quando em contato com os demais componentes da matriz.

Por fim, também há poucos relatos na literatura com relação à atividade antioxidante da C-FC quando aplicada em matriz alimentar e avaliando essa propriedade na C-FC com diferentes graus de pureza. A procura por alimentos que possuam compostos bioativos naturais em sua composição é crescente, e é interessante relacionar a atividade antioxidante desta ficobiliproteína com seu grau de pureza.

Diante do exposto, o presente trabalho visa preencher algumas lacunas da literatura, principalmente no que diz respeito a estabilidade da cor da C-FC quando aplicada em sorvetes, além de avaliar a sua atividade biológica quando purificada e quando adicionada neste alimento. Somando-se a isso, este estudo visa estudar processos de purificação deste biocorante que apresentem elevada recuperação e pureza, devido ao seu alto valor agregado e importância biotecnológica.

CAPÍTULO III
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO 1

**PURIFICAÇÃO DE C-FICOCIANINA EM ETAPA ÚNICA: CROMATOGRAFIA DE
TROCA IÔNICA COM ELUIÇÃO POR GRADIENTE DE pH**

RESUMO

A C-ficocianina (C-FC) é uma ficobiliproteína que pode ser usada como corante azul natural nas indústrias de alimentos e cosméticos, como biomarcador ou como agente em tratamentos médicos, dependendo do seu grau de pureza. Neste trabalho foi descrito um processo de purificação em uma única etapa de C-FC extraída da biomassa úmida de *Spirulina (Arthrospira) platensis* LEB-52 utilizando cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH. Diferentes parâmetros foram estudados, como o pH de alimentação, a adição de sal no tampão de eluição e o uso de diferentes tampões e volumes de eluição. Os melhores resultados foram obtidos utilizando a seguinte condição cromatográfica: equilíbrio e lavagem com tampão Tris-HCl 0,025 mol.L⁻¹ pH 6,5 e eluição combinando degrau com 0,08 mol.L⁻¹ de NaCl diluído em Tris-HCl 0,025 mol.L⁻¹ pH 6,5 e gradiente de pH com tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ pH 6,2 – 3,0. Este processo resultou em C-FC com purezas de 4,2 e 3,5 e recuperações de 32,6 e 49,5%, respectivamente, em uma única etapa de purificação.

Palavras-chave: Eluição em degrau. Ficobiliproteínas. Pureza de grau analítico.

1 INTRODUÇÃO

As ficobiliproteínas são um grupo de proteínas coletoras de luz, utilizadas principalmente por cianobactérias e algas eucarióticas para aumentar a eficiência da fotossíntese, através da absorção de energia em comprimentos de onda onde a clorofila tem pouca absorção (ERIKSEN, 2008; KUDDUS et al., 2013). As principais ficobiliproteínas em cianobactérias são a ficoeritrina ($\lambda_{\max} = 490-570$ nm), a aloficocianina ($\lambda_{\max} = 650-665$ nm) e a C-ficocianina (C-FC, $\lambda_{\max} = 590-625$ nm) (SUN; WANG, 2003).

A C-FC é composta por duas subunidades relativamente homólogas, denominadas subunidades α e β , e é encontrada em solução como uma mistura de monômeros ($\alpha\beta$), trímeros ($\alpha_3\beta_3$), hexâmeros ($\alpha_6\beta_6$) e/ou outros oligômeros (MACCOLL, 1998). Song, Zhao e Wang (2013) relataram massa molar de 115 kDa para C-FC de *Spirulina (Arthrospira) platensis*, enquanto que este valor pode variar entre 16-18 kDa para a subunidade α e entre 19-21 kDa para a subunidade β (KUMAR et al., 2014; SEO et al., 2013; SONG; ZHAO; WANG, 2013; YAN et al., 2011). Em relação ao ponto isoelétrico da C-FC de *Spirulina platensis*, vários valores dentro do intervalo de pH de 4,8 – 5,8 foram relatados (LIU et al., 2000; PATIL; RAGHAVARAO, 2007; ZHAO et al., 2014).

A C-FC apresenta cor azul brilhante, e as indústrias de alimentos e cosméticos têm interesse em sua aplicação como corante natural em energéticos, refrigerantes, doces, confeitos e cosméticos (MISHRA et al., 2010). Esta ficobiliproteína também tem aplicações na indústria de biotecnologia, em diagnósticos e na medicina (ERIKSEN, 2008), como biomarcador fluorescente e como agente em tratamentos. Além disso, estudos mostraram que a C-FC possui propriedades bioativas, possuindo efeito anti-inflamatório (ROMAY; LEDÓN; GONZÁLEZ, 1998), hepatoprotetor (NAGARAJ et al., 2012), antioxidante (ROMAY et al., 1998; SONANI et al., 2017), neuroprotetor (PENTÓN-ROL et al., 2011), antidiabético (OU et al., 2013), anticancerígeno e antitumoral (DENIZ; OZEN; YESIL-CELIKTAS, 2016; LIAO et al., 2016; LIU et al., 2000; SILVA et al., 2018).

A pureza da C-FC é definida como a razão entre as absorvâncias a 620 nm e 280 nm; quando esta relação é $\geq 0,7$, é considerada como pureza de grau alimentar e, quando $\geq 4,0$, é considerada de grau analítico (RITO-PALOMARES; NUÑEZ; AMADOR, 2001). Devido ao seu alto valor agregado, vários estudos estão focados no desenvolvimento de um processo de purificação que permita alcançar alta pureza com a maior recuperação possível. No entanto, na maioria dos estudos (ABALDE et al., 1998; HAZRA; KESH, 2017; MINKOVA et al., 2003; MORAES; KALIL, 2009; SONI et al., 2006; ZHANG; CHEN, 1999), mais de uma

etapa de purificação é aplicada, o que aumenta os custos da purificação de C-FC e diminui sua recuperação. Assim, para alcançar maior pureza de C-FC, é necessário utilizar métodos de extração mais seletivos, como os propostos em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (SALA; MORAES; KALIL, 2018), e processos de purificação mais eficientes.

A cromatografia de troca iônica (CTI) é uma das técnicas mais comuns aplicadas na separação de proteínas (AHAMED et al., 2007), portanto, é amplamente utilizada na purificação de C-FC. A adsorção de C-FC na resina de troca aniônica Q-Sepharose Fast Flow já foi investigada por nosso grupo de pesquisa (SILVEIRA et al., 2008); enquanto que um processo de purificação de C-FC extraída da biomassa seca de *Spirulina platensis* LEB-52 foi otimizado por Moraes e Kalil (2009) através da aplicação de precipitação com sulfato de amônio, diálise e CTI com eluição combinando degrau e gradiente salino.

O pH é um dos parâmetros mais importantes que afetam a ligação de proteínas na CTI, uma vez que determina a carga da molécula alvo e do trocador de íons. As proteínas são carregadas negativamente em valores de pH acima de seu ponto isoelétrico (pI) e carregadas positivamente em valores de pH abaixo de seu pI. Portanto, o gradiente de pH pode ser usado como um modo de eluição na CTI, com as proteínas carregadas negativamente adsorvidas em resinas de troca aniônica sendo eluídas pela diminuição do valor de pH, e as proteínas carregadas positivamente adsorvidas em resinas de troca catiônica sendo eluídas pelo aumento do valor de pH (KARLSSON; HIRSH, 2011). Isto permite que as diferentes proteínas carregadas na coluna de CTI sejam eluídas em faixas estreitas de pH mais ou menos iguais ao seu pI, aumentando a resolução da separação (PEPAJ et al., 2006). Portanto, a CTI com eluição por gradiente de pH é uma técnica eficiente para a purificação de proteínas, mas raramente é aplicada para a separação de ficobiliproteínas (KUMAR et al., 2014; LIU et al., 2005; SU et al., 2010; YAN et al., 2011). Além disso, não há relatos na literatura sobre o estudo das condições de eluição durante a CTI com eluição por gradiente de pH para purificação de C-FC.

Considerando a importância comercial da C-FC e seu alto valor agregado, é importante ampliar os estudos referentes à sua purificação, com foco na simplificação do processo. O objetivo deste estudo é avaliar o potencial de purificação da CTI com eluição por gradiente de pH, comparando com processo anteriormente otimizado, e estudar diferentes parâmetros deste tipo de eluição para purificação de C-FC extraída da biomassa úmida de *S. platensis*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CULTIVO DA CIANOBACTÉRIA *Spirulina platensis* LEB-52 E EXTRAÇÃO DE C-FICOCIANINA A PARTIR DE BIOMASSA ÚMIDA (EXTRAÇÃO SELETIVA)

A cianobactéria *Spirulina platensis* LEB-52, gentilmente cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), foi utilizada para obtenção de C-ficocianina a partir da biomassa úmida. Para o preparo do inóculo, cultivo e manutenção da microalga foi utilizado o meio Zarrouk (REINEHR; COSTA, 2006; ZARROUK, 1966). A cianobactéria foi cultivada em modo descontínuo em Erlenmeyer de 2 L (volume útil de 1,8 L), sendo adicionado 20 % (v/v) de inóculo com concentração inicial de 0,75 g.L⁻¹. A agitação foi realizada por injeção constante de ar estéril (0,5 vvm) a 25 °C. A iluminância foi promovida por lâmpadas fluorescentes do tipo *daylight* (40,5 µE.m⁻².s⁻¹) com fotoperíodo fixado em 12 h claro e 12 h escuro (SALA et al., 2018).

A C-FC foi extraída seletivamente de acordo com o estudo de Sala, Moraes e Kalil (2018), onde verificou-se que a máxima produção intracelular de C-ficocianina por *S. platensis* LEB-52 utilizando o meio Zarrouk ocorre em 21 d de cultivo, permanecendo constante até 74 d, sem incremento significativo ($p > 0,05$) na concentração intracelular de C-FC. Assim, a biomassa foi recuperada entre 21 e 74 d de cultivo através de filtração em membrana de acetato de celulose (0,45 µm). A biomassa foi pré-tratada com EDTA (1 mg.mL⁻¹) diluído em tampão Tris-SO₄ 0,05 mol.L⁻¹ pH 7,4, na concentração de 1,5 mg_{biomassa}.mL⁻¹. A suspensão foi agitada durante 30 s em vórtex e mantida durante 1 min a 25 °C. Após, a biomassa pré-tratada foi recuperada por filtração em membrana de 0,45 µm e a C-FC foi extraída seletivamente ressuspensando a biomassa em tampão Tris-SO₄ 0,05 mol.L⁻¹ pH 7,4, na concentração de 0,5 mg_{biomassa}.mL⁻¹, e incubando a 25 °C durante 24 h. Ao final deste período, o extrato foi centrifugado (12.000 × g, 10 °C, 20 min) e filtrado em membrana de 0,45 µm para obtenção do extrato clarificado.

2.2 PURIFICAÇÃO DE C-FICOCIANINA POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

2.2.1 Resina e coluna cromatográfica

Todos os ensaios cromatográficos foram realizados utilizando coluna de leito fixo C10/20 (dimensões 20 x 1 cm) contendo 10 cm (volume total de 8 mL) de resina trocadora aniônica forte Q-Sepharose Fast Flow, ambas adquiridas da GE Healthcare (Suíça). O grupo de troca iônica desta resina é um grupamento amino quaternário.

2.2.2 Cromatografia de troca iônica: eluição por gradiente salino e por gradiente de pH

Nos ensaios de comparação entre tipos de eluição, 41 mL do extrato clarificado (concentração de 0,079 mg.mL⁻¹) foram carregados na velocidade de 40 cm.h⁻¹ na coluna previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,025 mol.L⁻¹ pH 6,5 (MORAES; KALIL, 2009). As proteínas não adsorvidas foram removidas por lavagem utilizando o mesmo tampão de equilíbrio. A CTI com eluição combinando degrau e gradiente salino foi realizada de acordo com Moraes e Kalil (2009), utilizando-se 0,1 mol.L⁻¹ de NaCl seguido de gradiente linear (0,1 – 1 mol.L⁻¹) com 50 mL de NaCl diluído em tampão Tris-HCl 0,025 mol.L⁻¹, pH 5,0 na velocidade de 40 cm.h⁻¹

A CTI com eluição por gradiente de pH foi realizada de acordo com Kumar et al. (2014) com modificações, utilizando 50 mL de tampão acetato de sódio 0,1 mol.L⁻¹ em gradiente de pH de 5,6 – 3,4 na velocidade de 40 cm.h⁻¹. Frações de 3 mL foram coletadas em ambos os ensaios, as quais foram monitoradas a 280 nm e analisadas quanto ao pH e concentração, pureza, recuperação e fator de purificação de C-FC.

2.2.3 Cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH

Parâmetros da cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH, tais como pH de alimentação, adição de sal na etapa de eluição e utilização de diferentes tampões e volumes de eluição, foram estudados (Tabela 1). Em todos os ensaios, exceto no Ensaio 2, as etapas de equilíbrio e lavagem foram realizadas com tampão Tris-HCl 0,025 mol.L⁻¹ pH 6,5 e o pH de alimentação do extrato de C-FC foi ajustado para 6,5 (Moraes e Kalil, 2009). No Ensaio 2, as etapas de equilíbrio e lavagem foram realizadas com o mesmo tampão de extração (Tris-SO₄ 0,05 mol.L⁻¹ pH 7,4) e o pH de alimentação do extrato de C-FC não foi ajustado.

Tabela 1 – Condições cromatográficas dos ensaios de purificação de C-FC por CTI com eluição por gradiente de pH.

Condições cromatográficas			
Ensaio	Equilíbrio e lavagem	Alimentação	Eluição
1	Tampão Tris-HCl 0,025 mol.L ⁻¹ pH 6,5	pH 6,5	50 mL de tampão acetato 0,1 mol.L ⁻¹ pH 5,6 – 3,4
2	Tampão Tris-SO ₄ 0,05 mol.L ⁻¹ pH 7,4	pH 7,4	50 mL de tampão acetato 0,1 mol.L ⁻¹ pH 5,6 – 3,4
3	Tampão Tris-HCl 0,025 mol.L ⁻¹ pH 6,5	pH 6,5	50 mL de tampão acetato 0,1 mol.L ⁻¹ pH 5,6 – 3,4 + 0,05 mol.L ⁻¹ de NaCl
4	Tampão Tris-HCl 0,025 mol.L ⁻¹ pH 6,5	pH 6,5	25 mL de tampão acetato 0,1 mol.L ⁻¹ pH 5,6 – 3,4
5	Tampão Tris-HCl 0,025 mol.L ⁻¹ pH 6,5	pH 6,5	37,5 mL de tampão acetato 0,1 mol.L ⁻¹ pH 5,6 – 3,4
6	Tampão Tris-HCl 0,025 mol.L ⁻¹ pH 6,5	pH 6,5	75 mL de tampão acetato 0,1 mol.L ⁻¹ pH 5,6 – 3,4
7	Tampão Tris-HCl 0,025 mol.L ⁻¹ pH 6,5	pH 6,5	50 mL de tampão citrato 0,1 mol.L ⁻¹ pH 5,6 – 3,4
8	Tampão Tris-HCl 0,025 mol.L ⁻¹ pH 6,5	pH 6,5	50 mL de tampão citrato 0,05 mol.L ⁻¹ pH 5,6 – 3,4
9	Tampão Tris-HCl 0,025 mol.L ⁻¹ pH 6,5	pH 6,5	50 mL de tampão citrato 0,05 mol.L ⁻¹ pH 6,2 – 3,0
10	Tampão Tris-HCl 0,025 mol.L ⁻¹ pH 6,5	pH 6,5	75 mL de tampão citrato 0,05 mol.L ⁻¹ pH 6,2 – 3,0
11	Tampão Tris-HCl 0,025 mol.L ⁻¹ pH 6,5	pH 6,5	20 mL de tampão Tris-HCl 0,025 mol.L ⁻¹ pH 6,5 + 0,08 mol.L ⁻¹ de NaCl seguido de 50 mL de tampão citrato 0,05 mol.L ⁻¹ pH 6,2 – 3,0

2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.3.1 Concentração, pureza, recuperação e fator de purificação de C-ficocianina

As leituras de pH foram realizadas utilizando um pHmetro digital (Hanna Instruments, EUA). As frações purificadas foram misturadas de acordo com quatro faixas de pureza: $PE \geq 4,0$; $3,5 \leq PE < 4,0$; $2,5 \leq PE < 3,5$; $1,5 \leq PE < 2,5$. Os valores finais de concentração, pureza, recuperação e fator de purificação de C-FC foram determinados na mistura das frações. A concentração de C-ficocianina (C-FC, mg.mL^{-1} , Equação 1) foi calculada como descrito por Bennett e Bogorad (1973) com modificação no comprimento de onda por Moraes e Kalil (2009). A pureza do extrato de C-FC (PE) foi calculada conforme a Equação 2, onde a absorvância a 620 nm (A_{620}) indica a concentração de C-FC e a absorvância a 280 nm (A_{280}) indica a concentração de proteínas na solução. As leituras de absorvância (A) a 620, 652 e 280 nm foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu UV-1800, Japão).

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

$$\text{PE} = \frac{A_{620}}{A_{280}} \quad (2)$$

O fator de purificação (FP) foi calculado pela razão entre a pureza final e a pureza inicial do extrato. A recuperação de C-FC (%) após o processo de purificação foi calculada conforme a Equação 3, onde $\text{C-FC}_{\text{final}}$ e $\text{C-FC}_{\text{inicial}}$ correspondem às concentrações de C-FC (mg.mL^{-1}) das frações ao final e no início do processo de purificação, respectivamente, e V_{final} e V_{inicial} são os volumes (mL) das frações final e inicial, respectivamente.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\sum (\text{C-FC}_{\text{final}} \times V_{\text{final}})}{\text{C-FC}_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (3)$$

2.3.2 Concentração de biomassa

A concentração de biomassa foi determinada por leitura da densidade óptica a 670 nm (COSTA et al., 2002) e conversão para biomassa seca através de curva padrão

previamente preparada. Para construção da curva padrão, as células foram coletadas por centrifugação ($4.757 \times g$, 30 min, 4 °C), lavadas e ressuspendidas com água destilada para leitura da absorvância. Para determinação da biomassa seca, as células lavadas com água destilada foram secas a 105 °C até massa constante.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 COMPARAÇÃO ENTRE TIPOS DE ELUIÇÃO NA CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA PARA PURIFICAÇÃO DE C-FICOCIANINA

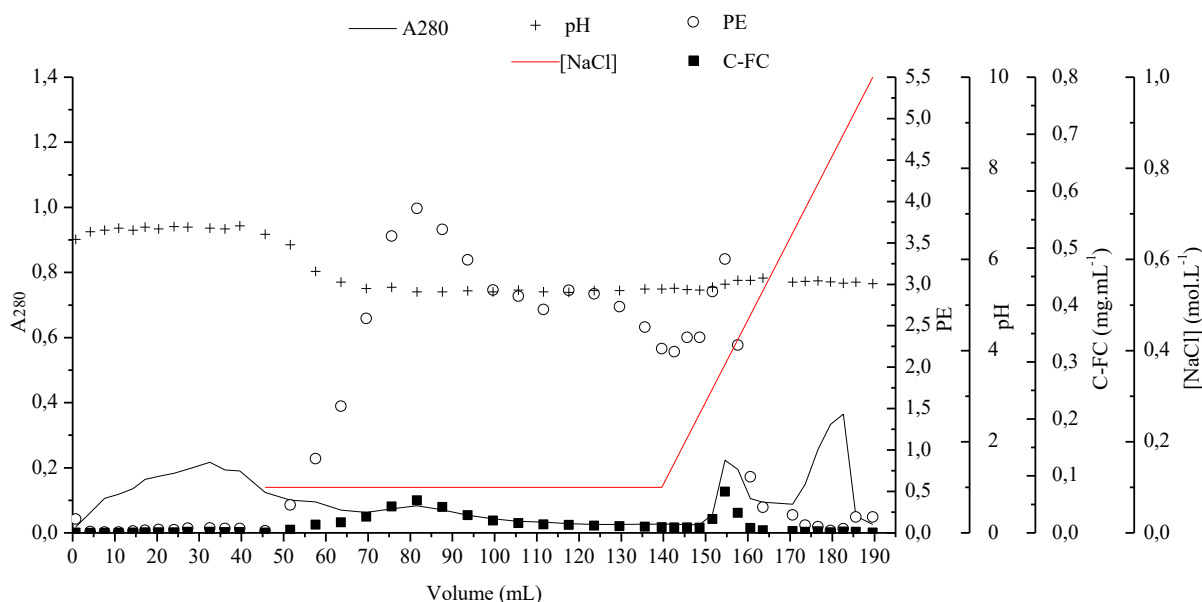
CTI com eluição por gradiente de pH e com eluição combinando degrau e gradiente de NaCl foram aplicadas na purificação de C-FC extraída da biomassa úmida de *S. platensis* LEB-52, a fim de avaliar o potencial de purificação da eluição por gradiente de pH (Tabela 2). A eluição combinando degrau e gradiente salino foi otimizada por Moraes e Kalil (2009) para a purificação de C-FC extraída a partir da biomassa seca de *S. platensis* LEB-52 e foi aplicada após uma etapa prévia de purificação por precipitação fracionada com sulfato de amônio e diálise, resultando em C-FC com pureza de 4,0, recuperação de 44,0 % e FP de 6,3 vezes. No presente trabalho, a C-FC extraída seletivamente a partir de biomassa úmida da mesma cianobactéria não passou por nenhuma etapa prévia de purificação, e a maior pureza de C-FC obtida com eluição por degrau e gradiente de NaCl foi de 3,4 (mistura das frações $3,5 \leq PE < 4$), com um FP de 3,7 vezes e 30,2 % de recuperação, indicando que este processo apresenta uma grande eficiência de purificação (Figura 1).

Tabela 2 – Parâmetros de purificação dos ensaios comparando modos de eluição.

Frações	Degrau seguido de gradiente de NaCl				Gradiente de pH (Ensaio 1)			
	PE	FP	C-FC	Rec %	PE	FP	C-PC	Rec %
Inicial	0,9	1,0	0,072	100,0	1,0	1,0	0,083	100,0
$PE \geq 4,0$	-	-	-	-	4,5	4,5	0,080	37,3
$3,5 \leq PE < 4,0$	3,4	3,7	0,049	30,2	3,3	3,3	0,029	14,0
$2,5 \leq PE < 3,5$	2,9	3,2	0,029	40,5	2,5	2,5	0,067	20,7
$1,5 \leq PE < 2,5$	1,9	2,1	0,014	13,7	1,7	1,7	0,022	1,9

PE: pureza; FP: fator de purificação; C-FC: concentração de C-FC ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); Rec: recuperação de C-FC (%).

Figura 1 – Cromatograma do ensaio utilizando eluição por combinação de degrau e gradiente de NaCl.

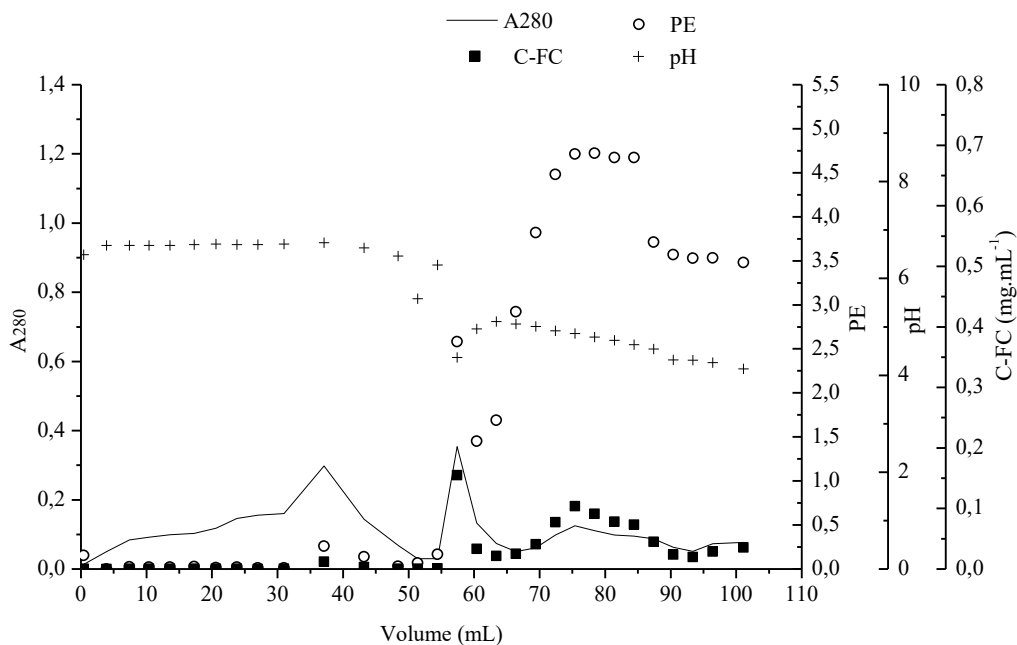


No entanto, pode-se observar na Figura 2 que utilizando a eluição por gradiente de pH foi possível obter 5 frações de C-FC de pureza acima de 4,0 (resultando em um FP de 4,5 vezes) e recuperação de 37,3 %, enquanto que no ensaio utilizando degrau e gradiente salino não foi possível atingir pureza de 4,0. Este resultado indica que a CTI com eluição por gradiente de pH é eficiente na purificação de C-FC obtida a partir da biomassa úmida, uma vez que foram obtidos resultados de pureza e concentração final, fator de purificação e recuperação de C-FC superiores aos obtidos pelo modo de eluição previamente otimizado por Moraes e Kalil (2009). Além disso, em comparação à CTI com eluição por gradiente salino, o gradiente de pH possui a vantagem de não necessitar de uma etapa de dessalinização da amostra após o processo de purificação.

Na Figura 2, é possível observar o efeito que ocorreu no pH de eluição em torno de 50-55 mL. Primeiro, houve uma queda abrupta no pH (5,5), seguida por um retorno no valor (6,2) e uma nova queda para em torno de 4,3 antes de o valor de pH começar a se estabilizar e formar o gradiente. Essa primeira queda pode ser explicada pela súbita mudança de pH no início da eluição, uma vez que as etapas de alimentação e lavagem foram realizadas em pH 6,5 e a capacidade tamponante da resina trocadora aniônica forte manteve o pH em valores ligeiramente superiores. O aumento subsequente do valor de pH no início da eluição pode ser atribuído ao efeito Donnan. O pH no microambiente de um trocador de íons não é o mesmo que o do tampão alimentado porque a resina pode repelir ou atrair íons de acordo com sua carga

(KALIL; MAUGERI-FILHO; RODRIGUES, 2005). Segundo Scopes (2010), o pH na matriz (resina) é geralmente cerca de 1 unidade superior ao pH aplicado nos trocadores aniônicos. Neste ensaio, assim que o tampão de eluição (pH 5,6) passou a ser aplicado, ocorreu uma liberação de íons OH^- que estavam ligados a resina, os quais foram substituídos pelos íons do sal do tampão de eluição, resultando em um aumento de pH na saída da coluna (pH 6,2), característico do efeito Donnan. Por fim, a nova queda de pH antes da estabilização do gradiente (Figura 2, volume 55 mL) possivelmente ocorreu devido a uma liberação de proteínas carregadas positivamente, incluindo a C-FC. Isto porque pode-se observar um pico de proteínas (280 nm) e um pico de concentração de C-FC neste ponto de pH baixo (4,3), valor que está abaixo do ponto isoelétrico da C-FC relatado na literatura (LIU et al., 2000; PATIL; RAGHAVARAO, 2007; ZHAO et al., 2014), portanto o gradiente de pH aplicado (pH 5,6 – 3,2) promoveu a titulação da proteína, fazendo com que esta assumisse carga positiva, diminuindo o pH de saída da coluna.

Figura 2 – Cromatograma do ensaio utilizando eluição por gradiente de pH.



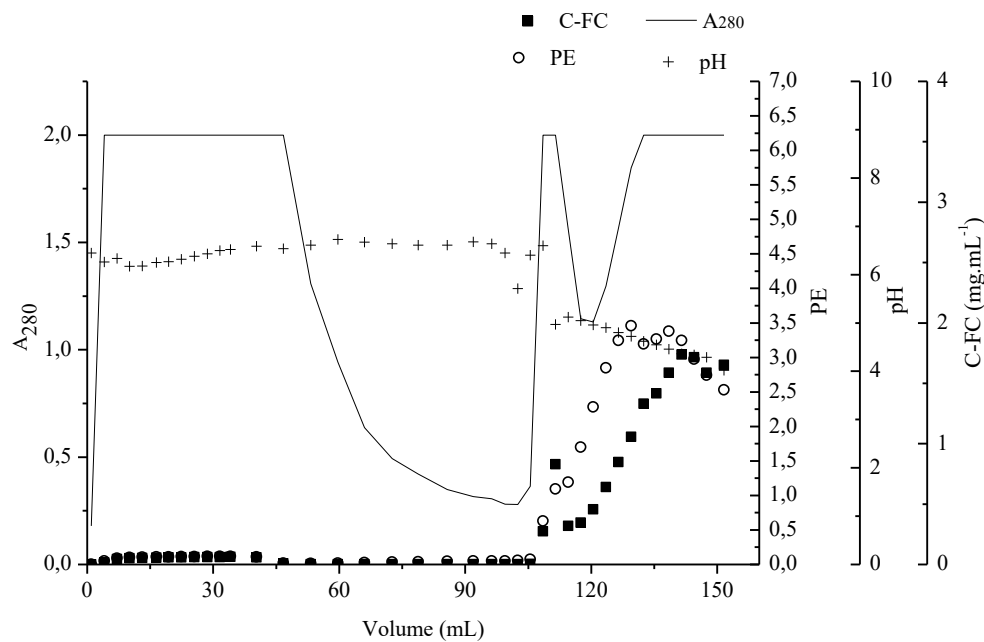
É importante ressaltar que a C-FC pode ser comercializada com diferentes graus de pureza (DELHI NUTRACEUTICALS, 2019; SOLEY BIOTECHNOLOGY INSTITUTE, 2019), assim, não apenas as frações mais puras obtidas durante o ensaio cromatográfico podem ser aproveitadas. Por exemplo, no ensaio utilizando eluição por degrau seguido de gradiente salino, a maior pureza de C-FC obtida pela mistura das frações foi de 3,4 com 30,2 % de

recuperação. No entanto, este ensaio forneceu diversas frações com pureza entre 2,5 e 3,5 e entre 1,5 e 2,5 (Figura 1, Tabela 2), as quais resultaram em misturas com purezas de 2,9 e 1,9 e recuperações de 40,5 e 13,7 %, respectivamente. Portanto, embora não tenha sido possível purificar C-FC até grau analítico ($PE \geq 4,0$) como no ensaio utilizando eluição por gradiente de pH, foi obtida C-FC com grau de pureza adequado para aplicação como corante em alimentos e cosméticos (PE de 1,5 – 2,5) e biomarcador em análises (PE de 2,5 – 3,5).

Os resultados elevados de pureza e recuperação obtidos no ensaio utilizando a eluição por gradiente de pH são devido a pureza inicial do extrato de C-FC extraída seletivamente. Para fins de comparação, foi realizado um ensaio de purificação utilizando as mesmas condições cromatográficas, porém aplicado ao extrato de C-FC extraído a partir da biomassa seca de *S. platensis* LEB-52 utilizando método de extração proposto por Silveira et al. (2007). O extrato inicial de C-FC possuía pureza de 0,5 e concentração de $1,78 \text{ mg.mL}^{-1}$ e, ao final do processo de purificação, foi possível obter pureza média de 3,2, recuperação de 39,0 % e FP de 6,0 vezes (Figura 3). Estes resultados comprovam que a alimentação de extrato de C-FC de pureza mais elevada, como é o caso da C-FC extraída seletivamente de biomassa úmida, torna a eluição por gradiente de pH ainda mais interessante. Além disso, pode-se observar na Figura 3 que a concentração de proteínas contaminantes, representada pela leitura da absorvância à 280 nm, é muito maior no extrato de C-FC da biomassa seca do que nos extratos obtidos a partir da biomassa úmida (Figuras 1 e 2). Isto porque a extração a partir da biomassa úmida utilizada neste trabalho é mais seletiva para a C-FC, resultando em menor concentração de proteínas contaminantes e fragmentos celulares.

Os resultados desta primeira etapa do trabalho indicam que a técnica de cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH é eficiente na purificação de C-FC. Os resultados obtidos pela eluição por gradiente de pH foram superiores quanto à pureza e concentração final, fator de purificação e recuperação de C-FC quando comparados aos alcançados com a eluição por combinação de degrau seguido de gradiente salino. Além disso, foi possível obter C-FC com pureza acima de 4,0 com apenas uma etapa cromatográfica quando utilizado este modo de eluição. Assim, diferentes parâmetros da CTI com eluição por gradiente de pH foram avaliados, a fim de obter C-FC com a maior pureza e recuperação possível.

Figura 3 – Cromatograma do ensaio utilizando C-FC extraída de biomassa seca e eluída com gradiente de pH.



3.2 PURIFICAÇÃO DE C-FICOCIANINA POR CROMATOLOGRAFIA DE TROCA IÔNICA COM ELUIÇÃO POR GRADIENTE DE pH

Os ensaios de purificação foram realizados variando diferentes parâmetros da CTI com eluição por gradiente de pH e os resultados estão apresentados na Tabela 3. Em todos os ensaios, com exceção do Ensaio 2, as condições das etapas de equilíbrio, alimentação e lavagem foram mantidas como as propostas no estudo de Moraes e Kalil (2009), que foi baseado nos estudos de adsorção de C-FC em Q-Sepharose Fast Flow conduzidos por Silveira et al. (2008). O Ensaio 1 é o mesmo realizado no estudo de comparação entre modos de eluição da cromatografia de troca iônica (Tabela 2).

No Ensaio 2 a resina foi equilibrada e lavada com tampão Tris-SO₄ 0,05 mol.L⁻¹ pH 7,4, o mesmo usado para extração de C-FC da biomassa úmida de *Spirulina platensis* LEB-52. Além disso, o pH do extrato não foi ajustado neste ensaio. O pH utilizado (7,4) favoreceu a adsorção da C-FC, uma vez que ocorreram perdas insignificantes durante as etapas de alimentação e lavagem (Apêndice 1, Fig. 1A). Esse comportamento corrobora com o estudo realizado por Silveira et al. (2008), em que se constatou que o pH ótimo para adsorção de C-FC na resina Q-Sepharose Fast Flow é de 7,5. No entanto, as proteínas contaminantes também foram adsorvidas mais fortemente neste valor de pH, porque o pico em 280 nm durante a etapa de lavagem, que foi característico em todos os outros ensaios, não foi observado no

Ensaio 2. Com base nas baixas recuperações alcançadas, podemos concluir que o gradiente de pH não foi suficiente para eluir eficientemente a C-FC neste ensaio, provavelmente devido ao pH de alimentação e adsorção.

Sal em baixa molaridade foi adicionado na etapa de eluição no Ensaio 3, porque, de acordo com Ahamed et al. (2007), essa adição poderia ajudar a manter a linearidade do gradiente de pH. Não foi observada diferença na linearidade do gradiente deste ensaio (Apêndice 1, Fig. 2A), mas este modo de eluição proporcionou C-FC com pureza de 4,1 com 10,0 % de recuperação. A maior recuperação (39,0 %) deste ensaio foi alcançada para C-FC com PE de 3,0, que pode ser usada como biomarcador em ensaios biomédicos.

Diferentes volumes de eluição foram testados nos Ensaios 4, 5 e 6, uma vez que a inclinação do gradiente pode ter grandes implicações na dessorção de proteínas do trocador iônico (Apêndice 1, Figs. 3A, 4A e 5A). Os Ensaios 4 e 5 apresentaram resultados promissores, com frações de PE > 4,0 com 39,7 e 32,5 % de recuperação, respectivamente, valores semelhantes aos alcançados no Ensaio 1. No entanto, a maior pureza obtida no Ensaio 6, onde 75 mL de tampão acetato foram utilizados, foi de 3,8 com 35,8 % de recuperação.

Nos Ensaios 1, 2, 5 e 6, algumas das misturas de frações da mesma faixa de pureza resultaram em PE mais baixo do que o valor esperado (Tabela 3). Uma possível explicação para isso é a diferença de pH entre as frações, que pode ocasionar na degradação de C-FC ao longo do tempo nas frações eluídas em valores de pH baixos.

Com a finalidade de melhorar a estabilidade das frações eluídas frente ao pH, tampão citrato foi utilizado na etapa de eluição dos Ensaios 7 – 11, o qual foi escolhido devido à sua faixa de pH de trabalho e por ser composto por ácido cítrico, conservante alimentar frequentemente utilizado em estudos de estabilidade térmica de C-FC (KANNAUJIYA; SINHA, 2016; MISHRA; SHRIVASTAV; MISHRA, 2008; MOGANY et al., 2018; PAN-UTAI; KAHAPANA; IAMTHAM, 2018). Além disso, de acordo com a série de Hofmeister, o citrato apresenta um efeito cosmotrópico maior do que o do acetato. Os ânions cosmotrópicos são moléculas fortemente hidratadas que possuem efeitos protetores sobre a estrutura de proteínas aniônicas, como a C-FC, estabilizando a estrutura e reduzindo a possibilidade de desnaturação (HOFMEISTER, 1888; KUNZ; HENLE; NINHAM, 2004).

Tabela 3 – Ensaio de purificação de C-ficocianina por cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH.

Ensaio	Frações	PE	Concentração (mg.mL ⁻¹)	Rec (%)	FP
2: Equilíbrio e lavagem: Tampão Tris-SO ₄ 0,05 mol.L ⁻¹ pH 7,4. pH de alimentação: 7,4. Eluição: 50 mL de tampão acetato 0,1 mol.L ⁻¹ em gradiente de pH de 5,6 – 3,4	PE ≥ 4	3,6	0,083	25,7	3,7
	3,5 ≤ PE < 4	3,5	0,058	12,7	3,7
	2,5 ≤ PE < 3,5	2,7	0,039	19,0	2,8
	1,5 ≤ PE < 2,5	1,5	0,019	4,2	1,6
3: Eluição: 50 mL de tampão acetato 0,1 mol.L ⁻¹ com 0,05 mol.L ⁻¹ de NaCl em gradiente de pH de 5,6 – 3,4*	PE ≥ 4	4,1	0,106	10,0	4,4
	3,5 ≤ PE < 4	3,8	0,090	17,8	4,0
	2,5 ≤ PE < 3,5	3,0	0,099	39,0	3,2
	1,5 ≤ PE < 2,5	1,6	0,006	2,0	1,7
4: Eluição: 25 mL de tampão acetato 0,1 mol.L ⁻¹ em gradiente de pH de 5,6 – 3,4*	PE ≥ 4	4,5	0,135	39,7	4,5
	2,5 ≤ PE < 3,5	2,7	0,074	23,1	2,8
	1,5 ≤ PE < 2,5	1,9	0,040	3,7	2,0
5: Eluição: 37,5 mL de tampão acetato 0,1 mol.L ⁻¹ em gradiente de pH de 5,6 – 3,4*	PE ≥ 4	4,2	0,118	32,5	4,3
	3,5 ≤ PE < 4	3,4	0,069	13,0	3,5
	2,5 ≤ PE < 3,5	2,7	0,032	10,9	2,8
	1,5 ≤ PE < 2,5	2,1	0,075	14,0	2,1
6: Eluição: 75 mL de tampão acetato 0,1 mol.L ⁻¹ em gradiente de pH de 5,6 – 3,4*	PE ≥ 4	3,8	0,05	35,8	3,9
	3,5 ≤ PE < 4	3,5	0,04	7,4	3,6
	2,5 ≤ PE < 3,5	2,8	0,02	19,8	2,9
	1,5 ≤ PE < 2,5	1,9	0,04	19,9	2,0

Tabela 3 – Ensaios de purificação de C-ficocianina por cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH (continuação).

Ensaio	Frações	PE	Concentração (mg.mL⁻¹)	Rec (%)	FP
7: Eluição: 50 mL de tampão citrato 0,1 mol.L ⁻¹ em gradiente de pH de 5,6 – 3,4*	2,5 ≤ PE < 3,5	2,9	0,643	68,0	3,8
8: Eluição: 50 mL de tampão citrato 0,05 mol.L ⁻¹ em gradiente de pH de 5,6 – 3,4*	3,5 ≤ PE < 4	3,6	0,238	23,7	3,8
	2,5 ≤ PE < 3,5	2,9	0,415	41,3	3,1
	1,5 ≤ PE < 2,5	1,5	0,016	3,6	1,6
9: Eluição: 50 mL de tampão citrato 0,05 mol.L ⁻¹ em gradiente de pH de 6,2 – 3,0*	3,5 ≤ PE < 4	3,7	0,723	69,3	4,0
	1,5 ≤ PE < 2,5	2,2	0,218	20,9	2,4
10: Eluição: 75 mL de tampão citrato 0,05 mol.L ⁻¹ em gradiente de pH de 6,2 – 3,0*	3,5 ≤ PE < 4	3,7	0,666	62,4	4,3
	2,5 ≤ PE < 3,5	2,5	0,256	23,9	2,9
11: Eluição: degrau com 20 mL de tampão Tris-HCl 0,025 mol.L ⁻¹ pH 6,5 com 0,08 mol.L ⁻¹ de NaCl seguido de 50 mL de tampão citrato 0,05 mol.L ⁻¹ em gradiente de pH de 6,2 – 3,0*	PE ≥ 4	4,2	0,347	32,6	4,9
	3,5 ≤ PE < 4	3,5	0,527	49,5	4,1

PE: pureza; FP: fator de purificação; C-FC: concentração de C-FC (mg.mL⁻¹); Rec: recuperação de C-FC (%).

*Equilíbrio e lavagem: Tampão Tris-HCl 0,025 mol.L⁻¹ pH 6,5. pH de alimentação: 6,5.

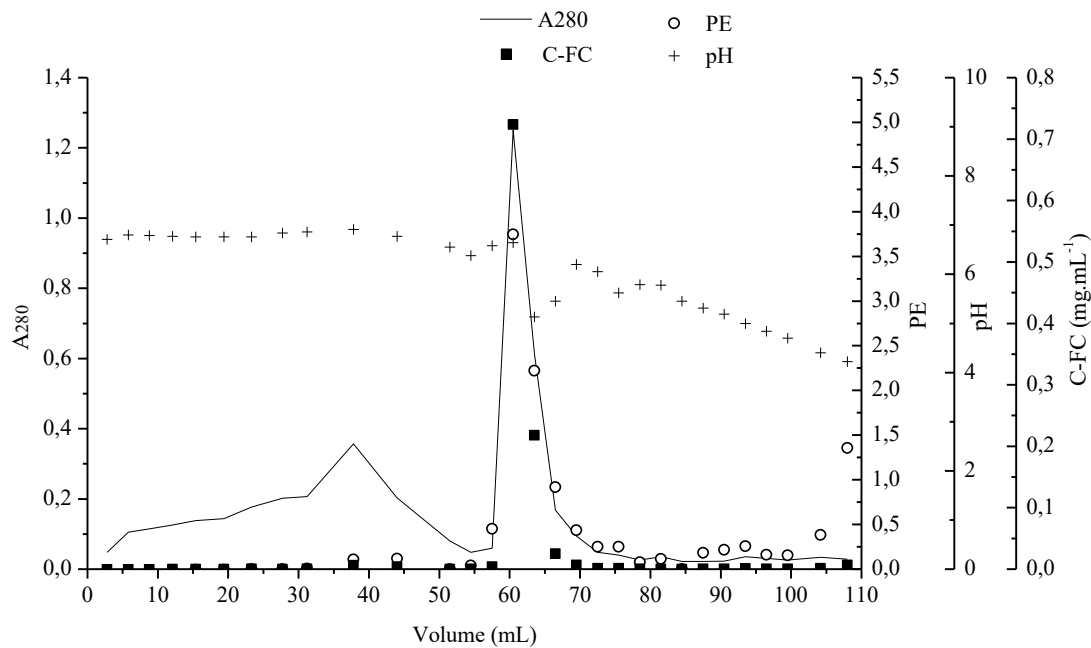
No Ensaio 7, foi utilizado tampão citrato na mesma molaridade e faixa de pH utilizados nos ensaios com tampão acetato (0,1 mol.L⁻¹ e gradiente de pH 5,6 – 3,4). Isso resultou em C-FC com pureza de 2,9 com 68,0 % recuperação (Apêndice 1, Fig. 6A), mostrando que o uso de tampão acetato nesta concentração e faixa de pH proporcionou melhores resultados. No entanto, é possível observar que praticamente toda C-FC eluiu nas duas primeiras frações da etapa de eluição no Ensaio 7, e não em várias frações de diferentes valores de pH ao longo desta etapa, como nos ensaios utilizando tampão acetato. Isto é vantajoso, pois a mistura das frações eluídas em diferentes valores de pH com o tampão acetato apresentou problemas nos valores de pureza, devido à baixa estabilidade das frações em pH baixo.

Assim, no Ensaio 8, a molaridade do tampão citrato foi reduzida para 0,05 mol.L⁻¹ e a faixa de pH foi mantida, a fim de minimizar a influência da molaridade do tampão na eluição. A mudança de molaridade foi benéfica para o sistema, resultando em C-FC com purezas de 3,6 e 2,9, com recuperações de 23,7 e 41,3 %, respectivamente (Apêndice 1, Fig. 7A).

No Ensaio 9, a faixa do gradiente de pH foi aumentada para 6,2 – 3,0 para tentar atingir a pureza máxima de C-FC. Embora não tenha sido possível alcançar PE de 4,0, este modo de eluição foi eficiente em concentrar a C-PC em 9,5 vezes, o que resultou em alta recuperação de 69,3 % e PE de 3,7. O cromatograma deste ensaio é apresentado na Figura 4. Este resultado é interessante, porque uma etapa de ultrafiltração pode ser aplicada na fração purificada, alcançando facilmente PE de 4,0. No entanto, também é possível testar outras estratégias, como variação do volume de eluição e aplicação de um degrau com baixa força iônica, para separar a C-FC de outras proteínas contaminantes, uma vez que o pico mais alto de concentração e pureza de C-FC ocorre na mesma fração que o pico em 280 nm.

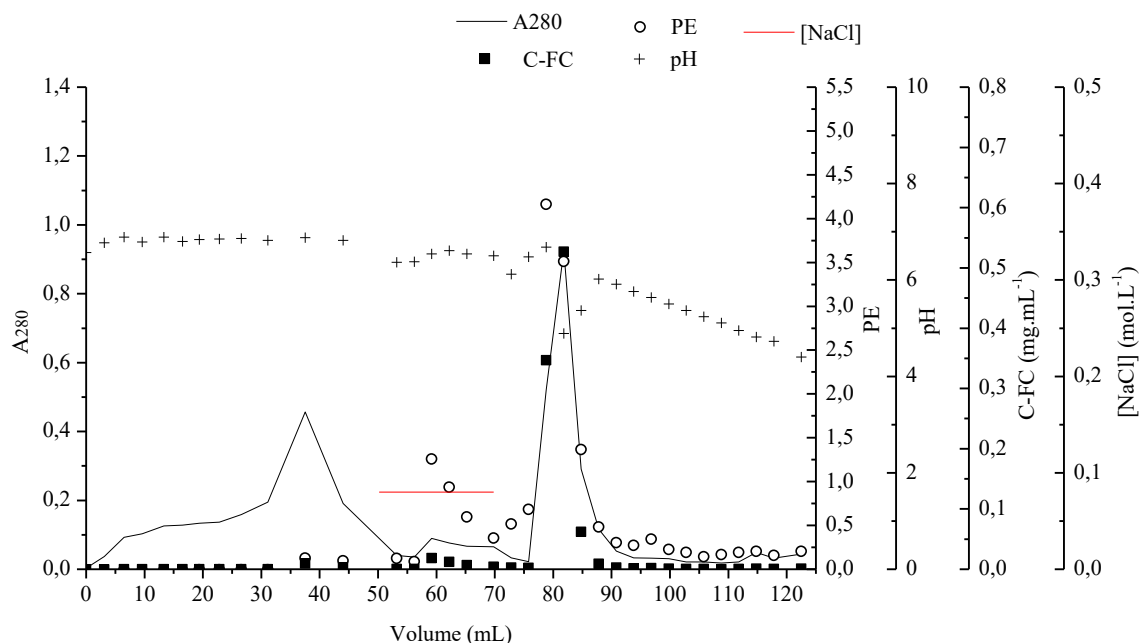
Os Ensaios 10 e 11 foram desenvolvidos com o intuito de alcançar a pureza de 4,0, através da separação do pico de concentração da C-FC do pico de proteínas contaminantes (Figura 4). Primeiramente, o volume de eluição foi aumentado para 75 mL (Ensaio 10), pois a utilização de um gradiente menos íngreme pode melhorar a separação das proteínas (SILVEIRA et al., 2008). No entanto, a pureza e a recuperação de C-FC atingidas foram quase as mesmas que as obtidas no Ensaio 9 (Tabela 3) com um perfil cromatográfico bastante semelhante (Apêndice 1, Fig. 8A).

Figura 4 – Cromatograma do Ensaio 9: Eluição com tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ em gradiente de pH de 6,2 – 3,0.



A alteração na molaridade do tampão entre as etapas de lavagem (tampão Tris-HCl 0,025 mol.L⁻¹) e eluição (tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹) nos Ensaio 8 – 10 possivelmente levou à eluição de proteínas contaminantes juntamente com a C-FC. Portanto, a eluição do Ensaio 11 foi realizada combinando degrau com 0,08 mol.L⁻¹ de NaCl diluído em tampão Tris-HCl 0,025 mol.L⁻¹ pH 6,5 e gradiente de pH com tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ pH 6,2 – 3,0. A Figura 5 apresenta o cromatograma do Ensaio 11. O degrau com NaCl foi eficiente na eluição de proteínas contaminantes e o gradiente de pH forneceu duas frações de C-FC altamente purificada com purezas de 4,2 e 3,5 e recuperações de 32,6 e 49,5 %, respectivamente. Este ensaio apresentou o maior fator de purificação entre os ensaios de purificação, de 4,9, bem como uma alta recuperação global, de 82,1 %. Os Ensaio 6, 9 e 10 apresentaram recuperações globais de 82,9, 90,2 e 86,3%, respectivamente, no entanto, nenhum deles obteve PE de 4,0. Além disso, os Ensaio 1, 4 e 5, que também resultaram em purezas acima de 4,0 com recuperações semelhantes aos do Ensaio 11, não forneceram misturas de C-FC com PE acima de 3,5. Esta é uma observação importante porque, como mencionado anteriormente, um processo de ultrafiltração pode ser aplicado à fração com PE de 3,5, a fim de aumentar sua pureza. Por estas razões, as condições cromatográficas do Ensaio 11 foram as melhores para a purificação de C-FC por CTI com eluição por gradiente de pH.

Figura 5 – Cromatograma do Ensaio 11: Eluição com degrau de NaCl 0,08 mol.L⁻¹ seguido de gradiente de pH com tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ pH 6,2 – 3,0.



Nos Ensaios 1, 2 e 4, onde foi utilizado 0,1 mol.L⁻¹ de tampão acetato em gradiente de pH de 5,6 – 3,4, as frações com maior pureza e concentração de C-FC foram eluídas em valores de pH entre 4,8 – 4,3. No Ensaio 3, onde foi utilizado tampão acetato adicionado de 0,05 mol.L⁻¹ de NaCl, eluiu-se uma fração com elevada concentração de C-FC em pH 4,5 e as frações com maior pureza foram eluídas em valores de pH entre 5,1 – 4,9. Portanto, a adição de sal antecipou a eluição de C-FC da resina, uma vez que esta eluiu em valores de pH mais altos. O mesmo comportamento foi observado no Ensaio 5, onde foram utilizados 37,5 mL de tampão acetato: as frações de maior pureza foram obtidas na faixa de pH de 5,2 – 4,7. No Ensaio 6, onde foram utilizados 75 mL de tampão acetato, houve eluição de C-FC em praticamente toda faixa de pH de trabalho (5,1 – 3,9), no entanto, as frações com maior pureza e concentração foram eluídas em valores de pH entre 5,0 – 4,3. O efeito no pH de eluição mencionado anteriormente foi observado em todos os ensaios utilizando o tampão acetato, mas não foi observado naqueles em que o tampão citrato foi aplicado (Ensaios 7 a 11). Nestes, as frações com maior pureza foram obtidas em valores de pHs mais altos, de 6,5 (Ensaio 7), 6,6 (Ensaios 9 e 11), 6,7 (Ensaio 10) e 6,9 (Ensaio 8). Nos Ensaios 7, 9 e 10, as frações mais purificadas também foram as mais concentradas. Contudo, nos Ensaios 8 e 11, as frações com a maior concentração de C-FC foram eluídas em pH 4,6 e 4,8, respectivamente.

Poucos trabalhos são encontrados na literatura utilizando eluição por gradiente de pH (*gradient chromatofocusing*) para a purificação de C-FC, e estes utilizam uma etapa prévia

de precipitação com sulfato de amônio e diálise (KUMAR et al., 2014; YAN et al., 2011). No estudo de Yan et al. (2011) foi utilizado tampão acetato de sódio contendo $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl e gradiente de pH de 5,0 – 3,6, resultando em C-FC com pureza de 5,6 e recuperação de 67,0 %. No trabalho realizado por Kumar et al. (2014) foi utilizado tampão acetato em gradiente de pH de 5,1 – 3,7, obtendo C-FC com pureza de 4,6, e recuperação de 14,0 %. Além destes estudos, a eluição por gradiente de pH foi usada para purificar outras ficobiliproteínas após precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e diálise: Su et al. (2010) purificaram a aloficocianina, obtendo pureza final de 5,0 e recuperação de 43,0 % e Liu et al. (2005) obtiveram R-ficoeritrina com pureza de 5,6 e recuperação de 67,0 %, ambos usando tampão fosfato contendo $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl e gradiente de pH de 5,6 – 4,0. No presente trabalho, duas frações de C-FC com purezas de 4,2 e 3,5 e recuperações de 32,6 e 49,5 %, respectivamente, foram obtidas com apenas uma etapa de purificação, o que permite a redução dos custos de *downstream processing*.

Poucos estudos usaram CTI para purificação de C-FC sem etapas de purificação prévias. Santiago-Santos et al. (2004) extraíram ficocianina de *Calothrix* sp. utilizando lisozima, e aplicaram CTI com eluição por gradiente de NaCl, atingindo pureza de 2,2 com 93,0 % de recuperação e FP de 5,5 vezes. Silveira et al. (2008) também aplicaram CTI com eluição por gradiente de NaCl após extração de C-FC da biomassa seca de *S. platensis* LEB-52, resultando em PE de 1,8 com 77,3 % de recuperação e FP de 3,4 vezes. O estudo de Moraes et al. (2015) comparou a purificação da C-FC extraída da biomassa seca de *S. platensis* LEB-52 por CTI em leito fixo e em leito expandido com eluição por gradiente de NaCl. A CTI em leito expandido com o adsorvente Streamline Q XL resultou em C-FC com pureza de 1,6 com 79,0 % de recuperação e FP de 3,2 vezes, enquanto que a CTI em leito fixo com Q-Sepharose Fast Flow resultou em C-FC com pureza de 1,5 com 62,0 % de recuperação e FP de 2,8 vezes. Diferentes parâmetros de eluição durante a purificação do extrato bruto de C-FC por CTI de leito expandido foram avaliados por Moraes et al. (2011), resultando em pureza de 2,9 (FP de 4,6 vezes) e 60,0 % de recuperação. Bermejo e Ramos (2012) também estudaram a CTI de leito expandido na purificação do extrato bruto de C-ficocianina de *Spirulina platensis*, obtendo pureza de 0,9 (FP de 4,6 vezes) e recuperação de 79,0 %. Pureza de 3,7 (FP de 3,7 vezes) e recuperação de 40,0 % foi alcançada por Chen et al. (2016) na purificação do extrato bruto de C-FC de *Spirulina platensis* usando CTI com resina Q Sepharose XL. Até o momento, o presente estudo é o primeiro a purificar o extrato bruto de C-FC por CTI e atingir pureza $> 4,0$.

Para verificar a repetibilidade deste processo de purificação, o Ensaio 11 foi realizado em triplicata utilizando um novo extrato de C-FC, resultando em fatores de

purificação de $4,5 \pm 0,2$ e $4,0 \pm 0,4$, para as frações de $PE \geq 4,0$ e $3,5 \leq PE < 4,0$, com recuperações de $32,5 \pm 18,3$ e $52,7 \pm 12,1$ %, respectivamente. Estes resultados foram muito próximos aos da Tabela 3, e indicam que esta condição pode ser aplicada na purificação e recuperação em uma etapa de C-FC extraída da biomassa úmida de *S. platensis* LEB-52.

Os processos de purificação de C-FC descritos na literatura geralmente combinam mais de uma técnica de purificação para atingir a pureza máxima de 4,0 (ABALDE et al., 1998; KUMAR et al., 2014; MORAES; KALIL, 2009; PATEL et al., 2005; SONANI et al., 2017; YAN et al., 2011). Neste trabalho foi descrito pela primeira vez um processo de purificação de uma única etapa para separar C-FC com pureza $> 4,0$ envolvendo cromatografia, eliminando a necessidade de outras técnicas de purificação.

4 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi descrita a purificação em uma etapa de C-ficocianina utilizando cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH, resultando em dois produtos com purezas de 4,2 e 3,5 e recuperações de 32,6 e 49,5 %, respectivamente. A seguinte condição cromatográfica foi a melhor para purificação de C-FC utilizando a resina aniônica Q-Sepharose Fast Flow: equilíbrio e lavagem com tampão Tris-HCl $0,025 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,5, alimentação de C-FC extraída da biomassa úmida em pH 6,5, eluição combinando degrau com $0,08 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaCl em Tris-HCl $0,025 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,5 e gradiente de pH com tampão citrato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,2 – 3,0. Este processo permite a recuperação de C-FC com pureza máxima, em apenas uma etapa de purificação.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALDE, J.; BETANCOURT, L.; TORRES, E.; CID, A.; BARWELL, C. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. **Plant Science**, v. 136, n. 1, p. 109–120, 1998.

AHAMED, T.; NFOR, B. K.; VERHAERT, P. D. E. M.; VAN DEDEM, G. W. K.; VAN DER WIELEN, L. A. M.; EPPINK, M. H. M.; VAN DE SANDT, E. J. A. X.; OTTENS, M. pH-gradient ion-exchange chromatography: An analytical tool for design and optimization of protein separations. **Journal of Chromatography A**, v. 1164, n. 1–2, p. 181–188, 2007.

BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **The Journal of Cell Biology**, v. 58, p. 419–435, 1973.

BERMEJO, R.; RAMOS, A. Pilot scale recovery of phycocyanin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. **Chromatographia**, v. 75, n. 5–6, p. 195–204, 2012.

CHEN, C. Y.; KAO, P. C.; TAN, C. H.; SHOW, P. L.; CHEAH, W. Y.; LEE, W. L.; LING, T. C.; CHANG, J. S. Using an innovative pH-stat CO₂ feeding strategy to enhance cell growth and C-phycocyanin production from *Spirulina platensis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 112, p. 78–85, 2016.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603–607, 2002.

DELHI NUTRACEUTICALS. 2018. Disponível em:
<http://www.delhinutraceuticals.com/phycocyanin.html>. Acesso em: 5 de mar. 2019, 14:18:00.

DENIZ, I.; OZEN, M. O.; YESIL-CELIK TAS, O. Supercritical fluid extraction of phycocyanin and investigation of cytotoxicity on human lung cancer cells. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 108, p. 13–18, 2016.

ERIKSEN, N. T. Production of phycocyanin - A pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 1, p. 1–14, 2008.

HAZRA, P.; KESH, G. S. Isolation and purification of phycocyanin from cyanobacteria of a mangrove forest. **Applied Biological Chemistry**, v. 60, n. 6, p. 631–636, 2017.

HOFMEISTER, F. Zur Lehre von der Wirkung der Salze - Zweite Mittheilung. **Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 24, n. 4–5, p. 247–260, 1888.

KALIL, S. J.; MAUGERI-FILHO, F.; RODRIGUES, M. I. Ion exchange expanded bed chromatography for the purification of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 581–586, 2005.

KANNAUJIYA, V. K.; SINHA, R. P. Thermokinetic stability of phycocyanin and phycoerythrin in food-grade preservatives. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 2, p. 1063–1070, 2016.

KARLSSON, E.; HIRSH, I. Ion Exchange Chromatography. In: JANSON, J. C. (Ed.). **Protein Purification: principles, high resolution methods, and applications**. 3. ed. [S.I.]: Wiley, 2011. Cap. 4.

KUDDUS, M.; SINGH, P.; THOMAS, G.; AL-HAZIMI, A. Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycocyanin. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

KUMAR, D.; DHAR, D. W.; PABBI, S.; KUMAR, N.; WALIA, S. Extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (CCC540). **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 2, p. 184–188, 2014.

- KUNZ, W.; HENLE, J.; NINHAM, B. W. “Zur Lehre von der Wirkung der Salze” (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister’s historical papers. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, n. 1–2, p. 19–37, 2004.
- LIAO, G.; GAO, B.; GAO, Y.; YANG, X.; CHENG, X.; OU, Y. Phycocyanin inhibits tumorigenic potential of pancreatic cancer cells: role of apoptosis and autophagy. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2016.
- LIU, L. N.; CHEN, X. L.; ZHANG, X. Y.; ZHANG, Y. Z.; ZHOU, B. C. One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*. **Journal of Biotechnology**, v. 116, n. 1, p. 91–100, 2005.
- LIU, Y.; XU, L.; CHENG, N.; LIN, L.; ZHANG, C. Inhibitory effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on the growth of human leukemia K562 cells. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 2, p. 125–130, 2000.
- MACCOLL, R. Cyanobacterial phycobilisomes. **Journal of Structural Biology**, v. 124, n. 2, p. 311–334, 1998.
- MINKOVA, K. M.; TCHERNOV, A. A.; TCHORBADJIEVA, M. I.; FOURNADJIEVA, S. T.; ANTOVA, R. E.; BUSHEVA, M. C. Purification of C-phycoerythrin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. **Journal of Biotechnology**, v. 102, n. 1, p. 55–59, 2003.
- MISHRA, S. K.; SHRIVASTAV, A.; PANCHA, I.; JAIN, D.; MISHRA, S. Effect of preservatives for food grade C-phycoerythrin, isolated from marine cyanobacteria *Pseudanabaena* sp. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, n. 5, p. 597–602, 2010.
- MISHRA, S. K.; SHRIVASTAV, A.; MISHRA, S. Effect of preservatives for food grade C-PC from *Spirulina platensis*. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 339–345, 2008.
- MOGANY, T.; KUMARI, S.; SWALAHA, F. M.; BUX, F. Extraction and characterisation of analytical grade C-phycoerythrin from *Euhalothece* sp. **Journal of Applied Phycology**, 2018.
- MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Strategy for a protein purification design using C-phycoerythrin extract. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5312–5317, 2009.
- MORAES, C. C.; ORES, J. C.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Recovery of C-phycoerythrin in the presence of cells using expanded bed IEC. **Chromatographia**, v. 74, n. 3–4, p. 307–312, 2011.
- MORAES, C. C.; SALA, L.; ORES, J. C.; BRAGA, A. R. C.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Expanded and fixed bed ion exchange chromatography for the recovery of C-phycoerythrin in a single step by using lysed cells. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 93, n. 1, p. 111–115, 2015.
- NAGARAJ, S.; ARULMURUGAN, P.; RAJARAM, M. G.; KARUPPASAMY, K.; JAYAPPRIYAN, K. R.; SUNDARARAJ, R.; VIJAYANAND, N.; RENGASAMY, R. Hepatoprotective and antioxidative effects of C-phycoerythrin from *Arthrospira maxima* SAG 25780 in CCl₄-induced hepatic damage rats. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 81–85, 2012.

OU, Y.; LIN, L.; YANG, X.; PAN, Q.; CHENG, X. Antidiabetic potential of phycocyanin: effects on KKAY mice. **Pharmaceutical biology**, v. 51, n. 5, p. 539–44, 2013.

PAN-UTAI, W.; KAHAPANA, W.; IAMTHAM, S. Extraction of C-phycocyanin from *Arthrospira (Spirulina)* and its thermal stability with citric acid. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 1, p. 231–242, 2018.

PATEL, A.; MISHRA, S.; PAWAR, R.; GHOSH, P. K. Purification and characterization of C-phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. **Protein Expression and Purification**, v. 40, n. 2, p. 248–255, 2005.

PATIL, G.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycocyanin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 2, p. 156–164, 2007.

PENTÓN-ROL, G.; MARÍN-PRIDA, J.; PARDO-ANDREU, G.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; ACOSTA-MEDINA, E. F.; VALDIVIA-ACOSTA, A.; LAGUMERSINDEZ-DENIS, N.; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ, E.; LLÓPIZ-ARZUAGA, A.; LÓPEZ-SAURA, P. A.; GUILLÉN-NIETO, G.; PENTÓN-ARIAS, E. C-phycocyanin is neuroprotective against global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils. **Brain Research Bulletin**, v. 86, n. 1–2, p. 42–52, 2011.

PEPAJ, M.; WILSON, S. R.; NOVOTNA, K.; LUNDANES, E.; GREIBROKK, T. Two-dimensional capillary liquid chromatography: pH gradient ion exchange and reversed phase chromatography for rapid separation of proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 1120, n. 1–2, p. 132–141, 2006.

REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Repeated batch cultivation of the microalga *Spirulina platensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 937–943, 2006.

RITO-PALOMARES, M.; NUÑEZ, L.; AMADOR, D. Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for C-phycocyanin recovery from *Spirulina maxima*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 76, n. 12, p. 1273–1280, 2001.

ROMAY, C.; ARMESTO, J.; REMIREZ, D.; GONZÁLEZ, R.; LEDON, N.; GARCÍA, I. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae. **Inflammation Research**, v. 47, n. 1, p. 36–41, 1998.

ROMAY, C.; LEDÓN, N.; GONZÁLEZ, R. Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation. **Inflammation Research**, v. 47, n. 8, p. 334–338, 1998.

SALA, L.; ORES, J. C.; MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Simultaneous production of phycobiliproteins and carbonic anhydrase by *Spirulina platensis* LEB-52. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 96, n. 9, p. 1896–1902, 2018.

SALA, L.; MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Cell pretreatment with ethylenediaminetetraacetic acid for selective extraction of C-phycocyanin with food grade purity. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 5, p. 1261–1268, 2018.

SANTIAGO-SANTOS, M. C.; PONCE-NOYOLA, T.; OLVERA-RAMÍREZ, R.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O. Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2047–2052, 2004.

SCOPES, R. K. **Protein purification: principles and practice**. 3. ed. New York, NY: Springer Science, 2010.

SEO, Y. C.; CHOI, W. S.; PARK, J. H.; PARK, J. O.; JUNG, K. H.; LEE, H. Y. Stable isolation of phycocyanin from *Spirulina platensis* associated with high-pressure extraction process. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 1, p. 1778–1787, 2013.

SILVA, E. F.; FIGUEIRA, F. S.; CAÑEDO, A. D.; MACHADO, K. S.; SALGADO, M. T. S. F.; SILVA, T. K.; WAGNER, E. F.; MATTOZO, F. H.; LIMA, A.; SALES-NETO, J. M.; FERREIRA, V. U.; COMITRE, A. A.; MASCARENHAS, S. R.; KALIL, S. J.; VOTTO, A. P. S. C-phycocyanin to overcome the multidrug resistance phenotype in human erythroleukemias with or without interaction with ABC transporters. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, p. 532–542, 2018.

SILVEIRA, S. T.; BURKERT, J. F. M.; COSTA, J. A. V.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, p. 1629–1634, 2007.

SILVEIRA, S. T.; QUINES, L. K. M.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Separation of phycocyanin from *Spirulina platensis* using ion exchange chromatography. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n. 5, p. 477–482, 2008.

SOLEY BIOTECHNOLOGY INSTITUTE. 2018. Disponível em: <http://www.soleybio.com/products/61-c-phycocyanin.html>. Acesso em: 5 de mar. 2018, 21:19:00.

SONANI, R. R.; PATEL, S.; BHASTANA, B.; JAKHARIA, K.; CHAUBEY, M. G.; SINGH, N. K.; MADAMWAR, D. Purification and antioxidant activity of phycocyanin from *Synechococcus* sp. R42DM isolated from industrially polluted site. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 325–331, 2017.

SONG, W.; ZHAO, C.; WANG, S. A large-scale preparation method of high purity C-phycocyanin. **International journal of bioscience, biochemistry and bioinformatics**, v. 3, n. 4, p. 293–297, 2013.

SONI, B.; KALAVADIA, B.; TRIVEDI, U.; MADAMWAR, D. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata* - Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 2017–2023, 2006.

SU, H. N.; XIE, B. BIN; CHEN, X. L.; WANG, J. X.; ZHANG, X. Y.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Efficient separation and purification of allophycocyanin from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 1, p. 65–70, 2010.

SUN, L.; WANG, S. Allophycocyanin complexes from the phycobilisome of a thermophilic blue-green alga *Myxosarcina concinna* Printz. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 72, n. 1–3, p. 45–53, 2003.

YAN, S. G.; ZHU, L. P.; SU, H. N.; ZHANG, X. Y.; CHEN, X. L.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Single-step chromatography for simultaneous purification of C-phycoyanin and allophycoyanin with high purity and recovery from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 1, p. 1–6, 2011.

ZARROUK, C. **Contribution a l'étude d'une cianophycee: Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima***. 1966. 83 f. Ph.D. thesis - Faculte des Sciences, Universite de Paris, 1966.

ZHANG, Y. M.; CHEN, F. A simple method for efficient separation and purification of C-phycoyanin and allophycoyanin from *Spirulina platensis*. **Biotechnology Techniques**, v. 13, n. 9, p. 601–603, 1999.

ZHAO, L.; PENG, Y. LIANG; GAO, J. MEI; CAI, W. MIN. Bioprocess intensification: an aqueous two-phase process for the purification of C-phycoyanin from dry *Spirulina platensis*. **European Food Research and Technology**, v. 238, n. 3, p. 451–457, 2014.

ARTIGO 2

**PURIFICAÇÃO DE C-FICOCIANINA EXTRAÍDA DA BIOMASSA ÚMIDA DE
Spirulina (Arthrospira) platensis LEB-52 POR DIFERENTES *DESIGNS***

RESUMO

A C-ficocianina (C-FC) é uma ficobiliproteína que possui elevado valor de mercado dependendo de seu grau de pureza, uma vez que este implica em suas possíveis aplicações. Assim, ao desenvolver um processo de purificação desta proteína, deve-se avaliar a importância de cada etapa de acordo com a pureza final desejada. O objetivo deste trabalho foi purificar a C-FC obtida a partir da biomassa úmida de *Spirulina platensis* LEB-52 por diferentes *designs* envolvendo as técnicas de precipitação fracionada, diafiltração/ultrafiltração e cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH. Primeiramente, três membranas de ultrafiltração de polietersulfona de diferentes massas molares de corte (30, 50 e 100 kDa) foram avaliadas na purificação da C-FC extraída a partir da biomassa úmida. As membranas de 30 e 50 kDa apresentaram resultados de purificação estatisticamente iguais ($p > 0,05$), e a membrana de 50 kDa foi selecionada para ser utilizada nos *designs* de purificação. Quatro sequências de purificação foram aplicadas, as quais resultaram em extratos de C-FC de diferentes graus de pureza. Devido ao seu elevado custo, geralmente deseja-se atingir a maior pureza e recuperação de C-FC possível, portanto, o *design* que consistiu na aplicação de ultrafiltração seguida de cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH foi considerado o mais vantajoso, pois resultou em C-FC com pureza de 3,9, representando um fator de purificação de 4,9 vezes, e recuperação de 79,7 %. Além disso, foi avaliada a capacidade antioxidante do extrato bruto e purificado de C-FC. Os resultados mostraram que o extrato de maior pureza (de 3,9) apresentou maior capacidade de sequestro dos radicais ABTS^{•+} ($161,66 \mu\text{mol}_{\text{TE}} \cdot \text{g}^{-1}$) e peroxila ($1211,41 \mu\text{mol}_{\text{TE}} \cdot \text{g}^{-1}$) quando comparado à C-FC bruta, o que evidencia a relação do grau de pureza desta ficobiliproteína com a atividade antioxidante. Este trabalho demonstra as vantagens da aplicação de um *design* de purificação de C-FC, uma vez que resulta em produto de elevado fator de purificação e recuperação, em poucas etapas, além de elevada atividade antioxidante, características importantes devido ao valor agregado e importância biotecnológica deste biocomposto.

Palavras-chave: Precipitação. Ultrafiltração. Cromatografia de troca iônica. Atividade antioxidante. ORAC.

1 INTRODUÇÃO

O termo *downstream process* pode ser definido como a série de passos que levam à obtenção de um produto proteico purificado. Portanto, o primeiro fator a ser considerado é o objetivo do *design* (sequência de purificação), o qual é influenciado por critérios como a pureza final do produto, custo e rapidez de entrada do produto no mercado (WHEELWRIGHT, 1989). Assim, considera-se a importância de cada etapa do processo de acordo com o objetivo que se quer atingir, uma vez que o *downstream process* engloba desde a extração celular até o produto final purificado (JUNGBAUER, 2013).

A C-ficocianina (C-FC) é uma ficobiliproteína de cor azul, que apresenta aplicações diversas, de acordo com a sua pureza. Segundo Rito-Palomares; Nuñez e Amador (2001), grau de pureza maior ou igual a 0,7 indica C-FC de grau alimentar, enquanto que pureza igual ou maior que 4,0 é considerada de grau analítico. No entanto, algumas empresas têm comercializado esta proteína de acordo com faixas de pureza mais específicas recomendadas para diferentes aplicações. Por exemplo, a empresa Delhi Nutraceuticals (2019) comercializa a C-FC de pureza entre 0,50 e 1,50 indicada como corante na indústria alimentícia; de pureza entre 1,50 e 2,50 para ser utilizada como corante em cosméticos; de pureza entre 2,50 e 3,50 para ser utilizada como corante e biomarcador e de pureza superior a 4,0 para ser utilizada em tratamentos médicos e como biomarcador em diagnósticos. Assim, o valor de mercado desta proteína também aumenta consideravelmente com seu grau de pureza, onde uma grama de C-FC de pureza acima de 4,0 pode atingir cerca de US\$ 4.660,00 (SOLEY INSTITUTE, 2019).

Desta forma, levando em consideração o seu elevado custo e número de aplicações possíveis, é interessante o desenvolvimento de sequências de purificação que visam a obtenção deste produto proteico com diferentes graus de pureza e o menor número de etapas possível. A etapa de extração é importante na obtenção de C-FC de elevada pureza, portanto, é necessário utilizar métodos de extração mais seletivos e que resultem em alto rendimento (SALA; MORAES; KALIL, 2018). Além disso, técnicas de baixa resolução e baixo custo, mas que resultam em recuperações elevadas, como a precipitação e a ultrafiltração, podem ser utilizadas quando não é necessário atingir grau de pureza elevado (BRANDELLI; SALA; KALIL, 2015).

A técnica de cromatografia de troca iônica (CTI) é uma das mais utilizadas para a separação de proteínas, pois é uma técnica simples, de alta resolução e versátil, e que oferece grande incremento no fator de purificação (MORAES; KALIL, 2014). A cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH apresenta resultados de fator de purificação e recuperação interessantes quando aplicada na purificação de ficobiliproteínas, porém é pouco

utilizada na literatura (KUMAR et al., 2014; LIU et al., 2005; SU et al., 2010; YAN et al., 2011).

O apelo ao consumo de compostos naturais como suplementos alimentares induz a pesquisa por este tipo de alimento e suas propriedades bioativas. A atividade antioxidante da C-FC tem sido reportada por diversos autores (BENEDETTI et al., 2010; BERMEJO; PIÑERO; VILLAR, 2008; BHAT; MADYASTHA, 2001; ROMAY et al., 1998), além das suas propriedades anti-inflamatórias (ROMAY; LEDÓN; GONZÁLEZ, 1998), anticancerígenas e antitumorais (DENIZ; OZEN; YESIL-CELIKTAS, 2016; LIAO et al., 2016; LIU et al., 2000; SILVA et al., 2018), entre outras. No entanto, são poucos os trabalhos comparando a atividade antioxidante do extrato bruto e purificado de C-FC.

O objetivo deste trabalho foi purificar a C-FC extraída seletivamente a partir da biomassa úmida da cianobactéria *Spirulina platensis* LEB-52 por três técnicas compondo diferentes *designs* de purificação, além da avaliação da capacidade antioxidante da C-FC antes e após o processo de purificação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CULTIVO DA CIANOBACTÉRIA *Spirulina platensis* LEB-52 E EXTRAÇÃO DE C-FICOCIANINA A PARTIR DE BIOMASSA ÚMIDA (EXTRAÇÃO SELETIVA)

A cianobactéria *Spirulina (Arthrospira) platensis* LEB-52, gentilmente cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), foi utilizada para obtenção de C-ficocianina a partir da biomassa úmida. Para o preparo do inóculo, cultivo e manutenção da microalga foi utilizado o meio Zarrouk (REINEHR; COSTA, 2006; ZARROUK, 1966). A cianobactéria foi cultivada em modo descontínuo em Erlenmeyer de 2 L (volume útil de 1,8 L), sendo adicionado 20 % (v/v) de inóculo com concentração inicial de 0,75 g.L⁻¹. A agitação foi realizada por injeção constante de ar estéril (0,5 vvm) a 25 °C. A iluminância foi promovida por lâmpadas fluorescentes do tipo *daylight* (40,5 µE.m⁻².s⁻¹) com fotoperíodo fixado em 12 h claro e 12 h escuro (SALA et al., 2018).

A C-FC foi extraída seletivamente de acordo com o estudo de Sala, Moraes e Kalil (2018), onde verificou-se que a máxima produção intracelular de C-ficocianina por *S. platensis* LEB-52 utilizando o meio Zarrouk ocorre em 21 d de cultivo, permanecendo constante até 74 d, sem incremento significativo ($p > 0,05$) na concentração intracelular de C-FC. Assim, a

biomassa foi recuperada entre 21 e 74 d de cultivo através de filtração em membrana de acetato de celulose (0,45 μm). A biomassa foi pré-tratada com EDTA (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) diluído em tampão Tris- SO_4 0,05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,4, na concentração de 1,5 $\text{mg}_{\text{biomassa}}\cdot\text{mL}^{-1}$. A suspensão foi agitada durante 30 s em vórtex e mantida durante 1 min a 25 °C. Após, a biomassa pré-tratada foi recuperada por filtração em membrana de 0,45 μm e a C-FC foi extraída seletivamente ressuspendendo a biomassa em tampão Tris- SO_4 0,05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,4, na concentração de 0,5 $\text{mg}_{\text{biomassa}}\cdot\text{mL}^{-1}$, e incubando a 25 °C durante 24 h. Ao final deste período, o extrato foi centrifugado (12.000 \times g, 10 °C, 20 min) e filtrado em membrana de 0,45 μm para obtenção do extrato bruto.

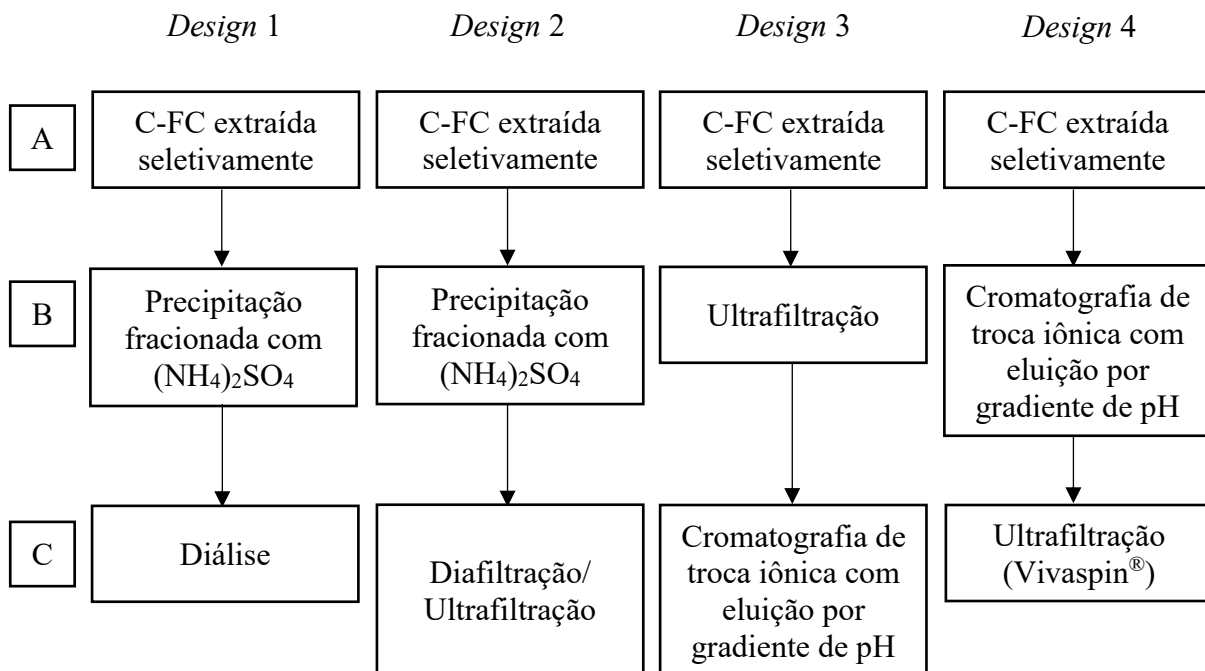
2.2 SELEÇÃO DA MEMBRANA DE ULTRAFILTRAÇÃO

A ultrafiltração (UF) foi realizada segundo Figueira (2014), utilizando célula laboratorial do tipo convencional, de volume útil de 160 mL, agitada por barra magnética suspensa para simulação do escoamento em fluxo tangencial. A fim de selecionar a massa molar de corte da membrana de ultrafiltração para purificação da C-FC extraída a partir da biomassa úmida, três membranas de polietersulfona (PES) foram testadas, com massas molares de corte de 30, 50 e 100 kDa. O processo foi realizado a 25 °C e sob pressão provida por nitrogênio de 1,0 $\text{kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$ (manométrica). O ponto final da ultrafiltração foi definido como a redução em cinco vezes do volume alimentado de extrato de C-FC. Previamente à ultrafiltração, as membranas foram compactadas com água até fluxo constante, utilizando os mesmos parâmetros de operação. Concentração, pureza, fator de purificação e recuperação de C-FC foram avaliados antes e depois do processo. Os ensaios foram realizados em triplicata e a membrana de ultrafiltração que apresentou a maior eficiência para purificar e recuperar C-FC foi utilizada nas sequências de purificação.

2.3 DESIGNS DE PURIFICAÇÃO DE C-FICOCIANINA

Três técnicas de purificação foram utilizadas para compor os *designs* de purificação da C-FC extraída seletivamente a partir da biomassa úmida de *Spirulina platensis* LEB-52: diafiltração/ultrafiltração, precipitação fracionada com sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH. A partir destas técnicas, foram desenvolvidas quatro sequências de purificação, de acordo com a Figura 1.

Figura 1 – Sequências de purificação (*designs*) para purificação de C-FC extraída seletivamente.



2.3.1 Purificação de C-FC extraída seletivamente por precipitação fracionada com sulfato de amônio

A precipitação fracionada com sulfato de amônio foi realizada segundo Silva et al. (2009), com modificação no tempo de precipitação segundo Figueira (2014). No primeiro fracionamento, sulfato de amônio sólido foi adicionado ao extrato de C-FC na concentração de saturação equivalente a 20 %, de acordo com Scopes (2010), sob agitação constante durante 30 min, seguida de repouso sob refrigeração por 2 h. Após este período, a amostra foi centrifugada ($12.000 \times g$, $10 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 min) e o precipitado descartado. No segundo fracionamento, sulfato de amônio sólido foi adicionado ao sobrenadante da etapa anterior até atingir saturação equivalente a 50 % (SCOPEs, 2010) da mesma forma que a saturação anterior. A solução foi mantida pelo mesmo tempo que o primeiro fracionamento e então centrifugada. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em tampão fosfato de sódio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,0 em uma relação volume de ressuspensão/volume inicial de 0,52. Após a precipitação, as amostras foram dialisadas utilizando tampão fosfato de sódio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,0 para retirada do sal. Concentração, pureza, fator de purificação e recuperação de C-FC foram avaliados no início e ao final dos processos de precipitação e diálise.

2.3.2 Purificação de C-FC extraída seletivamente por diafiltração/ultrafiltração

A diafiltração/ultrafiltração (DF/UF) foi realizada adicionando o extrato em célula laboratorial do tipo convencional, de volume útil de 160 mL, agitada por barra magnética suspensa, membrana de polietersulfona de 50 kDa, a 25 °C e sob pressão provida por nitrogênio de 1,0 kgf.cm⁻² (manométrica) (FIGUEIRA, 2014). Previamente à diafiltração/ultrafiltração, as membranas foram compactadas com água até fluxo constante, utilizando os mesmos parâmetros de operação. Seis ciclos de diafiltração foram utilizados previamente à concentração por ultrafiltração, os quais consistiram na recarga de 2 diavolumes de tampão Tris-SO₄ (0,05 mol.L⁻¹ pH 7,4). O número de ciclos de diafiltração necessários para a remoção do sal foi definido utilizando reagente de Nessler. Concentração, pureza, fator de purificação e recuperação de C-FC foram avaliados no início e ao final do processo, nas frações permeada e retida.

2.3.3 Purificação de C-FC extraída seletivamente por cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH

O extrato de C-FC foi alimentado em pH 6,5 na velocidade de 40 cm.h⁻¹ em coluna de leito fixo C10/20 (dimensões 20 x 1 cm) contendo 10 cm (volume total de 8 mL) de resina trocadora aniônica forte Q-Sepharose Fast Flow, ambas adquiridas da GE Healthcare (Suíça), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 0,025 mol.L⁻¹ pH 6,5. As proteínas não adsorvidas foram removidas por lavagem com o mesmo tampão de equilíbrio. A eluição foi realizada combinando degrau com 0,08 mol.L⁻¹ de NaCl em Tris-HCl 0,025 mol.L⁻¹ pH 6,5 e gradiente de pH com tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ pH 6,2 – 3,0. Frações de 3 mL foram coletadas para monitoramento à 280 nm e analisadas quanto ao pH e concentração, pureza, recuperação e fator de purificação de C-FC.

2.3.4 Purificação de C-FC extraída seletivamente por ultrafiltração utilizando tubos Vivaspin® 15 Turbo

As frações de C-FC purificadas por CTI foram adicionadas a tubos Vivaspin® 15 Turbo (Sartorius Stedim Biotech, Alemanha) e ultrafiltradas utilizando a força centrífuga. Os tubos continham membranas de polietersulfona de 50 kDa (FIGUEIRA, 2014) e foram centrifugados por 20 min, 10 °C e 3304 × g (SALA; MORAES; KALIL, 2018). Concentração,

pureza, fator de purificação e recuperação de C-FC foram avaliados no início e ao final do processo, nas frações permeadas e retidas.

2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E PURIFICADO DE C-FC

2.4.1 Preparo dos extratos antioxidantes de C-FC

O extrato bruto de C-FC de pureza 0,9 (extração seletiva) e o extrato purificado de pureza 3,9 foram congelados em ultrafreezer à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e liofilizados. Para obtenção dos extratos antioxidantes, uma massa conhecida dos extratos liofilizados foi ressuspensa em volume conhecido de metanol 50 % (v/v). As amostras foram filtradas em filtros de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ (membrana de acetato de celulose) previamente às análises.

2.4.2 Atividade antioxidante empregando o radical ABTS^{•+}

Para determinação da atividade antioxidante utilizando o método de ABTS, $30\text{ }\mu\text{L}$ dos extratos preparados com metanol 50 % (v/v) foram adicionados em 3 mL da solução de radical ABTS^{•+} e a absorvância da reação foi lida em espectrofotômetro à 734 nm após 6 min . O radical ABTS^{•+} foi preparado a partir da reação entre 5 mL de solução estoque de ABTS (7 mmol.L^{-1}) e $88\text{ }\mu\text{L}$ de persulfato de potássio (140 mmol.L^{-1}), ambos preparados em água, sendo a mistura mantida ao abrigo da luz e em temperatura ambiente por 16 h . Esta solução foi diluída com etanol até absorvância de $0,7 \pm 0,05$, à 734 nm (RE et al., 1999). A quantificação da atividade antioxidante total foi realizada a partir de curva padrão de Trolox em etanol, nas mesmas condições reacionais. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol.g}_{\text{amostra}}^{-1}$ de equivalentes de Trolox (TE).

2.4.3 Atividade antioxidante frente ao radical peroxila

Para determinação da atividade antioxidante frente ao radical peroxila foi utilizado o método ORAC (capacidade de absorção de radicais oxigênio), baseado na formação de radicais peroxila pela degradação térmica do AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano)di-hidroclorato) à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. $150\text{ }\mu\text{L}$ de fluoresceína (61 nmol.L^{-1} , preparada em tampão fosfato 75 mmol.L^{-1} pH 7,4) foram adicionados em microplacas de 96 poços, seguidos de $25\text{ }\mu\text{L}$ do extrato preparado em metanol 50 % (v/v) (diluído 1, 50, 100 e 1000 vezes em tampão fosfato)

ou branco (tampão) ou solução padrão de Trolox ($50 \mu\text{mol.L}^{-1}$). A placa foi incubada por 10 min à 37°C , sob agitação intermitente, e após, foram adicionados $25 \mu\text{L}$ de solução de AAPH (19mmol.L^{-1} , preparado em tampão fosfato) em cada poço. As leituras da fluorescência à 538nm (excitação à 485nm) foram realizadas a cada minuto, durante 180 min (RODRIGUES et al., 2012). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol.g}_{\text{amostra}}^{-1}$ de equivalentes de Trolox (TE).

2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.5.1 Concentração, pureza, recuperação e fator de purificação de C-ficocianina

As leituras de pH foram realizadas utilizando um pHmetro digital (Hanna Instruments, EUA). As frações purificadas por CTI foram misturadas de acordo com três faixas de pureza: $3,5 \leq \text{PE} < 4,0$; $2,5 \leq \text{PE} < 3,5$; $1,5 \leq \text{PE} < 2,5$. Os valores finais de concentração, pureza, recuperação e fator de purificação de C-FC foram determinados na mistura das frações. A concentração de C-ficocianina (C-FC, mg.mL^{-1} , Equação 1) foi calculada como descrito por Bennett e Bogorad (1973) com modificação no comprimento de onda por Moraes e Kalil (2009). A pureza do extrato de C-FC (PE) foi calculada conforme a Equação 2, onde a absorvância a 620nm (A_{620}) indica a concentração de C-FC e a absorvância a 280nm (A_{280}) indica a concentração de proteínas na solução. As leituras de absorvância (A) a 620 , 652 e 280nm foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu UV-1800, Japão).

$$\text{C-FC (mg}\cdot\text{mL}^{-1}) = \frac{A_{620} - 0,474 \times A_{652}}{5,34} \quad (1)$$

$$\text{PE} = \frac{A_{620}}{A_{280}} \quad (2)$$

O fator de purificação (FP) foi calculado pela razão entre a pureza final e a pureza inicial do extrato. O fator de concentração (FC) nos ensaios de ultrafiltração foi calculado pela razão entre a concentração após o processo de purificação e a concentração inicial do extrato. A recuperação de C-FC (%) após os processos de purificação foi calculada conforme a Equação 3, onde $\text{C-FC}_{\text{final}}$ e $\text{C-FC}_{\text{inicial}}$ correspondem às concentrações de C-FC (mg.mL^{-1}) das frações ao final e no início do processo de purificação, respectivamente, e V_{final} e V_{inicial} são os volumes (mL) das frações final e inicial, respectivamente.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\sum (C-FC_{\text{final}} \times V_{\text{final}})}{C-FC_{\text{inicial}} \times V_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (3)$$

2.5.2 Concentração de biomassa

A concentração de biomassa foi determinada por leitura da densidade óptica a 670 nm (COSTA et al., 2002) e conversão para biomassa seca através de curva padrão previamente preparada. Para construção da curva padrão, as células foram coletadas por centrifugação ($4.757 \times g$, 30 min, 4 °C), lavadas e ressuspensas com água destilada para leitura da absorvância. Para determinação da biomassa seca, as células lavadas com água destilada foram secas a 105 °C até massa constante.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos ensaios de seleção da membrana de ultrafiltração foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste Tukey, a fim de verificar diferenças significativas considerando um nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$). Os resultados dos ensaios de atividade antioxidante foram submetidos ao Teste-t a fim de verificar diferenças significativas entre as duas populações considerando um nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 MASSA MOLAR DE CORTE DA MEMBRANA DE ULTRAFILTRAÇÃO

Primeiramente, foram realizados ensaios para determinar a massa molar de corte da membrana de ultrafiltração (UF) para purificação da C-FC extraída seletivamente a partir da biomassa úmida de *S. platensis* LEB-52. As membranas de polietersulfona (PES) de retenções nominais de 30 e 50 kDa apresentaram resultados de fator de purificação, recuperação e fator de concentração bastante semelhantes, sendo estatisticamente iguais entre si ($p > 0,05$), conforme a Tabela 1. A membrana de polietersulfona de 100 kDa apresentou FP estatisticamente inferior ($p < 0,05$) quando comparado ao atingido pelas outras duas membranas, resultando em somente 52,5 % de recuperação de C-FC. As membranas de 30 e 50 kDa foram capazes de concentrar a C-FC 7,7 e 7,5 vezes, respectivamente, enquanto que a membrana de 100 kDa, apresentou FC de apenas 4,9 vezes.

Tabela 1 – Seleção da massa molar de corte da membrana de ultrafiltração para purificação de C-FC extraída a partir da biomassa úmida.

Membrana	FP	Rec (%)	FC
30 kDa	1,5 ± <0,1 ^a	85,1 ± 1,0 ^a	7,7 ± 0,9 ^a
50 kDa	1,5 ± <0,1 ^a	85,8 ± 2,6 ^a	7,5 ± 0,3 ^a
100 kDa	1,1 ± <0,1 ^b	52,5 ± 4,5 ^b	4,9 ± 0,3 ^b

FP: fator de purificação; Rec: recuperação de C-FC (%); FC: fator de concentração.

Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias (Teste Tukey, $p > 0,05$) na mesma coluna.

Figueira (2014) utilizou a UF para purificar C-FC extraída a partir da biomassa seca de *S. platensis* LEB-52, utilizando membranas de retenção nominal de 50 e 100 kDa, de polietersulfona e celulose regenerada, respectivamente. Os fatores de purificação obtidos foram de 1,3 e 1,4 e recuperações de 85,0 e 90,0 %, respectivamente. Os resultados obtidos por Figueira (2014) com a membrana de 50 kDa foram bastante próximos aos obtidos com as membranas de 30 e 50 kDa no presente trabalho. No entanto, os resultados para a membrana de 100 kDa apresentaram grande diferença quando comparados aos obtidos neste estudo, principalmente com relação à recuperação de C-FC.

Adicionalmente, não foi observado *fouling* (incrustação da membrana) em nenhum dos ensaios de seleção de membrana, diferentemente do estudo de Figueira (2014), provavelmente devido à baixa concentração de fragmentos celulares no extrato de C-FC obtido pela extração seletiva. O *fouling* diminui o fluxo de permeado na UF, porém, dependendo da massa molar do bioproduto, pode ser benéfico para a purificação, uma vez que o depósito ou a adsorção de solutos na superfície da membrana diminui o tamanho dos poros da mesma. Segundo a literatura, a massa molar da C-FC de *Spirulina (Arthrospira) platensis* é em torno de 115 kDa (SONG; ZHAO; WANG, 2013), porém este valor é dependente do tipo de oligômero presente nas cianobactérias, podendo variar entre 81–131 kDa (PATEL et al., 2005). Portanto, no presente trabalho, a baixa recuperação (52,5 %) de C-FC atingida para a fração retida quando utilizada a membrana de 100 kDa deve-se a passagem do biocorante para o permeado, sendo esta massa molar de corte muito grande para reter eficientemente a C-FC. A fração permeada dos ensaios utilizando membrana de 100 kDa apresentou concentração média de C-FC de 0,03 mg.mL⁻¹, representando perda de 29,8 %. Enquanto que, no trabalho de Figueira (2014), a C-FC ficou retida eficientemente na membrana de 100 kDa (90,0 % de recuperação) provavelmente devido à incrustação dos poros da membrana pelo excesso de fragmentos celulares do extrato obtido a partir da biomassa seca. Sørensen, Hantke e Eriksen

(2013) também estudaram membranas de 50 e 100 kDa para a ultrafiltração de C-FC de *Galdieria sulfuraria*, e reportaram que mais de 50 % da C-FC foi perdida quando utilizada a membrana de 100 kDa, enquanto que a membrana de 50 kDa forneceu recuperação de 79,0 %.

Apesar de não apresentar elevado FP, a UF é uma técnica de purificação simples, de baixa resolução e de fácil aumento de escala, que utiliza baixas pressões e temperaturas, minimizando a desnaturação do bioproduto (BRANDELLI; SALA; KALIL, 2015), podendo ser utilizada para concentrar o extrato de C-FC a fim de facilitar a sua aplicação como corante azul natural na indústria de alimentos. Mogany et al. (2018) aplicou UF (membrana de 50 kDa) na purificação de C-FC de *Euhalothece* sp. após precipitação fracionada com sulfato de amônio e adsorção com carbono ativado, fornecendo fator de purificação de 1,1, valor próximo ao obtido neste trabalho, com 61,0 % de recuperação. Membrana de PES de 50 kDa também foi utilizada por Zheng et al. (2018) para purificação da C-FC extraída de *Arthrospira platensis*, atingindo FP de 6,5 (pureza de 2,7) com 91,8 % de recuperação; no presente estudo foi atingida recuperação de 85,8 %.

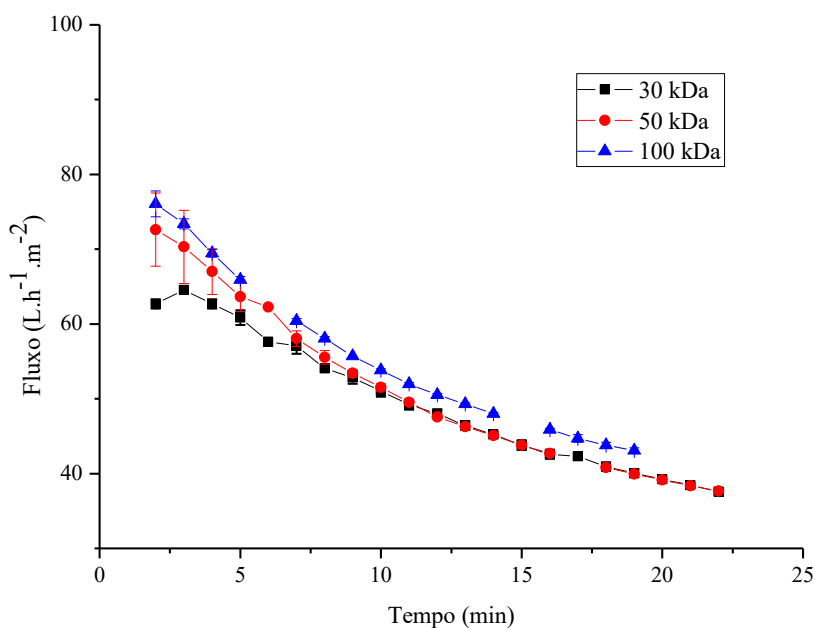
A Figura 2 apresenta os fluxos de permeado dos ensaios de seleção da massa molar de corte da membrana de UF. Pode-se observar que as maiores diferenças entre os fluxos ocorreram durante os primeiros minutos, e, após transcorridos 5 min de UF, as três membranas apresentaram comportamentos de fluxo bastante similares. A membrana de 100 kDa apresentou fluxo levemente superior às demais, provavelmente porque o extrato permeou mais facilmente pela membrana, devido ao tamanho dos poros.

Chaiklahan et al. (2011) estudaram três massas molares de corte de membranas de polietersulfona modificada para purificação de C-FC extraída de *Spirulina* sp.: 50, 70 e 100 kDa, obtendo purezas de 1,1, 1,0 e 1,0 e fatores de purificação de 2,0, 1,8 e 1,8, respectivamente, valores próximos aos obtidos no presente trabalho. Adicionalmente, os fluxos de permeado também foram consistentes com os obtidos na Figura 2, variando entre 50–75 L.h⁻¹.m⁻² para as membranas de 50 e 70 kDa e entre 45–110 L.h⁻¹.m⁻² para a membrana de 100 kDa. No presente estudo, os fluxos de permeados variaram entre 37–70 L.h⁻¹.m⁻² e entre 40–70 L.h⁻¹.m⁻² para as membranas de 50 e 100 kDa, respectivamente.

Uma vez que as membranas de polietersulfona de 30 e 50 kDa apresentaram resultados de FP, FC e recuperação de C-FC estatisticamente iguais (Tabela 1), além de apresentarem praticamente os mesmos fluxos de permeado após os primeiros 5 min de processo (Figura 2), a membrana de 50 kDa foi escolhida para ser utilizada nos *designs* de purificação da C-FC. Esta membrana foi selecionada porque já foi utilizada em outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa para a purificação da C-FC extraída a partir da biomassa seca (BRAGA et

al., 2016; FIGUEIRA, 2014), além de ser a mais utilizada na literatura para este fim (CHAIKLAHAN et al., 2011; MOGANY et al., 2018; SINGH; PARMAR; MADAMWAR, 2009; ZHENG et al., 2018).

Figura 2 – Fluxos de permeado nos ensaios de seleção da membrana de ultrafiltração.



3.2 DESIGNS DE PURIFICAÇÃO DE C-FC EXTRAÍDA SELETIVAMENTE

A C-FC extraída a partir da biomassa úmida da cianobactéria *S. platensis* LEB-52 foi purificada por diferentes sequências de purificação, conforme a Figura 1. A Tabela 2 apresenta os resultados de pureza, fator de purificação e recuperação de C-FC obtidos em cada *design*.

O *Design* 1, o qual incluía uma etapa de precipitação fracionada com sulfato de amônio seguida de diálise, resultou em C-FC com pureza de 1,6 (FP de 2,0) com recuperação global de 86,8 %. Este processo resultou em C-FC com pureza possível de ser utilizada industrialmente como corante em cosméticos, em apenas duas etapas simples de purificação. Além disso, pode-se notar na Tabela 2 que ambas as etapas de purificação apresentaram recuperações elevadas, em torno de 93,0 %. Esta observação é importante, pois a aplicação de mais de uma etapa de purificação pode acarretar na perda do bioproduto, encarecendo o processo de *downstream*; portanto a aplicação de técnicas que resultem em altas recuperações é interessante.

Tabela 2 – Pureza, fator de purificação e recuperação de C-FC em cada etapa dos *designs* de purificação.

<i>Design</i>	Etapa	Frações	PE	PF	Rec (%)
1	A: Extração seletiva		0,8	1,0	100,0
	B: Precipitação fracionada		1,6	2,0	92,7
	C: Diálise		1,6	1,0	93,6
	Global		1,6	2,0	86,8
2	A: Extração seletiva		0,9	1,0	100,0
	B: Precipitação fracionada		1,7	1,9	93,3
	C: Diafiltração/ultrafiltração		1,9	1,2	54,5
	Global		1,9	2,1	50,8
3	A: Extração seletiva		0,8	1,0	100,0
	B: Ultrafiltração		1,0	1,3	89,3
	C: CTI com eluição por gradiente de pH	$3,5 \leq PE < 4,0$	3,9	3,9	89,3
		$2,5 \leq PE < 3,5$	2,8	2,8	6,6
		$1,5 \leq PE < 2,5$	1,8	1,8	3,3
Global		3,9	4,9	79,7	
4	A: Extração seletiva		0,9	1,0	100,0
	B: CTI com eluição por gradiente de pH	$3,5 \leq PE < 4,0$	3,6	4,0	75,0
		$2,5 \leq PE < 3,5$	3,0	3,3	8,7
		$1,5 \leq PE < 2,5$	1,9	2,1	3,9
	C: Ultrafiltração	$3,5 \leq PE < 4$	3,8	1,0	66,2
		$2,5 \leq PE < 3,5$	3,7	1,2	61,4
$1,5 \leq PE < 2,5$		2,9	1,5	49,1	
Global		3,8	4,2	49,6	

PE: pureza; FP: fator de purificação; Rec: recuperação de C-FC (%).

O estudo realizado por Silva et al. (2009), utilizando precipitação fracionada com sulfato de amônio nas saturações 0-20/20-50 % para purificar a C-FC extraída a partir da biomassa seca de *S. platensis* LEB-52, resultou em PE de 0,8 (FP de 1,7) e recuperação de 83,8 %. No presente estudo, o fator de purificação apenas da etapa de precipitação foi de 2,0,

com recuperação de 92,7 %. As mesmas faixas de saturação de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ também foram utilizadas por Zheng et al. (2018) para purificar a C-FC extraída a partir da biomassa seca de *Arthrospira platensis* após uma etapa de ultrafiltração. A etapa de precipitação resultou em FP de 1,3 e recuperação de 74,8 %, o que indica que a precipitação da C-FC obtida a partir da biomassa úmida, como a do presente estudo, é mais vantajosa.

Mogany et al. (2018) utilizaram precipitação fracionada com sulfato de amônio para a purificação de C-FC de *Euhalothece* sp., nas faixas de saturação de 0-30/30-60 %, resultando em FP de 1,4 com 71,0 % de recuperação. Khazi, Demirel e Dalay (2018) também purificaram a C-FC de *Arthrospira platensis* cultivada em meio Zarrouk com NaNO_3 como fonte de nitrogênio, utilizando precipitação fracionada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nas faixas de 0-30/30-70 %, seguida de diálise. As etapas de precipitação e de diálise apresentaram FP de 1,2 e 1,3, respectivamente, resultando em FP global de 1,9, semelhante ao obtido no presente trabalho, embora os autores não tenham mencionado a recuperação dos processos.

O *Design 2* consistiu na aplicação da diafiltração em substituição da diálise após a etapa de precipitação fracionada com sulfato de amônio, para a retirada do sal, seguida de ultrafiltração para concentrar o extrato. A etapa de precipitação apresentou resultados de fator de purificação e recuperação semelhantes aos obtidos no *Design 1*. A aplicação da DF/UF foi eficiente em remover o sulfato de amônio e resultou em pequeno aumento na pureza do extrato, representando um FP de 1,2. No entanto, esta etapa apresentou recuperação bem mais baixa do que a etapa de precipitação, de apenas 54,5 %. Assim, esta sequência apresentou praticamente o mesmo FP global do *Design 1*, porém com recuperação de apenas 50,8 %. Com base nos resultados, pode-se concluir que a o processo onde a retirada de sal é realizada com diálise é mais vantajoso em termos de recuperação de C-FC. No entanto, a diálise é apenas aplicável em processos de pequena escala, enquanto que a diafiltração tem a vantagem de ser uma técnica de fácil aumento de escala e que pode ser utilizada industrialmente. Além disso, na diálise a força motriz do processo de troca de tampão é a diferença de concentração do soluto através da membrana, enquanto que a diafiltração é mais rápida, devido ao fluxo convectivo de tampão através da membrana. Isto pode ser vantajoso no processamento de proteínas ou outras biomoléculas que são instáveis (EVANS; ROMERO; WESTOBY, 2009).

Figueira (2014) estudou quatro *designs* de purificação da C-FC extraída a partir da biomassa seca de *S. platensis* LEB-52 e um destes consistia na aplicação de precipitação fracionada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nas saturações de 0-20/20-50 %, DF/UF com membrana de PES de 50 kDa, CTI com eluição por degrau seguido de gradiente salino e novamente DF/UF. A etapa de precipitação resultou em FP de 1,7 vezes e recuperação de 81,2 %, enquanto que a DF/UF

resultou em FP de 1,4 vezes com 95,2 % de recuperação. Se este *design* consistisse apenas destas duas etapas, o fator de purificação global seria de 3,7 e a recuperação global seria de 77,3 %, valores superiores aos obtidos no presente trabalho.

Embora a etapa de precipitação tenha resultado em elevada recuperação, com um bom fator de purificação, considerando a simplicidade da técnica, ocorreram perdas de C-FC na etapa de DF/UF, o que levou à uma baixa recuperação global no *Design 2*. De acordo com Ding et al. (2013), o aumento da força iônica (através da adição de NaCl) resultou em aumento da agregação das moléculas e do *fouling* causado por uma solução de albumina durante o processo de microfiltração. A adsorção da proteína na superfície ou no interior da membrana durante o *fouling* pode causar degradação da biomolécula, além da diminuição do fluxo durante o processo (BÓDALO et al., 2004; GÜELL; DAVIS, 1996). Uma vez que apenas 7 % de C-FC foi perdida nas frações permeadas durante a diafiltração e ultrafiltração, uma possível explicação para a baixa recuperação desta etapa no *Design 2* é que a alta força iônica do extrato após a precipitação com sulfato de amônio causou a agregação das moléculas de C-FC e adsorção na membrana, desnaturando a proteína. De fato, foi observada significativa diminuição no fluxo de permeado durante a ultrafiltração, além de resíduos de cor azul na membrana após o processo, o que indica que ocorreu *fouling* nestes ensaios. Outra indicação de que a adição de sal teve influência na baixa recuperação da DF/UF é que a ultrafiltração apresentou elevada recuperação nos ensaios de seleção da massa molar de corte da membrana e nos demais *designs* que continham etapa de UF.

A técnica de ultrafiltração pode ser utilizada também para concentrar o extrato de C-FC obtido a partir da biomassa úmida, antes da alimentação na CTI com eluição por gradiente de pH, uma vez que a C-FC extraída seletivamente apresenta baixa concentração, em torno de 0,083 mg.mL⁻¹. No *Design 3*, a UF aplicada após a extração seletiva, concentrou o extrato em 6,4 vezes, reduzindo o volume de alimentação na CTI e, conseqüentemente, o tempo de processo. A CTI com eluição por gradiente de pH aplicada no extrato concentrado por UF resultou em três frações de PE 3,9, 2,8 e 1,8, sendo que a fração de maior pureza apresentou elevada recuperação de C-FC, de 89,3 %. Os resultados globais de fator de purificação (4,9 vezes) e recuperação (79,7 %) deste *design* indicam a importância da pureza de entrada do extrato na sequência de purificação.

Singh, Parmar e Madamwar (2009) purificaram C-FC de *Phormidium ceylanicum* utilizando UF com membrana de PES de 50 kDa seguida de CTI com eluição por degrau de NaCl. C-FC com pureza de 2,9 (FP de 2,6) e recuperação de 83,6 % foi obtida por UF, no entanto, os autores utilizaram quatro ciclos de diafiltração (DF) acoplados à UF, o que justifica

o elevado FP, uma vez que a DF pode auxiliar na purificação através da eliminação de proteínas contaminantes. O extrato concentrado por DF/UF foi purificado por CTI utilizando uma resina fraca trocadora aniônica, resultando em PE de 4,1 (FP de 1,4 vezes) com 63,5 % de recuperação. Assim, o processo apresentou FP global de 3,7 e recuperação global de 53,0 %, resultados inferiores aos obtidos no presente trabalho.

No estudo de Figueira (2014), DF/UF com membrana de PES de 50 kDa e seis ciclos de DF foram utilizados previamente à CTI com eluição por degrau ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) seguido de gradiente de NaCl ($0,1 - 1 \text{ mol.L}^{-1}$) e outra etapa de DF/UF após a CTI. A primeira etapa de DF/UF apresentou FP de 1,7 vezes e recuperação de 92,6 %, enquanto que a CTI resultou em FP de 3,2 com 57,7 % de recuperação. A segunda DF/UF após a CTI não apresentou incremento da pureza do extrato, portanto, este processo resultou em fator de purificação global de 5,3 vezes, pureza global de apenas 3,0 e recuperação de 51,3 %. Excluindo a última etapa de DF/UF o processo resultaria em recuperação global de 53,4 %, valor inferior quando comparado aos resultantes do *Design 3* no presente estudo.

Somando-se a isso, é possível verificar que o *design* desenvolvido por Figueira (2014) apresentou pureza global (3,0) inferior à do *Design 3* (3,9). O elevado valor de PE global obtido no presente estudo se deve à extração seletiva a partir da biomassa úmida de *S. platensis*, que resulta em um extrato de C-FC com menor concentração de contaminantes e, conseqüentemente, em uma elevada pureza inicial para o *design*. Por outro lado, a extração a partir da biomassa seca, como no estudo de Figueira (2014), resulta em extrato de C-FC com pureza mais baixa, em torno de 0,5, o que prejudica a pureza final dos processos. Além disso, a secagem da biomassa representa uma operação a mais no processo e perdas no rendimento de C-FC (SALA; MORAES; KALIL, 2018; SARADA; PILLAI; RAVISHANKAR, 1999).

No *Design 4*, a UF foi aplicada após a CTI com eluição por gradiente de pH, porém foram utilizados tubos Vivaspin® 15 Turbo contendo membranas de polietersulfona de 50 kDa, ao invés da célula de ultrafiltração convencional (SALA; MORAES; KALIL, 2018). A CTI resultou em frações de C-FC de purezas 3,6, 3,0 e 1,9, novamente apresentando FP (4,0) e recuperação (75,0 %) elevados para a mistura das frações de maior pureza. Após a aplicação da UF, foi possível atingir a pureza de 3,8, além de duas frações de PE 3,7 e 2,9. Os fatores de purificação atingidos pela UF foram consistentes com os fornecidos nos *Designs 2* e *3*, variando entre 1,0 e 1,5. Os tubos Vivaspin® forneceram fatores de concentração bastante elevados, variando entre 24,6 e 74,0 vezes, no entanto, a recuperação global do *Design 4* foi mais baixa do que do *Design 3*.

Outro *design* desenvolvido no trabalho de Figueira (2014) envolvia a CTI com eluição por degrau e gradiente salino seguida de DF/UF, apresentando valores de FP próximos aos obtidos no *Design 4*, porém com pureza global bastante inferior, de 2,1. A CTI resultou em FP de 3,7 vezes com 73,4 % de recuperação, enquanto que a DF/UF apresentou fator de purificação de 1,0 e recuperação de 92,1 %, o que resultou em valores globais de 3,7 e 67,6 %, respectivamente (FIGUEIRA, 2014). No presente trabalho, valores de 4,2 e 49,6 % para os parâmetros FP e recuperação foram atingidos, o que resultou em pureza global de 3,8.

O *design* de purificação mais vantajoso depende do grau de pureza necessário e/ou desejado de C-FC. No entanto, devido ao seu elevado custo e a possibilidade de aplicação como biofármaco, geralmente busca-se a obtenção de C-FC com a maior pureza e recuperação possível. Assim, considerando os fatores de purificação e a recuperação global dos processos, o *Design 3*, o qual consistiu na extração seletiva de C-FC a partir da biomassa úmida de *S. platensis* LEB-52, ultrafiltração com membrana de polietersulfona de 50 kDa e cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH apresentou os melhores resultados. Este processo forneceu C-FC com PE de 3,9 (FP de 4,9 vezes) com 79,7 % de recuperação.

3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO E PURIFICADO DE C-FC

A atividade antioxidante da C-FC extraída seletivamente (extrato bruto) e purificada até pureza 3,9 (extrato purificado), foi avaliada utilizando os métodos ABTS e ORAC (Tabela 3). Os resultados de atividade antioxidante apresentaram relação com a pureza da C-FC. As maiores capacidades antioxidantes foram obtidas pela fração de pureza de 3,9, as quais foram cerca de 18,3 e 40,6 vezes superiores às obtidas pela C-FC de PE = 0,9. Estes resultados corroboram com o observado por Chen et al. (2017), os quais relataram aumento da atividade antioxidante com o aumento da pureza das ficobiliproteínas.

Tabela 3 – Atividade antioxidante do extrato bruto e purificado de C-FC frente aos radicais ABTS^{•+} ($\mu\text{mol}_{\text{TE}}\cdot\text{g}^{-1}$) e peroxila (ORAC, $\mu\text{mol}_{\text{TE}}\cdot\text{g}^{-1}$).

Amostra	PE	ABTS ^{•+}	ORAC
Extrato bruto	0,9	8,85 ± 1,21 ^b	29,80 ± 11,16 ^b
Extrato purificado	3,9	161,66 ± 4,64 ^a	1211,41 ± 73,65 ^a

Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias (Teste-t, $p < 0,05$) na mesma coluna.

Park et al. (2018) obtiveram oito extratos de C-FC de sete amostras de *Spirulina* comerciais em pó e de uma amostra de *Spirulina* liofilizada cultivada em laboratório, que resultaram em atividades antioxidantes frente ao radical ABTS^{•+} entre 42,5 e 108,3 $\mu\text{mol}_{\text{TE}}\cdot\text{g}^{-1}$. A atividade pelo método ABTS encontrada no presente estudo para a C-FC de pureza 0,9 se encontra abaixo desta faixa, porém destaca-se a capacidade antioxidante obtida pela fração de PE = 3,9, a qual foi superior à encontrada na literatura.

A comparação dos resultados de atividade antioxidante com a literatura é difícil, uma vez que os poucos trabalhos que utilizaram as metodologias de ORAC e ABTS para avaliação da capacidade antioxidante de C-FC apresentam os resultados com unidades diferentes das utilizadas no presente estudo, e que tornam a conversão para a comparação impossível. Assim, tomou-se como exemplo o estudo de Braga et al. (2018), onde os métodos de ORAC e ABTS foram aplicados à polpa de juçara *in natura* e após fermentação láctica, a fim de avaliar se a atividade antioxidante foi afetada pelas mudanças na composição de antocianinas, as quais também são compostos antioxidantes coloridos que possuem aplicação como biocorantes naturais em alimentos. Os resultados mostraram que a atividade antioxidante pelo método de ABTS aumentou de 1,42 $\mu\text{mol}_{\text{TE}}\cdot\text{g}^{-1}$ para 2,12 $\mu\text{mol}_{\text{TE}}\cdot\text{g}^{-1}$ após a fermentação; enquanto que, pelo método de ORAC, a atividade aumentou de 0,46 para 0,88 $\mu\text{mol}_{\text{TE}}\cdot\text{g}^{-1}$. Portanto, os extratos bruto e purificado de C-FC do presente estudo apresentaram capacidades de sequestro dos radicais ABTS^{•+} e peroxila superiores à polpa de juçara, tanto *in natura* como após fermentação.

Estes resultados são interessantes pois demonstram os benefícios de aplicar técnicas de purificação ao extrato de C-FC: além de resultar em um produto de elevada recuperação e pureza, que permite sua aplicação como agente em tratamentos, a purificação eleva a atividade antioxidante do extrato. Por outro lado, é importante ressaltar que a C-FC é um pigmento natural, que, quando extraído seletivamente a partir da biomassa úmida de *Spirulina* (PE > 0,7), pode ser aplicado como corante em alimentos. Além disso, o perfil de consumo de alimentos vem sofrendo mudanças e dentre as novas exigências dos consumidores está a busca por alimentos funcionais, que não apenas atendam aos requisitos nutricionais, mas também agreguem benefícios à saúde. Assim, os resultados deste trabalho mostram a vantagem da aplicação da C-FC como corante alimentar, uma vez que pode proporcionar cor azul e efeitos biológicos ao alimento, elevando o interesse dos consumidores.

4 CONCLUSÃO

Diferentes graus de pureza de C-ficocianina extraída a partir da biomassa úmida de *S. platensis* LEB-52 foram obtidos utilizando três técnicas de purificação combinadas em quatro *designs* de purificação distintos. Primeiramente, foram avaliadas três membranas de ultrafiltração para purificação de C-FC. Fator de purificação de 1,5 e recuperação de aproximadamente 85,0 % foram obtidos para as membranas de 30 e 50 kDa, portanto, a membrana de 50 kDa foi utilizada nos *designs* de purificação de C-FC. A maior recuperação de C-FC (86,8 %) foi obtida no *design* que consistiu na precipitação fracionada com sulfato de amônio seguida de diálise, porém, este processo resultou em C-FC com pureza final igual a 1,6. A melhor sequência de purificação consistiu na extração de C-FC a partir da biomassa úmida, concentração por ultrafiltração com membrana de 50 kDa e purificação por cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH. Este *design* resultou em C-FC com pureza de 3,9, fator de purificação de 4,9 vezes e recuperação de 79,7 %. Adicionalmente, foram avaliadas as atividades antioxidantes da C-FC extraída seletivamente e após processo de purificação, onde a fração de pureza 3,9 apresentou capacidade de sequestro dos radicais ABTS^{•+} e peroxila de 161,66 e 1211,41 $\mu\text{mol}_{\text{TE}}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente. Este trabalho demonstra a aplicação de um *design* de purificação de C-FC, resultando em elevado fator de purificação, recuperação e atividade antioxidante, mostrando também a vantagem da utilização da C-FC como corante e fonte de efeitos biológicos em alimentos, mesmo em sua forma bruta.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENEDETTI, S.; BENVENUTI, F.; SCOGLIO, S.; CANESTRARI, F. Oxygen radical absorbance capacity of phycocyanin and phycocyanobilin from the food supplement *Aphanizomenon flos-aquae*. **Journal of medical food**, v. 13, p. 223–227, 2010.

BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complementary chromatic adaption in a filamentous blue-green alga. **The Journal of Cell Biology**, v. 58, p. 419–435, 1973.

BERMEJO, P.; PIÑERO, E.; VILLAR, Á. M. Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v. 110, n. 2, p. 436–445, 2008.

BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection against oxidative damage to DNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, n. 2, p. 262–266, 2001.

BÓDALO, A.; GÓMEZ, J. L.; GÓMEZ, E.; MÁXIMO, M. F.; MONTIEL, M. C. Study of L-aminoacylase deactivation in an ultrafiltration membrane reactor. **Enzyme and Microbial**

Technology, v. 35, n. 2–3, p. 261–266, 2004.

BRAGA, A. R. C.; MESQUITA, L. M. DE S.; MARTINS, P. L. G.; HABU, S.; DE ROSSO, V. V. *Lactobacillus* fermentation of jussara pulp leads to the enzymatic conversion of anthocyanins increasing antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 69, p. 162–170, 2018.

BRAGA, A. R. C.; FIGUEIRA, F. DA S.; SILVEIRA, J. T. DA; MORAIS, M. G. DE; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Improvement of thermal stability of C-phycoerythrin by nanofiber and preservative agents. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 40, n. 6, p. 1264–1269, 2016.

BRANDELLI, A.; SALA, L.; KALIL, S. J. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. **Food Research International**, v. 73, p. 3–12, 2015.

CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; LOHA, V.; TIA, S.; BUNNAG, B. Separation and purification of phycoerythrin from *Spirulina* sp. using a membrane process. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 14, p. 7159–7164, 2011.

CHEN, X.; WU, M.; YANG, Q.; WANG, S. Preparation, characterization of food grade phycobiliproteins from *Porphyra haitanensis* and the application in liposome-meat system. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 468–474, 2017.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603–607, 2002.

DELHI NUTRACEUTICALS. 2018. Disponível em: <http://www.delhinutraceuticals.com/phycoerythrin.html>. Acesso em: 5 de mar. 2019, 14:18:00.

DENIZ, I.; OZEN, M. O.; YESIL-CELIK TAS, O. Supercritical fluid extraction of phycoerythrin and investigation of cytotoxicity on human lung cancer cells. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 108, p. 13–18, 2016.

DING, Y.; TIAN, Y.; LI, Z.; WANG, H.; CHEN, L. Microfiltration (MF) membrane fouling potential evaluation of protein with different ion strengths and divalent cations based on extended DLVO theory. **Desalination**, v. 331, p. 62–68, 2013.

EVANS, D. R. H.; ROMERO, J. K.; WESTOBY, M. Concentration of Proteins and Removal of Solutes. In: PYLE, A. M.; CHRISTIANSON, D. W. (Eds). **Methods in Enzymology**. [S.I.]: Elsevier, 2009, v. 463, p. 97–120. Cap. 9.

FIGUEIRA, F. S. **Purificação de C-ficocianina e sua incorporação em nanofibras**. 2014. 141 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

GÜELL, C.; DAVIS, R. H. Membrane fouling during microfiltration of protein mixtures. **Journal of Membrane Science**, v. 119, n. 2, p. 269–284, 1996.

JUNGBAUER, A. Continuous downstream processing of biopharmaceuticals. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 479–492, 2013.

- KHAZI, M. I.; DEMIREL, Z.; DALAY, M. C. Evaluation of growth and phycobiliprotein composition of cyanobacteria isolates cultivated in different nitrogen sources. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 3, p. 1513–1523, 2018.
- KUMAR, D.; DHAR, D. W.; PABBI, S.; KUMAR, N.; WALIA, S. Extraction and purification of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* (CCC540). **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 2, p. 184–188, 2014.
- LIAO, G.; GAO, B.; GAO, Y.; YANG, X.; CHENG, X.; OU, Y. Phycocyanin inhibits tumorigenic potential of pancreatic cancer cells: role of apoptosis and autophagy. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2016.
- LIU, L. N.; CHEN, X. L.; ZHANG, X. Y.; ZHANG, Y. Z.; ZHOU, B. C. One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*. **Journal of Biotechnology**, v. 116, n. 1, p. 91–100, 2005.
- LIU, Y.; XU, L.; CHENG, N.; LIN, L.; ZHANG, C. Inhibitory effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on the growth of human leukemia K562 cells. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 2, p. 125–130, 2000.
- MOGANY, T.; KUMARI, S.; SWALAHA, F. M.; BUX, F. Extraction and characterisation of analytical grade C-phycoerythrin from *Euhalothece* sp. **Journal of Applied Phycology**, 2018.
- MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Strategy for a protein purification design using C-phycoerythrin extract. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5312–5317, 2009.
- MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Downstream de bioprocessos. In: STEFFENS, J.; BACKES, G. T.; VALDUGA, A. T. (Eds.). **Processos tecnológicos, biotecnológicos, e engenharia de processos em alimentos**. Erechin, RS: EdiFAPES, 2014. Cap. 2.
- PARK, W. S.; KIM, H. J.; LI, M.; LIM, D. H.; KIM, J.; KWAK, S. S.; KANG, C. M.; FERRUZZI, M. G.; AHN, M. J. Two classes of pigments, carotenoids and C-phycoerythrin, in *Spirulina* powder and their antioxidant activities. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1–11, 2018.
- PATEL, A.; MISHRA, S.; PAWAR, R.; GHOSH, P. K. Purification and characterization of C-phycoerythrin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. **Protein Expression and Purification**, v. 40, n. 2, p. 248–255, 2005.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.
- REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Repeated batch cultivation of the microalga *Spirulina platensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 937–943, 2006.
- RITO-PALOMARES, M.; NUÑEZ, L.; AMADOR, D. Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for C-phycoerythrin recovery from *Spirulina maxima*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 76, n. 12, p. 1273–1280, 2001.
- RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L. R. B.; FARIA, A. F.; MERCADANTE, A. Z.

Microcapsules containing antioxidant molecules as scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 704–711, 2012.

ROMAY, C.; ARMESTO, J.; REMIREZ, D.; GONZÁLEZ, R.; LEDON, N.; GARCÍA, I. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoerythrin from blue-green algae. **Inflammation Research**, v. 47, n. 1, p. 36–41, 1998.

ROMAY, C.; LEDÓN, N.; GONZÁLEZ, R. Further studies on anti-inflammatory activity of phycoerythrin in some animal models of inflammation. **Inflammation Research**, v. 47, n. 8, p. 334–338, 1998.

SALA, L.; ORES, J. C.; MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Simultaneous production of phycobiliproteins and carbonic anhydrase by *Spirulina platensis* LEB-52. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 96, n. 9, p. 1896–1902, 2018.

SALA, L.; MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Cell pretreatment with ethylenediaminetetraacetic acid for selective extraction of C-phycoerythrin with food grade purity. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 5, p. 1261–1268, 2018.

SARADA, R.; PILLAI, M. G.; RAVISHANKAR, G. A. Phycoerythrin from *Spirulina* sp: Influence of processing of biomass on phycoerythrin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycoerythrin. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 8, p. 795–801, 1999.

SCOPES, R. K. **Protein purification: principles and practice**. 3. ed. New York, NY: Springer Science, 2010.

SILVA, E. F.; FIGUEIRA, F. S.; CAÑEDO, A. D.; MACHADO, K. S.; SALGADO, M. T. S. F.; SILVA, T. K.; WAGNER, E. F.; MATTOZO, F. H.; LIMA, A.; SALES-NETO, J. M.; FERREIRA, V. U.; COMITRE, A. A.; MASCARENHAS, S. R.; KALIL, S. J.; VOTTO, A. P. S. C-phycoerythrin to overcome the multidrug resistance phenotype in human erythroleukemias with or without interaction with ABC transporters. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, p. 532–542, 2018.

SILVA, L. A.; KUHN, K. R.; MORAES, C. C.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Experimental design as a tool for optimization of C-phycoerythrin purification by precipitation from *Spirulina platensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 1, p. 5–12, 2009.

SINGH, N. K.; PARMAR, A.; MADAMWAR, D. Optimization of medium components for increased production of C-phycoerythrin from *Phormidium ceylanicum* and its purification by single step process. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 4, p. 1663–1669, 2009.

SOLEY BIOTECHNOLOGY INSTITUTE. 2018. Disponível em: <http://www.soleybio.com/products/61-c-phycoerythrin.html>. Acesso em: 5 de mar. 2018, 21:19:00.

SONG, W.; ZHAO, C.; WANG, S. A large-scale preparation method of high purity C-phycoerythrin. **International journal of bioscience, biochemistry and bioinformatics**, v. 3, n. 4, p. 293–297, 2013.

SØRENSEN, L.; HANTKE, A.; ERIKSEN, N. T. Purification of the photosynthetic pigment

C-phycoyanin from heterotrophic *Galdieria sulphuraria*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 12, p. 2933–2938, 2013.

SU, H. N.; XIE, B. BIN; CHEN, X. L.; WANG, J. X.; ZHANG, X. Y.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Efficient separation and purification of allophycoyanin from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 1, p. 65–70, 2010.

WHEELWRIGHT, S. M. The design of downstream processes for large-scale protein purification. **Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 2–3, p. 89–102, 1989.

YAN, S. G.; ZHU, L. P.; SU, H. N.; ZHANG, X. Y.; CHEN, X. L.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Single-step chromatography for simultaneous purification of C-phycoyanin and allophycoyanin with high purity and recovery from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 1, p. 1–6, 2011.

ZARROUK, C. **Contribution a l'étude d'une cianophycee: Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima***. 1966. 83 f. Ph.D. thesis - Faculte des Sciences, Universite de Paris, 1966.

ZHENG, Y.; MO, L.; ZHANG, W.; DUAN, Y.; HUANG, J.; CHEN, C.; GAO, Y.; SHI, X.; LI, F.; YANG, J.; GUO, Y. Phycocyanin fluorescent probe from *Arthrospira platensis*: preparation and application in LED-CCD fluorescence density strip qualitative detection system. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 2, p. 1107–1115, 2018.

ARTIGO 3

**APLICAÇÃO DE C-FICOCIANINA COMO CORANTE ALIMENTAR EM
SORVETES E AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA COR E CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE**

RESUMO

Os corantes azuis naturais possuem aplicação limitada na indústria de alimentos por serem pouco estáveis frente ao pH, temperatura, luz e condições ácidas. No entanto, devido à demanda pela substituição dos corantes sintéticos pelos naturais, são necessários estudos de avaliação da estabilidade dos compostos coloridos que apresentam potencial para servirem de corantes alimentícios. A C-ficocianina (C-FC) já é comercializada como corante azul natural, porém são poucos os estudos na literatura avaliando a estabilidade da sua cor quando aplicada em matrizes alimentares. Além da sua aplicação como corante, a C-FC apresenta propriedades bioativas, como efeitos anti-inflamatórios, anticancerígenos e antioxidantes, que possibilitam seu uso como agente em tratamentos. Porém, existem poucos estudos relatando a atividade antioxidante deste corante quando aplicado em matrizes alimentares. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade da cor ao longo do tempo e a capacidade antioxidante da C-FC aplicada em sorvetes à base de leite. Os sorvetes adicionados de C-FC apresentaram cor estável durante 273 d. Com relação à atividade antioxidante, avaliada utilizando os métodos de ABTS e ORAC após digestão gastrointestinal simulada, os sorvetes adicionados de C-FC apresentaram atividades de $1362,62 \pm 115,12$ e $134,63 \pm 15,68 \mu\text{mol}_{\text{TE}}\cdot\text{g}^{-1}$ frente aos radicais ABTS^{•+} e peroxila, respectivamente, valores cerca de 13 e 2 vezes superiores aos dos sorvetes controles digeridos. Assim, os resultados deste trabalho demonstram que o extrato de C-FC extraído a partir da biomassa úmida de *S. platensis* pode ser aplicado como corante azul alimentar em sorvetes, e destacam a produção de peptídeos bioativos nos sorvetes adicionados de C-FC após digeridos por pepsina. Isso é importante sobretudo do ponto de vista industrial, uma vez que estimula a formulação de produtos que atraiam a atenção dos consumidores tanto pela sua cor como por suas atividades biológicas.

Palavras-chave: Bioacessibilidade. Biocorante. Digestão *in vitro*. *Spirulina*. Colorímetro.

1 INTRODUÇÃO

As indústrias de alimentos e bebidas vêm buscando corantes naturais para o desenvolvimento de produtos, em substituição aos corantes sintéticos, uma vez que estes geralmente são tóxicos, carcinogênicos, ou não seguros, dependendo da concentração em que são adicionados nos alimentos (SOLTAN; SHEHATA, 2012). Esta procura é resultado da mudança de hábitos dos consumidores, os quais buscam alimentos mais naturais, com o mínimo de processamento possível e que agreguem benefícios à saúde através de propriedades bioativas, como efeito antioxidante. No entanto, a utilização de corantes naturais em alimentos é limitada pela natureza da matriz alimentícia onde o pigmento é disperso, e pelas interações com os outros componentes da matriz, como proteínas, polissacarídeos, lipídeos, açúcares, sais, entre outros (BATISTA et al., 2006).

As cores azuis não são incomuns na natureza, mas podem ser difíceis de replicar em alimentos, devido à baixa estabilidade ao pH, luz e calor apresentada pelos compostos naturais que produzem tons azuis (NEWSOME; CULVER; VAN BREEMEN, 2014). Um dos compostos azuis naturais mais explorados atualmente é a C-ficocianina (C-FC), a qual pertence ao grupo das ficobiliproteínas. Estas são proteínas solúveis em água, de cor brilhante e altamente fluorescentes, componentes dos complexos fotossintéticos de captação de luz de cianobactérias (algas verde-azuladas) e algas vermelhas (KUDDUS et al., 2013). As ficobiliproteínas são holoproteínas de cadeias múltiplas, compostas de apoproteínas covalentemente ligadas à cromóforos tetrapirrólicos de cadeia linear, chamados ficobilinas (ERIKSEN, 2008).

A C-FC já é utilizada e comercializada por várias empresas como corante azul em diversos produtos, porém, alguns autores afirmam que o uso desta proteína em alimentos e bebidas é limitado pela falta de estabilidade frente ao calor, à luz e à condições ácidas (JESPERSEN et al., 2005; NEWSOME; CULVER; VAN BREEMEN, 2014). Poucos trabalhos foram encontrados onde foi avaliada a estabilidade da cor da C-FC quando aplicada em matrizes alimentares (DEWI; KURNIASIH; PURNAMAYATI, 2018; JESPERSEN et al., 2005; MOHAMMADI-GOURAJI; SOLEIMANIAN-ZAD; GHIACI, 2019). No entanto, segundo Jespersen et al. (2005), o uso de qualquer corante natural em alimentos requer conhecimento detalhado da estabilidade do corante frente à possíveis processos de degradação, a fim de otimizar a produção industrial, embalagem e armazenamento dos produtos coloridos.

Além de corante na indústria de alimentos, a C-FC pode ser aplicada como corante em cosméticos, como biomarcador fluorescente em diagnósticos e como biofármaco,

dependendo do seu grau de pureza (SØRENSEN; HANTKE; ERIKSEN, 2013). Sua utilização como agente em tratamentos é derivada da sua capacidade antioxidante (SONANI et al., 2017), anticancerígena (SILVA et al., 2018), anti-inflamatória (ROMAY; LEDÓN; GONZÁLEZ, 1998) e antitumoral (LIAO et al., 2016), reportada por diversos estudos. Alguns autores atribuem estes efeitos aos seu cromóforo, chamado de ficocianobilina (PCB) (BHAT; MADYASTHA, 2000; HIRATA et al., 2000), devido à sua grande similaridade estrutural com a bilirrubina, produto resultante da degradação do grupo heme, a qual é um antioxidante natural no plasma e eficaz contra espécies reativas de oxigênio *in vivo* (STOCKER; GLAZER; AMES, 1987). Porém, estudos recentes sugerem que a holoproteína de C-FC apresenta propriedades antioxidantes e anticâncer mais significativas do que apenas a PCB purificada (CHERDKIATIKUL; SUWANWONG, 2014; GUAN et al., 2009; MINIC et al., 2016; PLEONSIL; SOOGARUN; SUWANWONG, 2013).

Considerando a crescente demanda por alimentos funcionais por parte dos consumidores e a escassez de estudos na literatura investigando a atividade antioxidante e a estabilidade da cor de C-FC quando aplicada em matriz alimentar, o objetivo deste trabalho é avaliar estes dois parâmetros através da aplicação de C-FC com grau de pureza alimentar em sorvetes à base de leite. Os parâmetros de cor dos sorvetes foram avaliados ao longo do tempo, e a atividade antioxidante foi comparada com a atividade do sorvete controle (sem adição do corante), após digestão gastrointestinal simulada.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CULTIVO DA CIANOBACTÉRIA *Spirulina platensis* LEB-52 E EXTRAÇÃO DE C-FICOCIANINA A PARTIR DE BIOMASSA ÚMIDA (EXTRAÇÃO SELETIVA)

A cianobactéria *Spirulina (Arthrospira) platensis* LEB-52, gentilmente cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), foi utilizada para obtenção de C-ficocianina a partir da biomassa úmida. Para o preparo do inóculo, cultivo e manutenção da microalga foi utilizado o meio Zarrouk (REINEHR; COSTA, 2006; ZARROUK, 1966). A cianobactéria foi cultivada em modo descontínuo em Erlenmeyer de 2 L (volume útil de 1,8 L), sendo adicionado 20 % (v/v) de inóculo com concentração inicial de 0,75 g.L⁻¹. A agitação foi realizada por injeção constante de ar estéril (0,5 vvm) a 25 °C. A iluminação foi promovida por lâmpadas

fluorescentes do tipo *daylight* ($40,5 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) com fotoperíodo fixado em 12 h claro e 12 h escuro (SALA et al., 2018).

A C-FC foi extraída seletivamente de acordo com o estudo de Sala, Moraes e Kalil (2018), onde verificou-se que a máxima produção intracelular de C-ficocianina por *S. platensis* LEB-52 utilizando o meio Zarrouk ocorre em 21 d de cultivo, permanecendo constante até 74 d, sem incremento significativo ($p > 0,05$) na concentração intracelular de C-FC. Assim, a biomassa foi recuperada entre 21 e 74 d de cultivo através de filtração em membrana de acetato de celulose ($0,45 \mu\text{m}$). A biomassa foi pré-tratada com EDTA ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) diluído em tampão Tris- SO_4 $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,4, na concentração de $1,5 \text{ mg}_{\text{biomassa}}\cdot\text{mL}^{-1}$. A suspensão foi agitada durante 30 s em vórtex e mantida durante 1 min a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Após, a biomassa pré-tratada foi recuperada por filtração em membrana de $0,45 \mu\text{m}$ e a C-FC foi extraída seletivamente ressuspendendo a biomassa em tampão Tris- SO_4 $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7,4, na concentração de $0,5 \text{ mg}_{\text{biomassa}}\cdot\text{mL}^{-1}$, e incubando a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h. Ao final deste período, o extrato foi centrifugado ($12.000 \times g$, $10 \text{ }^\circ\text{C}$, 20 min) para clarificação.

2.2 PURIFICAÇÃO DE C-FC EXTRAÍDA SELETIVAMENTE POR ULTRAFILTRAÇÃO

A ultrafiltração (UF) foi realizada segundo Figueira (2014), adicionando o extrato em célula laboratorial do tipo convencional, de volume útil de 160 mL, agitada por barra magnética suspensa para simulação do escoamento em fluxo tangencial. O processo foi realizado com membrana de polietersulfona de 50 kDa, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e sob pressão provida por nitrogênio de $1,0 \text{ kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$ (manométrica). O ponto final da ultrafiltração foi definido como a redução em cinco vezes do volume alimentado de extrato de C-FC.

2.3 APLICAÇÃO DE C-FICOCIANINA EM SORVETE À BASE DE LEITE

2.3.1 Avaliação da estabilidade da cor da C-FC em sorvete à base de leite

A formulação do sorvete à base de leite foi baseada na receita do fabricante Duas Rodas Industrial[®] (Tabela 1). Todos os componentes, com exceção do emulsificante Emustab[®] e da C-FC, foram homogeneizados em *blender* (1745 rpm) durante 3 min e a calda base foi congelada ($-18 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 4 h. Após, foram adicionados Emustab[®] e C-FC (concentração de $0,25 \text{ mg}_{\text{C-FC}}\cdot\text{mL}_{\text{sorvete}}^{-1}$), e a calda foi homogeneizada em batedeira (110 rpm) durante 5 min. Os sorvetes foram estocados à $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ em embalagens de plástico comerciais e 24 h após o preparo

foram determinadas a densidade aparente e a cor inicial. A formulação controle foi preparada da mesma forma, porém não foi adicionada de C-FC, e todos os ensaios foram realizados em triplicata. Uma amostra de cada sorvete preparado foi separada após 170 d (em torno de 6 meses) e liofilizada para as análises de digestibilidade *in vitro* e atividade antioxidante.

Tabela 1 – Formulação de sorvete à base de leite, com e sem adição de C-FC (base úmida).

Componente	Formulação sem adição	Formulação adicionada
	de C-FC (controle)	de C-FC
	Concentração (% m/m)	Concentração (% m/m)
Leite	67,80	43,05
Sacarose	16,42	10,45
Leite em pó integral	6,57	4,17
Crema de leite	7,88	5,00
Super liga neutra ^{®*}	0,66	0,42
Emustab ^{®*}	0,66	0,42
Extrato de C-ficocianina (concentração de 0,437 mg.mL ⁻¹)	-	36,51

*Produzidos pela empresa Duas Rodas Industrial[®].

A densidade aparente de cada triplicata foi determinada pesando os produtos em recipientes tarados de volume conhecido, de acordo com método proposto pela ASTM (2017). A estabilidade da cor dos produtos foi acompanhada a cada 14 d durante 273 d utilizando colorímetro (Minolta, modelo CR400, Japão) e o sistema de cor L* a* b*. O ângulo Hue (h, Equação 1), o qual indica o ângulo da cor (0° - vermelho; 90° amarelo; 180° verde; 270° azul e 360° negro), e os valores de L*, a* e b* foram determinados para cada formulação em cada ponto. O valor de L* indica luminosidade (0 – 100), a* indica a quantidade de vermelho (valores positivos) ou verde (valores negativos) e b* indica a quantidade de amarelo (valores positivos) ou azul (valores negativos). Também foi calculada a diferença de cor (ΔE , Equações 2 – 5) com relação aos valores iniciais (0) e finais (t) de L*, a* e b* de cada formulação (com e sem C-FC) nos tempos 14 e 273 d.

$$h (^{\circ}) = 180 + \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad \text{quando } (-a^*, +b^*) \text{ ou } (-a^*, -b^*) \quad (1)$$

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (2)$$

$$\Delta L^* = L_0^* - L_t^* \quad (3)$$

$$\Delta a^* = a_0^* - a_t^* \quad (4)$$

$$\Delta b^* = b_0^* - b_t^* \quad (5)$$

2.3.2 Digestão *in vitro* dos sorvetes

Os sorvetes adicionados de C-FC e controles foram submetidos ao processo de digestão *in vitro* segundo Berni et al. (2015), de forma a avaliar a bioacessibilidade dos sorvetes adicionados de C-FC. As amostras liofilizadas dos sorvetes com e sem C-FC foram homogeneizadas com 40 mL de solução de sais (120 mmol.L⁻¹ NaCl, 6 mmol.L⁻¹ CaCl₂ e 5 mmol.L⁻¹ KCl) e acidificadas (pH 2,0) com HCl 1 mol.L⁻¹. Após, adicionou-se 2 mL de pepsina (40 mg.mL⁻¹ em 0,1 mol.L⁻¹ HCl) e as misturas foram transferidas para frascos de vidro âmbar e incubadas a 37 °C em banho maria, sendo agitadas a 95 rpm por 1 h. Em seguida, o pH das misturas parcialmente digeridas foi ajustado para 6,5 pela adição de NaOH (1 mol.L⁻¹), e foram adicionados 3 mL de extrato de bile (40 mg.mL⁻¹) e 2 mL de pancreatina (10 mg.mL⁻¹). As misturas foram novamente incubadas sob agitação a 95 rpm por 2 h a 37 °C, a fim de simular a fase de digestão intestinal. Após o término da digestão, a fração aquosa das misturas, a qual continha a C-FC, foi separada da fração insolúvel e novamente liofilizada para determinação da atividade antioxidante.

2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS SORVETES APÓS A DIGESTÃO

2.4.1 Preparo dos extratos antioxidantes de C-FC

Para extração dos compostos antioxidantes das matrizes, os sorvetes com e sem C-FC liofilizados após a digestão *in vitro*, foram extraídos com 20 mL de metanol em agitador magnético durante 15 min. As amostras foram filtradas utilizando papel filtro e o retido foi

lavado duas vezes com mais 20 mL de metanol. O filtrado foi então concentrado utilizando evaporador rotativo, em temperatura inferior à 40 °C (BRAGA et al., 2018). As amostras foram filtradas em filtros de 0,22 µm (membrana de acetato de celulose) previamente às análises.

2.4.2 Atividade antioxidante empregando o radical ABTS^{•+}

Para determinação da atividade antioxidante utilizando o método de ABTS, 30 µL dos extratos preparados com metanol foram adicionados em 3 mL da solução de radical ABTS^{•+} e a absorvância da reação foi lida em espectrofotômetro à 734 nm após 6 min. O radical ABTS^{•+} foi preparado a partir da reação entre 5 mL de solução estoque de ABTS (7 mmol.L⁻¹) e 88 µL de persulfato de potássio (140 mmol.L⁻¹), ambos preparados em água, sendo a mistura mantida ao abrigo da luz e em temperatura ambiente por 16 h. Esta solução foi diluída com etanol até absorvância de $0,7 \pm 0,05$, à 734 nm (RE et al., 1999). A quantificação da atividade antioxidante total foi realizada a partir de curva padrão de Trolox em etanol, nas mesmas condições reacionais. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol.g}_{\text{amostra}}^{-1}$ de equivalentes de Trolox (TE).

2.4.3 Atividade antioxidante frente ao radical peroxila

Para determinação da atividade antioxidante frente ao radical peroxila foi utilizado o método ORAC (capacidade de absorção de radicais oxigênio), baseado na formação de radicais peroxila pela degradação térmica do AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano)di-hidroclorato) à 37 °C. 150 µL de fluoresceína (61 nmol.L⁻¹, preparada em tampão fosfato 75 mmol.L⁻¹ pH 7,4) foram adicionados em microplacas de 96 poços, seguidos de 25 µL do extrato preparado em metanol (diluído 10, 50, 100 e 1000 vezes em tampão fosfato) ou branco (tampão) ou solução padrão de Trolox (50 µmol.L⁻¹). A placa foi incubada por 10 min à 37 °C, sob agitação intermitente, e após, foram adicionados 25 µL de solução de AAPH (19 mmol.L⁻¹, preparado em tampão fosfato) em cada poço. As leituras da fluorescência à 538 nm (excitação à 485 nm) foram realizadas a cada minuto, durante 180 min (RODRIGUES et al., 2012). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol.g}_{\text{amostra}}^{-1}$ de equivalentes de Trolox (TE).

2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.5.1 Concentração e pureza de C-ficocianina

A concentração de C-ficocianina (C-FC, mg.mL⁻¹, Equação 6) foi calculada como descrito por Bennett e Bogorad (1973) com modificação no comprimento de onda por Moraes e Kalil (2009). A pureza do extrato de C-FC (PE) foi calculada conforme a Equação 7, onde a absorvância a 620 nm (A₆₂₀) indica a concentração de C-FC e a absorvância a 280 nm (A₂₈₀) indica a concentração de proteínas na solução. As leituras de absorvância (A) a 620, 652 e 280 nm foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu UV-1800, Japão).

$$\text{C-FC (mg}\cdot\text{mL}^{-1}) = \frac{A_{620} - 0,474 \times A_{652}}{5,34} \quad (6)$$

$$\text{PE} = \frac{A_{620}}{A_{280}} \quad (7)$$

2.5.2 Concentração de biomassa

A concentração de biomassa foi determinada por leitura da densidade óptica a 670 nm (COSTA et al., 2002) e conversão para biomassa seca através de curva padrão previamente preparada. Para construção da curva padrão, as células foram coletadas por centrifugação (4.757 × g, 30 min, 4 °C), lavadas e ressuspensas com água destilada para leitura da absorvância. Para determinação da biomassa seca, as células lavadas com água destilada foram secas a 105 °C até massa constante.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos ensaios de atividade antioxidante foram submetidos ao Teste-t a fim de verificar diferenças significativas entre as duas populações considerando um nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ESTABILIDADE DA COR DE C-FC QUANDO APLICADA EM SORVETE

C-FC foi extraída seletivamente da biomassa úmida da cianobactéria *Spirulina platensis* LEB-52 e concentrada por ultrafiltração, a fim de facilitar a sua adição na formulação de sorvetes à base de leite. O extrato de C-FC adicionado nos produtos possuía pureza de 1,1, a qual é considerada de grau alimentar, e concentração de $0,437 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, após ultrafiltração com membrana de 50 kDa. A C-FC foi adicionada na concentração de $0,25 \text{ mg}_{\text{C-FC}}\cdot\text{mL}_{\text{sorvete}}^{-1}$.

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 266 de 22 de setembro de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2005), define o que são gelados comestíveis, os quais são obtidos a partir de emulsão de gorduras e proteínas ou da mistura de água e açúcar(es), podendo ser adicionados de outros ingredientes, desde que não descaracterizem o produto. Além disso, a RDC estabelece somente a densidade aparente mínima de $475 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ como requisito específico de gelados comestíveis. Portanto, a densidade aparente dos sorvetes adicionados de C-FC foi determinada após 24 h de congelamento, a fim de garantir que o produto se encontrava de acordo com a legislação. Este valor indica a quantidade de ar que foi incorporada à massa do sorvete durante os processos de homogeneização e congelamento, e não há um valor limite reportado para este tipo de produto. Os sorvetes adicionados de C-FC apresentaram densidade aparente média de $784,4 \pm 20,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, enquanto que os sorvetes controle (sem adição de C-FC) apresentaram média de $510,8 \pm 24,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Este aumento de 53,5 % na densidade aparente dos produtos adicionados de C-FC com relação aos sorvetes controle é resultado da adição do extrato aquoso de C-FC aos produtos.

As Figuras 1 e 2 apresentam os resultados da estabilidade da cor dos sorvetes ao longo do tempo. Os valores de L^* , a^* , b^* e ângulo Hue variaram pouco ao longo do tempo nos sorvetes adicionados de C-FC (Figura 1) e nos sorvetes controle (Figura 2). Destes quatro parâmetros, os de maior importância neste caso são os valores de b^* e ângulo Hue. Na Figura 1 observa-se que os valores de b^* são negativos, os quais indicam a cor azul dos sorvetes, enquanto que na Figura 2, os valores de b^* encontram-se na faixa positiva, indicando a presença da cor amarela nos sorvetes controle. Com relação ao ângulo Hue, o qual indica o ângulo da cor, os valores encontrados para os sorvetes com C-FC foram em torno de 260° , enquanto que os valores para os sorvetes controle foram em torno de 102° . Segundo Minolta (2007), um ângulo Hue de 270° indica a cor azul, enquanto que ângulo de 90° indica a cor amarela, portanto

os valores obtidos estão de acordo com a cor observada visualmente, tanto dos sorvetes com adição de C-FC como dos sorvetes controle.

Figura 1 – Parâmetros de estabilidade da cor ao longo do tempo dos sorvetes adicionados de C-ficocianina.

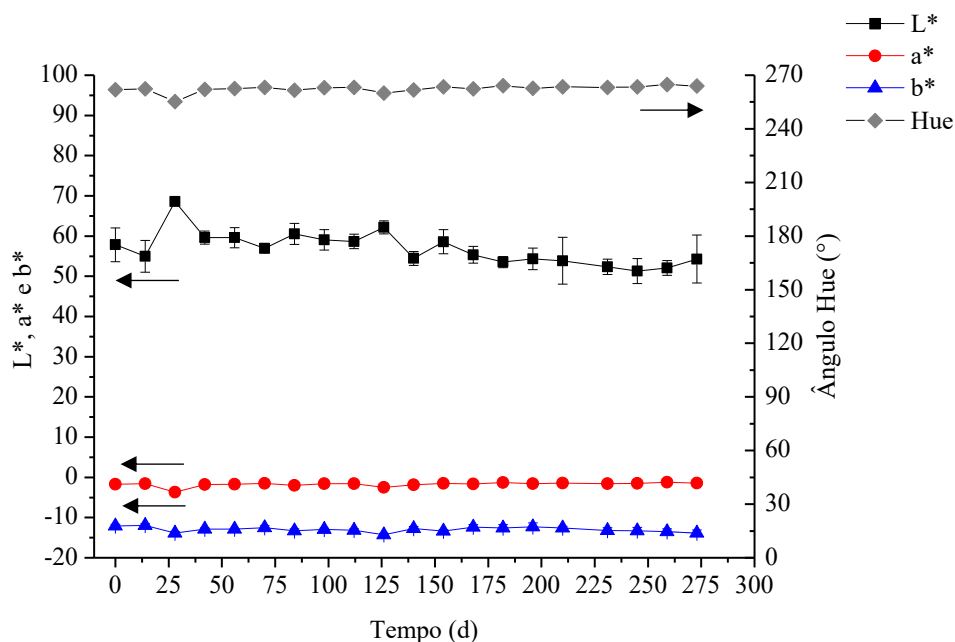
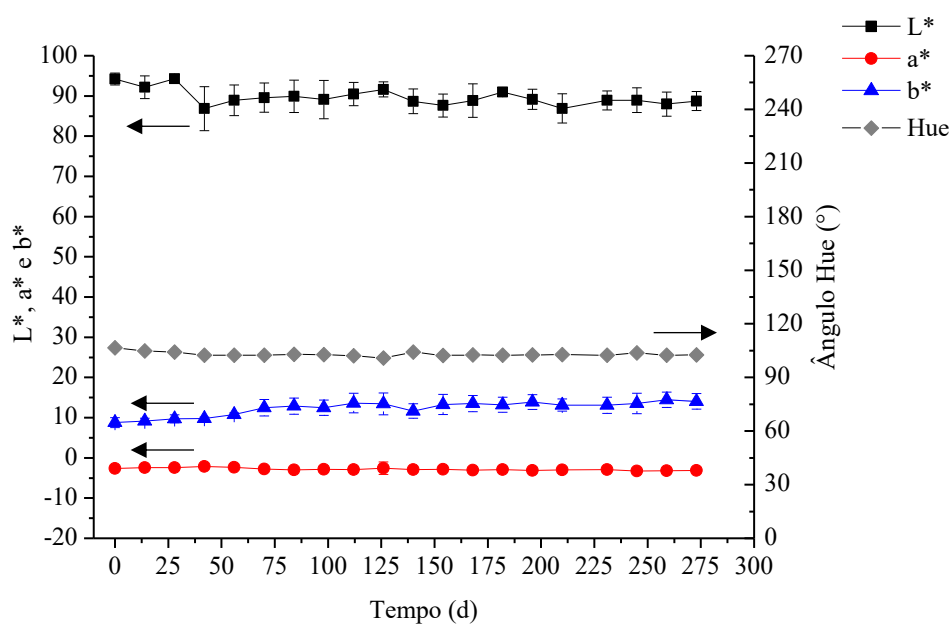


Figura 2 – Parâmetros de estabilidade da cor ao longo do tempo dos sorvetes controle (sem adição de C-ficocianina).



Com relação à diferença de cor (ΔE), os sorvetes adicionados de C-FC apresentaram valores de 4,15 e 7,89 nos tempos 14 e 273 d, respectivamente, enquanto que os sorvetes controle apresentaram valores de 2,28 e 29,21, respectivamente. Estes resultados são outro indicativo da estabilidade da cor da C-FC nos produtos, uma vez que a diferença entre os valores de ΔE em 14 e 273 d foi muito inferior para os sorvetes contendo o biocorante quando comparada à apresentada pelos controles.

De forma geral, devido aos valores praticamente constantes de todos os parâmetros de cor, pode-se concluir que a cor da C-FC nos sorvetes foi estável no período de 273 d. Considerando que a validade de gelados comestíveis varia entre 6 meses e 2 anos, este estudo mostra que a C-FC pode servir como corante alimentício neste tipo de alimento, apresentando perda de cor insignificante no período de 9 meses.

No que diz respeito a estabilidade da cor da C-FC quando aplicada em matriz alimentícia, apenas os estudos de Jespersen et al. (2005), Dewi, Kurniasih e Purnamayati (2018) e Mohammadi-Gouraji, Soleimani-Zad e Ghiaci (2019) foram encontrados. Jespersen et al. (2005) consideraram a C-FC mais versátil do que corantes como o gardênia azul e o índigo, apresentando cor azul brilhante quando aplicada em balas de goma e no revestimento de doces. No entanto, os doces contendo C-FC perderam a cor quando expostos à luz por 24 h. Dewi, Kurniasih e Purnamayati (2018) aplicaram diferentes concentrações (0, 1, 3 e 5 %) de C-FC microencapsulada em balas de goma, e verificaram através do uso de colorímetro que a cor azul foi intensificada proporcionalmente com o aumento da concentração de C-FC adicionada. Os valores dos parâmetros L^* , a^* e b^* foram de 38,55, -0,29 e -1,30 para as balas com 1% de C-FC; 40,74, 0,62 e -4,70 para as balas com 3% de C-FC e 41,20, 1,06 e -7,29 para as balas com 5% de C-FC, respectivamente (DEWI; KURNIASIH; PURNAMAYATI, 2018). Os valores de L^* e b^* obtidos no presente trabalho foram mais elevados, indicando que a cor azul estava presente em maior intensidade nos sorvetes.

No estudo de Mohammadi-Gouraji, Soleimani-Zad e Ghiaci (2019), C-FC purificada por sistema aquoso bifásico foi adicionada em iogurtes nas concentrações de 0, 2, 4 e 8 % (m/m) e as propriedades físico-químicas e antibacteriológicas dos produtos foram avaliadas. Os autores também não observaram alteração na cor azul ao longo de 21 d (vida de prateleira média de iogurtes) e a luminosidade dos iogurtes diminuiu com o aumento da concentração de C-FC adicionada, como esperado. No primeiro dia em que a cor dos iogurtes contendo C-FC foi avaliada, estes apresentaram valores de L^* na faixa de 56,52 à 66,36, os quais estão de acordo com os obtidos no presente estudo durante todo o período avaliado (Figura 1); os valores de a^* , os quais quando negativos indicam a presença da cor verde, foram

entre -4,82 e -9,91 nos iogurtes, superiores aos encontrados para os sorvetes; e os valores de b^* , os quais indicam a presença da cor azul quando negativos, foram de 0,47 a -6,29 nos iogurtes, valores inferiores aos obtidos no presente estudo, os quais variaram entre -11,93 e -13,89. Isto indica que, novamente, a cor azul era mais intensa nos sorvetes, e pode ser explicado porque nos estudos de Dewi, Kurniasih e Purnamayati (2018) e Mohammadi-Gouraji, Soleimani-Zad e Ghiaci (2019), a C-FC foi adicionada nos produtos microencapsulada por spray-dryer e liofilizada, respectivamente, enquanto que no presente estudo, foi adicionado o extrato aquoso de C-FC. No estudo de Selig et al. (2018), foi avaliada a cor de extrato aquoso comercial de C-FC, chamado “Spirulina Blue” da empresa DDW The Color House®, o qual apresentou valores de L^* , a^* e b^* de 42, -3,5 e -15, respectivamente. Estes resultados foram próximos aos do presente trabalho, sendo que o valor de b^* foi superior aos obtidos para os sorvetes, como era esperado, uma vez que nos sorvetes a C-FC encontra-se distribuída em uma matriz complexa e opaca. Diante destas observações, pode-se concluir que a secagem do extrato de C-FC pode acarretar na perda de cor ou intensidade da cor da proteína, e sua adição em matrizes alimentícias em forma de extrato aquoso é recomendada para preservação da cor do extrato e dos produtos.

3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS SORVETES APÓS DIGESTÃO *IN VITRO*

A atividade antioxidante dos sorvetes adicionados de C-FC e controle, após a digestão *in vitro*, foi avaliada pelos métodos de captura do radical $ABTS^{\bullet+}$ e capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC) (Tabela 2).

Tabela 2 – Atividade antioxidante dos sorvetes com e sem C-FC, após digestão *in vitro*, frente aos radicais $ABTS^{\bullet+}$ ($\mu\text{mol}_{\text{TE}}\cdot\text{g}^{-1}$) e peroxila (ORAC, $\mu\text{mol}_{\text{TE}}\cdot\text{g}^{-1}$).

Amostra	$ABTS^{\bullet+}$	ORAC
Sorvetes com C-FC após digestão <i>in vitro</i>	$1362,62 \pm 115,12^a$	$134,63 \pm 15,68^a$
Sorvetes controle após digestão <i>in vitro</i>	$105,09 \pm 4,02^b$	$78,78 \pm 6,71^b$

Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias (Teste-t, $p < 0,05$) na mesma coluna.

Park et al. (2018) estudaram a correlação entre a cor e a quantidade de certos pigmentos em extratos comerciais de *Spirulina* em pó e notaram que conforme o valor de b^* diminuía nos extratos, a quantidade de C-FC na *Spirulina* e a atividade antioxidante do extrato de C-FC pelo método de ABTS aumentava. A correlação entre os valores negativos de b^* e a

presença de C-FC e atividade antioxidante também pode ser observada no presente estudo, uma vez que a capacidade antioxidante tanto por ABTS como por ORAC dos sorvetes adicionados de C-FC digeridos foram em torno de 13 e 2 vezes maiores do que a dos sorvetes controle digeridos, respectivamente. Durante a digestão simulada, adicionam-se enzimas proteolíticas, como a pepsina, para auxiliar na hidrólise de proteínas. Os resultados obtidos indicam que durante a digestão dos sorvetes podem ter sido liberados peptídeos bioativos tanto da C-FC como dos componentes do sorvete.

Recentemente, há grande interesse na produção de peptídeos bioativos através da hidrólise proteica (BAMDAD; CHEN, 2013), uma vez que estes peptídeos podem apresentar atividade antioxidante, anti-hipertensiva, anticancerígena e imunomodulatória (SAMARANAYAKA; LI-CHAN, 2011). Minic et al. (2016) estudaram a estrutura e bioatividade dos cromopeptídeos gerados através da hidrólise da C-FC pela digestão *in vitro* utilizando a enzima pepsina em fluido gástrico simulado. Os resultados mostraram que os cromopeptídeos purificados apresentaram atividade anticancerígena e queladora de metais Cu^+ , além de capacidade antioxidante frente ao radical peroxila, de em torno de 8,2 – 13,2 TE ($\mu\text{M}_{\text{trolox}} \cdot \mu\text{M}_{\text{cromopeptídeo}}^{-1}$). No entanto, a atividade antioxidante da C-FC digerida (sem separar os cromopeptídeos) foi de 25,4 TE, cerca de 2,4 vezes superior à dos cromopeptídeos purificados, indicando que a fração de apoproteína da C-FC também apresenta atividade antioxidante significativa. Sendo assim, é provável que, no presente trabalho, tanto os peptídeos com cromóforos ligados covalentemente, como a fração apoproteica da C-FC, contribuíram para a atividade antioxidante após a digestão simulada dos sorvetes contendo C-FC.

No estudo de Pérez-Vega et al. (2013), foram obtidos peptídeos através da simulação da digestão gastrointestinal de pepino-do-mar, os quais apresentaram atividades antioxidantes pelo método de ORAC entre 390,00 – 4400,00 $\mu\text{mol}_{\text{TE}} \cdot \text{g}^{-1}$, valores superiores aos obtidos neste trabalho. A digestão de peptídeos derivados da caseína por fluido gastrointestinal simulado resultou em atividades antioxidantes por ORAC mais baixas quando comparadas as obtidas pelos peptídeos não-digeridos, de 2500,00 – 7600,00 $\mu\text{mol}_{\text{TE}} \cdot \text{g}^{-1}$ (CHEN; LI, 2012).

A atividade antioxidante de peptídeos de lisozima de clara de ovo obtidos pela hidrólise com alcalase foi investigada por You et al. (2010), obtendo em torno de 380,00 – 2770,00 $\mu\text{mol}_{\text{TE}} \cdot \text{g}^{-1}$ pelo método ABTS e 1400,00 – 3770,00 $\mu\text{mol}_{\text{TE}} \cdot \text{g}^{-1}$ pelo método de ORAC. No presente estudo, o sorvete digerido contendo C-FC apresentou 1362,62 $\mu\text{mol}_{\text{TE}} \cdot \text{g}^{-1}$ pelo método de ABTS e 134,63 $\mu\text{mol}_{\text{TE}} \cdot \text{mg}^{-1}$ pelo método de ORAC, porém, ressalta-se que a concentração de C-FC no sorvete era baixa (0,25 $\text{mg}_{\text{C-FC}} \cdot \text{mL}_{\text{sorvete}}^{-1}$), e as análises foram realizadas utilizando os sorvetes em si como amostras, enquanto que nos

estudos mencionados, a atividade antioxidante foi realizada diretamente nos extratos proteicos purificados. Vale destacar também que os sorvetes já tinham cerca de 6 meses de estocagem quando sofreram o processo de digestão *in vitro*, o que indica que, possivelmente, a atividade antioxidante era ainda maior nos primeiros dias após a adição da C-FC nos sorvetes.

Existem poucos trabalhos na literatura avaliando a atividade antioxidante da C-FC em alimentos, e os estudos encontrados investigaram apenas o efeito de proteção da C-FC frente à oxidação lipídica (BERTOLIN et al., 2011a, 2011b; SOUZA et al., 2009). No entanto, existe um interesse crescente por parte dos consumidores por alimentos mais naturais e funcionais, que exerçam efeitos biológicos benéficos ao organismo. No presente trabalho, foi investigada pela primeira vez a atividade antioxidante de sorvetes à base de leite contendo C-FC após simulação de processo de digestão gastrointestinal dos produtos, e os resultados mostraram que a aplicação deste biocorante propiciou um aumento significativo na atividade antioxidante com relação ao controle. Assim, este trabalho não só apresenta a aplicação de um corante azul natural, o qual é consideravelmente menos abundante do que pigmentos laranjas ou amarelos (NEWSOME; CULVER; VAN BREEMEN, 2014), de forma estável em uma matriz complexa alimentar, mas também demonstra a funcionalidade deste corante após o processo digestivo *in vitro*. Isso é importante sobretudo do ponto de vista industrial, uma vez que propicia a formulação de novos produtos que atraiam a atenção dos consumidores tanto pela sua cor como por suas atividades biológicas.

4 CONCLUSÃO

A cor dos sorvetes adicionados de C-ficocianina foi estável durante 273 d (9 meses), apresentando perda de cor insignificante durante todo o período. Após a digestão *in vitro* utilizando pepsina, os sorvetes adicionados do biocorante apresentaram atividades antioxidantes em torno de 13 e 2 vezes superiores às do sorvete controle para os métodos ABTS e ORAC, respectivamente. Este trabalho demonstra a utilização do extrato de C-FC extraído a partir da biomassa úmida de *S. platensis* como corante azul alimentar em sorvetes, além de destacar o efeito antioxidante dos sorvetes após o processo de digestão simulada. Os resultados apresentados podem ser importantes pontos de partida para a formulação de novos produtos contendo um corante azul natural com apelo funcional.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). **Standard Test Methods for Apparent Density, Bulk Factor, and Pourability of Plastic Materials**. 2017.

BAMDAD, F.; CHEN, L. Antioxidant capacities of fractionated barley hordein hydrolysates in relation to peptide structures. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 57, n. 3, p. 493–503, 2013.

BATISTA, A. P.; RAYMUNDO, A.; SOUSA, I.; EMPIS, J. Rheological characterization of coloured oil-in-water food emulsions with lutein and phycoerythrin added to the oil and aqueous phases. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 1, p. 44–52, 2006.

BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **The Journal of Cell Biology**, v. 58, p. 419–435, 1973.

BERNI, P.; CHITCHUMROONCHOKCHAI, C.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; MOURA, F. F.; FAILLA, M. L. Comparison of content and in vitro bioaccessibility of provitamin A carotenoids in home cooked and commercially processed orange fleshed sweet potato (*Ipomea batatas Lam*). **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 70, p. 1–8, 2015.

BERTOLIN, T. E.; GUARIENTI, C.; FARIAS, D.; SOUZA, F. T.; GUTKOSKI, L. C.; COLLA, L. M. Efeito antioxidante da ficocianina em pescado salgado-seco. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 4, p. 751–757, 2011a.

BERTOLIN, T. E.; MARGARITES, A. C. F.; GIACOMELLI, B.; FRUETTI, A.; HORST, C.; TEIXEIRA, D. M. D. F. Ficocianina, tocoferol e ácido ascórbico na prevenção da oxidação lipídica em charque. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 4, p. 301–307, 2011b.

BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. C-phycoerythrin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 275, n. 1, p. 20–25, 2000.

BRAGA, A. R. C.; MESQUITA, L. M. DE S.; MARTINS, P. L. G.; HABU, S.; DE ROSSO, V. V. *Lactobacillus* fermentation of jussara pulp leads to the enzymatic conversion of anthocyanins increasing antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 69, p. 162–170, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 266, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para gelados comestíveis e preparados para gelados comestíveis. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 2005.

CHEN, M.; LI, B. The effect of molecular weights on the survivability of casein-derived antioxidant peptides after the simulated gastrointestinal digestion. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 16, p. 341–348, 2012.

CHERDKIATIKUL, T.; SUWANWONG, Y. Production of the α and β subunits of *Spirulina* allophycoerythrin and C-phycoerythrin in *Escherichia coli*: A comparative study of their antioxidant activities. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 19, n. 6, p. 959–965, 2014.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603–607, 2002.

DEWI, E. N.; KURNIASIH, R. A.; PURNAMAYATI, L. The application of microencapsulated phycocyanin as a blue natural colorant to the quality of jelly candy. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 116, 2018.

ERIKSEN, N. T. Production of phycocyanin - A pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 1, p. 1–14, 2008.

FIGUEIRA, F. S. **Purificação de C-ficocianina e sua incorporação em nanofibras**. 2014. 141 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

GUAN, X. Y.; ZHANG, W. J.; ZHANG, X. W.; LI, Y. X.; WANG, J. F.; LIN, H. Z.; TANG, X. X.; QIN, S. A potent anti-oxidant property: Fluorescent recombinant α -phycocyanin of *Spirulina*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 4, p. 1093–1100, 2009.

HIRATA, T.; TANAKA, M.; OOIKE, M.; TSUNOMURA, T.; SAKAGUCHI, M. Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, p. 435–439, 2000.

JESPERSEN, L.; STRØMDAHL, L. D.; OLSEN, K.; SKIBSTED, L. H. Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. **European Food Research and Technology**, v. 220, n. 3–4, p. 261–266, 2005.

KUDDUS, M.; SINGH, P.; THOMAS, G.; AL-HAZIMI, A. Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycocyanin. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

LIAO, G.; GAO, B.; GAO, Y.; YANG, X.; CHENG, X.; OU, Y. Phycocyanin inhibits tumorigenic potential of pancreatic cancer cells: role of apoptosis and autophagy. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2016.

MINIC, S. L.; STANIC-VUCINIC, D.; MIHAILOVIC, J.; KRSTIC, M.; NIKOLIC, M. R.; CIRKOVIC VELICKOVIC, T. Digestion by pepsin releases biologically active chromopeptides from C-phycocyanin, a blue-colored biliprotein of microalga *Spirulina*. **Journal of Proteomics**, v. 147, p. 132–139, 2016.

MINOLTA, K. **Precise color communication: Color control from perception to instrumentation**. [S.I: S.N.], 2007.

MOHAMMADI-GOURAJI, E.; SOLEIMANIAN-ZAD, S.; GHIACI, M. Phycocyanin-enriched yogurt and its antibacterial and physicochemical properties during 21 days of storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 102, p. 230–236, 2019.

MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Strategy for a protein purification design using C-phycocyanin extract. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5312–5317, 2009.

NEWSOME, A. G.; CULVER, C. A.; VAN BREEMEN, R. B. Nature's palette: the search

for natural blue colorants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 28, p. 6498–6511, 2014.

PARK, W. S.; KIM, H. J.; LI, M.; LIM, D. H.; KIM, J.; KWAK, S. S.; KANG, C. M.; FERRUZZI, M. G.; AHN, M. J. Two classes of pigments, carotenoids and C-phycoerythrin, in *Spirulina* powder and their antioxidant activities. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1–11, 2018.

PÉREZ-VEGA, J. A.; OLIVERA-CASTILLO, L.; GÓMEZ-RUIZ, J. ÁNGEL; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. Release of multifunctional peptides by gastrointestinal digestion of sea cucumber (*Isostichopus badionotus*). **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 2, p. 869–877, 2013.

PLEONSIL, P.; SOOGARUN, S.; SUWANWONG, Y. Anti-oxidant activity of holo- and apo-C-phycoerythrin and their protective effects on human erythrocytes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 393–398, 2013.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.

REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Repeated batch cultivation of the microalga *Spirulina platensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 937–943, 2006.

RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L. R. B.; FARIA, A. F.; MERCADANTE, A. Z. Microcapsules containing antioxidant molecules as scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 704–711, 2012.

ROMÁN, R. B.; ALVÁREZ-PEZ, J. M.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; GRIMA, E. M. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. **Journal of Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 73–85, 2002.

ROMAY, C.; LEDÓN, N.; GONZÁLEZ, R. Further studies on anti-inflammatory activity of phycoerythrin in some animal models of inflammation. **Inflammation Research**, v. 47, n. 8, p. 334–338, 1998.

SALA, L.; ORES, J. C.; MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Simultaneous production of phycobiliproteins and carbonic anhydrase by *Spirulina platensis* LEB-52. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 96, n. 9, p. 1896–1902, 2018.

SALA, L.; MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Cell pretreatment with ethylenediaminetetraacetic acid for selective extraction of C-phycoerythrin with food grade purity. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 5, p. 1261–1268, 2018.

SAMARANAYAKA, A. G. P.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 4, p. 229–254, 2011.

SELIG, M. J.; MALCHIONE, N. M.; GAMALELDIN, S.; PADILLA-ZAKOUR, O. I.; ABBASPOURRAD, A. Protection of blue color in a spirulina derived phycoerythrin extract from proteolytic and thermal degradation via complexation with beet-pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 74, p. 46–52, 2018.

- SILVA, E. F.; FIGUEIRA, F. S.; CAÑEDO, A. D.; MACHADO, K. S.; SALGADO, M. T. S. F.; SILVA, T. K.; WAGNER, E. F.; MATTOZO, F. H.; LIMA, A.; SALES-NETO, J. M.; FERREIRA, V. U.; COMITRE, A. A.; MASCARENHAS, S. R.; KALIL, S. J.; VOTTO, A. P. S. C-phycoyanin to overcome the multidrug resistance phenotype in human erythroleukemias with or without interaction with ABC transporters. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, p. 532–542, 2018.
- SONANI, R. R.; PATEL, S.; BHASTANA, B.; JAKHARIA, K.; CHAUBEY, M. G.; SINGH, N. K.; MADAMWAR, D. Purification and antioxidant activity of phycoyanin from *Synechococcus* sp. R42DM isolated from industrially polluted site. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 325–331, 2017.
- SØRENSEN, L.; HANTKE, A.; ERIKSEN, N. T. Purification of the photosynthetic pigment C-phycoyanin from heterotrophic *Galdieria sulphuraria*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 12, p. 2933–2938, 2013.
- SOUZA, F. T.; MARGARITES, A. C.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E. Avaliação do potencial antioxidante da ficocianina em sistema lipídico óleo de soja e azeite de oliva. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 3, p. 275–279, 2009.
- STOCKER, R.; GLAZER, A. N.; AMES, B. N. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 16, p. 5918–22, 1987.
- YOU, S. J.; UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E.; WU, J. Multifunctional peptides from egg white lysozyme. **Food Research International**, v. 43, n. 3, p. 848–855, 2010.
- ZARROUK, C. **Contribution a l'étude d'une cianophyce: Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima***. 1966. 83 f. Ph.D. thesis - Faculte des Sciences, Universite de Paris, 1966.

CAPÍTULO IV
CONCLUSÃO GERAL

4 CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho, a C-ficocianina extraída seletivamente a partir da biomassa úmida de *Spirulina platensis* LEB-52 foi purificada por diferentes técnicas. A cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH foi mais eficiente em purificar a proteína em comparação à eluição com gradiente salino, uma vez que apresentou valores de fator de purificação e recuperação mais elevados. Portanto diferentes parâmetros como o pH de alimentação, a adição de sal no tampão de eluição, e o uso de diferentes tampões e volumes de eluição foram estudados a fim de obter a maior pureza e recuperação possível utilizando eluição por gradiente de pH. Os melhores resultados foram obtidos utilizando a seguinte condição cromatográfica: equilíbrio e lavagem com tampão Tris-HCl 0,025 mol.L⁻¹ pH 6,5, alimentação de C-ficocianina extraída da biomassa úmida em pH 6,5 e eluição combinando degrau com 0,08 mol.L⁻¹ de NaCl em Tris-HCl 0,025 mol.L⁻¹ pH 6,5 e gradiente de pH com tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ pH 6,2 – 3,0. Este processo resultou em duas frações de C-ficocianina com purezas de 4,2 e 3,5 e recuperações de 32,6 e 49,5%, respectivamente, em uma única etapa de purificação. Portanto, a técnica de cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH é eficiente em purificar C-ficocianina extraída da biomassa úmida, resultando em dois produtos de elevada pureza e recuperação global.

Membranas de polietersulfona de massas molares de corte de 30, 50 e 100 kDa foram estudadas na purificação de C-ficocianina extraída da biomassa úmida de *Spirulina platensis* LEB-52. A membrana de 50 kDa apresentou fator de purificação de 1,5 e recuperação de 85,8 %, sendo os resultados estatisticamente iguais aos obtidos para a membrana de 30 kDa. Portanto, a membrana de 50 kDa foi utilizada nos *designs* de purificação de C-ficocianina, os quais envolveram as técnicas de precipitação fracionada com sulfato de amônio, diafiltração/ultrafiltração e cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH, com o intuito de obter diferentes purezas dessa proteína. O *design* considerado mais vantajoso consistiu na aplicação de ultrafiltração seguida de cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH, o que resultou em C-ficocianina com pureza de 3,9 e recuperação de 79,7 %. No entanto, dependendo da aplicação de C-ficocianina desejada, outros *designs* de purificação podem ser utilizados. O processo envolvendo precipitação fracionada com sulfato de amônio e diálise resultou na maior recuperação (de 86,8 %) e pureza de 1,6, que possibilita a aplicação da proteína como corante em cosméticos. Além disso, foi avaliada a capacidade antioxidante do extrato bruto e purificado de C-FC. O extrato de pureza igual a 3,9 apresentou as maiores capacidades de sequestro do radical ABTS^{•+} (161,66 μmol_{TE}.g⁻¹) e de radicais

peroxila ($1211,41 \mu\text{mol}_{\text{TE}}\cdot\text{g}^{-1}$), indicando que o grau de pureza de C-ficocianina tem relação com a atividade antioxidante desta biomolécula.

Com o intuito de preencher a lacuna na literatura com relação à estabilidade da cor da C-ficocianina quando aplicada em matriz alimentícia, esta ficobiliproteína foi extraída seletivamente a partir da biomassa úmida, concentrada por ultrafiltração e aplicada em sorvetes à base de leite. Os sorvetes adicionados do biocorante apresentaram cor estável durante 273 d, apresentando ângulo Hue na região indicativa da cor azul. As atividades antioxidantes dos sorvetes adicionados de C-ficocianina foram avaliadas pelos métodos de ABTS e ORAC após digestão gastrointestinal simulada utilizando a enzima pepsina. Os sorvetes adicionados do biocorante digeridos apresentaram atividades de $1362,62$ e $134,63 \mu\text{mol}_{\text{TE}}\cdot\text{g}^{-1}$ frente aos radicais $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e peroxila, respectivamente, valores 13 e 2 vezes superiores aos obtidos para os sorvetes controle digeridos. Portanto, conclui-se que, no que diz respeito à estabilidade da cor, a aplicação de C-ficocianina extraída a partir da biomassa úmida de *S. platensis* em sorvetes é adequada, e ainda pode ocasionar na produção de peptídeos bioativos após digerida, o que eleva o apelo funcional dos sorvetes.

Deste modo, neste trabalho foi possível desenvolver processos de purificação de C-FC que resultam em elevadas purezas e recuperações, além de ter sido demonstrada a estabilidade da cor deste corante quando aplicada em sorvetes à base de leite e a sua atividade biológica quando purificada e quando adicionada neste alimento.

5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Purificar a C-ficocianina extraída seletivamente a partir da biomassa úmida de *S. platensis* LEB-52 por cromatografia de troca iônica em leito expandido com eluição por gradiente de pH;
- Estudar a estabilidade e a organização estrutural da C-ficocianina extraída seletivamente em diferentes valores de pH;
- Estudar os parâmetros operacionais da diafiltração/ultrafiltração da C-ficocianina extraída seletivamente.

CAPÍTULO V
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALDE, J.; BETANCOURT, L.; TORRES, E.; CID, A.; BARWELL, C. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. **Plant Science**, v. 136, n. 1, p. 109–120, 1998.

AHAMED, T.; NFOR, B. K.; VERHAERT, P. D. E. M.; VAN DEDEM, G. W. K.; VAN DER WIELEN, L. A. M.; EPPINK, M. H. M.; VAN DE SANDT, E. J. A. X.; OTTENS, M. pH-gradient ion-exchange chromatography: An analytical tool for design and optimization of protein separations. **Journal of Chromatography A**, v. 1164, n. 1–2, p. 181–188, 2007.

AJAYAN, K. V.; SELVARAJU, M.; THIRUGNANAMOORTHY, K. Enrichment of chlorophyll and phycobiliproteins in *Spirulina platensis* by the use of reflector light and nitrogen sources: An in-vitro study. **Biomass and Bioenergy**, v. 47, p. 436–441, 2012.

AMBROZOVA, J. V.; MISURCOVA, L.; VICHA, R.; MACHU, L.; SAMEK, D.; BARON, M.; MLCEK, J.; SOCHOR, J.; JURIKOVA, T. Influence of extractive solvents on lipid and fatty acids content of edible freshwater algal and seaweed products, the green microalga *Chlorella kessleri* and the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 2344–2360, 2014.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). **Standard Test Methods for Apparent Density, Bulk Factor, and Pourability of Plastic Materials**. 2017.

ANDERSEN, T.; PEPAJ, M.; TRONES, R.; LUNDANES, E.; GREIBROKK, T. Isoelectric point separation of proteins by capillary pH-gradient ion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, n. 2, p. 217–226, 2004.

ANTELO, F. S.; ANSCHAU, A.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* in conventional and integrated aqueous two-phase systems. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 5, p. 921–926, 2010.

BAMDAD, F.; CHEN, L. Antioxidant capacities of fractionated barley hordein hydrolysates in relation to peptide structures. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 57, n. 3, p. 493–503, 2013.

BATISTA, A. P.; RAYMUNDO, A.; SOUSA, I.; EMPIS, J. Rheological characterization of coloured oil-in-water food emulsions with lutein and phycocyanin added to the oil and aqueous phases. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 1, p. 44–52, 2006.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 207–210, 2007.

BENEDETTI, S.; BENVENUTI, F.; SCOGLIO, S.; CANESTRARI, F. Oxygen radical absorbance capacity of phycocyanin and phycocyanobilin from the food supplement *Aphanizomenon flos-aquae*. **Journal of medical food**, v. 13, p. 223–227, 2010.

BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complementary chromatic adaption in a filamentous blue-green alga. **The Journal of Cell Biology**, v. 58, p. 419–435, 1973.

BERMEJO, P.; PIÑERO, E.; VILLAR, Á. M. Iron-chelating ability and antioxidant

- properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v. 110, n. 2, p. 436–445, 2008.
- BERMEJO, R.; RAMOS, A. Pilot scale recovery of phycocyanin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. **Chromatographia**, v. 75, n. 5–6, p. 195–204, 2012.
- BERNI, P.; CHITCHUMROONCHOKCHAI, C.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; MOURA, F. F.; FAILLA, M. L. Comparison of content and in vitro bioaccessibility of provitamin A carotenoids in home cooked and commercially processed orange fleshed sweet potato (*Ipomea batatas* Lam). **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 70, p. 1–8, 2015.
- BERTOLIN, T. E.; GUARIENTI, C.; FARIAS, D.; SOUZA, F. T.; GUTKOSKI, L. C.; COLLA, L. M. Efeito antioxidante da ficocianina em pescado salgado-seco. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, n. 4, p. 751–757, 2011a.
- BERTOLIN, T. E.; MARGARITES, A. C. F.; GIACOMELLI, B.; FRUETTI, A.; HORST, C.; TEIXEIRA, D. M. D. F. Ficocianina, tocoferol e ácido ascórbico na prevenção da oxidação lipídica em charque. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 4, p. 301–307, 2011b.
- BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. C-Phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger *in vivo* and *in vitro*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 275, n. 1, p. 20–25, 2000.
- BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection against oxidative damage to DNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, n. 2, p. 262–266, 2001.
- BÓDALO, A.; GÓMEZ, J. L.; GÓMEZ, E.; MÁXIMO, M. F.; MONTIEL, M. C. Study of L-aminoacylase deactivation in an ultrafiltration membrane reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2–3, p. 261–266, 2004.
- BRAGA, A. R. C.; MESQUITA, L. M. DE S.; MARTINS, P. L. G.; HABU, S.; DE ROSSO, V. V. *Lactobacillus* fermentation of jussara pulp leads to the enzymatic conversion of anthocyanins increasing antioxidant activity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 69, p. 162–170, 2018.
- BRAGA, A. R. C.; FIGUEIRA, F. DA S.; SILVEIRA, J. T. DA; MORAIS, M. G. DE; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Improvement of thermal stability of C-phycocyanin by nanofiber and preservative agents. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 40, n. 6, p. 1264–1269, 2016.
- BRANDELLI, A.; SALA, L.; KALIL, S. J. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. **Food Research International**, v. 73, p. 3–12, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Novos ingredientes aprovados. 2018. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/novos-ingredientes-aprovados>. Acesso em: 18 de mar. 2018, 19:38:00.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 3, de 15 de janeiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico sobre atribuição de aditivos e

seus limites máximos para a Categoria de Alimentos 3: Gelados Comestíveis. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 266, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para gelados comestíveis e preparados para gelados comestíveis. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, 2005.

CAO, G.; ALESSIO, H. M.; CUTLER, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 14, n. 3, p. 303–311, 1993.

CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; LOHA, V.; TIA, S.; BUNNAG, B. Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 14, p. 7159–7164, 2011.

CHARCOSSET, C. Membrane processes in biotechnology: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 482–492, 2006.

CHASE, H. A. Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds. **Trends in Biotechnology**, v. 12, n. 8, p. 296–303, 1994.

CHEN, C. Y.; KAO, P. C.; TAN, C. H.; SHOW, P. L.; CHEAH, W. Y.; LEE, W. L.; LING, T. C.; CHANG, J. S. Using an innovative pH-stat CO₂ feeding strategy to enhance cell growth and C-phycocyanin production from *Spirulina platensis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 112, p. 78–85, 2016.

CHEN, M.; LI, B. The effect of molecular weights on the survivability of casein-derived antioxidant peptides after the simulated gastrointestinal digestion. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 16, p. 341–348, 2012.

CHEN, T.; WONG, Y. S. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of selenium-containing phycocyanin from selenium-enriched *Spirulina platensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 12, p. 4352–4358, 2008.

CHEN, X.; WU, M.; YANG, Q.; WANG, S. Preparation, characterization of food grade phycobiliproteins from *Porphyra haitanensis* and the application in liposome-meat system. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 468–474, 2017.

CHERDKIATIKUL, T.; SUWANWONG, Y. Production of the α and β subunits of *Spirulina* allophycocyanin and C-phycocyanin in *Escherichia coli*: A comparative study of their antioxidant activities. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 19, n. 6, p. 959–965, 2014.

CHETHANA, S.; NAYAK, C. A.; MADHUSUDHAN, M. C.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Single step aqueous two-phase extraction for downstream processing of C-phycocyanin from *Spirulina platensis*. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 4, p. 2415–2421, 2015.

CODE OF FEDERAL REGULATIONS (Governo dos Estados Unidos). 2018. Disponível em: <http://www.ecfr.gov>. Acesso em: 14 de mar. 2018, 20:41:00.

COHEN, Z. The chemical of *Spirulina*. In: VONSHAK, A. (Ed.). ***Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology***. [S.I.]: CRC Press, 1997. Cap.

10.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 603–607, 2002.

CUI, Z. Protein separation using ultrafiltration — an example of multi-scale complex systems. **China Particuology**, v. 3, n. 6, p. 343–348, 2005.

DAINIPPON INK & CHEMICALS. 2018. Disponível em: <http://www.dlt-spl.co.jp/business/en/spirulina/linablue.html>. Acesso em: 14 de mar. 2018, 20:51:00.

DELHI NUTRACEUTICALS. 2019. Disponível em: <http://www.delhinutraceuticals.com/phycoyanin.html>. Acesso em: 5 de mar. 2019, 14:18:00.

DENIZ, I.; OZEN, M. O.; YESIL-CELIK TAS, O. Supercritical fluid extraction of phycocyanin and investigation of cytotoxicity on human lung cancer cells. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 108, p. 13–18, 2016.

DEWI, E. N.; KURNIASIH, R. A.; PURNAMAYATI, L. The application of microencapsulated phycocyanin as a blue natural colorant to the quality of jelly candy. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 116, 2018.

DEY, S.; RATHOD, V. K. Ultrasound assisted extraction of β -carotene from *Spirulina platensis*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 271–276, 2013.

DING, Y.; TIAN, Y.; LI, Z.; WANG, H.; CHEN, L. Microfiltration (MF) membrane fouling potential evaluation of protein with different ion strengths and divalent cations based on extended DLVO theory. **Desalination**, v. 331, p. 62–68, 2013.

DOONAN, S. Bulk precipitation by fractional precipitation. In: CUTLER, P. (Ed.). **Methods in Molecular Biology - Protein purification protocols**. [S.I.]: Humana Press, 2004. Cap. 13.

DOONAN, S.; CUTLER, P. General strategies. In: CUTLER, P. (Ed.). **Methods in Molecular Biology - Protein purification protocols**. [S.I.]: Humana Press, 2004. Cap. 1.

EARTHRISE. 2018. Disponível em: <http://earthrise.com/linablue/stability-properties/>. Acesso em: 14 de mar. 2018, 15:25:00.

ENGLARD, S.; SEIFTER, S. Precipitation techniques. **Methods in Enzymology**, v. 182, p. 285–300, 1990.

ERIKSEN, N. T. Production of phycocyanin - A pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 1, p. 1–14, 2008.

EVANS, D. R. H.; ROMERO, J. K.; WESTOBY, M. Concentration of proteins and removal of solutes. In: **Methods in Enzymology**, v. 463, p. 97–120, 2009.

FERNÁNDEZ-ROJAS, B.; MEDINA-CAMPOS, O. N.; HERNÁNDEZ-PANDO, R.; NEGRETTE-GUZMÁN, M.; HUERTA-YEPEZ, S.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. C-phycoyanin prevents cisplatin-induced nephrotoxicity through inhibition of oxidative stress.

Food and Function, v. 5, n. 3, p. 480–490, 2014.

FIGUEIRA, F. S. **Purificação de C-ficocianina e sua incorporação em nanofibras**. 2014. 141 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

FOLEY, G. Water usage in variable volume diafiltration: comparison with ultrafiltration and constant volume diafiltration. **Desalination**, v. 196, n. 1–3, p. 160–163, 2006.

GAD, A. S.; KHADRAWY, Y. A.; EL-NEKEETY, A. A.; MOHAMED, S. R.; HASSAN, N. S.; ABDEL-WAHAB, M. A. Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and *Spirulina* in rats. **Nutrition**, v. 27, n. 5, p. 582–589, 2011.

GLAZER, A. N. Phycobiliproteins - a family of valuable, widely used fluorophores. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 2, p. 105–112, 1994.

GOFF, H. D.; VERESPEJ, E.; SMITH, A. K. A study of fat and air structures in ice cream. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 11, p. 817–829, 1999.

GONZÁLEZ, R.; RODRÍGUEZ, S.; ROMAY, C.; ANCHETA, O.; GONZÁLEZ, A.; ARMESTO, J.; REMIREZ, D.; MERINO, N. Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acetic acid-induced colitis in rats. **Pharmacological research**, v. 39, n. 1, p. 55–59, 1999.

GOVINDJEE; SHEVELA, D. Adventures with cyanobacteria: a personal perspective. **Frontiers in Plant Science**, v. 2, p. 28, 2011.

GUAN, X. Y.; ZHANG, W. J.; ZHANG, X. W.; LI, Y. X.; WANG, J. F.; LIN, H. Z.; TANG, X. X.; QIN, S. A potent anti-oxidant property: Fluorescent recombinant α -phycocyanin of *Spirulina*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 4, p. 1093–1100, 2009.

GÜELL, C.; DAVIS, R. H. Membrane fouling during microfiltration of protein mixtures. **Journal of Membrane Science**, v. 119, n. 2, p. 269–284, 1996.

GUPTA, R. C. **Nutraceuticals: Efficacy, safety ad toxicity**. v. 91, [S.I.]:Elsevier, 2016.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processos de Separação por Membranas**. Rio de Janeiro: E-papers, 2006.

HAGEL, L. Separation on the basis of chemistry. In: ROE, S. (Ed.). **Protein purification techniques**. 2nd. ed. New York: Oxford University Press, 2001. Cap. 7.

HARRIS, E. L. V. Concentration of the extract. In: ROE, S. (Ed.). **Protein purification techniques**. 2nd. ed. New York: Oxford University Press, 2001. Cap. 6.

HAYASHI, O.; KATOH, T.; OKUWAKI, Y. Enhancement of antibody production in mice by dietary *Spirulina platensis*. **Journal Of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 40, n. 4, p. 431–441, 1994.

HAZRA, P.; KESH, G. S. Isolation and purification of phycocyanin from cyanobacteria of a mangrove forest. **Applied Biological Chemistry**, v. 60, n. 6, p. 631–636, 2017.

- HIRATA, T.; TANAKA, M.; OOIKE, M.; TSUNOMURA, T.; SAKAGUCHI, M. Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, p. 435–439, 2000.
- HOFMEISTER, F. Zur Lehre von der Wirkung der Salze - Zweite Mittheilung. **Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 24, n. 4–5, p. 247–260, 1888.
- HOLMAN, B. W. B.; MALAU-ADULI, A. E. O. *Spirulina* as a livestock supplement and animal feed. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, n. 4, p. 615–623, 2013.
- HOLT, J. G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- İLTER, I.; AKYIL, S.; DEMIREL, Z.; KOÇ, M.; CONK-DALAY, M.; KAYMAK-ERTEKIN, F. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 70, p. 78–88, 2018.
- JESPERSEN, L.; STRØMDAHL, L. D.; OLSEN, K.; SKIBSTED, L. H. Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. **European Food Research and Technology**, v. 220, n. 3–4, p. 261–266, 2005.
- JUNGBAUER, A. Continuous downstream processing of biopharmaceuticals. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 479–492, 2013.
- KALIL, S. J.; MAUGERI-FILHO, F.; RODRIGUES, M. I. Ion exchange expanded bed chromatography for the purification of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 581–586, 2005.
- KANNAUJIYA, V. K.; SINHA, R. P. Thermokinetic stability of phycocyanin and phycoerythrin in food-grade preservatives. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 2, p. 1063–1070, 2016.
- KARAMAN, S.; TOKER, Ö. S.; YÜKSEL, F.; ÇAM, M.; KAYACIER, A.; DOĞAN, M. Physicochemical, bioactive, and sensory properties of persimmon-based ice cream: Technique for order preference by similarity to ideal solution to determine optimum concentration. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 1, p. 97–110, 2014.
- KARLSSON, E.; HIRSH, I. Ion Exchange Chromatography. In: JANSON, J. C. (Ed.). **Protein Purification: principles, high resolution methods, and applications**. 3. ed. [S.I.]: Wiley, 2011. Cap. 4.
- KHAN, M.; VARADHARAJ, S.; GANESAN, L. P.; SHOBHA, J. C.; NAIDU, M. U.; PARINANDI, N. L.; TRIDANDAPANI, S.; KUTALA, V. K.; KUPPUSAMY, P. C-phycoerythrin protects against ischemia-reperfusion injury of heart through involvement of p38 MAPK and ERK signaling. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 290, n. 5, p. 2136–2145, 2006.
- KHAZI, M. I.; DEMIREL, Z.; DALAY, M. C. Evaluation of growth and phycobiliprotein composition of cyanobacteria isolates cultivated in different nitrogen sources. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 3, p. 1513–1523, 2018.

KONÍCKOVÁ, R.; VANKOVÁ, K.; VANÍKOVÁ, J.; VÁNOVÁ, K.; MUCHOVÁ, L.; SUBHANOVÁ, I.; ZADINOVÁ, M.; ZELENKA, J.; DVORÁK, A.; KOLÁR, M.; STRNAD, H.; RIMPELOVÁ, S.; RUMML, T.; WONG, R. J.; VÍTEK, L. Anti-cancer effects of blue-green alga *Spirulina platensis*, natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds. **Annals of Hepatology**, v. 13, n. 2, p. 273–283, 2014.

KUDDUS, M.; SINGH, P.; THOMAS, G.; AL-HAZIMI, A. Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycoyanin. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

KUMAR, D.; DHAR, D. W.; PABBI, S.; KUMAR, N.; WALIA, S. Extraction and purification of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* (CCC540). **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 2, p. 184–188, 2014.

KUNZ, W.; HENLE, J.; NINHAM, B. W. “Zur Lehre von der Wirkung der Salze” (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister’s historical papers. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 9, n. 1–2, p. 19–37, 2004.

KURD, F.; SAMAVATI, V. Water soluble polysaccharides from *Spirulina platensis*: Extraction and in vitro anti-cancer activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 498–506, 2015.

LEHTO, S.; BUCHWEITZ, M.; KLIMM, A.; STRASSBURGER, R.; BECHTOLD, C.; ULBERTH, F. Comparison of food colour regulations in the EU and the US: a review of current provisions. **Food Additives and Contaminants - Part A. Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 34, n. 3, p. 335–355, 2017.

LIAO, G.; GAO, B.; GAO, Y.; YANG, X.; CHENG, X.; OU, Y. Phycocyanin inhibits tumorigenic potential of pancreatic cancer cells: role of apoptosis and autophagy. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 2016.

LISSI, E. A.; PIZARRO, M.; ASPEE, A.; ROMAY, C. Kinetics of phycocyanine bilin groups destruction by peroxy radicals. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, n. 7, p. 1051–1055, 2000.

LIU, L. N.; CHEN, X. L.; ZHANG, X. Y.; ZHANG, Y. Z.; ZHOU, B. C. One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*. **Journal of Biotechnology**, v. 116, n. 1, p. 91–100, 2005.

LIU, Y.; ANDERSON, D. J. Gradient chromatofocusing high-performance liquid chromatography I. Practical aspects. **Journal of Chromatography A**, v. 762, n. 1–2, p. 207–217, 1997.

LIU, Y.; XU, L.; CHENG, N.; LIN, L.; ZHANG, C. Inhibitory effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on the growth of human leukemia K562 cells. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 2, p. 125–130, 2000.

LUJÁN-FACUNDO, M. J.; MENDOZA-ROCA, J. A.; CUARTAS-URIBE, B.; ÁLVAREZ-BLANCO, S. Evaluation of cleaning efficiency of ultrafiltration membranes fouled by BSA using FTIR-ATR as a tool. **Journal of Food Engineering**, v. 163, p. 1–8, 2015.

MACCOLL, R. Cyanobacterial phycobilisomes. **Journal of Structural Biology**, v. 124, n. 2,

p. 311–334, 1998.

MADHYASTHA, H. K.; SIVASHANKARI, S.; VATSALA, T. M. C-phycoerythrin from *Spirulina fusciformis* exposed to blue light demonstrates higher efficacy of in vitro antioxidant activity. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p. 221–224, 2009.

MANIRAFASHA, E.; MURWANASHYAKA, T.; NDIKUBWIMANA, T.; YUE, Q.; ZENG, X.; LU, Y.; JING, K. Ammonium chloride: a novel effective and inexpensive salt solution for phycoerythrin extraction from *Arthrospira (Spirulina) platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 3, p. 1261–1270, 2017.

MARÍN-PRIDA, J.; PAVÓN-FUENTES, N.; LLÓPIZ-ARZUAGA, A.; FERNÁNDEZ-MASSÓ, J. R.; DELGADO-ROCHE, L.; MENDOZA-MARÍ, Y.; SANTANA, S. P.; CRUZ-RAMÍREZ, A.; VALENZUELA-SILVA, C.; NAZÁBAL-GÁLVEZ, M.; CINTADO-BENÍTEZ, A.; PARDO-ANDREU, G. L.; POLENTARUTTI, N.; RIVA, F.; PENTÓN-ARIAS, E.; PENTÓN-ROL, G. Phycoerythrin promotes PC12 cell survival and modulates immune and inflammatory genes and oxidative stress markers in acute cerebral hypoperfusion in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 272, n. 1, p. 49–60, 2013.

MARTÍNEZ, J. M.; LUENGO, E.; SALDAÑA, G.; ÁLVAREZ, I.; RASO, J. C-phycoerythrin extraction assisted by pulsed electric field from *Arthrospira platensis*. **Food Research International**, v. 99, p. 1042–1047, 2017.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, n. 4, p. 407–412, 1993.

MINIC, S. L.; STANIC-VUCINIC, D.; MIHAILOVIC, J.; KRSTIC, M.; NIKOLIC, M. R.; CIRKOVIC VELICKOVIC, T. Digestion by pepsin releases biologically active chromopeptides from C-phycoerythrin, a blue-colored biliprotein of microalga *Spirulina*. **Journal of Proteomics**, v. 147, p. 132–139, 2016.

MINKOVA, K. M.; TCHERNOV, A. A.; TCHORBADJIEVA, M. I.; FOURNADJIEVA, S. T.; ANTOVA, R. E.; BUSHEVA, M. C. Purification of C-phycoerythrin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. **Journal of Biotechnology**, v. 102, n. 1, p. 55–59, 2003.

MINOLTA, K. **Precise color communication: Color control from perception to instrumentation**. [S.I: S.N.], 2007.

MISHRA, S. K.; SHRIVASTAV, A.; PANCHA, I.; JAIN, D.; MISHRA, S. Effect of preservatives for food grade C-phycoerythrin, isolated from marine cyanobacteria *Pseudanabaena* sp. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, n. 5, p. 597–602, 2010.

MISHRA, S. K.; SHRIVASTAV, A.; MISHRA, S. Effect of preservatives for food grade C-PC from *Spirulina platensis*. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 4, p. 339–345, 2008.

MOGANY, T.; KUMARI, S.; SWALAHA, F. M.; BUX, F. Extraction and characterisation of analytical grade C-phycoerythrin from *Eubalthece* sp. **Journal of Applied Phycology**, 2018.

MOHAMMADI-GOURAJI, E.; SOLEIMANIAN-ZAD, S.; GHIACI, M. Phycoerythrin-enriched yogurt and its antibacterial and physicochemical properties during 21 days of

storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 102, p. 230–236, 2019.

MORAES, C. C.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J. C-phycoerythrin extraction process for large-scale use. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, p. 133–148, 2010.

MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Strategy for a protein purification design using C-phycoerythrin extract. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5312–5317, 2009.

MORAES, C. C.; ORES, J. C.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Recovery of C-phycoerythrin in the presence of cells using expanded bed IEC. **Chromatographia**, v. 74, n. 3–4, p. 307–312, 2011.

MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Downstream de bioprocessos. In: STEFFENS, J.; BACKES, G. T.; VALDUGA, A. T. (Eds.). . **Processos tecnológicos, biotecnológicos, e engenharia de processos em alimentos**. Erechin, RS: EdiFAPES, 2014.

MORAES, C. C.; SALA, L.; ORES, J. C.; BRAGA, A. R. C.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Expanded and fixed bed ion exchange chromatography for the recovery of C-phycoerythrin in a single step by using lysed cells. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 93, n. 1, p. 111–115, 2015.

NAGAOKA, S.; SHIMIZU, K.; KANEKO, H.; SHIBAYAMA, F.; MORIKAWA, K.; KANAMARU, Y.; OTSUKA, A.; HIRAHASHI, T.; KATO, T. A novel protein C-phycoerythrin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of *Spirulina platensis* concentrate in rats. **Nutrient Interactions and Toxicity**, v. 135, n. 10, p. 2425–2430, 2005.

NAGARAJ, S.; ARULMURUGAN, P.; RAJARAM, M. G.; KARUPPASAMY, K.; JAYAPPRIYAN, K. R.; SUNDARARAJ, R.; VIJAYANAND, N.; RENGASAMY, R. Hepatoprotective and antioxidative effects of C-phycoerythrin from *Arthrospira maxima* SAG 25780 in CCl₄-induced hepatic damage rats. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 81–85, 2012.

NEWSOME, A. G.; CULVER, C. A.; VAN BREEMEN, R. B. Nature's palette: the search for natural blue colorants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 28, p. 6498–6511, 2014.

OH, S.-H.; AHN, J.; KANG, D.-H.; LEE, H.-Y. The effect of ultrasonicated extracts of *Spirulina maxima* on the anticancer activity. **Marine Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 205–214, 2011.

OLSZOWY, M.; DAWIDOWICZ, A. L. Is it possible to use the DPPH and ABTS methods for reliable estimation of antioxidant power of colored compounds? **Chemical Papers**, v. 72, n. 2, p. 393–400, 2018.

ORES, J. C.; AMARANTE, M. C. A.; KALIL, S. J. Co-production of carbonic anhydrase and phycobiliproteins by *Spirulina* sp. and *Synechococcus nidulans*. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 219–227, 2016.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4619–4626, 2001.

OU, Y.; LIN, L.; YANG, X.; PAN, Q.; CHENG, X. Antidiabetic potential of phycocyanin: effects on KKAY mice. **Pharmaceutical biology**, v. 51, n. 5, p. 539–44, 2013.

PAN-UTAI, W.; KAHAPANA, W.; IAMTHAM, S. Extraction of C-phycocyanin from *Arthrospira (Spirulina)* and its thermal stability with citric acid. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 1, p. 231–242, 2018.

PARK, W. S.; KIM, H. J.; LI, M.; LIM, D. H.; KIM, J.; KWAK, S. S.; KANG, C. M.; FERRUZZI, M. G.; AHN, M. J. Two classes of pigments, carotenoids and C-phycocyanin, in *Spirulina* powder and their antioxidant activities. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 1–11, 2018.

PATEL, A.; MISHRA, S.; PAWAR, R.; GHOSH, P. K. Purification and characterization of C-phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. **Protein Expression and Purification**, v. 40, n. 2, p. 248–255, 2005.

PATIL, G.; CHETHANA, S.; SRIDEVI, A. S.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Method to obtain C-phycocyanin of high purity. **Journal of Chromatography A**, v. 1127, n. 1–2, p. 76–81, 2006.

PATIL, G.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycocyanin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 2, p. 156–164, 2007.

PENTÓN-ROL, G.; MARÍN-PRIDA, J.; PARDO-ANDREU, G.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; ACOSTA-MEDINA, E. F.; VALDIVIA-ACOSTA, A.; LAGUMERSINDEZ-DENIS, N.; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ, E.; LLÓPIZ-ARZUAGA, A.; LÓPEZ-SAURA, P. A.; GUILLÉN-NIETO, G.; PENTÓN-ARIAS, E. C-phycocyanin is neuroprotective against global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils. **Brain Research Bulletin**, v. 86, n. 1–2, p. 42–52, 2011.

PEPAJ, M.; WILSON, S. R.; NOVOTNA, K.; LUNDANES, E.; GREIBROKK, T. Two-dimensional capillary liquid chromatography: pH gradient ion exchange and reversed phase chromatography for rapid separation of proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 1120, n. 1–2, p. 132–141, 2006.

PÉREZ-VEGA, J. A.; OLIVERA-CASTILLO, L.; GÓMEZ-RUIZ, J. ÁNGEL; HERNÁNDEZ-LEDESMA, B. Release of multifunctional peptides by gastrointestinal digestion of sea cucumber (*Isostichopus badionotus*). **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 2, p. 869–877, 2013.

PESSOA JR, A.; KLIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. São Paulo, SP: Manole, 2005.

PLEONSIL, P.; SOOGARUN, S.; SUWANWONG, Y. Anti-oxidant activity of holo- and apo-c-phycocyanin and their protective effects on human erythrocytes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 393–398, 2013.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.

REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Repeated batch cultivation of the microalga *Spirulina platensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 937–943,

2006.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. [S.I.]: Blackwell Science Ltd, 2004.

RIMBAU, V.; CAMINS, A.; ROMAY, C.; GONZÁLEZ, R.; PALLÀS, M. Protective effects of C-phycoerythrin against kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus. **Neuroscience Letters**, v. 276, n. 2, p. 75–78, 1999.

RISS, J.; DÉCORDÉ, K.; SUTRA, T.; DELAGE, M.; BACCOU, J. C.; JOUY, N.; BRUNE, J. P.; ORÉAL, H.; CRISTOL, J. P.; ROUANET, J. M. Phycobiliprotein C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* is powerfully responsible for reducing oxidative stress and NADPH oxidase expression induced by an atherogenic diet in hamsters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 19, p. 7962–7967, 2007.

RITO-PALOMARES, M.; NUÑEZ, L.; AMADOR, D. Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for C-phycoerythrin recovery from *Spirulina maxima*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 76, n. 12, p. 1273–1280, 2001.

RODRIGUES, E.; MARIUTTI, L. R. B.; FARIA, A. F.; MERCADANTE, A. Z. Microcapsules containing antioxidant molecules as scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 704–711, 2012.

ROMÁN, R. B.; ALVÁREZ-PEZ, J. M.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; GRIMA, E. M. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. **Journal of Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 73–85, 2002.

ROMAY, C.; ARMESTO, J.; REMIREZ, D.; GONZÁLEZ, R.; LEDÓN, N.; GARCÍA, I. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoerythrin from blue-green algae. **Inflammation Research**, v. 47, n. 1, p. 36–41, 1998.

ROMAY, C.; LEDÓN, N.; GONZÁLEZ, R. Further studies on anti-inflammatory activity of phycoerythrin in some animal models of inflammation. **Inflammation Research**, v. 47, n. 8, p. 334–338, 1998.

ROMAY, C.; GONZALEZ, R.; PIZARRO, M.; LISSI, E. Kinetics of C-phycoerythrin reaction with hypochlorite. **Journal of Protein Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 151–155, 2000.

SALA, L.; ORES, J. C.; MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Simultaneous production of phycobiliproteins and carbonic anhydrase by *Spirulina platensis* LEB-52. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 96, n. 9, p. 1896–1902, 2018.

SALA, L.; MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Cell pretreatment with ethylenediaminetetraacetic acid for selective extraction of C-phycoerythrin with food grade purity. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 5, p. 1261–1268, 2018.

SAMARANAYAKA, A. G. P.; LI-CHAN, E. C. Y. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 4, p. 229–254, 2011.

SANTIAGO-SANTOS, M. C.; PONCE-NOYOLA, T.; OLVERA-RAMÍREZ, R.; ORTEGA-

LÓPEZ, J.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O. Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2047–2052, 2004.

SANTOS, R.; CARVALHO, A. L.; ROQUE, A. C. A. Renaissance of protein crystallization and precipitation in biopharmaceuticals purification. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 1, p. 41–50, 2017.

SARADA, R.; PILLAI, M. G.; RAVISHANKAR, G. A. 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**, v. 34, n. 8, p. 795–801, 1999.

SATHYASAIKUMAR, K. V.; SWAPNA, I.; REDDY, P. V. B.; MURTHY, C. R. K.; ROY, K. R.; DUTTA GUPTA, A.; SENTHILKUMARAN, B.; REDDANNA, P. Co-administration of C-phycocyanin ameliorates thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in Wistar rats. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 252, n. 1, p. 67–75, 2007.

SAXENA, A.; TRIPATHI, B. P.; KUMAR, M.; SHAHI, V. K. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, n. 1–2, p. 1–22, 2009.

SCHRATTER, P. Purification and concentration by ultrafiltration. In: CUTLER, P. (Ed.). **Methods in Molecular Biology - Protein purification protocols**. [S.I.]: Humana Press, 2004. Cap. 12.

SCHWARTZ, L. Diafiltration for Desalting or Buffer Exchange. **Bioprocess international**, 2003.

SCOPES, R. K. **Protein purification: principles and practice**. 3. ed. New York, NY: Springer Science, 2010.

SELIG, M. J.; MALCHIONE, N. M.; GAMALELDIN, S.; PADILLA-ZAKOUR, O. I.; ABBASPOURRAD, A. Protection of blue color in a spirulina derived phycocyanin extract from proteolytic and thermal degradation via complexation with beet-pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 74, p. 46–52, 2018.

SEO, Y. C.; CHOI, W. S.; PARK, J. H.; PARK, J. O.; JUNG, K. H.; LEE, H. Y. Stable isolation of phycocyanin from *Spirulina platensis* associated with high-pressure extraction process. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 1, p. 1778–1787, 2013.

SHALABY, A.; SHANAB, S. M. M. Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, n. 10, p. 528–539, 2013.

SHAN, L.; ANDERSON, D. J. Effect of buffer concentration on gradient chromatofocusing performance separating proteins on a high-performance DEAE column. **Journal of Chromatography A**, v. 909, n. 2, p. 191–205, 2001.

SHAN, L.; ANDERSON, D. J. Gradient chromatofocusing. Versatile pH gradient separation of proteins in ion-exchange HPLC: Characterization studies. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 21, p. 5641–5649, 2002.

- SILVA, E. F.; FIGUEIRA, F. S.; CAÑEDO, A. D.; MACHADO, K. S.; SALGADO, M. T. S. F.; SILVA, T. K.; WAGNER, E. F.; MATTOZO, F. H.; LIMA, A.; SALES-NETO, J. M.; FERREIRA, V. U.; COMITRE, A. A.; MASCARENHAS, S. R.; KALIL, S. J.; VOTTO, A. P. S. C-phycoerythrin to overcome the multidrug resistance phenotype in human erythroleukemias with or without interaction with ABC transporters. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, p. 532–542, 2018.
- SILVA, L. A.; KUHN, K. R.; MORAES, C. C.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Experimental design as a tool for optimization of C-phycoerythrin purification by precipitation from *Spirulina platensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 1, p. 5–12, 2009.
- SILVEIRA, S. T.; BURKERT, J. F. M.; COSTA, J. A. V.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of phycoerythrin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, p. 1629–1634, 2007.
- SILVEIRA, S. T.; QUINES, L. K. M.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Separation of phycoerythrin from *Spirulina platensis* using ion exchange chromatography. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n. 5, p. 477–482, 2008.
- SINGH, N. K.; PARMAR, A.; MADAMWAR, D. Optimization of medium components for increased production of C-phycoerythrin from *Phormidium ceylanicum* and its purification by single step process. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 4, p. 1663–1669, 2009.
- SINGH, P.; KUDDUS, M.; THOMAS, G. An efficient method for extraction of C-phycoerythrin from *Spirulina* sp. and its binding affinity to blood cells, nuclei and genomic DNA. **International Research Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 5, p. 80–85, 2010.
- SLUYTERMAN, L. A. A. E.; ELGERMA, O. Chromatofocusing: isoelectric focusing on ion-exchange columns. **Journal of Chromatography**, v. 150, p. 17–30, 1978.
- SLUYTERMAN, L. A. A. E.; WIJDENES, J. Chromatofocusing: Isoelectric focusing on ion-exchange columns. **Journal of Chromatography**, v. 150, n. 1, p. 31–44, 1978.
- SOLEY BIOTECHNOLOGY INSTITUTE. 2018. Disponível em: <http://www.soleybio.com/products/61-c-phycoerythrin.html>. Acesso em: 14 de mar. 2018, 21:19:00.
- SOLTAN, S. S. A.; SHEHATA, M. M. E. M. The effects of using color foods of children on immunity properties and liver, kidney on rats. **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, n. 07, p. 897–904, 2012.
- SONANI, R. R.; PATEL, S.; BHASTANA, B.; JAKHARIA, K.; CHAUBEY, M. G.; SINGH, N. K.; MADAMWAR, D. Purification and antioxidant activity of phycoerythrin from *Synechococcus* sp. R42DM isolated from industrially polluted site. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 325–331, 2017.
- SONG, W.; ZHAO, C.; WANG, S. A large-scale preparation method of high purity C-phycoerythrin. **International journal of bioscience, biochemistry and bioinformatics**, v. 3, n. 4, p. 293–297, 2013.
- SONI, B.; KALAVADIA, B.; TRIVEDI, U.; MADAMWAR, D. Extraction, purification and

characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata* - Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 2017–2023, 2006.

SONI, B.; TRIVEDI, U.; MADAMWAR, D. A novel method of single step hydrophobic interaction chromatography for the purification of phycocyanin from *Phormidium fragile* and its characterization for antioxidant property. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 1, p. 188–194, 2008.

SØRENSEN, L.; HANTKE, A.; ERIKSEN, N. T. Purification of the photosynthetic pigment C-phycocyanin from heterotrophic *Galdieria sulphuraria*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 12, p. 2933–2938, 2013.

SØTOFT, L. F.; LIZARAZU, J. M.; PARJIKOLAEI, B. R.; KARRING, H.; CHRISTENSEN, K. V. Membrane fractionation of herring marinade for separation and recovery of fats, proteins, amino acids, salt, acetic acid and water. **Journal of Food Engineering**, v. 158, p. 39–47, 2015.

SOUZA, F. T.; MARGARITES, A. C.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E. Avaliação do potencial antioxidante da ficocianina em sistema lipídico óleo de soja e azeite de oliva. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 3, p. 275–279, 2009.

STOCKER, R.; GLAZER, A. N.; AMES, B. N. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 16, p. 5918–22, 1987.

STRASKY, Z.; ZEMANKOVA, L.; NEMECKOVA, I.; RATHOUSKA, J.; WONG, R. J.; MUCHOVA, L.; SUBHANOVA, I.; VANIKOVA, J.; VANOVA, K.; VITEK, L.; NACHTIGAL, P. *Spirulina platensis* and phycocyanobilin activate atheroprotective heme oxygenase-1: A possible implication for atherogenesis. **Food and Function**, v. 4, n. 11, p. 1586–1594, 2013.

SU, H. N.; XIE, B. BIN; CHEN, X. L.; WANG, J. X.; ZHANG, X. Y.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Efficient separation and purification of allophycocyanin from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 1, p. 65–70, 2010.

SUN, L.; WANG, S. Allophycocyanin complexes from the phycobilisome of a thermophilic blue-green alga *Myxosarcina concinna* Printz. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 72, n. 1–3, p. 45–53, 2003.

TANTIRAPAN, P.; SUWANWONG, Y. Anti-proliferative effects of C-phycocyanin on a human leukemic cell line and induction of apoptosis via the PI3K/AKT pathway. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 5, p. 1295–1301, 2014.

TAPIA, G.; GALETOVIC, A.; LEMP, E.; PINO, E.; LISSI, E. Singlet oxygen-mediated photobleaching of the prosthetic group in hemoglobins and C-phycocyanin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 70, n. 4, p. 499–504, 1999.

THANGAM, R.; SURESH, V.; ASENATH PRINCY, W.; RAJKUMAR, M.; SENTHILKUMAR, N.; GUNASEKARAN, P.; RENGASAMY, R.; ANBAZHAGAN, C.; KAVERI, K.; KANNAN, S. C-phycocyanin from *Oscillatoria tenuis* exhibited an antioxidant and *in vitro* antiproliferative activity through induction of apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest. **Food Chemistry**, v. 140, n. 1–2, p. 262–272, 2013.

- VAN REIS, R.; ZYDNEY, A. Membrane separations in biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, p. 208–211, 2001.
- VONSHAK, A.; RICHMOND, A. Mass production of the blue-green alga *Spirulina*: An overview. **Biomass**, v. 15, n. 4, p. 233–247, 1988.
- WHEELWRIGHT, S. M. The design of downstream processes for large-scale protein purification. **Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 2–3, p. 89–102, 1989.
- WHEELWRIGHT, S. M. **Protein purification: design and scale up of downstream processing**. [S.I.]: John Wiley & Sons, Inc, 1991.
- WIBISONO, Y.; CORNELISSEN, E. R.; KEMPERMAN, A. J. B.; VAN DER MEER, W. G. J.; NIJMEIJER, K. Two-phase flow in membrane processes: A technology with a future. **Journal of Membrane Science**, v. 453, p. 566–602, 2014.
- WU, L. C.; LIN, Y. Y.; YANG, S. Y.; WENG, Y. T.; TSAI, Y. T. Antimelanogenic effect of C-phycoerythrin through modulation of tyrosinase expression by upregulation of ERK and downregulation of p38 MAPK signaling pathways. **Journal of Biomedical Science**, v. 18, n. 1, p. 74, 2011.
- YAN, S. G.; ZHU, L. P.; SU, H. N.; ZHANG, X. Y.; CHEN, X. L.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Single-step chromatography for simultaneous purification of C-phycoerythrin and allophycoerythrin with high purity and recovery from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 1, p. 1–6, 2011.
- YOU, S. J.; UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E.; WU, J. Multifunctional peptides from egg white lysozyme. **Food Research International**, v. 43, n. 3, p. 848–855, 2010.
- ZARROUK, C. **Contribution a l'étude d'une cyanophycee: Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima***. 1966. 83 f. Ph.D. thesis - Faculte des Sciences, Universite de Paris, 1966.
- ZHANG, Y. M.; CHEN, F. A simple method for efficient separation and purification of C-phycoerythrin and allophycoerythrin from *Spirulina platensis*. **Biotechnology Techniques**, v. 13, n. 9, p. 601–603, 1999.
- ZHAO, L.; PENG, Y. LIANG; GAO, J. MEI; CAI, W. MIN. Bioprocess intensification: an aqueous two-phase process for the purification of C-phycoerythrin from dry *Spirulina platensis*. **European Food Research and Technology**, v. 238, n. 3, p. 451–457, 2014.
- ZHENG, J.; INOBUCHI, T.; SASAKI, S.; MAEDA, Y.; MCCARTY, M. F.; FUJII, M.; IKEDA, N.; KOBAYASHI, K.; SONODA, N.; TAKAYANAGI, R. Phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis* protect against diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress. **AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 304, n. 2, p. 110–120, 2013.
- ZHENG, Y.; MO, L.; ZHANG, W.; DUAN, Y.; HUANG, J.; CHEN, C.; GAO, Y.; SHI, X.; LI, F.; YANG, J.; GUO, Y. Phycocyanin fluorescent probe from *Arthrospira platensis*: preparation and application in LED-CCD fluorescence density strip qualitative detection system. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 2, p. 1107–1115, 2018.

ZILINSKAS, B. A.; GREENWALD, L. S. Phycobilisome structure and function. **Photosynthesis Research**, v. 10, p. 7–35, 1986.

ZIN, G.; PENHA, F. M.; REZZADORI, K.; SILVA, F. L.; GUIZONI, K.; PETRUS, J. C. C.; OLIVEIRA, J. V.; DI LUCCIO, M. Fouling control in ultrafiltration of bovine serum albumin and milk by the use of permanent magnetic field. **Journal of Food Engineering**, v. 168, p. 154–159, 2016.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Cromatogramas dos ensaios de purificação utilizando cromatografia de troca iônica com eluição por gradiente de pH

Figura 1A. Cromatograma do Ensaio 2: Equilíbrio e lavagem com tampão Tris-SO₄ 0,05 mol.L⁻¹ pH 7,4. Alimentação com pH 7,4. Eluição com 50 mL de tampão acetato 0,1 mol.L⁻¹ em gradiente de pH de 5,6 – 3,4.

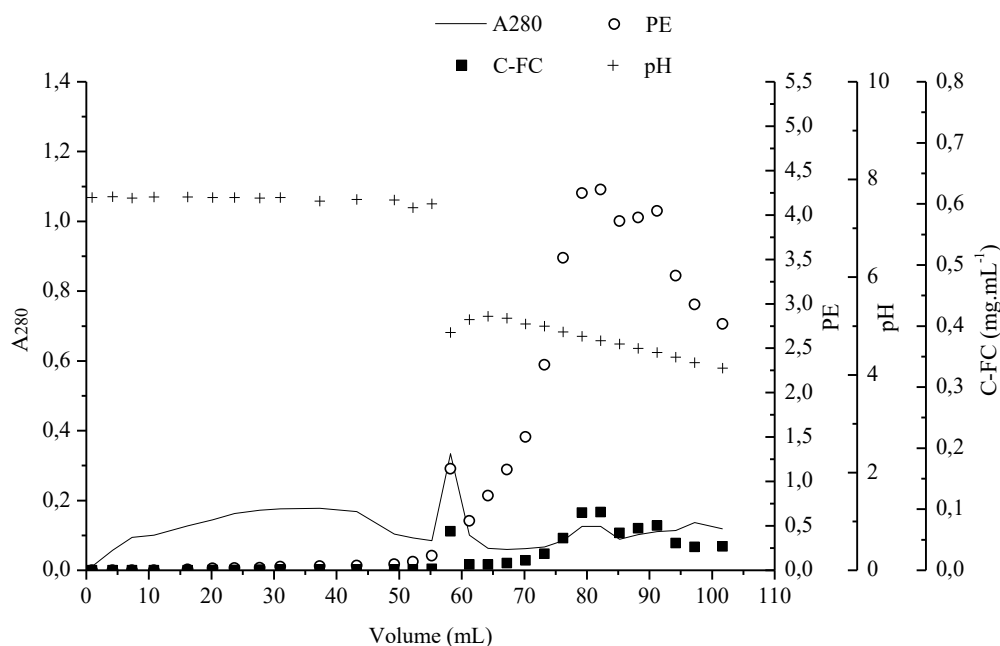


Figura 2A. Cromatograma do Ensaio 3: Eluição com 50 mL de tampão acetato 0,1 mol.L⁻¹ + 0,05 mol.L⁻¹ de NaCl em gradiente de pH de 5,6 – 3,4.

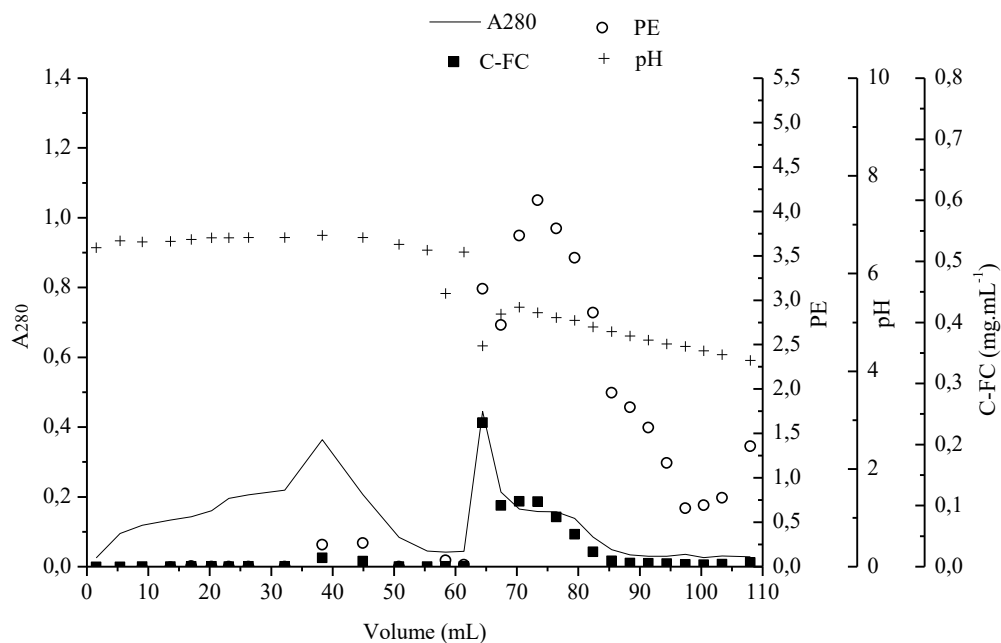


Figura 3A. Cromatograma do Ensaio 4: Eluição com 25 mL de tampão acetato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ em gradiente de pH de 5,6 – 3,4.

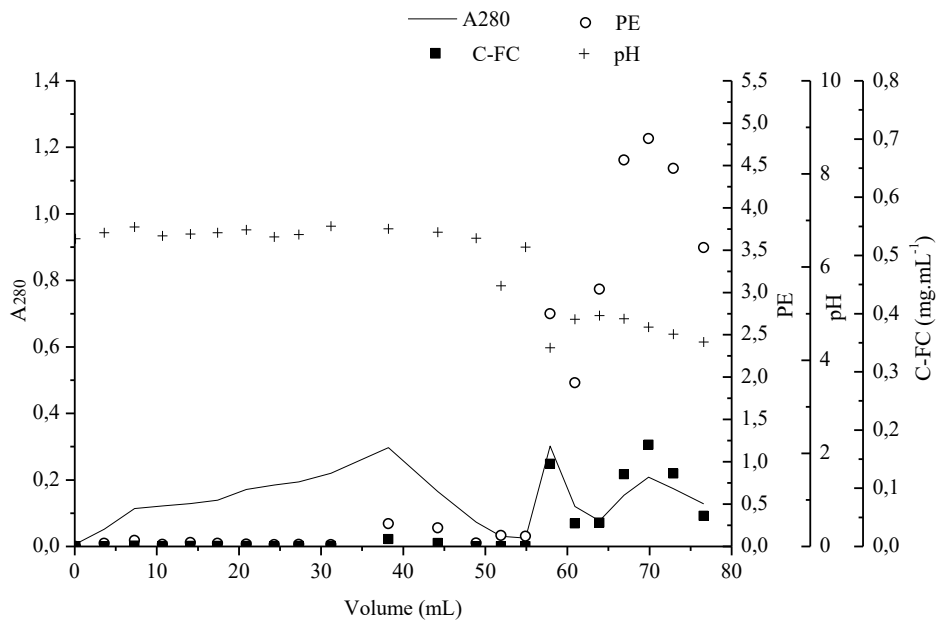


Figura 4A. Cromatograma do Ensaio 5: Eluição com 37,5 mL de tampão acetato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ em gradiente de pH de 5,6 – 3,4.

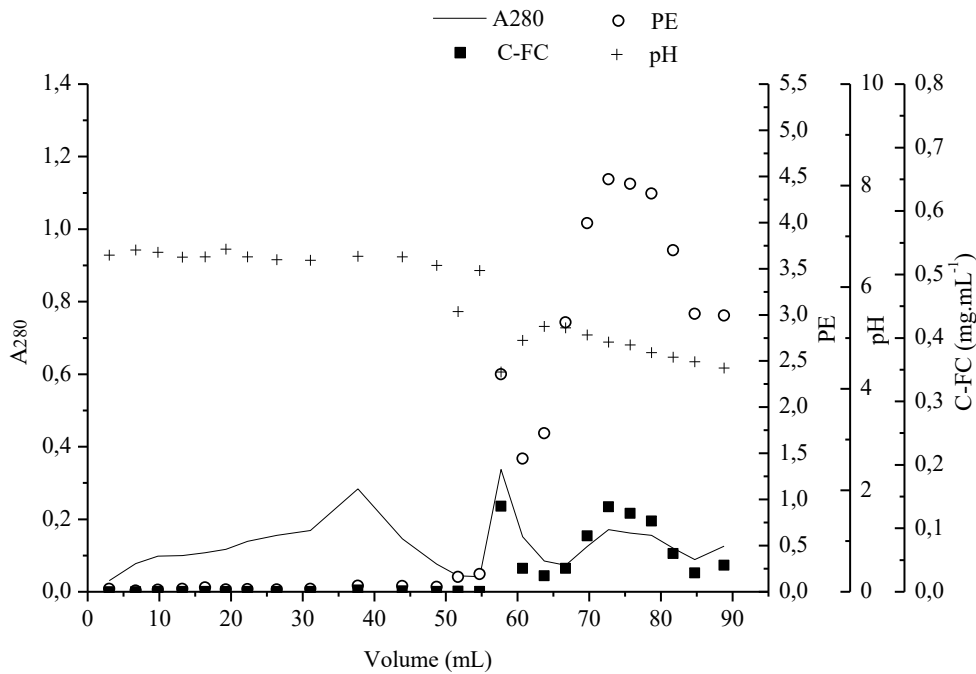


Figura 5A. Cromatograma do Ensaio 6: Eluição com 75 mL de tampão acetato 0,1 mol.L⁻¹ em gradiente de pH de 5,6 – 3,4.

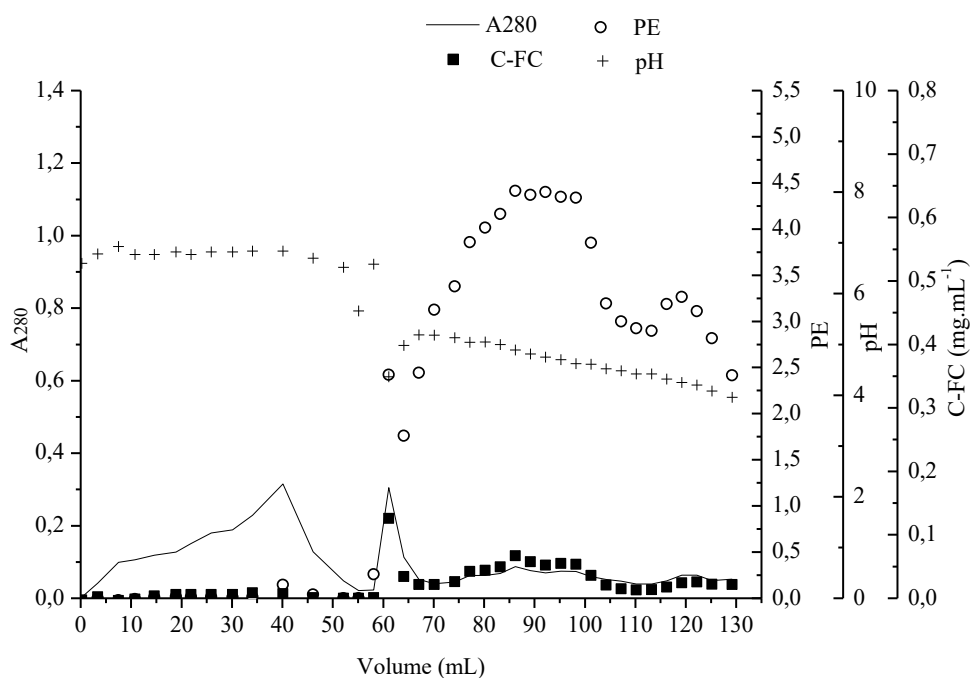


Figura 6A. Cromatograma do Ensaio 7: Eluição com 50 mL de tampão citrato 0,1 mol.L⁻¹ em gradiente de pH de 5,6 – 3,4.

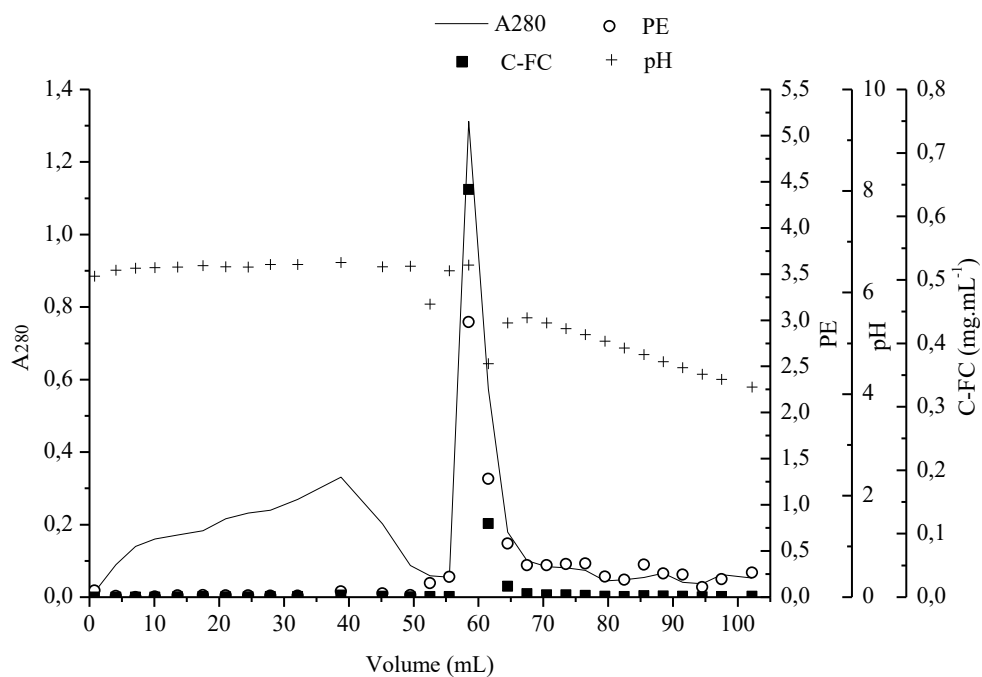


Figura 7A. Cromatograma do Ensaio 8: Eluição com 50 mL de tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ em gradiente de pH de 5,6 – 3,4.

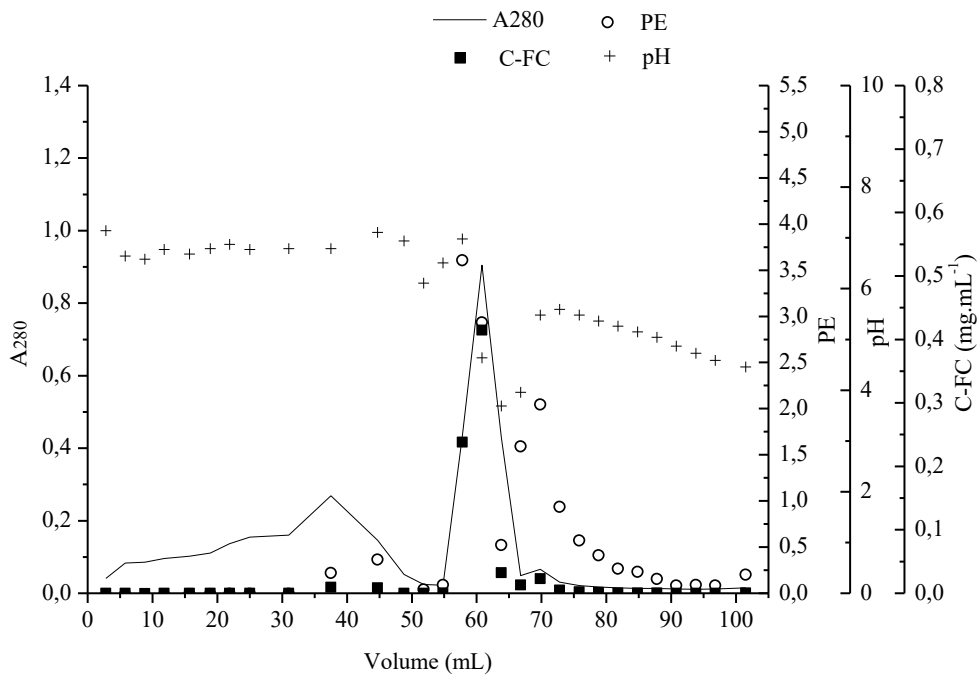


Figura 8A. Cromatograma do Ensaio 10: Eluição com 75 mL de tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ em gradiente de pH de 6,2 – 3,0.

