



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

**PURIFICAÇÃO DE C-FICOCIANINA E SUA INCORPORAÇÃO EM NANOFIBRAS**  
**FELIPE DA SILVA FIGUEIRA**

PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> SUSANA JULIANO KALIL

Orientadora

PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> CAROLINE COSTA MORAES

Co-orientadora

RIO GRANDE, RS

2014

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

**PURIFICAÇÃO DE C-FICOCIANINA E SUA INCORPORAÇÃO EM NANOFIBRAS**  
**FELIPE DA SILVA FIGUEIRA**

Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
doutor em Engenharia e Ciência de  
Alimentos

PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> SUSANA JULIANO KALIL

Orientadora

PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> CAROLINE COSTA MORAES

Co-orientadora

RIO GRANDE, RS

2014

F475p	<p>Figueira, Felipe da Silva  Purificação de C-ficocianina e sua incorporação em nanofibras/ Felipe da Silva Figueira. . 2014.  141 f.</p> <p>Tese (Doutorado) . Universidade Federal do Rio Grande . Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos.</p> <p>Orientadora: Dr<sup>a</sup> Susana Juliano Kalil.  Co-orientadora: Dr<sup>a</sup> Caroline Costa Moraes.</p> <p>1. Engenharia e Ciência de alimentos 2. C-ficocianina  3. Purificação 4. Isotermas 5. Design de processo  6. Nanofibras 7. Electrospinning. I. Kalil, Susana Juliano.  II. Moraes, Caroline Costa. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 664</p>
-------	--

*Dedico este trabalho a minha esposa Elida, amor da minha vida, minha inspiração, sempre presente, fiel e companheira, que me motiva a querer ser uma pessoa cada vez melhor, tornando o caminho até aqui melhor do que jamais poderia ser, e caminhando comigo para o futuro com o qual sonhamos todos os dias  
Sempre para sempre...*



## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Susana Juliano Kalil, pela sua orientação, atenção, disponibilidade, apoio, incentivo, dedicação, grande amizade e ensinamentos muito mais além do que profissionais e foram fundamentais para realização deste trabalho.

À minha mãe Dionéia, por ter criado a mim e meus irmãos com amor e carinho e ter nos ensinado a ter caráter, ser dignos e bons com os outros.

À minha família, aos meus irmãos Fábio, Marcos e Mauro, ao meus tios Hélio e Edi pelo apoio incondicional, pelo incentivo, pelo orgulho, por estarem sempre presentes e sempre acreditarem no meu potencial.

Aos meus sogros Geine e Laurio, minha nova família, que me dão carinho e torcem por mim e me incentivam que tudo vai dar certo.

À minha co-orientadora e amiga Caroline Moraes, sempre disposta a ajuda da melhor maneira possível não só neste trabalho mas na vida.

Aos membros da banca, professores Helen Treichel, Adriano Silva e Michele Andrade Zimmermann de Souza pelas suas valorosas contribuições.

À Ana Sanzo, nossa segunda mãe, sempre disposta a ajudar, aconselhar e incentivar quando preciso.

À Universidade Federal do Rio Grande, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos pela oportunidade para desenvolver esta tese.

Aos meus orientados Jéssica Duarte, Fabricio, Jéssica Silveira e Juliana, por toda disposição e profissionalismo e contribuição essenciais para a realização deste trabalho.

Aos amigos Adriano, William, Francisco, Carolina e Sandriane, juntos desde sempre nesta vida de pós-graduação e compartilhando bons momentos fora dela

Aos meus grandes amigos André, Victor, Sergio e Saulo, com os quais sempre pude contar desde a infância e que sempre acreditaram, incentivaram e se orgulharam de mim.

Aos grandes amigos, Fernanda, Muriel, André, Alexandra, Thiago, Fábio e Thais que mesmo sem manter contato, me apoiam e incentivam.

À minha amiga Andréia, que mesmo longe, contribuiu da melhor maneira para me ajudar.

À professora Michele Moraes, que muito auxiliou e contribuiu para este trabalho.

À professora Myriam Salas-Mellado, que me acolheu no início do caminho da pós-graduação.

Aos companheiros Joana, Juliana, Luisa, Anna Rafaela, Daiane, Ailton, Deborah pelo auxílio com dicas, opiniões e contribuições diretas, além das risadas e bom astral no laboratório.

Aos meus orientados de TCC, Gabi, Sibebe e Fabricio, que com seu bom humor e questionamentos contribuíram muito para minha formação.

Aos professores Ednei Primel e Jorge Costa, pela ajuda e disponibilidade.

Às técnicas Elisane e Sabine, pelo auxílio e boas conversas.

Aos laboratórios de Engenharia de Bioprocessos, Engenharia Bioquímica e Análise de Alimentos por disponibilizar equipamentos e materiais fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Secretaria da Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos pela colaboração e simpatia.

À REDE NANOFOTBIOTEC/CAPES, ao CNPq e a FAPERGS pelo apoio financeiro.



*Que homem é um homem que não faz do mundo um lugar melhor?*



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

Tabela 1 - Características dos processos de separação por membranas em termos de dimensões de poros e força motriz..... 21

### CAPÍTULO III

#### ARTIGO 1

Tabela 1 - Coeficientes de partição da adsorção de C-ficocianina em resina Streamline® DEAE, em diferentes temperaturas, com erro médio ..... 46

Tabela 2- Comparação entre os parâmetros das isotermas de Langmuir, Freundlich e Langmuir-Freundlich para a adsorção de C-ficocianina em resina Streamline® DEAE ..... 49

#### ARTIGO 2

Tabela 1 - Níveis das variáveis independentes utilizadas no delineamento experimental para ultrafiltração de C-FC ..... 61

Tabela 2 - Matriz do planejamento fracionário com os valores codificados e reais e os dados de fator de purificação e recuperação da C-FC ..... 66

Tabela 3 - Valores de fluxo médio ( $L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$ ) para todos os ciclos dos ensaios do delineamento experimental de ultrafiltração de C-FC ..... 69

Tabela 4 - Valores dos fluxos médios dos ensaios de ultrafiltração com variação do número de ciclos de recarga de tampão..... 72

#### ARTIGO 3

Tabela 1 - Diferentes tempos aplicados para precipitação da C-ficocianina com sulfato de amônio e fator de purificação e recuperação obtidos..... 88

Tabela 2 - Avaliação da pureza, fator de purificação e recuperação em cada processo de purificação de C-ficocianina estudado ..... 89

#### ARTIGO 4

Tabela 1 - Concentrações de óxido de polietileno e cloreto de sódio e a condutividade das soluções utilizadas na elaboração das nanofibras contendo 3% de C-ficocianina. .... 106



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

- Figura 1- Comparação esquemática entre Filtração Convencional (Filtração frontal) e a Filtração em Escoamento Tangencial ..... 22
- Figura 2 ó Montagem esquemática de um sistema de *electrospinning*..... 29

### CAPÍTULO III

#### ARTIGO 1

- Figura 1 - Cinética de adsorção de C-ficocianina em resina de troca iônica DEAE a diferentes valores de concentração inicial..... 44
- Figura 2 - Comportamento (com erro médio) do coeficiente de partição (f) para a adsorção de C-ficocianina em resina de troca iônica Streamline<sup>®</sup> DEAE em diferentes valores de pH ..... 45
- Figura 3 - Isotermas de adsorção de C-ficocianina em resina Streamline<sup>®</sup> DEAE conforme equação de (a) Langmuir, (b) Freundlich e (c) Langmuir-Freundlich ..... 48

#### ARTIGO 2

- Figura 1 - Célula de ultrafiltração utilizada na concentração e purificação da C-ficocianina . 60
- Figura 2 - Fator de purificação e recuperação de C-ficocianina expressos como valores médios com erro padrão para as membranas de 50 kDa (sem uso e regenerada) e 100 kDa (sem uso) ..... 64
- Figura 3 - Fluxo de permeado utilizando as membranas de 50 kDa (sem uso e regenerada) e 100 kDa ..... 65
- Figura 4 - Diagrama de Pareto para análise dos efeitos referentes ao fator de purificação de C-ficocianina ..... 67
- Figura 5 - Diagrama de Pareto para análise dos efeitos referentes à recuperação de C-ficocianina ..... 68
- Figura 6 - Valores de fator de purificação e recuperação da C-ficocianina com a aplicação de diferentes ciclos de recarga de tampão..... 70

#### ARTIGO 3

- Figura 1:- Diagrama esquemático dos processos estudados (1, 2, 3 e 4) para purificação da C-ficocianina utilizando diferentes etapas ..... 84
- Figura 2 - Cromatograma da purificação de C-ficocianina em leito expandido com resina Streamline DEAE..... 91
- Figura 3 - Cromatograma da purificação de C-ficocianina em leito fixo com resina Q Sepharose Fast Flow<sup>®</sup> . ..... 94

#### ARTIGO 4

- Figura 1 - Equipamento de *electrospinning* com sistema de injeção (a), placa coletora (b) e fonte de alta voltagem (c)..... 104
- Figura 2 - Capilar (a) e coletor (b) do sistema de *electrospinning* ..... 105
- Figura 3 - Nanofibras obtidas a partir do processo de *electrospinning*. ..... 108

Figura 4 - Diâmetro médio (com erro médio) das nanofibras obtidas.....	110
Figura 5 - Análise termogravimétrica da C-ficocianina, do PEO e das nanofibras obtidas...	111

## SUMÁRIO

CAPÍTULO I .....	1
RESUMO .....	2
ABSTRACT .....	4
1 INTRODUÇÃO .....	6
1.1 Objetivos .....	8
1.1.1 Objetivo geral .....	8
1.1.2 Objetivos específicos .....	8
CAPÍTULO II.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	12
2.1 Ficobiliproteínas .....	12
2.2 C-ficocianina .....	12
2.3 Recuperação e purificação de proteínas.....	14
2.4 Cromatografia de troca iônica .....	15
2.5 Cromatografia em leito expandido .....	17
2.6 Isotermas de adsorção .....	18
2.7 Separação por membranas.....	19
2.8 Ultrafiltração.....	22
2.9 Purificação de C-ficocianina .....	24
2.10 Nanotecnologia .....	25
2.11 Nanofibras.....	26
CAPÍTULO III.....	33
ARTIGO 1 .....	35
CINÉTICAS E ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE C-FICOCIANINA EM RESINA DE ADSORÇÃO POR TROCA IÔNICA DEAE .....	37
RESUMO .....	37
1 INTRODUÇÃO .....	38
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	39
2.1 Obtenção da biomassa, extração e quantificação da C-ficocianina .....	39
2.2 Adsorvente.....	40
2.3 Curvas de cinética de adsorção.....	40
2.4 Efeito do pH no coeficiente de partição.....	41
2.5 Efeito da temperatura no coeficiente de partição .....	41

2.6	Isotermas de adsorção .....	41
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
3.1	Curvas de cinética de adsorção.....	43
3.2	Efeito do pH no coeficiente de partição.....	44
3.3	Efeito da temperatura no coeficiente de partição .....	46
3.4	Isotermas de adsorção .....	46
4	CONCLUSÃO .....	51
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51
	ARTIGO 2.....	55
	CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE C-FICOCIANINA DE <i>Spirulina platensis</i> POR PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO .....	57
	RESUMO .....	57
1	INTRODUÇÃO .....	58
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.1	Biomassa, extração e quantificação de C-ficocianina.....	59
2.2	Sistema de ultrafiltração.....	60
2.3	Purificação e concentração de C-ficocianina por ultrafiltração convencional .....	60
2.3.1	Seleção da membrana .....	60
2.3.2	Avaliação das condições da UF através de delineamento experimental.....	61
2.3.3	Variação do número de ciclos de diafiltração na UF da C-ficocianina .....	61
2.4	Fator de purificação, recuperação de C-ficocianina e retenção da membrana.....	62
2.5	Avaliação estatística.....	63
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	63
3.1	Seleção da membrana .....	63
3.2	Delineamento experimental.....	65
3.3	Variação de ciclos.....	69
4	CONCLUSÃO .....	73
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	74
	ARTIGO 3.....	78
	OBTENÇÃO DE C-FICOCIANINA DE GRAU ALIMENTAR ATÉ GRAU ANALÍTICO UTILIZANDO DIFERENTES SEQUÊNCIAS DE PURIFICAÇÃO .....	80
	RESUMO .....	80
1	INTRODUÇÃO .....	81
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	82
2.1	Obtenção da biomassa e extração da C-Ficocianina.....	82
2.2	Processos de obtenção de C-ficocianina com diferentes graus de pureza .....	82

2.2.1	Precipitação com sulfato de amônio .....	85
2.2.2	Diafiltração/ultrafiltração (DF/UF).....	85
2.2.3	Cromatografia de troca iônica em leito fixo.....	85
2.2.4	Cromatografia de troca iônica em leito expandido.....	86
2.3	Concentração e recuperação da C-ficocianina .....	86
2.4	Pureza do extrato e fator de purificação.....	87
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	87
3.1	Precipitação com sulfato de amônio .....	87
3.2	Estudo dos processos de purificação de C-ficocianina .....	88
4	CONCLUSÃO .....	95
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	95
	ARTIGO 4 .....	99
	INCORPORAÇÃO DE C-FICOCIANINA EM NANOFIBRAS DE ÓXIDO DE POLIETILENO.....	101
	RESUMO .....	101
1	INTRODUÇÃO .....	102
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	103
2.1	Biomassa, extração e quantificação de C-ficocianina.....	103
2.2	Preparação das soluções para <i>electrospinning</i> .....	104
2.3	Processo de <i>electrospinning</i> .....	104
2.4	Caracterização das soluções e nanofibras .....	105
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	106
3.1	Condutividade dos polímeros .....	107
3.2	Obtenção das nanofibras .....	107
3.3	Análise termogravimétrica .....	111
4.	CONCLUSÃO .....	112
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	112
	CAPÍTULO IV .....	116
3	CONCLUSÃO GERAL .....	118
	CAPÍTULO V.....	120
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	122

**CAPÍTULO I**  
**RESUMO GERAL, ABSTRACT, INTRODUÇÃO GERAL**

## RESUMO

C-ficocianina (C-FC) é uma ficobiliproteína, de cor natural azul, com diversas aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica e biomédica, dependendo do seu grau específico de pureza, que pode variar de 0,7 a 4,0, com respectivo aumento de seu valor comercial. Essa pureza é alcançada através de diversas técnicas de purificação, que podem ser aplicadas em diferentes sequências. Um destes processos de purificação de proteínas baseia-se na cromatografia de troca iônica, que utiliza trocadores que adsorvem as proteínas como resultado de interações iônicas entre a superfície da proteína e o trocador. Resinas e colunas de leito expandido podem ser utilizadas para aumentar a produtividade dessa técnica. É fundamental conhecer o perfil do processo de adsorção, para melhor aplicá-lo como ferramenta para o *design* e otimização de parâmetros operacionais. Outra tecnologia para o tratamento de biomoléculas é a ultrafiltração. Esta técnica é aplicável em larga escala, apresenta baixa complexidade de aplicação e pode ser realizada em condições brandas, minimizando o dano para o produto. Para aumentar a estabilidade da C-FC, e facilitar a sua aplicação, podem ser avaliadas técnicas recentes, não exploradas para este fim, como as nanofibras obtidas através do processo de *electrospinning*. Estas fibras possuem uma área superficial específica extremamente elevada devido a seu pequeno diâmetro. O objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros de adsorção e diferentes técnicas para purificação de C-ficocianina de *Spirulina platensis* e obter nanofibras poliméricas incorporadas de C-ficocianina. O trabalho foi dividido em quatro artigos. No primeiro artigo, foram avaliados os parâmetros e as isotermas de adsorção de C-ficocianina em resina de troca iônica para leito expandido Streamline<sup>®</sup> DEAE. Verificou-se que o maior coeficiente de partição foi obtido em pH 7,5, nas temperaturas de 15 e 25 °C. As isotermas de adsorção da C-ficocianina foram bem representadas pelos modelos de Langmuir, de Freundlich e de Langmuir-Freundlich, sendo os valores estimados para  $Q_m$  e  $K_d$  obtidos pela isoterma de Langmuir foram, respectivamente, 33,92 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,123 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. No segundo artigo foi avaliada a purificação de C-FC até grau alimentar, utilizando ultrafiltração (UF). Com a membrana de 50 kDa, identificou-se que somente a temperatura e a aplicação de diferentes ciclos de diafiltração (DF) causaram influência significativa sobre a purificação e recuperação da C-ficocianina. Foram então aplicados o aumento gradativo da quantidade de ciclos, e a diafiltração previamente à ultrafiltração (DF/UF), onde obteve-se um extrato de C-ficocianina com pureza de 0,95. No terceiro artigo foram propostos processos de purificação, envolvendo a utilização das diferentes técnicas para obtenção de C-FC com diferentes purezas. Determinou-se que a partir de cromatografia de troca iônica em leito fixo seguido de DF/UF, obtém-se C-FC para uso em cosméticos e a partir de precipitação com sulfato de amônio, e DF/UF obtém-se C-FC para uso em biomarcadores. Com uma sequência de precipitação com sulfato de amônio, DF/UF e cromatografia de troca iônica em leito fixo chega-se a C-FC de grau analítico. No último artigo, C-FC foi incorporada a nanofibras de óxido de polietileno (PEO) através de processo de *electrospinning*. Foram determinadas a condutividade da solução de C-FC/PEO, a estrutura e comportamento termogravimétrico das nanofibras formadas. Soluções de polímeros com concentração de 6 e 8% proporcionaram a formação de nanofibras com diâmetro médio inferior a 800 nm, homogêneas, sem a presença de gotas. A análise termogravimétrica identificou aumento na resistência térmica da C-FC incorporada nas fibras.

**Palavras-chave:** C-ficocianina, purificação, isothermas, *design* de processo, nanofibras, *electrospinning*.

## ABSTRACT

C-phycoyanin is a phycobiliprotein, of a natural blue color, which has several applications in food, pharmaceutical and biomedical industries. Depending on its specific purity level, which can vary from 0.7 to 4.0, its commercial value can be increased. This purity is achieved through various purification techniques, that can be applied in different sequences. One of these processes, protein purification based on ion exchange chromatography, uses exchangers to adsorb proteins as a result of ionic interactions between the protein surface and the exchanger. Expanded bed resins and columns can be utilized to increase the productivity of this technique. It is essential to determine the profile of the adsorption process, to improve it as a tool for design and optimization operating parameters. Another technology for biomolecule treatment is ultrafiltration. This technique is applicable in a large scale, has easy implementation and can be performed under mild conditions, minimizing damage to product. Among all the forms that would enable better implementation and greater stability of the C-PC, electrospun nanofibers have not yet been evaluated. These fibers have an extremely high specific surface area due to their small diameter. This study aims to evaluate adsorption parameters and different techniques for purification of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* and produce polymeric nanofibers containing C-phycoyanin. In the first article, were evaluated the process parameters and C-phycoyanin adsorption isotherms in ion exchange expanded bed resin Streamline DEAE. It has been found that the higher partition coefficient occurred at pH 7.5, in 15 and 25 °C. The adsorption isotherms of C-phycoyanin were found to follow the predictions made by the Langmuir, Freundlich and Langmuir-Freundlich models, where the estimated values for  $Q_m$  and  $K_d$  obtained from Langmuir isotherm were, respectively, 33.92 mg.mL<sup>-1</sup> and 0.123 mg.mL<sup>-1</sup>. In the second article, it has been evaluated the C-PC purification to food grade, using ultrafiltration (UF) technique. With the selected membrane of 50 kDa, it was found that only temperature and diafiltration cycles (DF) caused significant influence on the purification and recovery of C-phycoyanin. Thus, the gradual increase of applied cycles, and the diafiltration step were conducted prior to ultrafiltration (DF/UF), which yielded an extract of C- phycoyanin with purity around 0.95. In the third article, it has been evaluated different purification processes, with diverse techniques, to obtain C-PC with different purity levels. It was determined that from fixed bed ion exchange chromatography, followed by DF/UF, was obtained C-PC for cosmetics and from precipitation with ammonium sulfate and DF/UF was obtained C-PC for use in biomarkers. Through sequence precipitation with ammonium sulfate, DF/UF and fixed bed ion exchange chromatography, was achieved analytical grade C-PC. In the last article, was produced polyethylene oxide (PEO) nanofibers containing C-PC, through electrospinning process. It has been determined the conductivity of C-PC/PEO solution, the structure by using digital optical microscope and thermogravimetric analysis of formed nanofibers. Polymer solutions with a concentration of 6 to 8% provided the formation of homogeneous nanofibers with average diameter lower than 800 nm, without beads. Thermogravimetric analysis identified an increase in the thermal resistance of C-PC incorporated in the fibers.

**Keywords:** C-phycoyanin, purification, isotherms, design, nanofibers, electrospinning.



## 1 INTRODUÇÃO

C-ficocianina (C-FC) é um pigmento fotossintético do grupo das ficobiliproteínas, presentes em cianobactérias, algas vermelhas e criptomonas. As ficobiliproteínas são divididas em três classes: ficoeritrinas, ficocianinas e aloficocianinas. A C-FC, além de ser utilizada como corante em alimentos e cosméticos, estimula o sistema imunológico, possui diversas propriedades terapêuticas e auxilia no tratamento de diversas doenças (ERIKSEN, 2008; KAMBLE et al., 2013; MARTELLI et al., 2014; NAGARAJ et al., 2012; OU et al., 2013; PUMAS et al., 2011). Também pode ser utilizada como traçador bioquímico em imunoenaios, microscopia e citometria em função de suas propriedades fluorescentes. Dentre as fontes existentes de C-FC, a cianobactéria *Spirulina platensis* recebe destaque, uma vez que a C-FC pode constituir até 20% em peso seco do conteúdo total de proteína deste micro-organismo (VONSHAK, 2002), sendo a ficobiliproteína mais abundante na *S. platensis*.

O custo da C-ficocianina de grau alimentar (pureza maior do que 0,7) é de cerca de US\$ 0,35 por grama, enquanto que o custo de grau analítico (pureza superior a 4,0) chega a US\$ 4.500,00 por grama (DELHI NUTRACEUTICALS, 2014). A chave para a purificação bem sucedida de proteínas é selecionar as técnicas mais apropriadas, otimizar o seu desempenho para atender às necessidades, e combiná-los de maneira lógica para maximizar o rendimento e minimizar o número de etapas necessárias. Dependendo do grau de pureza requerido para o produto, a complexidade do processo de purificação pode chegar a um custo de até 80% do total do produto (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

A pureza para C-ficocianina é dada pela relação entre a absorção máxima visível a 620 nm e a absorção a 280 nm. Quando esta razão é superior a 4,0, este bioproduto apresenta grau analítico, no entanto, quando este valor é superior a 0,7, o mesmo pode ser utilizado como um biocorante na indústria de alimentos e cosméticos (ABALDE et al., 1998; PATIL et al., 2006). Romay et al. (2003) constataram que a C-FC purificada apresenta potencial efeito cito e tecido-protetor, anti-inflamatório e efeitos terapêuticos.

Com o tempo, foi desenvolvido grande diversidade de técnicas que exploram as diferenças nas propriedades físicas e químicas de compostos de interesse, com o objetivo de possibilitar a sua separação de outros compostos, ou seja, sua purificação (WILSON et al., 2000). A purificação de um produto biotecnológico envolve em geral as etapas de precipitação, centrifugação, ultrafiltração, sistema aquoso bifásico, ou a combinação destes (LING et al., 2004), seguidos de uma ou mais etapas cromatográficas, como principalmente cromatografia de troca iônica, de afinidade, de interação hidrofóbica ou de adsorção. A

finalização geralmente é realizada com etapa de filtração em gel, secagem, cristalização ou liofilização do produto de interesse (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

Diferentes métodos já foram propostos para a purificação de C-FC, como: precipitação (SILVA et al., 2009), sistema aquoso bifásico (ANTELO et al., 2010), separação por membranas (CHAIKLAHAN et al., 2011), e os mais utilizados que são os métodos cromatográficos em coluna de leito fixo (MORAES; KALIL, 2009; SILVEIRA et al., 2008) e de leito expandido (BERMEJO; RAMOS, 2012; MORAES et al., 2011). Muitos estudos aplicam diferentes combinações de várias técnicas de purificação (MORAES; BURKERT; KALIL, 2010; RAMOS et al., 2010; SONG; ZHAO; WANG, 2013).

Apesar dos vários estudos apresentados sobre purificação de C-FC, ainda é necessário um aprofundamento no estudo do comportamento da adsorção de C-FC por resina de troca iônica Streamline DEAE para leito expandido, assim como a aplicação de extrato bruto contendo células, utilizando esta resina. Não foi encontrado na literatura também, estudos detalhados sobre a aplicação de ultrafiltração no modo convencional, avaliando-se diferentes condições de processo. Tendo em vista estas observações, torna-se interessante também avaliar um esquema de processo para purificação da C-FC envolvendo estas técnicas em diferentes sequências, possibilitando a obtenção de extratos com diferentes graus de pureza.

A liberação controlada é um processo eficiente de aplicação de biocompostos na terapia médica. Ela pode equilibrar a cinética de liberação, minimizar os efeitos de toxicidade e colaterais (YIH; AL-FANDI, 2006). Como um portador potencial de transporte de biocompostos, nanofibras obtidas por *electrospinning* têm demonstrado muitas vantagens. Apresenta facilidade de incorporação do produto, e a alta tensão aplicada no processo não causa danos e tem pouca influência sobre a atividade do biocomposto. A elevada área superficial específica e curta extensão do trecho de difusão proporcionam ao sistema de nanofibras uma taxa de liberação maior do que a de material a granel (filme, por exemplo) (FANG et al., 2008).

Estudos demonstram que a C-ficocianina pode ser facilmente degradada sob condições adversas, incluindo o trato gastrointestinal (ANTELO; COSTA; KALIL, 2008; MARTELLI et al., 2014; ROMAY et al., 2003), necessitando assim de um sistema protetor para garantir a sua total utilização. Não foram encontrados até o desenvolvimento deste trabalho estudos sobre a produção de nanofibras com a presença de ficobiliproteínas originárias de cianobactérias.

Considerando o que foi exposto anteriormente e tendo em vista a infraestrutura que a FURG disponibiliza para a produção da cianobactéria *Spirulina platensis*, a experiência e reconhecimento do grupo de pesquisa de recuperação e purificação de Bioprodutos do Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, este trabalho de tese visa ampliar os estudos sobre processos de purificação de um produto de alto valor agregado, assim como inovar na forma de apresentação deste bioproduto para ser utilizado nas indústrias de alimentos e biotecnológicas, valendo-se da implementação de nanotecnologia, que está em ampla ascensão no mercado de pesquisa e desenvolvimento.

### **1.1 Objetivos**

#### **1.1.1 Objetivo geral**

Avaliar parâmetros de adsorção e diferentes técnicas para purificação de C-ficocianina de *Spirulina platensis* LEB 52 e obter nanofibras poliméricas incorporadas de C-ficocianina.

#### **1.1.2 Objetivos específicos**

- Estudar o processo de adsorção de extrato de C-ficocianina em resina de troca iônica Streamline DEAE em reator de mistura;
- Determinar as melhores condições (membrana, pH, temperatura, pressão e aplicação de ciclos de diafiltração) para concentração e purificação de C-ficocianina utilizando a técnica de ultrafiltração;
- Estabelecer a melhor sequência a ser utilizada na purificação e recuperação de C-ficocianina de diferentes graus de pureza para diversas aplicações;
- Obter nanofibras de óxido de polietileno, incorporadas de C-ficocianina e avaliar suas características microscópicas e termogravimétricas.



**CAPÍTULO II**  
**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Ficobiliproteínas

Ficobiliproteínas (FBP $\phi$ ) são proteínas de cadeia aberta com grupos prostéticos tetrapirrólicos chamado bilinas, ligados aos resíduos específicos de cisteína nas apoproteínas (MACCOLL, 1998). Elas formam complexos antena coletores de luz (ficobilissomas) e agem como pigmentos fotossintéticos acessórios em cianobactérias e algas vermelhas (GANTT, 1981). São encontradas em cianobactérias e algas vermelhas e podem ser subdivididas em quatro grupos principais com base em seu espectro de absorção: ficocianina (C-FC - max é 620 nm), aloficocianina (AFC - max é 650 nm), ficoeritrina (FE - max é 565 nm) e aloficocianina B ( max é 670 nm) (YAMANAKA; GLAZER; WILLIAMS, 1978).

As principais aplicações das ficobiliproteínas são como marcadores fluorescentes das células e macromoléculas na pesquisa biomédica, diagnóstica, terapêutica e técnicas altamente sensíveis de fluorescência (GLAZER, 1994). Apresentam também potencial como corantes naturais para uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos, particularmente como substitutos para os corantes sintéticos, que são geralmente tóxicos ou inseguros (SINGH; KATE; BANERJEE, 2005). Além disso, as ficobiliproteínas têm sido descritas como fortes antioxidantes (BHAT; MADYASTHA, 2000; ESTRADA; BESCOS; DEL FRESNO, 2001; GE et al., 2006; HIRATA et al., 2000; PUMAS et al., 2011). Portanto, as FBP $\phi$  apresentam elevado potencial de utilização como substâncias bioativas. FBP $\phi$  comerciais são produzidas a partir de algas, incluindo ficocianina da cianobactéria *Arthrospira (Spirulina)* e ficoeritrina de *Porphyridium rhodophyta* (SPOLAORE et al., 2006). Dentre as fontes existentes deste biocorante, a cianobactéria *Spirulina platensis* recebe destaque, uma vez que a C-ficocianina pode constituir até 20% em peso seco das proteínas totais deste microrganismo (VONSHAK, 2002).

### 2.2 C-ficocianina

C-ficocianina é a ficobiliproteína mais abundante na *Spirulina platensis*. Esta biliproteína fluorescente de cor azulada proveniente de algas foi relatada pela primeira vez em 1928 por Lemberg (OHEOCHA, 1963). Tem máximo de absorção visível entre 615 e 620 nm e máximo de emissão de fluorescência em ~ 650 nm. Seu peso molecular varia entre 60.000 e 240.000 Daltons (BENNETT; BOGORAD, 1971). C-FC é composta por uma apoproteína

ligada a uma ficocianobilina (cromóforo) por uma ligação tioéter, e a porção de proteína é constituída por subunidades e de pesos moleculares na faixa de 18 e 20 kDa, respectivamente e apresenta ponto isoelétrico entre 4,6 e 5,2 (ABALDE et al., 1998; SANTIAGO-SANTOS et al., 2004).

As duas subunidades formam monômeros, agregados em trímeros ( $( )_3$ ) e posteriormente em hexâmeros ( $( )_6$ ) em forma de disco, a unidade funcional da C-FC. A quantidade relativa de cada espécie tem sido relatada como função do pH, força iônica, temperatura e concentração de proteínas (BERNS, 1970). As estruturas cristalinas da C-FC a partir de diversas cianobactérias e rodofíceas já foram elucidadas. Todas elas mostram essa organização global dos complexos C-FC com apenas pequenas variações espécie-dependentes (ADIR; DOBROVETSKY; LERNER, 2001; CONTRERAS-MARTEL et al., 2007; NIELD et al., 2003; PADYANA; RAMAKUMAR, 2006; STEC; TROXLER; TEETER, 1999).

A C-FC é solúvel em água, fortemente fluorescente e tem propriedades antioxidantes (ABALDE et al., 1998) e sua coloração azul da C-FC, juntamente com a clorofila, que possui coloração verde, são as responsáveis pela coloração verde-azulada das cianobactérias (MINKOVA et al., 2003).

Quando purificada, a C-ficocianina apresenta potencial como agente terapêutico em doenças oxidativas induzidas pelo stress causadoras de dano ao DNA (BHAT; MADYASTHA, 2001), e como marcador fluorescente em pesquisa biomédica (ERIKSEN, 2008). Além disso, exibe atividade antioxidante contra radicais hidroxil (ESTRADA; BESCOS; DEL FRESNO, 2001), radicais peróxidos (BHAT; MADYASTHA, 2000) e radicais DPPH (GANTAR et al., 2012), e tem sido utilizada como agente antitumoral e anti-inflamatório (REDDY et al., 2003; ZHANG et al., 2011), com capacidade hepatoprotetora (NAGARAJ et al., 2012) e potencial contra diabetes (OU et al., 2013) e hipertensão (ICHIMURA et al., 2013).

A pureza da C-FC é geralmente avaliada usando a razão de absorvância em 620 nm, em que ocorre a absorção máxima da C-ficocianina, pela absorvância a 280 nm, que corresponde às proteínas totais (LIU; JIANG; JÖNSSON, 2005). A C-ficocianina de pureza 0,7 é considerada de grau alimentar, 3,9 é de grau reativo e maior do que 4,0 é de grau analítico (RITO-PALOMARES; NUNEZ; AMADOR, 2001). Comercialmente, a C-ficocianina é vendida com os graus de pureza 0,75-1,5, 1,5-2,5, 2,5-3,5 e 4. A equação para o cálculo da concentração de C-ficocianina foi obtida a partir de uma relação, obtida por Bennett e Bogorad (1973), entre os coeficientes de extinção das ficobiliproteínas presentes nas cianobactérias, no comprimento de onda onde apresentam máxima absorção.

### 2.3 Recuperação e purificação de proteínas

A utilização da biotecnologia tende a gerar uma grande variedade de produtos a partir do mesmo processo. Esta diversidade possibilita um grande espectro de métodos de separação de bioprodutos, que podem ser empregados para que se atinja um produto de acordo com os graus requeridos de concentração e pureza. A escolha e a sequência das técnicas de separação a serem utilizadas são muito importantes, a fim de minimizar as perdas e aumentar o rendimento nas múltiplas operações. Vários métodos de separação de proteínas baseiam-se nas diferenças das propriedades físicas, químicas e funcionais. As principais propriedades exploradas são cargas, tamanho, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade, forma e função (BELTER; CUSSLER; HU, 1988).

A recuperação e purificação de bioprodutos (*downstream process*) engloba todas as etapas do processo, desde a extração celular até o produto final purificado. Na maioria dos casos, para uma purificação eficiente, devem ser utilizadas diferentes operações unitárias no mesmo processo (JUNGBAUER, 2013). O maior objetivo das técnicas de *downstream processing* tem sido o desenvolvimento das operações unitárias que combinem alta eficiência, mas ao mesmo tempo reduza o número de etapas necessárias para concentrar e/ou purificar até determinado grau a molécula alvo (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

No início da purificação, a proteína alvo pode ser o menor componente entre milhões de outras proteínas e contaminantes. Assim, para que uma purificação seja bem sucedida deve-se seguir algumas regras, tais como: ser um processo simples; evitar técnicas dispendiosas; otimizar cada etapa envolvida no processo; usar técnicas e materiais viáveis; escrever os métodos antes de começar; manter anotações sobre os rendimentos de cada etapa; ter sempre em mente o objetivo final, seja ele alto rendimento, alta pureza e/ou reprodutibilidade, e é também de grande importância o conhecimento da estrutura, função e propriedades da proteína alvo para montar uma estratégia correta de purificação (ROE, 2001).

O grande desafio do processo de purificação de proteínas é encontrar as melhores estratégias e a adequação da metodologia para a escala de produção pretendida, garantindo que o produto final tenha todas as características necessárias para o seu uso (MILNE, 2011). A purificação convencional de qualquer produto biotecnológico envolve, tradicionalmente, as etapas de precipitação, centrifugação, ultrafiltração, sistema aquoso bifásico, ou a combinação das mesmas (LING et al., 2004), seguidos de uma ou mais etapas cromatográficas, principalmente cromatografia de troca iônica, de afinidade, de interação hidrofóbica ou de

adsorção. A finalização geralmente é feita com uma etapa de filtração em gel, secagem, cristalização ou liofilização do produto de interesse (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

## 2.4 Cromatografia de troca iônica

A cromatografia é o método de separação mais amplamente utilizado nos laboratórios que trabalham com algum tipo de química, onde é utilizada na análise, no isolamento e na purificação, e que é comumente utilizada industrialmente como um componente da produção em pequena e larga escala. Esta técnica é essencialmente um método físico de separação em que os componentes de uma mistura são separados pela sua distribuição entre duas fases, uma das quais permanece estacionária, enquanto a outra elui entre os interstícios ou sobre a superfície da fase estacionária (FE). O movimento da fase móvel (FM) resulta na migração diferencial dos componentes da amostra (POOLE, 2000).

A cromatografia pode ser dividida em dois grandes grupos: líquida e gasosa, sendo a líquida a de interesse para a purificação de metabólitos celulares. Na cromatografia líquida, a característica molecular mais comumente explorada em separações são o tamanho, as propriedades iônicas e hidrofóbicas bem como certas interações bioespecíficas (FREITAG; HORVÁTH, 1996; PESSOA; KILIKIAN, 2005).

Segundo Jungbauer (2005) há sete princípios cromatográficos empregados em biomoléculas. Os princípios de ação são a cromatografia de adsorção, cromatografia de troca iônica, cromatografia de exclusão molecular, também chamada de permeação em gel, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de fase normal e cromatografia de fase reversa. Dentre essas, recebe destaque a cromatografia de troca iônica, devido à sua ampla aplicabilidade, seu alto poder de resolução, sua alta capacidade e sua simplicidade e facilidade de controle (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2002).

Na cromatografia por troca iônica, a solução contendo o composto desejado passa através da coluna contendo a resina trocadora. A proteína ficará ligada à resina através de forças eletrostáticas. Após a coluna é lavada com um tampão de força iônica maior, causando a liberação de proteínas fracamente ligadas, seguido da liberação das moléculas firmemente ligadas, permitindo sua separação. Os eluentes obtidos por lavagem são coletados em pequenas frações sob diferentes condições. É uma técnica amplamente utilizada em biosseparações de peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos e biopolímeros que tenham moléculas químicas ionizáveis tornando-as suscetíveis a aumento ou reversão das cargas em função do pH (BAILEY; OLLIS, 1986).

Esta técnica envolve a adsorção da biomolécula a grupos carregados da resina, seguida de sua eluição com fracionamento. Biomoléculas carregam grupos ionizados em sua superfície, devido principalmente aos resíduos de aminoácidos. O balanço de cargas positivas e negativas depende das quantidades relativas desses grupos carregados e isso varia com o pH. Quando estão em igual número, tem-se o PI (ponto isoelétrico). No pH acima do PI a biomolécula possui uma carga negativa e abaixo uma carga positiva. O pH pode ser ajustado para regular o grau de adsorção da biomolécula pela resina. Uma unidade de pH acima ou abaixo do pI deve ser utilizada para facilitar a adsorção. A eluição normalmente é mais eficiente quando feita através de um gradiente linear, em que o pH ou a força iônica sofre mudança contínua (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

A maioria dos experimentos de troca iônica é feito em cinco etapas principais: a primeira fase é o equilíbrio no qual o trocador iônico é conduzido a um estado inicial, em termos de pH e força iônica, que permite a ligação das moléculas desejadas de soluto. O segundo estágio é a aplicação da amostra e adsorção, no qual as moléculas de soluto conduzem a carga apropriada a substituir os íons contidos e conduzem reversivelmente para o gel. No terceiro estágio, as moléculas são removidas da coluna por troca através de condições de eluição desfavoráveis para condução iônica das moléculas do soluto. Isto normalmente envolve um aumento na força iônica do tampão de eluição ou troca de pH. O quarto e quinto estágios são a remoção, da coluna, de substâncias não eluídas sob condições experimentais prévias e o re-equilíbrio para as condições iniciais para uma próxima purificação (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2002).

Existem dois tipos de trocadores iônicos. Um deles é o trocador catiônico, onde o adsorvente é negativamente carregado. Este é usado para separar proteínas positivamente carregadas, predominantemente a pH abaixo do seu ponto isoelétrico. O outro modo é o trocador aniônico, onde o adsorvente é positivamente carregado. Se a carga do trocador iônico varia com o pH durante a operação, o trocador é dito fraco (ROE, 2001).

A cromatografia de troca iônica é a técnica mais usada para purificação de proteínas e normalmente é a primeira opção no desenvolvimento de processo de bioseparação (AHAMED et al., 2007). Tem sido utilizada com sucesso na purificação de produtos como as enzimas  $\alpha$ -galactosidase (MEDEIROS; BURKERT; KALIL, 2012), inulinase (KALIL et al., 2010), amiloglicosidase (MANERA et al., 2008), polifenoxidase (PALMA-OROZCO et al., 2011), peroxidase (ZIA et al., 2011) e pigmentos como C-ficocianina (SILVEIRA et al., 2008) e antocianinas (HE; GIUSTI, 2011) entre outros.

## 2.5 Cromatografia em leito expandido

A recuperação de produtos provenientes de bioprocessos líquidos é uma operação de várias etapas que se destinam primeiramente à remoção de detritos sólidos, tais como células inteiras ou que se desintegraram (GHOSE; CHASE, 2000). Cromatografia em leito expandido permite integrar separação sólido-líquido, redução de volume por adsorção de proteínas e purificação parcial em uma operação, sem comprometer a eficiência de separação, economizando tempo e reduzindo custos (ANSPACH et al., 1999).

Processos de cromatografia em leito expandido utilizam adsorventes especialmente concebidos, expandidos na coluna com uma fase ascendente de líquido, apresentando leito fluidizado perfeitamente classificado (HJORTH, 1997). Comparado com operação em leito empacotado, o leito expandido evita as deficiências pela pequena porosidade do leito, adequado para operação em alto fluxo, com queda de pressão relativamente baixa. Além disso, permite que as células e restos celulares atravessem sem bloquear o leito, evitando a contaminação por essas partículas (PÅLSSON; AXELSSON; LARSSON, 2001).

Após o preenchimento da coluna com o adsorvente, uma distribuição aleatória de pequenas e grandes partículas é encontrada no leito sedimentado. A fim de alcançar a distribuição de tamanho de partículas e densidades designadas pelo fabricante, a mistura completa da suspensão é muito importante antes de colocá-lo na coluna, se o conteúdo todo não for utilizado. Caso contrário, a distribuição de tamanho das partículas será diferente em preenchimentos posteriores da coluna (ANSPACH et al., 1999).

O aumento na porosidade do leito proporcionado pela expansão, permite que pequenas partículas na fase móvel passem através do leito expandido sem necessitar sua prévia remoção (XIA; LIN; YAO, 2007). A adsorção em leito expandido conceitualmente apresenta uma série de vantagens sobre operações em leito empacotado para operação em larga escala, particularmente por isolar e purificar bioprodutos de grandes volumes de extratos brutos contendo material particulado (PAI et al., 1999). O uso de adsorventes com densidade controlada permite obter um leito estável, com cada partícula mantendo uma posição discreta no leito com pequeno movimento circular. Deste modo, este processo, comparado ao leito fluidizado, apresenta maior capacidade de adsorção, com o leito expandido se comportando como um reator tubular durante a aplicação da alimentação (SNOW, 1994).

Diversos autores apresentam aplicações bem sucedidas do leito expandido para a purificação de proteínas (BERMEJO et al., 2013; JOSÉ ARTOLOZAGA et al., 1998; KALIL; MAUGERI-FILHO; RODRIGUES, 2005; MORAES et al., 2011; PAI et al., 1999).

## 2.6 Isotermas de adsorção

A capacidade de caracterizar com precisão o equilíbrio é importante em todos os processos cromatográficos. O equilíbrio de adsorção pode ser definido como um estado de equilíbrio dinâmico, onde as taxas de adsorção e dessorção se equivalem (LANGMUIR, 1916). As isotermas de adsorção de proteínas fornecem as informações essenciais para o *design* de separações cromatográficas de troca iônica, que são processos típicos para a purificação de proteínas (LAN et al., 2001). Além das reações de troca iônica, outras interações como as hidrofóbicas e de van der Waals também desempenham papel importante no processo (LADIWALA et al., 2005). A adsorção de proteínas é influenciada por vários fatores, tais como força iônica, pH, temperatura, massa molecular e cargas da superfície (VA KOVÁ; ANTOVÁ; POLAKOVI, 2007).

A técnica utilizada para gerar os dados de adsorção é a princípio, bem simples, pois uma quantidade conhecida do soluto é adicionada ao sistema contendo uma quantidade conhecida de adsorvente. Considera-se que a diferença entre a quantidade adicionada e a remanescente na solução encontra-se adsorvida na superfície adsorvente (ALLEONI; CAMARGO; CASAGRANDE, 1998).

Muitos modelos diferentes de isotermas, como o de Langmuir, Freundlich e de Freundlich-Langmuir, têm sido propostos para a adsorção de solutos em uma solução líquida sobre uma superfície sólida. Esses modelos são usados para descrever a adsorção, sem no entanto, fornecer informações sobre o mecanismo das reações envolvidas (LAN et al., 2001). Para cada isoterma, o eixo das abcissas representa a concentração de soluto na solução, geralmente em massa de soluto por volume de solução, enquanto o eixo das ordenadas dá a concentração de soluto por massa de adsorvente.

A isoterma de adsorção de Langmuir foi originalmente desenvolvida para descrever a adsorção de fase gasosa em carvão ativado, tem sido tradicionalmente usada para quantificar e contrastar o desempenho de diferentes biosorventes (LANGMUIR, 1916). Este modelo empírico assume adsorção em monocamada (a camada adsorvida apresenta espessura de uma molécula), com adsorção podendo ocorrer apenas em um número finito (fixo) de definidos sítios localizados, que são idênticos e equivalentes, sem interação lateral e com uma barreira estérica entre as moléculas adsorvidas, mesmo em locais adjacentes

(VIJAYARAGHAVAN et al., 2006). A isoterma de Langmuir indica uma adsorção homogênea, onde cada molécula possui entalpia e energia de ativação de sorção constantes (todos os sítios possuem igual afinidade pelo adsorbato) (KUNDU; GUPTA, 2006), sem transmigração de adsorbato na superfície adsorvente (PÉREZ-MARÍN et al., 2007).

A isoterma de Freundlich (VIJAYARAGHAVAN et al., 2006) é a primeira relação conhecida descrevendo a adsorção não-ideal e reversível, não restrita à formação de monocamada. Este modelo empírico pode ser aplicado para a adsorção em multicamada, com distribuição não uniforme de energia de adsorção e afinidades sobre a superfície heterogênea (ADAMSON, 1982). Quando desenvolvido, demonstrou que a concentração de adsorbato na superfície do adsorvente aumenta com a concentração de adsorbato (AHMARUZZAMAN, 2008). Com isto, a quantidade adsorvida é a soma da adsorção em todos os sítios (cada um com energia de ligação), com os sítios de ligação mais fortes sendo ocupados primeiro e a energia de adsorção reduzindo exponencialmente até a conclusão do processo de adsorção (CAPASSO et al., 2007).

A isoterma de Langmuir-Freundlich (SIPS, 1948) é uma forma combinada das expressões de Langmuir e Freundlich deduzida para prever os sistemas de adsorção heterogêneos (GÜNAY; ARSLANKAYA; TOSUN, 2007) e contornar a limitação da concentração de adsorbato crescente associado ao modelo de Freundlich (FOO; HAMEED, 2010). Em baixas concentrações para adsorção, se reduz a isoterma de Freundlich, enquanto a concentrações elevadas prevê capacidade de adsorção em monocamada característica da isoterma de Langmuir. Como regra geral, os parâmetros da equação são essencialmente conduzidos pelas condições de operação, tais como a alteração do pH, temperatura e concentração (PÉREZ-MARÍN et al., 2007). Por analogia com as interações das múltiplas ligações proteicas, é assumido que este modelo descreve bem a adsorção com cooperatividade (SHARMA; AGARWAL, 2001). A cooperatividade pode ser atribuída às interações laterais da molécula e depende da natureza da macromolécula e da presença de múltiplos grupos funcionais, que normalmente produz múltiplas interações com o adsorvente, além da força causada pelas interações laterais ou interações proteína-proteína que podem exercer influência além da natureza heterogênea da adsorção devido aos múltiplos sítios de ligação (BRESOLIN et al., 2013).

## 2.7 Separação por membranas

Produtos biotecnológicos como antibióticos e proteínas, são produtos lábeis e sensíveis mesmo para condições não muito drásticas de pH, temperatura, força iônica, solvente e tensões. Parte desses problemas pode ser enfrentada, com relativo sucesso, com o emprego dos chamados Processos de Separação por Membrana (PSM) (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

Durante as últimas três décadas, as membranas atraíram a atenção de químicos, engenheiros químicos e biotecnológicos, devido à seu princípio de separação único, ou seja, o transporte seletivo e eficiente separação comparada com outras operações unitárias. Separações com membranas não requerem aditivos, e podem ser realizadas isotermicamente em temperaturas baixas, com menor consumo de energia em comparação com outros processos de separação térmica. Devido às propriedades únicas das membranas, o aumento e redução de escala de processos de separação por membranas, assim como a sua integração em outros processos de separação e reação são relativamente simples (SAXENA et al., 2009).

Entre os PSM, os mais empregados na área de biotecnologia, em particular na concentração e na purificação de macromoléculas, são os que utilizam a diferença de pressão como força motriz. Em razão da natureza e do tipo de solutos e da presença ou não de partículas em suspensão, membranas com diferentes tamanhos e distribuição de poros ou mesmo densas são empregadas, caracterizando os processos conhecidos como Microfiltração, Ultrafiltração, Nanofiltração e Osmose Inversa (WIBISONO et al., 2014). Estes processos podem ser entendidos como extensão dos processos de filtração clássica que empregam nessa sequência, meios filtrantes (membranas) cada vez mais fechadas, ou seja, com poros cada vez menores (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

As membranas tem importantes aplicações industriais, e diversos estudos demonstram a utilidade desta tecnologia, como por exemplo, purificação de água, tratamento de efluentes industriais, desidratação de solventes, recuperação de voláteis orgânicos, concentração de proteínas (SAXENA et al., 2009), separação de substâncias termolábeis, desidratação de etanol, purificação de enzimas, fracionamento de proteínas, esterilização de meios de fermentação, biorreatores a membrana, concentração de leite, concentração de soro de queijo, concentração de suco de fruta, clarificação e desalcoolização de vinhos e cervejas (HABERT, 2006).

A utilização dos processos de separação com membranas apresenta como vantagem suas condições de funcionamento brandas (isto é, relativamente baixas temperaturas, baixas pressões baixas, nenhuma mudança de fase ou aditivos químicos) que garantem uma reduzida desnaturação, desativação e/ou degradação de produtos biológicos

altamente instáveis, tornando-os particularmente adequados para o processamento de macromoléculas biológicas. Além disso, possui custo menor do que outros métodos de separação e purificação como a cromatografia, além de ser de fácil operação e alteração de escala de trabalho (CUI, 2005).

No processo de separação com membranas, especialmente nos casos de ultrafiltração e microfiltração, observa-se uma queda inicial do fluxo permeado com o tempo, sendo que este decréscimo é ocasionado por fenômenos que limitam o transporte de solventes tais como a polarização da concentração, camada polarizada e a incrustação (*fouling*). Os fenômenos são devido à presença de espécies no fluido de alimentação que não podem passar para o permeado. Estes diferem, pois na polarização da concentração, as espécies acumuladas na parede da membrana encontram-se dispersas na solução, enquanto que na camada polarizada as espécies se depositam na superfície da membrana e na incrustação estas aderem dentro da matriz da mesma. A intensidade da incrustação depende do tipo de membrana, concentração e solutos presentes na solução, temperatura, pH e tempo de operação (CHERYAN, 1998).

Uma resistência adicional ao fluxo de permeado ocorre quando hidrocolóides, proteínas e outras moléculas de alta massa molecular estão presentes na solução. Estes compostos são altamente rejeitados e tendem a formar uma camada viscosa na superfície da membrana denominada camada polarizada. A camada polarizada é caracterizada quando não há mais variação na concentração de partículas junto à membrana (SCHÄFER; FANE; WAITE, 2000).

Quando o objetivo da separação por membrana é a concentração, o retido será o produto fina\*1. Porém, no caso de purificação, tanto o retido quanto o permeado podem conter o produto desejado, dependendo das impurezas que se quer eliminar e o tamanho da molécula alvo. Os PSM podem ser classificados em microfiltração (MF), ultrafiltração (UF), nanofiltração (NF) e osmose inversa (OI), que se diferenciam principalmente pelo tamanho dos poros da membranas, conforme apresentado na Tabela 1 (HABERT, 2006).

**Tabela 1** - Características dos processos de separação por membranas em termos de dimensões de poros e força motriz.

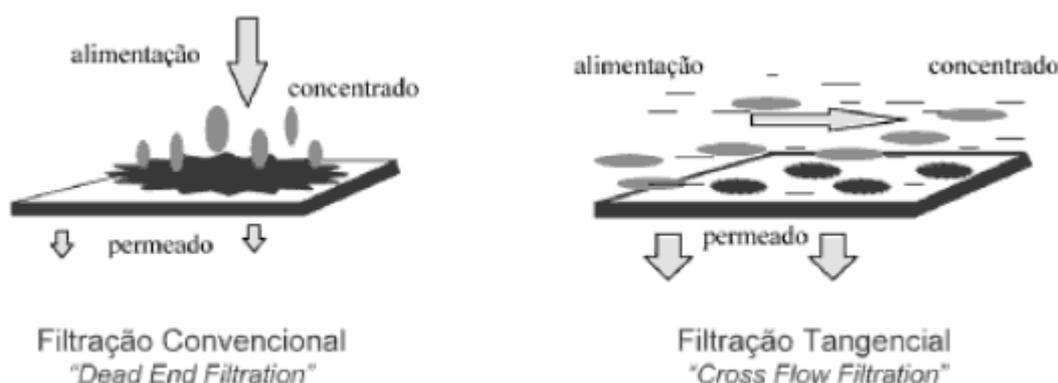
Processo	Dimensão dos poros	Força motriz ( $\hat{e}P$ )*
Microfiltração (MF)	0,1 a 1,0 $\mu\text{m}$	0,5 - 2 atm
Ultrafiltração (UF)	0,001 a 0,1 $\mu\text{m}$	1 - 7 atm

Nanofiltração (NF)	5 a 10 Å	5 - 25 atm
Osmose inversa (OI)	Membrana densa	15 - 80 atm

Fonte: Habert (2006). \* é P: diferença de pressão

Com relação ao modo de operação, os PSM podem ser operados em escoamento do tipo clássico de filtração frontal e em escoamento tangencial. Na filtração frontal, o permeado passa através da membrana e o soluto, ou sólidos em suspensão, são retidos, acumulando-se na superfície da membrana. Na filtração com escoamento tangencial a solução ou suspensão escoam paralelamente à superfície da membrana, enquanto o permeado é escoado transversalmente a mesma (HABERT, 2006). A Figura 1 apresenta o desenho esquemático dos dois modos de operação. Entre os materiais que podem ser utilizados na fabricação das membranas, a polietersulfona (PES) é um dos materiais poliméricos mais importantes e amplamente utilizado nos processos de separação. Membranas baseadas em PES apresentam estabilidade térmica e hidrolítica assim como boas propriedades mecânicas (ZHAO et al., 2013).

**Figura 1-** Comparação esquemática entre Filtração Convencional (Filtração frontal) e a Filtração em Escoamento Tangencial



Fonte: Habert (2006)

## 2.8 Ultrafiltração

O tamanho dos poros da membrana de ultrafiltração é na faixa de 1 a 100 nm, possibilitando assim reter as moléculas na faixa de peso molecular de 10 kD - 1 MD e é preferencialmente usado para concentrar macromoléculas, como moléculas de proteínas e polímeros. O processo de ultrafiltração pode ser controlado por dois parâmetros principais, o

fluxo de permeado e a rejeição da membrana (CUI, 2005). Membranas de ultrafiltração foram projetadas para proporcionar alta retenção de proteínas e outras macromoléculas. Estes processos com membrana envolvem a filtração de soluções biológicas contendo proteínas, peptídeos, aminoácidos, sais e outros compostos como ácidos orgânicos, açúcares e vitaminas. Alguns exemplos incluem a concentração de proteínas de soro de leite durante a produção de uma variedade de produtos lácteos, filtração de vinho e na purificação de biocompostos (DARNON et al., 2003).

Existem diversos fatores envolvidos no processo de separação e fracionamento de proteínas por ultrafiltração: interação soluto-soluto, interação soluto-membrana, polarização, modo de transporte do soluto, entre outros vários fatores que podem ser responsáveis pelo fracionamento de proteína (ZUÑIGA et al., 2003). Um problema comum durante o processo de filtração é a perda de desempenho da membrana devido à polarização por concentração e incrustações (*fouling*). O acúmulo de uma camada polarizada é causado pelo aumento da concentração de solutos perto da superfície da membrana, devido à sua rejeição pela barreira semipermeável e ocorre imediatamente após a filtração ser iniciada (PEEVA et al., 2012).

Membranas de ultrafiltração são feitas de vários polímeros. Elas geralmente têm duas camadas distintas. No lado em contato com a amostra ou corrente de fluido há uma película densa muito fina (0,1- 1,5 $\mu$ m) com poros extremamente finos cujos diâmetros estão na faixa de 10-400Å. Abaixo disto, há uma subestrutura aberta unicelular muito mais grossa de poros cada vez maiores, largamente aberta para o lado do filtrado no filtro. Qualquer espécie capaz de atravessar os poros da película podem, assim, passar livremente pela membrana. Este arranjo permite uma combinação única de seletividade e excepcional rendimento em pressão moderadas (CUTLER, 2004).

As membranas de UF, baseadas em uma variedade de polímeros sintéticos, têm alta estabilidade térmica, resistência química, e uso restrito de produtos químicos de limpeza pesada (L'HOCINE; BOYE; ARCAND, 2006). As membranas de UF, normalmente, são especificadas através da retenção nominal, que é definida como sendo o valor da massa molar para a qual a membrana apresenta um coeficiente de rejeição de 95%. Assim, uma membrana com retenção nominal de 15 kDa é aquela capaz de rejeitar 95% das moléculas presentes em uma solução de um soluto com massa molar maior de 15.000 Dalton (HABERT, 2006). Diversos fatores podem influenciar na eficiência da UF, como pH, temperatura, pressão e força iônica (SUN et al., 2011)

O sucesso do fracionamento de proteínas usando ultrafiltração se baseia tanto na minimização da incrustação da membrana e na obtenção de seletividade suficientemente

elevada de separação. Para aumentar a pureza dos produtos na ultrafiltração é comum usar a diafiltração. A diafiltração (DF) é um modo alternativo de operar sistemas de MF, UF e NF e OI. A operação consiste em se adicionar, continuamente, na solução a ser processada, solvente puro ou solução tampão (solução DF), em quantidade equivalente à vazão de permeado que sai do sistema. A diafiltração é utilizada quando se deseja purificar determinado soluto de uma solução, onde os contaminantes são compostos de dimensões menores do que as do soluto de interesse. A ultrafiltração com diafiltração pode ser operada em batelada ou em modo contínuo (YEE; WILEY; BAO, 2007).

## 2.9 Purificação de C-ficocianina

Entre os métodos propostos para purificação de C-FC, encontram-se a aplicação de diferentes métodos. Utilizando sistema aquoso bifásico, já se obteve extrato com pureza variando de 2,4 (RITO-PALOMARES; NUNEZ; AMADOR, 2001) até 3,23 (PATIL et al., 2008). Antelo et al. (2010) utilizaram sistema aquoso bifásico com polietilenoglicol de diferentes massas molares, a partir de extrato contendo células, obtendo C-ficocianina de grau alimentar. Com a aplicação da técnica de precipitação, a partir de *Spirulina platensis*, já foi obtido extrato com pureza de 2,03 e uma recuperação de 85% (MINKOVA et al., 2003). Silva et al. (2009) através de delineamento experimental, otimizaram a técnica de precipitação com sulfato de amônio na purificação de C-ficocianina até grau alimentar com pureza de 0,88, obtendo um fator de purificação de 1,7 e recuperação de 83,8%. Não foram encontrados até o momento estudos avaliando a utilização de diferentes tempos de processo para a aplicação de precipitação com sulfato de amônio na purificação de C-FC.

Os métodos mais amplamente utilizados são os cromatográficos, em coluna de leito fixo, onde foram obtidos valores de pureza de 4,85 utilizando cromatografia de interação hidrofóbica seguida por cromatografia de troca iônica (ABALDE et al., 1998) e pureza de 3,9 utilizando cromatografia de troca iônica, previamente a aplicação de sistema aquoso bifásico, a partir de extrato de C-FC com concentração inferior a  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  (PATIL et al., 2006). Utilizando cromatografia de troca iônica em leito fixo, a partir de extrato clarificado, Silveira et al. (2008) obtiveram C-ficocianina com pureza de 1,82 (fator de purificação de 3,4) e recuperação de 77%.

A partir da utilização de cromatografia de troca iônica em coluna de leito expandido, já foram obtidos extrato de C-FC com pureza  $> 2,0$  e recuperação de 80% (BERMEJO et al., 2006) e pureza  $\times 2,87$  com recuperação de 35% (NIU et al., 2007), em ambos os casos, a partir de extrato clarificado de C-FC. Moraes et al. (2011), obtiveram

extrato de C-FC com pureza de 2,9 (fator de purificação de 4,6), a partir de caldo bruto, contendo células, com uma recuperação de 60%.

Existem poucos estudos sobre a utilização de processo de purificação por membranas. Jaouen et al. (1999) utilizaram membranas de microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose reversa para concentração e clarificação de C-FC de *S. platensis*. Chaiklahan et al. (2011) obtiveram C-FC de grau alimentar (pureza de 1,11) com a utilização de ultrafiltração. Até o desenvolvimento deste trabalho, não foram encontrados estudos avaliando a variação da temperatura, pH e aplicação de diafiltração/ultrafiltração na purificação de C-FC.

A utilização de combinações de diversas técnicas de purificação é aplicada quando se requer uma pureza mais elevada do produto final. Estudos apresentam a combinações de várias técnicas de purificação (BERMEJO; RAMOS, 2012; KAMBLE et al., 2013; RAMOS et al., 2010). Moraes e Kalil (2009) avaliaram diferentes sequências de processos de purificação, utilizando precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica em leito fixo e permeação em gel, onde obtiveram um extrato com pureza de grau analítico ( $\times 4,0$ ) ao utilizarem a sequência precipitação e diálise e cromatografia de troca iônica com eluição em gradiente linear salino. No entanto, sequências de processo utilizando leito expandido em combinação com ultrafiltração, e a partir de extrato não clarificado de C-ficocianina e a comparação entre diferente sequências de processos visando a obtenção de extratos de C-FC de diferentes graus de pureza como produto final, não foram encontrados na literatura.

## 2.10 Nanotecnologia

A nanotecnologia é a capacidade de medir, observar, manipular e construir coisas em escalas nanométricas. O termo "nano" vem da palavra grega "nanos", que significa anão e indica que um nano é igual a um bilionésimo de um metro (ou seja,  $10^{-9}$  m) (SEKHON, 2010). A nanotecnologia pode ser descrita também como a combinação de engenharia e biologia molecular que está levando a uma nova classe de dispositivos e sistemas multifuncionais para análise biológica e química com melhor sensibilidade, especificidade e maior taxa de reconhecimento (MORAIS et al., 2014).

A nanociência e a nanotecnologia já foram aplicadas em diversas áreas, tais como informática, comunicação, produção de energia, medicina e indústria de alimentos. Devido à maior área superficial por unidade de massa das nanopartículas, é esperado que elas sejam

mais biologicamente ativas do que as partículas maiores com mesma composição química. Isto oferece várias perspectivas para aplicações em alimentos e fármacos como aperfeiçoamento de compostos bioativos e suas propriedades de distribuição, melhora na solubilidade, no tempo de permanência no trato gastrintestinal e na absorção eficiente através de células (SOZER; KOKINI, 2009).

Entre as diversas nanoestruturas existentes atualmente, estão incluídas as nanomatrizes, nanodiscos, nanocápsulas, nanopartículas, nanoprismas, nanobastões, nanofitas, nanoconchas, nanotransistores, nanotubos, nanofios e nanofibras (FORTINA et al., 2007). Essas nanoestruturas já foram avaliadas e aplicadas em uma série de setores da nanobiotecnologia, incluindo transporte de fármacos, formação de emulsões, imagiologia, biomateriais, segurança alimentar, ótica e eletrônicos, patógenos, biossensores, diagnóstico *in vitro*, engenharia de tecidos e terapia genética (MORAIS et al., 2014).

## 2.11 Nanofibras

Nanoestruturas unidimensionais (possuem uma dimensão de tamanho nanométrico) têm sido alvo de pesquisas devido a suas propriedades únicas (LI; XIA, 2004). Nanofibras podem ser produzidas a partir de uma ampla variedade de polímeros. Estas fibras possuem uma área superficial específica extremamente elevada devido a seu pequeno diâmetro, e podem ser altamente porosas com excelente interligação dos poros. Essas características, mais as funcionalidades dos próprios polímeros possibilitam que as nanofibras apresentem diversas propriedades desejáveis para aplicações avançadas (FANG et al., 2008).

Nanofibras poliméricas podem ser processadas por diversas técnicas como (RAMAKRISHNA, 2005):

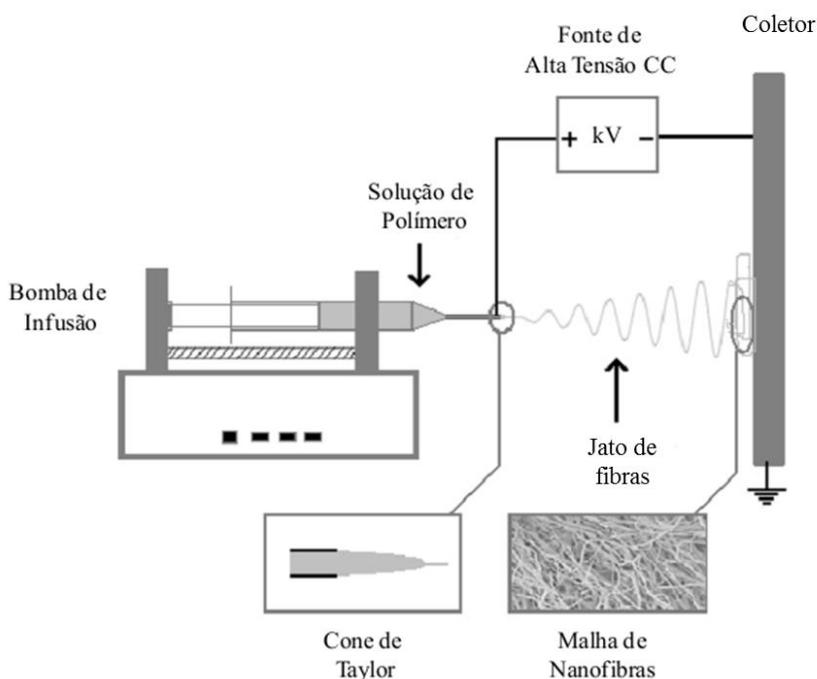
- *Drawing* (estiramento), que consiste em mergulhar a ponta de uma micropipeta em uma gota de solução polimérica e mover a mesma produzindo um nano ou micro filamento;
- Síntese *template*, que consiste em forçar por meio de pressão, a passagem de uma solução polimérica através de uma membrana de um óxido metálico;
- Separação de fases, que envolve principalmente as etapas de preparo da solução em solvente adequado, gelatinização, extração do solvente, congelamento, secagem e recongelamento;

- Auto-organização, onde os átomos ou moléculas organizam-se de forma autônoma por meio de interações físicas ou químicas construindo assim nanoestruturas ordenadas. Uma molécula pequena ou uma micela arranja-se de uma maneira concêntrica, tal que ligações podem se formar entre essas células pequenas auto-organizadas concetricamente. O mecanismo principal para uma auto-organização genérica é formado pelas forças intermoleculares as quais mantêm juntas as pequenas unidades;
- *Electrospinning* (eletrofiação), técnica não mecânica, onde uma solução polimérica suficientemente viscosa flui através de um capilar e, sob a influência da tensão superficial, forma-se na ponta uma gota. Se uma tensão elétrica suficientemente elevada é aplicada à solução, cargas elétricas são acumuladas na gota. Se a força exercida pelo campo elétrico, formado entre a gota e um anteparo aterrado, superar a tensão superficial e a viscosidade da gota, um fino jato é formado. O jato da solução carregada é acelerado em direção ao coletor sob a ação do campo, provocando um violento estiramento do polímero e a rápida evaporação do solvente. No coletor é formada uma manta constituída por uma rede de fibras ultrafinas, aleatoriamente orientadas.

Este processo utiliza campos elétricos de alta tensão (5-60kV) e baixa corrente (0,1-1 $\mu$ A) para produção de fibras de diâmetro reduzido. Quando o campo elétrico é suficientemente intenso para superar a tensão superficial da gota que se encontra suspensa na sua extremidade do capilar, esta torna-se fortemente eletrificada, deformando-se numa forma cônica (Cone de Taylor). Sempre que a tensão ultrapassa um valor crítico, as forças eletrostáticas superiorizam-se à tensão superficial do fluido e forçam a injeção deste a partir do cone. Este é o resultado das repulsões eletrostáticas entre as cargas do mesmo sinal na superfície do fluido, assim como das atrações perante as cargas de sinal oposto, localizadas no coletor. Como o solvente evapora rapidamente durante o processo, o diâmetro do jato é constantemente reduzido, conduzindo à formação de fibras ultra finas. Dependendo das propriedades reológicas da solução e dos outros parâmetros de processamento, o diâmetro das fibras resultantes pode ser ajustado (RENEKER et al., 2000).

*Electrospinning* é uma técnica muito utilizada por ser simples e versátil, e, atualmente, é um método bem estabelecido e eficaz para produzir nanofibras de modo contínuo. *Electrospinning* é considerada a técnica mais apropriada para a produção de nanofibras por ser de fácil manuseio e permitir controlar a estrutura e a morfologia das fibras, que podem ser densas, porosas, na forma de fitas e tubos ocos ou preenchidos

(LEINDECKER; ALVES; BERGMANN, 2013). O diagrama esquemático de um sistema de *electrospinning* está apresentado na Figura 2.

**Figura 2 ó** Montagem esquemática de um sistema de *electrospinning*

Fonte: Adaptado de Portela (2011)

A manipulação dos principais parâmetros da solução (viscosidades, tensão superficial e condutividade elétrica); dos principais parâmetros do processo (tensão aplicada, a vazão e a distância da ponta da agulha à placa coletora) e dos parâmetros ambientais (umidade e temperatura do ambiente), permitem o controle da espessura, homogeneidade e orientação das nanofibras (COSTA; BRETAS; GREGORIO FILHO, 2009).

A tensão superficial indica a tensão aproximada na camada superficial de um fluido, que leva a sua superfície a se comportar como uma membrana elástica (MOORE et al., 1990). No *electrospinning*, as cargas da solução polimérica devem ser altas o suficiente para sobrepor a tensão superficial da solução, ou seja, romper a força de coesão entre as moléculas da solução. Quando o campo elétrico é alto o suficiente, um jato de solução é formado e acelerado pelo campo elétrico em direção ao coletor. Com a redução da tensão superficial de uma solução, fibras podem ser obtidas sem gotas, no entanto, não significa que uma tensão superficial menor é garantia de formação de fibras. O correto é compreender que a tensão superficial determina os limites inferior e superior do processo de *electrospinning* se as outras condições forem mantidas constantes (BHARDWAJ; KUNDU, 2010; ZONG et al., 2002).

A viscosidade da solução e a condutividade elétrica determinam a extensão do alongamento do jato fibroso que, por sua vez, tem influência sobre o diâmetro das fibras. A viscosidade, de uma maneira genérica e simplificada, é a medida da resistência do material ao fluxo. Geralmente, a viscosidade da solução está relacionada com o grau de emaranhamento das cadeias moleculares do polímero na solução. No caso do *electrospinning*, quando a viscosidade é excessivamente baixa pode ocorrer *electrospraying* (formação de micro gotas), em vez do jato fibroso. Com baixa viscosidade, onde geralmente as ligações da cadeia polimérica são de menor intensidade, há uma maior probabilidade de obter fibras onduladas, em vez de fibras lisas. Portanto, fatores que afetam a viscosidade da solução também afetarão o processo e as fibras dele resultante (KULKARNI; BAMBOLE; MAHANWAR, 2010; RAMAKRISHNA, 2005; ZONG et al., 2002).

A condutividade de uma solução é determinada pela capacidade de movimento (em massa) dos íons  $H^+$  presentes na solução ou ainda, a facilidade com que a solução é capaz de conduzir uma corrente elétrica (MOORE et al., 1990). Quando uma diferença de potencial é aplicada a um determinado volume de solução, a intensidade da corrente que flui pela solução será proporcional à quantidade de íons presentes. Com o aumento da condutividade elétrica da solução, existe uma diminuição significativa no diâmetro das nanofibras, enquanto que com baixa condutividade da solução, resulta em alongamento insuficiente do jato pela força elétrica para produzir fibras uniformes e livres de grânulos. A maioria dos polímeros podem ser considerados bons isolantes, conseqüentemente, as cargas residuais deixadas entre as fibras não dissipam facilmente, podendo influenciar no processo, principalmente quando grandes quantidades de fibras precisam ser coletadas. A presença de sais, ácidos e bases, bem como a adição de água, quando o solvente for um ácido orgânico, irá aumentar a condutividade da solução produzindo fibras livres de grânulos e com diâmetros relativamente menores que variam de 200 a 1000 nm (BHARDWAJ; KUNDU, 2010; RAMAKRISHNA, 2005).

Com relação aos parâmetros de processo, foi relatado que um aumento na tensão aplicada (isto é, através do aumento da intensidade do campo elétrico), aumenta a força eletrostática repulsiva sobre o jato de fluido que pode favorecer a redução do diâmetro da fibra. A vazão da solução determina a quantidade de solução disponível para o *electrospinning*. Geralmente o aumento da vazão favorece o aumento do diâmetro da fibra, muito embora exista um limite do diâmetro para o sucessivo aumento da vazão. Vazões elevadas também podem originar fibras com defeitos, devido à elevada quantidade de solvente que deve evaporar antes de alcançar a placa coletora. Baixas vazões impossibilitam a

manutenção do Cone de Taylor (MEGELSKI et al., 2002). Uma distância mínima é necessária para dar as fibras tempo suficiente para evaporar o solvente antes de atingir a placa coletora, caso contrário, com distâncias que são próximas ou afastadas demais, se observa a formação de gotas (KULKARNI; BAMBOLE; MAHANWAR, 2010).

Os parâmetros ambientais também podem afetar o processo de electrospinning. Maior umidade pode causar a presença de pequenos poros circulares na superfície das fibras, Se houver um aumento maior ainda na umidade, conduz coalescência aos poros. Verifica-se que em níveis muito baixos de umidade, um solvente volátil pode secar rapidamente com a evaporação do mesmo. Já a liberdade de movimento das cadeias poliméricas é maior em temperaturas elevadas, resultando na menor viscosidade da solução (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

Entre as diversas utilizações avaliadas para as nanofibras, destacam-se sua aplicação no transporte de fármacos (CANBOLAT; CELEBIOGLU; UYAR, 2014; JIANG; MO; YU, 2012; ZENG et al., 2005), na produção de *scaffolds* (materiais fabricados especificamente para a regeneração de tecidos ou órgãos) para engenharia de tecidos (CHAHAL; HUSSAIN; YUSOFF, 2013; DE MORAIS et al., 2010; MA et al., 2012), imobilização de enzimas e outras proteínas (EL-AASSAR, 2013; LEE et al., 2010; SINGH et al.), embalagens de alimentos (BIKIARIS; TRIANTAFYLLIDIS, 2013; FABRA; LOPEZ-RUBIO; LAGARON, 2013; GHADERI et al., 2014) entre outras.

Até o momento, são raros os estudos sobre a incorporação de C-ficocianina em estruturas micrométricas ou nanométricas, a fim de ampliar a sua estabilidade e sua aplicabilidade. Xiaoxia e Xuewu (2012) elaboraram com sucesso nanotubos de carbono/quitosana/C-ficocianina para utilização em terapia fotodinâmica e fototérmica. Já Yan et al., (2014) elaboraram microcápsulas de quitosana/alginato/C-ficocianina que proporcionaram maior estabilidade para a C-FC durante armazenamento e sua fácil liberação em condições levemente alcalinas.



**CAPÍTULO III**  
**DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO**



## **ARTIGO 1**

**CINÉTICAS E ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE C-FICOCIANINA EM RESINA DE  
ADSORÇÃO POR TROCA IÔNICA DEAE**



## CINÉTICAS E ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE C-FICOCIANINA EM RESINA DE ADSORÇÃO POR TROCA IÔNICA DEAE

### RESUMO

C-ficocianina possui diversas aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica e biomédica. Os fins fitoterápicos apresentados por este produto exigem uma elevada pureza, atingida através de diversas técnicas de purificação, aplicadas em sequência. Um destes processos de purificação de proteínas baseia-se em técnicas cromatográficas, tal como a cromatografia de troca iônica, que utiliza trocadores iônicos que adsorvem as proteínas como resultado de interações iônicas entre a superfície da proteína e o trocador. Para aumentar a efetividade dessa técnica, pode-se utilizar resinas e colunas de leito expandido que podem ser utilizadas com volumes maiores de trabalho. Um estudo detalhado da performance de adsorção é fundamental para um melhor entendimento do perfil de adsorção e para usar essa informação como uma ferramenta para o *design* e otimização de parâmetros operacionais. Neste trabalho, o efeito do pH e da temperatura sobre a adsorção de C-ficocianina em resina de troca iônica Streamline<sup>®</sup> DEAE para cromatografia de adsorção em leito expandido foi avaliada através do coeficiente de partição. Além disso, foram avaliadas as cinéticas e as isotermas de adsorção. Através das cinéticas de adsorção foi possível observar que o equilíbrio foi atingido após 140 min. O maior coeficiente de partição foi alcançado em pH de 7,5, nas temperaturas de 15 e 25°C. As isotermas de adsorção da C-ficocianina foram bem representadas pelo modelo de Langmuir, bem como os modelos de Freundlich e de Langmuir-Freundlich, onde os valores estimados para  $Q_m$  e  $K_d$  obtidos pela isoterma de Langmuir foram, respectivamente, 33,92 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,123 mg.mL<sup>-1</sup>. Com relação a cooperatividade, parâmetro apresentado pelo modelo de Langmuir-Freundlich, foi considerada como puramente independente para a resina avaliada.

**Palavras-chave:** adsorção, C-ficocianina, isotermas, parâmetros cinéticos.

## 1 INTRODUÇÃO

Ficobiliproteínas são proteínas solúveis em água, componentes do complexo antena fotossintético coletor de luz, de cor brilhante, altamente fluorescentes, presente em cianobactérias, algas vermelhas e criptofíceas. Estas proteínas são divididas em dois grandes grupos, com base nas suas cores, a ficoeritrina (vermelho) e a ficocianina (azul). As ficocianinas incluem C-ficocianina (C-FC), R-ficocianina (R-FC) e aloficocianina (KUDDUS et al., 2013).

Dentre as fontes existentes de C-FC, a cianobactéria *Spirulina platensis* recebe destaque, uma vez que a C-FC pode constituir até 20% em peso seco do conteúdo total de proteína deste micro-organismo (VONSHAK, 2002), sendo a ficobiliproteína mais abundante na *S. platensis*. O Brasil apresenta abundância de água e regiões com clima adequado para o cultivo de *Spirulina*. Na região Sul do país já há a existência de plantas-piloto para o cultivo desta microalga.

C-ficocianina possui diversas aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica e biomédica. Os fins fitoterápicos apresentados por este produto exigem uma elevada pureza, atingida através de diversas técnicas de purificação (ROMAY et al., 2003). Um dos processos de purificação de proteínas baseia-se em técnicas cromatográficas, tal como a cromatografia de troca iônica, que utiliza trocadores iônicos que adsorvem as proteínas como resultado de interações iônicas entre a superfície da proteína e o trocador (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

Para aumentar a efetividade dessa técnica, pode-se utilizar resinas e colunas de leito expandido que podem ser empregadas com volumes maiores de trabalho. A adsorção em leitos expandidos permite que as proteínas sejam recuperadas diretamente a partir de extratos de células rompidas, quando compostos intracelulares, sem a necessidade de remoção prévia dos sólidos em suspensão, que normalmente resultam no bloqueio dos leitos empacotados. A implementação desta técnica reduz consideravelmente a complexidade do processo de *downstream*, eliminando etapas como centrifugação, diálise, precipitação, sistema aquoso bifásico e filtração em gel, resultando em redução de custos e simplificação do processo de purificação e recuperação do bioproduto (CHASE, 1994).

Um estudo detalhado da performance de adsorção é fundamental para um melhor entendimento do perfil de adsorção e para usar essa informação como uma ferramenta para o *design* e otimização de parâmetros operacionais (LAN et al., 2001). A quantidade de um elemento adsorvido em razão da concentração remanescente na solução de equilíbrio, frequentemente pode ser representada por isotermas de adsorção; essas isotermas são

equações matemáticas usadas para descrever a adsorção sem, no entanto, fornecer informações sobre o mecanismo das reações envolvidas. Os modelos de isotermas mais comumente encontradas para adsorção de bioprodutos são as de Freundlich, a de Langmuir e de Langmuir-Freundlich. A técnica usada para gerar os dados de adsorção é, a princípio, bastante simples, pois uma quantidade conhecida do soluto é adicionada ao sistema contendo uma quantidade conhecida de adsorvente. Admite-se que a diferença entre a quantidade adicionada e a remanescente na solução encontra-se adsorvida na superfície adsorvente (ALLEONI; CAMARGO; CASAGRANDE, 1998).

A seleção das condições de adsorção de C-ficocianina é uma etapa importante para a sua purificação, utilizando técnicas de adsorção em leito expandido, uma vez que o aumento na adsorção do composto pelo trocador iônico proporcionaria uma redução dos custos do processo devido à redução das perdas e a utilização de volumes reduzidos do composto alvo e resina.

Há uma escassez de estudos relacionados ao comportamento da adsorção de C-ficocianina em resinas de troca iônica em leito expandido. Silveira et al. (2008) estudaram os efeitos do pH e da temperatura no coeficiente de partição, e determinaram a isoterma de adsorção nas melhores condições para a adsorção de C-ficocianina na resina de troca iônica Q-Sepharose FF, uma resina amplamente usada em leitos fixos. Adsorção em resina de leito expandido Streamline<sup>®</sup> DEAE foi avaliada por alguns autores como Bermejo et al., 2006, Ramos et al., 2010, Ramos et al., 2011 e Bermejo e Ramos, 2012, obtendo as isotermas de adsorção para C-ficocianina bruta e/ou extrato purificado para obter o parâmetro  $Q_m$ . Nestes estudos, o comportamento cinético não foi avaliado e o pH e a temperatura não foram otimizados para máxima adsorção.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos dos parâmetros de processo - temperatura e pH - na adsorção de C-ficocianina em resina de troca iônica para leito expandido Streamline<sup>®</sup> DEAE, bem como verificar as condições típicas de equilíbrio para a adsorção de C-ficocianina na resina de troca iônica.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção da biomassa, extração e quantificação da C-ficocianina

A cianobactéria *Spirulina platensis* LEB 52 foi cultivada e cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG. Ao término do cultivo, a biomassa foi

recuperada por filtração, seca, congelada e moída até um tamanho de partícula entre 0,106 e 0,125 mm de diâmetro, e adicionada ao solvente extrator na concentração de 0,16 g.mL<sup>-1</sup> (MORAES; BURKERT; KALIL, 2010). Após a extração, o caldo bruto contendo células foi centrifugado e ajustado o pH de acordo com as condições de cada experimento. A concentração de C-ficocianina foi calculada utilizando a Equação 1, descrita por Bennett e Bogorad (1973), com modificações no comprimento de onda:

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

Onde, C-FC é a concentração de C-ficocianina em mg.mL<sup>-1</sup> e A<sub>620</sub> e A<sub>652</sub> são as absorvâncias em 620 e 652 nm, respectivamente.

## 2.2 Adsorvente

Streamline<sup>®</sup> DEAE (GE Healthcare), um adsorvente adequado para utilização em leitos expandidos, foi avaliada para a adsorção de C-ficocianina. Este adsorvente é constituído por uma matriz de agarose macroporosa, com um núcleo de quartzo. É um trocador aniônico fraco, com grupo funcional -O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-N<sup>+</sup>(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>H. A faixa de pH de trabalho do trocador está compreendida entre 2 e 13 (Amersham Biosciences, 2002), e pode promover diferentes graus de expansão do leito, entre 2 e 3 vezes.

## 2.3 Curvas de cinética de adsorção

Os ensaios foram realizados em reatores de mistura a 25°C e pH 7,5 por 200 min. Nesse sistema adicionou-se 30 mL de extrato de C-ficocianina e 3 mL de resina de troca iônica Streamline<sup>®</sup> DEAE pré-equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,025M. Foram avaliadas nestes ensaios duas diferentes concentrações iniciais de C-ficocianina, de 2,5 e 3,0 mg.mL<sup>-1</sup>. Amostras foram retiradas em intervalos de tempo pré-determinados, calculando-se a concentração de C-ficocianina, conforme a Equação 1, com a subsequente construção da curva cinética de adsorção.

## 2.4 Efeito do pH no coeficiente de partição

Os ensaios foram realizados em reatores de mistura a 25°C por 200 min. Nesse sistema adicionou-se 20 mL de extrato de C-ficocianina e 2 mL de resina de troca iônica Streamline® DEAE pré-equilibrada no tampão respectivo ao pH de estudo e concentração de 0,025M. O pH do extrato de C-ficocianina foi ajustado aos valores de pH estudados (5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5). Foi feito um branco de cada ensaio, no qual C-ficocianina no pH de estudo era adicionada no sistema sem a resina de troca iônica. Foram retiradas amostras a 0 e 200 min. A concentração de C-FC foi calculada conforme a Equação 1.

Através da concentração inicial e da concentração final de C-ficocianina livre na fase líquida ( $C^*$ ), foi possível calcular a concentração no equilíbrio da C-ficocianina adsorvida na fase sólida ( $q^*$ ), definindo assim o coeficiente de partição ( $f$ ), o qual indica a fração de proteína adsorvida no equilíbrio. O coeficiente de partição foi calculado conforme Harsa e Furusaki (1994) como mostra a Equação 2. Os experimentos foram realizados em triplicata.

$$f = \frac{q^*}{C^*} \quad (2)$$

## 2.5 Efeito da temperatura no coeficiente de partição

Após determinação do tempo de equilíbrio e melhor pH de adsorção (fixado em 7,5), o efeito da temperatura no coeficiente de partição foi avaliado. Os ensaios foram realizados em reatores de mistura a 5°, 15° e 25°C por 200 min. Nesse sistema adicionou-se 20 mL de extrato de C-ficocianina e 2 mL de resina de troca iônica Streamline® DEAE pré-equilibrada em tampão fosfato de sódio de concentração 0,025M e pH 7,5. Um ensaio em branco foi realizado para cada condição, em que C-ficocianina na temperatura em estudo foi adicionada ao sistema sem a resina de troca iônica. Foram retiradas amostras a 0 e 200 min. As concentrações de C-ficocianina e os coeficientes de partição foram calculados de acordo com as Equações 1 e 2, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata.

## 2.6 Isotermas de adsorção

Os ensaios usados para determinar as isotermas de adsorção de equilíbrio foram realizados em reatores de mistura com agitação orbital contendo a resina de troca iônica Streamline® DEAE pré-equilibrada e o extrato de C-ficocianina com diferentes concentrações iniciais, ambos a pH 7,5 e 25°C, incubados durante 200 min. Após este período as amostras foram coletadas para determinar a concentração de C-ficocianina. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Isotermas de adsorção podem ser descritas em muitas formas matemáticas, algumas das quais são baseadas em um modelo físico simplificado de adsorção e dessorção, ao passo que outras são puramente empíricas e destinam-se a correlação com os dados experimentais. Diversas equações de isotermas, tais como os modelos de Langmuir, Freundlich e Langmuir-Freundlich, têm sido usadas para descrever as características de equilíbrio de adsorção. Se a adsorção de C-ficocianina é melhor descrita pelo modelo de Langmuir, o processo de adsorção pode ser expresso como:

$$q^* = \frac{Q_m \cdot C^*}{K_d + C^*} \quad (3)$$

Onde,  $Q_m$  representa a capacidade máxima de ligação da resina ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) e  $K_d$  representa a constante de equilíbrio de Langmuir ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), que é a constante de dissociação efetiva que representa a relação entre a adsorção e a dessorção. O modelo proposto baseia-se em uma superfície ideal e prevê que a superfície de adsorção é energeticamente ideal (BARBOZA; ALMEIDA; HOKKA, 2002).

Por outro lado, se a adsorção de C-ficocianina é melhor descrita o modelo de Freundlich, a isoterma pode ser descrita como:

$$q^* = k_f \cdot (C^*)^{1/n} \quad (4)$$

Onde,  $K_f$  e  $n$  são as constantes físicas de Freundlich, relacionadas com a capacidade e a intensidade de adsorção do adsorvente, respectivamente.

O modelo de Langmuir-Freundlich, proposto por Sips (1948), é uma forma combinada de modelos de Langmuir e Freundlich. O modelo de Langmuir-Freundlich (Equação 5) tem três parâmetros:  $Q_m$  representa a capacidade máxima de adsorção da

monocamada;  $K_{dLF}$  é a constante de dissociação aparente, e  $n_{LF}$  é o coeficiente de Langmuir-Freundlich que indica a presença ou ausência de cooperatividade.

$$q^* = \frac{Q_m (C^*)^{n_{LF}}}{K_{dLF} + (C^*)^{n_{LF}}} \quad (5)$$

Os modelos de Freundlich, Langmuir e Langmuir-Freundlich aplicados usando um método de regressão não-linear, foram utilizados para verificar o ajuste dos dados experimentais de equilíbrio, e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi utilizado para analisar o ajuste de cada modelo. Os parâmetros para os modelos podem ser calculados pelo método de regressão não-linear das expressões modelo.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

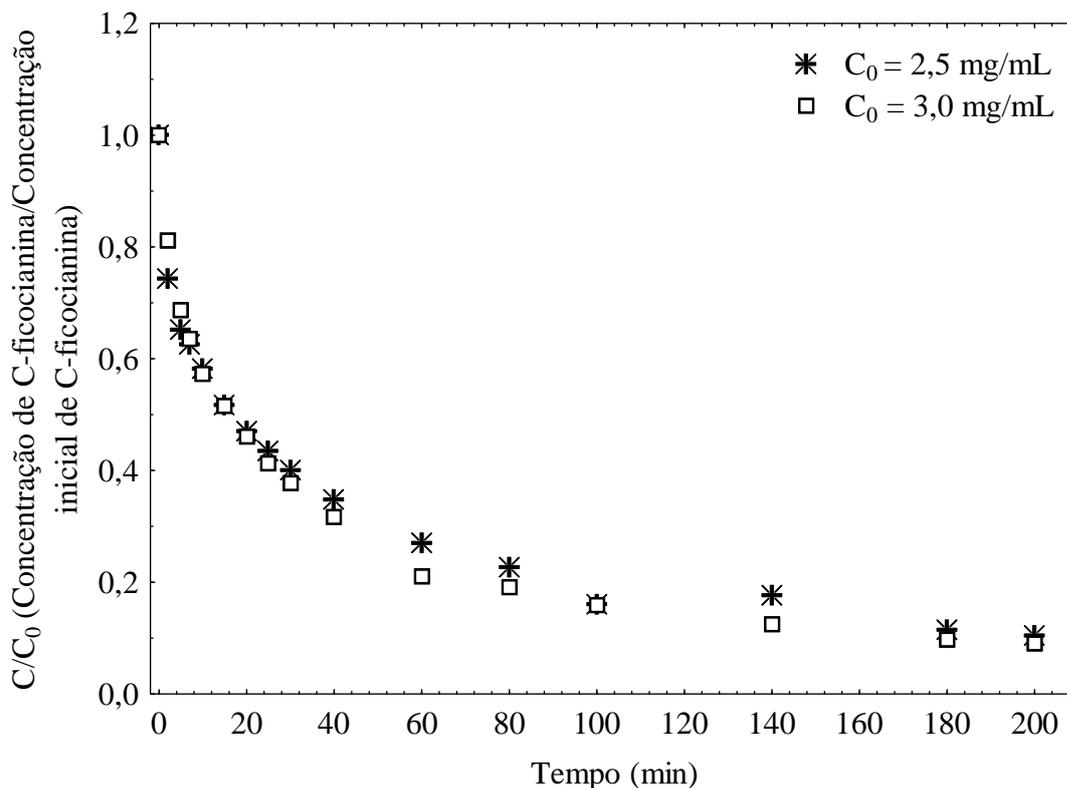
#### 3.1 Curvas de cinética de adsorção

A Figura 1 mostra o comportamento relativo à variação da concentração de C-ficocianina na fase líquida, ao longo do tempo para as diferentes concentrações iniciais, dentro dos valores de pH e temperatura selecionados, 7,5 e 25°C, respectivamente. É possível observar que no tempo de 140 minutos o equilíbrio havia sido atingido nas duas concentrações iniciais estudadas (2,5 e 3,0 mg.mL<sup>-1</sup>). Estes experimentos além de apresentarem o comportamento da adsorção ao longo do tempo, forneceram dados a respeito do tempo necessário para atingir o equilíbrio.

O tempo necessário para atingir o equilíbrio para a adsorção de C-ficocianina para a resina Streamline<sup>®</sup> DEAE, foi muito semelhante ao encontrado por Silveira et al. (2008), onde o equilíbrio foi atingido depois de 150 minutos para a adsorção de C-ficocianina sobre a resina Q-Sepharose Fast Flow<sup>®</sup> usada para o leito fixo.

Os ensaios efetuados sem a adição de qualquer resina mostraram que não houve desnaturação da C-ficocianina, durante o período de tempo estudado, no valor de pH de trabalho.

**Figura 1** - Cinética de adsorção de C-ficocianina em resina de troca iônica DEAE a diferentes valores de concentração inicial



### 3.2 Efeito do pH no coeficiente de partição

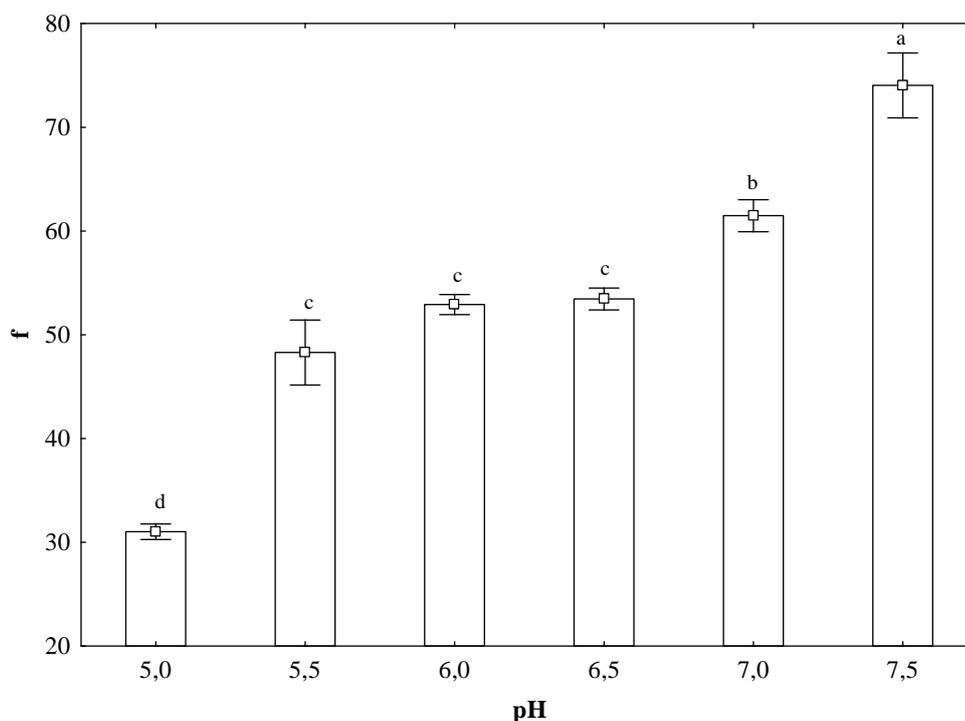
O coeficiente de partição correlaciona a quantidade de composto alvo que migra de uma fase para outra. No presente caso, o coeficiente de partição correlaciona a quantidade de C-ficocianina presente na fase sólida, ou adsorvido na resina, com a quantidade do mesmo bioproduto livre na solução no equilíbrio.

A Figura 2 apresenta o comportamento do coeficiente de partição com a variação de pH, para a adsorção de C-ficocianina em resina Streamline® DEAE. Os menores valores para o coeficiente de partição foram obtidos em pH mais baixos, sendo obtido o menor valor em pH 5,0.

A estrutura da C-ficocianina inclui uma parte proteica, e, conseqüentemente, a carga de superfície líquida da biomolécula pode variar de acordo com o valor do pH do meio. Quando acima do seu pI (ponto isoelétrico) a biomolécula será carregada negativamente. Por

outro lado, quando o pH é inferior ao pI da biomolécula esta apresentará carga líquida positiva. O ponto isoelétrico de C-ficocianina é entre 4,6-5,2 (ABALDE et al., 1998; SANTIAGO-SANTOS et al., 2004), e, assim, o extrato utilizado no presente estudo estava com a molécula alvo carregada negativamente o que justifica o emprego de um trocador aniônico. Logo, quando a C-FC entra em contato com o adsorvente a ligação formada entre o tampão e o adsorvente é mais fraca do que a ligação C-ficocianina-adsorvente, resultando em um processo de adsorção através da troca iônica. Quanto maior for o valor de pH, maior é a carga negativa líquida na biomolécula (até o momento que comece a desnaturação), resultando em coeficientes de partição maiores, tal como mostrado na Figura 2.

**Figura 2** - Comportamento (com erro médio) do coeficiente de partição ( $f$ ) para a adsorção de C-ficocianina em resina de troca iônica Streamline® DEAE em diferentes valores de pH



Letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente em nível de significância de 5% (Teste de Tukey)

No estudo realizado por Silveira et al. (2008), a influência do pH sobre o coeficiente de partição foi identificado também a pH 8,0 e 9,0, e, embora o coeficiente de partição foi ligeiramente superior a pH 8,0 do que a pH 7,5, os autores relataram que a C-ficocianina não era muito estável em pH 8,0, limitando o interesse para continuar os estudos de adsorção em uma condição onde existe uma perda de atividade biológica da proteína. Além disso, Silva et al. (2009) relataram que a concentração de C-FC diminuiu para

70% do seu valor inicial, em pH 8,0, à temperatura ambiente, e, portanto, por esse motivo, os valores de pH acima de 7,5 não foram incluídos no presente estudo. O maior coeficiente de partição para a resina utilizada foi obtido no pH 7,5, assim, este pH foi escolhido para continuidade do trabalho.

### 3.3 Efeito da temperatura no coeficiente de partição

O comportamento do coeficiente de partição nas temperaturas avaliadas está apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1** - Coeficientes de partição da adsorção de C-ficocianina em resina Streamline<sup>®</sup> DEAE, em diferentes temperaturas, com erro médio

Temperatura (°C)	Coeficiente de partição
5	39,5 ± 5,3 <sup>b</sup>
15	69,3 ± 2,9 <sup>a</sup>
25	76,8 ± 3,7 <sup>a</sup>

Letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente em nível de significância de 5% (Teste de Tukey)

A menor adsorção de C-ficocianina ocorreu na menor temperatura (5°C), enquanto a adsorção de C-ficocianina em 15 e 25°C foram iguais. Manera et al. (2008) observaram para adsorção de amiloglucosidase que redução na temperatura resultou em redução no coeficiente de partição. Assim, a temperatura de 25°C foi escolhida para os experimentos subsequentes, uma vez que a escolha desta temperatura iria reduzir os custos com resfriamento durante a purificação em larga escala em uma coluna de leito expandido. Além disso, de acordo com Sarada; Pillai e Ravishankar (1999) e Silva et al. (2009), C-ficocianina é estável a esta temperatura.

### 3.4 Isotermas de adsorção

Uma análise dos dados do equilíbrio é importante para desenvolver uma equação que possa ser utilizada no desenvolvimento de processos. Neste estudo, os três modelos de adsorção não-lineares clássicos, Langmuir, Freundlich e Langmuir-Freundlich foram utilizados para descrever o equilíbrio de adsorção de C-ficocianina.

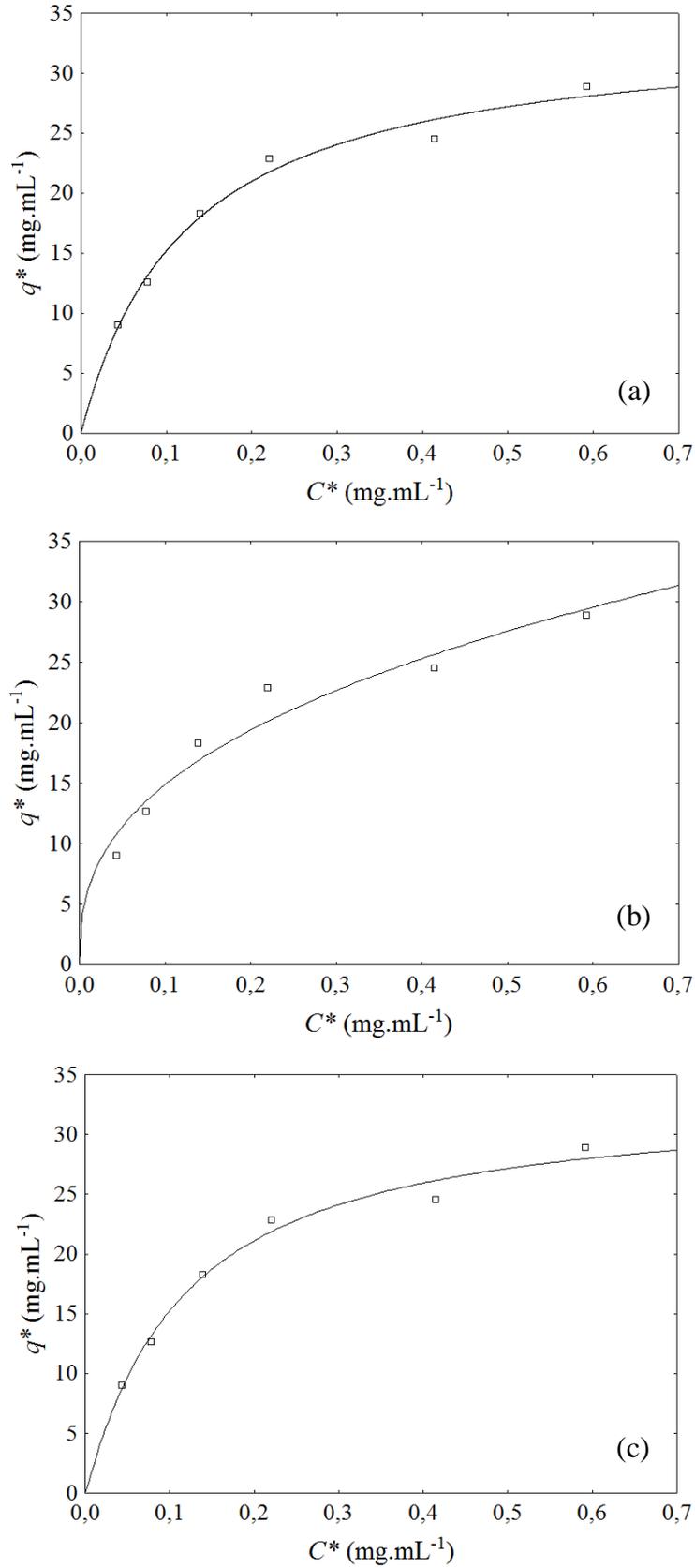
O modelo de Langmuir refere-se a sorção em monocamada em superfícies contendo um número finito de sítios idênticos, o que significa que os locais de ligação dos adsorventes são idênticos, e a molécula de proteína alvo apenas se liga aos locais de ligação (ROZIE et al., 1991). Outras hipóteses também são feitas para o modelo de Langmuir, como, por exemplo, que a reação seja reversível e inexistência de interação entre as espécies adsorvidas (NIE; CHEN; ZHU, 2007). Por esta razão, o modelo de Langmuir pressupõe uma adsorção homogênea.

A equação de Freundlich é uma relação empírica, onde é assumido que a energia de uma proteína quando ligada a um sítio em um adsorvente, depende da ocupação ou não dos sítios adjacentes.

Já a isoterma de Langmuir-Freundlich é uma simples generalização das duas isotermas (SIPS, 1948). Por analogia com as múltiplas interações proteína-ligante, tem sido sugerido que este modelo serve para modelar a cooperatividade da adsorção. Como a equação tem três termos de ajuste, é mais adequada para aproximar a adsorção de natureza heterogênea e explicar a cooperatividade da adsorção. Para sítios puramente independentes não-interativos, o valor da  $n_{LF} = 1$ . Quando  $n_{LF} > 1$ , cooperatividade positiva é sugerido, enquanto quando  $0 < n_{LF} < 1$ , uma cooperatividade negativa no processo de ligação é admitido. O valor de  $n_{LF}$  pode, assim, ser utilizado como um coeficiente empírico, representando o tipo e grau de cooperatividade presente na interação das ligações (SHARMA; AGARWAL, 2001).

A Figura 3 apresenta as isotermas de adsorção de C-ficocianina em resina Streamline<sup>®</sup> DEAE, segundo os modelos de Langmuir (2a), Freundlich (2b) e Langmuir-Freundlich (2c).

**Figura 3** - Isotermas de adsorção de C-ficocianina em resina Streamline® DEAE conforme equação de (a) Langmuir, (b) Freundlich e (c) Langmuir-Freundlich



A Tabela 2 apresenta as constantes de adsorção de Langmuir, Freundlich e Langmuir-Freundlich, com seus respectivos coeficientes de determinação, obtidos para as isotermas de adsorção de C-ficocianina em pH 7,5 e temperatura de 25°C, quando adsorvida por resina Streamline® DEAE.

**Tabela 2-** Comparação entre os parâmetros das isotermas de Langmuir, Freundlich e Langmuir-Freundlich para a adsorção de C-ficocianina em resina Streamline® DEAE

Modelo	Parâmetros	Streamline® DEAE
Langmuir	$Q_m$ (mg.mL <sup>-1</sup> )	33,92 ± 0,27
	$K_d$ (mg.mL <sup>-1</sup> )	0,123 ± 0,003
	$R^2$	0,983
Freundlich	$K_f$	35,94 ± 0,32
	$n$	2,61 ± 0,05
	$R^2$	0,947
Langmuir ó Freundlich	$Q_m$ (mg.mL <sup>-1</sup> )	33,08 ± 3,04
	$K_{DLF}$ (mg.mL <sup>-1</sup> )	0,106 ± 0,005
	$n_{LF}$	1,04 ± 0,04
	$R^2$	0,983

Analisando o modelo de Langmuir,  $K_d$  é o coeficiente de dissociação do complexo soluto-adsorvente, que representa a afinidade entre o soluto e os adsorventes (LAN et al., 2001). Silveira et al. (2008), estudaram a adsorção de C-ficocianina de *Spirulina platensis*, na resina de troca iônica Q Sepharose Fast Flow® em um leito fixo, e obtiveram os valores de  $Q_m$  e  $K_d$  de 22,67 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,031 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Os valores de  $Q_m$  para o mesmo suporte e produto alvo - Streamline® DEAE e C-ficocianina, respectivamente - para diferentes cianobactérias são variáveis, e os valores para  $Q_m$  de 0,8 mg.mL<sup>-1</sup> (BERMEJO et al., 2006), 1,6 mg.mL<sup>-1</sup> (BERMEJO; RAMOS, 2012), 1,74 mg.mL<sup>-1</sup> (RAMOS et al., 2010) e 5,2 mg.mL<sup>-1</sup> (RAMOS et al., 2011) podem ser encontrados na literatura. Assim, a resina Streamline® DEAE mostrou adsorção máxima 7 vezes maior do que o valor máximo mencionado acima, refletindo a importância de se estudar melhor as condições de adsorção, por exemplo, a influência do pH e da temperatura. Além disso, no presente estudo, foi utilizado um extrato com uma concentração inicial mais elevada de C-ficocianina, o que leva

a um aumento na capacidade de adsorção do corante pela resina. Isto é devido ao aumento da força motriz do gradiente de concentração, causado pelo aumento da concentração inicial do corante (CHIOU; LI, 2002).

Os valores para as constantes de Freundlich mostraram uma adsorção relativamente fácil de C-ficocianina em resina com elevada capacidade de adsorção. Especificamente (Tabela 2), o valor de  $n$ , que está relacionado com a distribuição da molécula ligada na superfície do adsorvente, foi maior do que uma unidade, indicando que a C-ficocianina foi favoravelmente adsorvida sob as condições experimentais aplicadas.

Para a isoterma de Langmuir-Freundlich, o valor de  $Q_m$  foi de  $33,08 \pm 3,04$   $\text{mg.mL}^{-1}$ , próximo ao valor encontrado quando utilizado o modelo de Langmuir. Outro parâmetro importante deste modelo é o  $n_{LF}$ , que representa a cooperatividade. O valor obtido para a resina DEAE ( $1,04 \pm 0,04$ ) demonstrou que a adsorção possui um efeito puramente independente, isto é, cada sítio de adsorção atua independentemente dos sítios adjacentes, e o ambiente em torno da molécula-alvo não influencia na sua ligação com o adsorvente. A cooperatividade depende da natureza da macromolécula e dos seus vários grupos funcionais, os quais normalmente produzem múltiplas interações (BRESOLIN; DE SOUZA; BUENO, 2010; SHARMA; AGARWAL, 2001).

As isotermas de adsorção obtidas para a adsorção de C-ficocianina pela resina Streamline<sup>®</sup> DEAE, seguiram as previsões feitas pelos modelos de Freundlich, Langmuir e Langmuir-Freundlich dentro da faixa de concentração estudada. Esta observação sugere que tanto a biosorção em monocamada como a adsorção em superfície heterogênea podem coexistir sob as condições experimentais utilizadas. Assim, a adsorção global da C-ficocianina pela resina de troca iônica é um processo complexo, que envolve mais do que um mecanismo, tal como a troca iônica, a complexação de superfície e a atração eletrostática.

Os coeficientes de determinação para os modelos de Langmuir, Freundlich e Langmuir-Freundlich para a regressão não-linear, foram de  $R^2 > 0,94$  (Tabela 2), caracterizando assim, o comportamento de adsorção como não-linear, conforme explicado pelos modelos. É conhecido que a isoterma de adsorção de Freundlich apresenta uma excelente representação de diversos conjuntos de dados para concentrações moderadas, enquanto que a equação de Langmuir é melhor para baixas concentrações (REDLICH; PETERSON, 1959). Além disso, Nie; Chen e Zhu (2007) relataram que uma limitação do modelo de Freundlich é que a quantidade de soluto adsorvido aumenta indefinidamente com a concentração do soluto na solução.

Na literatura, alguns autores, como Silveira et al. (2008), Bermejo et al. (2006) e Ramos et al. (2010), expressaram seus resultados para a adsorção de C-ficocianina deste modo, usando o modelo de Langmuir para planejar a construção dos processos de purificação. O modelo de Langmuir também foi utilizado para as isotermas de adsorção realizadas em vários tipos de resina de troca iônica para diferentes proteínas de interesse, como a adsorção do ácido clavulânico em Amberlite® IRA (BARBOZA; ALMEIDA; HOKKA, 2002) ou de amiloglicosidase em DEAE celulose (MANERA et al., 2008). Além disso, Bresolin; Fioritti e Buena (2011) utilizaram o modelo de Langmuir para cromatografia negativa em géis de agarose com ligantes à base de amina de poli-L-lisina imobilizados para adsorção de albumina do soro humano, e o modelo de Langmuir-Freundlich para descrever a isoterma de adsorção de imunoglobulina G no mesmo adsorvente.

#### 4 CONCLUSÃO

O estudo das condições de adsorção de C-ficocianina em resina Streamline® DEAE demonstrou que o equilíbrio cinético ocorreu a partir do tempo de 140 minutos. A maior adsorção ocorreu em pH 7,5 (coeficiente de partição de 76,8) e nas temperaturas de 15 e 25°C. A isoterma de adsorção da C-ficocianina em pH 7,5 e 25°C mostrou que os dados obtidos se adequam bem aos modelos propostos por Langmuir, Freundlich e Sips (Langmuir-Freundlich) e os valores  $Q_m$  e  $K_d$  da isoterma de Langmuir obtidos a partir de regressão não-linear, foram de 33,92 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,12 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALDE, J.; BETANCOURT, L.; TORRES, E.; CID, A.; BARWELL, C. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus sp.* IO9201. **Plant Science**, v. 136, n. 1, p. 109-120, Aug 7 1998.

ALLEONI, L. R. F.; CAMARGO, O. A.; CASAGRANDE, J. C. Isotermas de Langmuir e de Freundlich na descrição da adsorção de boro em solos altamente intemperizados. **Scientia Agricola**, v. 55, p. 379-387, 1998.

BARBOZA, M.; ALMEIDA, R. M. R. G.; HOKKA, C. O. Intrinsic kinetic parameters of clavulanic acid adsorption by ion-exchange chromatography. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 41, n. 23, p. 5789-5793, Nov 13 2002.

BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complementary Chromatic Adaptation in a Filamentous Blue-Green-Alga. **Journal of Cell Biology**, v. 58, n. 2, p. 419-435, 1973.

BERMEJO, R.; FELIPE, M. A.; TALAVERA, E. M.; ALVAREZ-PEZ, J. M. Expanded bed adsorption chromatography for recovery of phycocyanins from the microalga *Spirulina platensis*. **Chromatographia**, v. 63, n. 1-2, p. 59-66, Jan 2006.

BERMEJO, R.; RAMOS, A. Pilot Scale Recovery of Phycocyanin from *Spirulina platensis* Using Expanded Bed Adsorption Chromatography. **Chromatographia**, v. 75, n. 5-6, p. 195-204, Mar 2012.

BRESOLIN, I. T. L.; DE SOUZA, M. C. M.; BUENO, S. M. A. A new process of IgG purification by negative chromatography: Adsorption aspects of human serum proteins onto omega-aminodecyl-agarose. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 878, n. 23, p. 2087-2093, Aug 1 2010.

BRESOLIN, I. T. L.; FIORITTI, R. R.; BUENO, S. M. A. IgG purification by negative chromatography in amine-based ligands: A comparison of L-lysine and poly-L-lysine. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 2277-2285, Dec 2011.

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

CHIOU, M. S.; LI, H. Y. Equilibrium and kinetic modeling of adsorption of reactive dye on cross-linked chitosan beads. **Journal of Hazardous Materials**, v. 93, n. 2, p. 233-248, Jul 22 2002.

HARSA, S.; FURUSAKI, S. Separation of amyloglucosidase using Beta-cyclodextrin Chitosan. **Separation Science and Technology**, v. 29, n. 5, p. 639-650, 1994.

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

LAN, Q. D.; BASSI, A. S.; ZHU, J. X.; MARGARITIS, A. A modified Langmuir model for the prediction of the effects of ionic strength on the equilibrium characteristics of protein adsorption onto ion exchange/affinity adsorbents. **Chemical Engineering Journal**, v. 81, n. 1-3, p. 179-186, Jan 1 2001.

MANERA, A. P.; KAMIMURA, E. S.; BRITES, L. M.; KALIL, S. J. Adsorption of amyloglucosidase from *Aspergillus niger* NRRL 3122 using ion exchange resin. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 5, p. 1015-1024, Sep-Oct 2008.

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

NIE, H. L.; CHEN, T. X.; ZHU, L. M. Adsorption of papain on dye affinity membranes: Isotherm, kinetic, and thermodynamic analysis. **Separation and Purification Technology**, v. 57, n. 1, p. 121-125, Oct 1 2007.

PESSOA, A.; KILIKIAN, B. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Manole, 2005.

RAMOS, A.; ACIEN, F. G.; FERNANDEZ-SEVILLA, J. M.; GONZALEZ, C. V.; BERMEJO, R. Large-scale isolation and purification of C-phycocyanin from the

cyanobacteria *Anabaena marina* using expanded bed adsorption chromatography. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 783-792, Jun 2010.

RAMOS, A.; ACIEN, F. G.; FERNANDEZ-SEVILLA, J. M.; GONZALEZ, C. V.; BERMEJO, R. Development of a process for large-scale purification of C-phycoyanin from *Synechocystis aquatilis* using expanded bed adsorption chromatography. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 879, n. 7-8, p. 511-519, Mar 1 2011.

REDLICH, O.; PETERSON, D. L. A useful adsorption isotherm. **Journal of Physical Chemistry**, v. 63, n. 6, p. 1024-1024, 1959.

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

ROZIE, H.; SOMERS, W.; BONTE, A.; VANTRIET, K.; VISSER, J.; ROMBOUTS, F. M. Adsorption and desorption characteristics of bacterial alpha-amylases on cross-linked potato starch. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 13, n. 2, p. 181-195, Apr 1991.

SANTIAGO-SANTOS, M. C.; PONCE-NOYOLA, T.; OLVERA-RAMIREZ, R.; ORTEGA-LOPEZ, J.; CANIZARES-VILLANUEVA, R. O. Extraction and purification of phycoyanin from *Calothrix* sp. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2047-2052, Oct 29 2004.

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

SHARMA, S.; AGARWAL, G. P. Interactions of proteins with immobilized metal ions: A comparative analysis using various isotherm models. **Analytical Biochemistry**, v. 288, n. 2, p. 126-140, Jan 15 2001.

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

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

SIPS, R. On the structure of a catalyst surface. **Journal of Chemical Physics**, v. 16, n. 5, p. 490-495, 1948.

VONSHAK, A. *Spirulina Platensis Arthrospira: Physiology, Cell-Biology And Biotechnology*. Taylor & Francis, 2002.



**ARTIGO 2**  
**CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE C-FICOCIANINA DE *Spirulina platensis***  
**POR PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO**



## CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE C-FICOCIANINA DE *Spirulina platensis* POR PROCESSO DE ULTRAFILTRAÇÃO

### RESUMO

Em todo o mundo, a busca por aditivos naturais tem aumentado. Cianobactérias, como a *Spirulina platensis*, podem apresentar uma biomassa rica em pigmentos naturais, como os carotenóides, as clorofilas e as ficobiliproteínas. Dentre as ficobiliproteínas, destaca-se a C-ficocianina que é usada como corante em alimentos e cosméticos. Para estas aplicações a C-ficocianina precisa apresentar uma pureza igual ou superior a 0,7. A tecnologia de separação por membranas tem importância no tratamento de biomoléculas por ser aplicável em larga escala e por apresentar baixa complexidade de aplicação. Além disso, esta técnica é normalmente realizada à temperatura ambiente, o que minimiza o dano térmico para o produto. Para melhor utilização desta técnica, é recomendado avaliar a influência das condições operacionais. Neste trabalho foi avaliada a purificação de C-ficocianina até grau alimentar, utilizando a técnica de separação por membrana de ultrafiltração. Foi realizada a seleção da membrana a ser utilizada através de ensaios comparativos entre uma membrana de retenção nominal de 50 kDa e uma de 100 kDa, concluindo-se que a de 50 kDa apresentou melhores condições de purificação. Com a membrana selecionada foi realizado um delineamento experimental fracionário para identificar qual a influência dos parâmetros pH, temperatura, pressão e aplicação de diferentes números de ciclos de diafiltração sobre a purificação e recuperação da C-ficocianina. Através dos resultados obtidos identificou-se que somente a aplicação de diferentes ciclos de diafiltração causaram influência significativa sobre as características do extrato final. Para avaliar a influência da aplicação da diafiltração, foram realizados ensaios aumentando gradativamente a quantidade de ciclos aplicados, onde verificou-se que a aplicação de 6 ciclos de diafiltração foi o ideal para obter C-ficocianina com maior pureza (0,91) e menor perda na recuperação. Por último, foi avaliado a aplicação da diafiltração previamente a etapa de ultrafiltração/concentração, onde verificou-se um aumento na eficiência da purificação, possibilitando a obtenção de extratos de C-ficocianina com pureza em torno de 0,95, caracterizando o produto como C-ficocianina de grau alimentar.

**Palavras-chave:** purificação, C-ficocianina, ultrafiltração, diafiltração.

## 1 INTRODUÇÃO

Embora vários corantes sintéticos sejam considerados seguros, os consumidores estão cada vez mais interessados em produtos naturais, que causam menores danos à saúde humana e ao meio ambiente, e podem possuir propriedades funcionais ou terapêuticas. Pode ser constatado que a utilização de aditivos sintéticos nos países desenvolvidos tem sido reduzida gradativamente, devido aos riscos de câncer e alergias, sendo assim substituídos por corantes naturais (MARTELLI et al., 2014). Entre os micro-organismos com capacidade de produção de corantes naturais destacam-se as cianobactérias, em especial a *Spirulina platensis*. Pode-se classificar a *S. platensis* como uma cianobactéria azul-esverdeada que possui pigmentos fotossintéticos incluindo clorofila a, luteína, -caroteno, ficocianina e aloficocianina, sendo estes os maiores componentes bioativos na microalga (CHEN; ZHANG; GUO, 1996).

A C-ficocianina (C-FC) é um pigmento fotossintético acessório de cor azul da família das ficobiliproteínas, que absorve a luz em torno do comprimento de onda de 620 nm e emite fluorescência em torno de 640 nm. Ela é uma ficobiliproteína com massa molecular entre 60 e 240 kDa composta por duas subunidades e , que estão presentes em mesmo número, mas a quantidade exata de pares e que constituem a molécula pode variar entre as espécies (GLAZER; STRYER, 1983; MACCOLL, 1998; ROMAY et al., 2003).

Esse pigmento pode ser utilizado como corante natural de alimentos como iogurtes, *milk-shakes* e sorvetes, bebidas, sobremesas e também em cosméticos (SIMPSON et al., 2012). Além de sua utilização nas indústrias alimentícia e de cosméticos, estudos demonstram que a C-ficocianina possui atividade antioxidante (BHAT; MADYASTHA, 2001; ESTRADA; BESCOS; DEL FRESNO, 2001), anti-inflamatória e antitumoral (REDDY et al., 2003; ZHANG et al., 2011) e um grande potencial contra diabetes (OU et al., 2013) e hipertensão (ICHIMURA et al., 2013).

O custo de produtos com C-ficocianina varia amplamente e é dependente do grau de pureza, que é definido como a relação da absorvância a 620 nm e 280 nm ( $A_{620}/A_{280}$ ) (CISNEROS; RITO-PALOMARES, 2004). Os métodos de extração e purificação desempenham papéis importantes em relação à pureza e ao rendimento da C-ficocianina. Diversas técnicas já foram previamente utilizadas para purificação de C-ficocianina obtida de cianobactérias (ANTELO et al., 2010; MINKOVA et al., 2003; SINGH; PARMAR; MADAMWAR, 2009). Precipitação com sulfato de amônio (SILVA et al., 2009) e aplicação de ultrafiltração (CHAIKLAHAN et al., 2011; JAOUEN et al., 1999) podem ser utilizados

para obter C-ficocianina de grau alimentar, enquanto a aplicação de diferentes técnicas em conjunto com técnicas cromatográficas podem propiciar a obtenção de C-ficocianina de grau analítico (HERRERA et al., 1989; MINKOVA et al., 2003; MORAES; KALIL, 2009).

Os processos de separação por membranas são considerados uma alternativa econômica para atingir elevada produtividade e pureza, ao mesmo tempo. A ultrafiltração (UF) é o processo de separação por membranas mais utilizado na purificação de proteínas (GOLUNSKI et al., 2011). Estes processos apresentam como vantagens não requerem aditivos ou mudanças de fases e podem ser realizados isotermicamente em baixas temperaturas e pressões, com menor consumo de energia. Asseguram o mínimo de desnaturação, desativação e/ou degradação dos bioprodutos que são altamente instáveis (CUI, 2005; SAXENA et al., 2009).

Vários parâmetros influenciam no comportamento da ultrafiltração de proteínas, tais como pH (BURNS; ZYDNEY, 1999), temperatura (CHOLLANGI; HOSSAIN, 2007; PACE et al., 1976), pressão (CHOLLANGI; HOSSAIN, 2007) e aplicação de diafiltração (LI; H-KITTIKUN; YOURAVONG, 2009), influenciando diretamente no fluxo e eficiência do processo. No entanto, estudos mais amplos sobre a influência destes parâmetros na purificação de C-ficocianina através de processos de separação por membranas não foram encontrados até o momento.

Considerando o exposto anteriormente, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da retenção nominal das membranas, do pH, da temperatura, da pressão de operação e da etapa de diafiltração na purificação de C-ficocianina utilizando a técnica de ultrafiltração.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Biomassa, extração e quantificação de C-ficocianina

A cianobactéria *Spirulina platensis* LEB 52 foi cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG. Ao término do cultivo, a biomassa foi recuperada por filtração, seca, congelada e moída e adicionada ao solvente extrator (água) na concentração de 0,16 g.mL<sup>-1</sup> (MORAES; BURKERT; KALIL, 2010). Após a extração, o caldo bruto contendo células foi centrifugado e ajustado o pH de acordo com as condições de cada experimento. A concentração de C-ficocianina foi calculada utilizando a Equação 1, descrita por Bennett e Bogorad (1973), com modificações no comprimento de onda:

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

Onde, C-FC é a concentração de C-ficocianina e  $A_{620}$  e  $A_{652}$  são as absorvâncias do extrato em 620 e 652 nm, respectivamente.

## 2.2 Sistema de ultrafiltração

Os ensaios de ultrafiltração foram realizados em célula laboratorial do tipo convencional (Figura 1), pressurizada com nitrogênio, de volume útil de 200 mL, agitada por barra magnética suspensa a 5 mm da superfície da membrana, para simulação do escoamento em fluxo tangencial. O sistema foi mantido em temperatura controlada de acordo com cada experimento. Foram alimentados em todos os experimentos extrato clarificado de C-FC.

**Figura 1** - Célula de ultrafiltração utilizada na concentração e purificação da C-ficocianina



## 2.3 Purificação e concentração de C-ficocianina por ultrafiltração convencional

### 2.3.1 Seleção da membrana

Para determinar a membrana a ser utilizada nos ensaios de ultrafiltração foram avaliadas duas membranas com diferentes retenções nominais e materiais (50 kDa de polietersulfona e 100 kDa de celulose regenerada) à temperatura de 25°C, pressão de 1,5 kgf.cm<sup>-2</sup> e pH 7,5. Foram utilizadas as membranas sem uso e após uma regeneração química, composta pela aplicação de NaOH 6%, tampão pH 7,0 e ácido fosfórico 0,01% em sequência. O ponto final de cada experimento foi definido como a redução em cinco vezes do volume alimentado de extrato de C-FC. Para cada experimento foi determinado o fator de purificação e a recuperação de C-ficocianina no retido e o fluxo de permeado.

### 2.3.2 Avaliação das condições da UF através de delineamento experimental

Com a membrana de retenção nominal de 50 kDa de polietersulfona foi utilizado delineamento experimental fracionário 2<sup>4-1</sup>, para verificar a influência da variação da temperatura, do pH, da pressão e do número de ciclos de diafiltração (recarga do sistema com tampão fosfato de sódio 25mM no pH de trabalho correspondente a cada ensaio) sobre o fator de purificação e a recuperação de C-ficocianina. As faixas de estudo foram determinadas de acordo com a literatura e estudos prévios e os níveis das variáveis estão apresentados na Tabela 1. O ponto final de cada experimento foi definido como a redução em cinco vezes do volume alimentado de extrato de C-FC.

**Tabela 1** - Níveis das variáveis independentes utilizadas no delineamento experimental para ultrafiltração de C-FC

Variáveis independentes/níveis	-1	0	+1
Temperatura (°C)	4,0	14,5	25
pH	6,0	6,5	7,0
Pressão (kgf.cm <sup>-2</sup> )	1,0	1,5	2,0
Ciclos de diafiltração	0	2	4

### 2.3.3 Variação do número de ciclos de diafiltração na UF da C-ficocianina

De acordo com os resultados obtidos no delineamento experimental (Tabela 2), foram realizados ensaios variando o número de ciclos de diafiltração na célula de

ultrafiltração, utilizando a membrana com retenção nominal de 50 kDa. Foram avaliados 4, 6, 8 e 10 ciclos e sua influência sobre o fator de purificação e a recuperação de C-ficocianina e sobre o fluxo de permeado. Os ensaios foram realizados no pH de 6,5, pressão de 1,0 kgf.cm<sup>-2</sup> e temperatura de 25 °C. Foi utilizado o tampão fosfato de sódio 25mM e pH 6,5. O ponto final de cada ciclo foi o tempo de 40 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicata.

## 2.4 Fator de purificação, recuperação de C-ficocianina e retenção da membrana

O fator de purificação foi calculado de acordo com a Equação 2:

$$FP = \frac{PE_{\text{final}}}{PE_{\text{inicial}}} \quad (2)$$

Onde PE<sub>final</sub> é a pureza do extrato de ficocianina retido e PE<sub>inicial</sub> é a pureza do extrato alimentado ao processo.

A pureza do extrato de C-FC é calculada de acordo com a Equação 3:

$$PE = \frac{A_{620}}{A_{280}} \quad (3)$$

Onde A<sub>620</sub> é a absorvância máxima da C-ficocianina e A<sub>280</sub> é a absorvância máxima das proteínas totais.

A recuperação (%) de C-ficocianina foi calculada de acordo com a Equação 4:

$$REC = \frac{(V_{\text{final}} \cdot [C-FC_{\text{final}}])}{(V_{\text{inicial}} \cdot [C-FC_{\text{inicial}}])} \cdot 100 \quad (4)$$

Onde V<sub>final</sub> é o volume de extrato de C-FC retido; [C-FC<sub>final</sub>] é a concentração de C-ficocianina no retido; V<sub>inicial</sub> é o volume de extrato de C-FC alimentado e [C-FC<sub>inicial</sub>] é a concentração de C-ficocianina no extrato alimentado.

A retenção da membrana foi calculada de acordo com a Equação 5:

$$R = \left(1 - \frac{C_p}{C_A}\right) \cdot 100 \quad (5)$$

Onde,  $C_p$  é a concentração de C-FC ou de proteína total no permeado e  $C_A$  é a concentração de C-FC ou de proteína total na alimentação.

## 2.5 Avaliação estatística

Para avaliação dos resultados foi realizada análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

# 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

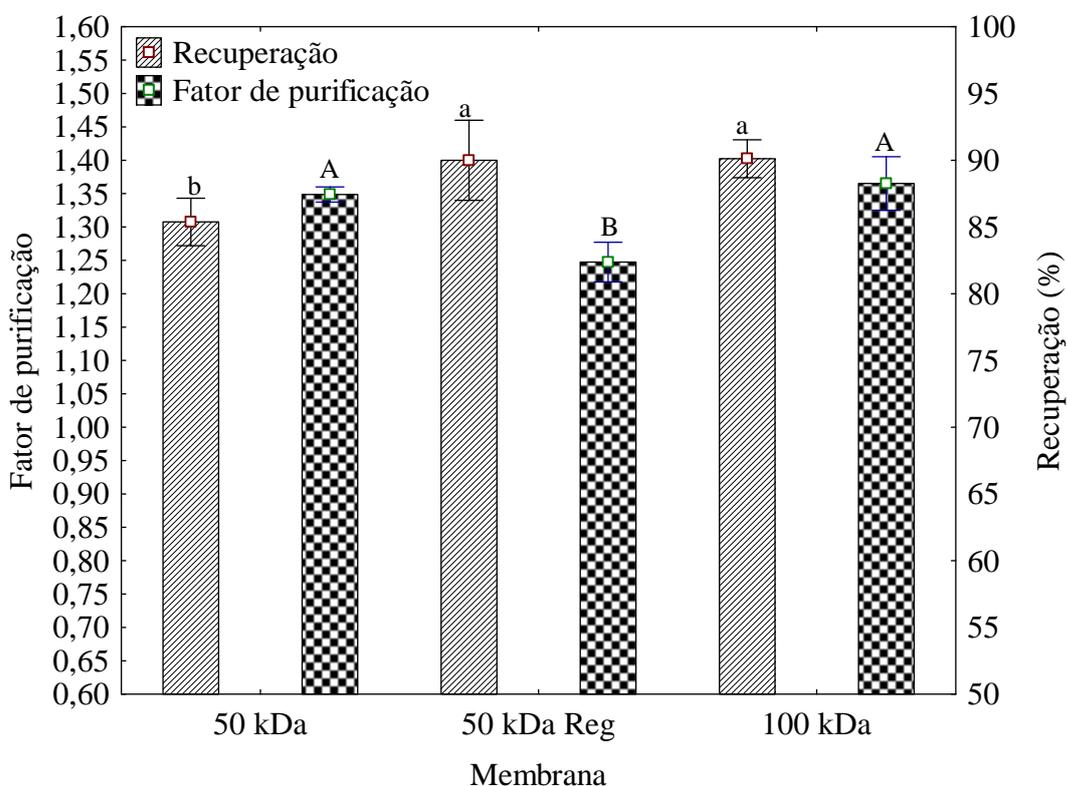
## 3.1 Seleção da membrana

Para seleção da membrana de ultrafiltração foram realizados experimentos com membranas sem uso e membranas regeneradas após já terem sido utilizadas de ultrafiltração. Quando foi utilizada uma membrana de 50 kDa foi obtido um fator de purificação de 1,35 e uma recuperação de 85% e quando a membrana foi reutilizada o fator de purificação obtido foi de 1,25 e a recuperação de 90%, valor significativamente menor do fator de purificação em comparação com a membrana sem uso nas mesmas condições de processo. Para a membrana de 100 kDa foi observado um fator de purificação de 1,37 e uma recuperação de 90% na primeira utilização. A recuperação semelhante entre as membranas de 50 kDa regenerada e 100 kDa sem uso pode ser atribuída a uma regeneração insuficiente, por não ter sido realizada uma otimização desta etapa, permitindo assim que resíduos proteicos possam ter permanecido nos poros da membrana, reduzindo o tamanho efetivo dos poros. Já durante a realização da regeneração da membrana foram encontrados danos na mesma que impossibilitaram sua reutilização.

A menor recuperação observada para a membrana de 50 kDa pode ser atribuída ao material do qual é composta (polietersulfona), que causa uma maior polarização da membrana, aumentando o *fouling*, por ser mais hidrofóbico que a celulose regenerada (QU et al., 2010), constituinte da membrana de 100 kDa. Isso significa que a C-FC pode ter permanecido retida na membrana. Este fato pode ser corroborado pela Figura 3, onde observa-se maior redução de fluxo na membrana de 50 kDa (72,22%) quando comparado com a membrana de 100 kDa (57,1%) (Fig. 3.).

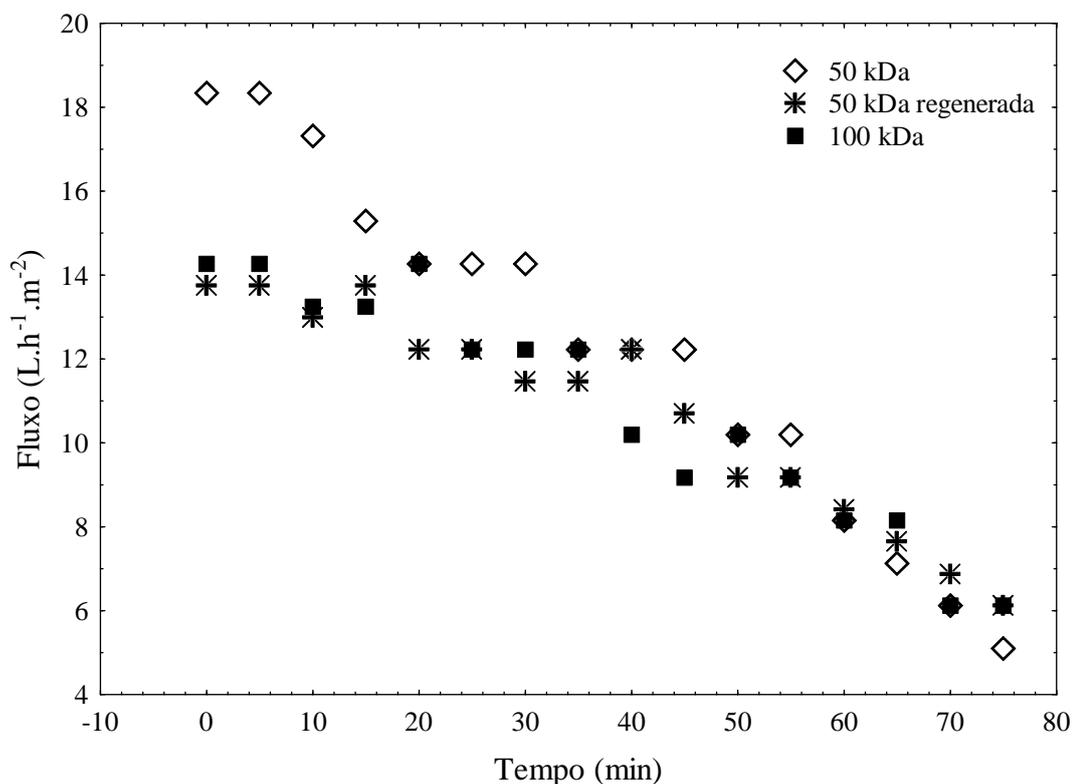
KO e PELLEGRINO (1992) mostraram que membranas de celulose regenerada hidrofílicas foram sutilmente afetadas pelo *fouling* por adsorção durante a ultrafiltração de proteínas, enquanto foi observado que as proteínas foram encontradas adsorvidas em membrana hidrofóbica de policarbonato.

**Figura 2** - Fator de purificação e recuperação de C-ficocianina expressos como valores médios com erro padrão para as membranas de 50 kDa (sem uso e regenerada) e 100 kDa (sem uso)



Letras minúsculas iguais para o fator de purificação não diferem ao nível de 95% de confiança ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas iguais para a recuperação não diferem ao nível de 95% de confiança ( $p < 0,05$ )

**Figura 3** - Fluxo de permeado utilizando as membranas de 50 kDa (sem uso e regenerada) e 100 kDa



Com os dados experimentais obtidos, foi selecionada para continuidade do trabalho a membrana de 50 kDa de polietersulfona. Esta seleção foi baseada nos valores de fator de purificação, que não apresentaram diferença significativa entre as membranas, assim como também foi relatado por Chaiklahan et al. (2011) que não observaram diferença significativa para o fator de purificação entre membranas de 50 e 100 kDa. Essa escolha também levou em consideração a impossibilidade de regeneração da membrana de 100 kDa pelo método químico empregado e o custo menor da membrana de 50 kDa. A recuperação de C-ficocianina da membrana de 50 kDa foi 5,5% menor do que a de 100 kDa, porém se manteve acima de 85%, valor maior que os obtidos por Singh, Parmar e Madamwar (2009) na etapa de ultrafiltração de C-FC.

### 3.2 Delineamento experimental

Com a membrana selecionada de 50 kDa de polietersulfona, foi realizado delineamento experimental fracionário  $2^{4+1}$  compreendendo 8 ensaios com 3 pontos centrais. Neste delineamento foram avaliados os parâmetros de processo: temperatura, pH, pressão e número de ciclos de diafiltração, sobre a purificação e a recuperação de C-ficocianina. A Tabela 2 apresenta a matriz do planejamento completo com os valores codificados e reais e os dados de fator de purificação e recuperação da C-FC.

As faixas de temperatura (4,0 - 25°C) e pH (6,0 - 7,0) avaliadas foram selecionadas de acordo com a estabilidade da C-ficocianina nestes valores (PUMAS et al., 2011; SARADA; PILLAI; RAVISHANKAR, 1999). Os valores de pressão (1,0 - 2,0 kgf.cm<sup>-2</sup>) foram selecionados de acordo com estudos preliminares e o número de ciclos (0 - 4) foi selecionado segundo Singh, Parmar e Madamwar (2009), que utilizaram 4 ciclos para ultrafiltração de C-ficocianina.

**Tabela 2** - Matriz do planejamento fracionário com os valores codificados e reais e os dados de fator de purificação e recuperação da C-FC

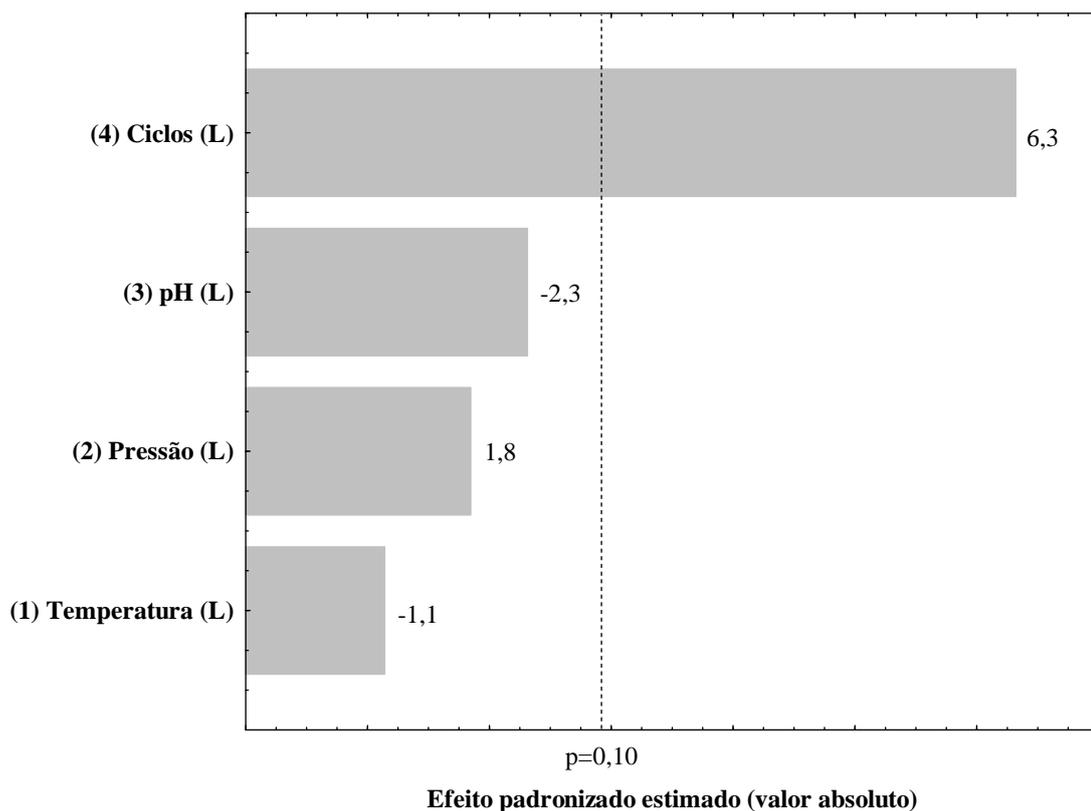
Ensaio	T (°C)	P (kgf.cm <sup>-2</sup> )	pH	Ciclos	Fator de purificação	Recuperação (%)
1	-1(4,0)	-1(1,0)	-1(6,0)	-1(0)	1,38	86,2
2	1(25,0)	-1(1,0)	-1(6,0)	1(4)	1,54	92,1
3	-1(4,0)	1(2,0)	-1(6,0)	1(4)	1,72	90,2
4	1(25,0)	1(2,0)	-1(6,0)	-1(0)	1,42	99,0
5	-1(4,0)	-1(1,0)	1(7,0)	1(4)	1,53	89,0
6	1(25,0)	-1(1,0)	1(7,0)	-1(0)	1,36	95,3
7	-1(4,0)	1(2,0)	1(7,0)	-1(0)	1,35	59,8
8	1(25,0)	1(2,0)	1(7,0)	1(4)	1,54	91,1
9	0(14,5)	0(1,5)	0(6,5)	0(2)	1,52	89,6
10	0(14,5)	0(1,5)	0(6,5)	0(2)	1,47	82,3
11	0(14,5)	0(1,5)	0(6,5)	0(2)	1,57	93,1

A recuperação de C-FC variou entre 59,8 e 99,0%, sendo este máximo atingido no ensaio 4, com temperatura no nível +1 (25,0 °C), pressão no nível +1 (2,0 kgf.cm<sup>-2</sup>), pH no nível -1 (6,0) e número de ciclos no nível -1 (0 ciclos). Os valores de pureza do extrato de C-FC em todos os ensaios foram superiores a 0,7, tendo-se assim, alcançado a pureza de grau

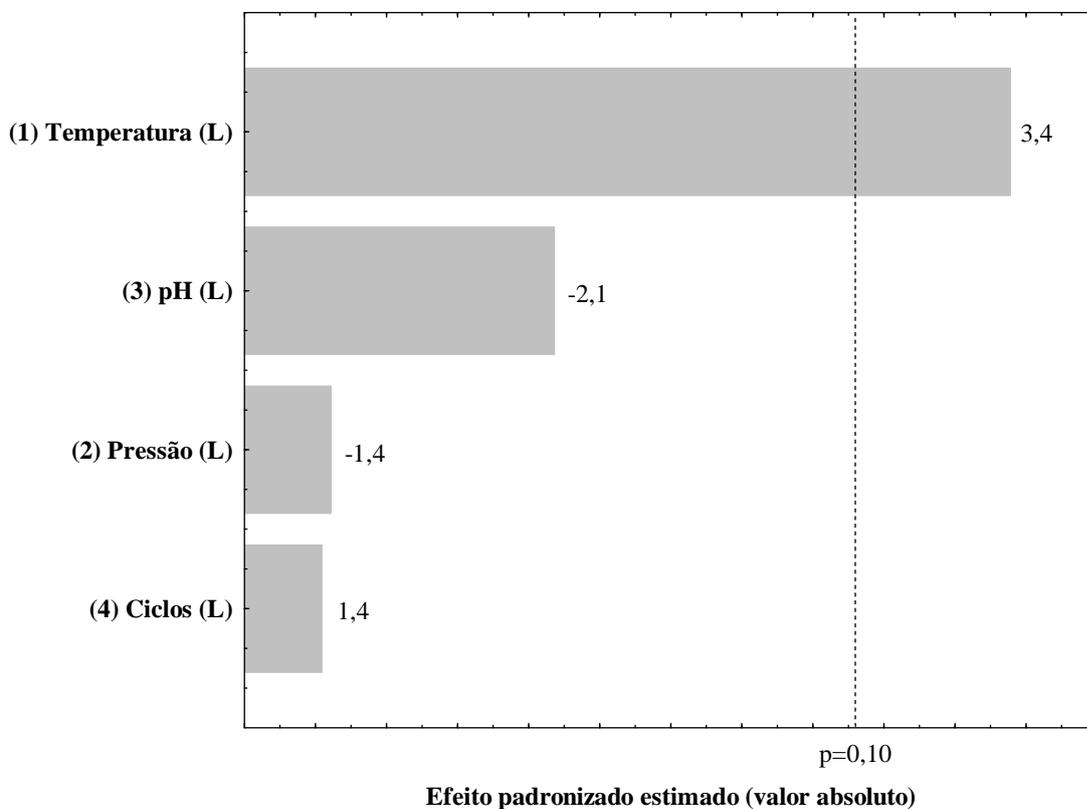
alimentar de acordo com Rito-Palomares, Nunez e Amador (2001). A pureza do extrato variou entre 0,70 e 0,82, sendo este maior valor de pureza obtido no ensaio 3, onde também se obteve o maior fator de purificação. A concentração final de C-ficocianina em todos os ensaios foi semelhante, partindo de uma solução inicial com concentração de  $4,26 \pm 0,75 \text{ mg.mL}^{-1}$  e ao fim do processo com concentração de  $17,02 \pm 1,32 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

Uma estimativa do efeito principal é obtida pela avaliação da diferença no processo causada pela alteração do menor (-1) para o maior (+1) nível do fator estudado (HAALAND, 1989). Para confirmar a significância dos fatores avaliados foram utilizados os gráficos de Pareto (Figuras 4 e 5). Para o fator de purificação foi obtido um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,94 e para a recuperação este valor foi de 0,96.

**Figura 4** - Diagrama de Pareto para análise dos efeitos referentes ao fator de purificação de C-ficocianina



**Figura 5** - Diagrama de Pareto para análise dos efeitos referentes à recuperação de C-ficocianina



Os resultados obtidos demonstraram que o único parâmetro que influenciou significativamente sobre o fator de purificação foi o número de ciclos de diafiltração e sobre a recuperação foi a temperatura. O pH e a pressão utilizados não causaram influência significativa sobre as respostas, podendo ser estabelecidos de acordo com a melhor estabilidade da C-ficocianina e condição de trabalho mais econômica. A utilização de 4 ciclos aumentou o fator de purificação, devido provavelmente à ressuspensão dos sólidos na superfície da membrana e a re-homogeneização do meio, possibilitando uma redução na polarização e na incrustação, permitindo assim que contaminantes que anteriormente tenham se acumulado na membrana possam atravessá-la.

O aumento na recuperação de C-ficocianina foi obtido na maior temperatura de estudo (25 °C). Esse efeito pode ser atribuído a uma maior retenção devido a um pequeno aumento na massa molar da C-FC com o aumento de temperatura identificado por Scheer e Kufer (1977). Outro parâmetro que pode ter contribuído para esse aumento foram os valores de fluxo médio maiores obtidos nos experimentos nesta temperatura (Tabela 3), que podem

causar uma redução no *fouling*, devido à menor viscosidade do extrato na maior temperatura (SUN et al., 2011), reduzindo a quantidade de C-FC que fica retida na superfície da membrana. Segundo Vincent-Vela et al. (2012) o *fouling* resistente presente no início do processo e a resistência da camada de torta formada na membrana se reduzem com aumento da temperatura, entretanto, acima de uma determinada temperatura esse efeito não é mais identificado.

**Tabela 3** - Valores de fluxo médio ( $L.h^{-1}.m^{-2}$ ) para todos os ciclos dos ensaios do delineamento experimental de ultrafiltração de C-FC

ENSAIO	CICLOS				
	Ciclo 0	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4
1	6,28	-	-	-	-
2	11,38	15,28	15,28	18,90	18,34
3	6,93	9,57	11,00	11,00	11,58
4	10,51	-	-	-	-
5	7,10	9,04	10,70	10,39	10,09
6	9,84	-	-	-	-
7	7,25	-	-	-	-
8	11,72	16,69	21,40	19,36	18,34
9	7,50	8,44	10,62	-	-
10	7,47	11,00	11,58	-	-
11	7,90	9,86	11,89	-	-

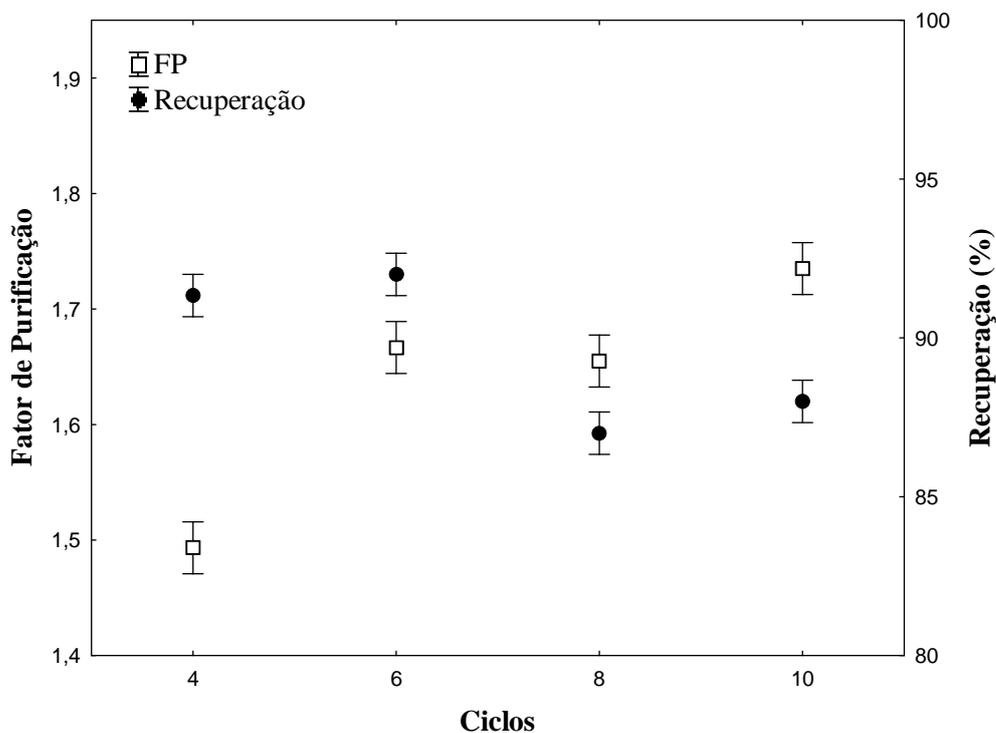
### 3.3 Variação de ciclos

Através do delineamento experimental foi possível verificar que os parâmetros que causaram influência significativa no fator de purificação e na recuperação de C-FC foram a variação no número de ciclos e a temperatura, respectivamente. Assim, com o objetivo de aumentar o fator de purificação, realizaram-se ensaios variando o número de ciclos de separação e fixando as condições de temperatura em 25 °C, em que se obteve os maiores valores de recuperação de C-FC no ensaio anterior, de pressão em 1,0  $kgf.cm^{-2}$  e de pH em 6,5.

Na Figura 6 é possível verificar que passando de 4 para 6 ciclos possibilitou aumento significativo no fator de purificação da C-FC, passando de 1,49 para 1,65, no

entanto, o aumento de 6 para 10 ciclos não apresentou acréscimo significativo neste fator. Isto pode ser atribuído à passagem da maioria das partículas contaminantes menores que a retenção nominal da membrana (50 kDa) nos 6 primeiros ciclos. Para a recuperação, a aplicação de 4 e 6 ciclos são iguais estatisticamente e maiores que 90% (Figura 6), ao se aplicarem 8 e 10 ciclos houve redução significativa na recuperação de C-ficocianina, atingindo os valores de 88 e 87%, respectivamente. Esta redução pode ser atribuída à possibilidade que os fragmentos menores de C-ficocianina (monômeros) tenham atravessado a membrana, a partir do momento que outras partículas de tamanho menor já tenham sido permeadas anteriormente.

**Figura 6** - Valores de fator de purificação e recuperação da C-ficocianina com a aplicação de diferentes ciclos de recarga de tampão



A partir da Tabela 4 é possível notar que o fluxo aumenta com a realização dos ciclos, de 77 até 85%, sendo verificado que esse aumento cessa e se torna estável à partir da realização de 4 ciclos. Isto pode ser atribuído possivelmente à diluição do extrato causado pela adição de tampão, que proporcionaria uma redução das incrustações na membrana (LI; YOURAVONG; H-KITTIKUN, 2006). Outra razão foi que a precipitação da proteína na membrana é mais evidente no modo de concentração direta do que no modo de diafiltração conforme identificado por Dewitt e Morrissey (2002).



**Tabela 4** - Valores dos fluxos médios dos ensaios de ultrafiltração com variação do número de ciclos de recarga de tampão

Ensaio	Valores de fluxo médio (L.h <sup>-1</sup> .m <sup>-2</sup> )										
	Ciclo 0	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4	Ciclo 5	Ciclo 6	Ciclo 7	Ciclo 8	Ciclo 9	Ciclo 10
4 ciclos	10,24	13,37	15,49	17,17	18,19	-	-	-	-	-	-
6 ciclos	12,46	16,94	19,84	19,66	20,38	21,14	21,17	-	-	-	-
8 ciclos	12,76	17,27	19,64	20,38	20,78	21,80	21,78	21,83	22,11	-	-
10 ciclos	11,16	13,53	15,89	17,54	18,53	18,64	18,64	19,07	20,90	20,78	20,71

Através destes resultados é possível afirmar que a aplicação de 6 ciclos de recarga da célula é a quantidade ideal para aumentar o fator de purificação do processo, sendo obtido com este ensaio um grau de pureza do extrato de 0,91, sem haver perda significativa na recuperação da C-ficocianina mantida em 92%.

Os ciclos de recarga de tampão após a operação de ultrafiltração foram avaliados para se obter a melhor operação. A fim de se obter um produto com uma maior pureza foi realizado a aplicação dos ciclos de recarga antes da concentração por ultrafiltração, podendo ser comparado com os ensaios realizados anteriormente (ultrafiltração seguida de ciclos de recarga de tampão).

Verificou-se que houve diferença significativa entre a aplicação de ciclos de recarga da célula antes e após a ultrafiltração para o fator de purificação. Através da aplicação da diafiltração previamente à concentração, foi possível obter um fator de purificação de  $1,79 \pm 0,03$ , valor este 8% acima do processo em que se utilizou diafiltração após a concentração do extrato, e ao mesmo tempo manteve-se um valor de recuperação acima de 90% para os dois métodos.

Esta melhora na purificação pode se dar possivelmente pela menor polarização na membrana causada pela adição do tampão logo no início do processo, assim como foi identificado por Li, H-Kittikun e Youravong (2009). Baldasso, Barros e Tessaro (2011) identificaram que a diafiltração tem alta eficiência quando aplicada com pequenos volumes de alimentação e elevado número de ciclos. Foi constatado que o *fouling* causado por proteínas não depende de seu tamanho individual, mas da sua capacidade de formar agregados (GÜELL; DAVIS, 1996), e o aumento na concentração de proteínas pode causar o aumento

da agregação (CROMWELL; HILARIO; JACOBSON, 2006). Agregados proteicos depositados sobre a superfície da membrana e moléculas adicionais podem conduzir à formação de uma multi-camada de incrustações na superfície da membrana. Devido à propriedade coloidal da camada de proteína, o *fouling* não pode ser removido pela passagem de tampão (LI; H-KITTIKUN; YOURAVONG, 2009).

A recuperação na aplicação do modo de diafiltração prévio a concentração não se alterou estatisticamente, se mantendo acima de 90%, valor maior que os obtidos por Singh, Parmar e Madamwar (2009) e Chaiklahan et al. (2011), que não alcançaram 85% de recuperação. Nestas condições de processo foi avaliada a retenção da membrana, onde se obteve para a retenção de C-ficocianina um valor de 95,5% e para as proteínas totais este valor foi de 87,3%, demonstrando que uma parte das proteínas contaminantes atravessaram a membrana proporcionando o aumento de pureza identificado.

O extrato obtido apresentou um grau de pureza de 0,95, podendo assim ser caracterizado como C-ficocianina de grau alimentar. A pureza alcançada por este trabalho foi maior que as obtidas por Kamble et al. (2013) e Silva et al. (2009), ao utilizarem precipitação com sulfato de amônio e diálise, e a obtida por Antelo et al. (2010) que utilizaram sistema aquoso bifásico, com a vantagem de que na ultrafiltração não é necessário a adição de agentes químicos, e próxima a de Chaiklahan et al. (2011), que utilizaram ultrafiltração tangencial. Silveira et al. (2008) também conseguiram obter C-FC de grau alimentar mas utilizando o método cromatográfico de troca iônica.

#### 4 CONCLUSÃO

Este estudo permitiu selecionar a membrana com retenção nominal de 50 kDa como a mais indicada para a purificação de C-ficocianina utilizando ultrafiltração. Através de delineamento experimental, ficou comprovado que a temperatura e aplicação de diafiltração causaram influência significativa sobre a recuperação e o fator de purificação da C-ficocianina, respectivamente. A realização de 6 ciclos de diafiltração, previamente a concentração, foi indicado como a condição ideal para obter o maior fator de purificação, sem ocasionar redução significativa na recuperação do bioproduto. Nestas condições foi possível obter um extrato de C-ficocianina com pureza de 0,95, caracterizada como grau alimentar.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination*, v. 278, n. 163, p. 381-386, 2011.

BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green-alga. **Journal of Cell Biology**, v. 58, n. 2, p. 419-435, 1973.

BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection against oxidative damage to DNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, n. 2, p. 262-266, Jul 13 2001.

BURNS, D. B.; ZYDNEY, A. L. Effect of solution pH on protein transport through ultrafiltration membranes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 64, n. 1, p. 27-37, Jul 5 1999.

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

CHEN, F.; ZHANG, Y. M.; GUO, S. Y. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 5, p. 603-608, May 1996.

CHOLLANGI, A.; HOSSAIN, M. M. Separation of proteins and lactose from dairy wastewater. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, n. 5, p. 398-404, May 2007.

CISNEROS, M.; RITO-PALOMARES, M. A simplified strategy for the release and primary recovery of c-phycoyanin produced by *Spirulina maxima*. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 18, n. 4, p. 385-390, Dec 2004.

CROMWELL, M. M.; HILARIO, E.; JACOBSON, F. Protein aggregation and bioprocessing. **The AAPS Journal**, v. 8, n. 3, p. E572-E579, 2006/09/01 2006.

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

DELHI NUTRACEUTICALS. <http://www.delhinutraceuticals.com/phycoyanin.html>, acessado em Janeiro de 2014.

DEWITT, C. A. M.; MORRISSEY, M. T. Pilot plant recovery of catheptic proteases from surimi wash water. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 3, 2002.

ESTRADA, J. E. P.; BESCOS, P. B.; DEL FRESNO, A. M. V. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **Farmaco**, v. 56, n. 5-7, p. 497-500, May-Jul 2001.

GLAZER, A. N.; STRYER, L. Fluorescent tandem phycobiliprotein conjugates - emission wavelength shifting by energy-transfer. **Biophysical Journal**, v. 43, n. 3, p. 383-386, 1983.

GOLUNSKI, S.; ASTOLFI, V.; CARNIEL, N.; DE OLIVEIRA, D.; DI LUCCIO, M.; MAZUTTI, M. A.; TREICHEL, H. Ethanol precipitation and ultrafiltration of inulinases from *Kluyveromyces marxianus*. **Separation and Purification Technology**, v. 78, n. 3, p. 261-265, Apr 29 2011.

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

HAALAND, P. D. **Experimental Design in Biotechnology**. Taylor & Francis, 1989.

HERRERA, A.; BOUSSIBA, S.; NAPOLEONE, V.; HOHLBERG, A. Recovery of c-phycoyanin from the cyanobacterium *Spirulina maxima*. **Journal of Applied Phycology**, v. 1, n. 4, p. 325-331, 1989/12/01 1989.

ICHIMURA, M.; KATO, S.; TSUNEYAMA, K.; MATSUTAKE, S.; KAMOGAWA, M.; HIRAO, E.; MIYATA, A.; MORI, S.; YAMAGUCHI, N.; SURUGA, K.; OMAGARI, K. Phycocyanin prevents hypertension and low serum adiponectin level in a rat model of metabolic syndrome. **Nutrition Research**, v. 33, n. 5, p. 397-405, 2013.

JAOUEN, P.; LEPINE, B.; ROSSIGNOL, N.; ROYER, R.; QUEMENEUR, F. Clarification and concentration with membrane technology of a phycocyanin solution extracted from *Spirulina platensis*. **Biotechnology Techniques**, v. 13, n. 12, p. 877-881, Dec 1999.

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

KO, M. K.; PELLEGRINO, J. J. Determination of osmotic pressure and fouling resistance and their effects of performance of ultrafiltration membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 74, n. 162, p. 141-157, 1992.

LI, Z.; H-KITTIKUN, A.; YOURAVONG, W. Purification of protease from pre-treated tuna spleen extract by ultrafiltration: An altered operational mode involving critical flux condition and diafiltration. **Separation and Purification Technology**, v. 66, n. 2, p. 368-374, 2009.

LI, Z.; YOURAVONG, W.; H-KITTIKUN, A. Separation of proteases from yellowfin tuna spleen by ultrafiltration. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 18, p. 2364-2370, 2006.

MACCOLL, R. Cyanobacterial phycobilisomes. **Journal of Structural Biology**, v. 124, n. 2-3, p. 311-334, Dec 15 1998.

MARSHALL, A. D.; MUNRO, P. A.; TRÄGÅRDH, G. Influence of permeate flux on fouling during the microfiltration of  $\beta$ -lactoglobulin solutions under cross-flow conditions. **Journal of Membrane Science**, v. 130, n. 162, p. 23-30, 1997.

MARTELLI, G.; FOLLI, C.; VISAI, L.; DAGLIA, M.; FERRARI, D. Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 154-159, 2014.

MINKOVA, K. M.; TCHERNOV, A. A.; TCHORBADJIEVA, M. I.; FOURNADJIEVA, S. T.; ANTOVA, R. E.; BUSHEVA, M. C. Purification of C-phycocyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. **Journal of Biotechnology**, v. 102, n. 1, p. 55-59, Apr 10 2003.

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

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

OU, Y.; LIN, L.; YANG, X. G.; PAN, Q.; CHENG, X. D. Antidiabetic potential of phycocyanin: Effects on KKAY mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 5, p. 539-544, May 2013.

PACE, G. W.; SCHORIN, M. J.; ARCHER, M. C.; GOLDSTEIN, D. J. The effect of temperature on the flux from a stirred ultrafiltration cell. **Separation Science**, v. 11, n. 1, p. 65-77, 1976/01/01 1976.

PUMAS, C.; VACHARAPIYASOPHON, P.; PEERAPORNPISAL, Y.; LEELAPORNPISID, P.; BOONCHUM, W.; ISHII, M.; KHANONGNUCH, C. Thermostability of phycobiliproteins and antioxidant activity from four thermotolerant cyanobacteria. **Phycological Research**, v. 59, n. 3, p. 166-174, Jul 2011.

QU, P.; TANG, H. W.; GAO, Y. A.; ZHANG, L. P.; WANG, S. Q. Polyethersulfone composite membrane blended with cellulose fibrils. **Bioresources**, v. 5, n. 4, p. 2323-2336, 2010.

REDDY, M. C.; SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S. V. K.; BHAT, V. B.; SRINIVAS REDDY, P.; KIRANMAI, G.; MADYASTHA, K. M.; REDDANNA, P. C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 304, n. 2, p. 385-392, 2003.

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

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

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

SAXENA, A.; TRIPATHI, B. P.; KUMAR, M.; SHAHI, V. K. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, n. 1-2, p. 1-22, Jan 30 2009.

SCHEER, H.; KUFER, W. Studies on plant bile-pigments .4. conformational studies on c-phycoyanin from *Spirulina platensis*. **Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences**, v. 32, n. 7-8, p. 513-519, 1977.

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

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

SIMPSON, B. K.; NOLLET, L. M. L.; TOLDRÁ, F.; BENJAKUL, S.; PALIYATH, G.; HUI, Y. H. **Food Biochemistry and Food Processing**. Wiley, 2012.

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

SUN, H.; QI, D.; XU, J.; JUAN, S.; ZHE, C. Fractionation of polysaccharides from rapeseed by ultrafiltration: Effect of molecular pore size and operation conditions on the membrane performance. **Separation and Purification Technology**, v. 80, n. 3, p. 670-676, 2011.

TANG, C. Y.; PENG, Y. Fouling of ultrafiltration membrane during secondary effluent filtration. **Desalination and Water Treatment**, v. 30, n. 1-3, p. 289-294, 2011/06/01 2011.

VINCENT-VELA, M.-C.; CUARTAS-URIBE, B.; ÁLVAREZ-BLANCO, S.; LORA-GARCÍA, J. Analysis of an ultrafiltration model: Influence of operational conditions. **Desalination**, v. 284, n. 0, p. 14-21, 2012.

ZHANG, L. X.; CAI, C. E.; GUO, T. T.; GU, J. W.; XU, H. L.; ZHOU, Y.; WANG, Y.; LIU, C. C.; HE, P. M. Anti-cancer effects of polysaccharide and phycoyanin from *Porphyra yezoensis*. **Journal of Marine Science and Technology-Taiwan**, v. 19, n. 4, p. 377-382, Aug 2011.

### **ARTIGO 3**

**OBTENÇÃO DE C-FICOCIANINA DE GRAU ALIMENTAR ATÉ GRAU ANALÍTICO UTILIZANDO DIFERENTES SEQUÊNCIAS DE PURIFICAÇÃO**



## **Obtenção de C-ficocianina de grau alimentar até grau analítico utilizando diferentes sequências de purificação**

### **RESUMO**

Quando um bioproduto de alto valor necessita de uma pureza específica para ser utilizado, torna-se interessante o estudo de metodologias que permitam a obtenção desta pureza com alta recuperação do produto e baixo custo. A adsorção em leito expandido e a ultrafiltração permitem a eliminação de uma etapa de clarificação, e também produzem um extrato concentrado e parcialmente purificado pronto para a próxima etapa de purificação. Com isto, a avaliação da aplicação destes métodos em conjunto com outros métodos de purificação, incluindo diferentes sequências é de grande interesse para as indústrias de biotecnologia. C-ficocianina (C-FC) é um corante azul natural extraído de cianobactérias como *Spirulina platensis*, e possui muitas aplicações comerciais em alimentos e cosméticos. Estudos recentes demonstraram que a C-FC possui propriedades hepatoprotetora, anti-inflamatória e antioxidante, antitumorais e potencial contra diabetes e hepatite. Devido à distribuição limitada na natureza, e ao elevado custo de obtenção, resultante da dificuldade de purificação do processo, estes pigmentos são bastante caros e sua obtenção assim como de compostos puros é uma tarefa potencialmente atrativa. Este trabalho propõe estabelecer a melhor sequência a ser utilizada na purificação e recuperação de C-ficocianina de diferentes graus de pureza para diversas aplicações. Foram avaliadas a aplicação de ultrafiltração, precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica em leito expandido e leito fixo, em diferentes combinações de sequências e seu efeito sobre a purificação e a recuperação da C-ficocianina. Com as etapas aplicadas, foi possível obter C-FC para uso como corante alimentício, para uso como corante em cosméticos, de grau reativo para uso em biomarcadores e de grau analítico, indicado para uso terapêutico e em biomedicina. Concluiu-se que foram obtidos com sucesso diferentes sequências de etapas de processo para obtenção de C-ficocianina com diversos graus de pureza. Comparando as etapas cromatográficas, a cromatografia em leito expandido apresentou fator de purificação mais elevado que a cromatografia em leito fixo, com a vantagem de trabalhar com o extrato bruto contendo células, dispensando uma etapa de clarificação. O processo a ser utilizado vai depender do grau de pureza requerido para o extrato, sendo possível a obtenção de C-FC com pureza entre 0,75 e 1,5, de 1,5 a 2,5, de 2,5 a 3,5 e acima de 4,0, com recuperação mínima de 41,6%.

**Palavras-chave:** C-ficocianina, purificação, recuperação, *design*, leito expandido

## 1 INTRODUÇÃO

As fontes microbianas a partir dos quais as proteínas são obtidas são geralmente complexas, contendo biomassa e sólidos dissolvidos de vários tamanhos e massas moleculares. Dependendo da finalidade, é necessário a obtenção de uma substância com um definido grau de pureza. Esta condição raramente pode ser alcançada com uma única etapa de purificação, mas é geralmente obtida com uma combinação de diferentes operações unitárias que representam as diferentes necessidades de separação (ANSPACH et al., 1999).

O grande desafio dos processos de purificação de proteínas é a adequação da melhor técnica ao processo e a transferência da metodologia para a escala de produção, garantindo que o produto final tenha todas as características para sua aplicação em humanos, para diagnóstico ou uso veterinário (HO et al., 2000). Quando a pureza desejada é especificada, o objetivo do processo a ser elaborado é a obtenção de uma recuperação máxima ao mais baixo custo, com a obtenção do produto com a qualidade necessária. A seleção dos passos deste processo é chamado de *design*. O aperfeiçoamento do *design* de um processo envolve a substituição e alteração de suas etapas, a fim de se desenvolver a sequência mais indicada para obtenção do produto desejado (WHEELWRIGHT, 1989).

C-ficocianina (C-FC) é um pigmento fotossintético do grupo das ficobiliproteínas, presentes em cianobactérias, algas vermelhas e criptomonas. Além de sua utilização como corante em alimentos (MARTELLI et al., 2014), a C-FC age como um estimulante do sistema imunológico (ERIKSEN, 2008), possui capacidade como agente antitumoral e anti-inflamatório (REDDY et al., 2003), no tratamento do mal de Alzheimer e mal de Parkinson (RIMBAU et al., 2001) e contra hipertensão (ICHIMURA et al., 2013). Também pode ser utilizada como traçador bioquímico em microscopia e citometria em função de suas propriedades fluorescentes (VONSHAK, 2002).

A razão de pureza para C-ficocianina é dada pela relação entre a absorção máxima visível e a absorção a 280 nm, quando esta é superior a 4,0, este bioproduto apresenta grau analítico, no entanto, quando este valor é superior a 0,7, o mesmo pode ser utilizado como um biocorante na indústria de alimentos e cosméticos (ABALDE et al., 1998; PATIL et al., 2006). O custo da C-ficocianina de grau alimentar

(pureza maior do que 0,7) é de cerca de US\$ 0,35 por grama, enquanto que o custo de grau analítico (pureza superior a 4,0) chega a US\$ 4.500,00 por grama (DELHI NUTRACEUTICAS, 2014).

A purificação de um produto biotecnológico envolve em geral as etapas de precipitação, centrifugação, ultrafiltração, sistema aquoso bifásico, ou a combinação destes (LING et al., 2004), seguidos de uma ou mais etapas cromatográficas, como principalmente cromatografia de troca iônica, de afinidade, de interação hidrofóbica ou de adsorção. A finalização geralmente é feita com uma etapa de filtração em gel, secagem, cristalização ou liofilização do produto de interesse (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

Diversos autores avaliaram o desenvolvimento de processos para a obtenção de C-FC purificada (BERMEJO; RAMOS, 2012; MORAES; KALIL, 2009; SONG; ZHAO; WANG, 2013), entretanto a utilização de cromatografia de troca iônica em leito expandido, utilizando extrato bruto contendo diversos contaminantes como células, resíduos celulares e outras proteínas é raramente aplicada. A obtenção de processos de purificação que consigam, através de um mínimo de etapas, fornecer C-FC classificada de acordo com os diversos graus de pureza, é de alto valor industrial e comercial.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer a melhor sequência a ser utilizada na purificação e recuperação de C-ficocianina de diferentes graus de pureza para diversas aplicações.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

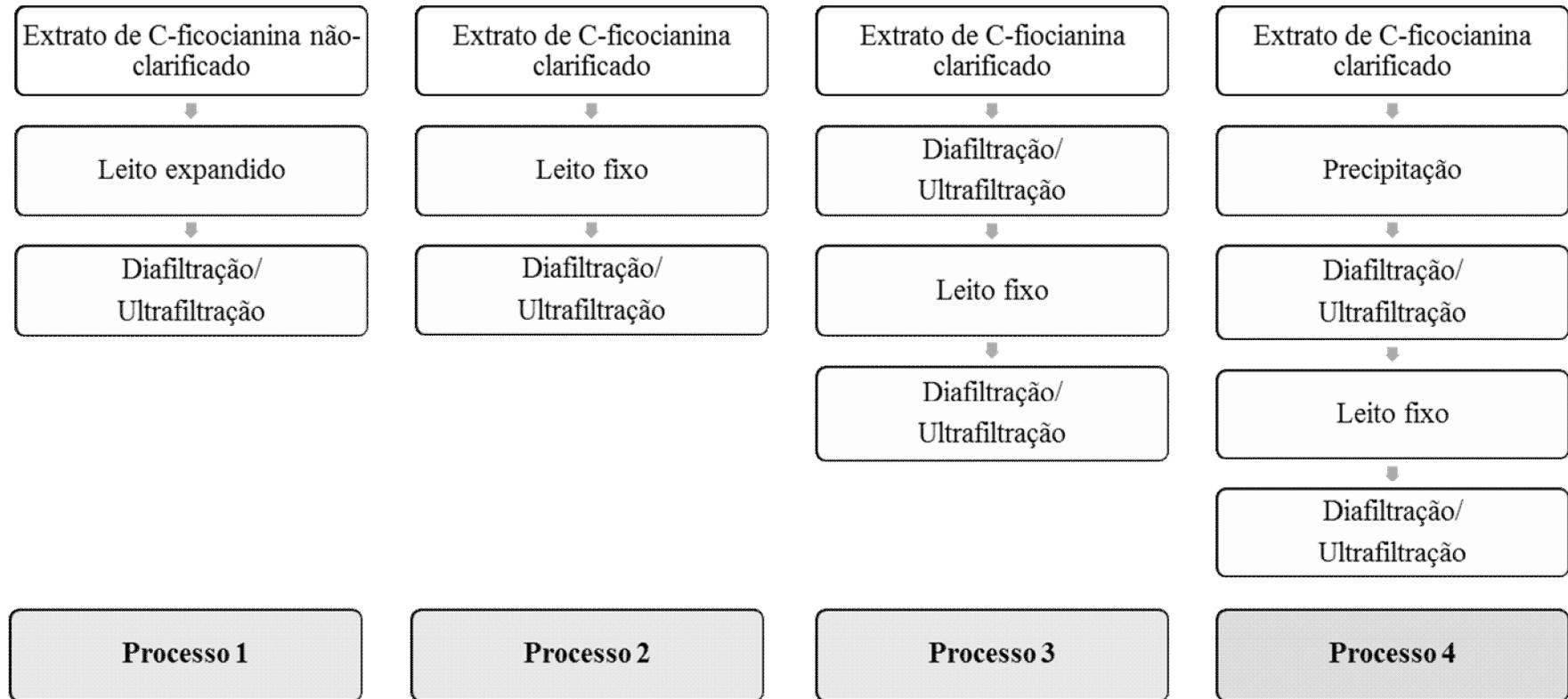
### **2.1 Obtenção da biomassa e extração da C-Ficocianina**

A cianobactéria *Spirulina platensis* LEB 52 foi cultivada e cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG. Ao término do cultivo, a biomassa foi recuperada por filtração, seca, congelada e moída até um tamanho de partícula entre 0,106 e 0,125 mm de diâmetro, e adicionada ao solvente extrator na concentração de 0,16 g/mL (MORAES; BURKERT; KALIL, 2010).

### **2.2 Processos de obtenção de C-ficocianina com diferentes graus de pureza**

Para a obtenção de C-ficocianina em diferentes graus de pureza foram utilizadas as seguintes técnicas de purificação, individualmente e em diferentes sequências: ultrafiltração, precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica em leito fixo e cromatografia de troca iônica em leito expandido, conforme apresentado na Figura 1.

**Figura 1:-** Diagrama esquemático dos processos estudados (1, 2, 3 e 4) para purificação da C-ficocianina utilizando diferentes etapas



### **2.2.1 Precipitação com sulfato de amônio**

Para a purificação da C-ficocianina utilizando precipitação com sulfato de amônio, foram avaliadas modificações na metodologia de Silva et al., (2009) com relação ao tempo de de fracionamento. Foi aplicada precipitação fracionada com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sólido em temperatura ambiente com saturação de 0-20% na primeira etapa e 20-50% na segunda etapa. Na primeira etapa, sulfato de amônio foi adicionado a amostra numa concentração de saturação equivalente a 20%, de acordo com Scopes (1994). A adição ocorreu sob constante agitação nos 30 min iniciais, seguido de repouso sob refrigeração pelos tempos avaliados, conforme Tabela 1. Após este período, a amostra foi centrifugada (12000xg, 25°C, por 20 min) e o precipitado foi descartado. Na segunda etapa, o sulfato de amônio foi adicionado ao sobrenadante até atingir saturação equivalente a 50% (SCOPEES, 1994) da mesma forma que a saturação anterior. A solução foi mantida pelo mesmo tempo que o primeiro fracionamento e então centrifugada. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em tampão fosfato de potássio 50 mM ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) pH 7,0 em uma relação volume de ressuspensão/volume inicial de 0,52.

### **2.2.2 Diafiltração/ultrafiltração (DF/UF)**

Os ensaios de ultrafiltração foram realizados seguindo estudos prévios. Foram em uma célula laboratorial do tipo convencional, de volume útil de 200 mL, agitada por uma barra magnética suspensa, para simulação do escoamento em fluxo cruzado. Foi utilizada membrana de retenção nominal de 50 kDa de polietersulfona, temperatura de 25°C, pressão de 1,0 kgf/cm<sup>2</sup> e pH de 6,5. Foram utilizado 6 ciclos de diafiltração previamente a concentração do extrato. A diafiltração consiste de ciclos de recarga de tampão na célula de ultrafiltração com tampão fosfato de sódio, pH 6,5. Foi alimentado ao sistema extrato clarificado de C-FC e o ponto final de cada ciclo foi o tempo de 40 minutos, e no último ciclo até o volume final 5 vezes menor que o inicial. Após cada ensaio foram quantificadas a concentração de C-FC e seu grau de pureza. A diafiltração/ultrafiltração foi utilizada também após as etapas de precipitação para remoção do sal presente, utilizando reagente de Nessler para verificar a eficiência da remoção.

### **2.2.3 Cromatografia de troca iônica em leito fixo**

O extrato contendo a C-ficocianina obtida em etapa anterior foi alimentado em uma coluna C10/20 GE Healthcare contendo resina aniônica Q Sepharose Fast Flow<sup>®</sup>, previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 6,5 na velocidade de 40 cm/h. As proteínas não adsorvidas foram removidas por lavagem com o mesmo tampão de equilíbrio. Foi realizada pré-eluição com NaCl 0,1M e após a eluição foi efetuada utilizando um gradiente linear de 0,1-1 M de NaCl com um gradiente de volume de 50 ml. Ambas as etapas em tampão Tris-HCl 25 mM pH 5,0 (MORAES; KALIL, 2009). As amostras foram coletadas a cada 5 minutos e determinadas a concentração e grau de pureza da C-ficocianina além do acompanhamento da proteína total através de determinação de absorvância em 280 nm. Determinadas as frações mais purificadas, estas foram reunidas e utilizadas nas etapas subsequentes do processo.

#### **2.2.4 Cromatografia de troca iônica em leito expandido**

Para os experimentos de purificação em leito expandido foi aplicada a metodologia determinada por Moraes et al. (2011), substituindo a resina utilizada pelos autores por Streamline DEAE. Foi utilizada uma coluna Streamline<sup>®</sup> 25 (D.I 2,5 cm x 100 cm de altura), que foi preenchida com 50 mL de resina, resultando em uma altura total de leito de 10 cm. A resina foi equilibrada com tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7,5 a uma velocidade de 240 cm/h em fluxo ascendente, o que proporcionou um grau de expansão (GE) de 2 vezes (20 cm de leito). Em todos os ensaios, 220 mL do extrato de C-ficocianina foram alimentados em fluxo ascendente a uma velocidade 123 cm/h, mantendo um GE de 2,0. Após a lavagem, realizada com 750 mL de tampão fosfato de sódio 25mM em pH de trabalho em modo expandido, a vazão foi interrompida e o leito de resina foi sedimentado até 10 cm. O adaptador foi movido até a posição 10 cm e foi realizada pré-eluição com NaCl 0,1M e a eluição com gradiente linear salino de 0,1-1M de NaCl com gradiente de volume de 220 mL, ambas as etapas em em tampão fosfato de sódio 25 mM pH 6,5, feitas em modo fixo e em fluxo descendente. Frações foram coletadas a cada 2 minutos onde foram determinadas a concentração de C-ficocianina (C-FC), a pureza (PE) e a absorvância em 280 nm para acompanhamento das proteínas totais.

### **2.3 Concentração e recuperação da C-ficocianina**

A concentração de C-ficocianina foi calculada utilizando a Equação 1, descrita por Bennett e Bogorad (1973), com modificações no comprimento de onda:

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

Onde, C-FC é a concentração de C-ficocianina em mg.mL<sup>-1</sup> e A<sub>620</sub> e A<sub>652</sub> são as absorvâncias em 620 e 652 nm, respectivamente.

A recuperação de C-ficocianina foi calculado de acordo com a Equação 2:

$$REC = \frac{(V_{\text{final}} \cdot [C\text{-FC}_{\text{final}}])}{(V_{\text{inicial}} \cdot [C\text{-FC}_{\text{inicial}}])} \cdot 100 \quad (2)$$

Onde, V<sub>final</sub> é o volume de extrato de C-FC retido; [C-FC<sub>final</sub>] é a concentração de C-ficocianina no retido; V<sub>inicial</sub> é o volume de extrato de C-FC alimentado e [C-FC<sub>inicial</sub>] é a concentração de C-ficocianina no extrato alimentado.

## 2.4 Pureza do extrato e fator de purificação

A pureza do extrato de C-ficocianina foi monitorada pela razão A<sub>620</sub>/A<sub>280</sub> (ABALDE et al., 1998). O fator de purificação é dado pela relação entre a pureza de cada fração purificada pela pureza do extrato bruto.

# 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 Precipitação com sulfato de amônio

A precipitação com sulfato de amônio é uma técnica bastante aplicada para purificação de C-ficocianina (MORAES; KALIL, 2009; SONI et al., 2006; YAN et al., 2011), incluindo um estudo amplo sobre as condições aplicadas (SILVA et al., 2009). No entanto uma avaliação sobre a aplicação desta técnica em diferentes tempos não foi encontrada. A Tabela 1 apresenta os tempos aplicadas em cada etapa da precipitação fracionada, nas condições determinadas por Silva et al. (2009). É possível verificar que com exceção do

tempo de 1 hora por etapa, os tempos de 14 (*overnight*), 6, 4 e 2 horas não apresentaram diferença significativa para o fator de purificação nem para a recuperação, indicando assim, que pode ser utilizado o tempo de 2 horas em cada etapa do fracionamento, para precipitação de C-ficocianina, reduzindo consideravelmente o tempo necessário para a realização desta etapa, sem perda na eficiência do processo.

**Tabela 1** - Diferentes tempos aplicados para precipitação da C-ficocianina com sulfato de amônio e fator de purificação e recuperação obtidos

Tempo de cada fracionamento (horas)	Fator de purificação	Recuperação (%)
1	1,67 <sup>b</sup> ± 0,01	62,9 <sup>b</sup> ± 0,2
2	2,64 <sup>a</sup> ± 0,10	79,1 <sup>a</sup> ± 5,7
4	2,63 <sup>a</sup> ± 0,10	73,5 <sup>a</sup> ± 0,7
6	2,64 <sup>a</sup> ± 0,12	74,2 <sup>a</sup> ± 0,2
14	2,60 <sup>a</sup> ± 0,06	72,2 <sup>a</sup> ± 8,6

Letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente em nível de significância de 5% (Teste de Tukey)

Sulfato de amônio é usado como um agente de precipitação, porque tem custo relativamente baixo, mantém a integridade da proteína, precipita ficobiliproteínas facilmente, é altamente solúvel em água a baixas temperaturas, que permite soluções salinas com alta força iônica, e tem efeito bacteriostático, todos úteis na purificação de proteínas (BURGESS, 2009; SONI et al., 2006). O tempo de 2 horas foi selecionado para aplicação nos processos de purificação de C-ficocianina onde foi utilizada precipitação fracionada com sulfato de amônio.

### 3.2 Estudo dos processos de purificação de C-ficocianina

A necessidade da obtenção de C-ficocianina de diferentes graus de pureza faz com que o desenvolvimento de diferentes processos de purificação se tornem essenciais, a fim de reduzir tempo através de processos com o menor número de etapas e a maior recuperação de produto possível. A purificação da C-ficocianina envolveu as etapas de precipitação fracionada com sulfato de amônio, diafiltração/ultrafiltração, cromatografia de troca iônica em leito expandido e em leito fixo. Para garantir a igualdade das amostras em todos os experimentos, o foi utilizado mesmo lote de biomassa seca de *Spirulina platensis*.

No processo de purificação 1, onde foi utilizado a cromatografia de troca iônica em leito expandido, após a extração com água, o caldo bruto contendo células foi diluído e ajustado o pH para as condições de trabalho. A etapa de precipitação utilizada no processo 4 foi aplicada com o tempo de processo de 2 horas, o suficiente para obter a melhor recuperação e fator de purificação, conforme identificado no item anterior. Para a remoção dos sais (sulfato de amônio e cloreto de sódio) do extrato, quando necessário, foi utilizada a diafiltração/ultrafiltração, ao invés da diálise, porque além de remover os sais, esta técnica poderia contribuir para a purificação e concentração do extrato.

A Tabela 2 apresenta os resultados de pureza do extrato, fator de purificação e recuperação em cada uma das etapas dos diferentes processos, assim como esses parâmetros globais ao fim de cada processo.

**Tabela 2** - Avaliação da pureza, fator de purificação e recuperação em cada processo de purificação de C-ficocianina estudado

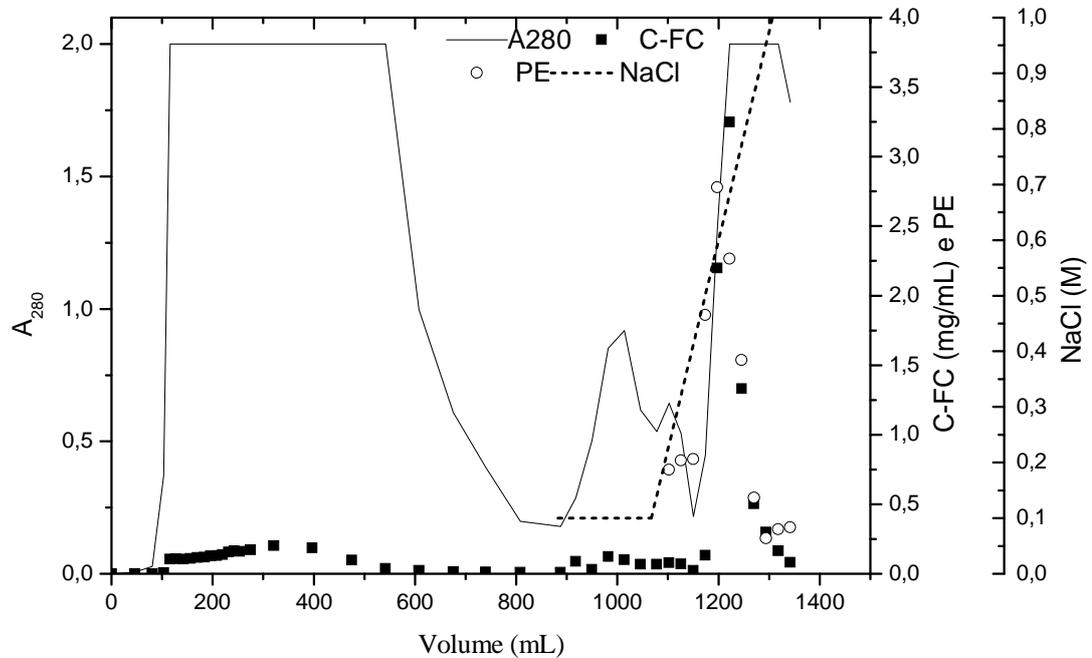
<b>Processo</b>	<b>Etapa</b>	<b>Pureza do extrato</b>	<b>Fator de purificação</b>	<b>Recuperação (%)</b>
1	Inicial	0,50	1,0	100
	Cromatografia de troca iônica em leito expandido	2,41	4,8	59,9
	Diafiltração/Ultrafiltração	2,96	1,2	82,9
	Global	2,96	5,9	49,7
	Inicial	0,58	1,0	100
2	Cromatografia de troca iônica em leito fixo	2,12	3,7	73,4
	Diafiltração/Ultrafiltração	2,12	1,0	92,1
	Global	2,12	3,7	67,6
	Inicial	0,57	1,0	100
3	Diafiltração/Ultrafiltração	0,95	1,7	92,6
	Cromatografia de troca iônica em leito fixo	3,00	3,2	57,7
	Diafiltração/Ultrafiltração	3,00	1,0	96,1
	Global	3,00	5,3	51,3
	Inicial	0,57	1,0	100
4	Precipitação	1,54	2,7	81,2
	Diafiltração/Ultrafiltração	2,12	1,4	95,2

Cromatografia de troca iônica em leito fixo	4,10	1,9	55,6
Diafiltração/Ultrafiltração	4,10	1,0	96,8
Global	4,10	7,2	41,6

Pela observação dos dados da Tabela 2, verifica-se que os processos aplicados possibilitaram a obtenção de extrato de C-ficocianina com purezas de grau alimentar (2,12, 2,41, 2,96 e 3,00) e grau analítico (4,1) conforme Rito-Palomares; Nunez e Amador (2001). Além disso, os extratos obtidos também se enquadram na classificação utilizada por diversas empresas que comercializam C-FC com pureza entre 0,5 até 1,5 para uso como corante alimentício, com pureza entre 1,50 e 2,50 para uso como corante em cosméticos, com pureza entre 2,5 e 3,5 como grau reativo para uso em biomarcadores e pureza maior que 4 como terapêutico e biomarcador.

O processo 1 consistiu na utilização da cromatografia de troca iônica em leito expandido para adsorção da C-FC em resina Streamline<sup>®</sup> DEAE, seguido por uma etapa de DF/UF. Avaliando-se somente a etapa de cromatografia, obtem-se o cromatograma do processo conforme apresentado na Figura 2. Diversos autores já avaliaram a utilização da resina de leito expandido Streamline DEAE (BERMEJO et al., 2006; BERMEJO; RAMOS, 2012; NIU et al., 2007; RAMOS et al., 2010), mas utilizando extrato não clarificado de C-ficocianina e com uma etapa de eluição tipo degrau seguida por eluição do tipo gradiente salino, não foram encontrados estudos. As condições utilizadas no processo foram as mesmas determinadas por Moraes et al. (2011), que utilizaram resina Streamline Q XL com pH de eluição 6,5. O pH de alimentação foi determinado por avaliação prévia dos parâmetros de adsorção da resina (SALA et al., 2014).

**Figura 2** - Cromatograma da purificação de C-ficocianina em leito expandido com resina Streamline DEAE usando eluição tipo degrau, com 0,1M de NaCl, combinado com gradiente linear salino (0,1 -1



M).

Assim como observado por Moraes et al. (2011), a etapa de pré-eluição proporcionou a remoção de algumas proteínas contaminantes adsorvidas fracamente na resina, o que pode ser observado na Figura 2 através da curva de absorvância a 280 nm, que representam as proteínas totais. Assim, é possível obter um extrato mais purificado ao final do processo. A C-FC obtida apresentou uma pureza de 2,41 (4,8 vezes mais pura que o extrato inicial) e recuperação de 59,9%. Bermejo et al. (2006) avaliaram a purificação de extrato bruto de C-ficocianina sem a presença de células através de cromatografia de troca iônica em leito expandido com resina Streamline DEAE, e obtiveram C-ficocianina 3 vezes mais purificada que o extrato inicial, com recuperação variando entre 60 e 80%. Bermejo e Ramos (2012) também utilizaram resina Streamline DEAE e obtiveram fator de purificação de 4,5, obtendo um extrato com pureza de 0,87 na etapa de cromatografia em leito expandido, com recuperação de 79%. Ambos os trabalhos utilizaram extrato clarificado de C-ficocianina, onde as células foram removidas por centrifugação, ao contrário deste trabalho, onde foi utilizado extrato bruto.

A utilização do leito expandido possibilita a aplicação de um caldo bruto, contendo células e resíduos celulares, e permite eliminar etapas como precipitação por sulfato

de amônio e cromatografia de permeação em gel, que são comuns nos protocolos de purificação usuais, além de possibilitar a redução do tempo total empregado no processo (NIU et al., 2007). Caso o objetivo do processo seja a maior purificação possível do extrato, sendo aceitável uma maior perda na recuperação, pode ser separada uma fração mais pura, com incremento de 5,5 vezes na pureza e 48,8% de recuperação.

A etapa de diafiltração/ultrafiltração após a cromatografia em leito expandido possibilitou a obtenção de C-FC com pureza de 2,96, com uma recuperação global de 49,7%. Em contraste com a diálise, etapa geralmente aplicada em processos de pequena escala, onde as diferenças na concentração de soluto através da membrana conduz a troca de tampão através de difusão, na diafiltração/ultrafiltração essa troca é mais rápida devido ao fluxo convectivo de tampão através da membrana, como consequência da aplicação de pressão como força motriz. Isto pode ser benéfico para o processamento de proteínas ou produtos biológicos que são instáveis e que necessitam de troca de tampão imediata (EVANS; ROMERO; WESTOBY, 2009). Essa troca mais rápida também é vantajosa por possibilitar redução no tempo total de processo.

No processo 2 foi realizada a etapa de cromatografia de troca iônica em leito fixo, otimizada por Moraes e Kalil (2009) utilizando resina aniônica Q-Sepharose Fast Flow e posterior UF/DF para concentração do extrato. Neste processo foi possível obter C-ficocianina com pureza de 2,12, um pouco inferior a alcançada no processo anterior, porém com recuperação aproximadamente 27% mais elevada. Os valores obtidos neste processo confirmam os encontrados por Moraes; e Kalil (2009), quando utilizaram na cromatografia de troca iônica em leito fixo, o extrato clarificado sem etapa prévia de purificação.

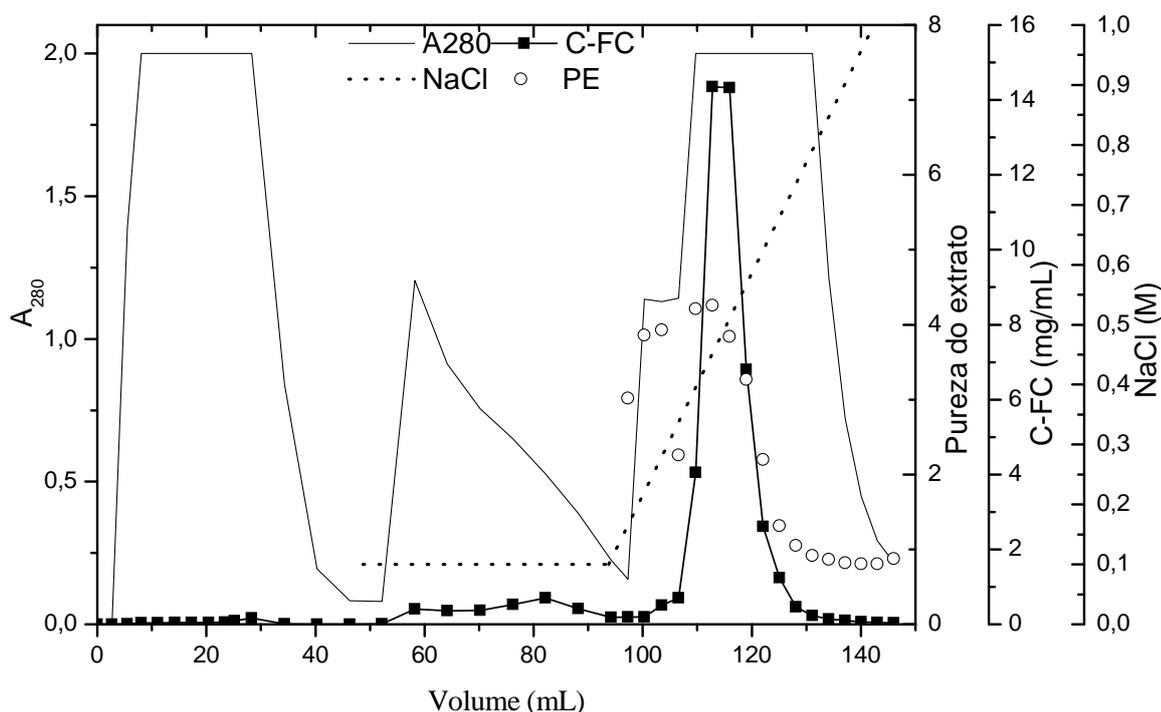
No processo 3 foi utilizada a etapa de DF/UF antes e após a etapa de cromatografia de troca iônica em leito fixo, e apresentou resultados semelhantes aos obtidos no processo 1, no entanto o volume de trabalho utilizado no processo com leito fixo é menor do que o utilizado no leito expandido, e necessita de uma etapa de clarificação prévia do extrato, o que faz este processo ter uma menor obtenção de extrato por processo. Uma vantagem da aplicação da DF/UF antes da cromatografia de leito fixo é que esta técnica pode ser ajustada para se obter um extrato com uma concentração definida (EVANS; ROMERO; WESTOBY, 2009). Observa-se também que, neste processo, caso se deseje a obtenção de C-ficocianina comercializada com grau alimentar (pureza entre 0,75 e 1,5), é possível obtê-la na primeira etapa de DF/UF, que forneceu um extrato com pureza de 0,95 e recuperação de 92,6% em uma única etapa de purificação.

A pureza final obtida pelos processos 1 e 3 é maior que a obtida por Kamble et al. (2013) que obtiveram 2,32, porem com fator de purificação de 14,44. Estes autores não informaram a recuperação obtida. Nos processos 1 e 3 foi possível obter C-FC com pureza entre 2,5 e 3,5, que é comercializada para uso em biomarcadores, com um custo médio de US\$ 1.500,00 por grama (DELHI NUTRACEUTICALS, 2014). Assim, o processo 1 se torna muito útil para produção em larga escala de extrato com esse grau de pureza.

O processo 4 foi o que possibilitou a obtenção do extrato com pureza mais elevada, considerada de grau analítico ( $PE > 4,0$ ) e que pode custar até US\$ 4.500,00 por grama. (DELHI NUTRACEUTICALS, 2014). Na primeira etapa deste processo, se utilizou a precipitação com sulfato de amônio, com as modificações no tempo de processo conforme apresentado anteriormente. A aplicação desta técnica é importante no processo de purificação, uma vez que proporciona bom aumento na pureza, com recuperação relativamente alta, além de ser de baixo custo e de simples aplicação (MORAES; KALIL, 2009; SILVA et al., 2009). Neste trabalho a etapa isolada de precipitação possibilitou a obtenção de um fator de purificação de 2,7, com recuperação de 81%. A etapa posterior de DF/UF, além de servir para retirar o sal de amônio da amostra, que impossibilitaria a adsorção pela resina de troca iônica, possibilitou mais um aumento no grau de pureza do extrato, com elevada recuperação da etapa (95,2%).

O extrato concentrado foi alimentado então na coluna de leito fixo, com a mesma metodologia aplicada no processo 3. Na Figura 3 está apresentado o cromatograma do processo, onde é possível verificar que na etapa de pré-eluição foram removidas algumas proteínas contaminantes. É possível verificar também, três frações na fase de eluição, com pureza do extrato próximo a 4,0, resultando em um total de 9,3 ml de C-FC, com pureza de 4,1 e concentração de 11,1 mg/mL, proporcionando recuperação de 55%. É aceito que para haver aumento na purificação de um produto biotecnológico, há uma perda na recuperação, sendo necessário se escolher entre uma e outra como objetivo do processo (WHEELWRIGHT, 1989)

**Figura 3** - Cromatograma da purificação de C-ficocianina em leito fixo com resina Q Sepharose Fast Flow<sup>®</sup> usando eluição tipo degrau, com 0,1M de NaCl, combinado com gradiente linear salino (0,1 -1 M).



Após a cromatografia, a etapa de DF/UF não apresentou incremento na pureza e foi mantido um volume e concentração final do extrato igual ao da etapa de cromatografia, mas a etapa permitiu a retirada dos sais inseridos no processo. A recuperação final do processo 4 foi de 41,6%, com fator de purificação de 7,2, valor pouco maior que o obtido por Moraes e Kalil (2009) de 6,3. Song; Zhao e Wang (2013) obtiveram C-FC com pureza de 5,32 e recuperação de 42%, utilizando uma etapa de precipitação com sulfato de amônio, com posterior passagem por três colunas cromatográficas, de interação hidrofóbica, de troca iônica e de permeação em gel. O processo 4 descrito neste trabalho apresenta a vantagem de utilizar somente uma etapa de cromatografia.

Com a redução no tempo necessário para a realização da etapa de precipitação com sulfato de amônio e a utilização de DF/UF como alternativa a diálise, o tempo total necessário para o processo de purificação de C-ficocianina pode ser consideravelmente

reduzido. Este trabalho permitiu o desenvolvimento de processos para obtenção de C-ficocianina, de acordo com a pureza requerida, com o mínimo de etapas, e manutenção altos níveis de recuperação. Com a etapa B do processo 3, obteve-se C-FC para uso como corante alimentício, com o processo 2 obteve-se C-FC para uso como corante em cosméticos, com uma maior recuperação, no processo 1 foi atingido o grau reativo para uso em biomarcadores e no processo 4 a C-FC obtida apresentou grau analítico, indicado para uso terapêutico e em biomedicina.

#### 4 CONCLUSÃO

Foi possível verificar que a purificação de C-ficocianina por precipitação fracionada com sulfato de amônio, pode ser realizado com 2 horas para cada etapa de fracionamento, sem perda no fator de purificação e na recuperação. Foram obtidos com sucesso diferentes sequencias de etapas de processo para obtenção de C-ficocianina com diversos graus de pureza. Verificou-se que para obtenção de C-FC com grau de pureza entre 0,75 e 1,5, indicada para uso como corante alimentar, a técnica mais apropriada é a aplicação de diafiltração/ultrafiltração a partir de extrato clarificado. Para obter C-FC com pureza indicada para uso como corante em cosméticos, entre 1,5 e 2,5, indica-se a utilização de precipitação com sulfato de amônio, seguido por diafiltração/ultrafiltração. Para utilização da C-FC em biomarcadores, com pureza entre 2,5 e 3,5, a utilização de cromatografia de troca iônica em leito expandido seguida por diafiltração/ultrafiltração, a partir de extrato bruto contendo células, é o mais indicado, devido a possibilidade de trabalhar com volumes maiores de extrato, com uma recuperação de 49,7%. Para a obtenção de C-FC com grau analítico (Pureza > 4,0), deve ser aplicado, a partir de extrato clarificado, a sequência envolvendo precipitação, diafiltração/ultrafiltração, cromatografia de troca iônica em leito fixo e diafiltração/ultrafiltração, que apresentou uma recuperação global de 41,6%. Comparando as etapas cromatográficas, a cromatografia em leito expandido apresentou um fator de purificação mais elevado que a cromatografia em leito fixo, com a vantagem de trabalhar com extrato bruto contendo células, dispensando uma etapa de clarificação.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALDE, J.; BETANCOURT, L.; TORRES, E.; CID, A.; BARWELL, C. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. **Plant Science**, v. 136, n. 1, p. 109-120, Aug 7 1998.

ANSPACH, F. B.; CURBELO, D.; HARTMANN, R.; GARKE, G.; DECKWER, W.-D. Expanded-bed chromatography in primary protein purification. **Journal of Chromatography A**, v. 865, n. 162, p. 129-144, 1999.

BERMEJO, R.; FELIPE, M. A.; TALAVERA, E. M.; ALVAREZ-PEZ, J. M. Expanded bed adsorption chromatography for recovery of phycocyanins from the microalga *Spirulina platensis*. **Chromatographia**, v. 63, n. 1-2, p. 59-66, Jan 2006.

BERMEJO, R.; RAMOS, A. pilot scale recovery of phycocyanin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. **Chromatographia**, v. 75, n. 5-6, p. 195-204, 2012/03/01 2012.

BURGESS, R. R. Chapter 20 Protein Precipitation Techniques. In: RICHARD, R. B. e MURRAY, P. D. (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v. Volume 463, 2009. p.331-342. ISBN 0076-6879.

EVANS, D. R. H.; ROMERO, J. K.; WESTOBY, M. concentration of proteins and removal of solutes. **Guide to Protein Purification, Second Edition**, v. 463, p. 97-120, 2009.

HO, P.; KITAHARA, E.; OGAWA, D.; SILVA, A.; RAMOS, C.; NASCIMENTO, A. A arte de purificar proteínas: Uma nova tecnologia cromatográfica para uso biotecnológico. **Biotecnologia**, v. 13, p. 24-26, 2000.

ICHIMURA, M.; KATO, S.; TSUNEYAMA, K.; MATSUTAKE, S.; KAMOGAWA, M.; HIRAO, E.; MIYATA, A.; MORI, S.; YAMAGUCHI, N.; SURUGA, K.; OMAGARI, K. Phycocyanin prevents hypertension and low serum adiponectin level in a rat model of metabolic syndrome. **Nutrition Research**, v. 33, n. 5, p. 397-405, 2013.

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

MARTELLI, G.; FOLLI, C.; VISAI, L.; DAGLIA, M.; FERRARI, D. Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 154-159, 2014.

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

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

NIU, J.-F.; WANG, G.-C.; LIN, X.-Z.; ZHOU, B.-C. Large-scale recovery of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 850, n. 162, p. 267-276, 2007.

RAMOS, A.; ACIEN, F. G.; FERNANDEZ-SEVILLA, J. M.; GONZALEZ, C. V.; BERMEJO, R. Large-scale isolation and purification of C-phycocyanin from the cyanobacteria *Anabaena marina* using expanded bed adsorption chromatography. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 783-792, Jun 2010.

- RITO-PALOMARES, M.; NUNEZ, L.; AMADOR, D. Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for c-phycoyanin recovery from *Spirulina maxima*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 76, n. 12, p. 1273-1280, Dec 2001.
- SALA, L. ; FIGUEIRA, F. S. ; CERVEIRA, G. P. ; MORAES, C. C. ; KALIL, S. J. . Kinetics and adsorption isotherm of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* on ion-exchange resins. *Brazilian Journal of Chemical Engineering (In Press)*, 2014.
- SCOPES, R. K. **Protein Purification: Principles and Practice**. Springer-Verlag, 1994.
- SILVA, L. A.; KUHN, K. R.; MORAES, C. C.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Experimental design as a tool for optimization of C-phycoyanin purification by precipitation from *Spirulina platensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 5-12, 2009.
- SONG, W.; ZHAO, C.; WANG, S. A large-scale preparation method of high purity C-phycoyanin. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 3, n. 4, p. 293-297, 2013.
- SONI, B.; KALAVADIA, B.; TRIVEDI, U.; MADAMWAR, D. Extraction, purification and characterization of phycoyanin from *Oscillatoria quadripunctulata* Isolated from the rocky shores of Bet-Dwarka, Gujarat, India. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 2017-2023, 2006.
- WHEELWRIGHT, S. M. The design of downstream processes for large-scale protein purification. **Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 263, p. 89-102, 1989.
- YAN, S. G.; ZHU, L. P.; SU, H. N.; ZHANG, X. Y.; CHEN, X. L.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Single-step chromatography for simultaneous purification of C-phycoyanin and allophycoyanin with high purity and recovery from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 1, p. 1-6, Feb 2011.



**ARTIGO 4**  
**INCORPORAÇÃO DE C-FICOCIANINA EM NANOFIBRAS DE ÓXIDO DE**  
**POLIETILENO**



## INCORPORAÇÃO DE C-FICOCIANINA EM NANOFIBRAS DE ÓXIDO DE POLIETILENO

### RESUMO

C-ficocianina (C-FC) é um pigmento antena coletor de luz, que proporciona uma cor azul intensa nas algas verde-azuladas. É uma ficobiliproteína solúvel em água, e pode ser usada como corante em alimentos e cosméticos e também é um fotossensibilizador citotóxico capaz de matar células através da produção de oxigênio singleto por excitação, com a radiação apropriada. Entre as formas que possibilitam uma melhor aplicação e maior estabilidade da C-FC, as nanoestruturas ainda não foram amplamente avaliadas. Nanofibras podem ser produzidas a partir de uma ampla variedade de polímeros. Estas fibras possuem uma área superficial específica extremamente elevada devido a seu pequeno diâmetro. A incorporação de C-ficocianina em nanofibras poderia possibilitar estudos sobre sua aplicação na cobertura de alimentos, visando aumentar a vida útil do produto devido sua capacidade antioxidante, assim como uma forma alternativa para sua utilização via terapia fotodinâmica e fototérmica no tratamento de alguns tipos de câncer. *Electrospinning* é atualmente a técnica mais promissora para a produção contínua de nanofibras em larga escala e o diâmetro da fibra pode ser ajustado de nanômetros para microns. Além disso, o *electrospinning* é um processo relativamente fácil e rápido para a produção de nanofibras. Esta técnica envolve o uso de um campo de alta tensão eletrostática para carregar a superfície de uma gota de solução de polímero até sobrepor a tensão superficial da gota, e então um jato carregado de solução de polímero é ejetado. A rota do jato carregado é controlada pelo campo elétrico. O jato se estende através de *loops* em espiral; com o aumento de diâmetro dos *loops* o jato cresce mais longo e fino, até que se solidifica ou é coletado no alvo. No presente trabalho, C-ficocianina foi incorporada ao polímero óxido de polietileno (PEO) para produção de nanofibras por processo de *electrospinning*. Foram determinadas a condutividade da solução de C-FC/PEO e a estrutura através de microscópio digital ótico, e foi realizada a análise termogravimétrica das nanofibras formadas. Soluções de polímeros com concentração de 2 e 4% de PEO não possibilitaram a obtenção de nanofibras de boa qualidade, enquanto soluções com 6 e 8% proporcionaram a formação de nanofibras com diâmetro médio inferior a 800 nm, homogêneas e sem a presença de gotas. A análise termogravimétrica identificou aumento na resistência térmica da C-ficocianina incorporada nas nanofibras.

**Palavras-chave:** C-ficocianina, nanofibras, nanoestruturas, óxido de polietileno.

## 1 INTRODUÇÃO

C-ficocianina (C-FC) é um pigmento antena coletor de luz, que proporciona cor azul intensa nas algas verde-azuladas. É uma ficobiliproteína solúvel em água, de cor azul, fluorescente e de propriedades antioxidantes (ERIKSEN, 2008). Entre as outras ficobiliproteínas (ficoeritrina e aloficocianina), a C-FC é o principal pigmento acessório que está presente em todas as cianobactérias (GANTAR et al., 2012).

Entre as aplicações encontradas para a C-FC destacam-se: corante natural para alimentos e cosméticos (ARAD; YARON, 1992; PRASANNA et al., 2007), potencial agente terapêutico em doenças oxidativas induzidas pelo stress e marcador fluorescente em pesquisa biomédica (BHAT; MADYASTHA, 2001; YOSHIDA; TAKAGAKI; NISHIMUNE, 1996), atividade antioxidante contra radicais hidroxil (ESTRADA; BESCOS; DEL FRESNO, 2001), peróxidos (BHAT; MADYASTHA, 2000) e DPPH (GANTAR; DHANDAYUTHAPANI; RATHINAVELU, 2012). Além disso, tem sido utilizada como agente anti-tumoral e anti-inflamatório (REDDY et al., 2003; ZHANG et al., 2011), com capacidade hepatoprotetora (NAGARAJ et al., 2012) e potencial contra diabetes (OU et al., 2013) e hipertensão (ICHIMURA et al., 2013).

Entre as formas que possibilitariam uma melhor aplicação e maior estabilidade da C-FC, as nanoestruturas, como as nanofibras, ainda não foram amplamente avaliadas. Nanofibras podem ser produzidas a partir de uma ampla variedade de polímeros. Estas fibras possuem uma área superficial específica extremamente elevada devido a seu pequeno diâmetro (FANG et al., 2008). A utilização da nanobiotecnologia vem crescendo cada vez mais, com diversos estudos sobre aplicação de nanopartículas para o transporte de fármacos, emulsões, imagiologia, biomateriais, alimentos, ótica e eletrônica, patógenos, biossensores e diagnósticos *in vitro* (MORAIS et al., 2014).

*Electrospinning* tem sido reconhecido como uma técnica eficiente para a fabricação de nanofibras poliméricas, de tamanho submícron - variando de 5 a 500 nm,  $10^2$  a  $10^4$  vezes menores do que as preparadas pelos métodos tradicionais de solução ou *melt spinning* (DEITZEL et al., 2001). A técnica de *electrospinning* envolve a aplicação de um forte campo elétrico entre o polímero e um coletor metálico. Em termos de flexibilidade do processo, o *electrospinning* é capaz de fabricar nanofibras contínuas a partir de uma grande variedade de materiais, com o diâmetro de alguns nanômetros (ELSABEE; NAGUIB; MORSI, 2012).

As nanofibras têm características muito interessantes, como grande relação área superficial/volume e alta porosidade, com poros de tamanho muito pequeno (SON; KIM; YOO, 2014). Entre os polímeros que podem ser utilizados para a produção de nanofibras, se destaca o óxido de polietileno (PEO), conhecido por produzir boas nanofibras em *electrospinning*. PEO é um polímero biodegradável, atóxico, de baixo custo e biocompatível, que já tem sido utilizado em aplicações biomédicas, tais como o desenvolvimento de pensos para feridas (DE MORAIS et al., 2010). O PEO é reconhecido como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*).

Especificamente, existe um interesse crescente em nanofibras compostas de proteínas e proteínas/polímeros. Várias proteínas têm sido incorporadas em nanofibras a partir do *electrospinning*, incluindo a albumina do soro bovino (BSA) (DROR et al., 2008; ZHANG et al., 2005), caseína e lipase (XIE; HSIEH, 2003), gelatina (HUANG et al., 2004), lisozima (CHARERNSRIWILAIWAT et al., 2012), citocromo C (BAKER et al., 2006), entre outras. Geralmente, as proteínas são incorporadas nas nanofibras por *co-electrospinning* com um polímero adequado, como óxido de polietileno ou álcool polivinílico. Em outros casos, podem ser obtidas nanofibras formadas diretamente das proteínas como zeína (TORRES-GINER; GIMENEZ; LAGARONA, 2008).

A incorporação de C-ficocianina em nanofibras poderia possibilitar estudos sobre sua aplicação na cobertura de alimentos, visando aumentar a vida útil do produto devido sua capacidade antioxidante, assim como sua utilização via terapia fotodinâmica e fototérmica no tratamento de alguns tipos de câncer. Com isto, o objetivo deste trabalho foi a obtenção de nanofibras de óxido de polietileno incorporadas de C-ficocianina e a avaliação de suas características microscópicas e termogravimétricas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Biomassa, extração e quantificação de C-ficocianina

A cianobactéria *Spirulina platensis* LEB 52 foi cultivada e cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG. Ao término do cultivo, a biomassa foi recuperada por filtração, seca, congelada e moída e adicionada ao solvente extrator na concentração de 0,16 g.mL<sup>-1</sup> (MORAES; BURKERT; KALIL, 2010). Após a extração, o caldo bruto contendo

células foi centrifugado e purificado utilizando ultrafiltração. O extrato purificado foi liofilizado e utilizado no preparo das soluções de polímero.

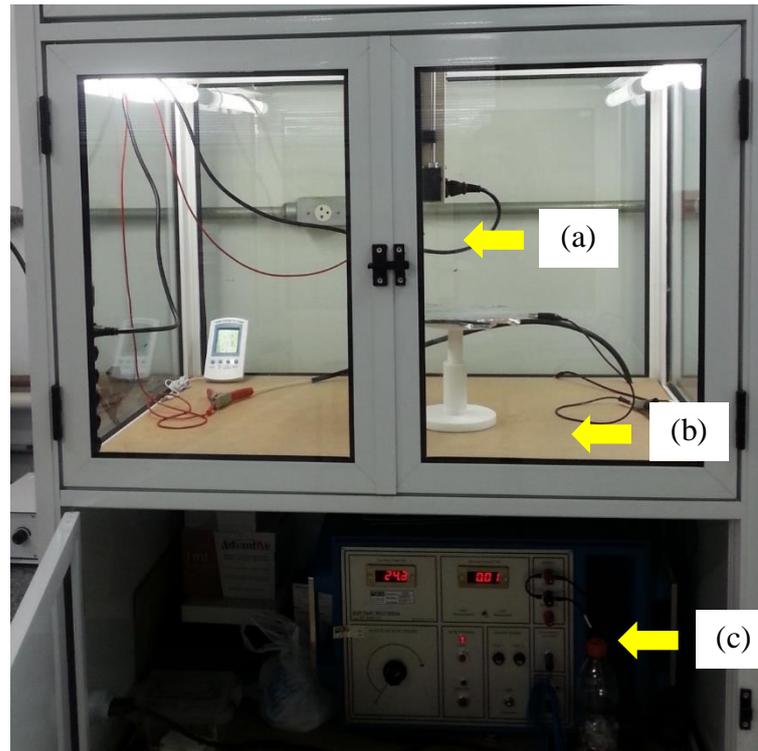
## 2.2 Preparação das soluções para *electrospinning*

Soluções de óxido de polietileno (PEO) (massa molecular de  $900.000 \text{ g.mol}^{-1}$ ) com e sem adição de NaCl, sob diferentes concentrações, com adição de extrato de C-ficocianina liofilizada (Tabela 1) foram preparadas para verificar o desenvolvimento de fibras. As amostras foram homogeneizadas em agitador magnético durante toda noite na temperatura de  $10^{\circ}\text{C}$ .

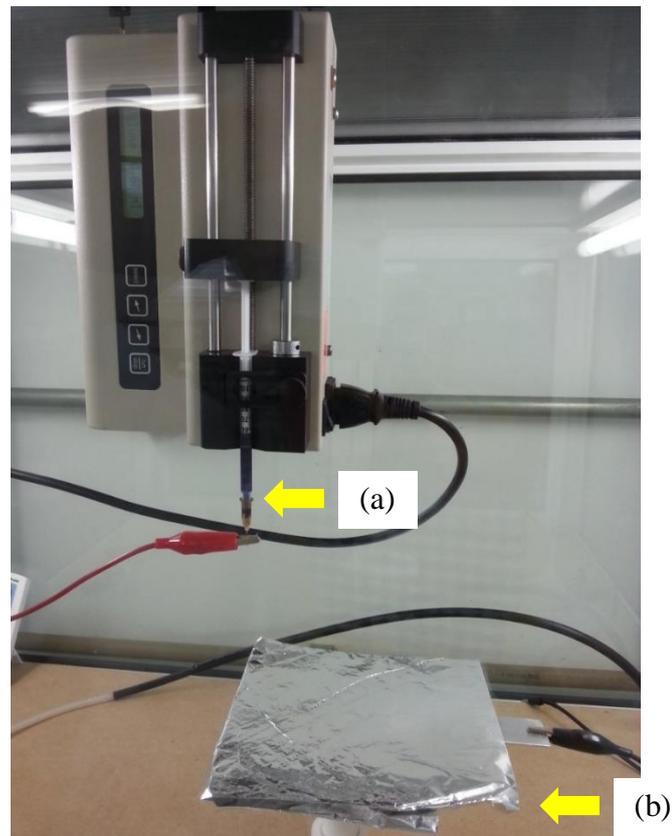
## 2.3 Processo de *electrospinning*

No processo de *electrospinning* as soluções foram injetadas através de capilar com diâmetro de 0,45 mm. O eletrodo de polaridade positiva foi conectado a extremidade da agulha e o isolamento foi conectado ao coletor de alumínio. A distância utilizada entre a extremidade do capilar e o coletor foi de 125 mm. O potencial elétrico aplicado foi de 24,3 kV. A vazão da solução foi de  $2,5 \mu\text{L.min}^{-1}$ , controlada através de bomba ligada ao injetor (DE MORAIS et al., 2010). Todos os experimentos foram conduzidos em temperatura ambiente e com umidade relativa do ar entre 50 e 60%. O sistema utilizado está apresentado na Figura 1, com detalhe do capilar e do coletor apresentado na Figura 2.

**Figura 1** - Equipamento de *electrospinning* com sistema de injeção (a), placa coletora (b) e fonte de alta voltagem (c)



**Figura 2** - Capilar (a) e coletor (b) do sistema de *electrospinning*



## 2.4 Caracterização das soluções e nanofibras

A condutividade das soluções de polímero foi determinada com condutivímetro digital (MCA-150, TECNOPON).

A morfologia das nanofibras foi observada em microscópio ótico trinocular (Axio Scope A1, Carl Zeiss) utilizando campo escuro. A média do diâmetro das nanofibras foi determinada pela medida de 30 diferentes pontos através das imagens obtidas pelo microscópio. Os diâmetros das nanofibras foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação entre médias dos diâmetros, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

Para medir as propriedades térmicas das nanofibras, a estabilidade térmica foi analisada em analisador termogravimétrico (TGA) (DTG-60H, Shimadzu). Os ensaios foram realizados no intervalo de temperatura de 30-550°C a uma velocidade constante de aumento de temperatura de 10°C min<sup>-1</sup> com um fluxo contínuo de gás nitrogênio. A perda de massa, seguindo-se a decomposição foi medida durante o intervalo de aquecimento. As taxas de perda foram determinadas para comparar a massa inicial com a perda de massa.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi utilizada C-ficocianina liofilizada com pureza de 0,95. Para a produção das nanofibras a partir da técnica de electrospinning, foram preparadas diferentes soluções de polímeros, onde foram determinadas suas condutividades elétricas. A Tabela 1 apresenta a formulação das soluções de PEO/C-FC com e sem adição de NaCl, utilizadas para a obtenção das nanofibras e os valores de condutividade das soluções.

**Tabela 1** - Concentrações de óxido de polietileno e cloreto de sódio e a condutividade das soluções utilizadas na elaboração das nanofibras contendo 3% de C-ficocianina.

Amostra	PEO (%)	NaCl (%)	C (mS.cm <sup>-1</sup> )
A	2,0	0,0	4,38
B	2,0	1,0	21,20
C	4,0	0,0	5,13
D	4,0	1,0	21,81
E	6,0	0,0	5,21
F	6,0	1,0	21,02
G	8,0	0,0	8,08

H	8,0	1,0	27,48
---	-----	-----	-------

### 3.1 Condutividade dos polímeros

Os valores de condutividade obtidos para as soluções de polímero apresentaram aumento proporcional ao aumento da concentração de PEO, quando não havia adição de NaCl, mesmo o PEO sendo um polímero eletricamente não carregado. Esse comportamento foi apresentado por Bordi, Cametti e Di Biasio (1988), que atribuíram esse aumento às interações do polímero com a água, devido a sua natureza hidrofílica, causando uma mudança estrutural nas moléculas de água na interface polímero-meio aquoso, proporcional a quantidade de polímero presente na solução, o que ocasiona um pequeno aumento na sua condutividade. Nos polímeros adicionados de NaCl, com exceção da amostra H com 8% de PEO e 1% de NaCl, todos apresentaram condutividade em torno de  $21 \text{ mS.cm}^{-1}$ .

### 3.2 Obtenção das nanofibras

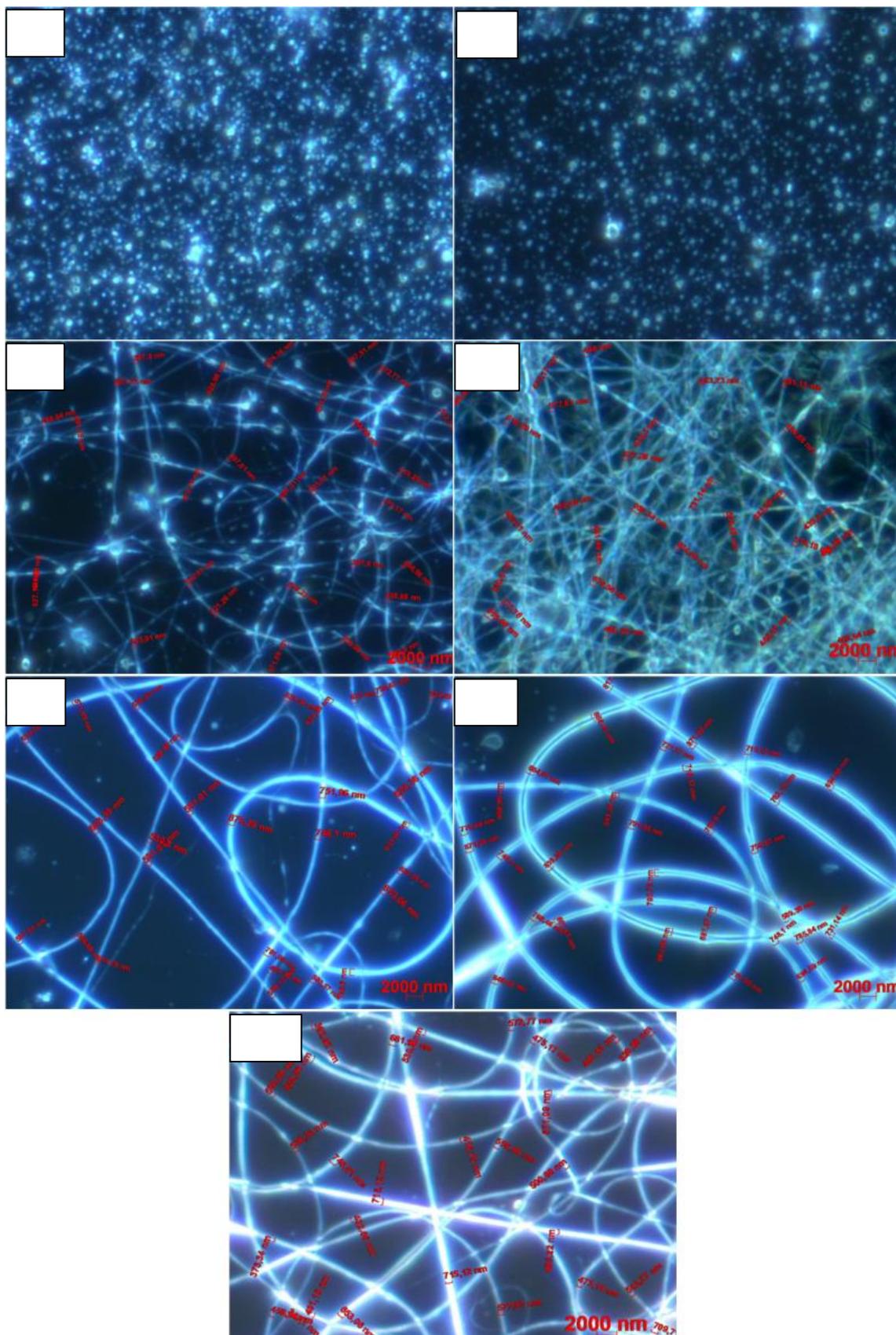
Com as soluções de polímero contendo 2% de PEO (A e B), não foi possível a obtenção de nanofibras, independente da adição de 1% de NaCl. Nestas condições ficou caracterizada a ocorrência de *electrospraying*, demonstrado pela presença exclusiva de gotas na placa coletora, conforme as Figuras 3a e 3b. Foi comprovado que soluções de PEO com concentração abaixo de 4% geralmente não possibilitam a formação de nanofibras, e quando formam há uma grande presença de gotas devido a viscosidade menor da solução, sendo nesse caso, a maior tensão superficial a força mais influente sobre o comportamento das fibras (DEITZEL et al., 2001). Com a amostra H, contendo 8% de PEO e 1% de NaCl, também não foi possível obter nanofibras, no entanto, isso foi ocasionado pela ocorrência de descargas elétricas a partir da agulha de injeção do polímero, que resultou no desligamento do sistema antes da formação das nanofibras, que pode ser atribuído à maior condutividade da solução.

Com as demais soluções utilizadas foi possível a obtenção de nanofibras com diâmetro médio 542,1 a 759,9 nm. A obtenção de nanofibras a partir do aumento gradual na concentração do polímero também foi observada por Nie et al. (2009). Segundo Eda, Liu e Shivkumar (2007) durante o processo de *electrospinning* de soluções de polímero, a um certo peso molecular, o efeito da concentração sobre o processo de *electrospinning* pode ser

descrito por duas concentrações críticas,  $C_i$  (concentração de transição entre a estrutura somente gotas para estrutura fibras com gotas) e  $C_f$  (concentração de transição da estrutura fibras com gotas para estrutura fibras sem gotas). Abaixo de  $C_i$ , somente gotas são obtidas devido a formação insuficiente de cadeias de emaranhados moleculares. Acima de  $C_i$ , uma combinação de gotas e fibras é observada e quando a concentração é aumentada acima de  $C_f$  fibras completas são produzidas. A alta importância da formação de emaranhamento das cadeias moleculares para produção eficiente de nanofibras a partir de *electrospinning* foi demonstrado por Shenoy et al. (2005).

Através de análise visual, foi possível observar uma coloração azul nas fibras formadas comprovando a presença da C-ficocianina incorporada. Nos ensaios com as amostras C e D (Figuras 3c e 3d, respectivamente) as nanofibras obtidas apresentavam gotas, o que é indesejável para o produto. Estas amostras continham 4% de PEO, presumindo-se que essa concentração está acima de  $C_i$  e abaixo de  $C_f$ . Nas soluções contendo 6% de PEO sem e com adição de NaCl (Figuras 3e e 3f) e 8% de PEO sem adição de NaCl (Figura 3g), foi possível observar que as nanofibras formadas eram mais homogêneas, sem presença marcante de gotas, estando assim com concentração acima de  $C_f$ .

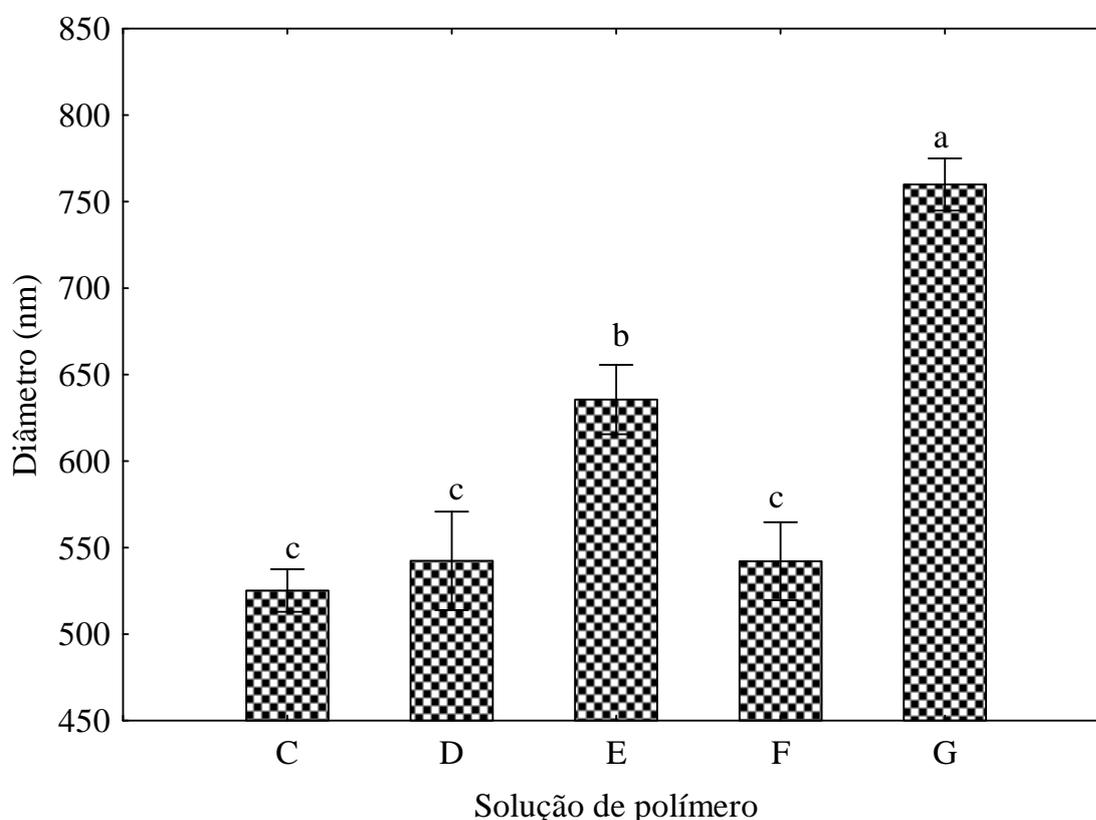
**Figura 3** - Nanofibras obtidas a partir do processo de *electrospinning* contendo 3% de C-ficocianina e 2% de PEO (a), 2% de PEO e 1% de NaCl (b), 4% de PEO (c), 4% de PEO e 1% de NaCl (d), 6% de PEO (e), 6% de PEO e 1% de NaCl (f) e 8% de PEO (g).



O diâmetro médio das nanofibras obtidas neste trabalho variou de 542,1 a 759,9 nm, podendo assim, serem caracterizadas como nanofibras. As amostras C, D e F

possibilitaram a obtenção de nanofibras com menor diâmetro médio (Figura 4), no entanto, conforme discutido anteriormente, as nanofibras dos polímeros C e D apresentavam grande presença de gotas. O aumento na concentração de PEO causou aumento no diâmetro das nanofibras, o que pode ser atribuído a uma possível redução na tensão superficial e quantidade de solvente nas soluções mais concentradas (DEITZEL et al., 2001). A adição de NaCl na solução com 6% de PEO aumentou sua condutividade (Tabela 1), o que causou a redução no diâmetro médio das nanofibras obtidas.

**Figura 4** - Diâmetro médio (com erro médio) das nanofibras obtidas a partir das soluções contendo 3% de C-ficocianina e 4% de PEO (C), 4% de PEO e 1% de NaCl (D), 6% de PEO (E), 6% de PEO e 1% de NaCl (F) e 8% de PEO (G).



\*Letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente em nível de significância de 5%

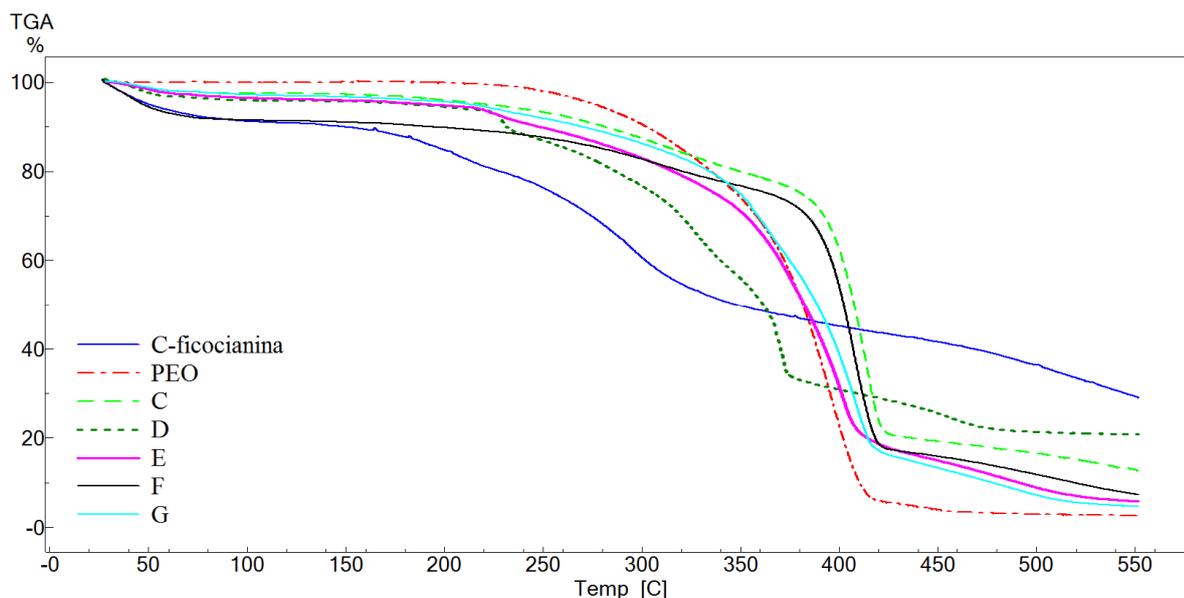
O aumento da condutividade das soluções comprovadamente melhora a qualidade das nanofibras. O processo de *electrospinning* envolve o alongamento da solução causado pela repulsão entre as cargas na sua superfície. Se a condutividade da solução é aumentada, mais cargas são carregadas pelo jato emitido (RAMAKRISHNA, 2005). Nos casos em que as nanofibras são formadas com gotas, a adição de sais na solução reduz ou elimina essas gotas, através do aumento no alongamento do jato de solução, como resultado do maior nível de

cargas transportadas por ela. Esse mesmo fator também incentiva a redução do diâmetro da fibra (ZONG et al., 2002). Fong, Chun e Reneker (1999) determinaram que para nanofibras de PEO a melhor concentração de NaCl a ser utilizada é entre 0,75 e 1,5%.

### 3.3 Análise termogravimétrica

A Figura 5 apresenta a perda de massa através de termograma TGA do PEO puro, da C-ficocianina e das nanofibras de PEO incorporadas de C-FC. Com exceção da curva do PEO, é possível observar uma perda de massa primária na temperatura entre 30 e 150°C, relativa a decomposição da água livre e da água ligada. Para a C-ficocianina, observa-se uma decomposição secundária mais acentuada entre 180 e 375°C, associada a degradação proteica e redução na estabilidade térmica causada pela ruptura das ligações intermoleculares de baixa energia que mantém a conformação da proteína, conforme foi observado por Brahatheeswaran et al. (2012), ao desenvolverem nanofibras de zeína contendo curcumina. Todas as nanofibras obtidas apresentaram decomposição primária entre 230 e 440°C. As nanofibras apresentaram perda de massa total menores que o PEO puro, demonstrando que a hidratação do polímero torna a sua estrutura mais termoestável. A menor perda de massa total foi identificada para a C-ficocianina, com valor de 70,2% de perda, próximo ao valor encontrado por Liao e Zhang (2012), quando avaliaram C-FC para aplicação em nanotubos de carbono. Apesar das nanofibras terem apresentado maior perda de massa detectada no ponto final da análise, comparada com a C-FC pura, até a temperatura de 367°C, as nanofibras apresentaram perda de massa menor, constatando que até esta temperatura houve um aumento da resistência da C-FC, quando incorporada nas nanofibras. Este comportamento também foi observado por Liao e Zhang (2012) que identificaram que o complexo nanotubos de carbono/quitosana/C-ficocianina apresentou perda de massa menos acentuada do que a quitosana e a C-FC puras. É possível que esse aumento da resistência possa ter sido causada pela proteção às ligações intermoleculares, ocasionada pela estrutura polímero-água.

**Figura 5** - Análise termogravimétrica da C-ficocianina, do PEO e das nanofibras obtidas a partir das soluções contendo 3% de C-ficocianina e 4% de PEO (C), 4% de PEO e 1% de NaCl (D), 6% de PEO (E), 6% de PEO e 1% de NaCl (F) e 8% de PEO (G)



#### 4. CONCLUSÃO

A partir da aplicação da técnica de *electrospinning*, foi possível a obtenção de nanofibras de óxido de polietileno (PEO) incorporadas de C-ficocianina, confirmada pela coloração azul das mesmas. Através de avaliação microscópica, determinou-se que a solução com 6% de PEO, 1% de NaCl e 3% de C-ficocianina originou nanofibras com diâmetro médio de 542 nm, sendo assim, caracterizadas como nanofibras. Verificou-se também que a incorporação da C-FC nas nanofibras proporcionou aumento na resistência térmica desta ficobiliproteína. Os resultados obtidos demonstram que a incorporação de C-ficocianina em nanofibras é uma prática promissora para avaliar a aplicação deste bioproduto em alimentos e também sua utilização em terapia fotodinâmica para o tratamento de câncer.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAD, S.; YARON, A. Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 3, n. 0, p. 92-97, 1992.

BAKER, S. E.; COLAVITA, P. E.; TSE, K. Y.; HAMERS, R. J. Functionalized vertically aligned carbon nanofibers as scaffolds for immobilization and electrochemical detection of redox-active proteins. **Chemistry of Materials**, v. 18, n. 18, p. 4415-4422, Sep 5 2006.

BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. C-Phycocyanin: A potent peroxy radical scavenger *in vivo* and *in vitro*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 275, n. 1, p. 20-25, Aug 18 2000.

BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. Scavenging of peroxy nitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection against oxidative damage to DNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, n. 2, p. 262-266, Jul 13 2001.

BORDI, F.; CAMETTI, C.; DI BIASIO, A. Electrical conductivity behavior of poly(ethylene oxide) in aqueous electrolyte solutions. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 92, n. 16, p. 4772-4777, 1988/08/01 1988.

BRAHATHEESWARAN, D.; MATHEW, A.; ASWATHY, R. G.; NAGAOKA, Y.; VENUGOPAL, K.; YOSHIDA, Y.; MAEKAWA, T.; SAKTHIKUMAR, D. Hybrid fluorescent curcumin loaded zein electrospun nanofibrous scaffold for biomedical applications. **Biomedical Materials**, v. 7, n. 4, Aug 2012.

CHARERNSRIWILAIWAT, N.; OPANASOPIT, P.; ROJANARATA, T.; NGAWHIRUNPAT, T. Lysozyme-loaded, electrospun chitosan-based nanofiber mats for wound healing. **Int J Pharm**, v. 427, n. 2, p. 379-84, May 10 2012.

DE MORAIS, M. G.; STILLINGS, C.; DERSCH, R.; RUDISILE, M.; PRANKE, P.; COSTA, J. A. V.; WENDORFF, J. Preparation of nanofibers containing the microalga *Spirulina (Arthrospira)*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, p. 2872-2876, 2010.

DEITZEL, J. M.; KLEINMEYER, J.; HARRIS, D.; BECK TAN, N. C. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. **Polymer**, v. 42, n. 1, p. 261-272, 2001.

DEITZEL, J. M.; KLEINMEYER, J. D.; HIRVONEN, J. K.; BECK TAN, N. C. Controlled deposition of electrospun poly(ethylene oxide) fibers. **Polymer**, v. 42, n. 19, p. 8163-8170, 2001.

DROR, Y.; ZIV, T.; MAKAROV, V.; WOLF, H.; ADMON, A.; ZUSSMAN, E. Nanofibers made of globular proteins. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 10, p. 2749-2754, Oct 2008.

EDA, G.; LIU, J.; SHIVKUMAR, S. Flight path of electrospun polystyrene solutions: Effects of molecular weight and concentration. **Materials Letters**, v. 61, n. 7, p. 1451-1455, 2007.

ELSABEE, M. Z.; NAGUIB, H. F.; MORSI, R. E. Chitosan based nanofibers, review. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 7, p. 1711-1726, 2012.

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

ESTRADA, J. E. P.; BESCOS, P. B.; DEL FRESNO, A. M. V. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **Farmaco**, v. 56, n. 5-7, p. 497-500, May-Jul 2001.

FANG, J.; NIU, H. T.; LIN, T.; WANG, X. G. Applications of electrospun nanofibers. **Chinese Science Bulletin**, v. 53, n. 15, p. 2265-2286, Aug 2008.

FONG, H.; CHUN, I.; RENEKER, D. H. Beaded nanofibers formed during electrospinning. **Polymer**, v. 40, n. 16, p. 4585-4592, Jul 1999.

GANTAR, M.; DHANDAYUTHAPANI, S.; RATHINAVELU, A. phycocyanin induces apoptosis and enhances the effect of topotecan on prostate cell line LNCaP. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 12, p. 1091-1095, Dec 2012.

GANTAR, M.; SIMOVIC, D.; DJILAS, S.; GONZALEZ, W. W.; MIKSOVSKA, J. Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycocyanin from *Limnothrix* sp strain 37-2-1. **Journal of Biotechnology**, v. 159, n. 1-2, p. 21-26, May 31 2012.

HUANG, Z. M.; ZHANG, Y. Z.; RAMAKRISHNA, S.; LIM, C. T. Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers. **Polymer**, v. 45, n. 15, p. 5361-5368, Jul 12 2004.

ICHIMURA, M.; KATO, S.; TSUNEYAMA, K.; MATSUTAKE, S.; KAMOGAWA, M.; HIRAO, E.; MIYATA, A.; MORI, S.; YAMAGUCHI, N.; SURUGA, K.; OMAGARI, K. Phycocyanin prevents hypertension and low serum adiponectin level in a rat model of metabolic syndrome. **Nutrition Research**, v. 33, n. 5, p. 397-405, 2013.

LIAO, X. X.; ZHANG, X. W. Preparation, characterization and cytotoxicity of carbon nanotube-chitosan-phycocyanin complex. **Nanotechnology**, v. 23, n. 3, Jan 27 2012.

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

MORAIS, M. G. D.; MARTINS, V. G.; STEFFENS, D.; PRANKE, P.; DA COSTA, J. A. V. Biological applications of nanobiotechnology. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 1007-1017, 2014.

NAGARAJ, S.; ARULMURUGAN, P.; RAJARAM, M. G.; KARUPPASAMY, K.; JAYAPPRIYAN, K. R.; SUNDARARAJ, R.; VIJAYANAND, N.; RENGASAMY, R. Hepatoprotective and antioxidative effects of C-phycocyanin from *Arthrospira maxima* SAG 25780 in CCl<sub>4</sub>-induced hepatic damage rats. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 81-85, 2012.

NIE, H.; HE, A.; WU, W.; ZHENG, J.; XU, S.; LI, J.; HAN, C. C. Effect of poly(ethylene oxide) with different molecular weights on the electrospinnability of sodium alginate. **Polymer**, v. 50, n. 20, p. 4926-4934, 2009.

NORRIS, I. D.; SHAKER, M. M.; KO, F. K.; MACDIARMID, A. G. Electrostatic fabrication of ultrafine conducting fibers: polyaniline/polyethylene oxide blends. **Synthetic Metals**, v. 114, n. 2, p. 109-114, 2000.

OU, Y.; LIN, L.; YANG, X. G.; PAN, Q.; CHENG, X. D. Antidiabetic potential of phycocyanin: Effects on KK<sup>ay</sup> mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 5, p. 539-544, May 2013.

PRASANNA, R.; SOOD, A.; SURESH, A.; NAYAK, S.; KAUSHIK, B. Potentials and applications of algal pigments in biology and industry. **Acta Botanica Hungarica**, v. 49, n. 1, p. 131-156, 2007.

RAMAKRISHNA, S. **An Introduction to Electrospinning and Nanofibers**. World Scientific, 2005.

REDDY, M. C.; SUBLIASHINI, J.; MAHIPAL, S. V. K.; BHAT, V. B.; REDDY, P. S.; KIRANMAI, G.; MADYASTHA, K. M.; REDDANNA, P. C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 304, n. 2, p. 385-392, May 2 2003.

SHENOY, S. L.; BATES, W. D.; FRISCH, H. L.; WNEK, G. E. Role of chain entanglements on fiber formation during electrospinning of polymer solutions: Good solvent, non-specific polymer-polymer interaction limit. **Polymer**, v. 46, n. 10, p. 3372-3384, 2005.

SON, Y.; KIM, W.; YOO, H. Therapeutic applications of electrospun nanofibers for drug delivery systems. **Archives of Pharmacal Research**, v. 37, n. 1, p. 69-78, 2014/01/01 2014.

TORRES-GINER, S.; GIMENEZ, E.; LAGARONA, J. M. Characterization of the morphology and thermal properties of zein prolamine nanostructures obtained by electrospinning. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 4, p. 601-614, Jun 2008.

XIE, J. B.; HSIEH, Y. L. Ultra-high surface fibrous membranes from electrospinning of natural proteins: casein and lipase enzyme. **Journal of Materials Science**, v. 38, n. 10, p. 2125-2133, May 15 2003.

YOSHIDA, A.; TAKAGAKI, Y.; NISHIMUNE, T. Enzyme immunoassay for phycocyanin as the main component of Spirulina color in foods. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 57-60, Jan 1996.

ZHANG, C. X.; YUAN, X. Y.; WU, L. L.; HAN, Y.; SHENG, J. Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. **European Polymer Journal**, v. 41, n. 3, p. 423-432, Mar 2005.

ZHANG, L. X.; CAI, C. E.; GUO, T. T.; GU, J. W.; XU, H. L.; ZHOU, Y.; WANG, Y.; LIU, C. C.; HE, P. M. Anti-cancer effects of polysaccharide and phycocyanin from *Porphyra yezoensis*. **Journal of Marine Science and Technology-Taiwan**, v. 19, n. 4, p. 377-382, Aug 2011.

ZONG, X.; KIM, K.; FANG, D.; RAN, S.; HSIAO, B. S.; CHU, B. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. **Polymer**, v. 43, n. 16, p. 4403-4412, 2002.

**CAPÍTULO IV**  
**CONCLUSÃO GERAL**



### 3 CONCLUSÃO GERAL

Após a realização deste trabalho, pode-se concluir que:

- O estudo das condições de adsorção de extrato clarificado de C-ficocianina em resina de troca iônica Streamline DEAE nos valores de pH entre 5,5 e 7,5 mostrou que a maior adsorção foi observada em pH 7,5 e nas temperaturas de 15 e 25°C;
- A isoterma de adsorção da C-ficocianina em pH 7,5 e 25°C mostrou que os dados obtidos se adequam bem aos modelos propostos por Langmuir, Freundlich e Sips (Langmuir-Freundlich) e os valores  $Q_m$  e  $K_d$  da isoterma de Langmuir obtidos a partir de regressão não-linear, foram de 33,92 mg.mL<sup>-1</sup> e 0,12 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente.
- No processo de ultrafiltração, a membrana com retenção nominal de 50 kDa é a mais indicada para a purificação de C-ficocianina ut. Através de delineamento experimental, ficou comprovado que a temperatura e aplicação de diafiltração causaram influência significativa sobre a recuperação e o fator de purificação da C-ficocianina, respectivamente.
- A realização de 6 ciclos de diafiltração, previamente a concentração final do extrato, foi indicado como a melhor condição para obter o maior fator de purificação da C-FC, sem ocasionar redução significativa na recuperação do bioproduto. Nestas condições foi possível obter um extrato de C-ficocianina com pureza de 0,95, caracterizada como grau alimentar.
- A purificação de C-ficocianina por precipitação fracionada com sulfato de amônio, pode ser realizado com 2 horas para cada etapa de fracionamento, sem perda no fator de purificação e recuperação.
- Comparando as etapas cromatográficas, a cromatografia em leito expandido apresentou fator de purificação mais elevado que a cromatografia em leito fixo, com a vantagem de trabalhar com extrato bruto contendo células, dispensando uma etapa de clarificação.

- Para obtenção de C-FC com grau de pureza entre 0,75 e 1,5, indicada para uso como corante alimentar, a técnica mais apropriada é a aplicação de diafiltração/ultrafiltração a partir de extrato clarificado.
- Para obter C-FC com pureza indicada para uso como corante em cosméticos, entre 1,5 e 2,5, indica-se a utilização de precipitação com sulfato de amônio, seguido por diafiltração/ultrafiltração.
- Para utilização da C-FC em biomarcadores, com pureza entre 2,5 e 3,5, a utilização de cromatografia de troca iônica em leito expandido seguida por diafiltração/ultrafiltração, a partir de extrato bruto contendo células, é o mais indicado, devido a possibilidade de trabalhar com volumes maiores de extrato, com uma recuperação de 49,7%.
- Para a obtenção de C-FC com grau analítico (Pureza > 4,0), deve ser aplicado, a partir de extrato clarificado, a sequência envolvendo precipitação, diafiltração/ultrafiltração, cromatografia de troca iônica em leito fixo e diafiltração/ultrafiltração, que apresentou uma recuperação global de 41,6%.
- A partir da aplicação da técnica de *electrospinning*, determinou-se que a solução com 6% de PEO, 1% de NaCl e 3% de C-ficocianina originou nanofibras com diâmetro médio de 542 nm, que proporcionou um aumento na resistência térmica desta ficobiliproteína. Os resultados obtidos demonstram que a incorporação de C-ficocianina em nanofibras é uma prática promissora para avaliar a aplicação deste bioproduto em alimentos e também sua utilização em terapia fotodinâmica para o tratamento de câncer.

**CAPÍTULO V**  
**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALDE, J.; BETANCOURT, L.; TORRES, E.; CID, A.; BARWELL, C. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. **Plant Science**, v. 136, n. 1, p. 109-120, Aug 7 1998.

ADAMSON, A. W. **Physical Chemistry of Surfaces**. John Wiley & Sons, 1982.

ADIR, N.; DOBROVETSKY, Y.; LERNER, N. Structure of c-phycocyanin from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus* at 2.5 angstrom: Structural implications for thermal stability in phycobilisome assembly. **Journal of Molecular Biology**, v. 313, n. 1, p. 71-81, Oct 12 2001.

AHAMED, T.; NFOR, B. K.; VERHAERT, P. D. E. M.; VAN DEDEM, G. W. K.; VAN DER WIELEN, L. A. M.; EPPINK, M. H. M.; VAN DE SANDT, E. J. A. X.; OTTENS, M. pH-gradient ion-exchange chromatography: An analytical tool for design and optimization of protein separations. **Journal of Chromatography A**, v. 1164, n. 162, p. 181-188, 2007.

AHMARUZZAMAN, M. Adsorption of phenolic compounds on low-cost adsorbents: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 143, n. 162, p. 48-67, 2008.

ALLEONI, L. R. F.; CAMARGO, O. A.; CASAGRANDE, J. C. Isotermas de Langmuir e de Freundlich na descrição da adsorção de boro em solos altamente intemperizados. **Scientia Agricola**, v. 55, p. 379-387, 1998.

AMERSHAM BIOSCIENCES. Instructions. 2002. Catálogo.

ANSPACH, F. B.; CURBELO, D.; HARTMANN, R.; GARKE, G.; DECKWER, W.-D. Expanded-bed chromatography in primary protein purification. **Journal of Chromatography A**, v. 865, n. 162, p. 129-144, 1999.

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

ANTELO, F. S.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, n. 1, p. 43-47, Aug 1 2008.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**. McGraw-Hill, 1986.

BELTER, P. A.; CUSSLER, E. L.; HU, W. S. **Bioseparations: downstream processing for biotechnology**. Wiley, 1988.

BENNETT, A.; BOGORAD, L. Properties of subunits and aggregates of blue-green algal biliproteins. **Biochemistry**, v. 10, n. 19, p. 3625-34, Sep 14 1971.

BENNETT, A.; BOGORAD, L. complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green-alga. **Journal of Cell Biology**, v. 58, n. 2, p. 419-435, 1973.

- BERMEJO, R.; FELIPE, M. A.; TALAVERA, E. M.; ALVAREZ-PEZ, J. M. Expanded bed adsorption chromatography for recovery of phycocyanins from the microalga *Spirulina platensis*. **Chromatographia**, v. 63, n. 1-2, p. 59-66, Jan 2006.
- BERMEJO, R.; RAMOS, A. Pilot scale recovery of phycocyanin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. **Chromatographia**, v. 75, n. 5-6, p. 195-204, 2012/03/01 2012.
- BERMEJO, R.; RUIZ, E.; RAMOS, A.; ACIÉN, F. G. Pilot-scale recovery of phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* using expanded bed adsorption chromatography. **Separation Science and Technology**, v. 48, n. 13, p. 1913-1922, 2013/09/02 2013.
- BERNS, D. S. Protein aggregation in phycocyanin  $\delta$  Osmotic pressure studies. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 38, n. 1, p. 65-73, 1970.
- BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 325-347, 2010.
- BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. C-phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger *in vivo* and *in vitro*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 275, n. 1, p. 20-25, 2000.
- BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection against oxidative damage to DNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, n. 2, p. 262-266, Jul 13 2001.
- BIKIARIS, D. N.; TRIANTAFYLLIDIS, K. S. HDPE/Cu-nanofiber nanocomposites with enhanced antibacterial and oxygen barrier properties appropriate for food packaging applications. **Materials Letters**, v. 93, n. 0, p. 1-4, 2013.
- BRESOLIN, I. R. A. P.; BRESOLIN, I. T. L.; SILVEIRA, E.; TAMBOURGI, E. B.; MAZZOLA, P. G. Isolation and purification of bromelain from waste peel of pineapple for therapeutic application. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, p. 971-979, 2013.
- CANBOLAT, M. F.; CELEBIOGLU, A.; UYAR, T. Drug delivery system based on cyclodextrin-naproxen inclusion complex incorporated in electrospun polycaprolactone nanofibers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 115, n. 0, p. 15-21, 2014.
- CAPASSO, S.; SALVESTRINI, S.; COPPOLA, E.; BUONDONNO, A.; COLELLA, C. Site-energy distribution analysis of humic acids adsorption by zeolitic tuff. **Journal of Porous Materials**, v. 14, n. 3, p. 363-368, 2007/09/01 2007.
- CHAHAL, S.; HUSSAIN, F. S. J.; YUSOFF, M. B. M. characterization of modified cellulose (mc)/poly (vinyl alcohol) electrospun nanofibers for bone tissue engineering. **Procedia Engineering**, v. 53, n. 0, p. 683-688, 2013.
- CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; LOHA, V.; TIA, S.; BUNNAG, B. Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp using a membrane process. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 14, p. 7159-7164, Jul 2011.

CHERYAN, M. **Ultrafiltration and Microfiltration Handbook**. Taylor & Francis, 1998.

CONTRERAS-MARTEL, C.; MATAMALA, A.; BRUNA, C.; POO-CAAMAÑO, G.; ALMONACID, D.; FIGUEROA, M.; MARTÍNEZ-OYANEDEL, J.; BUNSTER, M. The structure at 2 Å resolution of Phycocyanin from *Gracilaria chilensis* and the energy transfer network in a PCóPC complex. **Biophysical Chemistry**, v. 125, n. 263, p. 388-396, 2007.

COSTA, L. M. M.; BRETAS, R. E. S.; GREGORIO FILHO, R. Caracterização de filmes de PVDF- obtidos por diferentes técnicas. **Polímeros**, v. 19, p. 183-189, 2009.

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

CUTLER, P. **Protein Purification Protocols**. Humana Press, 2004.

DARNON, E.; MORIN, E.; BELLEVILLE, M. P.; RIOS, G. M. Ultrafiltration within downstream processing: some process design considerations. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 42, n. 4, p. 299-309, 2003.

DELHI NUTRACEUTICALS. <http://www.delhinutraceuticals.com/phyococyanin.html>, acessado em Janeiro de 2014.

DE MORAIS, M. G.; STILLINGS, C.; DERSCH, R.; RUDISILE, M.; PRANKE, P.; COSTA, J. A. V.; WENDORFF, J. Preparation of nanofibers containing the microalga *Spirulina (Arthrospira)*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, p. 2872-2876, 2010.

EL-AASSAR, M. R. Functionalized electrospun nanofibers from poly (AN-co-MMA) for enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85686, n. 0, p. 140-148, 2013.

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

ESTRADA, J. E. P.; BESCOS, P. B.; DEL FRESNO, A. M. V. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **Farmaco**, v. 56, n. 5-7, p. 497-500, May-Jul 2001.

FABRA, M. J.; LOPEZ-RUBIO, A.; LAGARON, J. M. High barrier polyhydroxyalcanoate food packaging film by means of nanostructured electrospun interlayers of zein. **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 1, p. 106-114, 2013.

FANG, J.; NIU, H. T.; LIN, T.; WANG, X. G. Applications of electrospun nanofibers. **Chinese Science Bulletin**, v. 53, n. 15, p. 2265-2286, Aug 2008.

FOO, K. Y.; HAMEED, B. H. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. **Chemical Engineering Journal**, v. 156, n. 1, p. 2-10, Jan 1 2010.

FORTINA, P.; WANG, J.; SURREY, S.; PARK, J.; KRICKA, L. Beyond Microtechnology - Nanotechnology in Molecular Diagnosis. In: LIU, R. e LEE, A. (Ed.). **Integrated Biochips for DNA Analysis**: Springer New York, 2007. cap. 13, p.187-197. (Biotechnology Intelligence Unit). ISBN 978-0-387-76758-1.

FREITAG, R.; HORVÁTH, C. Chromatography in the downstream processing of biotechnological products. In: (Ed.). **Downstream Processing Biosurfactants Carotenoids**: Springer Berlin Heidelberg, v.53, 1996. cap. 2, p.17-59. (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology). ISBN 978-3-540-59308-9.

GANTAR, M.; SIMOVIC, D.; DJILAS, S.; GONZALEZ, W. W.; MIKSOVSKA, J. Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycoerythrin from *Limnospira* sp strain 37-2-1. **Journal of Biotechnology**, v. 159, n. 1-2, p. 21-26, May 31 2012.

GANTT, E. Phycobilisomes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 32, p. 327-347, 1981.

GE, B.; QIN, S.; HAN, L.; LIN, F.; REN, Y. Antioxidant properties of recombinant allophycoerythrin expressed in *Escherichia coli*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, n. 3, p. 175-180, 2006.

GHADERI, M.; MOUSAVI, M.; YOUSEFI, H.; LABBAFI, M. All-cellulose nanocomposite film made from bagasse cellulose nanofibers for food packaging application. **Carbohydrate Polymers**, v. 104, n. 0, p. 59-65, 2014.

GHOSE, S.; CHASE, H. Expanded bed chromatography of proteins in small diameter columns. I. Scale down and validation. **Bioseparation**, v. 9, n. 1, p. 21-28, 2000/01/01 2000.

GLAZER, A. N. Phycobiliproteins - a Family of Valuable, Widely Used Fluorophores. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 2, p. 105-112, Apr 1994.

GÜNAY, A.; ARSLANKAYA, E.; TOSUN, . Lead removal from aqueous solution by natural and pretreated clinoptilolite: Adsorption equilibrium and kinetics. **Journal of Hazardous Materials**, v. 146, n. 162, p. 362-371, 2007.

HABERT, A. C. B., C. P.; RONALDO, N. **Processos de Separação por Membranas**. E-papers, 2006.

HE, J.; GIUSTI, M. M. High-purity isolation of anthocyanins mixtures from fruits and vegetables ó A novel solid-phase extraction method using mixed mode cation-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 44, p. 7914-7922, 2011.

HIRATA, T.; TANAKA, M.; OOIKE, M.; TSUNOMURA, T.; SAKAGUCHI, M. Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3-5, p. 435-439, Oct 2000.

HJORTH, R. Expanded-bed adsorption in industrial bioprocessing: Recent developments. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 6, p. 230-235, 1997.

ICHIMURA, M.; KATO, S.; TSUNEYAMA, K.; MATSUTAKE, S.; KAMOGAWA, M.; HIRAO, E.; MIYATA, A.; MORI, S.; YAMAGUCHI, N.; SURUGA, K.; OMAGARI, K. Phycocyanin prevents hypertension and low serum adiponectin level in a rat model of metabolic syndrome. **Nutrition Research**, v. 33, n. 5, p. 397-405, 2013.

JAOUEN, P.; LEPINE, B.; ROSSIGNOL, N.; ROYER, R.; QUEMENEUR, F. Clarification and concentration with membrane technology of a phycocyanin solution extracted from *Spirulina platensis*. **Biotechnology Techniques**, v. 13, n. 12, p. 877-881, Dec 1999.

JIANG, Y.-N.; MO, H.-Y.; YU, D.-G. Electrospun drug-loaded core-shell PVP/zein nanofibers for biphasic drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 438, n. 16, p. 232-239, 2012.

JOSÉ ARTOLOZAGA, M.; JONAS, R.; SCHNEIDER, A.; FURLAN, S.; DE FÁTIMA CARVALHO-JONAS, M. One step partial purification of  $\beta$ -D-galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CDB 002 using STREAMLINE-DEAE. **Bioseparation**, v. 7, n. 3, p. 137-143, 1998/05/01 1998.

JUNGBAUER, A. Chromatographic media for bioseparation. **Journal of Chromatography A**, v. 1065, n. 1, p. 3-12, 2005.

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

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

KALIL, S. J.; SILVEIRA, S. T.; MAUGERI-FILHO, F.; RODRIGUES, M. I. Evaluation of different parameters for the purification of inulinase using an ion exchange fixed bed. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, n. 4, p. 676-679, 2010/08/01 2010.

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

KULKARNI, A.; BAMBOLE, V. A.; MAHANWAR, P. A. electrospinning of polymers, their modeling and applications. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v. 49, n. 5, p. 427-441, 2010/04/15 2010.

KUNDU, S.; GUPTA, A. K. Arsenic adsorption onto iron oxide-coated cement (IOCC): Regression analysis of equilibrium data with several isotherm models and their optimization. **Chemical Engineering Journal**, v. 122, n. 162, p. 93-106, 2006.

L'HOCINE, L.; BOYE, J. I.; ARCAND, Y. Composition and functional properties of soy protein isolates prepared using alternative defatting and extraction procedures. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 3, p. C137-C145, 2006.

LADIWALA, A.; REGE, K.; BRENNEMAN, C. M.; CRAMER, S. M. A priori prediction of adsorption isotherm parameters and chromatographic behavior in ion-exchange systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 33, p. 11710-11715, Aug 16 2005.

LAN, Q. D.; BASSI, A. S.; ZHU, J. X.; MARGARITIS, A. A modified Langmuir model for the prediction of the effects of ionic strength on the equilibrium characteristics of protein adsorption onto ion exchange/affinity adsorbents. **Chemical Engineering Journal**, v. 81, n. 1-3, p. 179-186, Jan 1 2001.

- LANGMUIR, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. Solids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 38, n. 11, p. 2221-2295, 1916/11/01 1916.
- LEE, S.-M.; NAIR, S.; AHN, H.-K.; KIM, B. S.; JUN, S.-H.; AN, H. J.; HSIAO, E.; KIM, S. H.; KOO, Y.-M.; KIM, J. Property control of enzyme coatings on polymer nanofibers by varying the conjugation site concentration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 47, n. 5, p. 216-221, 2010.
- LEINDECKER, G. C.; ALVES, A. K.; BERGMANN, C. P. Obtenção por electrospinning e caracterização de fibras de pentóxido de nióbio (Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 9, n. 2, p. 102-110, 2013.
- LI, D.; XIA, Y. N. Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel? **Advanced Materials**, v. 16, n. 14, p. 1151-1170, Jul 19 2004.
- LING, T. C.; LOONG, C. M.; TAN, W. S.; TEY, B. T.; ABDULLAH, W. M. W.; ARIFF, A. Purification of filamentous bacteriophage M13 by expanded bed anion exchange chromatography. **Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 228-232, Sep 2004.
- LIU, J.-F.; JIANG, G.-B.; JÖNSSON, J. Å. Application of ionic liquids in analytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 1, p. 20-27, 2005.
- MA, G.; FANG, D.; LIU, Y.; ZHU, X.; NIE, J. Electrospun sodium alginate/poly(ethylene oxide) core-shell nanofibers scaffolds potential for tissue engineering applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 737-743, 2012.
- MACCOLL, R. Cyanobacterial phycobilisomes. **Journal of Structural Biology**, v. 124, n. 2-3, p. 311-334, Dec 15 1998.
- MANERA, A. P.; KAMIMURA, E. S.; BRITES, L. M.; KALIL, S. J. Adsorption of amyloglucosidase from *Aspergillus niger* NRRL 3122 using ion exchange resin. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 1015-1024, 2008.
- MARTELLI, G.; FOLLI, C.; VISAI, L.; DAGLIA, M.; FERRARI, D. Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 154-159, 2014.
- MEDEIROS, F. O.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Purification of  $\beta$ -galactosidase by ion exchange chromatography: elution optimization using an experimental design. **Chemical Engineering & Technology**, v. 35, n. 5, p. 911-918, 2012.
- MEGELSKI, S.; STEPHENS, J. S.; CHASE, D. B.; RABOLT, J. F. Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. **Macromolecules**, v. 35, n. 22, p. 8456-8466, 2002/10/01 2002.
- MILNE, J. Scale-up of protein purification: downstream processing issues. In: WALLS, D. e LOUGHRAN, S. T. (Ed.). **Protein Chromatography**: Humana Press, v.681, 2011. cap. 5, p.73-85. (Methods in Molecular Biology). ISBN 978-1-60761-912-3.

MINKOVA, K.; TCHORBADJIEVA, M.; TCHERNOV, A.; STOJANOVA, M.; GIGOVA, L.; BUSHEVA, M. Improved procedure for separation and purification of *Arthronema africanum* phycobiliproteins. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 4, p. 647-651, Apr 2007.

MINKOVA, K. M.; TCHERNOV, A. A.; TCHORBADJIEVA, M. I.; FOURNADJIEVA, S. T.; ANTOVA, R. E.; BUSHEVA, M. C. Purification of C-phycoyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. **Journal of Biotechnology**, v. 102, n. 1, p. 55-59, Apr 10 2003.

MOORE, W. J.; JORDAN, I.; CHUN, H. L.; FERRERONI, M. C. **Fisico-química**. Edgard Blucher, 1990.

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

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

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

MORAIS, M. G. D.; MARTINS, V. G.; STEFFENS, D.; PRANKE, P.; DA COSTA, J. A. V. Biological applications of nanobiotechnology. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 1007-1017, 2014.

MULDER, M. **Basic Principles of Membrane Technology Second Edition**. Kluwer, 1996.

NAGARAJ, S.; ARULMURUGAN, P.; RAJARAM, M. G.; KARUPPASAMY, K.; JAYAPPRIYAN, K. R.; SUNDARARAJ, R.; VIJAYANAND, N.; RENGASAMY, R. Hepatoprotective and antioxidative effects of C-phycoyanin from *Arthrospira maxima* SAG 25780 in CC14-induced hepatic damage rats. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 81-85, 2012.

NIELD, J.; RIZKALLAH, P. J.; BARBER, J.; CHAYEN, N. E. The 1.45 angstrom three-dimensional structure of C-phycoyanin from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. **Journal of Structural Biology**, v. 141, n. 2, p. 149-155, Feb 2003.

NIU, H. F.; WANG, G. C.; LIN, X. Z.; ZHOU, B. C. Large-scale recovery of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 850, n. 1-2, p. 267-276, May 1 2007.

OHEOCHA, C. Spectral properties of the phycobilins. I. Phycocyanobilin. **Biochemistry**, v. 2, p. 375-82, Mar-Apr 1963.

OU, Y.; LIN, L.; YANG, X. G.; PAN, Q.; CHENG, X. D. Antidiabetic potential of phycocyanin: Effects on KKAY mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 5, p. 539-544, May 2013.

PADYANA, A. K.; RAMAKUMAR, S. Lateral energy transfer model for adjacent light-harvesting antennae rods of C-phycoyanins. **Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics**, v. 1757, n. 3, p. 161-165, Mar 2006.

PAI, A.; GONDKAR, S.; SUNDARAM, S.; LALI, A. Expanded bed adsorption on supermacroporous cross-linked cellulose matrix. **Bioseparation**, v. 8, n. 1-5, p. 131-138, 1999/01/01 1999.

PALMA-OROZCO, G.; ORTIZ-MORENO, A.; DORANTES-ÁLVAREZ, L.; SAMPEDRO, J. G.; NÁJERA, H. Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mamey (*Pouteria sapota*). **Phytochemistry**, v. 72, n. 1, p. 82-88, 2011.

PÅLSSON, E.; AXELSSON, A.; LARSSON, P. O. Theories of chromatographic efficiency applied to expanded beds. **Journal of Chromatography A**, v. 912, n. 2, p. 235-248, 2001.

PATIL, G.; CHETHANA, S.; MADHUSUDHAN, M. C.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Fractionation and purification of the phycobiliproteins from *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 15, p. 7393-7396, Oct 2008.

PATIL, G.; CHETHANA, S.; SRIDEVI, A. S.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Method to obtain C-phycoyanin of high purity. **Journal of Chromatography A**, v. 1127, n. 1-2, p. 76-81, Sep 15 2006.

PEEVA, P. D.; KNOCHE, T.; PIEPER, T.; ULBRICHT, M. Cross-flow ultrafiltration of protein solutions through unmodified and surface functionalized polyethersulfone membranes - Effect of process conditions on separation performance. **Separation and Purification Technology**, v. 92, p. 83-92, 2012.

PÉREZ-MARÍN, A. B.; ZAPATA, V. M.; ORTUÑO, J. F.; AGUILAR, M.; SÁEZ, J.; LLORÉNS, M. Removal of cadmium from aqueous solutions by adsorption onto orange waste. **Journal of Hazardous Materials**, v. 139, n. 1, p. 122-131, 2007.

PESSOA, A.; KILIKIAN, B. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Manole, 2005.

POOLE, C. F. CHROMATOGRAPHY. In: WILSON, I. D. (Ed.). **Encyclopedia of Separation Science**. Oxford: Academic Press, 2000. p.40-64. ISBN 978-0-12-226770-3.

PUMAS, C.; VACHARAPIYASOPHON, P.; PEERAPORNPISAL, Y.; LEELAPORNPISID, P.; BOONCHUM, W.; ISHII, M.; KHANONGNUCH, C. Thermostability of phycobiliproteins and antioxidant activity from four thermotolerant cyanobacteria. **Phycological Research**, v. 59, n. 3, p. 166-174, Jul 2011.

RAMAKRISHNA, S. **An Introduction to Electrospinning and Nanofibers**. World Scientific, 2005.

RAMOS, A.; ACIEN, F. G.; FERNANDEZ-SEVILLA, J. M.; GONZALEZ, C. V.; BERMEJO, R. Large-scale isolation and purification of C-phycoyanin from the cyanobacteria *Anabaena marina* using expanded bed adsorption chromatography. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 783-792, Jun 2010.

REDDY, M. C.; SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S. V. K.; BHAT, V. B.; SRINIVAS REDDY, P.; KIRANMAI, G.; MADYASTHA, K. M.; REDDANNA, P. C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 304, n. 2, p. 385-392, 2003.

RENEKER, D. H.; YARIN, A. L.; FONG, H.; KOOMBHONGSE, S. Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. **Journal of Applied Physics**, v. 87, n. 9, p. 4531-4547, 2000.

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

ROE, S. **Protein Purification Applications: A Practical Approach**. Oxford University Press, 2001.

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

SANTIAGO-SANTOS, M. C.; PONCE-NOYOLA, T.; OLVERA-RAMIREZ, R.; ORTEGA-LOPEZ, J.; CANIZARES-VILLANUEVA, R. O. Extraction and purification of phycoerythrin from *Calothrix* sp. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2047-2052, Oct 29 2004.

SAXENA, A.; TRIPATHI, B. P.; KUMAR, M.; SHAHI, V. K. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, n. 1-2, p. 1-22, Jan 30 2009.

SCHÄFER, A. I.; FANE, A. G.; WAITE, T. D. Fouling effects on rejection in the membrane filtration of natural waters. **Desalination**, v. 131, n. 163, p. 215-224, 2000.

SEKHON, B. S. Food nanotechnology - an overview. **Nanotechnol Sci Appl**, v. 3, p. 1-15, 2010.

SHARMA, S.; AGARWAL, G. P. Interactions of proteins with immobilized metal ions: A comparative analysis using various isotherm models. **Analytical Biochemistry**, v. 288, n. 2, p. 126-140, 2001.

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

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

SINGH, S.; KATE, B. N.; BANERJEE, U. C. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 73-95, 2005.

SINGH, S.; SINGH, A.; BAIS, V. S. S.; PRAKASH, B.; VERMA, N. Multi-scale carbon micro/nanofibers-based adsorbents for protein-immobilization. **Materials Science and Engineering: C**, n. 0,

SIPS, R. On the Structure of a Catalyst Surface. **Journal of Chemical Physics**, v. 16, n. 5, p. 490-495, 1948.

SNOW, U. Adsorbent reduces primary unit operations for bioprocess recovery. **Genetic Engineering News**, p. 16, 1994.

SONG, W.; ZHAO, C.; WANG, S. A large-scale preparation method of high purity c-phycocyanin. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 3, n. 4, p. 293-297, 2013.

SOZER, N.; KOKINI, J. L. Nanotechnology and its applications in the food sector. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 82-89, Feb 2009.

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

STEC, B.; TROXLER, R. F.; TEETER, M. M. Crystal structure of C-phycocyanin from *Cyanidium caldarium* provides a new perspective on phycobilisome assembly. **Biophysical Journal**, v. 76, n. 6, p. 2912-2921, Jun 1999.

SUN, H.; QI, D.; XU, J.; JUAN, S.; ZHE, C. Fractionation of polysaccharides from rapeseed by ultrafiltration: Effect of molecular pore size and operation conditions on the membrane performance. **Separation and Purification Technology**, v. 80, n. 3, p. 670-676, 2011.

VA KOVÁ, K.; ANTO<sup>TM</sup>OVÁ, M.; POLAKOVI , M. Adsorption equilibrium of fructosyltransferase on a weak anion-exchange resin. **Journal of Chromatography A**, v. 1162, n. 1, p. 56-61, 2007.

VIJAYARAGHAVAN, K.; PADMESH, T. V. N.; PALANIVELU, K.; VELAN, M. Biosorption of nickel(II) ions onto *Sargassum wightii*: Application of two-parameter and three-parameter isotherm models. **Journal of Hazardous Materials**, v. 133, n. 163, p. 304-308, 2006.

VONSHAK, A. **Spirulina Platensis Arthrospira: Physiology, Cell-Biology And Biotechnology**. Taylor & Francis, 2002.

WIBISONO, Y.; CORNELISSEN, E. R.; KEMPERMAN, A. J. B.; VAN DER MEER, W. G. J.; NIJMEIJER, K. Two-phase flow in membrane processes: A technology with a future. **Journal of Membrane Science**, v. 453, n. 0, p. 566-602, 2014.

WILSON, I. D.; ADLARD, E. R.; COOKE, M.; POOLE, C. F. **Encyclopedia of separation science**. Academic, 2000.

XIA, H.-F.; LIN, D.-Q.; YAO, S.-J. Evaluation of new high-density ion exchange adsorbents for expanded bed adsorption chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1145, n. 162, p. 58-66, 2007.

XIAOXIA, L.; XUEWU, Z. Preparation, characterization and cytotoxicity of carbon nanotubeóchitosanóphycocyanin complex. **Nanotechnology**, v. 23, n. 3, p. 035101, 2012.

YAMANAKA, G.; GLAZER, A. N.; WILLIAMS, R. C. Cyanobacterial phycobilisomes - characterization of phycobilisomes of *Synechococcus*-sp 6301. **Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 22, p. 8303-8310, 1978.

YAN, M.; LIU, B.; JIAO, X.; QIN, S. Preparation of phycocyanin microcapsules and its properties. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, n. 1, p. 89-97, 2014.

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

YEE, K. W. K.; WILEY, D. E.; BAO, J. Whey protein concentrate production by continuous ultrafiltration: Operability under constant operating conditions. **Journal of Membrane Science**, v. 290, n. 162, p. 125-137, 2007.

YIH, T. C.; AL-FANDI, M. Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 97, n. 6, p. 1184-1190, Apr 15 2006.

ZENG, J.; YANG, L.; LIANG, Q.; ZHANG, X.; GUAN, H.; XU, X.; CHEN, X.; JING, X. Influence of the drug compatibility with polymer solution on the release kinetics of electrospun fiber formulation. **Journal of Controlled Release**, v. 105, n. 162, p. 43-51, 2005.

ZHANG, L. X.; CAI, C. E.; GUO, T. T.; GU, J. W.; XU, H. L.; ZHOU, Y.; WANG, Y.; LIU, C. C.; HE, P. M. Anti-cancer effects of polysaccharide and phycocyanin from *Porphyra yezoensis*. **Journal of Marine Science and Technology-Taiwan**, v. 19, n. 4, p. 377-382, Aug 2011.

ZHAO, C.; XUE, J.; RAN, F.; SUN, S. Modification of polyethersulfone membranes ó A review of methods. **Progress in Materials Science**, v. 58, n. 1, p. 76-150, 2013.

ZIA, M. A.; KOUSAR, M.; AHMED, I.; IQBAL, H. M. N.; ABBAS, R. Z. Comparative study of peroxidase purification from apple and orange seeds. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 33, p. 6300-6303, Jul 6 2011.

ZONG, X.; KIM, K.; FANG, D.; RAN, S.; HSIAO, B. S.; CHU, B. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. **Polymer**, v. 43, n. 16, p. 4403-4412, 2002.

ZUÑIGA, A. D. G.; PEREIRA, J. A. M.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; ROJAS, E. E. G. Técnicas usadas no processo de purificação de biomoléculas. **CEPPA**, v. 21, p. 61-82, 2003.