



# PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE *Spirulina platensis* UTILIZANDO SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO COMPOSTO POR POLIETILENO GLICOL E FOSFATO DE SÓDIO

A.L.L. Menegotto<sup>1</sup>, B.P. Balestieri<sup>2</sup>, J. Steffens<sup>3</sup>, E. Valduga<sup>4</sup>

1-Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos – Universidade Regional Integrada das Missões e do Alto Uruguai (URI) – CEP: 99700-000 – Erechim – RS – Brasil – e-mail: ([annelupatini@yahoo.com.br](mailto:annelupatini@yahoo.com.br))

2-Departamento de Alimentos – Universidade Regional Integrada das Missões e do Alto Uruguai (URI) – CEP: 99700-000 – Erechim – RS – Brasil – e-mail: ([bianca.balestieri@hotmail.com](mailto:bianca.balestieri@hotmail.com))

3-Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos – Universidade Regional Integrada das Missões e do Alto Uruguai (URI) – CEP: 99700-000 – Erechim – RS – Brasil – e-mail: ([julisteffens@uricer.edu.br](mailto:julisteffens@uricer.edu.br))

4-Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos – Universidade Regional Integrada das Missões e do Alto Uruguai (URI) – CEP: 99700-000 – Erechim – RS – Brasil – e-mail: ([veunice@uricer.edu.br](mailto:veunice@uricer.edu.br))

**RESUMO** – O aumento no crescimento populacional e a desnutrição em diversos países subdesenvolvidos tornam necessário buscar e estudar novas alternativas de fontes proteicas. Neste contexto, as microalgas vêm se destacando por sua composição e qualidade nutricional, com alto conteúdo proteico. Dentre as algas, a *Spirulina platensis* é uma fonte alternativa no aporte deste nutriente, podendo ser comparada a proteínas animais e vegetais. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a purificação e recuperação das proteínas de *S. platensis* ao utilizar sistema aquoso bifásico (SAB) composto por polietileno glicol (PEG) e fosfato de sódio, variando as massas molares de PEG (1500, 4000, 6000 e 8000 Da). Os fatores de purificação variaram entre 0,83 a 1,52; a máxima recuperação proteica foi de 75,05%, utilizando 14% de fosfato de potássio e 15% de PEG de 1500 Da. O SAB é uma alternativa de baixo custo para recuperação/purificação de proteínas de *S. platensis*.

**ABSTRACT** – The increase in population growth and malnutrition in several underdeveloped countries makes it necessary to study and search for new alternatives for protein sources. In this context, microalgae have stood out for their composition and nutritional quality, with high protein content. Among microalgae, *Spirulina platensis* is an alternative source in the supply of this nutrient, which can be compared to animal and vegetal proteins. Thus, the objective of this work was to evaluate the purification and recovery of *S. platensis* proteins using an aqueous biphasic system (ABS) composed of polyethylene glycol (PEG) and sodium phosphate, varying the molar weights of PEG (1500, 4000, 6000 and 8000 Da). Purification factors ranged from 0.83 to 1.52; the maximum protein recovery was 75.05% using 14% potassium phosphate and 15% PEG of 1500 Da. SAB is a low-cost alternative for recovery/purification of *S. platensis* proteins.

**PALAVRAS-CHAVE:** estratégia sequencial de planejamento de experimentos; proteínas de microalgas; separação de proteínas.

**KEYWORDS:** microalgae proteins; separation of proteins; sequential strategy of experimental design.

## 1. INTRODUÇÃO

Entre os anos 60 e 70 alguns pesquisadores começaram a se preocupar com a falta de alimentos devido ao crescimento exponencial da população (Matassa et al., 2016), foi nesta época que o cultivo de microalgas foi inicializado, considerando-as uma fonte proteica alternativa (Roy, Pal, 2015). Entre as microalgas, a *Spirulina platensis* vem recebendo grande atenção, devido sua composição centesimal, com 8-14% de carboidratos, 4-9 de lipídios e seu alto conteúdo proteico (46-63%) (Becker, 2007), que pode ser comparado à carne (46-63%) e a soja (~40%) (Lupatini et al, 2017b).



A extração e purificação de compostos de interesse de microalgas são fatores limitantes para obtê-los em larga escala, o que leva a necessidade de aplicação de técnicas eficazes e de baixo custo. Para tal, métodos de separação de proteínas como sistemas aquosos bifásicos (SAB) vêm se destacando pela sua facilidade, rapidez e baixo custo (Wu et al., 2014). O SAB envolve o isolamento do composto de interesse a partir da concentração do mesmo em uma das suas fases (Leong et al., 2015), sendo simples e com potencial de aumento de escala (Raja et al., 2011). Os principais componentes destes sistemas são polímeros, sais e/ou solventes orgânicos (Leong et al., 2015). A eficácia da partição de biomoléculas a partir deste método se deve pela possibilidade em manipular seus parâmetros, tais como concentração dos seus componentes, pH e temperatura (Raja et al., 2011).

Entretanto, o SAB ainda é pouco aplicado para purificação de proteínas de *S. platensis*, sendo encontrado na literatura somente trabalhos envolvendo a purificação de ficobiliproteínas, tais como a ficocianina. Antelo et al. (2015) estudaram o uso de SAB composto por fosfato de potássio e polietileno glicol (PEG) para purificação de ficocianina de *S. platensis* e atingiram recuperação de 100%. Patil et al. (2008) também estudaram a purificação de ficocianina aplicando SAB com diferentes sais e PEG, sendo que o fosfato de potássio apresentou melhor recuperação e pureza do pigmento e pureza de

Ao considerar a necessidade do desenvolvimento de novas fontes proteicas para suplementação nutricional e aplicação em diferentes tipos de alimentos, este estudo teve como objetivo estudar a viabilidade da utilização de SAB composto por PEG e fosfato de potássio para purificação de proteínas de *S. platensis*, previamente extraídas por ondas ultrassônicas, empregando estratégia de planejamento de experimentos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Extração de proteínas da biomassa de *S. platensis*

A biomassa inativa da microalga *S. platensis* desidratada foi obtida comercialmente pela Fazenda Tamandua (Santa Terezinha, Paraíba). A extração proteica foi realizada conforme Lupatini et al. (2017a) com adaptações. A biomassa foi dissolvida em água purificada (30 g.L<sup>-1</sup>) e o pH foi ajustado para 9,0 com NaOH 0,1 M. A suspensão foi submetida ao tratamento ultrassônico em banho de ultrassom (Unique, USC-1800A, Indaiatuba) na frequência de 40 kHz, amplitude de 90% por 35 min e, em seguida à agitação mecânica (Fisatom, 712, São Paulo) na velocidade de 100 rpm por 50 min, a 30 °C. Para separação das fases realizou-se centrifugação (Biosystems, MPW-351R, Curitiba) à 7000 rpm, 25 °C por 15 min, e do sobrenadante foi obtido o extrato proteico de *S. platensis* (EPSp).

### 2.2. Recuperação de proteínas de *S. platensis*

O EPSp foi submetido a ensaios de purificação proteica empregando SABs compostos por fosfato de potássio e PEG em diferentes massas molares (1500, 4000, 6000 e 8000 Da), fixando o pH em 9,0. No delineamento experimental empregou-se planejamentos fatoriais (PF) 2<sup>2</sup> (3 pontos centrais, total de 7 ensaios) para a avaliação de duas variáveis sobre o processo de purificação de proteínas: concentração de fosfato de potássio (% m/m) e concentração de PEG (% m/m); para cada massa molar de PEG foi desenvolvido um PF. Os níveis reais e codificados das variáveis estudadas nos PFs (Tabela 1) foram definidos os diagramas de fases construídos por Minami (1997). As concentrações das soluções estoques, PEG e fosfato de potássio, foram 50 e 40% (m/m), respectivamente.

Os ensaios foram conduzidos em tubos tipo falcon onde foram adicionadas as soluções estoques de PEG e fosfato de potássio, e em seguida o EPSp (20% da massa final do sistema). Os tubos foram homogeneizados em vortex (Quimis, Q220B1, Diadema) e mantidos em repouso (15 min), e posteriormente centrifugados (Biosystems, MPW-351R, Curitiba) por 20 min, 4000 rpm e 25 °C.

As fases topo e fundo foram separadas sendo que cada fase foi submetida à análise de concentração de nitrogênio (g.L<sup>-1</sup>), pelo método de oxidação por combustão catalítica a 720 °C com detecção por infravermelho (Shimadzu, TOC-VCSH, Japão); para o cálculo de proteína (g.L<sup>-1</sup>) levou-se em consideração o fator geral de conversão de nitrogênio (6,25). Os parâmetros de purificação, fator de

purificação (FP), recuperação (RE), razão volume (Rv) e coeficiente de partição (Kp) foram calculados de acordo com Albertson (1986).

### 2.3 Análise estatística

Os resultados foram tratados pela metodologia de planejamento de experimentos e pela análise de variância (ANOVA) com o auxílio do software *Statistica* 11.0 (Statsoft Inc., EUA) com 90% de nível de confiança.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta a matriz do PF 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados) das variáveis estudadas com os SABs compostos por PEG e fosfato de potássio e as respostas dos fatores de purificação (FP, RE, Kp e Rv). A máxima concentração de proteínas ocorreu nas fases topo (Kp > 1,0), indicando maior solubilidade deste componente em solução composta por PEG.

Os maiores resultados ocorreram ao utilizar PEG 1500, atingindo 1,42 de FP (ensaio 4), e 75,05% de RE (ensaio 1). Em geral, o fracionamento das proteínas pode ser favorecido com PEG de menor peso molar, pois em pesos molares mais altos (> 1500 Da), o volume livre da solução é reduzido, dificultando a solubilidade das proteínas-alvo na fase rica em polímero e devido ao mecanismo de exclusão molecular, leva as proteínas a migrarem à fase salina (Goja et al., 2013; Franco et al., 2005).

A partição de proteínas utilizando SAB pode ser influenciada por diversos fatores, como: massa molar e concentração do polímero, tipo e concentração do sal, pH, tamanho da proteína, entre outros (Leong et al., 2015). O pH é uma variável importante do processo, considerando-se a solubilidade das proteínas (Franco et al., 2005), portanto este parâmetro foi fixado em 9,0 sendo um ponto de alta solubilidade das proteínas de *S. platensis*. Entre os polímeros, o PEG vem sendo muito utilizado em SAB devido sua característica inerte e de carga neutra (Pereira et al., 2012).

A Figura 1 representa os gráficos de Pareto com efeitos estimados das variáveis estudadas. Ao mudar o nível de -1 a +1, a concentração de fosfato de potássio (%) apresentou efeito positivo e significativo ( $p \leq 0,10$ ) para FP, indicando que os maiores resultados de FP ocorrem em maiores concentrações de sal; isto ocorre devido ao *salting-out* das proteínas, que ao reduzir a solubilidade deste componente na fase salina, favorece a migração para fase topo (Ng et al., 2018). Já o efeito negativo para a resposta RE (%) é decorrente da redução de volume da fase topo consequência do aumento da concentração salina (Xin-Ying et al., 2012), onde o sal se liga com as moléculas de água devido a solvatação dos íons (Franco et al., 2005), aumentando o volume da fase fundo. Muitas vezes, ao utilizar SAB, a RE da proteína apresenta efeitos contrários ao FP, quanto maior a pureza da proteína-alvo, menor é sua recuperação; isto ocorre devido a maior possibilidade de perdas junto aos contaminantes no momento que se intensifica o processo de purificação (Antelo et al., 2015).

Em geral, o aumento da concentração do PEG favorece a partição das proteínas, aumentando o Kp do sistema (Pereira et al., 2012). Contudo, valores intermediários de PEG são mais aplicáveis, garantindo uma adequada separação e purificação (Goja et al., 2013). Em altas concentrações do polímero, ocorre o aumento da viscosidade do sistema, dificultando a homogeneização e, conseqüentemente, a separação das fases (Pereira et al., 2012). Comportamento semelhante foi observado por Antelo et al. (2015) que ao purificar ficocianina de *S. platensis* em SAB composto por PEG 1500, 4000, 6000 e 8000 e fosfato de potássio, notaram efeitos positivos para FP em todas as massas molares avaliadas e para RE (%), os resultados positivos ocorreram somente para 1500 e 6000.

A aplicação da metodologia de planejamento de experimentos permitiu a seleção das variáveis estatisticamente significativas em relação ao processo de purificação de proteínas de *S. platensis* utilizando SAB composto por PEG e fosfato de potássio, além de indicar qual massa molar de PEG é adequada para o sistema. De forma geral, o SAB composto com PEG 1500 Da com maior concentração de polímero e sal (25% de PEG e 20% de sal), apresentou melhores resultados de purificação com FP de 1,52 e RE de 56,35%.

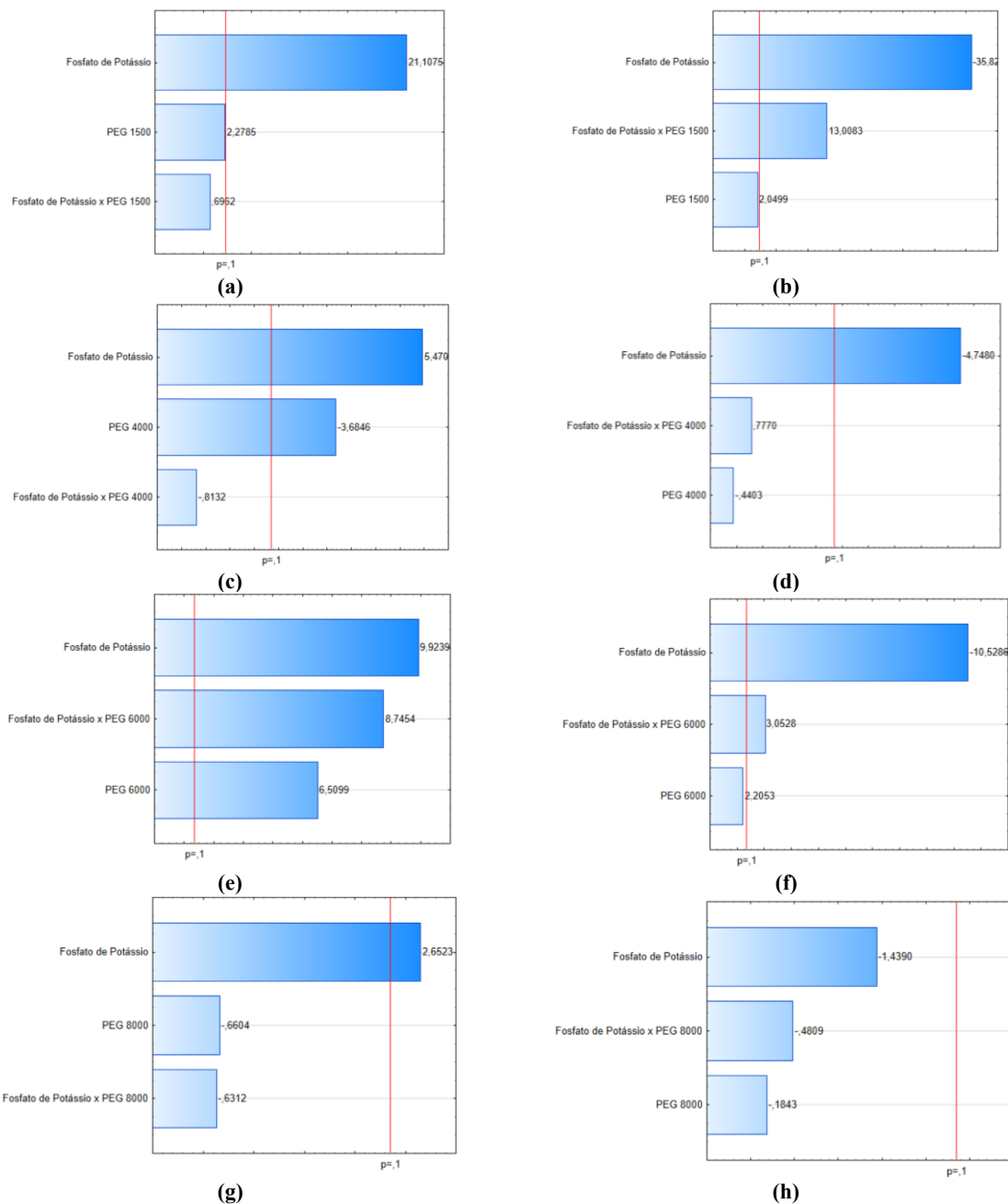
Tabela 1 – Matriz do PF 2<sup>2</sup> (valores reais e codificados) para purificação de proteínas de *S. platensis* com SABs compostos por PEG (1500, 4000, 6000 e 8000) e fosfato de potássio com as respostas de FP e RE (%) para as fases topo e, Rv e Kp dos sistemas.

SAB PEG 1500/fosfato de potássio						
Ensaio	Variáveis independentes*		Variáveis dependentes		Rv	Kp
	Fosfato de potássio (%)	PEG 1500 (%)	FP	RE (%)		
1	-1 (14)	-1 (15)	1,11 ± 0,02	75,05 ± 1,30	6,20	2,01
2	+1 (20)	-1 (15)	1,47 ± 0,00	48,02 ± 0,01	0,79	2,40
3	-1 (14)	+1 (25)	1,14 ± 0,00	68,99 ± 0,26	3,48	1,93
4	+1 (20)	+1 (25)	1,52 ± 0,03	56,35 ± 1,06	0,89	3,41
5	0 (17)	0 (20)	1,35 ± 0,01	62,59 ± 0,59	1,57	2,05
6	0 (17)	0 (20)	1,33 ± 0,05	62,94 ± 2,57	1,56	2,19
7	0 (17)	0 (20)	1,31 ± 0,00	62,88 ± 0,04	1,69	1,89
SAB PEG 4000/fosfato de potássio						
Ensaio	Variáveis independentes*		Variáveis dependentes		Rv	Kp
	Fosfato de potássio (%)	PEG 4000 (%)	FP	RE (%)		
1	-1 (11)	-1 (15)	1,10 ± 0,02	67,04 ± 1,22	3,50	1,48
2	+1 (17)	-1 (15)	1,25 ± 0,05	35,90 ± 1,41	0,66	1,75
3	-1 (11)	+1 (25)	1,03 ± 0,01	60,18 ± 0,57	2,73	1,17
4	+1 (17)	+1 (25)	1,14 ± 0,01	37,80 ± 0,31	0,77	1,54
5	0 (14)	0 (20)	1,15 ± 0,01	43,04 ± 1,37	0,95	1,52
6	0 (14)	0 (20)	1,11 ± 0,02	42,40 ± 0,83	0,95	1,38
7	0 (14)	0 (20)	1,16 ± 0,01	42,93 ± 0,25	0,94	1,50
SAB PEG 6000/fosfato de potássio						
Ensaio	Variáveis independentes*		Variáveis dependentes		Rv	Kp
	Fosfato de potássio (%)	PEG 6000 (%)	FP	RE (%)		
1	-1 (9,0)	-1 (13)	1,05 ± 0,02	72,37 ± 1,30	6,12	1,65
2	+1 (15)	-1 (13)	1,07 ± 0,04	30,24 ± 1,21	0,62	1,37
3	-1 (9,0)	+1 (23)	1,00 ± 0,03	69,74 ± 2,25	6,67	1,52
4	+1 (15)	+1 (23)	1,37 ± 0,11	46,55 ± 3,59	0,78	1,87
5	0 (12)	0 (18)	1,16 ± 0,01	50,39 ± 0,48	1,28	1,38
6	0 (12)	0 (18)	1,12 ± 0,03	50,88 ± 1,45	1,33	1,32
7	0 (12)	0 (18)	1,14 ± 0,03	50,62 ± 1,55	1,32	1,34
SAB PEG 8000/fosfato de potássio						
Ensaio	Variáveis independentes*		Variáveis dependentes		Rv	Kp
	Fosfato de potássio (%)	PEG 8000 (%)	FP	RE (%)		
1	-1 (10)	-1 (18)	0,83 ± 0,00	53,20 ± 0,05	4,20	1,38
2	+1 (14)	-1 (18)	1,18 ± 0,01	44,51 ± 0,57	0,97	1,99
3	-1 (10)	+1 (26)	0,83 ± 0,00	55,89 ± 0,08	3,44	1,39
4	+1 (14)	+1 (26)	1,04 ± 0,01	38,48 ± 0,54	0,94	1,76
5	0 (12)	0 (22)	0,83 ± 0,01	35,96 ± 0,29	1,25	1,24
6	0 (12)	0 (22)	0,83 ± 0,00	35,93 ± 0,07	1,25	1,22
7	0 (12)	0 (22)	0,84 ± 0,03	36,20 ± 1,46	1,22	1,30

\*variáveis independentes fixas: concentração EPSp: 20%; pH: 9,0, tempo de repouso: 15 min.

A biomassa da *S. platensis* já vem sendo aplicada em diferentes formulações de alimentos, principalmente devido seu conteúdo nutricional, estudos revelam potencial de aplicação em iogurte (Silva et al., 2019), sorvete e queijos macios (Agustini et al., 2016), entre outros. Desta forma, a proteína purificada de *S. platensis*, também, pode compor formulações de alimentos, assim como contribuir com o seu processamento, devido suas características tecno-funcional (Menegotto et al., 2019).

Figura 1 – Gráficos de Pareto dos efeitos estimados, tendo como variável-resposta FP (a, c, e, g) e RE (b, d, f, h) para SAB composto por fosfato de potássio e PEG, 1500, 4000, 6000 e 8000, respectivamente.



#### 4. CONCLUSÕES

As condições que possibilitaram a maior concentração de proteína (75,05%) de *S. platensis* e fatores de purificação (FP e RE) ocorreram nas fases topo ( $K_p > 1,0$ ), demonstrando maior afinidade das proteínas com a fase composta por PEG. A máxima purificação ocorreu ao utilizar 20% de fosfato de potássio e 25% de PEG 1500 Da, atingindo 1,52 de FP.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, CNPq, FAPERGS e URI pelo apoio financeiro.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agustini, T. W., Ma'ruf, W. F., Suzery, M., Hadiyanto, Benjakul, S. (2016). Application of *Spirulina platensis* on ice cream and soft cheese with respect to their nutritional and sensory perspectives. *Jurnal Teknologi*, 78, 245-251.
- Albertson, P. A. (1986). *Partitioning of cell particles and macromolecules*. Nova York: John Wiley & Sons.
- Antelo, F. S., Costa, J. A. V., & Kalil, S. J. (2015). Purification of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* in aqueous two-phase systems using an experimental design. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58, 1-11.
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as source of protein. *Biotechnology advances*, 25, 207-210.
- Franco, T. T., Kilikian, B. V., Coimbra, J. S. R., & Meirelles, A. J. A. (2005). Extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas. In: Pessoa Jr, A., & Kilikian, B. V. *Purificação de Produtos Biotecnológicos*. Barueri: Manole.
- Goja, A. M., Yang, H., Cui, M., & Li, C. (2013). Aqueous two-phase extraction advances for bioseparation. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 4, 1-8.
- Leong, Y. K., Koroh, F. E., Show, P. L., Lan, J. C.-W., & Loh, H.-S. (2015). Optimisation of extractive bioconversion for green polymer via aqueous two-phase system. *Chemical Engineering Transactions*, 45, 1495-1500.
- Lupatini, A. L., Bispo, L. O., Colla, L. M., Costa, J. A. V., Canan, C., Colla, E. (2017a). Protein and carbohydrate extraction from *S. platensis* biomass by ultrasound and mechanical agitation. *Food Research International*, 99, 1028-1035.
- Lupatini, A. L., Colla, L. M., Canan, C., & Colla, E. (2017b). Potential application of microalgae *Spirulina platensis* as a protein source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 97, 724-732.
- Matassa, S., Boon, N., Pikaar, I., & Verstraete, W. (2016). Microbial protein: future sustainable food supply route with low environmental footprint. *Microbial Biotechnology*, 9, 568-575.
- Minami, N. M. (1997). *Extração líquido-líquido aplicada à separação e purificação de amiloglicosidase*. (Dissertação de mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Ng, H. S., Chai, C. X. Y., Chow, Y. H., Loh, W. L. C., Yim, H. S., Tan, J. S., & Lan, J. C.-W. (2018). Direct recovery of *Bacillus subtilis* xylanase from fermentation broth with an alcohol/salt aqueous biphasic system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 125, 585-589.
- Patil, G., Chethana, S., Mudhusudhan, M. C., Raghavarao, K. S. M. S. (2008). Fractionation and purification of the phycobiliproteins from *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*, 99, 7393-7396.
- Pereira, J. F. B., Santos, V. C., Johansson, H.-O., Teixeira, J. A. C., & Pessoa Jr, A. (2012). A stable liquid-liquid extraction system for clavulanic acid using polymer-based aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*, 98, 441-450.
- Raja, S., Murty, V. R., Thivaharan, V., Rajasekar, V., & Ramesh, V. (2011). Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules – a review. *Science and Technology*, 1, 7-16.
- Da Silva, S. C., Fernandes, I. P., Barros, L., Fernandes, A., Alves, M. J., Calhella, R. C., Pereira, C., Barreira, J. C. M., Manrique, Y., Colla, E., Ferreira, I. C. F. R., Barreiro, M. F. (2019). *Journal of Functional Foods*, 60, 103427.
- Wu, Y., Wang, Y., Zhang, W., Han, J., Liu, Y., Hu, Y., & Ni, L. (2014). Extraction and preliminary purification of anthocyanins from grape juice in aqueous two-phase system. *Separation and Purification Technology*, 124, 170-178.
- Xin-Ying, Z., Feng, Q., Min, D., Fan, C., Ai-Qin, L., & Jing-Hua, Z. (2012). Separation of proteins by aqueous two-phase extraction system combined with liquid chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 40, 38-42.