



AValiação DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE FICOCIANINA DE *Anabaena variabilis* POR SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS PEG-SAL

V. B. Z. ROSA¹, L. R. POLLI¹, A. G. COTTAS¹, É. O. WATANABE¹ e J. S. FERREIRA¹

¹ Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Engenharia Química
E-mail para contato: victorbzr100@hotmail.com

RESUMO – O sistema aquoso bifásico (SAB) é um método de extração líquido-líquido, com aplicações na purificação de biomoléculas, por se tratar de um ambiente biocompatível e não tóxico para estes compostos. Neste trabalho foram utilizados SABs do tipo PEG-sal na proporção 13% polímero e 14% sal, utilizando PEG 1500 e PEG 4000 e os sais fosfato de potássio e citrato de sódio para purificação de ficocianina (FC) de *Anabaena variabilis*. Dentre os resultados obtidos, observou-se que a FC se particionou para fase topo em todos os sistemas. O SAB formado por PEG 1500 – fosfato de potássio proporcionou melhores resultados, sendo encontrados coeficiente de partição de 5,44, e pureza de 1,11, que é considerada acima da pureza de grau alimentar.

1. INTRODUÇÃO

Os sistemas aquosos bifásicos (SABs) são um método de extração líquido-líquido que emprega duas fases, compostas por dois polímeros imiscíveis ou um polímero e um sal de baixo peso molecular. Eles são constituídos por espécies químicas que, em determinadas concentrações e temperatura, formam duas fases líquidas distintas (fase topo e fase fundo), em equilíbrio termodinâmico, com propriedades intensivas e composições diferentes (Haraguchi *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2016).

As principais vantagens do SABs são alta capacidade, alto rendimento, menor tempo de processo, baixo consumo de energia e facilidade de ampliação de escala. Além disso, os SABs oferecem um ambiente biocompatível e sem toxicidade por possuírem, na maioria dos casos, alta concentração de água em ambas as fases e baixa tensão superficial, resultando em um ambiente ameno, favorável e estável para utilização em biomoléculas, uma vez que desnaturação, mudanças estruturais e perda de atividade biológica dificilmente ocorrem nestas condições (Asenjo e Andrews, 2012; Zhao *et al.*, 2014).

Dentre os tipos de SAB, os sistemas PEG-sal têm sido utilizados para separação de proteínas, que pode ser de dendritos celulares ou uma proteína específica dentre outras proteínas, devido à maior diferença na densidade entre as fases, menor viscosidade e baixo custo, levando a uma separação bem mais rápida (cerca de 30 minutos) do que sistemas Polímero/Polímero (cerca de 1 a 6 horas), dependendo do tamanho da proteína (Nascimento *et al.*, 2011). A maioria das partículas solúveis e dos particulados tende a se particionar para a fase mais polar (fase sal ou fundo) enquanto as proteínas tendem a se particionar na fase



hidrofóbica (fase polímero ou topo) (Asenjo e Andrews, 2012). Além disso, o SAB do tipo polímero-sal apresenta taxas de recuperação da ordem de 90% e fator de purificação de até 4, ou seja, o composto recuperado possui concentração 4 vezes maior que o componente inicial (Igbal *et al.*, 2016).

As Ficobiliproteínas (FBP) são um conjunto de proteínas pigmentadas, hidrossolúveis e fluorescentes, presentes em cianobactérias, algas vermelhas e criptofíceas (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2013). Juntamente com a clorofila, são os principais pigmentos fotossintéticos nas cianobactérias e permitem a otimização da captura de luz e transferência de energia, graças à organização e posicionamento dos pigmentos (Doust *et al.*, 2004; Manirafasha *et al.*, 2016).

Uma aplicação das FBP é como corantes naturais. Os corantes desempenham papel importante na indústria alimentícia, sobretudo por ser um fator crítico para a aceitação do produto pelo consumidor (Rizzo *et al.*, 2015). O interesse na utilização de fontes naturais para obtenção de corantes, substituindo parcial ou completamente os corantes artificiais, está na agregação de valor nutricional e redução de toxicidade dos alimentos, uma vez que as crianças são as principais consumidoras de produtos coloridos artificialmente (Ores *et al.*, 2016).

A ficocianina (FC) é considerada a principal ficobiliproteína (FBP) presente nas cianobactérias, sendo encontrada em maior quantidade e proporção. Seu valor comercial depende da sua pureza, obtida pela razão entre o valor da absorbância máximo da FC (615 nm) e o valor de absorbância relacionado com a proteína total (280 nm). A FC com pureza maior que 0,7 é considerada como grau alimentício, maior que 3,9 como grau reativo e acima de 4,0 como grau analítico (Lauceri *et al.*, 2018).

O objetivo do trabalho foi recuperar FC extraída da cepa de *Anabaena variabilis* por SABs tipo PEG-sal, utilizando PEG 1500 e 4000 e os sais fosfato de potássio e citrato de sódio, na proporção 13% polímero e 14% sal.

2. METODOLOGIA

A cepa de *Anabaena variabilis* ATCC 29413, utilizada neste trabalho foi, gentilmente, doada pelo Laboratório de Cianobactérias e Ficotoxinas da FURG (Rio Grande, RS) e mantida em meio BG11₀ (Jacinavicius *et al.*, 2013).

O extrato bruto de ficobiliproteínas foi obtido por ciclos de congelamento e descongelamento combinado com ultrassom, sendo 5 ciclos de congelamento por 1,5h a 15°C e descongelamento em banho ultrassônico por 30 min a 25°C (Cottas, 2019).

Para o preparo dos sistemas aquosos bifásicos, para fase foi obtida a partir de soluções aquosas de PEG 50% (m/m) e de sal 30% (m/m), sendo que a composição do SAB foi definida na proporção indicada na Tabela 1.

Tabela 1 – Características do SAB utilizado

	% (m/m) PEG	% (m/m) Sal	% (m/m) Extrato	Massa Total do Sistema (g)
Proporção	13,0	14,0	27,0	20

Cada SAB foi preparado em triplicata em funil de separação graduado, mantido em banho termostático à temperatura de 15°C por 2 horas, de modo a atingir o equilíbrio. Após o equilíbrio, foram medidos os volumes de cada fase e, em seguida, as fases foram separadas, a fase topo foi removida por pipeta Pasteur e a fase fundo escoada pelo registro do funil de separação.

Após a separação das fases, fez-se a leitura de absorbância de cada uma e foram calculadas concentração (C), pureza (P), coeficiente de partição, razão de volume entre as fases (Vr) e recuperação de FC, de acordo com as Equações 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente:

$$C = \frac{A_{615} - 0,474.(A_{652})}{5,34} \quad (1)$$

$$P = \frac{A_{615}}{A_{280}} \quad (2)$$

$$K = \frac{[\text{Ficobiliproteína}]_{\text{topo}}}{[\text{Ficobiliproteína}]_{\text{fundo}}} \quad (3)$$

$$Vr = \frac{V_{\text{TOPO}}}{V_{\text{FUNDO}}} \quad (4)$$

$$R(\%) = \frac{100}{1 + (K.Vr)^{-1}} \quad (5)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração e pureza iniciais do extrato obtido de *Anabaena varibilis* é mostrada na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração e pureza inicial de FC do extrato inicial

Pureza FC	C (µg/mL)
0,67	45,0

Após purificação, os resultados obtidos são mostrados na Tabela 3:

Tabela 3 – SAB PEG-sal (13% PEG e 14% sal)

Sal	PM PEG	K ¹	P ²	R (%) ³	Vr ⁴	pH
Fosfato de Potássio	1500	5,44	1,11 ± 0,02	81,76 ± 0,13	0,82	7,17 ± 0,04
	4000	2,77	0,96 ± 0,04	67,77 ± 0,10	0,76	
Citrato de Sódio	1500	4,57	0,88 ± 0,01	83,54 ± 0,11	1,11	8,31 ± 0,04
	4000	1,74	0,82 ± 0,01	56,66 ± 0,21	0,75	



¹ coeficiente de partição, ² pureza, ³ recuperação, ⁴ razão de volume (topo/fundo)

De acordo com a Tabela 3 nota-se que a FC se particiona para a fase topo ($K > 1$) em todos os sistemas analisados, indicando uma maior afinidade da proteína com a fase hidrofóbica (rica em PEG).

Com relação ao peso molecular do polímero, foram obtidas maiores pureza e recuperação utilizando PEG 1500 em relação ao PEG 4000. Este resultado é devido à menor cadeia carbônica do polímero, resultando em maior volume livre na fase topo para acomodação e separação da FC (Patil e Raghavarao, 2007).

Em relação ao tipo de sal, o fosfato de potássio obteve os maiores coeficientes de partição, sendo o maior destes 5,44 no SAB utilizando PEG 1500. Uma possível explicação para esse fato provém do pH do sistema ser próximo ao neutro (pH 7,0), sendo ambiente biocompatível para proteínas (Patil *et al.*, 2008).

As maiores recuperações foram obtidas para sistemas utilizando PEG 1500, sendo 81,76% utilizando fosfato de potássio e 83,54% utilizando citrato de sódio. Outro fator importante na recuperação é a razão de volume entre as fases (V_r) e quanto maior esse valor (maior volume da fase topo), maior a recuperação (Patil *et al.*, 2008), o que corrobora com os resultados deste trabalho.

A pureza máxima de FC foi obtida para o sistema PEG 1500 – fosfato de potássio, com pureza de 1,11, representando aumento de 66% em relação a pureza inicial do extrato (0,67), evidenciando a purificação da FC ao final do processo de recuperação por SAB PEG-sal e obtendo pureza a nível de aplicação em grau alimentar (acima de 0,7), conforme relatado por Lauceri *et al.* (2018).

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que foi possível a purificação de FC obtida da cepa de *Anabaena variabilis* por SAB do tipo PEG-sal na proporção de (13% PEG e 14% sal), obtendo-se pureza máxima para o sistema PEG 1500 – fosfato de potássio de 1,11 e maior coeficiente de partição (5,44). As melhores recuperações foram para os sistemas utilizando PEG 1500 e maiores V_r (81,76% para fosfato de potássio e 83,54% para citrato de sódio).

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

6. REFERÊNCIAS

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: Phase separation and applications. *J Chromatogr A*, v. 1238, p. 1–10, 2012.



- BARBOSA, A. A.; BONOMO, R. C. F.; MARTINS, C. V.; FONTAN, R. C. I.; JÚNIOR, E. C. S.; MINIM, L. A.; PIGNATA, M. C. Equilibrium Data and Physical Properties of Aqueous Two Phase Systems Formed by PEG (1500 and 4000) g·mol⁻¹ + Sodium Sulfate + Water at Different Temperatures and pH 2. *J Chem Eng Data*, v. 61(1), p. 3–11, 2016.
- COTTAS, A. G. Avaliação do processo de produção de ficobiliproteínas de cianobactérias e purificação por sistemas aquosos bifásicos. *Dissertação de Mestrado*. Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia – UFU, 2019.
- DOUST, A. B., MARAI, C. N. J., HARROP, S. J., WILK, K. E., CURMI, P. M. G., SCHOLE, G. D. Developing a structure-function model for the cryptophyte phycoerythrin 545 using ultrahigh resolution crystallography and ultrafast laser spectroscopy. *J. Mol. Biol.*, v. 344(1), p. 135–153, 2004.
- HARAGUCHI, L. H.; MOHAMED, R. S.; LOH, W.; PESSÔA FILHO, P. A. Phase equilibrium and insulin partitioning in aqueous two-phase systems containing block copolymers and potassium phosphate. *Fluid Ph. Equilibria*, v. 215(1), p. 1–15, 2004.
- IGBAL, M.; TAO, Y.; XIE, S.; ZHU, Y.; CHEN, D.; WANG, X.; YUAN, Z. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. *Biol Proced Online*, v. 18(1), p. 1–18, 2016.
- JACINAVICIUS, F. R.; GAMA JUNIOR, W. A.; AZEVEDO, M. T. P.; SANTANNA, C. Manual para cultivo de cianobactérias. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 2013.
- LAUCERI, R.; CHINI ZITTELLI, G.; MASERTI, B.; TORZILLO, G. Purification of phycocyanin from *Arthrospira platensis* by hydrophobic interaction membrane chromatography. *Algal Research*, v. 35, p. 333–340, 2018.
- MANIRAFASHA, E., NDIKUBWIMANA, T., ZENG, X., LU, Y., JING, K. Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. *Biochem. Eng. J.*, v. 109, p. 282–296, 2016.
- NASCIMENTO, K. S.; YELO, S.; CAVADA, B. S.; AZEVEDO, A. M.; AIRES-BARROS, M. R. Liquid– Liquid Equilibrium data for Aqueous Two-Phase Systems composed of Ethylene Oxide Propylene Oxide Copolymers. *J Chem Eng Data*, v. 56, n.2, pp. 190–194, 2011.
- ORES, J. DA C.; AMARANTE, M. C. A. DE; KALIL, S. J. Co-production of carbonic anhydrase and phycobiliproteins by *Spirulina* sp. and *Synechococcus nidulans*. *Bioresour. Technol*, v. 219, p. 219–227, 2016.
- PATIL, G.; CHETHANA, S.; MADHUSUDHAN, M. C.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Fractionation and purification of the phycobiliproteins from *Spirulina platensis*. *Bioresour. Technol.*, v. 99(15), p.7393–7396, 2008.



- PATIL, G.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycoerythrin. *Biochem Eng J.*, v. 34(2), p. 156–164, 2007.
- RIZZO, R. F.; SANTOS, B. DO N. C. DOS; CASTRO, G. F. P. DA S. DE; PASSOS, T. S.; NASCIMENTO, M. DE A.; GUERRA, H. D.; LIMA-ARAÚJO, K. G. DE. Production of phycobiliproteins by *Arthrospira platensis* under different light conditions for application in food products. *Food Sci. Technol. (Campinas)*, v. 35(2), p. 247–252, 2015.
- RUIZ-RUIZ, F., BENAVIDES, J., RITO-PALOMARES, M. Scaling-up of a B-phycoerythrin production and purification bioprocess involving aqueous two-phase systems: Practical experiences. *Process Biochem.*, v. 48(4), p. 738–745, 2013.
- ZHAO, L.; PENG, Y.; GAO, J.; CAI, W. Bioprocess intensification: An Aqueous Two-Phase Process for the Purification of C-phycoerythrin from dry *Spirulina platensis*. *Eur Food Res Technol.*, v. 238, n.3, p. 451-457, 2014.