

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

Alessandro Lima Sbeghen

Processo de separação por membranas na purificação de ficocianina de
***Spirulina* sp.**

Passo Fundo

2017

Alessandro Lima Sbeghen
Engenheiro de Alimentos

**Processo de separação por membranas na purificação de ficocianina de
Spirulina sp.**

*Dissertação de Mestrado apresentada para
obtenção do título de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos*

Orientador: Prof. Dr. Vandr e Barbosa Brião

*Coorientadora: Profa. Dra. Luciane Maria
Colla*

*Linha de pesquisa: Desenvolvimento de
produtos e processos para a indústria de
alimentos.*

Passo Fundo

2017

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**


A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

Processo de separação por membranas na purificação de ficocianina de *Spirulina* sp.

Elaborada por
Alessandro Lima Sbeghen

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Comissão Examinadora


Vandrê Barbosa Brião, Dr., UPF
(Orientador/Presidente)


Luciane Maria Colla, Dra., UPF


Christian Oliveira Reinehr, Dr., UPF


Geciane Toniazzi Backes, Dra., URI

Passo Fundo, RS, Brasil
2017

CIP – Catalogação na Publicação

S276p Sbeghen, Alessandro Lima
Processo de separação por membrana na purificação de ficocianina de Spirulina sp. / Alessandro Lima Sbeghen. – 2017.

89 p. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Vandr e Barbosa Brião.

Coorientador: Profa. Dra. Luciane Maria Colla.

Disserta o (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2017.

1. Spirulina. 2. Antioxidantes . 3. Grau alimentar. 4. Análise. I. Brião, Vandr e Brabosa, orientador. II. Colla, Luciane Maria, coorientador. III. Título.

CDU: 582.26

*Dedico este trabalho a minha mãe, Antônia Ely
Lima e seu amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, a minha família, em especial minha mãe Antônia Ely Lima, e aos meus amigos pela força, compreensão e suporte, que sem os quais não teria realizado esta dissertação. Não posso deixar de agradecer ao meu orientador Vandrê Brião pelo apoio e por me manter na direção certa “Foca Ozzy!” quando muitas das vezes eu me perdia em ideias. Aos amigos Éllen Francine Rodrigues, Bruna Seguenka e Vinícius Castoldi, pelo apoio na parte teórica e experimental dos processos, a todos os professores que de certa forma colaboraram com o desenvolvimento do trabalho e aos funcionários João Barcelos e Clarice Ângela Alves e Adriana Barlette, sempre dispostos a me ajudar em atividades marcadas com muita antecedência (15-30 min).

“Todas as riquezas do mundo não valem um bom amigo.”

(Voltaire)

RESUMO

A ficocianina é um pigmento fotossintético da família das ficobiliproteínas, seu grupo cromóforo confere além da coloração azul das cianobactérias, propriedades anticarcinogênicas, anti-inflamatórias e antioxidantes, dentre outras propriedades farmacológicas. Suas propriedades, que permitiam algas secas durarem longos períodos, estimulam estudos para substituição de antioxidantes sintéticos devido aos efeitos deletérios destes. Além do uso da ficocianina como corante em indústrias de cosméticos e alimentos, suas propriedades bioativas geram um produto de alto valor agregado e de grande interesse nestas indústrias. A purificação da ficocianina obtida do extrato bruto de microalgas como a *Spirulina* sp e realizada através de processos de separação por membranas pode tornar esta operação mais simples e fácil de escalonar. Para o processo de purificação, avaliou-se os métodos de extração, diferentes tipos de membranas, sua eficiência e colmatação para obtenção de ficocianina com grau alimentar e atividade antioxidante. A microalga foi submetida a extração por congelamento e descongelamento obteve um extrato bruto celular contendo $1,38 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ e com grau de pureza de 0,35. Este extrato bruto foi submetido ao processo de separação por membranas planas de $20 \mu\text{m}$, $0,4 \mu\text{m}$ e 60 kDa para purificação, porém a colmatação produzida neste processo foi muito elevada impedindo a obtenção de um extrato purificado. Partiu-se então para testes de extração por congelamento e descongelamento, banho ultrassônico e solução tampão fosfato, sendo que o último obteve o melhor resultado de extração. O extrato bruto obtido por solução tampão fosfato obteve uma extração de $58,54 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de ficocianina por g de célula e grau de pureza de 0,52. Este extrato bruto foi então submetido em um processo de ultrafiltração por uma membrana tubular com tamanho de poro entre 30 e 80 kDa em equipamento piloto, seguido de três diafiltrações. O processo de purificação se mostrou eficiente atingindo valores de 0,83 para grau de pureza com fator de purificação de 1,54 e mantendo uma boa atividade antioxidante. O processo de separação por membranas mostrou possuir facilidade de escalonamento e capacidade de purificação de ficocianina em escala piloto.

Palavras-chave: Extração. Grau alimentar. Ultrafiltração. Diafiltração.

ABSTRACT

Phycocyanin is a photosynthetic pigment of the phycobiliprotein family, its chromophore group conferring in addition to the blue staining of cyanobacteria, anticarcinogenic, anti-inflammatory and antioxidant properties, among other pharmacological properties. Its properties, which allowed dried algae to last for long periods, stimulated studies for the substitution of synthetic antioxidants due to their deleterious effects. In addition to the use of phycocyanin as a dye in the cosmetics and food industries, its bioactive properties generate a product of high added value and of great interest in these industries. Purification of phycocyanin obtained from the crude extract of microalgae such as *Spirulina* sp and carried out by membrane separation processes may make this operation simpler and easier to stagger. For the purification process, the extraction methods, different types of membranes, their efficiency and fouling to obtain food-grade phycocyanin and antioxidant activity were evaluated. The microalga was subjected to extraction by freezing and thawing obtained a crude cellular extract containing $1.38 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and with a degree of purity of 0,353. This crude extract was subjected to the separation process by flat membranes of $20 \mu\text{m}$, $0.4 \mu\text{m}$ and 60 kDa for purification, however the fouling produced in this process was very high, preventing the obtaining of a purified extract. Looking for another methodology of extraction was tested freeze-thaw extraction, ultrasonic bath and phosphate buffer solutions, being this last a better extraction result. The crude extract obtained by phosphate buffer solution obtained a $58.54 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ extraction of phycocyanin per g of cell and a grade of purity of 0.52. This crude extract was subjected to an ultrafiltration process by a tubular membrane in pilot equipment, followed by three diafiltrations. The purification process was efficient, reaching values of 0.83 for purity grade with purification factor of 1.54 and keeping antioxidant properties. The membrane separation process showed to have ease scale-up and capacity for phycocyanin purification on a large scale.

Key-words: Extraction. Food grade. Ultrafiltration. Diafiltration

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura das ficobiliproteínas	24
Figura 2 Estrutura química da ficocianina (a) e bilirrubina (b)	25
Figura 3 Estrutura da ficocianobilina.....	27
Figura 4 Diagrama esquemático do módulo de filtração por membranas	34
Figura 5 Fluxograma das correntes de processo de filtração por membranas.....	35
Figura 6 Diagrama do equipamento piloto de filtração tangencial.....	35
Figura 7 Fluxo do permeado de ficocianina na microfiltração em membrana de 0,4 µm	44
Figura 8 Permeabilidade da membrana de 0,4 µm antes (a) e depois (b) da filtração do extrato bruto de ficocianina.....	44
Figura 9 Visualização por MEV do topo da superfície da membrana de 0,4 µm antes da filtração do extrato bruto de ficocianina	46
Figura 10 Visualização por MEV do topo da superfície da membrana de 0,4 µm após a filtração do extrato bruto de ficocianina	46
Figura 11 Visualização por MEV do corte transversal da membrana de 0,4 µm após a filtração do extrato bruto de ficocianina	47
Figura 12 Fluxo do extrato bruto celular em membrana de 60 kDa	48
Figura 13 Permeabilidade hidráulica da membrana de 60 kDa antes e após a ultrafiltração ...	48
Figura 14 Visualização por MEV do topo da superfície da membrana de 60 kDa antes da ultrafiltração do extrato bruto de ficocianina	49
Figura 15 Visualização por MEV do de topo da superfície da membrana de 60 kDa após da ultrafiltração do extrato bruto de ficocianina	49
Figura 16 Vista do corte transversal da membrana de 60 kDa após a filtração	50
Figura 17 Comportamento do fluxo em relação ao tempo durante o processo de purificação da ficocianina.	51
Figura 18 Fluxo de permeado durante a ultrafiltração do extrato bruto de ficocianina em membrana tubular.	52
Figura 19 Grau de pureza da ficocianina durante o processo de purificação	53
Figura 20 Espectroscopia por infravermelho pela transformada de Fourier.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Concentração e pureza de ficocianina no extrato bruto obtido a parti da <i>Spirulina</i> sp LEB 18	41
Tabela 2 Rendimento de ficocianina no extrato bruto.	43
Tabela 3 Resistências apresentadas na microfiltração do extrato bruto.....	45
Tabela 4 Concentração e pureza da ficocianina obtida após filtração do extrato bruto em membrana de 0,4 μ m.....	47
Tabela 5 Concentração de ficocianina no extrato bruto e sua recuperação	53
Tabela 6 Fator de purificação e eficiência durante as etapas de purificação do extrato bruto de ficocianina	54
Tabela 7 Percentual de inibição do radical DPPH dos extratos de ficocianina	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1	MICROALGAS.....	21
2.2	ANTIOXIDANTES	22
2.3	FICOCIANINA	24
2.3.1	Extração de Ficocianina.....	27
2.3.2	Purificação de Ficocianina.....	28
2.4	PROCESSO DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS	29
2.4.1	Colmatação de membranas	31
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1	TESTES DE EXTRAÇÃO DE FICOCIANINA POR DIFERENTES MÉTODOS.....	33
3.2	SISTEMAS DE FILTRAÇÃO	34
3.2.1	Filtração em membranas planas	34
3.2.2	Filtração em membrana tubular.....	35
3.3	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	36
3.3.1	Determinação do potencial antioxidante.....	37
3.3.2	Determinação das resistências nas membranas planas	38
3.3.3	Análise de microscopia eletrônica de varredura nas membranas planas	38
3.3.4	Modelagem usando o Solver adicionado ao Microsoft Excel na membrana tubular.	39
3.3.5	Determinação por espectroscopia em infravermelho por transformada de Fourier dos extratos purificados por ultrafiltração e diafiltração em membrana tubular	39
3.4	TESTES DE EXTRAÇÃO POR DIFERENTES MÉTODOS.....	41
3.5	PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS NA PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DE FICOCIANINA.....	42
3.5.1	Purificação do extrato bruto de ficocianina através de membranas planas	42
3.5.2	Purificação do extrato bruto de ficocianina através de membranas tubular em escala piloto	51
4	CONCLUSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS	59

APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO.....	72
--	-----------

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos 20 anos, o interesse sobre o potencial uso da ficocianina tem aumentado consideravelmente, em consequência da sua ampla faixa de aplicação nos setores de alimentos, cosméticos e fármacos. Além do uso como corante, a ficocianina possui excelentes propriedades antioxidantes, anticarcinogênicas e anti-inflamatórias (FERREIRA et al., 2010; GANTAR et al., 2012; RAPOSO; MORAIS; MORAIS, 2013).

A ficocianina é um pigmento azul pertencente à família das ficobiliproteínas, com caráter altamente solúvel e estável, produzido por cianobactérias. O caráter renovável das microalgas propicia um aumento na tendência de seu uso como fonte natural de corantes na indústria, porém a distribuição no mercado global dos pigmentos ainda é limitada, pois os métodos de purificação são de alto custo (SILVA et al., 2009).

Vários fatores podem influenciar na concentração e qualidade final desse extrato como natureza dos microrganismos, técnicas de cultivo para acúmulo de biocompostos, e principalmente, dos métodos de extração e purificação deste biocomposto, mas em geral, o método de extração é a chave para a recuperação de ficobiliproteínas no seu estado natural com quantidades relevantes e que favoreçam os processos de recuperação, concentração e purificação ((SILVEIRA et al., 2007, GUAN, 2016; MOARES; BURKERT; KALIL, 2010). O conteúdo intracelular de ficocianina na *Spirulina* sp pode ser superior a 150 mg.g⁻¹ e para que a purificação tenha um bom resultado, a qualidade do extrato bruto da ficocianina torna-se muito importante (BHATTACHARYA; SHIVAPRAKASH, 2005).

A etapa de purificação dos extratos de ficocianina é essencial para manter as propriedades bioativas, garantir uma melhor eficiência energética, simplicidade de operação, viabilidade econômica e de escalonamento para a produção deste biocomposto (GUPTA; SANIS, 2009; PATIL et al., 2008).

A purificação de ficocianina pode envolver uma série de etapas complexas ou com custo elevado, variando de acordo com os métodos e condições escolhidos. Os estudos de produção e purificação, devido à baixa resistência térmica da ficocianina (SARADA; PILLAI; RAVISHANKAR, 1999), acabam sendo direcionados para métodos físicos e químicos, sem a utilização de calor. Os procedimentos químicos para sua extração e purificação, podem ser de alto custo e difíceis de serem utilizados em escala industrial, ou exigir uma demanda alta de produtos químicos, gerando demasiada quantidade de resíduo. Assim busca-se a realização de estudos a fim de que o processo tenha eficiência energética, viabilidade econômica, fácil

operação e que não afete as suas propriedades bioativas. Além do mais, o processo a ser utilizado para obtenção da ficocianina deve possibilitar que a fração não utilizada esteja apta para outros usos.

Os métodos físicos e químicos destaca-se a separação por membranas, que pode ser realizada a temperatura ambiente sem ocasionar perdas de suas propriedades. A utilização da microfiltração e ultrafiltração tornam-se relevantes devido a sua simplicidade de operação e facilidade de escalonamento, mas apesar de ser um processo simples, muitos fatores necessitam ser estudados para a obtenção de condições ideais para o processo de purificação por membranas, bem como as propriedades antioxidantes da ficocianina, após sua obtenção a partir de biomassa de *Spirulina* sp. Além da capacidade de extração destes compostos de interesse presente nas microalgas, pode-se reduzir os custos e ampliar o espectro de uso das microalgas, como por exemplo, na cadeia de produção de biocombustíveis.

O objetivo foi estudar o processo de purificação por membranas de extratos de ficocianina visando a obtenção de um biocomposto com atividade antioxidante e grau de pureza alimentar.

Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) Avaliar a eficiência de extração de ficocianina por diferentes métodos;
- b) Estudar diferentes membranas no processo de purificação dos extratos brutos de ficocianina;
- c) Estudar o efeito de colmatação das membranas;
- d) Avaliar a eficiência da filtração por membranas para obtenção de grau de pureza alimentar;
- e) Avaliar o potencial antioxidante da ficocianina purificada através dos processos de micro e ultrafiltração.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROALGAS

As microalgas pertencem a um amplo grupo de microrganismos eucariontes e procariontes, dentre os procariontes, pode-se dividi-las ainda em *Prochlorophyta* e *Cyanophyta* (MUTANDA et al., 2011). As cianobactérias (*Cyanophyta*) são microrganismos unicelulares gram-negativos com diferentes fisiologias, metabolismos e morfologias, se apresentando também de forma filamentosa ou agrupados em colônias (BECK et al., 2012).

As cianobactérias são seres autotróficos sintetizadores de oxigênio e estão entre as mais antigas formas de vida por existirem há mais de 3,5 bilhões de anos na Terra (BANDYOPADHYAY et al., 2011). Com um papel fundamental no ciclo biogeoquímico de oxigênio, nitrogênio e carbono, acredita-se que sua fotossíntese alterou o ambiente de uma atmosfera rica em gás carbônico para rica em oxigênio. Esta transformação proveu a base para as variadas formas de vida existentes e a evolução dos metabolismos aeróbicos. Além disto, podem servir de modelo para importantes estudos em atividades biológicas (SHARMA; TITHI; RAI, 2010).

Estes microrganismos possuem naturalmente diferentes características metabólicas e composições químicas, que em conjunto com novas tecnologias de cultivo e melhoramento genético, abrem uma vasta área para pesquisas básicas e aplicadas (IBAÑEZ; CIFUENTES, 2013). Dentre estas pesquisas pode-se destacar, além do uso como fonte de alimentos com base em sua biomassa (DRAAISMA et al., 2013), a produção de energia e biocombustíveis (WIJFFELS; BARBOSA, 2010), a obtenção de compostos bioativos como a ficocianina, polissacarídeos, ácidos graxos entre outros (COSTA et al., 2013; MORAIS et al., 2015) com alto valor agregado, além de outras substâncias convenientes como manitol e betacaroteno (JACOBSEN; FRIGAARD, 2014; MILLEDGE, 2011).

Segundo Spolaore et al. (2006), a reação de conversão de substrato em bioprodutos intracelulares e metabólitos extracelulares via biocatálise por microalgas apresenta grande potencial de uso em vários produtos de consumo. Este potencial torna as cianobactérias fábricas celulares naturais para a síntese de compostos de interesse (GERSHWIN; BELAY, 2008). Em meados de 1950, as microalgas já eram exploradas fortemente como recurso alternativo para alimentação, principalmente pelo seu alto teor de proteína (SPOLAORE et al., 2006). A alegação referente ao elevado teor proteico vem sendo complementada pela produção e

purificação de compostos bioativos oriundos destes microrganismos (COSTA et al., 2013; PRASANNA et al., 2010). Avaliadas de forma promissora na produção e isolamento de compostos naturais e ativos bioquímicos de alto valor de mercado (PRASANNA et al., 2008), as microalgas têm capacidade de metabolizar, sintetizar, acumular e secretar diversos compostos orgânicos de interesse para aplicação em indústrias de alimentos, fármacos e cosméticos (YAMAGUCHI, 1996). Seu espectro de metabólitos primários e secundários é tão amplo, que muitas estruturas e bioatividades não são encontradas em outras matrizes (SINGH et al., 2011).

Os pigmentos naturais estão entre os bioprodutos de maior interesse nas microalgas, pelas suas propriedades bioativas, terapêuticas e sua ampla área de aplicações com alto valor econômico (BOROWITZKA, 2013; RASTOGI; SINHA, 2009). Pigmentos como ficocianinas, carotenóides e clorofilas possuem propriedades físico-químicas que lhes permitem interagir em uma série de reações e exercer papéis essenciais em atividades de nível celular e em sistemas alimentícios, incluindo as atividades hepatoprotetoras, anti-inflamatórias e imunossupressoras (ERIKSEN, 2008).

A *Spirulina*, com cerca de 20 % de sua massa seca composta de ficocianina (VONSHAK, 1997), torna-se uma referência na produção de antioxidantes naturais para uso em alimentos, fármacos, cosméticos e outros produtos oxidáveis gerando enorme demanda (DUFOSSÉ et al., 2006). Além de ser uma fonte natural de produção independente da estação do ano e das condições geográficas, com rendimento controlável e de qualidade previsível (JOSHI et al., 2003).

2.2 ANTIOXIDANTES

A teoria formulada pelo professor da Universidade de Nebraska, Denhim Harman, em 1954, é uma das mais aceitas para a explicação de diversos processos antioxidantes biológicos, representada pela ação de radicais livres em lipoperoxidação e oxidação de proteínas e DNA (CEPOI et al., 2009).

As reações de oxidação e redução são indispensáveis para o metabolismo de todos os organismos, porém, pode ocorrer estresse oxidativo se houver um desbalanceamento na produção de radicais livres e a ação de mecanismos de defesa antioxidante. A geração destes radicais livres em excesso podem se originar a partir de defeitos na respiração mitocondrial, no metabolismo do ácido araquidônico, ativação-inibição de sistemas enzimáticos ou por fatores exógenos, como poluição, uso de álcool ou cigarros, e ainda, por uma alimentação

inadequada (NÚÑEZ-SELLÉS, 2005). Alguns processos inflamatórios também envolvem espécies reativas de oxigênio, originadas pela ativação de leucócitos durante a degranulação (SOUZA et al., 2007). Os antioxidantes produzidos pelo corpo ou provenientes da dieta atuam neste excesso de radicais livres antes da reação com moléculas biológicas do organismo, prevenindo a formação de compostos altamente reativos pela ativação do oxigênio e reações em cadeia (RATNAM et al., 2006).

A hipótese de que antioxidantes sintéticos usados em ampla escala na indústria podem provocar o desenvolvimento de células tumorais (BOTTERWERCK et al., 2000), incrementa a procura por compostos antioxidantes naturais, comumente encontrados em plantas. Já é de conhecimento que folhas e talos de vegetais vasculares e algas possuem inúmeras substâncias antioxidantes, provenientes das suas células fotossintéticas. Os tilacóides que são membranas fotossintéticas, sofrem os efeitos deletérios oxidativos primordialmente pela sua constituição majoritária de lipídios insaturados (MATSUKAWA et al., 1997). Isto se deve, principalmente devido ao processo de fotossíntese que leva a formação de espécies reativas de oxigênio, determinando a necessidade de criação de mecanismos antioxidantes mais desenvolvidos (CEPOI et al., 2009). Assim, os mecanismos de proteção destes organismos acabam por serem mais desenvolvidos e eficientes.

As cianobactérias por terem uma maior produtividade de compostos antioxidantes que as plantas, surgem como uma fonte mais vantajosa para a produção destes compostos (PULZ; GROSS, 2004). As incessantes variações de intensidade de luz e concentrações de O₂ e CO₂ causam estresse oxidativo, fazendo com que a sobrevivência das microalgas esteja relacionada a uma resposta eficiente. Assim estes microrganismos podem representar uma importante fonte de substâncias antioxidantes naturais, tanto para as indústrias alimentícias como para o setor farmacêutico (MATSUKAWA et al., 1997). Isto já foi comprovado cientificamente em estudos comparando a atividade antioxidante das microalgas e cianobactérias com antioxidantes sintéticos utilizados na indústria, a exemplo do BHT (SPÍNOLA, 1997; CHOOCHOTE; SUKLAMPOO; OCHAIKUL, 2014). Vários outros estudos avaliaram a atividade antioxidante de microalgas frente a diferentes modelos toxicológicos, como a (JAIME et al., 2005; COLLA; FURLONG; COSTA, 2007; BIERHALZ et al., 2009).

Dentre os compostos identificados nas microalgas, os pigmentos naturais merecem uma atenção particular, pois têm papel importante no metabolismo fotossintético e coloração das microalgas, além das benéficas atividades biológicas como antioxidante, anticarcinogênico, anti-inflamatório, anti-angiogênico e neuroprotetivos (GUEDES; AMARO; MALCATA, 2011; PANGESTUTI; KIM, 2011).

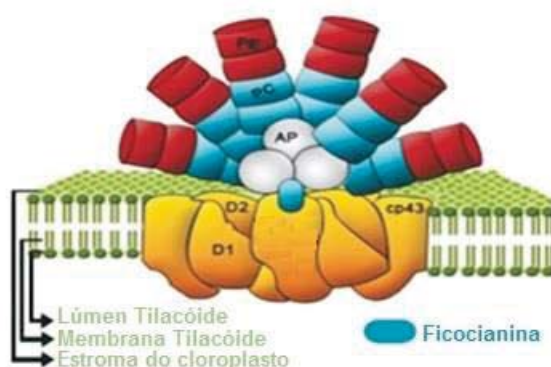
2.3 FICOCIANINA

A ficocianina é um corante azul natural pertencente à família das ficobiliproteínas, encontrada em cianobactérias como a *Spirulina platensis* (KAMBLE et. al., 2013; MORAES et. al., 2011), muito utilizada em diagnósticos e cosméticos devido a sua forte fluorescência e atividade antioxidante (SEKAR; CHANDRAMOHAN, 2008; ERIKSEN, 2008).

As ficobiliproteínas podem representar de 40 % a 60 % do total de proteínas nas cianobactérias (BENEDETTI et al., 2004; SONI; VISAVADYIA; MADAMWAR, 2008) e são altamente solúveis em água e não extraíveis por solventes orgânicos devido a estarem covalentemente ligados a polipeptídeos (TAMARY et al., 2012).

As ficobiliproteínas são pigmentos hidrossolúveis formados por grupos prostéticos tetrapirróis lineares (bilinas, que correspondem ao grupo cromóforo da molécula) covalentemente ligadas a proteínas específicas por uma ligação tioéter através de resíduos de cisteína (BERMEJO et al., 1997). Os espectros de absorção de luz e emissão de fluorescência são determinados pela extensão das ligações duplas conjugadas nos cromóforos, com base em suas características espectrais, classifica-se as ficobiliproteínas (Figura 1) em ficoeritrina (PE) com cromóforo ficoeritrobilina de coloração vermelha, ficocianina (PC) e aloficocianina (AP), com cromóforo ficocianobilina de coloração azul (SPOLAORE et al., 2006).

Figura 1 Estrutura das ficobiliproteínas.



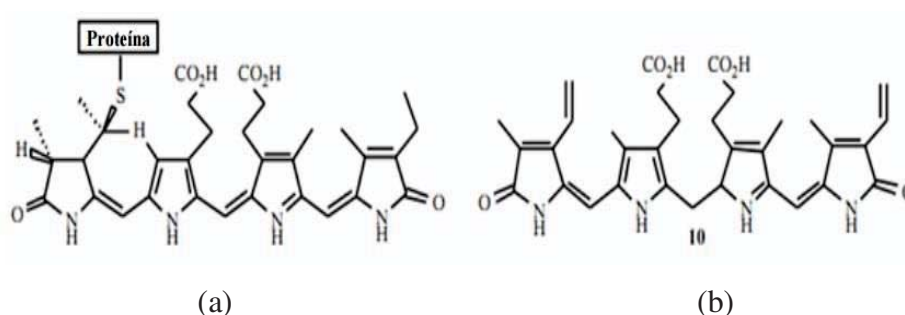
Fonte: www.nutraculture.com/phycoocyanin.html, 2016.

Segundo Wolk (1973) e corroborado por Hsieh, Pedersen e Albertano (2013), o fato do cromóforo ficoeritrobilina conter 6 ligações duplas conjugadas faz com que ela tenha o pico de absorção máximo em menores comprimentos de onda, entre 540 e 570 nm, já a ficocianobilina

com 8 ligações duplas conjugadas, tendo o pico de absorção máximo para a ficocianina entre 610 e 620 nm e para aloficocinina entre 650 e 655 nm.

As primeiras investigações acerca destas propriedades antioxidantes das ficobiliproteínas, em especial a ficocianina, se basearam nas semelhanças entre as estruturas químicas das ficobiliproteínas e a molécula de bilirrubina (Figura 2), que é um importante composto antioxidante nos sistemas biológicos. A bilirrubina inibe a modificação oxidativa de proteínas e aminoácidos aromáticos no plasma, como na eliminação de radicais de oxigênio para proteção da albumina, bem como de outros alvos biológicos. Vários trabalhos *in vitro* com diferentes metodologias experimentais comprovam que a ficocianina é eficiente na remoção de radicais livres de oxigênio e reage, inclusive, com outros antioxidantes importantes em processos patológicos (ROMAY et al., 2003). A ficocianina revelou em estudos de Patel, Mishra e Gosh (2006) alta reatividade contra radicais peroxil, a qual foi atribuída ao alto grau de conjugação de duplas ligações do cromóforo, o que favorece fortemente a estabilização dos radicais. Já Soni, Visavadiya e Madamwar (2008) demonstraram a capacidade da ficoeritrina de eliminar radicais superóxido, monóxido de nitrogênio e hidroxila, bem como de prevenir a peroxidação lipídica *in vitro*, e que a molécula tetrapirrol é a principal responsável pelo sequestro dos radicais.

Figura 2 Estrutura química da ficocianina (a) e bilirrubina (b)



Fonte: Romay et al., 2003.

Embora já conhecidos os mecanismos antioxidantes exercidos pelos carotenóides, tocoferóis e compostos fenólicos, para as ficobiliproteínas, têm-se três hipóteses principais para seu efeito protetor nas células animais. A primeira, demonstrada *in vitro*, por Bermejo-Bescos, Pinero-Estrada e Villar Del Fresno (2008) e *in vivo* por Sathysaikumar et al. (2007), seria devido à própria estrutura química de tetrapirróis lineares que atuariam como nucleófilos, neutralizando as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. A segunda se deveria às propriedades quelantes de minerais e a terceira envolveria o incremento do sistema enzimático

antioxidante (GALLARDO-CASAS et al., 2010). Esta última hipótese, de acordo com Cano-Europa et al. (2010) se deveria ao fato das estruturas tetrapirróis das ficobiliproteínas funcionarem de maneira análoga a catalase, mimetizando sua função através da diminuição do teor de H_2O_2 .

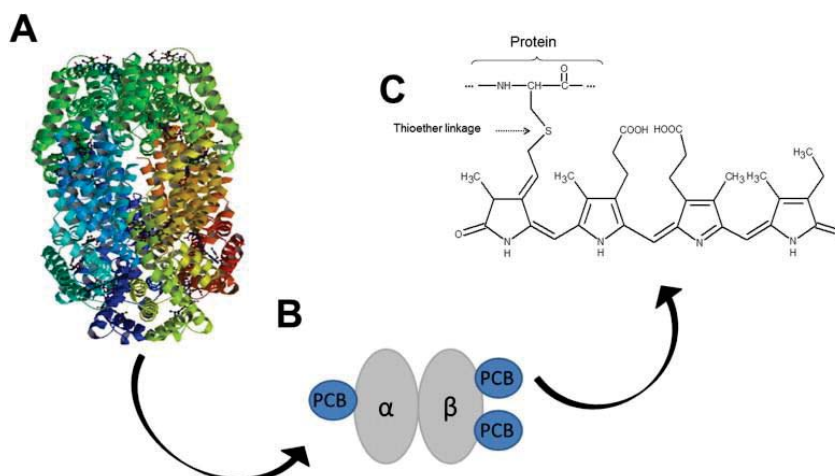
A possibilidade de contribuição da porção apo-proteína no total da atividade antioxidante da ficocianina, não pode ser descartada, já que essa porção contém resíduos de aminoácidos antioxidantes. Tem sido sugerido que triptofano, tirosina e histidina podem capturar radicais peroxil em ambientes menos polares (PATEL; MISHRA; GOSH, 2006).

As fotorreações de todos os organismos fotossintéticos, como as cianobactérias, iniciam com a absorção de fótons por antenas complexas chamadas ficobilissomos. Esses compostos altamente complexos são formados por dois tipos de proteínas, uma colorida e brilhante, como as ficobiliproteínas, que absorvem e transmitem a energia luminosa para os centros de reação fotossintéticos, e outra, um polipeptídeo de ligação não pigmentado que são responsáveis pela montagem dos ficobilissomos (SUN et al., 2009). As ficobiliproteínas absorvem a porção da luz (480 a 650 nm) que não é absorvida pela clorofila, tornando o processo de fotossíntese mais eficiente.

Além das propriedades antioxidantes, um efeito antialérgico foi demonstrado em modelo experimental de pequenos ratos com sensibilidade induzida a albumina do ovo, apresentando orelhas inchadas e reações de pele, sugerindo potenciais benefícios na prevenção de doenças patológicas associadas com stress oxidativo e inflamações (ROSGAARDA et al., 2012). Estas ligações são importantes não somente para a coloração e propriedades fluorescentes, mas também no seu potencial terapêutico e antioxidante, pois a ficocianobilina pode ser enzimaticamente reduzida a ficocianorubina a qual é estruturalmente semelhante a bilirrubina, um antioxidante natural do plasma que protege lipídeos da oxidação (SØRENSEN; HANTKE; ERIKSEN, 2013).

A ficocianina possui uma estrutura química baseada em duas subunidades relativamente homólogas α e β que se agregam em trímeros $\alpha_3\beta_3$ e subsequente em hexâmeros (Figura 3a). O conjunto que forma a ficocianina pode ser representado pela composição do conjunto de duas subunidades de proteína (α e β), sendo que um ficobilissomo se liga na α e dois ficobilissomos na β (Figura 3b), esta união é dada por uma ligação tioéter de modo covalente (Figura 3c), originando assim o ficobilissomo com cromóforo de cor azulada da ficocianina. (SHEER; ZHAO, 2008; FERNÁNDEZ-ROJAS, HERNÁNDEZ-JUÁREZ, PEDRAZZA-CHAVERRI, 2014).

Figura 3 Estrutura da ficocianobilina



Fonte: Fernández-Rojas, Hernández-Juárez, Pedrazza-Chaverri, 2014.

Devido ao efeito tóxico de vários corantes sintéticos, há uma crescente demanda por corantes naturais nas indústrias de alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos e têxteis. As ficobiliproteínas, especificamente ficocianina e a ficoeritrina são utilizados como um corante de proteína natural nas indústrias de alimentos e cosméticos (PULZ; GROSS, 2004; SHARMA; TITHI; RAI, 2010). O método comum para o consumo humano de ficocianina está em uma forma não purificada via *Spirulina platensis* adicionada em alimentos (NIELS, 2008). A Companhia Japonesa de Tintas e Químicos Dai Nippon extrai a ficocianina azul da *Spirulina platensis* e vende como um pigmento azul natural para uso em alimentos e produtos cosméticos (PRASANNA et al., 2010). Além disso, a ficocianina também é utilizada na coloração de muitos produtos alimentares, desde produtos lácteos fermentados, sorvetes, sobremesas, bebidas não alcoólicas e produtos de confeitaria como gomas de mascar e gelatinas (SANTIAGO-SANTOS et al., 2004).

2.3.1 Extração de Ficocianina

O conteúdo intracelular de ficocianina em *Spirulina sp* pode ser superior a 150 mg.g⁻¹ e para que a purificação tenha um bom resultado, a qualidade do extrato bruto da ficocianina torna-se muito importante (BHATTACHARYA; SHIVAPRAKASH, 2005).

A extração de ficobiliproteínas envolve a ruptura celular e a liberação destas proteínas (KAMBLE et al., 2013). Cada microrganismo tem características particulares referindo-se à

localização das proteínas produzidas intracelularmente. Portanto, o protocolo de extração pode variar de acordo com a proteína desejada (MOARES; BURKERT; KALIL, 2010).

Vários fatores podem influenciar a extração da ficocianina, como o método de ruptura celular, o tipo de solvente, a relação biomassa-solvente e o tempo de extração (SILVEIRA et al., 2007). Mas, em geral, o método de extração é a chave para a recuperação de ficobiliproteínas no seu estado natural a partir de algas (MOARES; BURKERT; KALIL, 2010).

O extrato bruto de ficocianina pode ser obtido através de diversas técnicas de rompimento celular, como o choque osmótico realizado com tampão fosfato, acetato ou somente água destilada, com associação ou não de métodos físicos como congelamento e descongelamento, maceração com gral/pistilo, digestão, sonificação ou homogeneização por pressão (REIS et al., 1998; PATEL et al., 2005; CHEN et al., 2006; PATIL et al., 2006; SUN, WANG e QIAO, 2006). O processo de extração pode ser realizado ainda de modo enzimático (SANTIAGO-SANTOS et al., 2004) ou por fluidos supercríticos (MENDIOLA et al., 2007). Em uma comparação de alguns métodos Moraes et al. (2011) utilizando o banho de ultrassom com pérolas de vidro, obtiveram um rendimento 56 % maior de ficocianina que o método de congelamento e descongelamento, o qual tem sido o mais utilizado.

O método de extração das ficobiliproteínas da *Spirulina* é um dos processos fundamentais para a obtenção de um extrato bruto com quantidades relevantes de ficocianina e que favoreça os processos de recuperação, concentração e purificação. Todos os métodos utilizados apresentam vantagens e desvantagens para sua aplicação. O método de congelamento e descongelamento e o banho ultrassônico apresentam a vantagem de não utilizar químicos em seu processo, porém a lise celular causada por estes métodos favorecem a liberação de compostos que tornam o extrato mais viscoso e com uma quantidade maior de impurezas (GUAN, 2016; MOARES; BURKERT; KALIL, 2010).

O método de congelamento e descongelamento promove a lise celular através da ação dos cristais de gelo como facas afiadas formadas durante o congelamento e a contração das células durante o descongelamento. A extração através deste método apresenta algumas vantagens como eficiência na ruptura da membrana celular e reprodutibilidade, em contrapartida exige manipulação e consumo de energia em um tempo relativamente grande (SONI et al., 2006).

2.3.2 Purificação de Ficocianina

Os bioprodutos possuem etapas complexas de purificação, pois sua produção a partir de microrganismos ou células animais são influenciadas pelas características dos meios e das biomoléculas de interesse, sejam elas ácidos orgânicos, antibióticos, polissacarídeos, peptídeos aminoácidos ou proteínas (KILIKIAN; PESSOA JR, 2003). Além disto, os produtos intracelulares apresentam maior dificuldade no seu processo de obtenção que os extracelulares, devido à liberação de nucleotídeos e outras moléculas intracelulares juntamente com o composto alvo, podendo requerer várias etapas para remover outras muitas proteínas presentes no meio (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

A escolha pelo método de purificação de proteínas varia de acordo com suas características físico-químicas, com os contaminantes presentes no extrato bruto e de acordo com o uso a qual se dará ao pigmento-antioxidante. Esta definição ocorre em função das múltiplas etapas fundamentadas na distinção das proteínas com base na sequência e sua atividade biológica, no conteúdo de carboidratos e lipídios, dentre outras características (ALMEIDA; KURTENBACH, 2002).

A purificação da ficocianina (FC) normalmente é dada por um número de pureza que é obtido pela divisão entre as absorvâncias das ficocianobilinas a 620 nm e todas as proteínas na solução a 280 nm, A_{620}/A_{280} . Soluções de ficocianina com números de pureza maior que 0,7 são descritas como de grau alimentício por Rito-Palomares, Nuñez e Amador (2001), enquanto números de pureza de 3,9 e acima de 4,0 têm sido consideradas de grau reativo e analítico, respectivamente.

A purificação deste extrato de ficocianina pode ser realizada por diferentes métodos como cromatografia, precipitação com sulfato de amônio, extração aquosa bifásica, fluidos supercríticos, carbono ativo e processos de separação por membranas (KUMAR et al., 2014; CHEN et al., 2014; GANTAR et al., 2012; CHAIKLAHAN et al., 2011; JOHNSON; KUMAR; DAS, 2014; ANTELO; COSTA; KALIL, 2015).

2.4 PROCESSO DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS

Os processos de separação por membranas têm sido utilizados na separação de biocompostos desde bem antes do início das tecnologias modernas de produção de membranas. Ferry (1936) descreve a utilização de membranas para concentração de enzimas, análise de vírus e bacteriófagos, preparos de soluções biológicas ultrafiltradas livres de proteínas e

filtração estéril, embora todos em escalas laboratoriais devido às limitações das membranas e módulos disponíveis.

A filtração por membrana tem sido igualmente apresentada como um processo promissor de separação das microalgas dos meios de cultivo, além de ser indicado para uma vasta gama de processos de biorrefinarias tais como recuperação, reciclagem, purificação e extração de biocombustíveis, subprodutos, meio de cultura e nutrientes (GERARDO; OATLEY-RADCLIFFE; LOVITT, 2014; ABELS; CARSTENSEN; WESSLING, 2013). O desenvolvimento de tecnologias de produção de membranas durante as últimas 3 décadas produziu relevantes melhorias na sua fabricação, com diminuição de custo (ZHANG et al., 2010; CHURCHOUSE; WILDGOOSE, 1999).

As tecnologias utilizando membranas se mostram relevantes nos processos de biomoléculas e líquidos, podendo ser aplicadas em produções de larga escala devido ao seu simples funcionamento. Além disto, esta técnica é realizada a temperatura ambiente, o que minimiza o dano térmico no produto. Assim, o processo pode garantir a cor dos produtos, como da ficocianina (NAGARAJ; PATIL; BIRADAR, 2006).

Com a intenção de obter um pigmento natural para alimentos, Silva et al. (2009), buscou reduzir as etapas de purificação, devido estas estarem diretamente ligadas ao custo de operação. Chaiklahan et al. (2011), testando membranas capsulares de diferentes tamanhos de poro (5 μm , 1 μm , 0,8/0,2 μm e 0,2 μm) conseguiram obter ficocianina com um grau de pureza de 1,07 e eficiência na recuperação da ficocianina acima de 75% apenas com o uso da microfiltração, o suficiente para o uso deste pigmento na indústria de alimentos. Apesar das vantagens relatadas sobre filtração por membranas, cabe citar que uma desvantagem que ocorre é a redução de fluxo como resultado de entupimento da membrana (JAVADI et al., 2014; AHMAD et al., 2012). O fluxo operacional é de fato um parâmetro-chave, uma vez que determina os requisitos de membrana.

Dentro de processos de separação baseados em membrana, a filtração de fluxo cruzado é uma estratégia de operação amplamente utilizada, em que a suspensão a ser filtrada flui tangencialmente para a membrana (AHMAD et al., 2012). O extrato celular é mantido em suspensão, e a tensão de cisalhamento é fornecida pela velocidade de fluxo cruzado, reduzindo a formação de bolo e incrustação da membrana (AHMAD et al., 2012; TORRES et al., 2011).

Os processos de separação por membranas são métodos de separação baseado na permeabilidade da membrana, tendo como função principal remover partículas de acordo com o tamanho do poro. Como exemplo, pode-se citar os solventes e os sais de baixo peso molecular que passam através das membranas de ultrafiltração enquanto moléculas maiores, tais como

proteínas, pigmentos e agentes tensoativos são retidos (CAETANO et al., 1995). Ainda pode-se citar as diversas aplicações do processo de separação por membranas de micro e ultrafiltração na recuperação e purificação de frações proteicas, polissacarídeos e peptídeos dentre outros bioprodutos (HUANG; CHIANG, 2014; ISA; FRAZIER; JAUREGI, 2008, SOSA; ROCA; VELIZAROV, 2016; ALELE; ULBRICHT, 2016; FIRDAOUS et al., 2009; SAXENA et al., 2009).

A ultrafiltração permite a separação de macromoléculas com uma gama de peso molecular de 1 a 100 kDa, funcionando com uma faixa de pressão de 1 a 10 bar, podendo em alguns casos, chegar à 30 bar. As membranas são constituídas normalmente por polisulfona, polietersulfona e poliacrilonitrila (SCOTT; HUGHES, 1996). Seu processo de separação é baseado em um mecanismo de clivagem (interações electrostáticas influenciam no processo), em que um aumento na pressão aplicada aumenta a taxa de fluxo. No entanto, as membranas de UF são muito sensíveis ao fenômeno de incrustação e concentração por polarização.

2.4.1 Colmatação de membranas

A dinâmica do fluido processado deve ser cuidadosamente estudada para controlar a transferência de material na interface membrana-líquido. O efeito do fenômeno da concentração por polarização coloca um limite superior prático nas taxas de fluxo, pois resulta de uma acumulação de soluto concentrado no lado da alimentação, implicando em uma resistência adicional. Ainda sob pressões elevadas, as macromoléculas podem gelificar e uma fina camada de gel se forma na superfície da membrana e as incrustações podem também levar a um declínio gradual do fluxo em relação ao tempo (SCOTT; HUGHES, 1996).

Algumas técnicas conhecidas ajudam a melhorar o fluxo de permeado das membranas, como retrolavagens periódicas, criação de turbulência na alimentação por chicanas e bolhas de gás para melhorar a limpeza da membrana e gerar turbulência (CASSANO; BASILE, 2011).

Para a maioria das aplicações há uma redução gradual do fluxo de permeado ao longo do tempo devido ao acúmulo de material na superfície da membrana, que não participa do transporte de massa através da membrana. Frequentemente algumas medidas preventivas podem evitar o entupimento das membranas, como pré-tratamento, altas velocidades de fluxo e baixas pressões (PORTER, 1990).

A colmatação das membranas pode ser avaliada por diversos métodos e modelada através de equações. Um dos métodos mais atuais é a análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) retratando de forma visual a superfície, poros, secção transversal e outras

partes da membrana (ZANARDINI et al., 2017; WANG; LIN, 2017). Os modelos matemáticos para o processo de colmatção ajudam a interpretar os fenômenos ocorridos durante este processo. Um modelo estudado e com boa representação é o proposto por HO e Zydnei (2000) para obter dados experimentais de microfiltração de proteínas. Este modelo ainda vem sendo utilizado por diversos autores com sucesso na modelagem de outras soluções (BAGUENA et al., 2013; PENG; TREMBLAY, 2008; KARASU et al., 2010). Neste modelo o fluxo total a qualquer tempo da filtração (Q) é dado pelo somatório do fluxo dos poros abertos e parcialmente abertos onde a torta se formou, aumentando a resistência ao fluxo.

A ultrafiltração é o método mais comumente utilizado para a concentração e formulação final de proteínas recombinantes (SHIRE; SHAHROKH; LIU, 2004; REIS; ZYDNEY, 2007), sendo estudada também na purificação de ficocianina (CHAIKLAHAN et al., 2011; SØRENSEN; HANTKE; ERIKSEN, 2013; GANTAR et al., 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e métodos descrevem como foram conduzidos os experimentos de extração, purificação e caracterização da ficocianina obtida a partir da *Spirulina* sp. LEB 18 proveniente de cultivos realizados na planta piloto de produção de microalgas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal de Rio Grande situada na cidade de Santa Vitória do Palmar/RS. Também descreve os equipamentos utilizados para o processo de separação por membranas, tipos de membranas e as análises recolhidas durante os experimentos.

3.1 TESTES DE EXTRAÇÃO DE FICOCIANINA POR DIFERENTES MÉTODOS

O processo de extração de ficocianina pode interferir na etapa de purificação, deste modo decidiu-se realizar um testes de extração através dos diferentes métodos descritos a seguir.

O primeiro método de extração avaliado foi através do processo de congelamento e descongelamento (CD) utilizando-se 1 g da microalga e 30 mL de água destilada e condicionados em frascos com tampa, os quais foram conduzidas ao processo de congelamento a 0 °C por cerca de 3 h após esse período, levadas ao refrigerador para o descongelamento a 4 °C (MORAES, 2011) por mais 3 h. Os processos de congelamento e descongelamento foram realizados de forma sucessiva por 3 vezes.

O segundo método de extração foi realizado acondicionando-se uma suspensão de 0,1 g diluída em 10 mL de água destilada. Para melhorar o processo de extração utilizou-se uma proporção de 1:1,1 (g biomassa: g pérolas de vidro) conforme Medeiros et. al, (2008). Os tubos de ensaio foram então submetidos ao tratamento em banho ultrassônico (40 kHz) durante 40, 50 e 60 min (MEDEIROS et al., 2008) e designados UP40, UP50 e UP60, respectivamente.

O terceiro método utilizou tampão fosfato de sódio (TP) para extrair o conteúdo de ficocianina presente na biomassa em método adaptado de Chen et al. (2016), onde 0,1 g de biomassa seca foi suspensa em 10 mL de solução tampão fosfato 0,15 M (pH 7,0) e mantida a 4 °C e na ausência de luz durante 21 horas.

Após os tratamentos acima descritos, realizou-se uma centrifugação a 4400 g durante 15 min em centrífuga CIENTEC CT-5000 e o sobrenadante foi considerado como extrato bruto

de ficocianina seguido da designação citada em cada método e foram caracterizados conforme item 3.3.

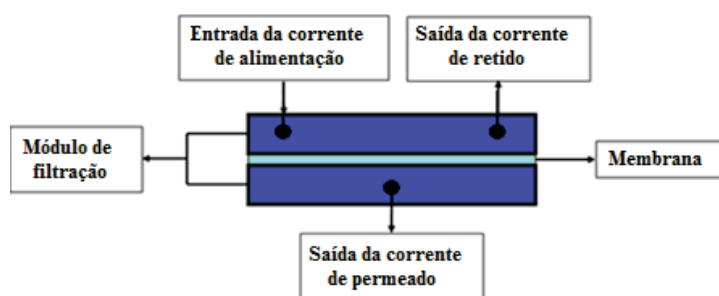
3.2 SISTEMAS DE FILTRAÇÃO

Os experimentos de purificação através de separação por membranas foram realizados em duas etapas, sendo a primeira em escala de bancada utilizando membranas planas de microfiltração e ultrafiltração. Já a segunda foi realizada em equipamento piloto de filtração tangencial utilizando uma membrana tubular de ultrafiltração seguida de diafiltração dentro das mesmas condições.

3.2.1 Filtração em membranas planas

A unidade de filtração para membranas planas utilizada era composta por um tanque de alimentação com capacidade para 1 L, sob temperatura ambiente, conectado ao módulo de filtração. O módulo de filtração era constituído de acrílico e possuía duas saídas, sendo uma de permeado e outra de rejeito. O rejeito redirecionado ao tanque de alimentação permite que ocorra a concentração dos compostos de interesse conforme a Figura 4.

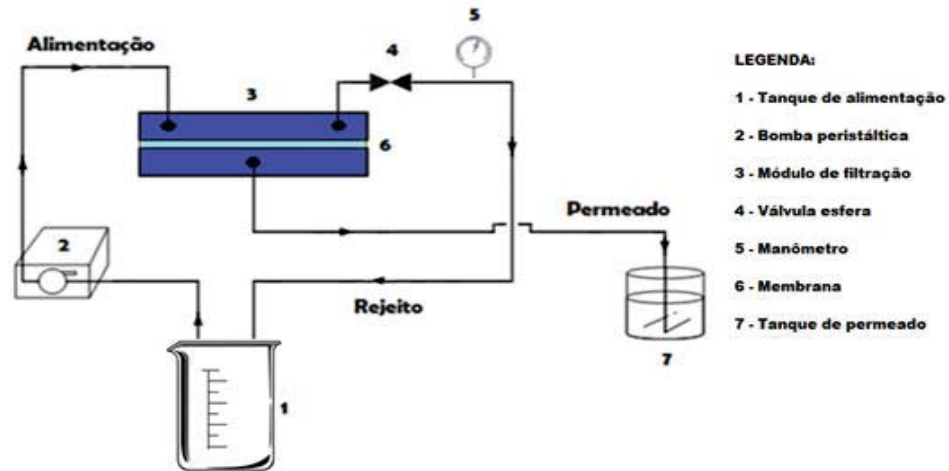
Figura 4 Diagrama esquemático do módulo de filtração por membranas



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

A corrente foi acondicionada em um tanque com capacidade para 1 L para medição de fluxo e a corrente de retido retornou ao tanque de alimentação para posterior caracterização conforme item 3.3. A Figura 5 ilustra as correntes de processo.

Figura 5 Fluxograma das correntes de processo de filtração por membranas



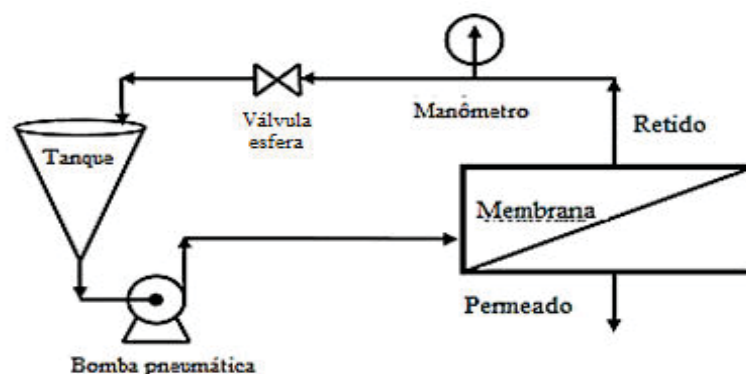
Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

As membranas utilizadas foram membranas planas, sendo uma de microfiltração com tamanho de poro de $0,4 \mu\text{m}$ e uma de ultrafiltração com tamanho de poro de 60 kDa , ambas com área de $0,0039 \text{ m}^2$ para retenção da ficocianina. A pressão utilizada no processo de separação foi de $1,5 \text{ bar}$.

3.2.2 Filtração em membrana tubular

Para a ultrafiltração e diafiltração em membrana tubular, utilizou-se equipamento piloto PROTOSEP para filtração tangencial, através de uma membrana tubular de Fluoreto de polivinilideno (PVDF) com área de filtração de $0,1 \text{ m}^2$ e tamanho de poro entre 30 e 80 kDa sob uma pressão de $1,5 \text{ bar}$. Este equipamento era composto por um reservatório de aço inoxidável de 10 L de capacidade e uma bomba pneumática para alimentação do extrato bruto na carcaça da membrana como representado na Figura 6.

Figura 6 Diagrama do equipamento piloto de filtração tangencial



Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

A corrente do retido foi direcionada ao tanque de alimentação, permitindo assim a concentração e purificação da ficocianina mediante a exclusão de compostos de menor peso molecular através da corrente de permeado. O processo de separação foi mantido até que o volume inicial fosse reduzido em 50%.

A parte retida correspondeu ao extrato bruto ultrafiltrado. Para que houvesse um aumento na pureza, foi realizado no mesmo equipamento a diafiltração, seguindo adaptações de procedimento realizado para purificação de concentrado de soro de leite sugerido por Seguenka (2016), Baldasso (2008) e Pagno et al. (2009), onde retornou-se ao volume inicial pela adição de água de osmose inversa e declorada, seguindo de filtração até que seu volume fosse reduzido em 50%. Este processo de diafiltração foi realizado por 3 vezes consecutivas.

3.3 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

Os extratos brutos e purificados foram submetidos a análise de concentração de ficocianina através da diluição em solução aquosa e leitura da absorbância para quantificação. A quantificação foi realizada conforme definição de Bennett e Bogorad (1973), apresentada na Equação 1.

$$PC = \frac{A_{620} - 0,474(A_{652})}{5,34} \quad (1)$$

Onde:

PC = concentração de ficocianina ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$);

A_{620} = absorbância a 620 nm;

A_{652} = absorbância a 652 nm.

A pureza da ficocianina determinou-se conforme Equação 2 (ABALDE et al. 1998).

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

Onde:

PCPC = Pureza da ficocianina;

A_{620} = absorbância a 620 nm;

A_{280} = absorvância a 280 nm.

A partir destes dados foi possível calcular o fator de purificação, através do quociente entre a pureza do extrato purificado e a pureza do extrato bruto pela Equação 3.

$$PF = \frac{PC_p}{PC_c} \quad (3)$$

Onde:

PF = Fator de purificação;

PC_p = Pureza da ficocianina no extrato purificado;

PC_c = Pureza da ficocianina no extrato bruto.

A quantidade de ficocianina presente no extrato purificado em relação ao extrato bruto, foi dada pela Equação 4.

$$EP = \frac{(PC_p \times V_p)}{(PC_c \times V_c)} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

EP = Eficiência do processo;

PC_p = Concentração de ficocianina no extrato purificado;

PC_c = Concentração de ficocianina no extrato bruto;

V_p = Volume do extrato purificado;

V_c = Volume do extrato bruto.

3.3.1 Determinação do potencial antioxidante

A determinação da atividade antioxidante dos extratos obtidos foram realizados via radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) pelo método desenvolvido por Brand-Willians, Cuvelier e Berset (1995) e modificado por Mensor et al. (2001).

O método DPPH se dá na redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), de coloração púrpura, onde, ao receber um elétron ou um radical hidrogênio, altera sua coloração de violeta para amarelo (difenil-picril-hidrazina). Esta coloração amarela indica sua

estabilidade, ocasionando decréscimo da absorvância a 515 nm (ROGINSKY; LISSI, 2005). A quantidade do radical DPPH removido do meio é proporcional à atividade antioxidante das substâncias presentes na amostra.

Uma alíquota de 0,1 mL de extrato foi adicionada a 2,9 mL de solução etanólica do radical livre DPPH 1 mM e incubado ao abrigo da luz durante 60 min. A redução do radical livre foi mensurado através da leitura da absorvância em espectrofotômetro ao comprimento de onda de 515 nm e a porcentagem de inibição foi calculado de acordo com a Equação 5.

$$\% \text{ inibição} = \left(\frac{\text{absorvância}_{\text{controle}} - \text{absorvância}_{\text{amostra}}}{\text{absorvância}_{\text{controle}}} \times 100 \right) \quad (5)$$

O controle foi realizado pelo solvente extrator e a solução de DPPH sem adição da amostra.

3.3.2 Determinação das resistências nas membranas planas

O efeito de colmatção nas membranas planas foi calculado através da medição dos fluxos de permeado, antes e após a filtração do extrato bruto de ficocianina utilizando água destilada e durante a filtração do extrato bruto de ficocianina. Com os resultados das permeabilidades antes e após a filtração pôde-se medir as resistências da membrana (R_m), resistência reversível (R_r) e resistência irreversível (R_{ir}), através da adaptação da Lei de Darcy por Gésan-Guisiou (1999) conforme a Equação 6.

$$J = \frac{TMP}{\mu(R_m + R_r + R_{ir})} \quad (6)$$

3.3.3 Análise de microscopia eletrônica de varredura nas membranas planas

As membranas planas de 0,4 μm e de 60 kD foram destinadas a análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV) em aparelho da marca TESCAN e modelo VEJA 3 LMU localizado no Laboratório de Metalografia da Faculdade de Engenharia e Arquitetura da Universidade de Passo Fundo. Esta análise possibilita as imagens de superfície de topo e seções transversais das membranas. Como preparo, as membranas foram armazenadas em ultrafreezer

a -84 °C durante 20 h e liofilizadas antes da deposição de uma camada condutora de 0,3 nm de espessura composta por ouro. Para a realização da análise das secções transversais das membranas, estas foram fraturadas após imersão em nitrogênio líquido durante 30 min, seguido de nova liofilização antes da deposição da camada condutora. As amostras foram analisadas com energia de 30 kV.

3.3.4 Modelagem usando o Solver adicionado ao Microsoft Excel na membrana tubular.

O método utilizado foi desenvolvido usando o Microsoft Excel 2010 e o Solver foi usado para estimar os parâmetros dos modelos. Para realizar a modelagem do fluxo permeado, o modelo de Ho e Zydney (2000) (Eq. 1) foi implementado como uma função definida pelo usuário e o solver é executado automaticamente por um macro. A função do Solver é minimizar a soma residual de quadrados (SRQ) entre as previsões numéricas e os dados experimentais usando o procedimento de otimização de regressão não linear disponibilizado por este. O SRQ é minimizado com a variação aleatória dos parâmetros resistência da torta (α) e bloqueio de poro (R_p). Os dados de entrada requeridos são o fluxo de permeado (J), o tempo (t), a pressão transmembranar (P), a viscosidade do permeado (μ) e a concentração volumétrica (C_b) da solução de alimentação. A resistência à membrana (R_m) também é necessária. Este parâmetro pode ser diretamente informado pelo usuário ou calculado com os dados de permeação para água pura.

$$J = J_0 \left[\exp\left(-\frac{\alpha \Delta P C_b}{\mu R_m} t\right) + \frac{R_m}{R_m + R_p} \left(1 - \exp\left(-\frac{\alpha \Delta P C_b}{\mu R_m} t\right)\right) \right] \quad (8)$$

3.3.5 Determinação por espectroscopia em infravermelho por transformada de Fourier dos extratos purificados por ultrafiltração e diafiltração em membrana tubular

A espectroscopia em infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) corresponde à medição da radiação transmitida, absorvida ou refletida por uma amostra. As relações entre as transições dos diferentes níveis vibracionais se relacionam com a radiação de forma a caracterizar grupos funcionais distintos. Assim, as amostras purificadas por ultrafiltração e por

diafiltração foram submetidas a análise utilizando-se 0,5 mL de amostra sem diluição diretamente no leitor do espectrofotômetro na região espectral de 1.000 a 2.000 cm^{-1} . O espectrofotômetro Cary 630 F-TIR da Agilent Technologies utilizado pertence ao Parque Tecnológico da Universidade de Passo Fundo - UPF.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4 TESTES DE EXTRAÇÃO POR DIFERENTES MÉTODOS

Os testes de extração foram executados a fim de verificar qual a maior extração possível de ficocianina, bem como a maior pureza alcançada pelos mesmos a partir da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 sob diferentes metodologias. Os resultados obtidos nos testes de extração por congelamento e descongelamento, banho ultrassônico e com tampão fosfato de sódio estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 1 Concentração e pureza de ficocianina no extrato bruto obtido a parti da *Spirulina* sp LEB 18

Método de extração	Ficocianina* (mg.g _{cel} ⁻¹)	Pureza da Ficocianina*
CD	47,940±0,456 ^a	0,372±0,003
UP40	37,457±0,089 ^b	0,438±0,001
UP50	40,240±0,013 ^c	0,449±0,003
UP60	41,871±0,456 ^d	0,459±0,001
TP	58,540±0,256 ^e	0,516±0,005

*Resultados de média±desvio padrão. Congelamento e descongelamento (CD); Banho Ultrassônico com tempos de 40 min (UP40), 50 min (UP50) e 60 min (UP60); Tampão fosfato (TP).

Verifica-se na Tabela 4 que o método de extração da ficocianina a partir da biomassa apresenta diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação a quantidade a ser extraída. Do mesmo modo, a pureza também sofre interferência de acordo com a metodologia empregada. A extração com maior quantidade de ficocianina foi utilizando-se solução tampão fosfato, atingindo um valor de 58,54 mg.g⁻¹ de biomassa seca, correspondendo a 15,7 % do total de proteína da biomassa 371,7 mg.g_{célula}⁻¹. Este valor é relevante quando considera-se que a fração proteica da *Spirulina* pode conter até 20 % de ficocianina (VONSHAK, 1997) e que segundo Sarada, Pillai e Ravishankar (1999) e Chaiklahan et al. (2011) a redução no conteúdo de ficocianina pode ser de até 50 % quando utilizado processos de secagem da biomassa através de fluxo cruzado, aspersão ou fornos. A extração utilizando banho ultrassônico apresentou um valor crescente para a extração de ficocianina conforme o tempo utilizado, obtendo seu melhor resultado 41,87 mg.g_{cel}⁻¹ no tempo de 60 minutos, sendo muito próximo ao encontrado por Moraes et al. (2011) que obteve 43,75 mg.g_{cel}⁻¹ nas melhores condições de sua extração com banho ultrassônico.

Considerando a extração por tampão como base de cálculo, o rendimento da extração por congelamento e descongelamento apresentou um rendimento de 81,9% quando comparada a extração com tampão fosfato de sódio, sendo este valor 10,4 % superior a extração com banho ultrassônico. Este rendimento coloca a extração por congelamento e descongelamento à frente dos processos com banho ultrassônico, porém quando comparamos a pureza do extrato obtido isto se inverte, pois a pureza do extrato bruto obtido por banho ultrassônico foi superior em 19 %. O banho ultrassônico já vem sendo estudado na obtenção de extrato bruto de ficocianina alegando, em algumas ocasiões, superioridade em relação ao método de congelamento e descongelamento (MORAES et al., 2011; ORES; AMARANTE; KALIL, 2016; LIU et al., 2017).

A extração utilizando tampão fosfato de sódio pH 7,0 se apresenta como a melhor alternativa dentre os métodos testados (RAMOS; ACIÉN; FERNÁNDES-SEVILLA, 2011) neste trabalho e também em relação a outros tamponantes como tampão citrato pH 5,0 ou tampão acetato pH 6,0 (SARAN et al. 2016). Chen et al. (2016) utilizou a extração com tampão fosfato na extração de ficocianina como método de referência para quantificação de ficocianina presente na microalga obtendo um extrato com pureza de 0,99 após centrifugação a 10.000 g, sugerindo assim que este método possui uma extração relevante ao ponto de ser utilizado como base de cálculos. Saran et al. (2016) obteve 137 mg. g_{cel}^{-1} de ficocianina combinando o tampão fosfato com o processo de congelamento e descongelamento, seguido de centrifugação a 10.000 g. A solução de tampão fosfato de sódio obteve valores maiores de extração e um menor grau de impurezas, o que é desejável para um processo de separação por membranas.

3.5 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS NA PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DE FICOCIANINA

A purificação dos extratos brutos de ficocianina estudadas apresentou um fenômeno inesperado de forte colmatação quando realizada em equipamentos de escala de bancada. Assim para comprovação deste fenômeno as análises das resistências e visualização em MEV se mostraram de fundamental importância. Já para a purificação em escala piloto, optou-se pela modelagem.

3.5.1 Purificação do extrato bruto de ficocianina através de membranas planas

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos para o extrato bruto através da lise celular da *Spirulina* sp. por ciclos de congelamento e descongelamento utilizada no processo de purificação.

Tabela 2 Rendimento de ficocianina no extrato bruto.

Ficocianina* (mg.mL ⁻¹)	Ficocianina* (mg. g _{celúla} ⁻¹)	Pureza da Ficocianina*
1,383±0,014	41,49±0,042	0,355±0,003

*Resultados de média±desvio padrão.

O conteúdo de ficocianina obtido através do processo de congelamento e descongelamento apresentou um rendimento de 41,49 mg.g_{celúla}⁻¹, resultado este semelhante ao encontrado por Moraes et al. (2007) de 44,4 mg.g_{celúla}⁻¹ em seu melhor cultivo. Este resultado foi 14 % menor que o obtido no teste de extração, isto se deve ao fato de que durante o processo de congelamento e descongelamento, algumas amostras podem não terem sido ou congeladas ou descongeladas totalmente antes do próximo ciclo, reduzindo a eficiência da lise celular no processo.

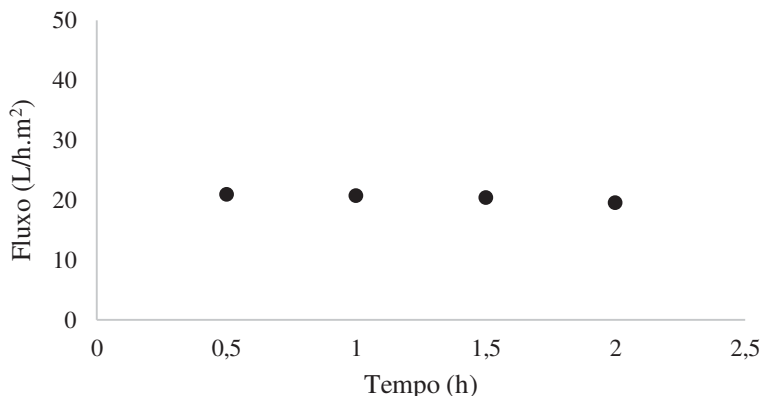
Um conteúdo de 41,49 mg.g_{celúla}⁻¹ corresponde a 4,15 % do extrato seco presente na biomassa e representa 8,6 % dos sólidos presentes quando comparados a literatura (KAMBLE; GAIKAR; PADALIA, 2013; SHANAB et al., 2012). O baixo grau de pureza do extrato bruto de ficocianina não é um limitante para o trabalho pois este valor poderia chegar ao valor de 0,7, correspondente ao mínimo grau de pureza necessário para uso em produtos alimentícios, conforme Rito-Palomares, Nuñez e Amador (2001) em um processo de purificação. O processo de congelamento e descongelamento, apresenta ainda a vantagem de não utilizar produtos químicos, possibilitando o uso da parte não utilizada neste processo para outras aplicações como por exemplo a extração de outros metabólitos de interesse ou a produção de biocombustíveis não trabalhados neste estudo.

A filtração do extrato bruto de ficocianina foi realizada em membrana plana de 0,4 µm e apresentou um baixo fluxo de permeado sem muita variação durante todo o processo (Figura 7). O reduzido fluxo de permeado se deve ao somatório de vários processos de entupimento, que se dá inicialmente pela adsorção das proteínas na membrana, podendo ocorrer antes ainda do permeado começar a ser gerado (JAMES; JIN; CHEN, 2003).

Em sistemas onde há formação de torta, este é caracterizado por uma queda rápida de fluxo inicialmente e após a formação da torta uma queda lenta (BRIAO; TAVARES, 2012; HO; ZYDNEY, 2000). A queda inicial do fluxo de permeado pode não ter sido percebida devido à

baixa vazão de permeado propiciada pela área superficial da membrana de 0,0039 m² no módulo de filtração.

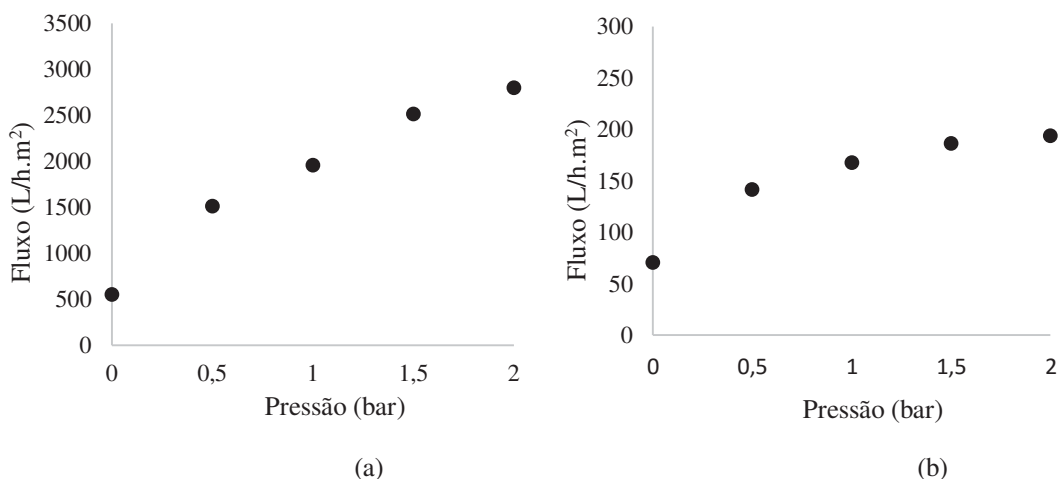
Figura 7 Fluxo do permeado de ficocianina na microfiltração em membrana de 0,4 μm



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

O comportamento do fluxo de permeado, aliado à grande diferença em relação à permeabilidade hidráulica da membrana 0,4 μm (Figura 8), indica a ocorrência do processo de entupimento logo nos segundos iniciais, reduzindo o fluxo de forma considerável e impedindo que o fluxo obtivesse uma curva dentro dos modelos tradicionais.

Figura 8 Permeabilidade da membrana de 0,4 μm antes (a) e depois (b) da filtração do extrato bruto de ficocianina



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

A membrana de 0,4 μm após a filtração foi limpa com água deionizada para retirada da torta formada sobre a superfície da membrana. O teste de permeabilidade hidráulica realizado

na membrana após a filtração, gerou pouco aumento de fluxo, confirmando o entupimento dos poros.

As resistências apresentadas na Tabela 2, trazem novos elementos para o entendimento do mecanismo que conduziu a redução do fluxo de permeado. Pode-se observar que a resistência com maior efeito, foi a reversível. A resistência reversível é formada pela resistência devido à formação de torta e também pela polarização por concentração.

Tabela 3 Resistências apresentadas na microfiltração do extrato bruto

Membrana	$R \cdot 10^{-10} \text{ (m}^{-1}\text{)}$	$R_m \cdot 10^{-10} \text{ (m}^{-1}\text{)}$	$R_{ir} \cdot 10^{-10} \text{ (m}^{-1}\text{)}$	$R_r \cdot 10^{-10} \text{ (m}^{-1}\text{)}$
0,4 μm	1836,26	18,44	196,24	1621,58

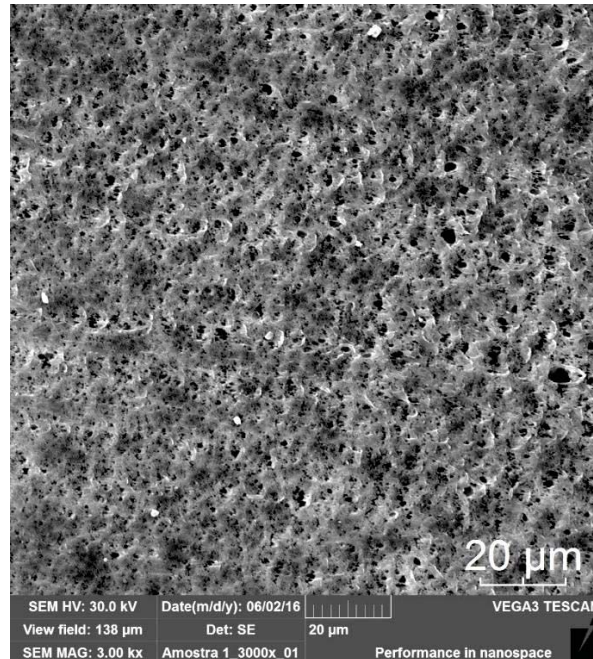
Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

R: Resistência total; R_m : Resistência da membrana; R_{ir} : Resistência irreversível; R_r : Resistência reversível.

Como a limpeza das membranas não resultou em uma alta recuperação do fluxo de permeado, estima-se que a adsorção das proteínas e suas interações, podem ter obstruído os poros, ou ainda que não, o acúmulo destas sobre a superfície da membrana pode ter gerado uma forma de incrustação chamada de polarização por concentração. A polarização por concentração ocorre quando o soluto é repelido por um processo osmótico decorrente do alto gradiente de concentração de soluto na superfície da membrana, evitando assim que este permeie a membrana (INGHAM et al., 1979).

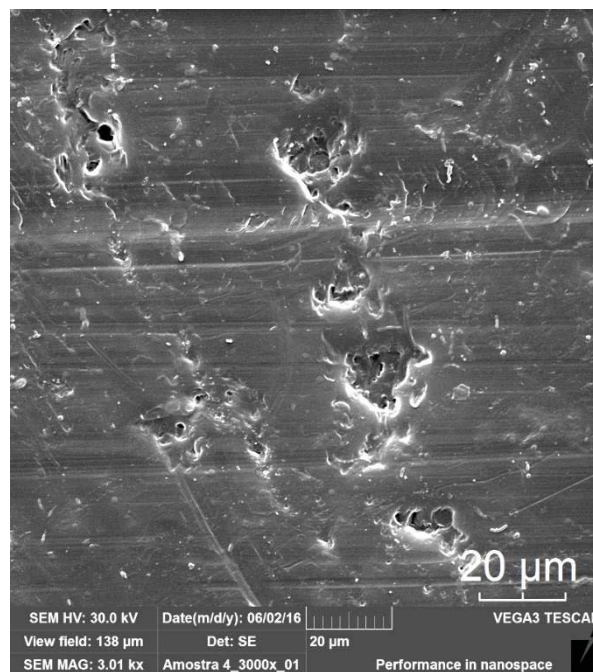
Para uma complementação visual do efeito de colmatação sofrido pela membrana de 0,4 μm durante a microfiltração, esta foi analisada por MEV conforme as Figuras 9, 10 e 11.

Figura 9 Visualização por MEV do topo da superfície da membrana de 0,4 μm antes da filtração do extrato bruto de ficocianina



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

Figura 10 Visualização por MEV do topo da superfície da membrana de 0,4 μm após a filtração do extrato bruto de ficocianina



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

A visualização da superfície da membrana de 0,4 μm nos permite avaliar de uma forma melhor o processo de colmatção. Os poros presentes nas Figura 9 são totalmente cobertos

pelos compostos presentes no extrato bruto que se adsorveram a superfície da membrana, a pressão positiva que força o fluxo através da membrana faz que alguns compostos penetrem a membrana ao mesmo tempo em que outros se depositam sobre ela formando a torta. Isto afeta diretamente o fluxo de permeado e também a capacidade de permeio das ficobiliproteínas, resultando em um permeado com baixíssima concentração de ficocianina, apenas realizando uma concentração do meio, como pode ser observado na Tabela 3.

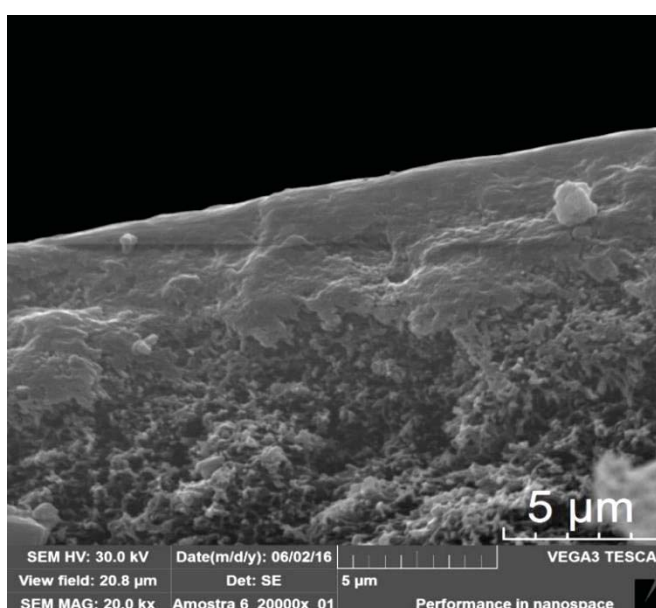
Tabela 4 Concentração e pureza da ficocianina obtida após filtração do extrato bruto em membrana de 0,4 μm

Fração	Ficocianina* (mg.mL^{-1})	Pureza da Ficocianina*
Permeado	$0,1657 \pm 0,0043$	$0,0651 \pm 0,0009$
Retido	$1,9058 \pm 0,0208$	$0,3454 \pm 0,0034$

Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

Uma visão do corte transversal da membrana de 0,4 μm (Figura 11) possibilita verificar o processo de colmatção, observando a camada inferior porosa e a camada superior da membrana. Na parte superior não se distingue a superfície da membrana, devido ao processo de preenchimento de alguns poros, a adsorção e a formação de torta sobre a mesma.

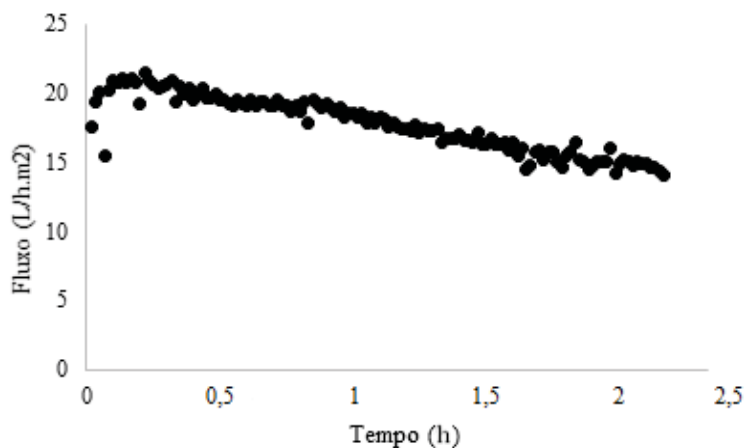
Figura 11 Visualização por MEV do corte transversal da membrana de 0,4 μm após a filtração do extrato bruto de ficocianina



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

A ultrafiltração obteve valores semelhantes de fluxo de permeado que a microfiltração (Figura 12), mesmo possuindo uma permeabilidade hidráulica muito inferior à da microfiltração. Isto se deve principalmente pelo processo de colmatção da membrana de 0,4 μm . Ainda pode-se notar que este gráfico de filtração do extrato bruto celular, mais uma vez não apresentou comportamento característico da formação de torta, também afetada pela alta concentração de solutos que deveriam ter sido eliminados no processo de microfiltração.

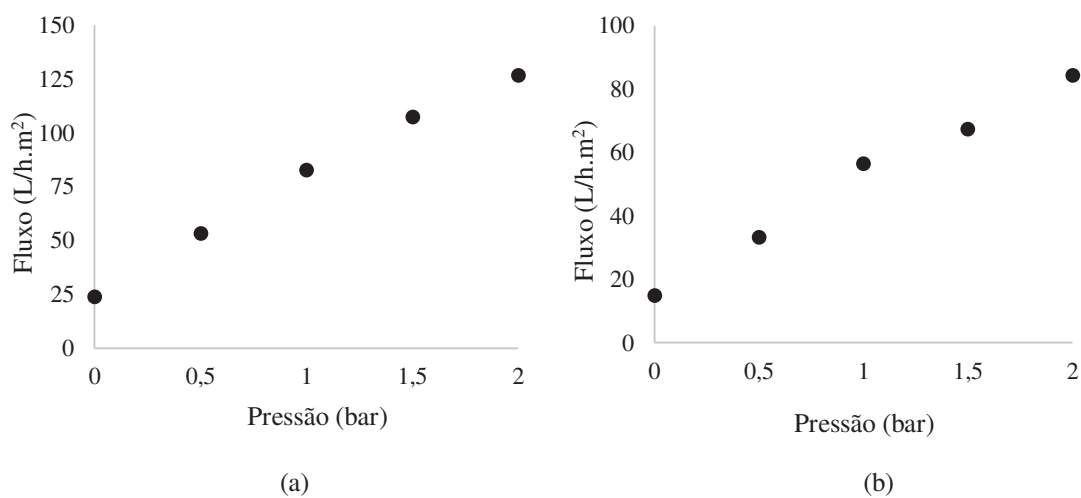
Figura 12 Fluxo do extrato bruto celular em membrana de 60 kDa



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

Os dados obtidos para a permeabilidade da membrana de ultrafiltração estão representados na Figura 13.

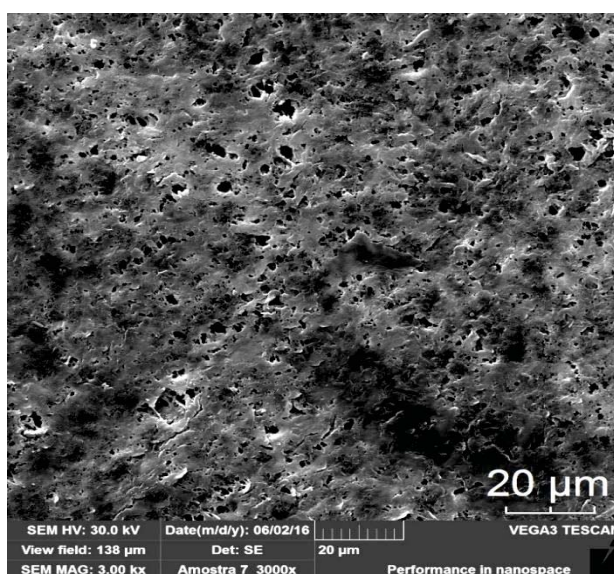
Figura 13 Permeabilidade hidráulica da membrana de 60 kDa antes e após a ultrafiltração



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

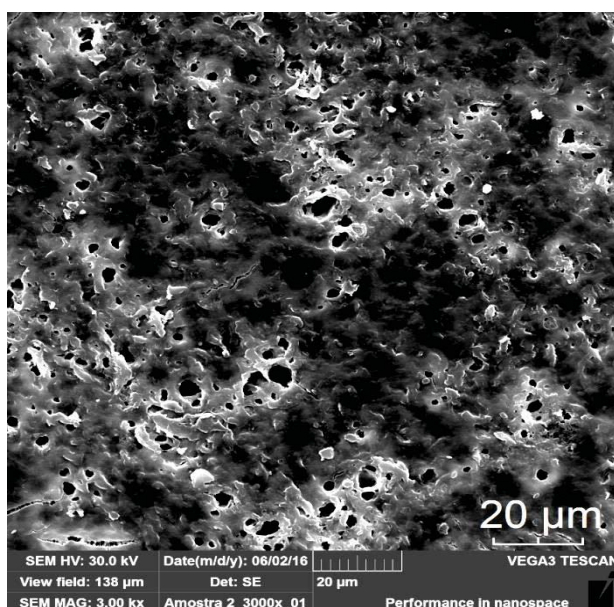
Na ultrafiltração a colmatção ocorreu de forma superficial (Figura 14), na vista de topo da membrana antes da filtração, pode-se observar claramente a estrutura porosa da membrana, já na Figura 15 uma região mais escura representa onde os poros possuem uma fina camada de torta sobre sua superfície, e alguns orifícios provenientes de vacúolos da membrana com seus interiores expostos devido ao manejo ou processo produtivo das mesmas.

Figura 14 Visualização por MEV do topo da superfície da membrana de 60 kDa antes da ultrafiltração do extrato bruto de ficocianina



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

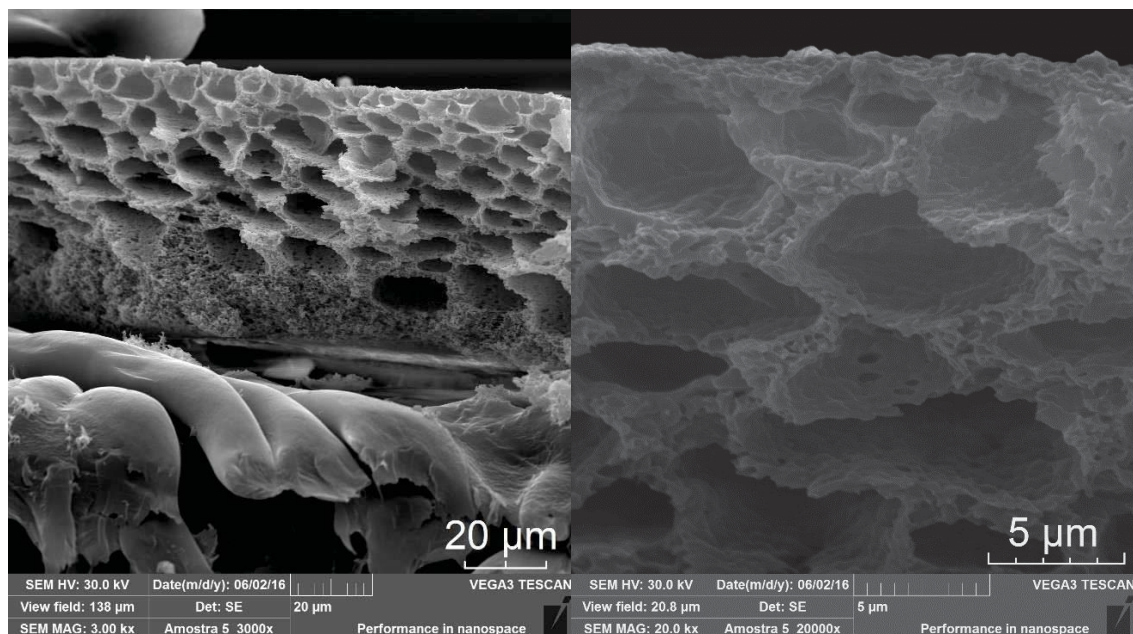
Figura 15 Visualização por MEV do de topo da superfície da membrana de 60 kDa após da ultrafiltração do extrato bruto de ficocianina



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

A Figura 16 demonstra através de um corte transversal a não ocorrência de constrição dos poros e pouquíssima formação de torta, tendo como principal força atuante a adsorção de proteínas a superfície e a polarização por concentração.

Figura 16 Vista do corte transversal da membrana de 60 kDa após a filtração



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

A concentração de soluto também atua como um dos fatores de forte influência sobre a queda do fluxo de permeado. A diluição do extrato bruto poderia ser uma alternativa a este efeito, ainda que esta prática dificultaria o processo de escalonamento do processo de purificação (BINABAJI et al., 2015). Os resultados apresentados na Tabela 4 demonstram houve uma redução superior a 10% da pureza no processo de ultrafiltração.

Tabela 4 Concentração e pureza da ficocianina obtida após filtração do extrato bruto em membrana de 60 kDa

Fração	Ficocianina* (mg.mL ⁻¹)	Pureza da Ficocianina*
Extrato Bruto	1,240±0,011	0,380±0,006
Permeado	0,052±0,008	0,024±0,003
Retido	1,498±0,036	0,336±0,005

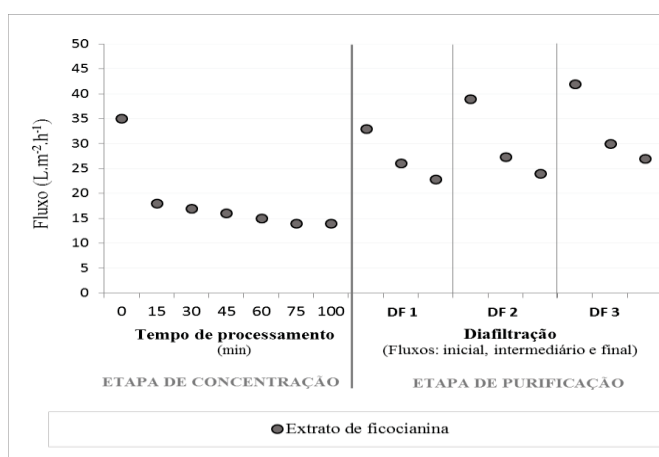
Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

3.5.2 Purificação do extrato bruto de ficocianina através de membranas tubular em escala piloto

A extração por tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,0 foi selecionada para esta etapa devido ao seu melhor rendimento em termos de quantidade e pureza do extrato bruto de ficocianina, além da facilidade do escalonamento para um equipamento piloto.

A Figura 17 apresenta os fluxos de permeado ao longo do tempo das etapas de ultrafiltração e diafiltração.

Figura 17 Comportamento do fluxo em relação ao tempo durante o processo de purificação da ficocianina.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

O gráfico mostra que o fluxo inicial decai de forma rápida logo nos primeiros minutos de filtração. Vários autores observaram esse fenômeno que é explicado devido à formação da camada de polarização por concentração, ao *fouling* (acúmulo de matérias depositadas na membrana durante a fase de polarização da concentração, também chamado de colmatação da membrana) e ao aumento da concentração da solução (AFONSO et al., 2004; REKTOR; VATAI, 2004; BACCHIN; AIMAR; FIELD, 2006).

Observou-se que ao iniciar cada etapa de diafiltração houve um aumento no fluxo de permeado. Esse aumento de fluxo ocorre porque a água adicionada dilui os sólidos presentes no retido reduzindo a polarização por concentração, mas conforme a água adicionada é removida no permeado e o retido recupera sua concentração inicial e o fluxo volta a cair.

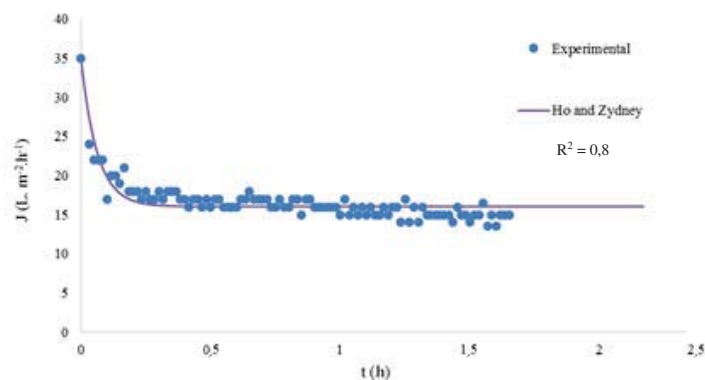
A literatura sugere que para a ultrafiltração e outros processos de separação por membranas, vários fatores afetam o desempenho do processo como velocidade tangencial,

pressão de operação e operações de limpeza e retrolavagem (CASSANO et al, 2013; HO; ZIDNEY, 2000; SALTIK et al, 2017).

Gunther et al. (2012), estudaram a distribuição do fluxo de permeado em membranas de fibra oca e constataram que as velocidades de filtração variam ao longo da fibra e isto conduz a formação de torta pelo depósito irregular das partículas sobre a membrana. Este fenômeno ocorre devido a primeira fração de permeado não encontrar obstáculos para atravessar a membrana, após inicia-se os processos de formação de torta e polarização por concentração.

A Figura 18 apresenta o fluxo de permeado durante todo o processo de ultrafiltração comparado com a curva de colmatção segundo o modelo de Ho e Zydney (2000), demonstrando sua capacidade para a modelagem de processos de micro e ultrafiltração de soluções proteicas em frente a outros modelos (PENG; TREMBLAY, 2008; SAMPATH; SHUKLA; RATHORE, 2014; BÁGUENA et al., 2013).

Figura 18 Fluxo de permeado durante a ultrafiltração do extrato bruto de ficocianina em membrana tubular.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2016.

O fluxo inicial foi de $35 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$, declinando para $22 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ após o primeiro minuto de operação e seguindo com uma gradual redução de fluxo até valores próximos a $15 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$. Isso ocorre devido ao aumento da concentração da solução de alimentação, esta concentração aumenta a camada de depósito e reduz o fluxo de permeado até que se atinja uma condição estacionária (ATRA et al. 2005).

Resaei et al. (2011) explicam em seu trabalho sobre os mecanismos de incrustação em membranas de microfiltração, que a pressão e os valores de Reynolds afetam de forma positiva no fluxo de permeado, sugerindo que valores melhores podem ainda serem obtidos para este processo. A partir de Mororó (2013), outros parâmetros podem ser otimizados para uma escala industrial, pois o fluxo depende de características do meio tais como, concentração, carga, tamanho das partículas e condições hidrodinâmicas.

A retenção das proteínas no processo se deu de forma positiva, pois na ultrafiltração foi possível reter 85 % das proteínas presentes no extrato bruto e 74,5 % do conteúdo de ficocianina. O grau de pureza também foi elevado a 0,66 representando um aumento de 81,8 %.

A Tabela 5 apresenta as concentrações de proteína e ficocianina em todas as etapas do processo.

Tabela 5 Concentração de ficocianina no extrato bruto e sua recuperação

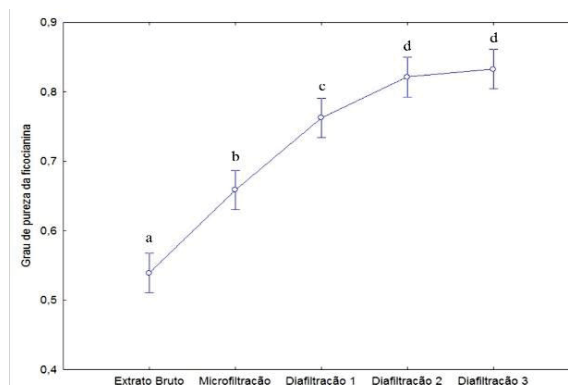
Amostras	Ficocianina (mg.g _{cel} ⁻¹)	Ficocianina (mg.mL ⁻¹)
Extrato bruto de ficocianina	65,630±4,809*	0,656±0,048
Retido ultrafiltração	48,882±1,245	0,978±0,025
Retido diafiltração 1	45,477±4,577	0,910±0,083
Retido diafiltração 2	41,966±2,183	0,839±0,022
Retido diafiltração 3	41,670±0,714	0,833±0,014

*Valor considerado como 100% para base de cálculos.

Pôde-se visualizar que a redução de proteína teve uma maior relevância nas etapas de ultrafiltração e nas duas primeiras diafiltrações. Nas diafiltrações 2 e 3, não houve diferença significativa ($p>0,05$) para o grau de pureza, ao mesmo tempo que os valores de proteína não sofreram mudanças significativas. Isso sugere que o processo pode ser realizado realizando-se apenas uma diafiltração ou duas diafiltrações.

O grau de pureza durante todo o processo de purificação pode ser observado na Figura 19.

Figura 19 Grau de pureza da ficocianina durante o processo de purificação



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

Se considerarmos a etapa de ultrafiltração e diafiltração como um todo, a pureza da ficocianina partiu de 0,54 para 0,83 com um fator de purificação de 1,54 e eficiência de processo de 0,635 apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 Fator de purificação e eficiência durante as etapas de purificação do extrato bruto de ficocianina

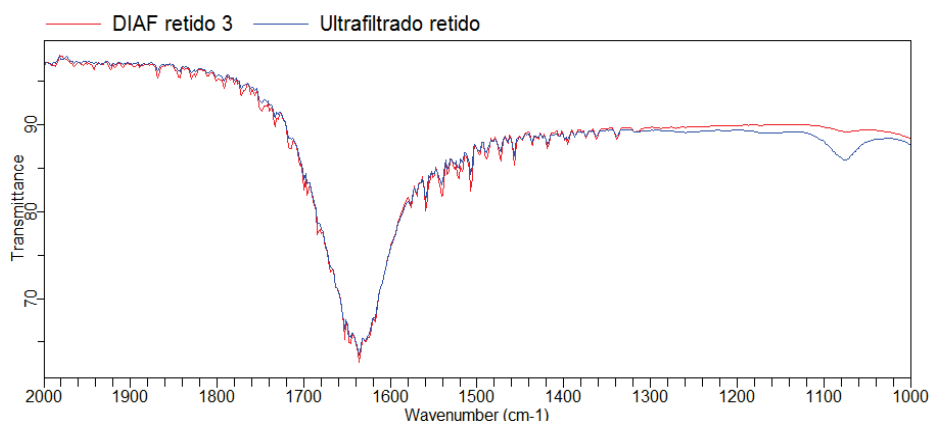
Amostras	Fator de Purificação*	Eficiência do Processo*
Retido ultrafiltração	1,22	74,5
Retido diafiltração 1	1,41	69,4
Retido diafiltração 2	1,52	63,9
Retido diafiltração 3	1,54	63,5

* Calculados em relação ao extrato bruto de ficocianina

O fator de purificação da ultrafiltração atingiu valores de 1,22, ficando abaixo dos encontrados por Chaiklahan et al (2011) e Figueira et al. (2012). Isto se justifica pelo fato de que o corte da membrana utilizada nos ensaios possui uma faixa de corte entre 30 e 80 kDa e a utilizada por estes autores um corte de 50 kDa. As substâncias com peso molecular entre 30 e 50 kDa que ficaram retidas podem influenciar de forma a reduzir a pureza da solução de ficocianina da corrente de retido. Após as três diálises foi possível obter um fator de purificação de 1,54. O grau de pureza alimentar foi alcançado já na primeira diálise e demonstrou-se fortemente ligado ao rendimento de extração, pois em um dos ensaios realizados atingiu-se grau de pureza alimentar apenas ultrafiltrando o extrato bruto.

A obtenção do grau de pureza alimentar de 0,7, proposto por Rito-Palomares, Nuñez e Amador (2001) é superado na primeira diálise (Figura 19) atingindo valores de $0,763 \pm 0,016$ com fator de purificação de 1,41 e eficiência de processo de 0,689. Isto sugere que as diafiltrações subsequentes podem ser planejadas conforme a pureza do extrato bruto e seu resultado após a ultrafiltração, utilizando-se de um número maior ou menor de etapas para a obtenção da pureza desejada. O aumento de pureza da ficocianina pode ser também explicado pela análise de espectroscopia de infravermelho pela transformada de Fourier (FTIR) apresentada na Figura 20.

Figura 20 Espectroscopia por infravermelho pela transformada de Fourier.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

Através da espectroscopia por FTIR, pode se observar a banda específica da amida 1 a 1655 cm^{-1} (alongamento da ligação C=O) e da amida 2 a 1543 cm^{-1} (SUSI, 1972; KRIMM; BANDEKAR, 1986). A posição e a forma da banda de amida 1 são utilizadas para a análise da estrutura secundária da proteína. O formato da banda de amida 1 a 1655 cm^{-1} , indica para a ficocianina, a α -hélice como elemento principal da sua estrutura secundária (FERNÁNDEZ-ROJAS, HERNÁNDEZ-JUÁREZ, PEDRAZZA-CHAVERRI, 2014; PATEL et al., 2005). Pode-se ainda verificar que o uso da diafiltração ocasionou a eliminação de grande parte dos sulfatos e fosfatos inorgânicos que representam uma banda intensa entre 1043 e 1015 cm^{-1} .

A manutenção da atividade antioxidante de um biocomposto é uma das características desejáveis em seu processo de obtenção e purificação. A Tabela 7 apresenta os resultados em percentual de inibição obtido para os extratos de ficocianina antes e após purificação em membrana plana (item 4.1) e membrana tubular (item 4.3).

Tabela 7 Percentual de inibição do radical DPPH dos extratos de ficocianina

Amostras	% inibição 30 min	% inibição 60 min
Extrato bruto obtido por CD	14,24±0,49	37,22±1,24
Extrato bruto obtido por TP	37,60±0,68	38,62±0,65
Extrato bruto CD purificado	16,28±0,27	24,26±0,26
Extrato bruto TP purificado	21,89±1,22	26,90±0,82

Congelamento e descongelamento (CD); Tampão fosfato (TP).

O extrato bruto obtido pela extração com tampão fosfato de sódio apresentou um percentual de inibição superior ao extrato bruto obtido por congelamento e descongelamento no tempo de 30 min. No tempo de 60 min não houve diferença significativa entre a inibição do

radical DPPH pelos extratos. Isto se repetiu para os extratos purificados, onde a redução do potencial antioxidante devido ao processo de purificação foi de 34% para o processo de separação em membranas planas e de 30% em membrana tubular. Esta queda do potencial antioxidante está relacionada a eliminação de outras substâncias com atividade antioxidante durante o processo de purificação (CHEN, 1996; APEL; HIRT, 2004; CHEN et al., 2005; SINHA et al., 2003).

Uma alteração notada durante o processo de purificação foi a redução da coloração rósea/avermelhada, característica da interação entre a ficocianina e a ficoeritrina, podendo ser considerada que esta última pode ter sido removida ou oxidada durante o processo (OLIVEIRA, 2012). Os extratos purificados apresentaram valores próximos aos encontrados por Formigheri et al. (2016) para ficocianina comercial pura e superiores aos encontrados por Cavalheiro et al. (2013) para soluções de *Spirulina* LEB 18.

A manutenção do potencial antioxidante durante a purificação através de processos de separação por membranas demonstra como um processo simples e eficiente pode ser aplicado em escala piloto, mesmo tendo nos fenômenos de colmatação um fator importante a ser considerado. Pois estes fenômenos implicam na avaliação dos materiais constituintes das membranas e do extrato a ser purificado, das condições ideais de operação e manutenção das membranas, o que inclui a limpeza periódica das membranas para minimizar os efeitos da colmatação entre os processos.

4 CONCLUSÃO

A combinação de métodos químicos e físicos são uma alternativa para a obtenção da ficocianina em grau alimentar de pureza utilizando extração com tampão fosfato seguida de microfiltração e diafiltração em membranas tubulares.

O método de extração por solução tampão fosfato obteve melhores resultados de pureza (0,52) e concentração de ficocianina ($58,5 \text{ mg.g}^{-1}$) no extrato bruto, superando o método mais utilizado por congelamento e descongelamento (0,37 e $47,9 \text{ mg.g}^{-1}$, respectivamente).

A utilização de membranas tubulares em uma escala piloto ofereceu resultados melhores que os testes em membranas planas em escala de bancada produzindo uma solução de ficocianina com grau de pureza alimentar (0,83) e com manutenção da sua atividade antioxidante.

O uso da diafiltração após a ultrafiltração se mostrou eficiente na melhora do grau pureza, se apresentando como uma alternativa que pode ser realizada em quantas etapas forem necessárias para que haja um aumento na pureza e remoção dos fosfatos residuais do processo de extração por solução tampão fosfato.

A colmatação é um fenômeno característico dos processos de separação por membranas e neste estudo pôde-se observar que ela foi reversível e com boa representação matemática pelo modelo de Ho e Zydney, possibilitando um maior entendimento do processo para utilização em escala industrial.

Como sugestões de continuidade, poderão ser realizados estudos frente a diferentes métodos de extração e sob condições diferenciadas de operação para a otimização do processo. O reuso da corrente de permeado na obtenção de outros compostos, ou para um processo contínuo de extração pode ser estudado complementando e melhorando o processo de purificação com uso de membranas.

REFERÊNCIAS

- 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, p. 109-120, 1998.
- ABELS, C.; CARSTENSEN, F.; WESSLING, M. Membrane processes in biorefinery applications. **Journal of Membrane Science**, v. 444, p. 285-317, 2013.
- AFONSO, M. D.; FERRER, J.; BÓRQUEZ, R. Na economic assessment of proteins recovery from fish meal effluents by ultrafiltration. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 506-512, 2004.
- AHMAD, A. L.; YASIN, N. H. M.; DEREK, C. J. C.; LIM, J. K. Crossflow microfiltration of microalgae biomass for biofuel production. **Desalination**, v. 302, p. 65-70, 2012.
- ALELE, N.; ULBRICHT, M. Membrane-based purification of proteins from nanoparticle dispersions: Influences of membrane type and ultrafiltration conditions. **Separation and Purification Technology**, v. 158, p. 171-182, 2016.
- ALMEIDA, M. S.; KURTENBACH, E. Como purificar proteínas? **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 24, p. 30-35, 2002.
- ANTELO, F. S.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* in aqueous two-phase systems using an experimental design. **Agriculture, Agribusiness and Biotechnology**, v. 58, n. 1, p. 1-11, 2015.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.
- ATRA, R.; VAITAI, G.; BEKASSY-MOLNAR, E.; BALINT, A. Investigation of ultra and nano filtration of whey protein and lactose. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 325-332, 2005.
- BACCHIN, P.; AIMAR, P.; FIELD, R. Critical and sustainable fluxes: theory, experiments and applications. **Journal of Membrane Science**, v. 281, p. 42-69, 2006.
- BÁGUENA, M. J. C.; VELA, M. C. V.; BLANCO, A. S.; GARCIA, J. L. Analysis of two ultrafiltration fouling models and estimation of model parameters as a function of operational conditions. **Transport in Porous Media**, v. 99, p. 391-411, 2013.
- BALDASSO, C. **Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro do lácteo através da tecnologia de separação por membranas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2008.
- BANDYOPADHYAY, A.; ELVITIGALA, T. WELSH, E.; STOCKEL, J. LIBERTON, M. MIN, H.; SHERMAN, L. A.; PAKARASI, H. B. Novel metabolic attributes of the genus *cyanothece*, comprising a group of unicellular nitrogen-fixing Cyanothece. **mBio**, v. 2, n. 5, 2011.

BECK, C.; KNOOP, H.; AXMANN, I. M.; STEUER, R. The diversity of cyanobacterial metabolism: genome analysis of multiple phototrophic microorganisms. **BMC Genomics**, v. 13, n. 56, p. 1-17, 2012.

BENEDETTI, S.; BENVENUTI, F.; PAGLIARANI, S.; FRANCOGLI, S.; SCOGLIO, S.; CANESTRARI, F. Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. **Life Sciences**, v. 75, n. 19, p. 2353–2362, 2004.

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

BERMEJO-BESCOS, P.; PINERO-ESTRADA, E.; VILLAR DEL FRESNO, A. M. Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against iron-induced toxicity in SH-SY5Y neuro-blastoma cells. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 1496-1502, 2008.

BERMEJO, R.; TALAVERA, E. M.; ALVAREZ-PEZ, J. M.; ORTE, J. C. Chromatographic purification of biliproteins from *Spirulina platensis* high-performance liquid chromatographic separation of their α and β subunits. **Journal of Chromatography A**, v. 778, n. 1-2, p. 441-450, 1997.

BHATTACHARYA, S.; SHIVAPRAKASH, M. K. Evaluation of three *Spirulina* species grown under similar conditions for their growth and biochemical. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 333-336, 2005.

BIERHALS, V. S.; MACHADO, V. G.; ECHEVENGUÁ, W. O.; COSTA, J. A. V.; FURLONG, E. B. Compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e antifúngica de multimisturas enriquecidas com a microalga *Spirulina platensis*. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 1, p. 42-48, 2009 .

BINABAJI, E.; MA, J.; RAO, S.; ZYDNEY, A. L. Theoretical analysis of ultrafiltration behavior of high concentrated proteins solutions. **Journal of Membrane Science**, n. 494, p. 216-223, 2015.

BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae - their development and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 3, p. 743-756, 2013.

BOTTERWERCK, A. A. M.; VERHAGEN, H.; GOLDBOEHM, R. A.; KLEINJANS, J.; BRANDT P. A. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, p. 599-605, 2000.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, n. 28, p. 25-30, 1995.

BRIAO, V. B.; TAVARES, C. R. G. Pore bloking mechanism for the recovery of milk solids from dairy wastewater by ultrafiltration. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 29, n. 2, p. 393-407, 2012.

CAETANO, A.; PINHO, M. N.; DRIOLI, E.; MUNTAO, H. Membrane Technology Applications to Industrial Wastewater Treatment. **Environmental Science and Technology**, v.1, 1995.

CANO-EUROPA, E.; ORTIZ-BUTRÓN, R.; GALLARDO-CASAS, C. A.; BLAS-VALDIVIA, V.; PINEDA-REYNOSO, M.; OLVERA-RAMÍREZ, R.; FRANCO-COLIN, M. Phycobiliproteins from *Pseudanabaena tenuis* rich in c-phycoerythrin protect against HgCl₂-caused oxidative stress and cellular damage in the kidney. **The Journal of Applied Phycology**, v. 22, p. 495-501, 2010.

CASSANO, A.; BASILE, A.; Membranes for industrial microfiltration and ultrafiltration. **Advanced Membrane Science and Technology for Sustainable Energy and Environmental Applications**, p. 647-679, 2011.

CASSANO, A.; CONIDI, C.; GIORNO, L.; DRIOLI, E. Fractionation of olive mill wastewater by membrane separation techniques. **Journal of Hazardous Materials**, v. 249-249, p. 185-193, 2013.

CAVALHEIRO, P. L.; MACHADO, A. R.; RIBEIRO, A. C.; BADIALE-FURLONG, E. SOUZA-SOARES, L. Avaliação da capacidade antioxidante de diferentes extratos de microalga *Spirulina* LEB-18. IN: Anais do 53º Congresso Brasileiro de Química, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

CEPOI, L.; RUDI, L.; MISCU, V.; COJOCARI, A.; CHIRIAC, T.; SADOVNIC, D. Antioxidative activity of ethanol extracts from *Spirulina platensis* and *Nostoc linckia* measured by various methods. *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie*, Tom. XVI, v. 2, p. 43-48, 2009.

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, p. 7159-7164, 2011.

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**, n. 112, p. 78-85, 2016.

CHEN, F. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. **Trends in Microbiology**, v. 14, p. 421-426, 1996.

CHEN, F.; LI, H. B.; WONG, R. N. S.; JI, B.; JIANG, Y. Isolation and purification of the bioactive carotenoid zeaxanthin from the microalga *Microcystis aeruginosa* by high speed countercurrent chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1064, p. 183-186, 2005.

CHEN, H. W.; YANG, T. S.; CHEN, M. J.; CHANG, Y. C.; WNAG, E. I. C.; HO, C. L.; LAI, Y. J.; YU, C. C.; CHOU, J. C.; CHAO, L. K. P.; LIAO, P. C. Purification and immunomodulating activity of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* cultured using power plant flue gas. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 1337-1344, 2014.

CHEN, T.; ZHENG, W.; YANG, F.; BAI, Y.; WONG, Y. S. Mixotrophic culture of high selenium-enriched *Spirulina platensis* on acetate and the enhanced production of photosynthetic pigments. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 103-107 2006.

CHOOCHOTE, W.; SUKLAMPOO, L.; OCHAIKUL, D. Evaluation of antioxidant capacities of green microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, p. 43-48, 2014.

CHURCHOUSE, S.; WILDGOOSE, D. Membrane bioreactors progress from the laboratory to full-scale use. **Membrane Technology**, p. 4-8, 1999.

COLLA, L. M.; FURLONG, E. B.; COSTA, J. A. V. Antioxidant properties of *Spirulina (Arthospira) platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p.161-167, 2007.

COSTA, M.; GARCIA, M.; COSTA-RODRIGUES J.; COSTA M. S.; RIBEIRO, M. J.; FERNANDES, M. H.; BARROS, P.; BARREIRO, A.; VASCONCELOS, V.; MARTINS, R. Exploring bioactive properties of marine cyanobacteria isolated from the portuguese coast: high potential as a source of anticancer compounds. **Marine Drugs**, v. 12, n. 1, p. 98-114, 2013.

DRAAISMA, R. B.; WIJFFELS, R. H.; SLEGGERS, P. M.; BRENTNER, L. B.; ROY, A., BARBOSA, M. J. Food commodities from microalgae. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 169-177, 2013.

DUFOSSÉ, L.; GALAUP, P.; YARON, A.; ARAD, S. M.; BLANC, P.; MURTHY, K. N. C.; RAVISHANKAR, G. A. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, n. 9, p. 389-406, 2005.

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.

FERREIRA, H.A.; TORRES, D.P.V.; JUAREZ-OROPEZA, M.A. Hepatoprotective effects of *Spirulina maxima* in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a case series. **J. Med. Case. Reports**, n. 4, p. 103, 2010.

FERNÁNDEZ-ROJAS, B.; HERNANDEZ-JUAREZ, J.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Nutraceutical properties of phycocyanin. **Journal of Food Functions**, v. 11, p. 375-392, 2014.

FERRY, J. D. Ultrafilter membranes and ultrafiltration, **Chemical Reviews**, v. 18, p. 373-455, 1936.

FIGUEIRA, F. S.; MOLON, F. O.; GETTENS, J. G.; MORAES, C.C.; KALIL, S. J. **Obtenção de C-ficocianina de grau alimentar por ultrafiltração: avaliação de parâmetros**. IN: Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, v. 4, n. 4, 2012.

FIRDAOUS, L.; DHULSTER, P.; AMIOT, J.; GAUDREAU, A.; LECOUTURIER, D.; KAPEL, R.; LUTIN, F.; VEZINA, L. P.; BAZINET, L. Concentration and selective separation of bioactive peptides from an alfalfa white protein hydrolysate by electro dialysis with ultrafiltration membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 329, n. 1-2, p. 60-67, 2009.

FORMIGHERI, M. S.; ORO, T.; COLLA, L. M.; BERTOLIN, T. E. Microcápsulas de ficocianina e seu potencial antioxidante. IN: Anais do XXV **Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Gramado, Rio Grande do Sul, 2016.

GALLARDO-CASAS, C. A.; CANO-EUROPA, E.; LÓPEZ-GALINDO, G. E.; BLAS-VALDIVIA V.; OLIVERA-RAMÍREZ, R.; FRANCO-COLÍN, M.; ORTIZ-BUTRÓN, R. Phycobiliproteins from *Spirulina maxima* and *Pseudanabaena tenuis* protect against hepatic damage and oxidative stress caused by Hg²⁺. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**, v. 41, n. 2, p. 30-35, 2010.

GANTAR, M.; SIMOVIC, D.; DJILAS, S.; GONZALEZ, W. W.; MIKSOVSKA, J. Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phyco cyanin from *Limnothrix* sp. Strain 37-2-1. **Journal of Biotechnology**, v. 159, p. 21-26, 2012.

GERARDO, M. L.; OATLEY-RADCLIFFE, D. L.; LOVITT, R. W. Integration of membrane technology in microalgae biorefineries. **Journal of Membrane Science**, v. 464, p. 86–99, 2014.

GERSHWIN, M. E.; BELAY, A. (Eds) ***Spirulina in human nutrition and health***. Boca Raton: CRC Press, Boca Raton, 2008.

GÉSAN-GUISIOU, G., BOYO AVAL, E., DAUFIN, G., Critical stability condition in crossflow microfiltration of skimmed milk: transition to irreversible deposition. **Journal of Membrane Science**, v. 158, p. 211-222, 1999.

GUAN, S. **Extracting phycocyanin from spirulina and hydrothermal liquefaction of its residues to produce bio-crude oil**. 2016. Thesis (Master of Science in Agricultural and Biological Engineering) – Graduate College of the University of Illinois at Urbana-Champaign, 2016.

GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; MALCATA, F. X. Microalgae as sources of carotenoids. **Mar Drugs**, v. 9, p. 625-644, 2011.

GUNTHER, J.; HOBBS, D.; ALBASI, C.; LAFFORGUE, C.; COCKX, A.; SCHIMITZ, P. Modeling the effect of packing density on filtration performances in hollow fiber microfiltration module: A spatial study of cake growth. **Journal of Membrane Science**, v. 389, p. 126-136, 2012.

GUPTA, A.; SANIS, J. K. Isolation of C-phyco cyanin from *Synechococcus* sp. **Journal of Applied Phycology**, n. 22, 231-233, 2009.

HO, C. C.; ZYDNEY, A. L. A combined pore blocking and cake filtration model for protein fouling during ultrafiltration. **Journal of Colloid and Interface Science**, n. 232, p. 389-399, 2000.

HSIEH, P.; PEDERSEN, J. Z.; ALBERTANO, P. Generation of reactive oxygen species upon red light exposure of cyanobacteria from *Roman hypogea*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 84, p. 258-265, 2013.

HUANG, K. J.; CHIANG, Y. C. Comparison of membrane fouling and separation efficiency in protein/polysaccharide cross-flow microfiltration using membranes with different morphologies. **Separation and Purification Technology**, v. 215, p. 74-82, 2014.

IBÁÑEZ, E., CIFUENTES, A. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 4, p. 703-709, Mar 2013.

INGHAM, K. C.; BUSBY, T. F.; SAHLESTROM, Y.; CASTINO, F. Separation of macromolecules by ultrafiltration: Influence of protein adsorption, protein-protein interactions and concentration polarisation. In A. R. Cooper (Ed.), **Ultrafiltration membranes and application** (p. 141). New York & London: Plenum Press, 1979.

ISA, M. H. M.; FRAZIER, R. A.; JAUREGI, P. A further study of the recovery and purification of surfactin from fermentation broth by membrane filtration. **Separation and Purification Technology**, v. 64, n. 2, p. 176-182, 2008.

JACOBSEN, J. H.; FRIGAARD, N. U. Engineering of photosynthetic mannitol biosynthesis from CO₂ in a cyanobacterium. **Metabolic Engineering**, v. 21, p. 60-70, 2014.

JAIME, L.; MENDIOLA, J. A.; HERRERO, M., SOLER-RIVAS, C.; SANTOYO, S.; SEÑORANS, F. J.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Separation and characterization of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga combining pressurized liquid extraction, TLC, and HPLC-DAD. **Journal of Separation Science**, v. 28, n. 16, p. 2111-2119, 2005.

JAMES, B. J.; JING, Y.; CHEN, X. D. Membrane fouling during filtration of milk – a microstructural study. **Journal of Food Engineering**, n. 60, p. 431-437, 2003.

JAVADI, N.; ASHTIANI, F. Z.; FOULADITAJAR, A.; ZENOOZ, A. M. Experimental studies and statistical analysis of membrane fouling behavior and performance in microfiltration of microalgae by a gas sparging assisted process. **Bioresources Technology**, v. 162, p. 350-357, 2014.

JOHNSON, E. M.; KUMAR, K. DAS, D. Physicochemical parameter optimization, and purification of phycobiliproteins from the isolated *Nostoc* sp. **Bioresource Technology**, v. 166, p. 541-547, 2014.

JOSHI, V. K.; ATTRI, D.; BALA, A.; BHUSHAN, S. Microbial pigments. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 362-369, 2003.

KAMBLE, S. P.; GAIKAR, R. B.; PADALIA, R. B. Extraction and purification of c-phycoyanin from dry *Spirulina* and evaluating its antioxidant, anticoagulation and prevention of DNA damage activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, n. 1, p. 1-4, 2012.

KAMBLE, S. P.; GAIKAR, R. B.; PADALIA, R. B.; SHINDE, K. D. Extraction and purification of C-phycoerythrin from dry *Spirulina* powder and evaluating its antioxidant, anticoagulation and prevention of DNA damage activity. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 8, p. 149-153, 2013.

KARASU, K.; YOSHIKAWA, S.; OOKAWARA, S.; OGAWA, K.; KENTISH, S. E.; STEVENS, G. W. A combined model for the prediction of the permeation flux during the cross flow ultrafiltration of a whey suspension. **Journal of Membrane Science**, v. 361, p. 71-77, 2010.

KILIKIAN, B. V.; PESSOA JR., A. **Purificação de produtos biotecnológicos**. São Paulo, Ed. Manole, 2003.

KRIMM, S.; BANDEKAR, J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins. **Advanced Protein Chemical**, v. 38, p. 181-364, 1986.

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.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LIU, C.; CAO, Z.; WANG, J.; SUN, Z.; HE, S. CHEN, W. Performance and mechanism of phycoerythrin removal from water by low-frequency ultrasound treatment. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 214-221, 2017.

MATSUKAWA, R.; DUBINSKY, Z.; KISHIMOTO, E.; MASAKI, K.; MASUDA, Y.; TAKEUCHI, T.; CHIHARA, M.; YAMAMOTO, Y.; NIKI, E.; KARUBE, I. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, n. 9, p. 29-35, 1997.

MEDEIROS, F.O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D. S.; BURKERT, A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MENDIOLA, J. A.; JAIME, L.; SANTOYO, S.; REGLERO, G.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E.; SEÑORÁNS, F. J. Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. **Food Chemistry**, v. 102, p. 1357-1367, 2007.

MENSOR, L. L. MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127- 130, 2001.

MILLEDGE, J. L. Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 31-41, 2011.

MOARES, C. C.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J. C-phycoerythrin extraction process for large-scale use. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 133, 2010.

- MORAES, C. C.; BURKERT, J. F. M.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Extração de ficocianina a partir de diferentes biomassas de *Spirulina* sp. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, n. 4, p. 529-532, 2007.
- MORAES, C. C.; SALA, L.; CERVEIRA, G. P.; KALIL, S. J. C-phycoocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 1, p. 45-49, 2011.
- MORAIS, M. G.; VAZ, V. S.; MORAIS, E. G.; COSTA, J. A. V. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 1-15, 2015.
- MORORÓ, R. R.; **Estudo de novo permeador para biorreatores com membranas (brm) visando ao controle de incrustações**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.
- MUTANDA, T.; RAMESH, D.; KARTHIKEYAN, S.; KUMARI, S.; ANANDRAJ, A.; BUX F. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 57-70, 2011.
- NAGARAJ, N.; PATIL, B. S.; BIRADAR, P. M. Osmotic membrane distillation: a brief. **Journal of Food Engineering**, v. 2, p. 1-22, 2006.
- NIELS, T. E. Production of phycocyanin: a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. **Applied Microbiological Biotechnology**, n. 80, p. 1-14, 2008.
- NÚÑEZ-SELLÉS, A. J. Antioxidant therapy: Myth or reality? **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 699-610, 2005.
- OLIVEIRA, C. A. Caracterização da produção de pigmentos e da atividade antioxidante de *Nostoc* spp. sob diferentes intensidade luminosas. 2012. Dissertação de Mestrado em Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2012.
- OLIVEIRA, E. G.; ROSA, G. S.; MORAES, M. A.; PINTO, L. A. A. Characterization of thin layer drying of *Spirulina platensis* utilizing perpendicular air flow. **Bioresearch Technology**, v. 100, p. 1297-1303, 2009.
- ORES, J. C.; MARANTE, 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.
- PAGNO, C. H.; BALDASSO, C.; TESSARO, I. C.; FLORES, S. H.; JONG, E. V. Obtenção de concentrados proteicos de soro de leite e caracterização de suas propriedades funcionais tecnológicas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n. 2, p. 231-239, 2009.
- PANGESTUTI, R.; KIM, S. K. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. **Journal of Functional Foods**. v. 3, p. 255-266, 2011.

PATEL, A.; MISHRA, S.; GHOSH, P. K. Antioxidant potential of C-phycoerythrin isolated from cyanobacterial species *Lyngbya*, *Phormidium* and *Spirulina* spp. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 43, p. 25-31, 2006.

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 & Purification**, v. 40, p. 248-255, 2005.

PATIL, G.; CHETHANA, S.; SRIDEVI, A. S.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Method to obtain c-phycoerythrin of high purity. **Journal of Chromatography A**, v.1127. ed. 1-2, 2006.

PATIL, G.; CHETHANA, S.; MADHUSUDHAN, M. C.; RAGHAVARAO, K. S. Fractionation and purification of phycobiliproteins from *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, n. 99, p. 7393-7396, 2008.

PENG, H.; TREMBLAY, A. Y. Membrane regeneration and filtration modeling in treating oily wastewaters. **Journal of Membrane Science**, n. 324, p. 59-66, 2008.

PORTER, M. C. **Handbook of Industrial Membrane Technology**. Noyes Publications, New Jersey, 1990;

PRASANNA, R.; JAISWAL, P.; KAUSHIK, B. D. Cyanobacteria as potential options for environmental sustainability — promises and challenges. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 89-94, 2008.

PRASANNA, R.; SOOD, A.; JAISWAL, P.; NAYAK, S.; GUPTA, V.; CHAUDHARY, V.; JOSHI, M.; NATARAJAN, C. Rediscovering cyanobacteria as valuable sources of bioactive compounds (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 119-134, 2010.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 65, p. 635-648, 2004.

RAMOS, A.; ACIÉN, F. G.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; Large-scale isolation and purification of C-phycoerythrin from the cyanobacteria *Anabaena marina* using expanded bed adsorption chromatography. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, n. 85, p. 783-792, 2010.

RAPOSO, M. F. D. J.; MORAIS, R. M. D.; MORAIS, A. M. D. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. **Life Science**, v. 93, p. 479 – 486, 2013.

RASTOGI, R. P.; SINHA, R. P. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 4, p. 521-539, 2009.

RATNAM, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K.; KUMAR, M. N. V. R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, n. 2, p. 189-207, 2006.

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

REIS, A.; MENDES, A.; LOBO-FERNANDES, H.; EMPIS, J. A.; NOVAIS, J. M. Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp. **Bioresource Technology**, v. 66, p. 181-187, 1998.

REIS, R. V.; ZYDNEY, A. Bioprocess membrane technology. **Journal Membrane Science**, v. 297, p. 16-50, 2007.

REKTOR, A.; VAITAI, G. Membrane filtration of mozzarella whey. **Desalination**, v. 162, p. 279-286, 2004.

RESAEI, H.; ASHTIANI, F. Z.; FOULADITAJAR, A.; Effercts of operating parameters on fouling mechanism and membrane flux in cross-flow microfiltration of whey. **Desalination**, v. 274, p. 262-271, 2011.

RITO-PALOMARES, M.; NUÑES, L.; AMADOR, D. Pratical application of aqueous two-phase systems for development of a prototype process for c-phycoyanin recovery from *Spirulina maxima*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, n. 12, p. 1273-1280, 2001.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-254, 2005.

ROMAY, C.; GONZALEZ, R.; LEDON, N.; REMIREZ, D.; RIMBAU, V. C-phycoyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. **Current Protein and Peptide Science**, v. 4, n. 3, p. 207-216, 2003.

ROSGAARDA, L.; PORCELLINISA, A. J.; JACOBSEN, J. H.; FRIGAARD, N. U.; SAKURAGIA, Y. Bioengineering of carbón fixation, biofuels, and biochemicals in cyanobacteria and plants. **Journal of Biotechnology**, n. 162, p. 134-147, 2012.

SALTIK, M. B.; OZKAN, L.; JACOBS, M.; VAN DER PADT, A. Dynamic modeling of ultrafiltration membranes for whey separation processes. **Computers & Chemical Engineering**, v. 99, p. 280-295, 2017.

SAMPATH, M.; SHUKLA, A.; RATHORE, A. S. Modeling of filtration process – microfiltration and deep filtration for harvest os a therapeutic protein expressed in *Pichia pastoris* at constant pressure. **Bioengineering**, v. 1, n. 4, p. 260-277, 2014.

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

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, p. 795-801, 1999.

SARAN, S.; Puri, N.; JASUJA, N. D.; KUMAR, M.; SHARMA, G. Optimization, purification and characterization of phycocyanin from *Spirulina platensis*. **International Journal of Applied and Pure Science and Agriculture**, p. 15-20, 2016.

SATHYSAIKUMAR, K. V.; SWAPNA, I.; REDDY, P. V. B.; MURTHY, C. R. K. ; ROY, K. R.; DUTTA GUPTA, A.; SENTHILKUMARAN, B.; REDDANNA, P. Coadministration of c-phycocyanin ameliorates thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in Wistar rats. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 252, 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.

SCOTT, K.; HUGHES, R. **Industrial Membrane Separation Technology**, ed. 1, 1996.

SEGUENKA, B. **Produção de concentrado de soro de leite por processos de separação por membranas**. 2016. Dissertação (Mestre em Ciência e tecnologia de Alimentos) na Universidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2016.

SEKAR, S.; CHANDRAMOHAN, M. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 2, p. 113-136, 2008.

SHANAB, S. M. M.; MOSTAFA, S. S. M.; SHALABY, E. A.; MAHMOUD, G. I. Aqueous extract of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, n. 1, p. 608-615, 2012.

SHARMA, N. K.; TITHI, K.; RAI, A. K. Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): fact and challenges. **Journal of Applied Phycology**, n. 23, p. 1059-1081, 2010.

SHEER, H.; ZHAO, K. H. Biliprotein maturation: the chromofore attachment. **Molecular Microbiology**, v. 2, p. 263-276, 2008.

SHIRE, S. J.; SHAHROKH, Z.; LIU, J. Challenges in the development of high protein concentration formulations. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 93, p. 1390-1402. 2004.

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-phycocyanin purification by precipitation from *Spirulina platensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, n. 20, p. 5-12, 2009.

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**, Amsterdam, v. 98, p. 1629-1634, 2007.

SINGH, R. K.; TIWARI, S. P.; RAI, A. K.; MOHAPATRA, T. M. Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, n. 6, p. 401-12, 2011.

SINHA, R. P.; AMBASHT, N. K. SINHA, J. P. HADER, D. P. Wavelength dependent induction of a mycosporine-like amino acid in a rice-field cyanobacterium, *Nostoc commune*: role of inhibitor and salt stress. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 2, p. 171-176, 2003.

SONI, B.; KALAWADIA, B.; TRIVEDI, U.; MADAMWAR, D. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata* – isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, Índia. **Process Biochemistry**, PRBI 7974, 2006.

SONI, B.; VISAVADIYA, N. P.; MADAMWAR, D. Ameliorative action of cyanobacterial phycoerythrin on CCl₄-induced toxicity in rats. **Toxicology**, v. 248, p. 59-65, 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, Sep. 2013.

SOSA, P. A.; ROCA, C. VELIZAROV, S. Membrane assisted recovery and purification of bio-based succinic acid for improved process sustainability. **Journal of Membrane Science**, v. 501, p. 236-247, 2016.

SOUZA, T. J. T.; APEL, M. A.; BORDIGNON, S. A. L.; MATZENBACHER, N. I.; ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 368-372, 2007.

SPÍNOLA, M. M. P. **Antioxidantes naturais em microalgas cultivadas em condições especiais: avaliação química e biologia**. 1997. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo; s. n. p. 105, 1997.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

SUN, L.; WANG, S.; QIAO, Z. Chemical stabilization of the phycocyanin from cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Biotechnology**, v. 121, p. 563-569, 2006.

SUN, L.; WANG, S.; ZHAO, M.; FU, X. **Phycobilisomes from Cyanobacteria**. In Handbook on cyanobacteria: biochemistry, biotechnology and applications. Edited by G. P. M. & M. H. J: Nova Science Publishers, 2009.

SUSI, H. Infrared spectroscopy conformation. **Methods in Enzymology**, v. 22, p. 455-472, 1972.

TAMARY, E.; KISS, V.; NEVO, R.; ADAM, Z.; BERNAT, G.; REXROTH, S.; ROGNER, M.; REICH, Z. Structural and functional alterations of cyanobacterial phycobilisomes induced by high-light stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1817, p. 319-327, 2012.

TORRES, A.; HEMMELMANN, A.; VERGARA, C.; JEISON, D. Application of two-phase slug-flow regime to control flux reduction on anaerobic membrane bioreactors treating

wastewaters with high suspended solids concentration. **Separation and Purification**, v. 79, p. 20-25, 2011.

VONSHAK, A. ***Spirulina: Growth, Physiology and Biochemistry***. In: VONSHAK, A. ed. *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology biotechnology*. London: Taylor and Francis, p. 43-66, 1997.

WANG, Z.; LIN, S. Membrane fouling and wetting in membrane distillation and their mitigation by novel membranes with special wettability. **Water Research**, v. 112, p. 38-47, 2017.

WIJFFELS, R. H.; BARBOSA, M. J. An outlook on microalgal biofuels. **Science**, v. 329, n. 5993, p. 769-799, 2010.

WOLK, C. P. Physiology and cytological chemistry blue-green algae. **Bacteriological Reviews**, v 37, n. 1, p. 32-101, 1973.

YAMAGUCHI, K. Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. **Journal of Applied Phycology**, v. 8, n. 6, p. 487-502, 1996.

ZANARDINI, S.; ZINATIZADEH, A. A. L.; RAHIMI, M.; VATANPOUR, V. Magnetic field-augmented coagulation bath during phase inversion for preparation of ZnFe₂O₄/SiO₂/PES nanofiltration membrane: A novel method for flux enhancement and fouling resistance. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 46, p. 9-18, 2017.

ZHANG, X. **Characterisation and mitigation of the fouling of ceramic microfiltration membranes caused by algal organic matter released from cyanobacteria**. 2014. Thesis (PhD in Master of Engineering Environmental in Shanghai University, China, 2014).

ZHANG, X.; HU, Q.; SOMMERFELD, M.; PURUHITO, E.; CHEN, Y. Harvesting algal biomass for biofuels using ultrafiltration membranes. **Bioresources Technology**, v. 101, p. 5297-5304, 2010.

APÊNDICE A – Artigo científico

PROCESSO DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS NA PURIFICAÇÃO DE FICOCIANINA DE *Spirulina* sp.

Alessandro Lima Sbeghen^{a*}, Vandré B. Brião^a, Luciane Maria Colla^a, Bruna Seguenka^a, Vinicius Castoldi^a

^aDepartamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Passo Fundo – Campus 1, BR 285 99052-900 Passo Fundo – RS, Brasil. *e-mail: asbeghen@hotmail.com

Resumo: A ficocianina é um pigmento natural azul fotossintético da família das ficobiliproteínas, encontrado nas cianobactérias. Possui propriedades anticarcinogênicas, anti-inflamatórias e antioxidantes. Além do uso como corante em indústrias de cosméticos e alimentos, suas propriedades bioativas permitem a substituição dos antioxidantes sintéticos como BHA e BHT. Uma das fontes deste biocomposto pode ser a microalga *Spirulina* sp. Foram realizados testes de extração por congelamento e descongelamento, banho ultrassônico e solução tampão fosfato, sendo que o último obteve o melhor resultado de extração. O extrato bruto obtido por solução tampão fosfato apresentou uma concentração de 58,54 mg.g⁻¹ de ficocianina por g de célula e grau de pureza de 0,52. Este extrato bruto foi então submetido em um processo de ultrafiltração por uma membrana tubular em equipamento piloto, seguido de três diafiltrações. O processo de purificação se mostrou eficiente atingindo grau de pureza de 0,833 com fator de purificação de 1,54 e mantendo uma boa atividade antioxidante. O processo de separação por membranas mostrou possuir facilidade de escalonamento e capacidade de purificação da ficocianina em larga escala.

Palavras-chave: Diafiltração, extração, grau alimentar, ultrafiltração.

MEMBRANE SEPARATION PROCESS ON PURIFICATION OF PHYCOCYANIN IN *Spirulina* sp.

Abstract: The phycocyanin is a natural blue pigment of photosynthetic phycobiliprotein family, found in cyanobacteria. Has anticarcinogênicas, anti-inflammatory and antioxidant properties. Beyond use as a dye in cosmetic and food industries, their bioactive properties allow the substitution of synthetic antioxidants like BHA and BHT. One of the sources of this biocompound can be the microalgae *Spirulina* sp. Extraction tests were carried out by freezing and thawing, ultrasonic bath and phosphate buffered solution, being the last obtained the best result of extraction. The crude extract obtained by phosphate buffer solution presented a concentration of 58.54 mg.g⁻¹ of phycocyanin per gram of cell and purity of 0.52. This crude extract was then subjected to a process of ultrafiltration for a tubular membrane pilot equipment, followed by three diafiltrations. The purification process proved efficient reaching purity of 0.833 and 1.54 purification factor and keeping a good antioxidant activity. The membrane separation process showed have ease of scaling and capacity of purification of phycocyanin on a large scale.

key-words: Diafiltration, extraction, food grade, ultrafiltration.

INTRODUÇÃO

A ficocianina é uma proteína natural de cor azul única, com caráter altamente solúvel e estável, com uma massa molecular de cerca de 110 kDa contendo duas subunidades (GLAZER; STRYER, 1984), pertencente à família das ficobiliproteínas, encontrada em cianobactérias (KAMBLE et. al., 2013; MORAES et. al., 2011). Por ser um pigmento natural, pode ser utilizado na indústria de alimentos, como corante, por exemplo, em sucos e gomas e na indústria de cosméticos, substituindo os corantes sintéticos (dissertação SILVA, 2008)

Nos últimos 20 anos, o interesse sobre o potencial uso da ficocianina tem aumentado consideravelmente. Além do uso como corante, a ficocianina possui excelentes propriedades antioxidantes, anticarcinogênicas e anti-inflamatórias (FERREIRA et al., 2010; GANTAR et al., 2012; RAPOSO; MORAIS; MORAIS, 2013), por isso tem sido muito utilizada em diagnósticos e cosméticos (SEKAR; CHANDRAMOHAN, 2008; ERIKSEN, 2008). Mas a distribuição no mercado global ainda é limitada, pois os métodos de purificação são de alto custo (SILVA et al., 2009).

A cianobactéria *Spirulina platensis* é uma excelente fonte, podendo conter uma fração proteica de até 20 % de ficocianina (VONSHAK, 1997). A quantidade de ficocianina produzida pela microalga *Spirulina* sp. depende de vários fatores, sendo o método de extração e purificação os mais relevantes (GUPTA; SANIS, 2009; PATIL et al., 2008).

A qualidade do extrato bruto da ficocianina é muito importante para que a purificação tenha um bom resultado (BHATTACHARYA; SHIVAPRAKASH, 2005). Vários fatores podem influenciar na concentração e qualidade final desse extrato (SILVEIRA et. al., 2007), mas em geral, o método de extração é a chave para a recuperação de ficobiliproteínas no seu estado natural com quantidades relevantes e que favoreçam os processos de recuperação, concentração e purificação (GUAN, 2016; MOARES et al., 2010).

A etapa de purificação dos extratos de ficocianina é essencial para manter as propriedades bioativas, garantir uma melhor eficiência energética, simplicidade de operação, viabilidade econômica e de escalonamento para a produção deste biocomposto (GUPTA; SANIS, 2009; PATIL et al., 2008). O extrato bruto de ficocianina pode ser obtido através de diversas técnicas de rompimento celular, como o choque osmótico realizado com tampão fosfato, acetato ou somente água destilada, com associação ou não de métodos físicos como congelamento e descongelamento, maceração gral/pistilo, digestão, sonificação e

homogeneização por pressão (REIS et al., 1998; PATEL et al., 2005; CHEN et al., 2006; PATIL et al., 2006; SUN; WANG; QIAO, 2006).

A purificação de ficocianina pode envolver uma série de etapas complexas ou com custo elevado, variando de acordo com os métodos e condições escolhidos. Devido a sua baixa resistência térmica, estes acabam sendo direcionados para métodos físicos e químicos, sem a utilização de calor (SARADA et al., 1999). Os procedimentos químicos para sua extração e purificação, podem ser de alto custo e difíceis de serem utilizados em escala industrial, ou exigir uma demanda alta de produtos químicos, gerando demasiada quantidade de resíduo (ANTELO; COSTA; KALIL, 2015). Assim busca-se a realização de estudos a fim de que o processo tenha eficiência energética, viabilidade econômica, fácil operação e que não afete as suas propriedades bioativas. Além do mais, um processo que tenha como alvo somente a obtenção de ficocianina, limita o seu potencial, pois a microalga é composta por diversas macromoléculas que podem ser utilizadas para outros fins, assim o método utilizado para a purificação deve possibilitar algum uso para a fração não utilizada.

Os métodos físicos se apresentam como uma alternativa para a separação destes biocompostos. Dentre eles destaca-se a separação por membranas, que pode ser realizada a temperatura ambiente sem ocasionar perdas de suas propriedades. A utilização da ultrafiltração tornam-se relevante devido a sua simplicidade de operação e facilidade de escalonamento, mas apesar de ser um processo simples, muitos fatores necessitam ser estudados para a obtenção de condições ideais para o processo de purificação por membranas.

O presente trabalho teve como objetivo estudar o processo de filtração por membranas para realizar a purificação de extratos de ficocianina e o método de extração mais adequado visando a obtenção de um biocomposto com atividade antioxidante e grau de pureza alimentar.

MATERIAL E MÉTODOS

A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 proveniente de cultivos realizados na planta piloto de produção de microalgas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal de Rio Grande situada na cidade de Santa Vitória do Palmar/RS.

O processo de extração da ficocianina pode interferir na etapa de purificação, deste modo decidiu-se realizar testes de extração através de diferentes métodos descritos a seguir.

O primeiro método de extração avaliado foi através do processo de congelamento e descongelamento (CD) utilizando-se 1 g da microalga e 30 mL de água destilada e condicionados em frascos com tampa, os quais foram conduzidas ao processo de congelamento a 0 °C por cerca de 3 h após esse período, levadas ao refrigerador para o descongelamento a 4 °C (MORAES, 2011). Os processos de congelamento e descongelamento foram realizados de forma sucessiva por 3 vezes.

O segundo método de extração foi realizado submetendo uma suspensão de biomassa em banho ultrassônico (40 kHz) com pérolas de vidro numa proporção de 1:1,1 (g biomassa: g pérolas de vidro) durante 40, 50 e 60 minutos (MEDEIROS et al., 2008) e designados UP40, UP50 e UP60, respectivamente.

O terceiro método utilizou tampão fosfato (TP) para extrair o conteúdo de ficocianina presente na biomassa conforme Chen et al. (2016), onde 0,1 g de biomassa seca foi suspensa em 10 mL de solução tampão fosfato 0,15 M (pH 7,0) e mantida a 4 °C e na ausência de luz durante 21 horas.

Após os métodos de extração, o produto resultante foi separado através de centrifugação a 4400 g durante 15 min em centrífuga CIENTEC CT-5000 e o sobrenadante considerado como extrato bruto de ficocianina seguido da designação citada em cada método.

A extração utilizando tampão fosfato 0,1 M e pH 7,0 apresentou o extrato bruto de ficocianina com melhor qualidade, desse modo foi o escolhido para realizar a purificação.

Um volume de 5,5 L de extrato bruto de ficocianina por extração com TP foi obtido para cada teste. Este extrato bruto foi bombeado com o auxílio de um equipamento piloto PROTOSEP para filtração tangencial, através de uma membrana tubular de Fluoreto de Polivinilideno (PVDF) com área de filtração de 0,1 m² e tamanho de poro entre 30 e 80 kDa sob uma pressão de 1,5 bar. O equipamento é composto por um reservatório de aço inoxidável de 10 L de capacidade e uma bomba pneumática para alimentação do extrato bruto na carcaça da membrana como representado na Figura 1.

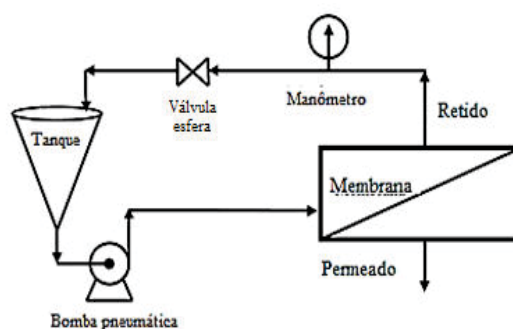


Figura 1: Diagrama do equipamento piloto de filtração tangencial.

Fonte: O autor, 2017.

A corrente do rejeito foi direcionada ao tanque de alimentação, permitindo assim a concentração e purificação da ficocianina mediante a exclusão de compostos de menor peso molecular através da corrente de permeado. O processo de separação foi mantido até que o volume inicial fosse reduzido em 50 %.

A parte retida correspondeu ao extrato bruto ultrafiltrado. Para que houvesse um aumento na pureza, foi realizado no mesmo equipamento a diafiltração, seguindo adaptações de procedimento realizado para purificação de concentrado de soro de leite sugerido por Seguenka (2016), Baldasso (2008) e Pagno et al. (2009), onde retornou-se ao volume inicial pela adição de água de osmose inversa e declorada, seguindo de filtração até que seu volume fosse reduzido em 50 %. Este processo de diafiltração foi realizado por 3 vezes consecutivas. As filtrações foram realizadas com amostras a temperatura ambiente.

As amostras purificadas por ultrafiltração e por diafiltração foram submetidas a análise por espectroscopia em infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), utilizando-se 0,5 mL de amostra sem diluição diretamente no leitor do espectrofotômetro na região espectral de 1.000 a 2.000 cm^{-1} . O espectrofotômetro Cary 630 F-TIR da Agilent Technologies utilizado pertence ao Parque Tecnológico da Universidade de Passo Fundo - UPF.

Os extratos brutos e purificados foram submetidos a análises de concentração de ficocianina através da diluição em solução aquosa e leitura da absorbância para quantificação. A quantificação foi realizada conforme definição de Bennett e Bogorad (1973) apresentada na Equação 1.

$$PC = \frac{A_{620} - 0,474(A_{652})}{5,34} \quad (1)$$

Onde:

PC = concentração de ficocianina ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); A_{620} = absorbância a 620 nm; A_{652} = absorbância a 652 nm.

A pureza da ficocianina determinou-se conforme Equação 2 (ABALDE et al., 1998).

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

Onde:

PCPC = Pureza da ficocianina; A_{620} = absorbância a 620 nm; A_{280} = absorbância a 280 nm.

A partir destes dados foi possível calcular o fator de purificação, através do quociente entre a pureza do extrato purificado e a pureza do extrato bruto pela Equação 3.

$$PF = \frac{PC_p}{PC_c} \quad (3)$$

Onde:

PF = Fator de purificação; PC_p = Concentração de ficocianina no extrato purificado; PC_c = Concentração de ficocianina no extrato bruto.

A quantidade de ficocianina presente no extrato purificado em relação ao extrato bruto, foi dada pela Equação 4.

$$EP = \frac{(PC_p \times V_p)}{(PC_c \times V_c)} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

EP = Eficiência do processo; PC_p = Concentração de ficocianina no extrato purificado; PC_c = Concentração de ficocianina no extrato bruto; V_p = Volume do extrato purificado; V_c = Volume do extrato bruto.

A determinação da atividade antioxidante dos extratos obtidos foram realizados via radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) pelo método desenvolvido por Brand-Willians, Cuvelier e Berset (1995) e modificado por Mensor et al. (2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos testes de extração por congelamento seguido de descongelamento, banho ultrassônico e com tampão fosfato de sódio, realizados com o objetivo de verificar qual método obtém os melhores valores de extração e pureza de ficocianina, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 1. Composição de ficocianina no extrato bruto.

Método de extração	Ficocianina* (mg.g ⁻¹)	Pureza da Ficocianina*
CD	47,940±0,456	0,372±0,003
UP40	37,457±0,089	0,438±0,001
UP50	40,240±0,013	0,449±0,003
UP60	41,871±0,456	0,459±0,001
TP	58,540±0,256	0,516±0,005

*Resultados de média±desvio padrão. Congelamento e descongelamento (CD); Banho Ultrassônico com tempos de 40 min (UP40), 50 min (UP50) e 60 min (UP60); Tampão fosfato (TP).

Verifica-se na Tabela 4 que a extração com maior quantidade de ficocianina foi utilizando-se solução tampão fosfato, atingindo um valor de $58,54 \text{ mg.g}^{-1}$ de biomassa seca, correspondendo a 15,7 % do total de proteína presente na biomassa. Este valor é relevante quando consideramos que a fração proteica da *Spirulina* pode conter até 20 % de ficocianina (VONSHAK, 1997). A extração utilizando tampão fosfato de sódio pH 7,0 se apresenta como a melhor alternativa dentre os métodos testados (RAMOS; ACIÉN; FERNÁNDES-SEVILLA, 2010) neste trabalho e também em relação a outros tamponantes como tampão citrato pH 5,0 ou tampão acetato pH 6,0 (SARAN et al. 2016).

A extração utilizando banho ultrassônico apresentou um valor crescente para a extração de ficocianina conforme o tempo utilizado, obtendo seu melhor resultado $41,87 \text{ mg.g}_{\text{cel}}^{-1}$ no tempo de 60 minutos, sendo muito próximo ao encontrado por Moraes et al. (2011) que obteve $43,75 \text{ mg.g}_{\text{cel}}^{-1}$ nas melhores condições de sua extração com banho ultrassônico.

Considerando a extração por tampão como base de cálculo, o rendimento da melhor condição testada para o banho ultrassônico, seu rendimento representa 71,5 %. Já o processo de congelamento e descongelamento obteve, um rendimento de 81,9 %, que apesar de superior ao banho ultrassônico, apresentou uma pureza 19 % inferior. O banho ultrassônico já vem sendo estudado na obtenção de extrato bruto de ficocianina (MORAES et al., 2011; ORES; AMARANTE; KALIL, 2016; LIU et al., 2017) comprovando, em algumas ocasiões, sua superioridade em relação ao método de congelamento e descongelamento.

O extrato bruto de ficocianina aplicado no processo de purificação, pelo método de extração por tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,0, iniciou com uma concentração média de $65,63 \text{ mg.g}_{\text{cel}}^{-1}$.

A Figura 2 apresenta os fluxos de permeado ao longo do tempo das etapas de ultrafiltração e diafiltração.

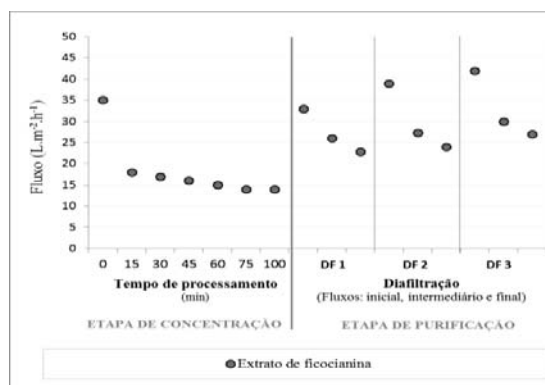


Figura 2. Comportamento do fluxo em relação ao tempo durante o processo de purificação da ficocianina.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

O gráfico mostra que o fluxo inicial decai de forma rápida logo nos primeiros minutos de filtração. Vários autores observaram esse fenômeno que é explicado devido à formação da camada de polarização por concentração, ao *fouling* (acúmulo de matérias depositadas na membrana durante a fase de polarização da concentração, também chamado de colmatação da membrana) e ao aumento da concentração da solução (AFONSO et al., 2004; REKTOR; VATAI, 2004; BACCHIN et al, 2006).

Observou-se que ao iniciar cada etapa de diafiltração houve um aumento no fluxo de permeado. Esse aumento de fluxo ocorre porque a água adicionada dilui os sólidos presentes no retido reduzindo a polarização por concentração, mas conforme a água adicionada é removida no permeado e o retido recupera sua concentração inicial e o fluxo volta a cair.

Os fluxos de permeado durante todo o processo de ultrafiltração seguem o modelo estabelecido por Ho e Zydney (2000).

A rejeição das proteínas no processo se deu de forma positiva, pois na ultrafiltração foi possível reter 85 % das proteínas presentes no extrato bruto e 74,5 % do conteúdo de ficocianina. O grau de pureza também foi elevado à 0,66 representando um aumento de 81,8 %.

A Tabela 2 apresenta as concentrações de proteína e ficocianina em todas as etapas do processo.

Tabela 2. Valores de concentração de ficocianina e sua recuperação.

Amostras	Ficocianina (mg.g ⁻¹)	Ficocianina (mg.mL ⁻¹)
Extrato bruto de ficocianina	65,630±4,809*	0,656±0,048
Retido ultrafiltração	48,882±1,245	0,978±0,025
Retido diafiltração 1	45,477±4,577	0,910±0,083
Retido diafiltração 2	41,966±2,183	0,839±0,022
Retido diafiltração 3	41,670±0,714	0,833±0,014

*Resultados de média±desvio padrão. Valor considerado como 100% para base de cálculos.

Pôde-se visualizar que a redução de proteína teve uma maior relevância nas etapas de ultrafiltração e nas duas primeiras diafiltrações. Nas diafiltrações 2 e 3, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para o grau de pureza, ao mesmo tempo que os valores de proteína não sofreram mudanças significativas. Isso sugere que o processo pode ser realizado realizando-se apenas uma diafiltração ou duas diafiltrações.

O grau de pureza durante todo o processo de purificação pode ser observado na Figura 3.

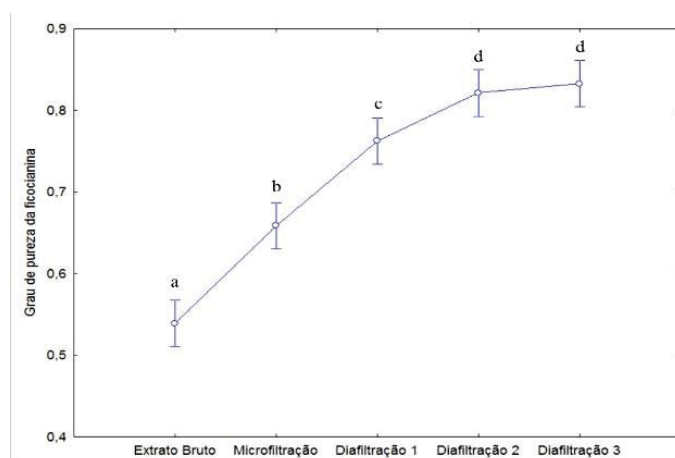


Figura 3. Grau de pureza da ficocianina durante o processo de purificação.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

Se considerarmos a etapa de ultrafiltração e diafiltração como um todo, a pureza da ficocianina partiu de 0,54 para 0,83 com um fator de purificação de 1,54 e eficiência de processo de 0,635. A razão de pureza é dada pela relação entre a absorção máxima visível e a absorção a 280, quando esta é superior a 4,0, ficocianina apresenta grau analítico, no entanto, quando este valor é superior a 0,7, este pigmento pode ser utilizado como um biocorante na indústria de alimentos e cosméticos (Patil et al., 2006).

O fator de purificação da ultrafiltração atingiu valores de 1,22, ficando abaixo dos encontrados por Chaiklahan et al (2011) e Figueira et al. (2012). Isto se justifica pelo fato de que o corte da membrana utilizada nos ensaios possui uma faixa de corte entre 30 e 80 kDa e a utilizada por estes autores um corte de 50 kDa. As substâncias com peso molecular entre 30 e 50 kDa que ficaram retidas no rejeito podem influenciar de forma a reduzir a pureza da solução de ficocianina da corrente de rejeito. Após as três diálises foi possível obter um fator de purificação de 1,54. O grau de pureza alimentar foi alcançado já na primeira diálise e demonstrou-se fortemente ligado ao rendimento de extração, pois em um dos ensaios realizados atingiu-se grau de pureza alimentar apenas ultrafiltrando o extrato bruto.

A obtenção do grau de pureza alimentar de 0,7, proposto por Rito-Palomares (2001) é superado na primeira diálise (Figura 3) atingindo valores de $0,763 \pm 0,016$ com fator de purificação de 1,41 e eficiência de processo de 0,689. Isto sugere que as diafiltrações subsequentes podem ser planejadas conforme a pureza do extrato bruto e seu resultado após a ultrafiltração, utilizando-se de um número maior ou menor de etapas para a obtenção da pureza

desejada. O aumento de pureza da ficocianina pode ser também explicado pela análise de espectroscopia de infravermelho pela transformada de Fourier (FTIR) apresentada na Figura 4.

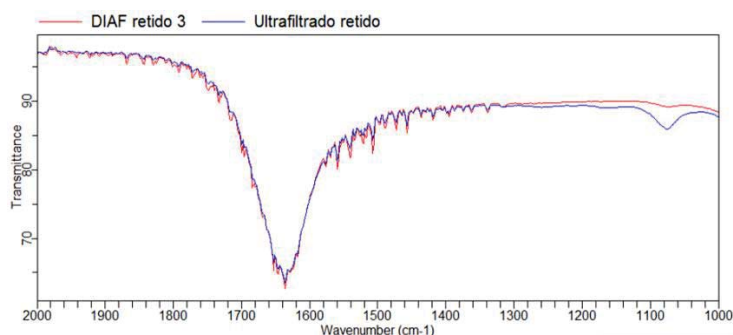


Figura 4. Espectroscopia por infravermelho pela transformada de Fourier.

Fonte: Elaborada pelo autor, 2017.

Através da espectroscopia por FTIR, pode se observar a banda específica da amida 1 a 1655 cm^{-1} (alongamento da ligação C=O) e da amida 2 a 1543 cm^{-1} (SUSI, 1972; KRIMM; BANDEKAR, 1986). A posição e a forma da banda de amida 1 são utilizadas para a análise da estrutura secundária da proteína. O formato da banda de amida 1 à 1655 cm^{-1} , indica para a ficocianina, a α -hélice como elemento principal da sua estrutura secundária (FERNÁNDEZ-ROJAS, HERNÁNDEZ-JUÁREZ, PEDRAZZA-CHAVERRI, 2014; PATEL et al., 2005). Pode-se ainda verificar que o uso da diafiltração ocasionou a eliminação de grande parte dos sulfatos e fosfatos inorgânicos que representam uma banda intensa entre 1043 e 1015 cm^{-1} .

A manutenção da atividade antioxidante de um biocomposto é uma das características desejáveis em seu processo de obtenção e purificação. A Tabela 3 apresenta os resultados em percentual de inibição obtido para os extratos de ficocianina antes e após purificação em membrana tubular.

Tabela 3. Valores de percentual de inibição do radical DPPH.

Amostras	% inibição 30 min	% inibição 60 min
Extrato bruto obtido por CD	14,24±0,49	37,22±1,24
Extrato bruto obtido por TP	37,60±0,68	38,62±0,65
Ext. bruto DC purificado	16,28±0,27	24,26±0,26
Ext. bruto TP purificado	21,89±1,22	26,90±0,82

*Resultados de média±desvio padrão. Congelamento e descongelamento (CD); Tampão fosfato (TP).

O extrato bruto obtido pela extração com tampão fosfato de sódio apresentou um percentual de inibição muito superior ao extrato bruto obtido por congelamento e descongelamento no tempo de 30 min. No tempo de 60 min não houve diferença significativa

entre a inibição do radical DPPH pelos extratos. Isto se repetiu para os extratos purificados, onde a redução do potencial antioxidante devido ao processo de purificação foi de 34 % para o processo de separação em membranas planas e de 30 % em membrana tubular. Esta queda do potencial antioxidante está relacionada ao processo de purificação, onde outras substâncias com atividade antioxidante são eliminadas (CHEN, 1996; APEL; HIRT, 2004; CHEN et al., 2005; SINHA et al., 2003).

Uma alteração notada durante o processo de purificação foi a redução da coloração rósea/avermelhada, característica da interação entre a ficocianina e a ficoeritrina, podendo ser considerada que esta última pode ter sido removida ou oxidada durante o processo (OLIVEIRA, 2012). Os extratos purificados apresentaram valores próximos aos encontrados por Formighieri et al. (2016), para ficocianina pura, e superiores aos encontrados por Cavalheiro et al. (2013) para soluções de *Spirulina* LEB 18.

CONCLUSÃO

O método de extração de ficocianina com melhor rendimento foi utilizando solução tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 obtendo em escala maior, um rendimento de 65,63 mg.g_{cel}⁻¹ de biomassa de *Spirulina* LEB 18.

A retenção das proteínas nos processos de purificação atingiu um rendimento de processo de 0,635, obtendo uma solução com grau de pureza alimentar de 0,83 e fator de purificação de 1,54. A solução de ficocianina manteve atividade antioxidante ao final do processo de purificação. Os efeitos de colmatção foram reversíveis e com boa representação matemática pelo modelo de Ho e Zydney

Com estes dados pode-se concluir que o processo de separação por membranas representa uma alternativa viável para a produção em larga escala de ficocianina de grau alimentar.

REFERÊNCIAS

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, p. 109-120, 1998.

AFONSO, M. D.; FERRER, J.; BÓRQUEZ, R. Na economic assessment of proteins recovery from fish meal effluents by ultrafiltration. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, p. 506-512, 2004.

ANTELO, F. S.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Purification of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* in aqueous two-phase systems using an experimental design. **Agriculture, Agribusiness and Biotechnology**, v. 58, n. 1, p. 1-11, 2015.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.

BACCHIN, P.; AIMAR, P.; FIELD, R. Critical and sustainable fluxes: theory, experiments and applications. **Journal of Membrane Science**, v. 281, p. 42-69, 2006.

BALDASSO, C. **Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro do lácteo através da tecnologia de separação por membranas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2008.

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

BHATTACHARYA, S.; SHIVAPRAKASH, M. K. Evaluation of three *Spirulina* species grown under similar conditions for their growth and biochemical. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 333-336, 2005.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, n. 28, p. 25-30, 1995.

CAVALHEIRO, P. L.; MACHADO, A. R.; RIBEIRO, A. C.; BADIALE-FURLONG, E. SOUZA-SOARES, L. Avaliação da capacidade antioxidante de diferentes extratos de microalga *Spirulina* LEB-18. IN: **Anais do 53 Congresso Brasileiro de Química**, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

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, p. 7159-7164, 2011.

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-phycoyanin production from *Spirulina platensis*. **Biochemical Engineering Journal**, n. 112, p. 78-85, 2016.

CHEN, F.; LI, H. B.; WONG, R. N. S.; JI, B.; JIANG, Y. Isolation and purification of the bioactive carotenoid zeaxanthin from the microalga *Microcystis aeruginosa* by high speed countercurrent chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1064, p. 183-186, 2005.

CHEN, T.; ZHENG, W.; YANG, F.; BAI, Y.; WONG, Y. S. Mixotrophic culture of high selenium-enriched *Spirulina platensis* on acetate and the enhanced production of photosynthetic pigments. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 103-107 2006.

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.

FERNÁNDEZ-ROJAS, B.; HERNANDEZ-JUAREZ, J.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Nutraceutical properties of phycocyanin. **Journal of Food Functions**, v. 11, p. 375-392, 2014.

FERREIRA, H.A.; TORRES, D.P.V.; JUAREZ-OROPEZA, M.A. Hepatoprotective effects of *Spirulina maxima* in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a case series. **J. Med. Case. Reports**, n. 4, p. 103, 2010.

FIGUEIRA, F. S.; MOLON, F. O.; GETTENS, J. G.; MORAES, C.C.; KALIL, S. J. **Obtenção de C-ficocianina de grau alimentar por ultrafiltração: avaliação de parâmetros**. IN: Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, v. 4, n. 4, 2012.

FORMIGHERI, M. S.; ORO, T.; COLLA, L. M.; BERTOLIN, T. E. Microcápsulas de ficocianina e seu potencial antioxidante. IN: Anais do XXV **Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Gramado, Rio Grande do Sul, 2016.

GANTAR, M.; SIMOVIC, D.; DJILAS, S.; GONZALEZ, W. W.; MIKSOVSKA, J. Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycocyanin from *Limnothrix* sp. Strain 37-2-1. **Journal of Biotechnology**, v. 159, p. 21-26, 2012.

GLAZER, A.; STRYER, L. Phycofluor probes. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 9, p. 423-427, 1984.

GUAN, S. **Extracting phycocyanin from spirulina and hydrothermal liquefaction of its residues to produce bio-crude oil**. 2016. Thesis (Master of Science in Agricultural and Biological Engineering) – Graduate College of the University of Illinois at Urbana-Champaign, 2016.

GUPTA, A.; SANIS, J. K. Isolation of C-phycocyanin from *Synechococcus* sp. **Journal of Applied Phycology**, n. 22, 231-233, 2009.

HO, C. C.; ZYDNEY, A. L. A combined pore blocking and cake filtration model for protein fouling during ultrafiltration. **Journal of Colloid and Interface Science**, n. 232, p. 389-399, 2000.

KAMBLE, S. P.; GAIKAR, R. B.; PADALIA, R. B.; SHINDE, K. D. Extraction and purification of C-phycocyanin from dry *Spirulina* powder and evaluating its antioxidant, anticoagulation and prevention of DNA damage activity. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 8, p. 149-153, 2013.

KRIMM, S.; BANDEKAR, J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides and proteins. **Advanced Protein Chemistry**, v. 38, p. 181-364, 1986.

LIU, C.; CAO, Z.; WANG, J.; SUN, Z.; HE, S. CHEN, W. Performance and mechanism of phycocyanin removal from water by low-frequency ultrasound treatment. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 214-221, 2017.

MEDEIROS, F.O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D. S.; BURKERT, A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de b-galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MENSOR, L. L. MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoterapy Research**, v. 15, p. 127- 130, 2001.

MOARES, C. C.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J. C-phycocyanin extraction process for large-scale use. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 133, 2010.

MORAES, C. C.; SALA, L.; CERVEIRA, G. P.; KALIL, S. J. C-phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 1, p. 45-49, 2011.

OLIVEIRA, C. A. **Caracterização da produção de pigmentos e da atividade antioxidante de *Nostoc* spp. sob diferentes intensidade luminosas**. Dissertação de Mestrado em Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2012.

ORES, J. C.; MARANTE, 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.

PAGNO, C. H.; BALDASSO, C.; TESSARO, I. C.; FLORES, S. H.; JONG, E. V. Obtenção de concentrados proteicos de soro de leite e caracterização de suas propriedades funcionais tecnológicas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n. 2, p. 231-239, 2009.

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 & Purification**, v. 40, p. 248-255, 2005.

PATIL, G.; CHETHANA, S.; SRIDEVI, A. S.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Method to obtain C-phycocyanin of high purity. **J. Chromatogr.**, v. 1127, p. 76-81, 2006.

PATIL, G.; CHETHANA, S.; MADHUSUDHAN, M. C.; RAGHAVARAO, K. S. Fractionation and purification of phycobiliproteins from *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, n. 99, p. 7393-7396, 2008.

RAMOS, A.; ACIÉN, F. G.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; Large-scale isolation and purification of C-phycocyanin from the cyanobacteria *Anabaena marina* using expanded bed adsorption chromatography. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, n. 85, p. 783-792, 2010.

RAPOSO, M. F. D. J.; MORAIS, R. M. D.; MORAIS, A. M. D. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. **Life Science**, v. 93, p. 479 – 486, 2013.

- REIS, A.; MENDES, A.; LOBO-FERNANDES, H.; EMPIS, J. A.; NOVAIS, J. M. Production, extraction and purification of phycobiliproteins from *Nostoc* sp. **Bioresource Technology**, v. 66, p. 181-187, 1998.
- REKTOR, A.; VAITAI, G. Membrane filtration of mozzarella whey. **Desalination**, v. 162, p. 279-286, 2004.
- RITO-PALOMARES, M.; NUÑES, L.; AMADOR, D. Pratical application of aqueous two-phase systems for development of a prototype process for c-phycocyanin recovery from *Spirulina maxima*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, n. 12, p. 1273-1280, 2001.
- 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, p. 795-801, 1999.
- SARAN, S.; Puri, N.; JASUJA, N. D.; KUMAR, M.; SHARMA, G. Optimization, purification and characterization of phycocyanin from *Spirulina platensis*. **International Journal of Applied and Pure Science and Agriculture**, p. 15-20, 2016.
- SEGUENKA, B. **Produção de concentrado de soro de leite por processos de separação por membranas**. 2016. Dissertação (Mestre em Ciência e tecnologia de Alimentos) na Universidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, 2016.
- SEKAR, S.; CHANDRAMOHAN, M. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 2, p. 113-136, 2008.
- SILVA, L. A. **Estudo do processo biotecnológico de produção, extração e recuperação do pigmento ficocianina da *Spirulina platensis***. Dissertação (Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Área de Concentração Agroindústria), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2008.
- 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**, Amsterdam, v. 98, p. 1629-1634, 2007.
- SINHA, R. P.; AMBASHT, N. K. SINHA, J. P.HADER, D. P. Wavelength dependente induction of a mycosporine-like amino acid in a rice-field cyanobacterium, *Nostoc commune*: role of inhibitor and salt stress. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 2, p. 171-176, 2003.
- SUN, L.; WANG, S.; QIAO, Z. Chemical stabilization of the phycocyanin from cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Biotechnology**, v. 121, p. 563-569, 2006.
- SUSI, H. Infrared spectroscopy conformation. **Methods in Enzymology**, v. 22, p. 455-472, 1972.

VONSHAK, A. ***Spirulina: Growth, Physiology and Biochemistry***. In: VONSHAK, A. ed. *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology biotechnology*. London: Taylor and Francis, p. 43-66, 1997.