

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

**Verônica Gamba**

**Processos de separação por membranas para reciclo de águas do  
processo de extração e purificação de ficocianina**

**Passo Fundo**

**2022**

**Verônica Gamba**  
**Engenheira Química**

**Processos de separação por membranas para reciclo de águas do  
processo de extração e purificação de ficocianina**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.  
Orientador: Dr. Vandrê Barbosa Brião  
Linha de pesquisa: Processos Biotecnológicos e não convencionais na produção de alimentos e ingredientes

**Passo Fundo**

**2022**

CIP – Catalogação na Publicação

---

G187p Gamba, Verônica  
Processos de separação por membranas para reciclo de águas do processo de extração e purificação de ficocianina [recurso eletrônico] / Verônica Gamba. – 2022.  
2 MB ; PDF.

Orientador: Dr. Vandrê Barbosa Brião.  
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de Passo Fundo, 2022.

1. *Spirulina*. 2. Alga. 3. Ficocianina - Extração e purificação. 4. Enzimas - Aplicações industriais. 5. Águas - Reúso. I. Brião, Vandrê Barbosa, orientador. II. Título.

CDU: 664

---

Catalogação: Bibliotecária Jucelei Rodrigues Domingues - CRB 10/1569

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

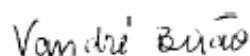
A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**“Processos de separação por membranas para reciclo de águas do processo de extração  
e purificação de ficocianina”**

Elaborada por  
**Verônica Gamba**

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

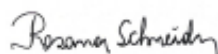
**Comissão Examinadora**



**Prof. Dr. Vandré Barbosa Brião**  
Orientador e Presidente – UPF



**Prof. Dr. Marcelo Hemkemeier**  
Comissão examinadora – UPF



**Profa. Dra. Rosana de Cássia de Souza Schneider**  
Membro externo - UNISC

**Passo Fundo, RS, Brasil  
2022**

*Dedico este trabalho a minha mãe, que foi minha  
incentivadora e fonte de inspiração.  
À Georgia, Cecília e Catarina, para que sejam mulheres  
guerreiras, determinadas e persistentes ao longo da  
vida, assim como eu fui para concretizar esse sonho.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me guiar e me iluminar nessa trajetória.

A mim mesmo, por não ter desistido da conclusão desse objetivo, mesmo em momentos difíceis.

A minha família, pelo suporte a realização deste sonho. Em especial a minha mãe, uma mulher guerreira, determinada, sempre disposta a ajudar o próximo e abrir mão de seus sonhos para realização do meu.

Ao Leonardo, por estar ao meu lado em todas as fases da minha formação profissional, inclusive deste sonho. Obrigada por estar ao meu lado todos os dias e me dar atenção, carinho e amor.

Ao meu orientador, professor Dr. Vandrê Barbosa Brião por manter a nossa relação de orientador e orientada de “amor e ódio”, por ter me dado suporte técnico e científico para minha formação e realização deste trabalho.

A Universidade de Passo Fundo por fornecer toda a estrutura para realização deste trabalho, a todos professores e colaboradores do PPGCTA, obrigado por todo o empenho e dedicação.

As minhas amigas, Brenda, Lara e Maurien, por proporcionarem momentos de descontração em períodos um pouco, complicados para mim e para a Bre. A Brenda em especial, pela companhia desses 7 anos e dos sábados abaixo de 40°C realizando experimentos.

Enfim, a tudo e a todos que de uma forma ou outra me ajudaram a encerrar mais esta etapa da minha vida. Muito obrigado.

Finally, Me.

*“Arrisque-se! Toda na vida é um risco.  
O homem que vai mais longe é geralmente, aquele que  
está disposto a fazer e a ousar”*

Dale Carnige

## RESUMO

A *Spirulina sp.* é uma espécie de microalga que contém em suas ficobiliproteínas a ficocianina, um pigmento azul com propriedades terapêuticas e elevado valor nutricional proteico. Sua aplicação vem sendo ampliada em decorrência da aprovação da FDA como primeiro corante natural a ser utilizado na indústria de alimentos. Entretanto, os processos para obtenção de ficocianina necessitam de elevado consumo de água. A extração por tampão fosfato e a concentração e purificação da através da separação por membranas, quando comparado aos métodos cromatográficos e químicos possui uma operação mais simples e facilidade em seu escalonamento industrial. O objetivo deste trabalho consiste em verificar a possibilidade da reutilização da solução de extração tampão-fosfato com osmose inversa do processo de extração e purificação de ficocianina. A extração e concentração foi realizada através de uma membrana de ultrafiltração, com pressão de 1,5 bar e concentração de 50% do volume inicial de ficocianina. A purificação foi realizada através do método de diafiltração, alimentando água ultrapura em uma proporção de três vezes o volume de que se desejava purificar. Para recuperar os permeados deste processo, foi utilizada uma membrana de osmose inversa, onde foram avaliadas as seguintes condições de operação: pressão de 1, 2 e 3 bar para a água da diafiltração; e pressão de 4, 5 e 6 bar para o permeado proveniente da concentração. Como fator resposta e análise estatística, foram avaliados os seguintes parâmetros: concentração de fosfato, fluxo de permeado e condutividade. Após análise do balanço hídrico do processo, a viabilidade do método proposto seria mais eficaz quando houvesse uma mistura dos permeados. Por isso, foi realizado o segundo teste avaliando a pressão de 3, 4 e 5 bar e os fatores de concentração de 50% e 75%. A melhor condição de recuperação foi na pressão de 5 bar e concentração de 75%, com redução de fluxo de  $160 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$  para  $59 \text{ L.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ . Através dessa condição foi possível obter um permeado de osmose inversa com características de água ultrapura, isento de fosfato e ficocianina, sendo promissora sua reutilização na diafiltração. O rejeito do processo apresentou uma concentração de  $5620 \text{ mg.L}^{-1}$  de fosfato, representando aumento de 75% na concentração inicial da solução original de fosfato. A re-extração com uso do rejeito de osmose inversa, apresentou características promissoras, pois houve um aumento de 30% na concentração de ficocianina e 35% na sua pureza, quando comparado ao método tradicional da extração. Os processos de separação por membranas foram eficientes para recuperação dos resíduos da extração e purificação de ficocianina. Este processo permite reduzir em 80% o volume de água inserida no processo em relação ao processo tradicional.

Palavras-chave: Biorrefinaria. *Spirulina sp.* Osmose Inversa. Tampão Fosfato. Diafiltração.



## ABSTRACT

*Spirulina sp.* is a species of microalgae that contains in its phycobiliproteins phycocyanin, a blue pigment with therapeutic properties and high protein nutritional value. Its application has been expanded as a result of FDA approval as the first natural dye to be used in the food industry. However, the processes for obtaining phycocyanin require high consumption of water. The extraction by phosphate buffer and the concentration and purification through membrane separation, when compared to chromatographic and chemical methods, has a simpler operation and ease in it industrial scale. The objective of this work is to verify the possibility of reusing the buffer-phosphate extraction solution with reverse osmosis from the phycocyanin extraction and purification process. The extraction and concentration was carried out through an ultrafiltration membrane, with a pressure of 1.5 bar and a concentration of 50% of the initial volume of phycocyanin. Purification was carried out through the diafiltration method, feeding ultrapure water in a proportion of three times the volume that was desired to be purified. To recover the permeates from this process, a reverse osmosis membrane was used, where the following operating conditions were evaluated: pressure of 1, 2 and 3 bar for the diafiltration water; and pressure of 4, 5 and 6 bar for the permeate from the concentration. As a response factor and statistical analysis, the following parameters were evaluated: phosphate concentration, permeate flux and conductivity. After analyzing the water balance of the process, the feasibility of the proposed method would be more effective when there is a mixture of permeates. Therefore, the second test was performed evaluating the pressure of 3, 4 and 5 bar and the concentration factors of 50% and 75%. The best recovery condition was at a pressure of 5 bar and a concentration of 75%, with a flow reduction from 160 L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> to 59 L.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>. Through this condition, it was possible to obtain a reverse osmosis permeate with characteristics of ultrapure water, free of phosphate and phycocyanin, and its reuse in diafiltration is promising. The waste from the process presented a concentration of 5620 mg.L<sup>-1</sup> of phosphate, representing an increase of 75% in the initial concentration of the original phosphate solution. The re-extraction using reverse osmosis waste showed promising characteristics, as there was an increase of 30% in the concentration of phycocyanin and 35% in its purity, when compared to the traditional method of extraction. The membrane separation processes were efficient in the recovery of residues from the extraction and purification of phycocyanin. This process makes it possible to reduce the volume of water used in the process by 80% compared to the traditional process.

Keywords: Biorefinery. *Spirulina sp.* Reverse Osmosis. Phosphate Buffer. Diafiltration.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fracionamento de biomassa e produtos primários e secundários em uma biorrefinaria de microalgas.....	16
Figura 2: Agrupamento das ficobiliproteínas das cianobactérias.....	20
Figura 3: Processos para a extração de ficocianina e proposta de reciclo de solução tampão .	24
Figura 4: Fluxograma geral do experimento .....	32
Figura 5: Módulo de ultrafiltração .....	34
Figura 6: Módulo de separação por membrana de osmose inversa.....	35
Figura 7: Microalga utilizada no experimento antes e após a maceração .....	38
Figura 8: Fluxo de permeado durante a concentração da ficocianina por ultrafiltração a 20°C e 150 kPa (1,5 bar) de pressão.....	40
Figura 9: Fluxo de permeado durante a purificação da ficocianina com três diafiltrações a 20°C e 150 kPa (1,5 bar) de pressão.....	41
Figura 10: Ficocianina concentrada (à esquerda) e permeado (à direita) da ultrafiltração à pressão de 150 kPa (1,5 bar).....	42
Figura 11: Correntes de alimentação(à esquerda), permeado (imagem central) e rejeito (à direita) do processo de osmose inversa utilizado na recuperação do permeado da ultrafiltração do extrato de ficocianina.....	43
Figura 12: Fluxo de permeado para recuperação de água de ultrafiltração por osmose inversa à 20°C e pressões de 400 kPa (4 bar), 500 kPa (5 bar) e 600 kPa (6 bar). .....	44
Figura 13: Fluxo de permeado de osmose inversa pra água proveniente da diafiltração da ficocianina à 20°C nas pressões de 100 kPa (1 bar), 200 kPa (2 bar) e 300 kPa (3 bar). .....	49
Figura 14: Balanço de massa de fosfato de ultrafiltração, diafiltração e recuperação via osmose inversa.....	51
Figura 15: Balanço de massa de ficocianina da extração com uso de solução tampão, concentração por ultrafiltração e purificação com o uso de diafiltração.....	52
Figura 16: Fluxo de permeado durante a concentração de 50% e 75% nas pressões de 300 kPa (3 bar), 400 kPa (4 bar) e 500 kPa (500 bar). .....	54
Figura 17: Correntes de Alimentação (A), permeado (B) e rejeito concentrado 75% (C) da osmose reversa.....	54
Figura 18: Comparação visual entre a primeira extração e segunda extração utilizando o rejeito da osmose reversa.....	56
Figura 19: Balanço hídrico do processo de extração e purificação de ficocianina.....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividade antioxidante em diferentes métodos de extração e purificação da ficocianina .....	21
Tabela 2: Métodos de ruptura celular e extração de ficocianina a partir da <i>Spirulina sp.</i> .....	23
Tabela 3: Métodos de purificação da ficocianina a partir da <i>Spirulina sp.</i> .....	25
Tabela 4: Concentração e pureza dos extratos de ficocianina e aloficocianina nas diferentes correntes do processo proposto .....	39
Tabela 5: Rejeições de condutividade elétrica e concentração de fosfato nas correntes de concentração por ultrafiltração e diafiltração. ....	42
Tabela 6: Concentração dos rejeitos e permeados da água de ultrafiltração após tratamento por osmose inversa para 400 kPa (4 bar), 500 kPa (5 bar) e 600 kPa (6 bar).....	47
Tabela 7: Análise estatística de condutividade elétrica, fluxo e fosfato para pressões para 400 kPa (4 bar), 500 kPa (5 bar) e 600 kPa (6 bar). ....	47
Tabela 8: Caracterização dos permeados provenientes da purificação por diafiltração.....	48
Tabela 9: Concentração dos rejeitos e permeados da osmose inversa à 100 kPa (1 bar), 200 kPa (2 bar) e 300 kPa (3 bar) de pressão, tratando as águas de diafiltração na purificação de ficocianina. ....	50
Tabela 10: Análise estatística de condutividade, fluxo e fosfato para pressões de 100 kPa (1 bar), 200 kPa (2 bar) e 300 kPa (3 bar). ....	50
Tabela 11: Médias de condutividade, fluxo e fosfato para pressões de 300 kPa (3 bar), 400 kPa (4 bar) e 500 kPa (5 bar) nas concentrações de rejeito de 50% e 75%.....	53
Tabela 12: Concentrações de condutividade, ficocianina, aloficocianina e fosfato na re-extração .....	55

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>15</b>
	<b>2.1 BIORREFINARIAS .....</b>	<b>15</b>
	<b>2.2 <i>SPIRULINA SP.</i>.....</b>	<b>17</b>
	<b>2.3 FICOCIANINA.....</b>	<b>19</b>
	<b>2.4 EXTRAÇÃO .....</b>	<b>22</b>
	<b>2.5 PURIFICAÇÃO .....</b>	<b>24</b>
	<b>2.6 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS .....</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO 3: ARTIGO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>30</b>
	<b>3.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>30</b>
	<b>3.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
	3.2.1 Extração e concentração da ficocianina .....	32
	3.2.2 Purificação da ficocianina .....	35
	3.2.3 Concentração por osmose inversa .....	36
	3.2.4 Análise de dados.....	37
	<b>3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
	3.3.1 Caracterização da biomassa .....	38
	3.3.2 Concentração e purificação da ficocianina.....	39
	3.3.3 Recuperação das águas de concentração por osmose inversa .....	43
	3.3.4 Recuperação das águas da diafiltração por osmose inversa.....	48
	3.3.5 Balanço de massa de fosfato e ficocianina.....	51
	3.3.6 Determinação do melhor fator de concentração e pressão de trabalho .....	52
	3.3.7 Nova extração de ficocianina .....	55
	3.3.8 Balanço hídrico .....	56
	<b>3.4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>59</b>
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A ficocianina é uma proteína presente em microalgas com propriedades nutracêuticas. Devido às suas características funcionais, tem atraído a atenção de inúmeras áreas, como da indústria de alimentos, biotecnologia e da área da saúde. Contudo, os processos para obtenção de ficocianina necessitam de elevado volume de água, gerando elevado volume de descarte de efluentes (DJAMAI et al., 2019; LEVASSEUR; PERRÉ; POZZOBON, 2020).

A obtenção da ficocianina passa por um processo de extração e purificação. A extração pode ser realizada por diversos métodos como maceração e extração aquosa (TAVANANDI et al., 2018), congelamento e descongelamento (TAVANANDI et al., 2018; SBEGHEN, 2017), e também pela utilização de tampão fosfato (CHAIKLAHAN et al., 2011; SBEGHEN, 2017). A purificação pode ser realizada por cromatografia ou precipitação com sais de amônio (KARTHICK RAJA NAMASIVAYAM; SHIVARAMAKRISHNAN; ARVIND BHARANI, 2019), ou por ultrafiltração seguida de diafiltração (SBEGHEN, 2017; BRIÃO et al., 2020).

Através da extração com solução tampão fosfato seguida de ultrafiltração e diafiltração, Brião et al., (2020) em seus estudos, obtiveram ficocianina de grau alimentar e esta técnica apresentou vantagem competitiva por exigir apenas um equipamento para a realização da purificação.

A pegada hídrica para produção de 1 kg de biomassa indica que são necessários em média 1,6 m<sup>3</sup> de água doce (NOGUEIRA JUNIOR et al., 2018). Nas etapas de extração e purificação de pigmentos, o volume necessário para a produção de 1 kg de ficocianina pode chegar a 5,4 m<sup>3</sup> de água. Assim sendo, visam-se alternativas para uma redução drástica da pegada hídrica com a prática do reuso da água. Segundo GROSSI et al., (2021), os processos de separação por membranas podem ser empregados com sucesso para tal propósito, por permitem a concentração de solutos para posterior recuperação. As vantagens deste processo em relação aos processos convencionais e o que torna competitivo, é ser um processo atérmico, com baixo consumo de energia e produtos químicos e facilidade no escalonamento (BRIÃO et al., 2020). Apesar de suas potencialidades, o uso de processos de separação por membranas apresenta fatores-chave que impactam na operação e custos, devendo ser estudados. Contudo, Brião et al., (2020) e Chaiklahan et al., (2018), apontaram a presença de ficocianina nos permeados obtidos na ultrafiltração e diafiltração do extrato de ficocianina, abrindo oportunidades para sua recuperação e purificação da solução, permitindo o seu reuso para novas extrações.

A osmose inversa (OI), pode ser utilizada para tal fim, pois apresenta sucesso nas plantas de recuperação de resíduos, possui operação simples, é atérmica e de fácil escalonamento, compatível com outros sistemas de tratamento, sendo aplicado nas indústrias (alimentícia e farmacêutica), no tratamento de efluentes é muito utilizado quando se deseja reúso de sais (PETRINIC, et al., 2015).

Neste contexto, este estudo visa aprofundar e avaliar se o processo de separação por osmose inversa proporciona a recuperação dos permeados provenientes da concentração e purificação por diafiltração da ficocianina. O presente estudo está vinculado à linha de pesquisa “Processos biotecnológicos e não convencionais na produção de alimentos e ingredientes” e acompanha o projeto de pesquisa: “Desenvolvimento de produtos e processos para a indústria de alimentos”, e seus objetivos específicos são:

- a) Caracterizar e viabilizar a reutilização da água de diafiltração;
- b) Verificar se a osmose inversa é uma alternativa sustentável para a recuperação de águas de diafiltração com teste de diferentes pressões;
- c) Verificar a possibilidade da reciclagem da solução de extração tampão-fosfato com osmose inversa;

Este trabalho está estruturado em 4 capítulos, conforme especificado a seguir:

No Capítulo 1, está apresentada a introdução geral do trabalho, assim como a integração da dissertação com a linha de pesquisa do PPGCTA, onde são elencados as suas justificativas e seus objetivos. O Capítulo 2 contempla a revisão bibliográfica sobre o assunto, envolvendo conceitos e oportunidades relacionadas ao processo de tratamento proposto. O Capítulo 3 apresenta o artigo experimental de como foi conduzida a dissertação, os resultados dos experimentos e suas considerações. No Capítulo 4 estão apresentadas as conclusões gerais.

## 2 CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BIORREFINARIAS

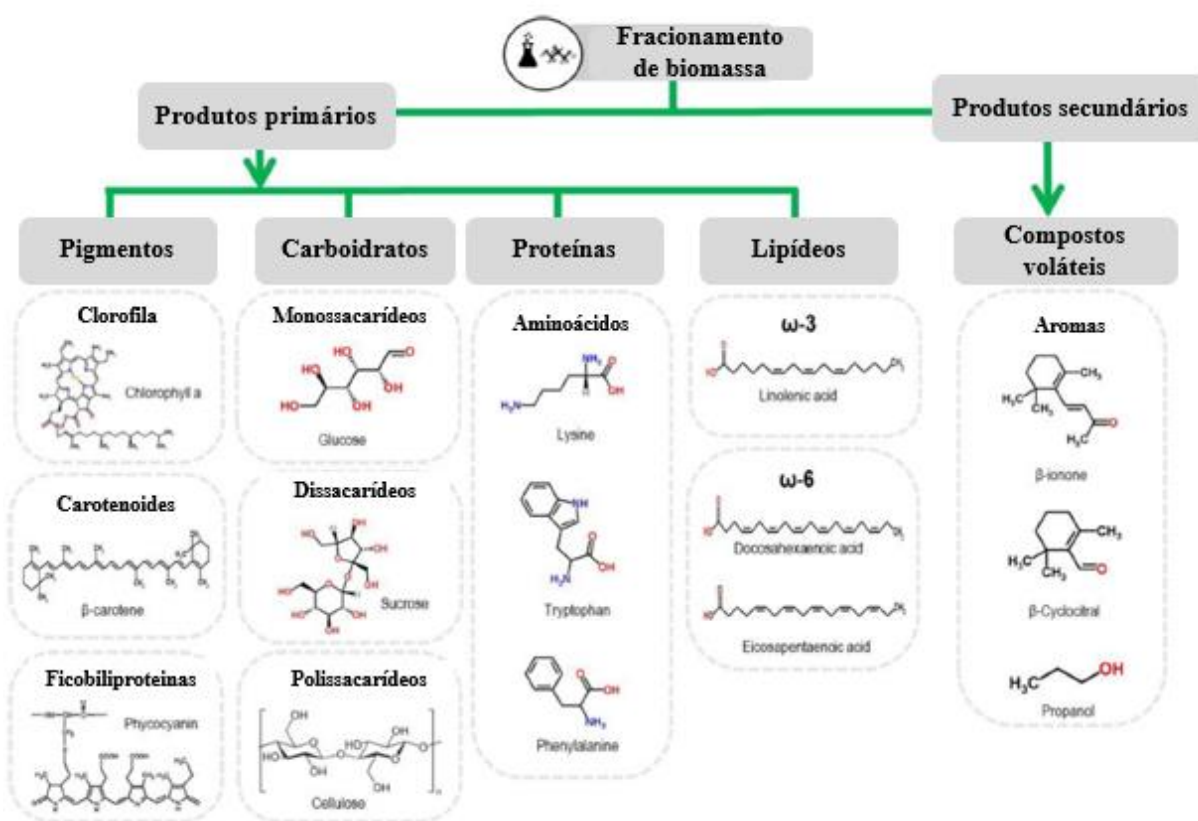
A substituição de produtos derivados de petróleo, tais como as *commodities* químicas e de materiais, permitem a ampliação do leque de produtos de base biológica nas biorrefinarias. A consciência desse desafio, tem direcionado inúmeros investimentos para a pesquisa, produção comercial e matérias-primas alternativas como as microalgas (BRASIL, B. S. A. F; GARCIA, L. C, 2016).

As biorrefinarias são instalações comerciais que através de seus processos convertem matérias-primas em *commodities* de interesse para a bioeconomia, otimizando os recursos e minimizando a geração de resíduos (DEPRÁ et al., 2018).

Segundo Chinnawornrungrsee; Malakul; Mungcharoen, (2013), as biorrefinarias que atuam na conversão de biomassa fornece produtos de alto custo a partir de matéria primas de baixo custo devido à eficiência do uso de recursos e minimização de resíduos, o que, conseqüentemente, leva a maximização de benefícios e lucratividade.

A seleção de um produto proveniente das biorrefinarias, deve atender os seguintes critérios: (i) custo da matéria-prima; (ii) custo do processamento da matéria-prima; (iii) preço do mercado atual e esperado do futuro do coproduto; (iv) capacidade de operação; (v) características técnicas adequadas a necessidade do mercado (DEPRÁ et al., 2018). Na Figura 1 é possível observar o fracionamento da biomassa microalgas e produtos primários e secundários provenientes das biorrefinarias.

Figura 1: Fracionamento de biomassa e produtos primários e secundários em uma biorrefinaria de microalgas.



Fonte: DEPRÁ et al., (2018).

Atualmente, os produtos produzidos a partir de algas abastecem principalmente os mercados de cosméticos, fármacos e nutrição humana e animal. Trata-se de produto de valor agregado que são produzidos em pequena e média escala. Entretanto, a viabilidade econômica do cultivo em larga escala de microalgas para produtos de baixo valor agregado (por exemplo, os *commodities*) ainda não foi atingida (DEPRÁ et al., 2018).

A busca por estratégias sustentáveis, interessa o estudo de uma abordagem alternativa para valorização dos constituintes da biomassa algal, reutilização de solventes e recuperação de biomoléculas em escala industrial, além da minimização do impacto ambiental e qualidade dos produtos (DJAMAI et al., 2019; LEVASSEUR; PERRÉ; POZZOBON, 2020). A comunidade científica já vem demonstrando técnicas de implementação da ISSO 14040 através da Avaliação do Ciclo de Vida (ou *life-cycle assessment*) em biorrefinarias (BAGHEL; TRIVEDI; REDDY, 2016; CHINNAWORNRUNGSEE; MALAKUL; MUNGCHAROEN, 2013).

Segundo Zhu et al., (2016) o setor industrial das biorrefinarias está otimista no desenvolvimento de novas tecnologias de microalgas para a produção de bioprodutos,



entretanto ainda é limitado os estudos que envolvem o ciclo de vida da água ou a pegada hídrica nas biorrefinarias.

Brião et al., (2020) em seus estudos, identificou a perda de ficocianina no permeado após a purificação por processos de separação por membranas. Entretanto, em um processo teórico de biorrefinaria, a solução tampão fosfato utilizada, bem como o permeado da purificação pode ser reciclado novamente no processo (BRIÃO et al., 2020; CHAIKLAHAN et al., 2018).

Do ponto de vista estratégico, as unidades industriais de biorrefinarias estão ativamente buscando a qualidade dos compostos finos (pigmentos) a serem gerados e a sustentabilidade no processo. Assim, uma questão fundamental no projeto de uma plataforma integrada, é que seja capaz de não apenas fracionar, extrair e purificar os compostos alvo, mas também cumprir princípios da química verde e sustentabilidade, destravando os paradigmas do potencial das microalgas (GERARDO; OATLEY-RADCLIFFE; LOVITT, 2014). Segundo Zhu et al., (2016), o uso da água é essencial no biorrefino de microalgas, e sua demanda necessária para a operação é diretamente relevante ao desempenho econômico e tecnológico. O estudo da pegada hídrica nas biorrefinarias, torna-se um fator para formulação de novas políticas e estratégias operacionais.

A separação por membranas tem sido indicada como um desafio por vários autores como um processo promissor para as biorrefinarias, por permitirem a recuperação, reciclagem, purificação e extração de biocombustíveis, subprodutos, meio de cultura e nutrientes (GERARDO; OATLEY-RADCLIFFE; LOVITT, 2014; SOSTER, 2018). Segundo Wan et al, (2008) a mais comum aplicação da ultrafiltração nos processos *downstream* é na concentração de proteínas (por exemplo, na remoção de solventes), alteração do tampão e dessalinização, remoção de vírus e clarificação.

## **2.2 SPIRULINA SP.**

As microalgas tem atraído interesse mundial nos últimos anos em bioprocessos, devido a sua capacidade metabólica de bioconversão; baixa necessidade de nutrientes; aptidão para acúmulo de carboidratos, lipídeos e proteínas; manutenção do ciclo do carbono e produção de oxigênio; sendo considerada uma rica fonte natural de metabólitos secundários, nutrientes funcionais e peptídeos bioativos, tornando-se uma alternativa promissora para a área farmacêutica, alimentícia e na produção de nutracêuticos, (DEPRÁ et al., 2018; DERNER et al., 2006; DJAMAI et al., 2019), neste sentido, estes microrganismos possuem importância

biológica, ecológica e econômica (KARTHICK RAJA NAMASIVAYAM; SHIVARAMAKRISHNAN; ARVIND BHARANI, 2019).

As microalgas pertencem a um amplo grupo de microrganismo unicelulares eucariontes e procariontes, e dentro dos procariontes pode-se dividi-las ainda em *Prochlorophyta* e *Cyanophyta* (MUTANDA et al., 2011). São microrganismos fotossintéticos unicelulares, naturalmente presentes em diferentes ambientes aquáticos/úmidos que utilizam a luz como fonte de energia para fixação do CO<sub>2</sub> (ABO et al., 2019). As cianobactérias (*Cyanophyta*) são microrganismos unicelulares, gram-negativos e sintetizadores de oxigênio e são conhecidas como a mais primitiva forma de vida por existirem a mais de 3,5 bilhões de anos (I, 2019; BRASIL, B. S. A. F; GARCIA, L. C, 2016).

Tradicionalmente as cianobactérias são classificadas de acordo com seu pigmento fotossintético, natureza química dos produtos de reserva e pelos constituintes da parede celular. Os pigmentos podem ser categorizados em carotenóides, clorofila e ficobiliproteínas (PBP). Os carotenóides e a clorofila apresentam insolubilidade em água e baixo peso molecular, enquanto as ficobiliproteínas apresentam proteínas solúveis em água e propriedades espectrais, subdivididas em três categorias: ficoeritrina (*Phycoerythrin*), de coloração rosa brilhante ( $\lambda_{max}$  490 nm–570 nm); ficocianina (*Phycocyanin*) de coloração azul cobalto ( $\lambda_{max}$  610 nm– 625 nm) ; e aloficocianina (*Allophycocyanin*) de coloração ciano ( $\lambda_{max}$  650 nm–660 nm) (BRIÃO et al., 2020; IZADI; FAZILATI, 2018).

As diferentes características bioquímicas das microalgas representam um potencial biotecnológico e sua aplicação torna-se promissora como matérias-primas para alimentos, rações, combustível, fertilizantes e outros produtos de valor agregado e potencial para tratamento de efluentes (DERNER et al., 2006; LEVASSEUR; PERRÉ; POZZOBON, 2020; YU et al., 2017).

A *Arthrospira platensis* (*Spirulina sp.*) é uma cianobactéria fotossintética que apresenta elevado valor como suplemento nutricional e aditivo alimentar devido aos seus constituintes como macronutrientes, proteína (51 e 71 %), carboidratos (15 e 25 %) e lipídeos (4 e 9 %) em seu peso seco. Inúmeros são os benefícios para a saúde humana e animal, por apresentar propriedades terapêuticas, antivirais, anti-inflamatórias, antioxidante, e terapia de doenças como diabetes, obesidade, artrite, anemia, doenças cardiovasculares, alergias, tumores e câncer (AL HINAI et al., 2019; BRIÃO et al., 2020; COLLA; FURLONG; COSTA, 2007; IZADI; FAZILATI, 2018; JAESCHKE et al., 2019; PAN-UTAI; IAMTHAM, 2019a).

A biomassa de algas possui vantagens consideráveis sobre as matérias-primas tradicionais: (i) alta produtividade (geralmente de 10 a 100 vezes) maior que as culturas

agrícolas tradicionais; (ii) captura eficiente de carbono; (iii) elevado teor de lipídeos e amido (facilitando a utilização em biocombustíveis); (iv) cultivo com águas salobras, marítimas ou em águas residuais; (v) produção sobre terras não cultiváveis; (vi) colheita anual, sem período de entressafra; (vii) cultivo e processamento em um mesmo local, facilitando a logística de operação e instalação das biorrefinarias (BRASIL, B. S. A. F; GARCIA, L. C, 2016).

A biomassa de *Spirulina sp.* é considerada pela FDA (*Food and Drugs Administration*) “uma das melhores fontes de proteína” e reconhecida com o *status* GRAS (*Generally Recognized as Safe*) que reconhece o produto seguro e recomenda a utilização da biomassa e seus compostos como suplemento alimentar (JAESCHKE et al., 2019).

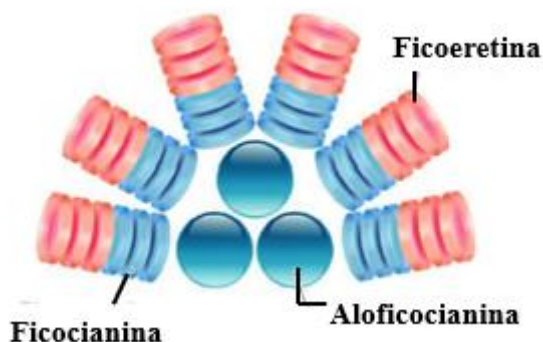
Sbeghen (2017), em seus estudos, atingiu a composição de 58 mg de ficocianina/g de célula de *Spirulina sp.* com teor de pureza de 56 % através da extração por solução tampão e purificação por diafiltração. Produtos que apresentam baixa concentração intracelular, requerem processamento de elevados volumes de massa de produto e maior número de etapas de purificação, necessitando de grandes equipamentos para o processo de purificação, ocasionando custos operacionais e capital alto (CLARKE, 2013).

### 2.3 FICOCIANINA

A ficocianina é o principal pigmento da família da ficobiliproteína (assim como a aloficocianina e a ficoeretina – Figura 2), encontrado em cianobactérias de coloração azul intensa, ligada às proteínas da *Spirulina sp* e corresponde entre 20 – 28 % da massa seca da biomassa (BABU; RASTOGI; RAGHAVARAO, 2006; CHAIKLAHAN et al., 2018; DE MORAIS et al., 2018; IZADI; FAZILATI, 2018). Recentemente foi aprovado pela FDA como corante alimentar, apresentando atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, hepaprotetoras e neuroprotetoras tanto *in vivo* quanto *in vitro* e pode ser considerada um importante composto nutracêutico (DE MORAIS et al., 2018; FERNÁNDEZ-ROJAS; HERNÁNDEZ-JUÁREZ; PEDRAZA-CHAVERRI, 2014; TAUFIQURRAHMI et al., 2017).

A ficocianina é uma proteína altamente fluorescente e estudada para várias aplicações, como indústrias cosméticas, alimentícias, medicamentos e biotecnologia (CHAIKLAHAN et al., 2011; PAN-UTAI; IAMTHAM, 2019a). O interesse industrial na ficocianina é devido ao seu valor nutricional como proteína e suas propriedades terapêuticas.

Figura 2: Agrupamento das ficobiliproteínas das cianobactérias



Fonte: IZADI; FAZILATI, (2018)

Na indústria de alimentos sua utilização é em decorrência de sua coloração azul e suas propriedades funcionais e terapêuticas como antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, hepatoprotetora e outros inúmeros benefícios em promoção da saúde. Estes benefícios, permitem que a ficocianina seja um corante natural como alternativa para a substituição aos corantes artificiais. (ANTELO; COSTA; KALIL, 2015; CHAIKLAHAN et al., 2011; DE MORAIS et al., 2018; IZADI; FAZILATI, 2018; JIANG et al., 2017; KARTHICK RAJA NAMASIVAYAM; SHIVARAMAKRISHNAN; ARVIND BHARANI, 2019; PRABAKARAN et al., 2020).

Em 2013, a FDA autorizou o uso de ficocianina como primeiro corante natural para ser usado pela indústria de alimentos, substituindo os corantes artificiais. Desde então, a demanda por esse pigmento vem aumentando, especialmente na América e na Europa, por apresentar propriedades de biodegradabilidade, solubilidade em água, atoxicidade e não cancerígeno (DE MORAIS et al., 2018; IZADI; FAZILATI, 2018). No Brasil a ANVISA autoriza, através da IN nº 28 de 2018 a utilização de concentrado de alga de *Spirulina sp.* como ingrediente para finalidade de realçar a cor em alimentos, sem a aprovação da ficocianina para uso industrial como corante (BRASIL, 2021). Entretanto, sua utilização pode ser limitada pela instabilidade à luz, à umidade, à temperatura, devido a degradação proteica (YAN et al., 2014).

A extração e purificação da ficocianina a partir da *Spirulina sp.* está tendo ampla aplicação comercial e industrial. Uma das premissas importantes para a obtenção da ficocianina a partir da *Spirulina sp.* seca é a escolha do método de extração e purificação. O principal fator determinante do rendimento da extração e grau de pureza da ficocianina é diretamente relacionado com a destruição da cobertura celular (ANTELO; COSTA; KALIL, 2015; IZADI; FAZILATI, 2018).

Na Tabela 1 é possível verificar a atividade antioxidante da ficocianina utilizando diferentes métodos de extração intracelular.

Tabela 1: Atividade antioxidante em diferentes métodos de extração e purificação da ficocianina

<b>Método de extração</b>	<b>Método de purificação</b>	<b>Atividade antioxidante (%)</b>	<b>Referência</b>
Maceração à frio e sonificação	Precipitação com sulfato de amônio e cromatografia em gel	76,2 <sup>1</sup>	(KARTHICK RAJA NAMASIVAYAM; SHIVARAMAKRISHNAN; ARVIND BHARANI, 2019)
Sonificação e agitação	Ultrafiltração	90,2	(MENEGOTTO et al., 2020)
Sonificação	Carvão ativado	58,6	(PAN-UTAI; IAMTHAM, 2019a)
Congelamento e descongelamento	N.A	37,2	(BRIÃO et al., 2020)
Estática em solução tampão	N.A	38,6	
Agitação	Diafiltração	29,9	

Legenda: <sup>1</sup> in vivo; N.A: não se aplica. Fonte: Autor, (2022).

Atualmente, o valor comercial de ficocianina está ligado ao grau de pureza, avaliado pela razão entre o valor de absorção máximo e a absorbância relacionada a quantidade de proteína (280 nm). Ficocianina com pureza maior que 0,7 é considerada de grau alimentício; maior que 4,0 de grau analítico e maior que 3,9 de grau reativo (LAUCERI et al., 2018).

Segundo Guan, (2016) O preço da ficocianina pode variar de 100 – 500 US\$kg<sup>-1</sup> visto que processos *downstream* – extração, separação e purificação – são de grande importância para a obtenção destes produtos, muitos grupos de pesquisas tem procurado desenvolver métodos que maximizem o rendimento e a qualidade de extração e purificação da ficocianina, enquanto reduzam os custos de operação nas biorrefinarias (CHAIKLAHAN et al., 2018). Chaiklahan et al, (2011) em análise da viabilidade econômica cita que o valor comercial da ficocianina altamente purificada pode variar de U\$30 – 150.mg<sup>-1</sup>, dependendo da natureza do produto final

e o valor de mercado total para os produtos fluorescentes. Clarke, (2013) cita em seu trabalho que os processos de purificação podem representar de 60 – 90% dos custos totais da produção.

## 2.4 EXTRAÇÃO

A extração da ficocianina da biomassa da *Spirulina sp.* é realizada por meio da ruptura celular das ficobiliproteínas e liberação das proteínas presente na biomassa microalgal. Os principais fatores que afetam o resultado da extração são: conteúdo de biomassa de ficocianina; distribuição e tamanho; solvente; tempo de extração; temperatura; taxa de mistura e proporção de biomassa para solvente (DE MORAIS et al., 2018; JULIANTI et al., 2019; TAUFIQURRAHMI et al., 2017).

A extração da ficocianina da biomassa da *Spirulina sp.* é complexa, pois a parede celular da cianobactéria apresenta resistência, por apresentar quatro camadas: a fibrila, peptidoglicano, proteínas e demais camadas análogas as bactérias gram-negativas (DE MORAIS et al., 2018; ÍLTER et al., 2018). A etapa de ruptura celular deve ser eficiente para que ocorra uma transferência de ficocianina para a solução de extração, bem como o tipo de solvente e a relação biomassa-solvente (LI et al., 2020; PAN-UTAI; IAMTHAM, 2019a).

Diversos autores, apresentam técnicas para rompimento celular para extração da ficocianina, como o choque osmótico com solução tampão fosfato, acetato ou água destilada com a associação ou não de métodos físicos de congelamento e descongelamento, maceração, sonificação e homogeneização por pressão. Ainda podem ser utilizados métodos de digestão enzimática, citólise com cálcio, tratamento com ácidos orgânicos e inorgânicos e extração por fluido supercrítico (DE MORAIS et al., 2018; JAESCHKE et al., 2019; LI et al., 2020; LUPATINI, 2016; TAVANANDI et al., 2018).

A Tabela 2 apresenta os resultados da concentração de ficocianina utilizando diferentes métodos de destruição celular, entretanto com o uso comum da solução tampão fosfato. Segundo a literatura observada, a extração com uso de solvente de tampão fosfato é o método mais usual utilizado nas biorrefinarias em decorrência do custo, eficiência e possibilidade de regeneração.

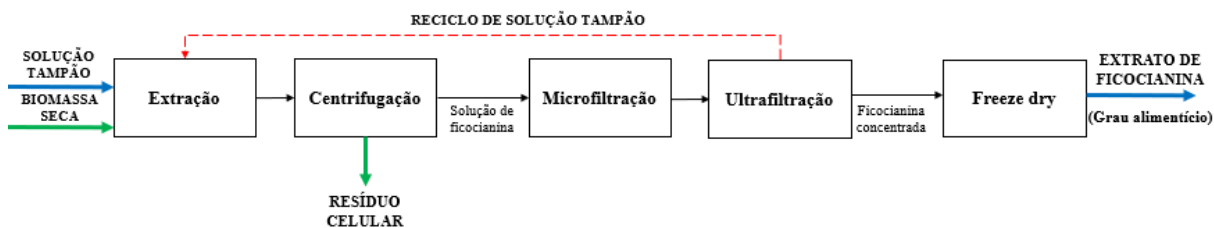
Tabela 2: Métodos de ruptura celular e extração de ficocianina a partir da *Spirulina sp.*

<b>Método de ruptura celular</b>	<b>Solvente de extração</b>	<b>Concentração de ficocianina</b>	<b>Referência</b>
Estática	Tampão fosfato	58,5	SBEGHEN, (2017)
Congelamento e descongelamento	Água destilada	47,9	
Ultrassom	Água destilada	41,8	(TAVANANDI et al., 2018)
Maceração	Tampão fosfato	55,9	
Ultrassom	Tampão fosfato	51,5	(JAESCHKE et al., 2019)
Homogeneização	Tampão fosfato	52,1	
Congelamento e descongelamento	Tampão fosfato	73,7	(PAN-UTAI; IAMTHAM, 2019a)
Campo elétrico pulsado	Tampão fosfato	85,2	
Homogeneização	Tampão fosfato	2,2	(CHAIKLAHAN et al., 2011)
Ultrassom	Tampão fosfato	4,3	
Agitação	Tampão fosfato	55,8	(CHAIKLAHAN et al., 2018)
Agitação	Tampão fosfato	21,3	

Fonte: Autor, (2022).

O processo de extração da ficocianina deve ser eficaz, apresentar rendimento eficaz e ser ambientalmente amigável devido aos volumes utilizados (ÍLTER et al., 2018). Chaiklahan et al, (2018) sugere em seu trabalho o reciclo da solução tampão proveniente da extração da ficocianina e a viabilidade do processo proposto. A Figura 3 apresenta a sugestão do autor de reciclo da solução tampão fosfato na etapa de extração.

Figura 3: Processos para a extração de ficocianina e proposta de reciclo de solução tampão



Fonte: Adaptado de Chaiklahan et al, (2018).

## 2.5 PURIFICAÇÃO

A valorização comercial dos biocompostos está continuamente relacionado com o grau de pureza. Atualmente, a etapa de purificação é um importante desafio para as indústrias de bioativos, devido à complexidade das estruturas biológicas das espécies de microalgas, além do custo envolvido na obtenção o pigmento purificado em conjunto com o elevado rendimento (podendo representar 80% dos custos totais) (DE MORAIS et al., 2018; YU et al., 2017).

A purificação em grande escala da ficocianina ainda é um desafio para as indústrias, e a busca por alternativas tecnológicas se tornou o foco de grandes pesquisas. Com o aumento da escala industrial, a pesquisa por métodos de purificação visa: (i) explorar novas tecnologias para escala industrial com redução de custos e (ii) expandir a aplicação e da ficocianina em alimentos funcionais (YU et al., 2017).

Segundo Brião et al, (2020) a pureza da ficocianina é um fator chave da aplicação na indústria alimentícia, farmacêutica e médica. No entanto, os processos de purificação necessários para atingir o requerido grau de pureza podem impactar negativamente na bioatividade dos compostos.

Os processos de purificação são habitualmente demorados e requerem elevado consumo de soluto. Em alguns casos envolvem diversas etapas como: precipitação de sulfato amônio, centrifugação, cromatografia de filtração em gel, etapas de sistema aquoso bifásico, eletroforese e processos de separação por membranas e em alguns casos a combinação desses (ANTELO; COSTA; KALIL, 2015; DA SILVA FIGUEIRA; MORAES; KALIL, 2018).

Os métodos de purificação dos compostos bioativos se baseiam na diferença de propriedades físicas e funcionais dos pigmentos (DE MORAIS et al., 2018). Na Tabela 3 são apresentados alguns resultados de purificação de diferentes autores.



Tabela 3: Métodos de purificação da ficocianina a partir da *Spirulina sp.*

<b>Método de purificação</b>	<b>Razão de purificação</b>	<b>Referência</b>
Sistema aquoso bifásico	0,7	(ANTELO; COSTA; KALIL, 2015)
Ultrafiltração e Diafiltração	0,7	(BRIÃO et al., 2020)
Membrana cromatográfica	4,2	(LAUCERI et al., 2018)
Microfiltração e Ultrafiltração	1,0	(CHAIKLAHAN et al., 2011)
Precipitação com sulfato de amônio	0,8	(DA SILVA FIGUEIRA; MORAES; KALIL, 2018)
Carvão ativado	1,2	(PAN-UTAI; IAMTHAM, 2019a)
Ultrafiltração e Diafiltração	1,0	(MENEGOTTO et al., 2020)

Fonte: Autor, (2022).

BRIÃO et al., (2020), através de seus estudos demonstrou que é possível produzir ficocianina com grau de pureza alimentar através da extração com solução tampão fosfato seguida de ultrafiltração e diafiltração. Esta técnica apresentou vantagem competitiva por exigir apenas um equipamento para realização da purificação. Os autores indicaram os resultados de purificação por ultrafiltração e diafiltração como um dos processos mais promissores em relação aos outros apresentados.

A diafiltração é utilizada quando se deseja purificar um determinado soluto de uma solução, onde os contaminantes são compostos de dimensões menores do que as do soluto de interesse. Assim, os contaminantes vão sendo eliminados no permeado, enquanto a membrana retém o soluto de interesse. Entretanto, na perspectiva ambiental e da bioeconomia circular, etapas de diafiltração se tornam questionáveis pelo elevado volume de água ultrapura utilizada, podendo corresponder de 3 – 4 vezes o volume que se deseja purificar.

Uma vez que a ficocianina apresenta sensibilidade ao calor e em condições alcalinas ou ácidas, alternativas que permitem a concentração e purificação à temperatura ambiente e sem interação química são propostas promissoras para as biorrefinarias. Nos últimos anos, a utilização de processos de separação por membranas como a ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e osmose reversa (OI), estão ganhando competitividade comercial na concentração e

purificação de bioativos (ANTELO; COSTA; KALIL, 2015; BABU; RASTOGI; RAGHAVARAO, 2006; BRIÃO et al., 2020).

## 2.6 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS

A tecnologia de filtração por membranas avançou gradualmente e tem se demonstrado como um processo promissor, construindo uma ponte sobre o sucesso observado nas indústrias de laticínios. O uso de processos de separação por membranas no fracionamento de produtos de microalgas demonstra grande potencial para as biorrefinarias, sendo indicado para uma vasta gama de processos, tais como recuperação, reciclagem, purificação e extração de biocombustíveis, subprodutos, meio de cultura e nutrientes (GERARDO; OATLEY-RADCLIFFE; LOVITT, 2014). Além disso, os processos de separação por membranas representam processos mais econômicos quando comparados aos tratamentos enzimáticos ou métodos cromatográficos de purificação.

Segundo Al-Shammari e Shahalam, (2020) no início dos anos de 2000, a filtração por membranas surgiu como uma escolha competitiva para o tratamento de águas residuais, principalmente para fornecer recursos alternativos de água potável em regiões com risco de escassez de água.

Conceitualmente, a tecnologia dos processos de separação por membranas é um grupo de técnicas de separação físico-química baseado na permeabilidade da membrana, através de uma barreira semi-perfeita, tendo como função principal remover partículas através da exclusão do tamanho de poro por meio da força motriz (HABERT et al, 2006).

De maneira geral, as membranas são classificadas de acordo com o tamanho de poro. As características estão descritas no Quadro 1. As membranas também podem ser classificadas pelo material de fabricação (orgânico ou inorgânico) e suas configurações (espiral ou tubular).

Quadro 1: Características físicas e funcionais das membranas

Membrana	Microfiltração	Ultrafiltração	Nanofiltração	Osmose Inversa
Tamanho do poro ( $\mu\text{m}$ )	0,1 - 1	0,01 – 0,1	0,001 – 0,01	0,001 – 0,0001
Seletividade	Bactérias, sólidos em suspensão, material coloidal e particulado	Macromoléculas, proteínas, pigmentos	Íons bivalentes, compostos orgânicos de peso molecular médio	Íons monovalentes, compostos de baixo peso molecular
Biorrefinarias	Colheita de biomassa, ruptura celular	Triglicerídeos (TAG), proteínas e açúcar	Ácidos nucleicos, sais	Água

Fonte: HABERT et al, (2006), BRIÃO et al., (2017, 2020).

Os processos de separação por membranas, apresentam tem propriedades intrínsecas, como: (i) simplicidade de operação; (ii) alta seletividade e permeabilidade para diferentes compostos; (iii) flexibilidade de modulação; (iv) compatibilidade com sistemas integrados; (v) baixo consumo de energia; (vi) não promove a alteração de fases (ZHANG et al., 2012). Apesar das vantagens relatadas da filtração por membranas, a principal desvantagem é a redução do fluxo de operação pelo resultado do entupimento da membrana, conhecido como *fouling* (BRIÃO et al., 2017, 2020; GOH et al., 2018).

O *fouling* refere-se ao acúmulo ou deposição de substâncias suspensas ou dissolvidas na superfície e poros da membrana, tornando-se um grande desafio nas operações de processos de separação por membranas, ocasionando a redução no fluxo de permeado, baixa eficiência de remoção de soluto e queda de pressão. Diversos fatores como características da membrana, solução da água alimentada, agentes incrustantes, condições de operação e entre outros fatores (BRIÃO et al., 2020; GROSSI et al., 2021).

Segundo Zhang et al., (2012) o *fouling* pode ser classificado em: (i) orgânico, quando a causa da incrustação está relacionada com o tamanho molecular, forma e características químicas da matéria orgânica. Esta incrustação ocorre principalmente devido à adsorção dos compostos orgânicos na membrana, e precipitação e interação com os cátions da água de alimentação; (ii) inorgânico, é causada principalmente pela precipitação de sais na superfície da membrana; (iii) biológico, é quando ocorre o acúmulo indesejado de microrganismos na membrana, onde eles crescem e se multiplicam usando os nutrientes da água de alimentação e formam o biofilme.

Uma das estratégias para mitigar o *fouling* é a utilização de processos de separação de fluxo cruzado, em que a suspensão a ser filtrada flui tangencialmente sobre a membrana. Assim 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).

Goh et al., (2018) cita que a modificação da superfície da membrana com deposição de nanomateriais e tratamento por plasma são técnicas promissoras para o revestimento da superfície da membrana e veem sendo avaliados como maneiras de mitigar a ocorrência do *fouling*.

Os processos de separação por membranas são uma técnica popular por ser reconhecido como um processo simples, e uma vez que por se tratar de um processo não térmico, pode ser utilizado para purificar bioprodutos minimizando os danos térmicos, apresentam elevada eficiência de separação e permite a recuperação de meio de cultura ou de soluções. Entretanto, o sucesso de qualquer processo de separação é determinado pelo fluxo de permeado e a seletividade da membrana (BRIÃO et al., 2017, 2020). Assim, o processo pode preservar as propriedades biologicamente ativas contidas em produtos naturais, como a cor e estabilidade (CASTRO-MUÑOZ et al., 2020).

Segundo Castro-Muñoz et al., (2020) o uso dos processos de separação por membranas atualmente possui abordagem múltipla dentro do processamento industrial de produtos alimentícios. Há algumas décadas, as diferentes técnicas baseadas nos processos de separação por membranas têm sido ativamente aplicadas para a separação, recuperação e concentração de compostos ativos (por exemplo, compostos fenólicos, antioxidantes, corantes, polissacarídeos), de produtos agroalimentares e seus derivados (como águas residuais), clarificação e concentração de extratos e recuperação de aromas (SANTOS et al., 2020).

O uso de membranas de osmose inversa, permite atingir água de padrões restritos e em muitos processos atinge padrão de potabilidade. O mecanismo de operação de membranas de

osmose inversa é através do gradiente de concentração dos solutos (MOSSMANN, 2017). De maneira simplificada, osmose pode ser definido como um processo natural no qual as moléculas de água se movem espontaneamente de uma região de baixa concentração para uma de alta concentração de solutos (QASIM et al, 2020). Quando aplicada uma diferença de pressão superior a pressão osmótica, a água é forçada a fluir em direção oposta àquela do fenômeno natural de osmose, neste caso, o processo que ocorre é conhecido como osmose inversa.

Dentre os processos de separação por membranas, a osmose inversa é um método que vem ocupando um amplo espaço na recuperação de águas residuais e para tratamento de água potável (GAMBA et al., 2020). Este processo é utilizado, quando o objetivo da filtração é reter solutos de baixa massa molar como sais inorgânicos e moléculas orgânicas, além de rejeitar íons monovalentes como sódio e cloreto, sendo que o tipo de água de alimentação pode influenciar no processo.

Para Czuba et al., (2021) os avanços industriais e tecnologias e o aumento da produção agrícola e demanda por água de alta qualidade, fazem das membranas uma ótima opção para recuperação e reutilização das águas residuais em países que não sofriam anteriormente com escassez de água e evitar que venha a ocorrer possíveis racionamento ou até a falta de água.

### 3 CAPÍTULO 3: ARTIGO EXPERIMENTAL

#### REUTILIZAÇÃO DE PERMEADOS DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE FICOCIANINA COM MEMBRANA DE OSMOSE INVERSA

##### RESUMO

A ficocianina é um pigmento extraído e purificado a partir das ficobiliproteínas da microalga *Spirulina sp* e seu uso e aplicação vem aumentando nos últimos anos em decorrência do uso do pigmento em indústrias do ramo alimentício e de produtos naturais. Os métodos de extração, concentração e purificação deste pigmento podem ser realizados via rotas de separação por membranas através do uso de solventes como tampão fosfato. Este trabalho visa criar uma rota de recuperação dos permeados do processo de concentração e purificação com uso de membrana de osmose reversa e propor a reutilização do seu rejeito e uma nova extração. Neste trabalho foram testadas as pressões de 1, 2 e 3 bar para o permeado de diafiltração, pressões de 4, 5 e 6 bar para o permeado da concentração por ultrafiltração e após a avaliação estatística e do balanço hídrico, foram realizados os testes avaliando o fator de concentração de 50% e 75% para as pressões de 4, 5 e 6 bar. Através do método proposto, foi possível reutilizar o rejeito da osmose reversa para uma nova extração, e obter uma concentração de 70,44 mg.gcel<sup>-1</sup> e pureza de 0,54, concentração 29% a mais que com o uso de um solvente a base de fosfato. Utilizando o método proposto, é possível reduzir 80% do consumo de água em uma biorefinaria de extração e purificação de ficocianina.

**Palavras-chaves:** Diafiltração; Osmose Inversa; Tampão Fosfato; Concentração

##### 3.1 INTRODUÇÃO

A ficocianina consiste em um composto de alto valor agregado e sua aplicação na indústria alimentícia vem ganhando importância como corante alimentar natural. As propriedades terapêuticas relatadas consistem nas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias antiplaquetárias, nefroprotetoras, de eliminação de radicais, anticancerígenas e hepatoprotetoras. Os processos de extração e purificação desse pigmento são amplos, e requerem uma estratégia segura e sustentável devido ao baixo rendimento e seu valor agregado. Um processo de extração e purificação que apresenta vantagem competitiva em relação a

qualidade e custo é através do uso de processos de separação por membranas. Através da ultrafiltração, é possível obter uma concentração de 79,10 mg.gcel<sup>-1</sup> de ficocianina com pureza de 0,39, com a utilização da diafiltração como processo de purificação, a concentração é de 91,30 mg.gcel<sup>-1</sup> e grau de pureza de 0,46. O principal desafio do método de extração por ultrafiltração seguido de purificação por diafiltração consiste na demanda hídrica, podendo chegar a 150 L a cada 10 g de ficocianina. Nos últimos anos, a recuperação e o reuso de água tornaram-se importantes elementos da gestão de recursos hídricos em todo o mundo (ZHANG et al, 2019). Entre os processos conhecidos para recuperar água, a separação por membranas tem sido reconhecida como um método viável para o tratamento de água, produzindo água de melhor qualidade, tornando-se seguro para consumo humano e aplicações de reutilização (HUBE et al., 2020). Este artigo apresenta as rotas de recuperação integral dos permeados do processo tradicional de extração e purificação da ficocianina com ultrafiltração através do uso de membrana de osmose inversa. Com o método proposto, é possível identificar uma oportunidade de redução no consumo de água e solvente tampão fosfato e redução na perda de ficocianina do processo.

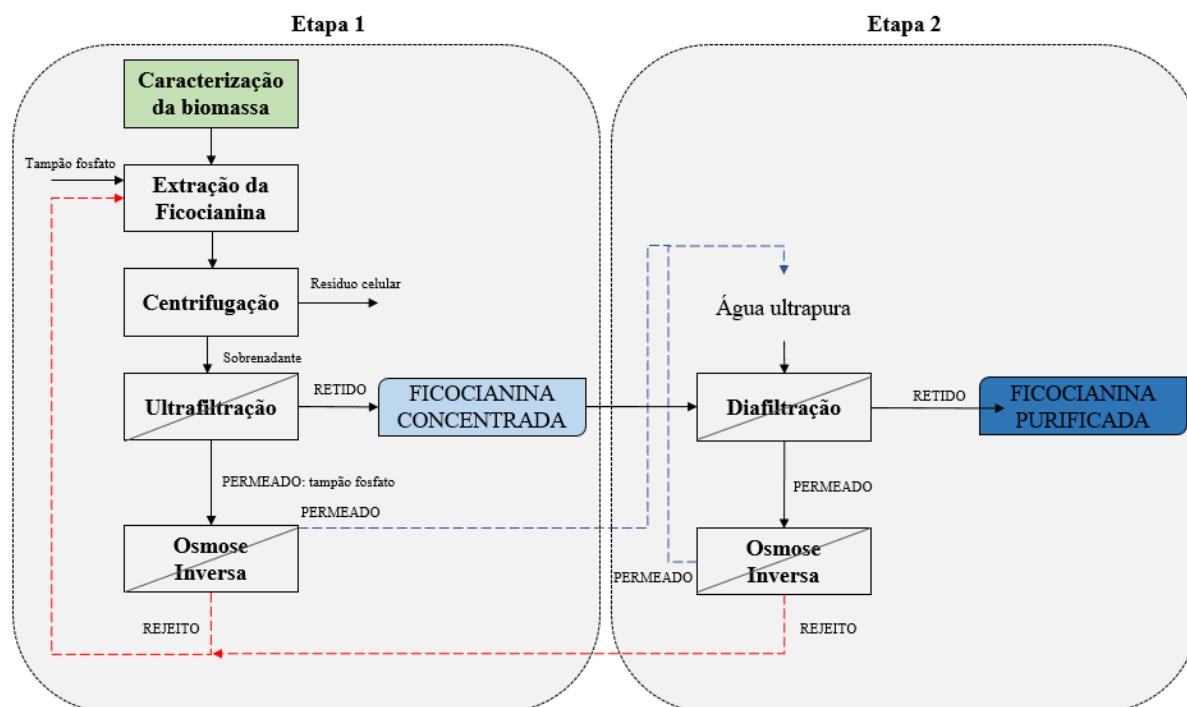
### 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O fluxograma de todas as etapas do experimento está apresentado na Figura 4. Através da figura é possível identificar todas as correntes de rejeito e permeado do experimento, bem como suas rotas de reutilização.

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

Para caracterização da biomassa, foi realizada a quantificação de proteínas (LOWRY et al, 1951) - ANEXO I e carboidratos (DUBOIS et al, 1956 – ANEXO II). A caracterização foi realizada em triplicata.

Figura 4: Fluxograma geral do experimento



Fonte: Autor, (2022).

### 3.2.1 Extração e concentração da ficocianina

#### 3.2.1.1 Extração da ficocianina

Para a extração da ficocianina, foi utilizada a razão de 1:100 (m/v) biomassa seca com solução tampão fosfato ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  e pH 7,0- ANEXO III). A extração e separação da ficocianina do extrato bruto seguiram as recomendações de Brião et al, (2020) adaptadas de Chaiklahan et al, (2011). A solução de extração foi submetida ao processo de agitação em shaker a 150 rpm à temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas.

A concentração de ficocianina ( $PC_{\text{conc}}$ ) foi obtida pela análise espectrofotométrica em 620 nm e 652 nm, determinada pela Equação (1) definida por Bennett e Bogorad (1973). As leituras de absorbância foram realizadas em um espectrofotômetro modelo UV-5100, fabricante Tecnal.

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

onde:



FICO<sub>conc</sub>: concentração de ficocianina (mg.mL<sup>-1</sup>);

A<sub>620</sub>: absorvância em 620 nm;

A<sub>652</sub>: absorvância em 652 nm;

0,474: constante da equação;

5,34: constante da equação;

A concentração de aloficocianina (APC) foi obtida pela análise espectrofotométrica em 652 nm e 620 nm determinada pela Equação (2) definida por Bennett e Bogorad (1973):

$$\text{ALOFICO}_{\text{conc}} = \frac{A_{652} - 0,208 A_{620}}{5,09} \quad (2)$$

onde:

ALOFICO<sub>conc</sub>: concentração de aloficocianina (mg.mL<sup>-1</sup>);

A<sub>620</sub>: absorvância em 620 nm;

A<sub>652</sub>: absorvância em 652 nm;

0,208: constante da equação;

5,09: constante da equação;

Para separar o extrato bruto de ficocianina dos resíduos celulares, foi realizada a centrifugação da solução a 4400g por 15 minutos, utilizando uma centrífuga CIENTEC CT-5000, sendo a fase sobrenadante de interesse.

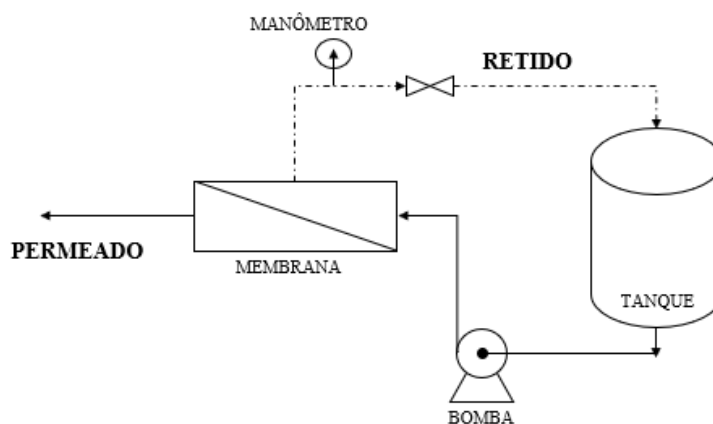
Para determinar o rendimento da extração foi utilizada a Equação 3.

$$\text{Rendimento (mg.g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Conc PC(mg.mL}^{-1}\text{)} \cdot \text{volume de solução tampão (mL)}}{\text{Peso celular (g)}} \quad (3)$$

### 3.2.1.2 Ultrafiltração

A concentração da ficocianina por ultrafiltração, seguiu a metodologia descrita por Sbeghen, (2017) e Brião et al, (2020). A concentração foi realizada no módulo de filtração tubular tangencial apresentado na Figura 5, com volume de alimentação de extrato bruto de 5,75 L e sistema de recirculação de rejeito. O extrato bruto é bombeado para o módulo de filtração, permeando através de uma membrana tubular de Policloreto de vinilideno, área de filtração de 0,1 m<sup>2</sup> e tamanho de ponto de corte de 30 kDa a 80 kDa (30000 g.mol<sup>-1</sup> – 80000 g.mol<sup>-1</sup>). O módulo foi adquirido da empresa WGM Sistemas (São Paulo – Brasil) e a membrana adquirida da Koch Membrane Systems.

Figura 5: Módulo de ultrafiltração



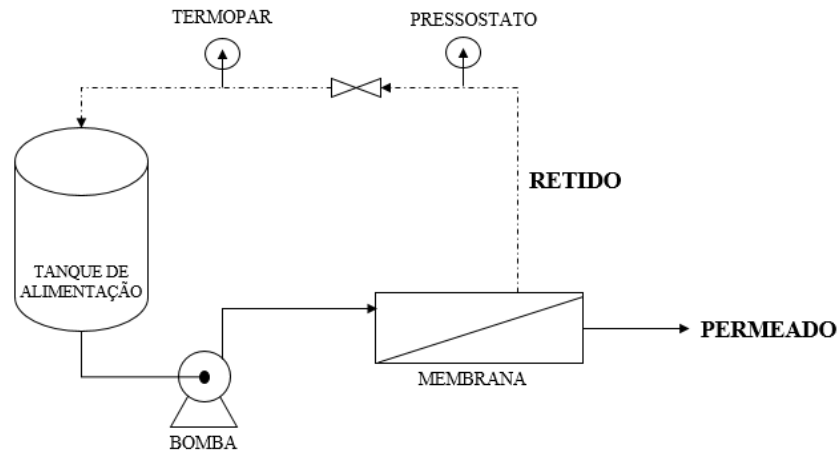
Fonte: Autor, (2022).

Durante a concentração, foram controladas as variáveis de pressão, mantida em 1,5 bar e temperatura de filtração de 20°C. Como forma de avaliar o grau de incrustação foi monitorado o fluxo de permeado. O processo de separação foi mantido até que o volume inicial fosse reduzido em 50% do volume inicial.

### 3.2.1.3 Osmose inversa

O permeado proveniente da etapa de ultrafiltração foi direcionado ao módulo de filtração da Figura 6. Para esta etapa, o volume do tanque de alimentação é bombeado para a membrana de osmose inversa de pressões ultra baixas (ULP2012-100, Vontron) de filtração perpendicular de poliamida espiral, com área de filtração de 0,56m<sup>2</sup>. A verificação da pressão é realizada através de um pressostato digital e a temperatura monitorada através de um termopar.

Figura 6: Módulo de separação por membrana de osmose inversa



Fonte: Autor (2022)

A fim de avaliar a rejeição de ficocianina, aloficocianina, condutividade elétrica e concentração de fosfato, na água proveniente da concentração, foram testadas as pressões de 4, 5 e 6 bar e a temperatura de filtração mantida constante em 20°C. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A Equação 4 apresenta o coeficiente de rejeição para cada etapa do experimento.

$$\text{Rejeição (\%)} = \left(1 - \frac{C_p}{C_a}\right) \cdot 100 \quad (4)$$

onde:

$C_p$ : Concentração do parâmetro no permeado

$C_a$ : Concentração do parâmetro na alimentação

### 3.2.2 Purificação da ficocianina

A purificação da ficocianina por diafiltração foi denominada como a etapa 2 do experimento.

#### 3.2.2.1 Ultrafiltração (diafiltração)

Para que houvesse o aumento de pureza da ficocianina, foram realizadas três etapas de diafiltração com água ultrapura proveniente do permeado da osmose inversa no mesmo equipamento, seguindo as recomendações descritas por Brião et al, (2020) onde retorna-se ao

volume inicial de extrato bruto pela adição da água ultrapura até que seu volume seja reduzido em 50%.

As amostras foram submetidas às mesmas condições operacionais do item 3.1.3.

Para determinar a pureza do extrato foi realizada a análise espectrofotométrica utilizando a relação de 620 nm e 280 nm, utilizando a Equação 5, definida por Abalde et al, (1998).

$$PC_{\text{pureza}} = \frac{A_{620}}{A_{280}} \quad (5)$$

onde,

$PC_{\text{pureza}}$ : pureza de ficocianina;

$A_{620}$ : absorvância em 620 nm;

$A_{280}$ : absorvância em 280 nm;

A água proveniente da diafiltração foi submetida a etapa de filtração por osmose inversa para que seja avaliada a qualidade para uma nova etapa de diafiltração. As condições de operação seguiram o mesmo procedimento descrito no item 3.1.4 onde foram avaliadas as pressões de 1, 2 e 3 bar e verificado como fator resposta a rejeição de ficocianina, aloficocianina, condutividade elétrica e fosfato e realizados em triplicata.

A determinação da concentração de fosfato seguiu a metodologia descrita em APHA (2005), no método 4500-P C e encontra-se no Anexo IV.

Para determinar a condutividade elétrica, seguiu-se a metodologia descrita em APHA (2005), no método 2510-B.

### **3.2.3 Concentração por osmose inversa**

Para avaliar o efeito do fator de concentração por osmose inversa e do processo proposto, foram misturadas as 4 correntes de 2,8 L de permeado do processo (1 corrente da ultrafiltração e 3 correntes da diafiltração), totalizando 11,2 L de permeado que seriam destinados à estação de tratamento de efluentes. Este volume de 11,2 L foi alimentado ao processo de osmose inversa da Figura 6 e avaliados dois fatores de concentração da corrente do rejeito de 50% e 75%. As pressões testadas nesta etapa do experimento, foram de 3, 4 e 5 bar. Como fator resposta, foram analisadas as variáveis de fluxo e concentração de fosfato.

### **3.2.4 Análise de dados**

Os dados foram avaliados estatisticamente através do *software* Statistica 7.0®. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para determinar as diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as amostras e as diferenças entre as médias determinadas pelo teste de Tukey.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Caracterização da biomassa

A caracterização da biomassa da microalga *Spirulina sp.* LEB 18 apresentou a composição de: 57,93%  $\pm$ 2,38% de proteínas e 13,07%  $\pm$ 0,11% de carboidratos. Estes resultados são esperados pois a *Spirulina sp.* apresenta valores consideráveis de carboidratos e proteínas quando comparadas a outras cianobactérias e outras fontes de alimentos. Segundo Caetano, (2018) a composição química para os parâmetros proteínas e carboidratos, podem variar de 60 – 71% e 13-16%, respectivamente. Da S Uebel et al., (2019) e Brião et al., (2020) em caracterização realizada para a mesma espécie da mesma planta piloto obtiveram concentrações entre 57,0% – 65,20% para proteínas e 10,6% – 11,05% para carboidratos. A composição química da *Spirulina sp.* LEB 18 apresenta diversificação em decorrência da adaptabilidade em alterar as condições de cultivo, visando o interesse comercial do produto.

Segundo Da S Uebel et al., (2019), as diferentes composições de biomassa são em decorrência da variação no cultivo na planta industrial e escala laboratorial. A Figura 7 apresenta a microalga utilizada para o experimento, sendo esta macerada para facilitar a difusão das ficobiliproteínas na solução de extração.

Figura 7: Microalga utilizada no experimento antes e após a maceração



Fonte: Autor, (2022).

Para o estudo disposto nessa dissertação, a concentração de proteína é o fator determinante para a o rendimento de ficocianina, proveniente da extração das ficobiliproteínas presente na membrana intracelular da microalga. Segundo Borba; Ferreira (2003) o nitrogênio consiste no principal nutriente inserido no meio de cultivo quando se deseja aumentar a concentração de proteínas, por ser o nutriente constituinte das partes estruturais das células como proteínas e ácidos nucleicos. A planta piloto de produção de *Spirulina sp.* em análise,

demonstrou que a microalga produz biomassa com alta qualidade para aplicação como biocombustíveis, energia, saúde e nutrição humana (DA S UEBEL et al., 2019).

### 3.3.2 Concentração e purificação da ficocianina

A concentração e pureza de ficocianina e a concentração de aloficocianina estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Concentração e pureza dos extratos de ficocianina e aloficocianina nas diferentes correntes do processo proposto

	Ficocianina (mg.gcel <sup>-1</sup> )	Aloficocianina (mg.gcel <sup>-1</sup> )	Pureza
Bruto após centrifugação	49,50±0,06	17,30±0,02	0,36±0,03
Concentrado ultrafiltração	79,10±0,14	33,90±0,07	0,39±0,02
Purificado 1ª DF	81,60±0,10	33,60±0,02	0,40±0,02
Purificado 2ª DF	87,90±0,14	31,60±0,03	0,42±0,04
Purificado 3ª DF	91,30±0,09	30,50±0,04	0,46±0,04

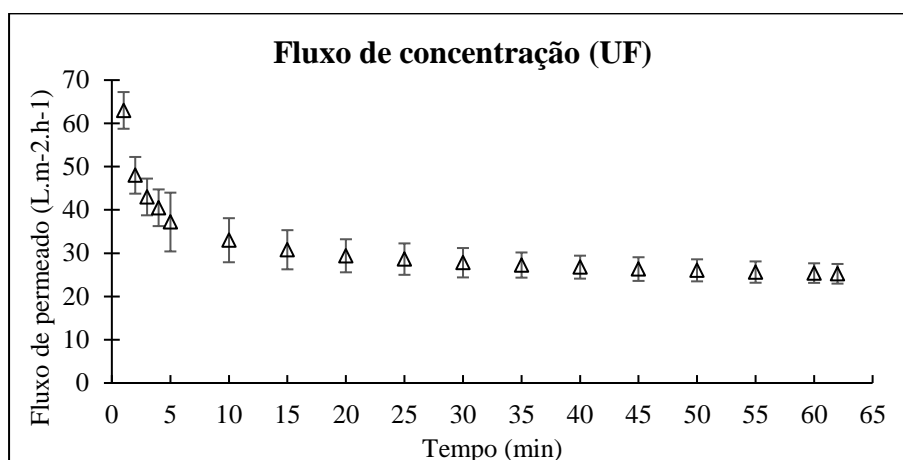
\*Valores denotam a média ± desvio padrão de quatro repetições. Fonte: Autor, (2022).

Pode-se observar que a concentração de ficocianina extraída pelo tampão fosfato é de 49,50±0,06. Estes resultados são esperados, segundo a literatura que apresentou resultados similares na Tabela 2. Em extração estática para mesma cultura de *Spirulina sp.*, Brião et al., (2020) atingiram concentrações de 58,54±0,25 e pureza de 0,51, valor superior ao encontrado neste experimento.

Pan-Utai; Iamtham, (2019b) e Da S Uebel et al., (2019), em seus estudos, citam que a extração e concentração das ficobiliproteínas proveniente da *Spirulina sp.*, é afetada por diversos fatores, entre eles a temperatura de extração, preparação da biomassa e a intensidade luminosa que foi fornecida durante o período de cultivo.

Estudos desenvolvidos por Balti et al, (2020) definiram o processo de purificação por diafiltração demonstrou potencialidade no fracionamento das proteínas solúveis da *Spirulina sp.* para a extração da ficocianina. A purificação por diafiltração apresentou aumento de concentração e conseqüentemente pureza da ficocianina e redução da concentração de aloficocianina no decorrer da purificação. Na Figura 8 é possível verificar o comportamento do fluxo de filtração no decorrer da concentração.

Figura 8: Fluxo de permeado durante a concentração da ficocianina por ultrafiltração a 20°C e 150 kPa (1,5 bar) de pressão



Fonte: Autor, (2022).

Houve redução do fluxo inicial de permeado (Apêndice A) de 302 (L.m<sup>2</sup>.h<sup>-1</sup>) para 66 (L.m<sup>2</sup>.h<sup>-1</sup>) no primeiro minuto de concentração, correspondendo a 78% de redução do fluxo. Segundo Habert et al., (2006) os fenômenos relacionados a queda contínua de fluxo de permeado após a estabilização da polarização da concentração são chamados de *fouling*, o qual é esperado e limitante aos processos de separação por membranas por caracterizar a deposição de substâncias suspensas ou dissolvidas na superfície da membrana.

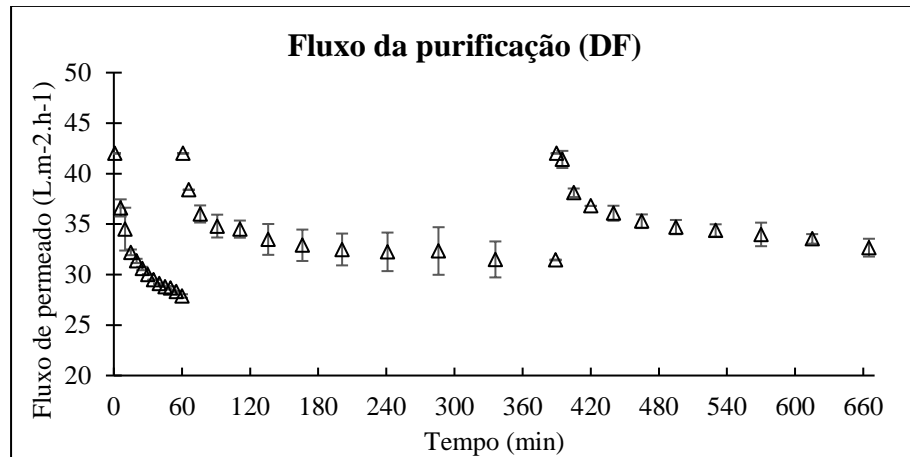
As características da composição química da biomassa da *Spirulina* sp., permite inferir segundo Qasim et al, (2019) que houve a ocorrência do *fouling* inorgânico, em decorrência da precipitação dos sais presentes na solução tampão, especialmente o fosfato e o *fouling* orgânico, relacionado ao tamanho molecular da ficocianina e alofocianina e conter com a presença de proteínas solúveis e insolúveis.

Brião et al. (2020) identificaram que a redução de fluxo dá-se em duas etapas, havendo o bloqueio de poros da membrana (mecanismo responsável pela queda inicial do fluxo) seguido pela formação de torta (responsável pela queda de longo prazo do fluxo)

Na Figura 9 é possível verificar o comportamento do fluxo da membrana durante as etapas de purificação.



Figura 9: Fluxo de permeado durante a purificação da ficocianina com três diafiltrações a 20°C e 150 kPa (1,5 bar) de pressão



Fonte: Autor, (2022).

O fluxo de permeado é recuperado cerca de 40% durante a diafiltração após ser reconstituído o volume inicial com água destilada (visualizados nos tempos de 60 min e 390 min), sugerindo que a polarização da concentração causou o declínio do fluxo. Essa recuperação de fluxo ocorre porque a água adicionada dilui os sólidos presentes no retido, reduzindo a polarização por concentração. Entretanto, conforme a água adicionada é removida no permeado e o retido recupera sua concentração inicial, o fluxo volta a cair.

Segundo Mulder, (1996) a polarização da concentração é observada nos momentos iniciais da filtração e possui uma tendência rápida a um valor constante. No caso da incrustação, a mesma possui uma tendência de estabilização mais prolongada, reduzindo o fluxo ao longo do tempo. Embora sejam abordados como fenômenos independentes um do outro, a incrustação pode resultar em fenômenos de polarização.

A pressão de operação tem efeito direto no fluxo permeado, enquanto que a velocidade tangencial minimiza a polarização de concentração na corrente do retido, e pode refletir tanto no fluxo permeado quanto na eficiência de separação (BRIÃO; TAVARES, 2012).

Na Figura 10 é apresentado o concentrado e permeado da etapa de concentração de ficocianina.

Figura 10: Ficocianina concentrada (à esquerda) e permeado (à direita) da ultrafiltração à pressão de 150 kPa (1,5 bar).



Fonte: Autor, (2022).

Por se tratar de uma barreira imperfeita, a membrana de UF permitiu na diafiltração, um produto 15% mais puro em relação à concentração convencional. Tecnicamente, isso significa que houve a perda de ficocianina no permeado, conforme observado nos estudos de Balti et al., (2021), isso permite que o permeado seja reciclado novamente através da extração para aumentar o rendimento, como sugerido por Chaiklahan et al., (2018) e realizado o experimento de recuperação destas águas por osmose inversa.

Na Tabela 5 estão apresentadas as rejeições de condutividade e fosfato.

Tabela 5: Rejeições de condutividade elétrica e concentração de fosfato nas correntes de concentração por ultrafiltração e diafiltração.

	Condutividade elétrica		Fosfato	
	Condutividade ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	Rejeição (%)	Concentração ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Rejeição (%)
Rejeito UF	3762,00±184,10	16	1167,52±71,75	42
Permeado UF	3060,00±78,62		669,13±26,73	
Purificado 1ª DF	2383,00±196,94	52	730,71±42,25	54
Permeado 1ª DF	1800,75±152,70		335,67±25,6	
Purificado 2ª DF	1630,25±137,04	54	452,78±103,60	60
Permeado 2ª DF	1105,68±123,73		177,51±14,73	
Purificado 3ª DF	1092,50±110,34	57	335,28±106,46	73
Permeado 3ª DF	708,80±120,39		90,81±21,01	

\*Valores denotam a média ± desvio padrão de quatro repetições. Fonte: Autor, (2022).

A concentração de fosfato na solução tampão a qual foi realizada a extração inicial é de 786,35 mg.L<sup>-1</sup>. Pode-se observar nos resultados acima, que a concentração na corrente de rejeito foi superior ao utilizado na solução tampão em decorrência da difusão de fósforo e fosfatos presentes no material intracelular da microalga.

As microalgas precisam de uma série de nutrientes para se multiplicar, no qual os essenciais ao cultivo são, principalmente, N e P (nitrogênio e fósforo). Em relação aos macronutrientes as mesmas requerem, além de nitrogênio e fósforo, carbono, oxigênio, hidrogênio, cálcio, magnésio, enxofre e potássio (HSIEH-LO, et al., 2019).

O solvente (tampão fosfato) passou a ser menos concentrado no decorrer das diafiltrações, o que pode ser observado na redução da condutividade e concentração de fosfato dos permeados. Também é possível observar que o permeado da concentração da ficocianina é o que apresenta maior concentração de fosfato em relação aos demais permeados, sendo então promissor para uma nova extração.

### 3.3.3 Recuperação das águas de concentração por osmose inversa

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos após a osmose inversa com as respectivas pressões utilizadas. É possível observar que houve 100% de rejeição de ficocianina, alofocianina e através do método de análise para determinar fosfato, não houve detecção espectrofotométrica. Sabe-se que o fosfato é um íon polivalente, e assim sua retenção é assegurada via processos de osmose inversa.

Visualmente, a ausência de ficocianina na corrente de permeado, pode ser observada na Figura 11. Para o parâmetro condutividade, todas as pressões testadas apresentaram rejeição superior a 99,3%. Sendo assim, existem inúmeras oportunidades de aplicação deste permeado no processo *downstream*, sendo uma alternativa no processo de diafiltração.

Figura 11: Correntes de alimentação (à esquerda), permeado (imagem central) e rejeito (à direita) do processo de osmose inversa utilizado na recuperação do permeado da ultrafiltração do extrato de ficocianina.

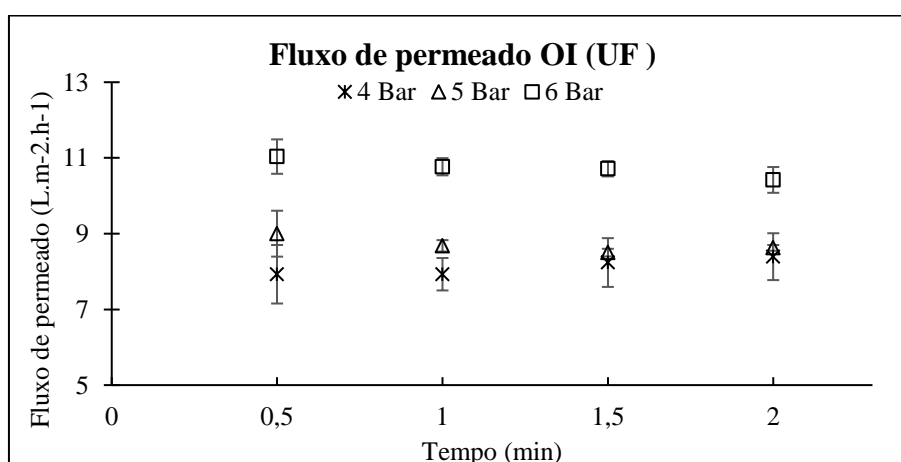


Fonte: Autor, (2022).

Sendo assim, é possível inferir que com o aumento da pressão utilizada, ocorre o aumento da concentração de ficocianina, aloficocianina, fosfato e condutividade na corrente do rejeito, sendo assim, o método proposto torna-se promissor para reutilizar as correntes de rejeito em outras extrações.

Qasim et al., (2019) cita a osmose inversa como principal processo de dessalinização atualmente conhecido, referindo-se ao processo de remoção de sais e minerais para a produção de água limpa e adequada para o consumo humano, uso industrial e doméstico. Os processos de separação por membranas, especialmente a osmose inversa, são conhecidos por atuarem como uma barreira na remoção de diferentes poluentes, microrganismos, partículas suspensas, materiais coloidais ou sólidos dissolvidos (CADORE et al., 2020). Na Figura 12 é apresentado o fluxo do permeado durante o experimento.

Figura 12: Fluxo de permeado para recuperação de água de ultrafiltração por osmose inversa à 20°C e pressões de 400 kPa (4 bar), 500 kPa (5 bar) e 600 kPa (6 bar).



Fonte: Autor, (2022).

A Figura 12 mostra que em relação ao fluxo inicial da osmose, apresentado no Apêndice A, ocorre uma redução de 58%, 64% e 65% do fluxo inicial para 4, 5 e 6 bar respectivamente. Esta ocorrência é devido ao *fouling*, já abordado anteriormente.

Para avaliar a recuperação do rejeito das águas provenientes da concentração por ultrafiltração, foram avaliadas estatisticamente os fatores resposta: condutividade, fluxo e concentração de fosfato em relação as pressões testadas e os resultados estão apresentados na Tabela 7.

A partir da análise ANOVA seguida do teste de Tukey (Tabela 7) é possível verificar que existe uma diferença significativa entre as pressões de 5 e 6 bar para os parâmetros de condutividade elétrica e fluxo no rejeito. Entretanto, não ocorre diferença significativa para a

concentração de fosfato. Com isso, é possível concluir que o processo de separação por membrana com o uso de osmose inversa, permite recuperar as características iniciais da solução tampão utilizada na extração da ficocianina. O maior fluxo permeado foi obtido a 6 bar de modo que a maior condutividade elétrica no rejeito da membrana também foi obtida nessa pressão, indicando ser esta a melhor pressão a ser utilizada. Ressalta-se que a membrana escolhida para os testes é do tipo de baixa pressão (Ultra Low Pressure), na qual evita-se o uso de pressões acima de 10 bar.



Tabela 6: Concentração dos rejeitos e permeados da água de ultrafiltração após tratamento por osmose inversa para 400 kPa (4 bar), 500 kPa (5 bar) e 600 kPa (6 bar).

Pressão		Ficocianina		Aloficocianina		Condutividade elétrica		Fosfato	
		Concentração (mg.g <sub>cel</sub> <sup>-1</sup> )	Rejeição (%)	Concentração (mg.g <sub>cel</sub> <sup>-1</sup> )	Rejeição (%)	Condutividade (μS.cm <sup>-1</sup> )	Rejeição (%)	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	Rejeição (%)
4 Bar	Rejeito	3,00±0,01	100	1,90±0,01	100	3380,25±201,99	99,5	721,70±26,93	100
	Permeado	ND		ND		15,92±8,70		ND	
5 Bar	Rejeito	3,40±0,00	100	2,10±0,00	100	3832,20±412,6	99,3	789,57±27,50	100
	Permeado	ND		ND		21,00±2,7		ND	
6 Bar	Rejeito	3,60±0,01	100	2,20±0,01	100	4265,00±589,04	99,3	830,59±76,57	100
	Permeado	ND		ND		20,58±2,56		ND	

\*Valores denotam a média ± desvio padrão de quatro repetições. ND: não detectado. Fonte: Autor, (2022).

Tabela 7: Análise estatística de condutividade elétrica, fluxo e fosfato para pressões para 400 kPa (4 bar), 500 kPa (5 bar) e 600 kPa (6 bar).

Pressão	Condutividade elétrica (μS.cm <sup>-1</sup> )	Fluxo (L.m <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> )	Fosfato (mg.L <sup>-1</sup> )
4 Bar	3380,25 <sup>a</sup> ±201,99	8,33 <sup>a</sup> ±0,62	721,70 <sup>a</sup> ±26,93
5 Bar	3832,75 <sup>ab</sup> ±412,6	9,00 <sup>a</sup> ±0,23	789,57 <sup>a</sup> ±27,50
6 Bar	4265,00 <sup>b</sup> ±589,04	10,33 <sup>b</sup> ±0,31	830,59 <sup>a</sup> ±76,57

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p<0,05). Fonte: Autor, (2022).

### 3.3.4 Recuperação das águas da diafiltração por osmose inversa

A caracterização dos permeados da diafiltração estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Caracterização dos permeados provenientes da purificação por diafiltração

	<b>Ficocianina</b> (mg.gcel <sup>-1</sup> )	<b>Aloficocianina</b> (mg.gcel <sup>-1</sup> )	<b>Condutividade</b> <b>elétrica (μS.cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Fosfato (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
Permeado 1 <sup>a</sup> DF	4,40±0,03	0,70±0,00	1800,75±152,7	335,67±25,60
Permeado 2 <sup>a</sup> DF	2,00±0,00	0,80±0,00	1105,68±123,73	177,51±14,73
Permeado 3 <sup>a</sup> DF	2,00±0,00	0,70±0,00	708,80±120,39	90,81±21,01
Mistura	2,20±0,00	0,10±0,00	1314,25±152,88	231,82±24,22

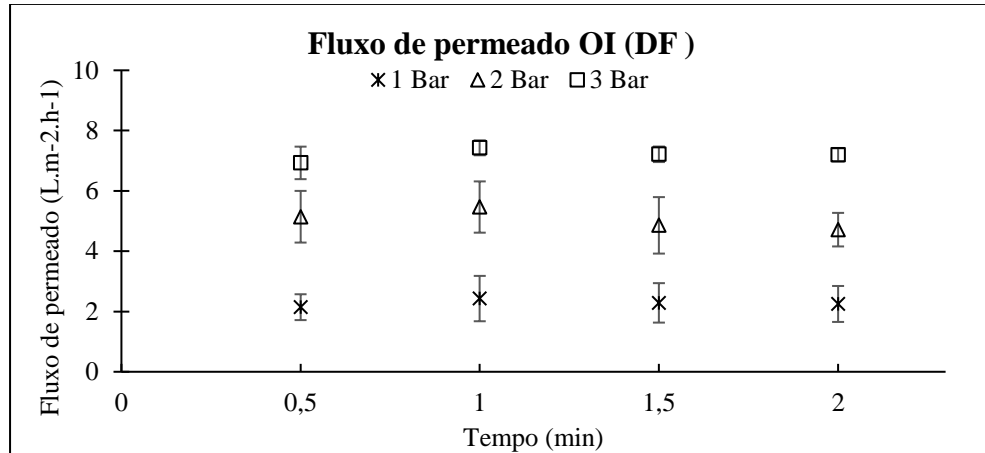
\*Valores denotam a média ± desvio padrão de quatro repetições. Fonte: Autor, (2022).

Da Tabela 8 é possível avaliar que a primeira água da diafiltração apresenta maior concentração de ficocianina e fosfato, tornando-se promissora para a reutilização em outras extrações. É possível observar uma relação entre a concentração de fosfato e a condutividade elétrica, onde os resultados apresentados mostram que quanto maior a condutividade, maior a concentração de fosfato. Entretanto, através do balanço hídrico que será apresentado no item 3.3.8 seria inviável recuperar por osmose inversa apenas o permeado proveniente da primeira diafiltração,

O efeito da pressão no fluxo permeado pode ser observado na Figura 12. Houve redução de 66,7%, 54% e 50% em relação ao fluxo inicial para as pressões de 1, 2 e 3 bar respectivamente devido ao fenômeno de *fouling*. Segundo Brião et al, (2020) a ocorrência do *fouling* promove resistência a filtração e reduz o fluxo de permeado, que por sua vez, afeta a taxa de filtração, a viabilidade comercial das membranas e sua vida útil de operação.



Figura 13: Fluxo de permeado de osmose inversa pra água proveniente da diafiltração da ficocianina à 20°C nas pressões de 100 kPa (1 bar), 200 kPa (2 bar) e 300 kPa (3 bar).



Fonte: Autor, (2022).

Através da Tabela 9 é possível identificar que os valores de condutividade elétrica, fosfato, ficocianina e aloficocianina são reduzidos na corrente de permeado. Enquanto na corrente de rejeito, ocorre a concentração de fosfato e ficocianina, fator chave para utilizar a corrente de rejeito em uma nova extração.

Devido as características morfológicas identificadas pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) da mesma membrana apresentada por Dalbosco et al., (2021) é possível observar um espaçamento entre os poros da membrana, sendo este superior ao esperado em membranas de osmose inversa. Este fato justifica o incremento de condutividade com o aumento da pressão utilizada, devido à ocorrência de transferência de massa por convecção.

A análise estatística, com fator resposta a condutividade, concentração de fosfato e fluxo são apresentadas na Tabela 10 e permite concluir através do teste de Tukey, que existe diferença significativa para o fator resposta fluxo, sendo que com a pressão de 3 bar é a que apresenta maior fluxo de permeado.

Tabela 9: Concentração dos rejeitos e permeados da osmose inversa à 100 kPa (1 bar), 200 kPa (2 bar) e 300 kPa (3 bar) de pressão, tratando as águas de diafiltração na purificação de ficocianina.

Pressão		Ficocianina		Aloficocianina		Condutividade elétrica		Fosfato	
		Concentração (mg.g <sub>cel</sub> <sup>-1</sup> )	Rejeição (%)	Concentração (mg.g <sub>cel</sub> <sup>-1</sup> )	Rejeição (%)	Condutividade (μS.cm <sup>-1</sup> )	Rejeição (%)	Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	Rejeição (%)
1 Bar	Rejeito	2,30±0,00	100	1,10±0,01	100	1341,25±233,19	99,50	223,41±4,00	100
	Permeado	N.D		ND		6,73±2,35		ND	
2 Bar	Rejeito	2,50±0,00	100	1,40±0,00	100	1422,25±235,03	99,10	246,70±22,08	100
	Permeado	ND		ND		11,77±2,01		ND	
3 Bar	Rejeito	2,50±0,00	100	1,30±0,00	100	1485,50±205,27	99,30	267,63±39,62	100
	Permeado	ND		ND		9,40±3,13		ND	

\*Valores denotam a média ± desvio padrão de quatro repetições. ND: não detectado. Fonte: Autor, (2022).

Tabela 10: Análise estatística de condutividade, fluxo e fosfato para pressões de 100 kPa (1 bar), 200 kPa (2 bar) e 300 kPa (3 bar).

Pressão	Condutividade elétrica (μS.cm <sup>-1</sup> )	Fluxo (L.m <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> )	Fosfato (mg.L <sup>-1</sup> )
1 Bar	1341,25 <sup>a</sup> ±233,19	2,00 <sup>a</sup> ±0,61	233,41 <sup>a</sup> ±4,00
2 Bar	1422,24 <sup>a</sup> ±235,03	5,00 <sup>b</sup> ±0,80	246,70 <sup>a</sup> ±22,08
3 Bar	1485,50 <sup>a</sup> ±205,27	7,00 <sup>c</sup> ±0,32	267,63 <sup>a</sup> ±39,62

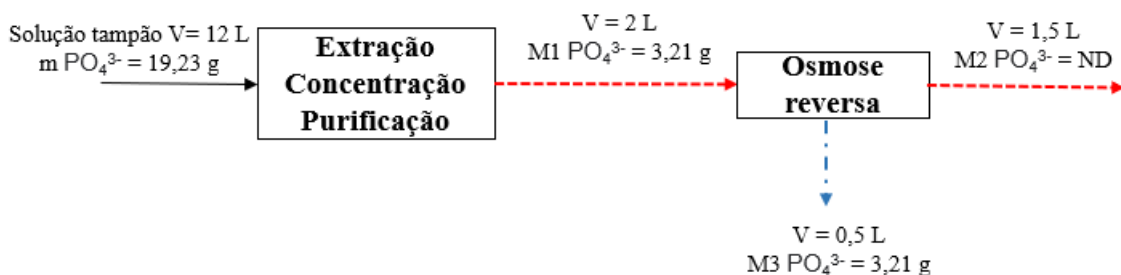
Resultados expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos (p<0,05). Fonte: Autor, (2022).

### 3.3.5 Balanço de massa de fosfato e ficocianina

O balanço de massa caracteriza os fluxos de massa e de vazão que ocorre durante processo. O balanço de massa global é uma aplicação do conceito da conservação da massa o qual, o processo de separação por membranas aplicado a um tanque, onde se adiciona uma descarga mássica M1 e retira-se M2 e M3. Os dados de balanço de massa em processos de separação por membranas são característicos pois permitem verificar a eficiência do tratamento nas condições adotadas e explica como os componentes estão sendo removidos e certifica que os resultados obtidos no equipamento descrevem teoricamente a ocorrência do fenômeno (RODRIGUES, 2018).

Para o balanço de massa do sistema de concentração de fosfato aplicado a este trabalho, conforme a Figura 14, primeiramente tem-se a solução tampão original com concentração de 19,23 g diluído em 12 L de permeado. Para a osmose reversa na condição de 5 bar e fator de concentração de 75%, foram alimentados 2 L a uma concentração de 3,21 g entrando no sistema (M1) e resultará em duas vazões de saída: permeado (M2) e rejeito (M3).

Figura 14: Balanço de massa de fosfato de ultrafiltração, diafiltração e recuperação via osmose inversa.

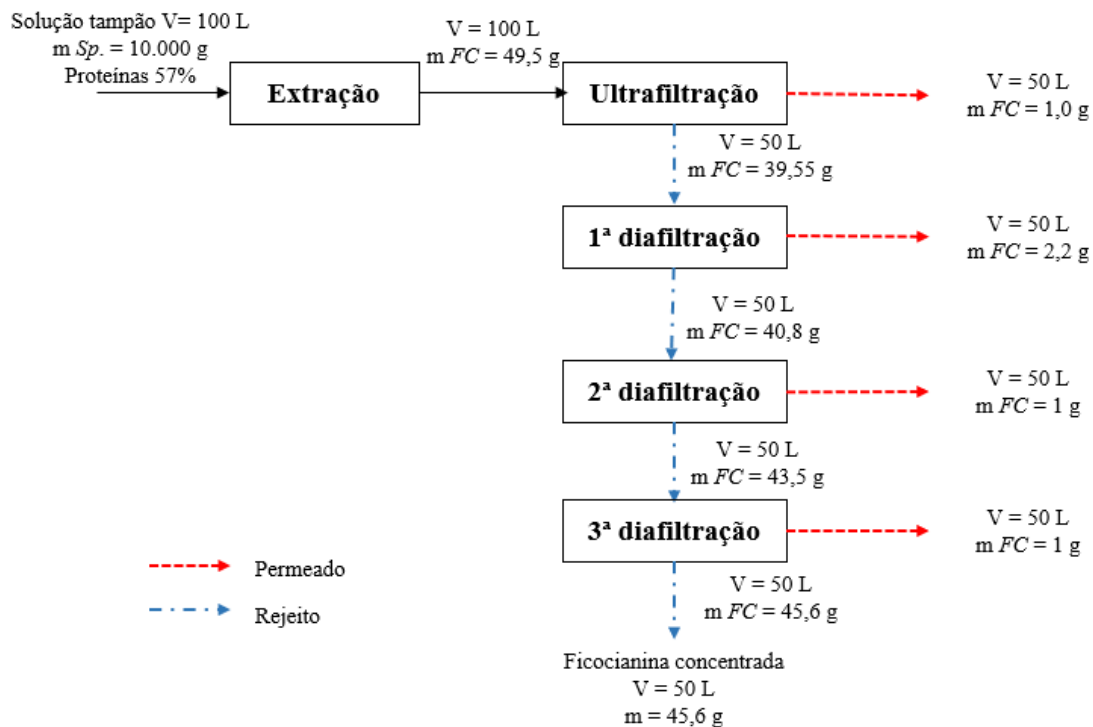


Fonte: Autor, (2022).

Quando esses permeados são alimentados na osmose inversa, o balanço de massa, permite visualizar que é possível recuperar os permeados provenientes da concentração e purificação da ficocianina com solução tampão fosfato e atingir sua concentração inicial, além de remover todos os compostos como ficocianina, aloficocianina e fosfato na corrente de permeado.

Na Figura 15 é apresentado o balanço de massa de ficocianina do experimento. Através das correntes de permeado, ocorre a perda de aproximadamente 5,2 g de ficocianina, que corresponde a mais de 11% da massa total extraída.

Figura 15: Balanço de massa de ficocianina da extração com uso de solução tampão, concentração por ultrafiltração e purificação com o uso de diafiltração.



Fonte: Autor, (2022)

### 3.3.6 Determinação do melhor fator de concentração e pressão de trabalho

Na Tabela 11 é apresentada a concentração de fosfato e os fluxos obtidos na osmose inversa e sua análise estatística através do teste de Tukey.

Verificamos que o fator de concentração é responsável por aumentar a concentração de fosfato e condutividade no rejeito.

Tabela 11: Médias de condutividade, fluxo e fosfato para pressões de 300 kPa (3 bar), 400 kPa (4 bar) e 500 kPa (5 bar) nas concentrações de rejeito de 50% e 75%.

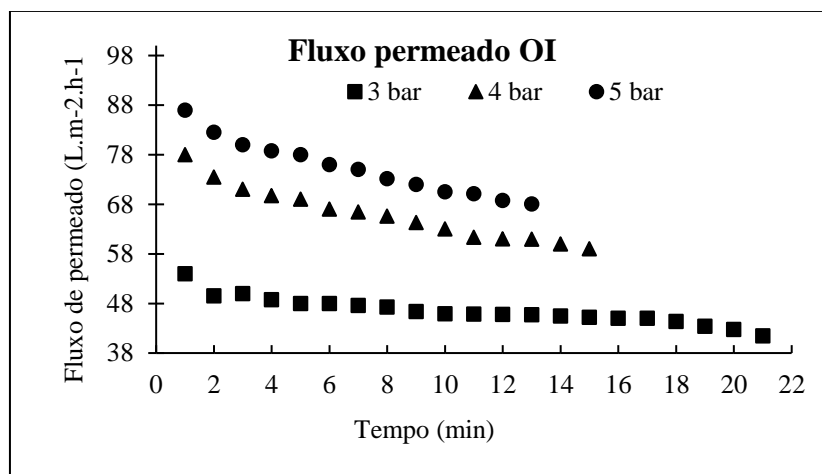
<b>Pressão</b>	<b>Concentração</b>	<b>Fosfato (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Condutividade (<math>\mu</math>S.cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Fluxo final (L/m<sup>2</sup>.h)</b>
3 bar	P 50%	ND	0,02 $\pm$ 0,35	45,40 <sup>a</sup> $\pm$ 1,25
	R 50%	1981,40 <sup>a</sup> $\pm$ 0,12	2650,00 $\pm$ 0,15	
	P 75%	ND	0,03 $\pm$ 0,46	41,40 <sup>a</sup> $\pm$ 1,52
	R 75%	2915,50 <sup>a</sup> $\pm$ 0,24	3510,00 $\pm$ 0,11	
4 bar	P 50%	ND	0,01 $\pm$ 0,21	63,00 <sup>a</sup> $\pm$ 1,95
	R 50%	2160,10 <sup>a</sup> $\pm$ 0,19	2780,00 $\pm$ 0,21	
	P 75%	ND	0,02 $\pm$ 0,27	59,00 <sup>a</sup> $\pm$ 1,45
	R 75%	3089,69 <sup>a</sup> $\pm$ 0,24	3720,00 $\pm$ 0,26	
5 bar	P 50%	ND	0,01 $\pm$ 1,12	72,00 <sup>a</sup> $\pm$ 1,89
	R 50%	2226,87 <sup>a</sup> $\pm$ 0,14	2730,00 $\pm$ 0,13	
	P 75%	ND	0,02 $\pm$ 0,53	68,10 <sup>a</sup> $\pm$ 1,47
	R 75%	3210,83 <sup>a</sup> $\pm$ 0,11	4230,00 $\pm$ 0,19	

Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). ND: não detectado. R: corrente de rejeito. P: corrente de permeado. Fonte: Autor, (2022).

A comparação de médias entre as concentrações de 50% e 75%, é possível verificar que não há diferença significativa entre os resultados. Sendo assim, devido ao melhor fluxo e concentração de fosfato, a seleção da pressão de 5 bar e concentração de 75% foi a condição fixada para gerar um rejeito com potencial de re-extração de ficocianina.

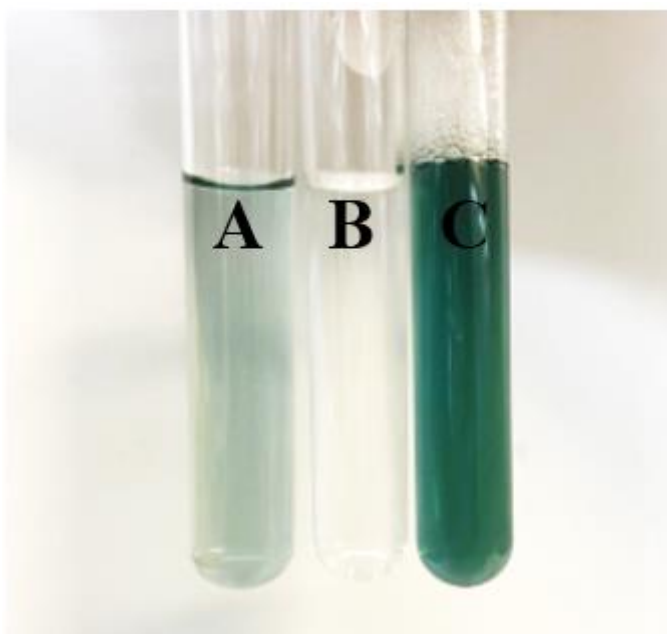
Na Figura 16 estão apresentados os fluxos de permeado durante os experimentos com a membrana de osmose inversa, avaliando a concentração da corrente de rejeito em 50% e 75%. É possível verificar uma redução de Na Figura 17 podemos observar a alimentação do sistema de osmose (A), o permeado (B) e o rejeito concentrado em 75% (C).

Figura 16: Fluxo de permeado durante a concentração de 50% e 75% nas pressões de 300 kPa (3 bar), 400 kPa (4 bar) e 500 kPa (500 bar).



Fonte: Autor, (2022).

Figura 17: Correntes de Alimentação (A), permeado (B) e rejeito concentrado 75% (C) da osmose reversa.



Fonte: Autor, (2022).

O volume de rejeito obtido por osmose reversa na condição de 5 bar e 75% de concentração, foi caracterizado e utilizado para uma nova extração como solvente de extração alternativo a uma nova solução tampão fosfato. Para essa etapa, não houve a adição de sais de fosfato ou outros compostos químicos.

### 3.3.7 Nova extração de ficocianina

Uma nova extração de ficocianina foi realizada, utilizando como solução tampão para extração o rejeito da osmose do item anterior. A Tabela 12 mostra os resultados obtidos.

Tabela 12: Concentrações de condutividade, ficocianina, aloficocianina e fosfato na re-extração

	<b>Condutividade</b> ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	<b>Ficocianina</b> ( $\text{mg}\cdot\text{g}_{\text{cel}}^{-1}$ )	<b>Pureza</b>	<b>Aloficocianina</b> ( $\text{mg}\cdot\text{g}_{\text{cel}}^{-1}$ )	<b>Fosfato</b> ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
Solução tampão	3060,00	-	-	-	3205,10
Ficocianina centrifugada	3950,00	54,53	0,40	35,38	5429,00
Ficocianina concentrada	3980,00	68,52	-	43,09	3875,90
Alimentação OI	1999,00	2,65	-	3,90	1766,90
Rejeito OI 5 bar 75%	4003,00	9,04	-	10,62	5620,10
Permeado	34,50	N.D	-	N.D	N.D
Ficocianina centrifugada (re-extração)	8460,00 $\pm$ 0,12	70,44 $\pm$ 0,65	0,54	24,56 $\pm$ 0,76	9297,5 $\pm$ 457,4

Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. ND: não detectado. Fonte: Autor, (2022).

Os resultados apresentados permitem inferir que houve a concentração de ficocianina e aloficocianina de maneira bem expressiva. As análises de permeado não apresentaram concentração de ficocianina, aloficocianina e fosfato, apresentando características similares a água ultra pura, podendo ser utilizado em novos processos. Na Figura 18 é possível verificar que na segunda extração, a percepção visual e a concentração de ficocianina é superior em relação a primeira extração.

Figura 18: Comparação visual entre a primeira extração e segunda extração utilizando o rejeito da osmose reversa.



Fonte: Autor, (2022).

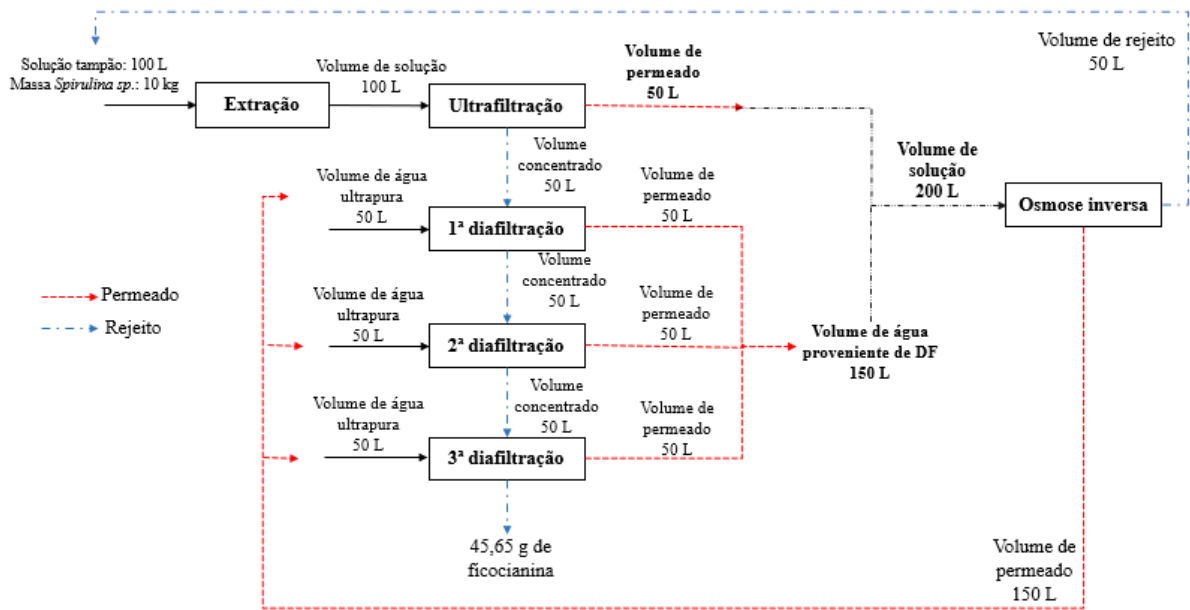
Em relação a solução tampão de origem, inserida na etapa 1 do experimento, apresentou um aumento na concentração de fosfato de 75%. Esse aumento é em decorrência do material intracelular que solubilizado e passa ser incrementado na solução tampão. Também é possível verificar que houve um aumento de 35% na concentração de ficocianina após a centrifugação, passando de  $54,53 \text{ mg.gcel}^{-1}$  para  $70,44 \text{ mg.gcel}^{-1}$ . O aumento da pureza também pode ser observado devido ao aumento de ficocianina e redução de aloficocianina, passando de 0,40 para 0,54.

### 3.3.8 Balanço hídrico

Partindo do balanço hídrico do processo, apresentado na Figura 19 com base de cálculo de 10 kg de *Spirulina sp.*, o rendimento é de 45,6 g de ficocianina. É possível verificar que a etapa de diafiltração é que apresenta maior impacto hídrico nas biorrefinarias, correspondendo à 3 vezes de água em relação ao volume que se deseja purificar.



Figura 19: Balanço hídrico do processo de extração e purificação de ficocianina.



Fonte: Autor, (2022).

Com a inserção da osmose inversa em uma biorefinaria teórica, todo o volume de rejeito pode ser reutilizado para uma nova extração, e o volume de permeado utilizado em 100% da diafiltração, sendo necessário inserir apenas 50% do volume de solução tampão fosfato para uma nova extração. Quando considerado o volume total de extração de ficocianina, é possível reduzir em 80% o volume de água pura necessário, além de evitar perdas do pigmento no processo e consequentemente reduzindo os custos e promovendo a sustentabilidade do processo.

### 3.4 CONCLUSÃO

A ultrafiltração seguida por diafiltração permitiu obter ficocianina de grau inferior ao grau alimentar. Apesar da ocorrência do *fouling* no decorrer da filtração, a diafiltração promoveu a recuperação de 40% do fluxo de permeado, devido a diluição dos sólidos presentes no retido, reduzindo a polarização por concentração. O uso de membrana de osmose inversa é eficiente na retenção de sais de fosfato, ficocianina e aloficocianina, e o permeado com características de água ultrapura. A condição de 5 bar e concentração de 75% para a osmose inversa, permite um rejeito com características de tampão fosfato. Quando realizada uma nova extração utilizando o rejeito da osmose como solvente, a concentração de ficocianina foi

superior quando comparada a solução inicial, passando de  $54,53 \text{ mg.gcel}^{-1}$  para  $70,44 \text{ mg.gcel}^{-1}$ . Além de evitar perdas de ficocianina, o processo proposto permite reduzir em 80% o consumo de água em uma biorrefinaria.

## 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A composição da *Spirulina sp* apresenta 57,93%  $\pm$ 2,38 de proteínas, uma característica determinante para o rendimento de ficocianina. A extração por tampão fosfato, apresentou concentração de ficocianina de 49,50 $\pm$ 0,06 mg.gcel<sup>-1</sup>. A concentração por ultrafiltração e purificação via diafiltração, permite atingir concentração de ficocianina de 91,30 $\pm$ 0,09 mg.gcel<sup>-1</sup> e uma pureza de 0,46. O grau de pureza obtido é inferior ao grau alimentar, o que é compreendido pela estrutura complexa da biomassa de *Spirulina sp*, a qual apresenta resistência para uma extração eficiente. A diafiltração se mostrou eficiente para a purificação de compostos e promoveu a recuperação de 40% do fluxo de permeado, devido a diluição dos sólidos presentes no retido, reduzindo a polarização por concentração.

Através da caracterização dos permeados, é possível identificar a perda de ficocianina e a concentração de fosfato e ficocianina passou a ser menos concentrada no decorrer das etapas. Através do balanço hídrico é possível concluir que todos os permeados são promissores e viáveis de reutilização em uma nova extração. Além do permeado, todo o rejeito do processo de osmose inversa pode ser inserido novamente no processo, promovendo 100% de reuso.

É possível comprovar que a osmose inversa é eficiente para a retenção de sais de fosfato, ficocianina e aloficocianina no rejeito e redução significativa de condutividade do permeado. Com isso, é possível concluir que o processo de separação por membrana com o uso de osmose inversa, permite recuperar as características iniciais da solução tampão utilizada na extração da ficocianina. O rejeito utilizado em uma nova extração, apresentou concentração de fosfato superior ao solvente inicial utilizado no processo e promoveu um aumento de extração de ficocianina, passando de 54,53 mg.gcel<sup>-1</sup> para 70,44 mg.gcel<sup>-1</sup>. Com o método proposto é possível reduzir em 80% do consumo de água em uma biorrefinaria de extração de ficocianina.

## 5 REFERÊNCIAS

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

ABO, B. O. et al. Microalgae to biofuels production: A review on cultivation, application and renewable energy. **Reviews on Environmental Health**, v. 34, n. 1, p. 91–99, 2019.

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.

AL HINAI, M. et al. Protein extraction from spirulina platensis. **International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering**, v. 8, n. 12, p. 1524–1530, 2019.

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. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 1, p. 1–11, 2015.

APHA, **Standard Methods for Examination of Water and Wastewater**. 21 ed. Washington: American Public Health Association, 2005. 1200p.

BABU, B. R.; RASTOGI, N. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Mass transfer in osmotic membrane distillation of phycocyanin colorant and sweet-lime juice. **Journal of Membrane Science**, v. 272, n. 1–2, p. 58–69, 2006.

BAGHEL, R. S.; TRIVEDI, N.; REDDY, C. R. K. A simple process for recovery of a stream of products from marine macroalgal biomass. **Bioresource Technology**, v. 203, p. 160–165, 2016.

BALTI, R. et al. Fractionation of *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) water soluble proteins by membrane diafiltration. **Separation and Purification Technology**, v. 256, n. September 2020, 2021.

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

BORBA, V. A.; FERREIRA CAMARGO, L. S. *Biotecnologia e Aplicações*. 2003.

BRASIL, B. S. A. F; GARCIA, L. C. Microalgas: alternativas promissoras para a indústria. **Agroenergia em revista**, n. 10, p 6-11, 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA). Instrução Normativa IN nº 28 de 26 de julho de 2018. **Diário Oficial da União**, 26 de julho de 2018.

- BRIÃO, V. B.; TAVARES, C. R. G. Ultrafiltração de efluente de indústria de laticínios para recuperação de nutrientes: efeito da pressão e da velocidade tangencial. *Nota Científica. Brazilian Journal of Food Technology*, v. 15, p. 352-362, 2012.
- BRIÃO, V. B. et al. Cake formation and the decreased performance of whey ultrafiltration. *Acta Scientiarum. Technology*, v. 39, n. 5, p. 517, 2017.
- BRIÃO, V. B. et al. Is downstream ultrafiltration enough for production of food-grade phycocyanin from *Arthrospira platensis*? *Journal of Applied Phycology*, 2020.
- CADORE, J. S. et al. Bibliometric approach to the perspectives and challenges of membrane separation processes to remove emerging contaminants from water. *Water Science and Technology*, v. 82, n. 9, p. 1721–1741, 2020.
- CAETANO, R. K. M. **Estudo da Extração e Purificação de Ficocianina e Aloficocianina da Bio massa de *Arthrospira platensis***. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós Graduação em Engenharia Química), Universidade Federal de Goiás, Goiania/GO, 2018.
- CASTRO-MUÑOZ, R. et al. Membrane technologies assisting plant-based and agro-food by-products processing: A comprehensive review. *Trends in Food Science and Technology*, v. 95, p. 219–232, 2020.
- CHAIKLAHAN, R. et al. Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp. using a membrane process. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 14, p. 7159–7164, 2011.
- CHAIKLAHAN, R. et al. Stepwise extraction of high-value chemicals from *Arthrospira* (*Spirulina*) and an economic feasibility study. *Biotechnology Reports*, v. 20, p. e00280, 2018.
- CHINNAWORNRUNGSEE, R.; MALAKUL, P.; MUNGCHAROEN, T. Life cycle energy and environmental analysis study of a model biorefinery in Thailand. *Chemical Engineering Transactions*, v. 32, p. 439–444, 2013.
- CLARKE, K. G. Downstream processing. In: **Bioprocess Engineering**. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 209–234.
- COLLA, L. M.; FURLONG, E. B.; COSTA, J. A. V. Antioxidant properties of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 50, n. 1, p. 161–167, 2007.
- CORREIA, R.T., MCCUE, P., MAGALHÃES, M.M., MACÊDO, G.R., SHETTY, K. Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple waste mixed with soy flour using *Rhizopus oligosporus*. *Process Biochem.* 39 (12), 2167–2172. 2004
- CZUBA, K. et al. Towards the circular economy — A pilot-scale membrane technology for the recovery of water and nutrients from secondary effluent. *Science of the Total Environment*, v. 791, p.1-11, 2021.
- DA S UEBEL, L. et al. Industrial plant for production of *spirulina* sp. LEB 18. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 36, n. 1, p. 51–63, 2019.

DA SILVA FIGUEIRA, F.; MORAES, C. C.; KALIL, S. J. C-phycoyanin purification: Multiple processes for different applications. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, n. 3, p. 1117–1128, 2018.

DALBOSCO, T. et al. Diffusion of fluoxetine through a reverse osmosis membrane. **Desalination and Water Treatment**, v. 212, p. 267–275, 2021.

DE MORAIS, M. G. et al. Phycocyanin from microalgae: Properties, extraction and purification, with some recent applications. **Industrial Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 30–37, 2018.

DEPRÁ, M. C. et al. Microalgal Biorefineries for Bioenergy Production: Can We Move from Concept to Industrial Reality? **Bioenergy Research**, v. 11, n. 4, p. 727–747, 2018.

DERNER, R. B. et al. Microalgae, products and applications. **Ciencia Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006.

DJAMAI, W. et al. Membrane-assisted biorefinery of microalgae to obtain enriched fractions of bioderived molecules. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 13, n. 4, p. 878–888, 2019.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method of determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

FERNÁNDEZ-ROJAS, B.; HERNÁNDEZ-JUÁREZ, J.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Nutraceutical properties of phycocyanin. **Journal of Functional Foods**, v. 11, n. C, p. 375–392, 2014.

GAMBA et al. Brazilian Journal of Animal and Environmental Research Brazilian Journal of Animal and Environmental Research. p. 168–178, 2020.

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.

GOH, P. S. et al. Membrane fouling in desalination and its mitigation strategies. **Desalination**, v. 425, n. October 2017, p. 130–155, 2018.

GROSSI, L. B. et al. Water conservation in mining industry by integrating pressure-oriented membrane processes for nitrogen-contaminated wastewater treatment: Bench and pilot-scale studies. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 1, 2021.

GUAN, S. Liquefaction of Its Residues To Produce Bio-Crude Oil. 2016.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processos de separação por membranas**. E- papers. Ex 4, 180 p. Rio de Janeiro, 2006.

HSIEH-LO, M. et al. Phycocyanin and phycoerythrin: Strategies to improve production yield and chemical stability. **Algal Research**, v 42, n. June, 2019.

HUBE, S. Direct membrane filtration for wastewater treatment and resource recovery: A

review. **Science of The Total Environment**, v 710, March, 2020.

İLTER, I. et al. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 70, n. April, p. 78–88, 2018.

IZADI, M.; FAZILATI, M. Extraction and purification of phycocyanin from *spirulina platensis* and evaluating its antioxidant and anti-inflammatory activity. **Asian Journal of Green Chemistry**, v. 2, n. Issue 4. pp. 281-394, p. 364–379, 2018.

JAESCHKE, D. P. et al. Extraction of valuable compounds from *Arthrospira platensis* using pulsed electric field treatment. **Bioresource Technology**, v. 283, n. March, p. 207–212, 2019.

JIANG, L. et al. Phycocyanin: A potential drug for cancer treatment. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 17, p. 3416–3429, 2017.

JULIANTI, E. et al. Optimization of extraction method and characterization of phycocyanin pigment from *spirulina platensis*. **Journal of Mathematical and Fundamental Sciences**, v. 51, n. 2, p. 168–176, 2019.

KARTHICK RAJA NAMASIVAYAM, S.; SHIVARAMAKRISHNAN, K.; ARVIND BHARANI, R. S. Potential antioxidative protein-pigment complex *spirulina platensis* mediated food grade phycocyanin C-extraction, purification, antioxidative activity and biocompatibility. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 56, n. 3, p. 230–239, 2019.

LAUCERI, R. et al. Purification of phycocyanin from *Arthrospira platensis* by hydrophobic interaction membrane chromatography. **Algal Research**, v. 35, n. September, p. 333–340, 2018.

LEVASSEUR, W.; PERRÉ, P.; POZZOBON, V. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. **Biotechnology Advances**, v. 41, n. March, p. 107545, 2020.

LI, Y. et al. Extraction of phycocyanin—A natural blue colorant from dried *spirulina* biomass: Influence of processing parameters and extraction techniques. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 3, p. 727–735, 2020.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v 193, p. 265-276, 1951.

LUPATINI, A. L. Extração de proteínas e carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis* e caracterização da fração proteica. p. 118, 2016.

MENEGOTTO, A. L. L. et al. Thermic and techno-functional properties of *Arthrospira platensis* protein fractions obtained by membrane separation process. **Journal of Applied Phycology**, 2020.

MOSSMANN, J. **Tratamento de água para reúso no beneficiamento de soro de leite**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo/RS, 2018.

MULDER, Marcel. **Basic Principles of Membrane Technology**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. May 1996.

MUTANDA, T., et al. Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 57-70, 2011.

NOGUEIRA JUNIOR, E. et al. Development of life cycle water footprints for the production of fuels and chemicals from algae biomass. **Water Research**, v. 140, p. 311–322, 2018.

PAN-UTAI, W.; IAMTHAM, S. Extraction, purification and antioxidant activity of phycobiliprotein from *Arthrospira platensis*. **Process Biochemistry**, v. 82, n. March, p. 189–198, 2019a.

PAN-UTAI, W.; IAMTHAM, S. Physical extraction and extrusion entrapment of C-phycocyanin from *Arthrospira platensis*. **Journal of King Saud University - Science**, v. 31, n. 4, p. 1535–1542, 2019b.

PETRINIC, I.; KORENAK, J.; POVODNIK, D.; HELIX-NIELSEN, C. A feasibility study of ultrafiltration/reverse osmosis (UF/RO)-based wastewater treatment and reuse in the metal finishing industry. **Journal of Cleaner Production**, v. 101, p. 292-300, 2015.

PRABAKARAN, G. et al. Extraction and characterization of phycocyanin from *Spirulina platensis* and evaluation of its anticancer, antidiabetic and antiinflammatory effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 153, p. 256–263, 2020.

QASIM, M. et al. Reverse osmosis desalination: A state-of-the-art review. **Desalination**, v. 459, n. February, p. 59–104, 2019.

RODRIGUES, A. C. M. Balanço de massa de um sistema de ultrafiltração e osmose reversa para dessalinização de água salobra. Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária e Ambiental), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa/PR, 2018.

SANTOS, L. F. DOS et al. Clarification and concentration of yerba mate extract by membrane technology to increase shelf life. **Food and Bioproducts Processing**, v. 122, p. 22–30, 2020

SBEGHEN, A. **Processo de separação por membranas na purificação de ficocianina de *Spirulina sp.*** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo/RS, 2017.

SOSTER, A. M. **Recuperação de sais do efluente de cultivo de microalga por osmose inversa para reúso *in loco*.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental), Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo/RS, 2018.

TAUFIQURRAHMI, N. et al. Phycocyanin extraction in *Spirulina* produced using agricultural waste. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 206, n. 1, 2017.

TAVANANDI, H. A. et al. Simple and efficient method for extraction of C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*. **Algal Research**, v. 31, n. February, p. 239–251, 2018.



VISKARI, P. J.; COLYER, C. L. Separation and quantitation of phycobiliproteins using phytic acid in capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 972, n. 2, p. 269–276, 2002.

WAN, Y.; GHOSH, R.; CUI, Z. Fractionation of proteins using ultrafiltration: Developments and challenges. **Developments in Chemical Engineering and Mineral Processing**, v. 13, n. 1–2, p. 121–136, 2005.

WANG, F. et al. Water footprint sustainability assessment for the chemical sector at the regional level. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 142, n. November 2018, p. 69–77, 2019.

YAN, M. et al. Preparation of phycocyanin microcapsules and its properties. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, n. 1, p. 89–97, 2014.

YU, P. et al. Purification and bioactivities of phycocyanin. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 18, p. 3840–3849, 2017.

ZHANG, T. C. et al. **M Embrane T Echnology and E Nvironmental**. [s.l: s.n.].

ZHU, L. D. et al. Algal biorefinery for sustainable development and the challenges. **Proceedings of Institution of Civil Engineers: Energy**, v. 169, n. 4, p. 179–186, 2016.



## **ANEXO I – Determinação de proteína**

A determinação de proteínas da biomassa seguirá a metodologia descrita por Lowry et al, (1951). O princípio do método consiste na redução dos constituintes ativos do reagente de folin-ciocalteau de alguns aminoácidos na presença de cobre (II) produzindo uma absorção máximo de 750 nm.

Inicialmente, uma curva padrão com solução padrão de albumina.

1º) 0,5 mL da amostra + 0,5 mL de NaOH 1N em um banho termostaticado a 100°C durante 5 min.

2º) Resfriar durante 10 min em banho de água fria.

3º) Adicionar 2,5 mL de solução de tártaro de sódio e potássio em conjunto com sulfato de cobre.

4º) Agitar a amostra com auxílio do vortex e aguarda durante 10 minutos.

5º) Adicionar 0,5 mL do reagente folin-ciocalteau diluído em água (1:1).

6º) Homogeneizar a amostra e manter no escuro durante 30 minutos.

7º) Realizar a leitura em espectrofotômetro a 750 nm.

## ANEXO II – Determinação de carboidratos

A determinação de carboidratos da biomassa seguirá a metodologia descrita por Dubois et al, (1956).

Inicialmente, uma curva padrão com solução padrão de glicose entre  $4 \mu\text{g.L}^{-1}$  e  $140 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

1º) Adicionar 1 mL da solução de biomassa devidamente diluída e 1 mL de solução de fenol 5% conservada em frasco escuro e sob refrigeração.

2º) Homogeneizar em agitador de tubos e após adicionar 5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

3º) Aguarda 10 minutos para que ocorra a reação e colocar o tubo em um banho de água fria durante 20 min.

4º) Realizar a leitura em espectrofotômetro a 488 nm do branco e das amostras.

### ANEXO III – Solução tampão fosfato

Reagente A - Solução de fosfato de sódio monobásico (0,2M): 27,5 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ou 31,2 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  em 1000 mL.

Reagente B - Solução de fosfato de sódio bibásico (0,2M): 53,65 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ou 71,7 g  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  em 1000 mL.

Para determinar a relação de volumes das soluções A e B pelo pH necessário, seguir a seguinte equação:

X mL de A + Y mL de B diluído em 1000 mL

Solução A	Solução B	pH
93,5	6,5	5,7
92,0	8,0	5,8
90,0	10,0	5,9
87,7	12,3	6,0
85,0	15,0	6,1
81,5	18,5	6,2
77,5	22,5	6,3
73,5	26,5	6,4
68,5	32,5	6,5
62,5	37,5	6,6
56,5	43,5	6,7
51,0	49,0	6,8
45,0	55,0	6,9
39,0	61,0	7,0
33,0	67,0	7,1
28,0	72,0	7,2

## ANEXO IV – Determinação de fosfato pelo método colorimétrico por ácido vanadomolibdofosfórico

O princípio do método consiste na combinação dos ortofosfatos com o chamado reagente combinado (solução de molibdato de amônio e metavanadato de amônio) e através da reação de formação do ácido fosfomolibdico, gerando um complexo amarelo, que tem absorvância a 470 nm.

A reação de formação do ácido fosfomolibdico é:



Em meio com excesso de  $\text{H}^+$ :  $\text{H}_3[\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_{12}]$

Para determinação da concentração de fosfato, deve-se deixar em solução ácida a vidraria para reduzir a interferência de detergentes ou outros contaminantes.

Procedimento: adicionar 35 mL ou menos de amostra contendo 0,05 – 1,0 mg P em um balão volumétrico de 50 mL. Adicionar 10 mL do reagente molibdato-vanadato e diluir o volume até a marca com água destilada. Aguardar no mínimo 10 minutos e realizar a leitura em absorvância da amostra, menos o valor do branco entre 400 – 470 nm dependendo da concentração da amostra.

A cor é estável por dias e sua coloração não é influenciada pela temperatura.

Reagente molibdato-vanadato:

Solução A: dissolveram-se 25 g de molibdato de amônio em 300 mL de água deionizada  $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ ;

Solução B: dissolveram-se 1,25 g de metavanadato de amônio ( $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ) em água deionizada por aquecimento até fervura por aproximadamente 10 min. Após o resfriamento, adicionaram-se 330 mL de HCL conc. Uma vez que a solução B novamente esfriou a temperatura ambiente adicionou-se a solução A em B, agitando-se com cuidado e, em seguida, diluiu-se a solução para BV (1000,0 mL).

Solução padrão de fosfato: dissolveram-se em água deionizada 219,5 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anidro para BV (1000,0 mL). A relação estequiométrica a ser obedecida foi que: cada 1,00 mL de solução equivaleria a 50,0  $\mu\text{g}$  de  $\text{PO}_4^{3-}\text{P}$ .

Cálculo da concentração:

$$\text{Mg P/L} = \frac{\text{mg P} \times 1000}{\text{mL amostra}}$$

## APÊNDICE A - Fluxo de permeado

