



**Maria Clara
Ramos Chácara**

**Uso de sistemas aquosos bifásicos para
a purificação de R-ficoeritrina extraída de
macroalgas vermelhas**

**Use of aqueous biphasic systems to
purify R-phycoerythrin extracted from
red seaweeds**



Universidade de Aveiro 2016

Departamento de Química

**Maria Clara
Ramos Chácara**

**Uso de sistemas aquosos bifásicos para a
purificação de R-ficoeritrina extraída de
macroalgas vermelhas**

**Use of aqueous biphasic systems to purify R-
phycoerythrin extracted from red seaweeds**

Dissertação de mestrado apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica do Professor Dr. João Manuel da Costa e Araújo Pereira Coutinho, Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e Doutora Maria Helena Abreu, Co-fundadora e Diretora de IDI da AlgaPlus, Ltda.

Porque **Deus dá sabedoria, conhecimento e prazer** ao homem
que lhe agrada;
(Eclesiastes 2:26a)

o júri
presidente

Prof. Doutora Maria Inês Purcell de Portugal Branco
Diretora do curso de Mestrado Integrado de Engenharia Química da Universidade
de Aveiro

Prof. Doutor João Manuel da Costa e Araújo Pereira Coutinho
Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Oscar Rodriguez Figueiras
Investigador, Programa Ramón y Cajal da Universidade de Santiago de
Compostela, Espanha

Agradecimentos Agradeço primeiramente a Deus, que me deu esta oportunidade que era algo impossível aos olhos de todos. Guiou o meu caminho e sempre me deu forças para não desistir. Pôs na minha vida pessoas que me encorajaram e nos momentos mais difíceis ensinaram-me a olhar para os problemas com outra perspectiva, pois a via é isto mesmo uma caminhada de aprendizagem.

Agradeço ao professor João Coutinho que me acolheu como sua aluna de tese de mestrado, por todos os raspanetes e todos os concelhos, muito obrigada é uma pessoa que marcou sem dúvida a minha vida. À professora Sónia Ventura, por ter encaminhado os passos deste trabalho nestes últimos meses, pelo incentivo e toda a motivação que precisava. A doutora Helena Abreu por ter se mostrado disponível para acompanhar este trabalho. À Margarida Martins pela paciência e dedicação, por não ter desistido de mim e ter me ajudado em tudo e por ter orientado no laboratório, pelas conversas, pelos concelhos, pelas risadas e tudo o resto que nós sabemos. Agradeço também à Chica que neste grupo foi sempre uma companheira para risos choros e quando necessário no trabalho. Ao João e ao Carlitos pelas risadas escandalosas e deliciosas nos laboratórios. A todos do grupo Path que se mostraram sempre prontos a ajudar em todas as questões, muito obrigada, principalmente pelos lanches, a melhor parte de tudo. Agradeço aos meus amigos que estiveram sempre perto quando precisei, obrigada pelos melhores momentos da minha vida, cinco anos de amizade que com certeza será para a vida toda. Gosto muito de vocês miguitos. Nunca serão esquecidos!

Agradeço a minha Isa, que é a pessoa mais presente mesmo estando sempre a quilómetros de distância. Muito obrigada pelo teu apoio incondicional pelas conversas pela amizade por tudo que vivemos e tudo o que partilhamos, muitíssimo obrigada.

Acima de tudo, quero agradecer a quem não entende nada da vida de num laboratório, mas entendem tudo de tudo na vida: os meus pais, que se dedicaram na minha educação fizeram todos os possíveis e impossíveis para me ajudarem em todas as áreas, sempre tiveram as palavras mais sábias para me consolar e encorajar; ao meu pai o meu concelheiro, à minha mãe a minha companheira e à minha irmã, o melhor presente do mundo. A tia Jack e tio Fernando que me conhecem desde pequena e estiveram presentes em todos os momentos desta jornada. A Brenda, minha meia irmã, que amo muito e Gabriel que são a família que Deus me deu neste país.

Obrigada a todos que acreditaram, àqueles que fizeram parte e de tudo e nunca desistiram de mim. Muito obrigada. Tudo o que sou, tem uma pontinha de cada um de vocês.

Palavras-chave

Macroalgas vermelhas, *Gracilaria* sp., ficobiliproteínas, sistemas aquosos bifásicos, purificação.

Resumo

A extração de compostos naturais a partir de recursos marinhos tem vindo a ser alvo de crescente interesse por parte da indústria biotecnológica, farmacêutica e cosmética. As macroalgas constituem uma matéria-prima atraente devido ao seu baixo custo, abundância, possibilidade de cultivo em aquacultura e constituição em compostos de valor acrescentado, nomeadamente compostos fotossintéticos, como é o caso das ficobiliproteínas. A ficoeritrina é uma ficobiliproteína reconhecida pelo seu vasto potencial, desde as suas características anti-tumorais, às suas propriedades como centros óticos ativos capazes de serem aplicados em células fotovoltaicas. Contudo, os métodos convencionais de purificação apresentam problemas que precisam ser ultrapassados, nomeadamente o ainda elevado custo associado, a morosidade e a baixa sustentabilidade de alguns destes processos.

Desta forma, este trabalho pretende desenvolver um processo alternativo de purificação de ficobiliproteínas mais eficientes a partir de extratos de macroalgas vermelhas. Os sistemas aquosos bifásicos (SABs) têm-se revelado potenciais alternativas aos métodos de purificação convencionais, nomeadamente os cromatográficos.

Numa primeira fase deste trabalho foram abordados diferentes métodos de pré-purificação nomeadamente a precipitação com acetona e sulfato de amónio. Verificou-se que enquanto há uma alteração do espectro típico da ficoeritrina no procedimento com acetona, quando o sulfato de amónio foi aplicado houve uma redução de 30% das proteínas totais tidas como contaminantes. Foram adicionalmente testados SABs poliméricos com e sem o uso de líquidos iónicos como adjuvantes. Outras condições foram testadas nomeadamente o tamanho do polímero, e o pH. Pelos resultados verificou-se que os sistemas estudados não promoveram a purificação eficiente das ficobiliproteínas.

Keywords

Red macroalgae, *Gracilaria* sp., phycobiliproteins, aqueous biphasic systems, purification

Abstract

The extraction of natural compounds from marine resources has been an increasingly focus of interest from the biotechnology, pharmaceutical, and cosmetic points of view. Macroalgae constitute an attractive raw material, because they are considered as a low-cost biomass, abundant, of facile aquaculture cultivation, and mainly, due to their high value in terms of their biochemistry, and high number of added-value bioactive compounds, namely the photosynthetic phycobiliproteins. Phycoerythrin is one of the most well-recognized phycobiliproteins, and it is responsible for photosynthesis in red macroalgae. It has been recognized for its great potential, namely regarding its anti-tumour properties and action as optical active centres to be applicable in photovoltaic cells. However, the conventional purification methods have some drawbacks to overcome, namely the associated high cost, the times required and the low sustainability of the methods.

In this work, it was intended to develop alternative and more efficient platforms for the purification of this protein from red seaweed extracts. The aqueous biphasic systems (ABS) have shown to be a potential alternative to replace the currently used purification methods, namely the chromatographic methods.

Firstly, different methods of pre-purification were investigated, namely the precipitation with acetone and ammonium sulphate, being the latest the most promising method due to the simultaneous reduction of 30% of contaminant proteins and maintenance of phycobiliproteins structure. Then, different polymeric-based ABS were studied with and without ionic liquids as adjuvants. Other conditions were also tested, namely the polymer molecular mass, and the pH. By analysing the main results it seems that ABS and conditions tested were not efficient promoting the phycobiliproteins purification.

Índice

Índice de Figuras.....	xiii
Índice de Tabelas	xv
Abreviaturas	xvii
1. Introdução	1
1.1 Recursos marinhos, exemplo das macroalgas	3
1.2 Ficobiliproteínas	4
1.3 R-ficoeritrina.....	7
1.4 Métodos convencionais de extração e purificação.....	7
1.5 Sistemas Aquosos Bifásicos – plataformas alternativas de purificação	8
1.6 Objetivos.....	10
2. Parte Experimental	11
2.1 Materiais	13
2.2 Metodologia	14
2.2.1 Extração sólido-líquido	14
2.2.2 Pré-purificação.....	14
2.2.3 Purificação de ficobiliproteínas usando sistemas aquosos bifásicos (SABs)	15
3. Resultados	17
3.1 Pré-purificação: precipitação com sulfato de amónio e acetona	19
3.2 Purificação: Sistemas aquosos bifásicos.....	20
3.2.1 Estudo da variação do peso molecular do polímero	21
3.2.3 Estudo do efeito do pH.....	22
3.2.2 Sistemas adjuvados com líquido iónico.....	23
4. Conclusão	27
6. Referências	33
7. Anexos.....	A
Anexo A – Curvas binodais dos sistemas aquosos bifásicos usados	C
Anexo B – Curvas de calibração.....	F
Anexo C- Balanços de massa	G

Índice de Figuras

Figura 1. Os espectros de absorção de ficobiliproteínas: (A) ficoeritrina (1- R-PE, 2- B-PE, 3- C-PE); (B) Outras ficobiliproteínas (4 - ficoeritrocianina, 5 - R-ficocianina, 6 - C-ficocianina e 7- aloficocianina) [14].....	5
Figura 2. Representação esquemática de um ficobilissoma que pode ser encontrado em cianobactérias e algas vermelhas: ficoeritrina (PE), ficocianina (PC) e aloficocianina (AP) [18].	6
Figura 3. Gracilaria sp. fresca recolhida dos tanques da ALGAplus.....	13
Figura 4. Estrutura química dos líquidos iônicos usados, cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio, [C ₂ mim]Cl, e cloreto de 1-hexil-3-metilimidazólio, [C ₆ mim]Cl. .	14
Figura 5. Espectro de absorção das frações obtidas dos passos de precipitação com: (A) sulfato de amónio; (B) acetona, onde SN corresponde ao sobrenadante e PT corresponde ao precipitado posteriormente ressuspendido em tampão fosfato de potássio 20 mM (pH 7).	19
Figura 6. Espectro de absorção das frações obtidas dos passos de precipitação com sulfato de amónio; onde SN corresponde ao sobrenadante e PT corresponde ao precipitado posteriormente ressuspendido em tampão fosfato de potássio 20 mM (pH 7).	20
Figura 7. Eficiência de extração (%) dos sistemas compostos por tampão + PEGs de diferentes massas molares + água. Ponto de mistura usado para os sistemas com tampão citrato de potássio: 30% (m/m) de PEG + 30% (m/m) K ₃ C ₆ H ₅ O ₇ /C ₆ H ₈ O ₇ + 40% (m/m) de extrato; e para os sistemas com o tampão fosfato de potássio: 15% (m/m) de PEG + 15% (m/m) K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ + 70% (m/m) de extrato.	21
Figura 8. Eficiência de extração (%) dos sistemas compostos por PEG 400 + tampão citrato de potássio + água a diferentes pHs, 6, 7 e 8, para o ponto de mistura de 30% (m/m) de PEG 400 + 30% (m/m) K ₃ C ₆ H ₅ O ₇ /C ₆ H ₈ O ₇ + 40% (m/m) de extrato.	23
Figura 9. Eficiência de extração (%) para os sistemas com e sem o uso dos líquidos iônicos [C ₂ mim]Cl e [C ₆ mim]Cl como adjuvantes, para os sistemas tampão fosfato de potássio (pH 7) + PEG de diferentes pesos moleculares + extrato.	24

Figura A 1. Curvas binodais para sistemas compostos por PEG 1500+ K_2HPO_4/KH_2PO_4 (pH 7) + 5 wt% de líquido iônico + água, (T = 298 K) Cl e respectiva curva do sistema não adjuvado (linha preta) [36].C

Figura A 2. Curvas binodais para sistemas a 298 (± 1) K, compostos por PEG (1500, 4000, 6000, e 8000) + K_2HPO_4/KH_2PO_4 (pH 7) + água + 5 wt% $[C_2mim]Cl$ e respectivas curvas em sistemas não adjuvados (linha preta) [36].C

Figura A 3. Curvas binodais para sistemas a 298 (± 1) K, compostos por PEG (1500, 4000, 6000, e 8000) + K_2HPO_4/KH_2PO_4 (pH 7) + água + 5 wt% $[C_6mim]Cl$, e respectivas curvas em sistemas não adjuvados (linha preta) [36].D

Figura A 4. Curvas binodais para os sistemas compostos por PEG 400 + $K_3C_6H_5O_7/C_6H_8O_7$ + água, (T = 298 K) a pH 5 (\blacklozenge); pH 6 (\bullet); pH 7 (\blacktriangle); pH 8 (\blacksquare) [46].D

Figura A 5. Curvas binodais para os sistemas compostos por PEG + $K_3C_6H_5O_7/C_6H_8O_7$ + água (T = 298 K, pH 7): PEG 400 (\blacktriangle); PEG 600 (\blacksquare); PEG 1000 (\bullet) [46].E

Figura B 1. Curva de calibração para quantificação das ficobiliproteínas em solução aquosa a 565 nm usando um leitor de microplacas UV-Vis (Synergy HT microplate reader – BioTek) e R-ficoeritrina como proteínas modelo..... F

Figura B 2. Curva de calibração para quantificação das proteínas totais em solução aquosa a 280 nm usando um leitor de microplacas UV-Vis (Synergy HT microplate reader – BioTek) e proteína de soro bovino como proteína modelo. F

Índice de Tabelas

Tabela C 1. Balanços de massa aos sistemas estudados	G
---	---

Abreviaturas

BM	Balanço de massa
[C₂mim]Cl	Cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio
[C₆mim]Cl	Cloreto de 1-hexil-3-metilimidazólio
EE (%)	Eficiência de extração, em percentagem
PEG	Polietileno-glicol
R-PE	R-ficoeritrina
SAB	Sistema Aquoso Bifásico

1. Introdução

1.1 Recursos marinhos, exemplo das macroalgas

Os recursos marinhos representam uma das fontes de matérias-primas mais ricas, considerado não só a sua riqueza bioquímica, mas também a capacidade de renovação que lhes está associada. Nesse sentido têm vindo a ser desenvolvidos vários programas governamentais que visam apoiar a otimização e maximização da exploração sustentável dos rios, mares e oceanos baseando-se na compreensão profunda dos ecossistemas aquáticos [1]. Além disso, torna-se também necessária a promoção da inovação e acima de tudo a criação de novas indústrias que possam vir a gerar o aparecimento de novos setores industriais ou que permitam um avanço nas áreas industriais já existentes. As algas têm ganho uma especial importância, pela sua versatilidade de utilização e, mais recentemente, pelo seu enorme potencial biotecnológico [2].

As macroalgas são organismos multicelulares que podem ser encontrados em qualquer parte do mundo, predominantemente oceanos, rios e mares, quer em água doce como salgada, podendo atingir tamanhos até 60 metros [3]. Tal como as plantas, as macroalgas são organismos fotossintéticos que fazem uso da luz solar, dióxido de carbono e água durante a fotossíntese [4, 5]. A sua grande diversidade no tamanho, estrutura celular, nível de organização morfológica, pigmentos de fotossíntese, substâncias de reserva, polissacarídeos estruturais e ciclo de vida são o resultado de origens evolutivas diversas [3, 6]. Na natureza, as algas são fonte principal de alimento para muitos peixes e outros organismos aquáticos, e contribuem substancialmente para o oxigénio na Terra [4]. Desde há muito tempo que as macroalgas são exploradas como alimento e fertilizante em particular nos países da Ásia [6]. Com o conhecimento científico que tem vindo a ser explorado cada vez mais, a sua utilização tem-se expandido para outros sectores industriais, nomeadamente no setor farmacêutico [2, 5, 10].

Recentemente, o interesse por esta biomassa marinha tem aumentado uma vez que o potencial biotecnológico tem vindo a ser amplamente explorado. As macroalgas são cada vez mais conhecidas como uma importante fonte de metabolitos que desempenham uma série de atividades biológicas importantes para o ser humano [6]. De entre os compostos comumente extraídos, são de realçar os terpenóides, proteínas, ácidos gordos poli-insaturados, polissacarídeos,

vitaminas, esteróis, tocoferol e, ficocianinas, e mais recentemente os pigmentos (carotenóides, ficobilinas, clorofilas) entre outros [9]. Muitos destes compostos foram já apontados pelas suas propriedades biológicas de interesse, nomeadamente como agentes anticancerígenos, anti-inflamatórios, antioxidantes, antimicrobianos, anticoagulantes, entre outros [7, 8].

As macroalgas são geralmente classificadas em macroalgas verdes (Chlorophyceae), macroalgas castanhas (Phaeophyceae) e macroalgas vermelhas (Rhodophyceae). No caso particular das macroalgas vermelhas, existem cerca de 8.000 espécies conhecidas, a maioria das quais de origem marinha. Estas podem ser encontradas na superfície ou em profundidade (entre os 40 e os 250 metros). As macroalgas vermelhas são consideradas como a fonte mais importante de muitos metabolitos biologicamente ativos em comparação com as classes de macroalgas verdes e castanhas [8], sendo em regiões orientais, comercializadas e consumidas como vegetais [1]. Além disso, os polissacarídeos constituintes de algumas destas espécies já são atualmente recuperados e aplicados na indústria alimentar como espessantes e gelificantes e como base na formulação de cosméticos [1]. Numerosas espécies de macroalgas vermelhas têm mostrado conter níveis significativos de proteína [10], criando um enorme potencial tanto para a sua aplicação como alimento como para aplicações tecnológicas e biofuncionais [10].

1.2 Ficobiliproteínas

As ficobiliproteínas são a principal classe de pigmentos de caráter fotossintético complementares às clorofilas e carotenóides presentes em macroalgas vermelhas, cianobactérias, entre outras [4, 8, 14]. Estes pigmentos são solúveis em água e apresentam uma coloração vermelha ou azul. Geralmente mascaram a presença da clorofila, proporcionando colorações avermelhadas às algas [12]. Estas proteínas altamente coloridas absorvem a luz na região do visível entre os 450 e os 650 nm, contribuindo em cerca de 30 a 50% do valor total de captura de luz usada pelas macroalgas na fotossíntese [3].

De entre as várias ficobiliproteínas, podem-se destacar a ficoeritrina de coloração vermelha (absorção máxima a 565 nm); a ficoeritrocianina de coloração vermelha

(absorção máxima a 568 nm); a ficocianina de coloração azul (absorção máxima entre 620-638 nm); e a aloficocianina de coloração azul (absorção máxima a 650 nm) (**Figura 1**) [12].

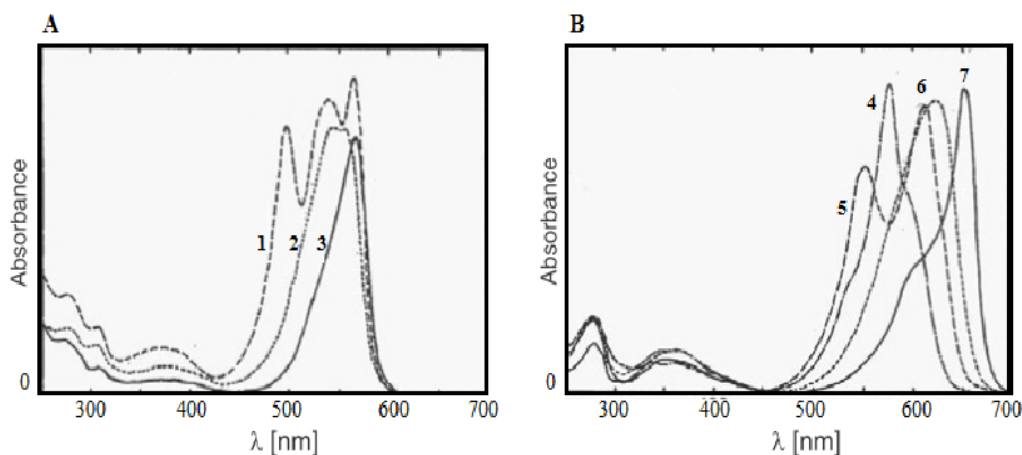


Figura 1. Os espectros de absorção de ficobiliproteínas: (A) ficoeritrina (1- R-PE, 2- B-PE, 3- C-PE); (B) Outras ficobiliproteínas (4 - ficoeritrocianina, 5 - R-ficocianina, 6 - C-ficocianina e 7- aloficocianina) [14].

A diferença entre a R-ficoeritrina (R-PE), C-ficoeritrina e B-ficoeritrina está relacionada com as diferenças espectrais. Pelo facto de serem constituídas por diferentes grupos prostéticos, o prefixo ‘R’ corresponde a macroalgas vermelhas, em inglês “Red algae”, o ‘C’ corresponde a ficoeritrina encontrada em cianobactérias, enquanto ‘B’ ou ‘b’ especifica os membros da ordem Bangiales das algas vermelhas [16, 17].

Todas as ficobiliproteínas têm a mesma unidade de base: um heterodímero de subunidades α e β , convencionalmente referida como monómero. Estas subunidades α e β são cadeias de cerca de 160-180 resíduos de aminoácidos. Três destes monómeros são associados para formar a base bloco de construção de ficobilissomas, o $(\alpha\beta)_3$ trímero. Os trímeros ligam-se de forma a formar um hexâmero com a ajuda de polipéptidos de ligação [20, 21]. Cada um destes monómeros pode conter um, dois ou três cromóforos, dependendo das espécies moleculares. Estas estruturas são a parte da molécula responsável pela sua cor, que conduz a diferenças nas suas propriedades óticas. No caso de ficobiliproteínas, os cromóforos são chamados ficobilinas. Estas estruturas específicas são compostas por quatro tipos diferentes de tetrapirróis de cadeia aberta, que se ligam covalentemente a cisteínas das apoproteínas através de ligações tioéter [17, 18].

Em geral, as ficobiliproteínas encontram-se agrupadas formando os ficobilissomas, normalmente localizados nos estromas sobre a estrutura externa da membrana tilacóide, como ilustra a **Figura 2** [4, 19]. Na verdade, os ficobilissomas funcionam como centro energético, permitindo a transferência de energia de qualquer uma das centenas de cromóforos para os centros reacionais. Eles são capazes de absorver a luz em zonas espectrais onde a clorofila a não consegue, e assim, transmitir essa energia para o centro reativo do fotossistema II, atingindo rendimentos de transferência de energia superiores a 90% [18, 24].

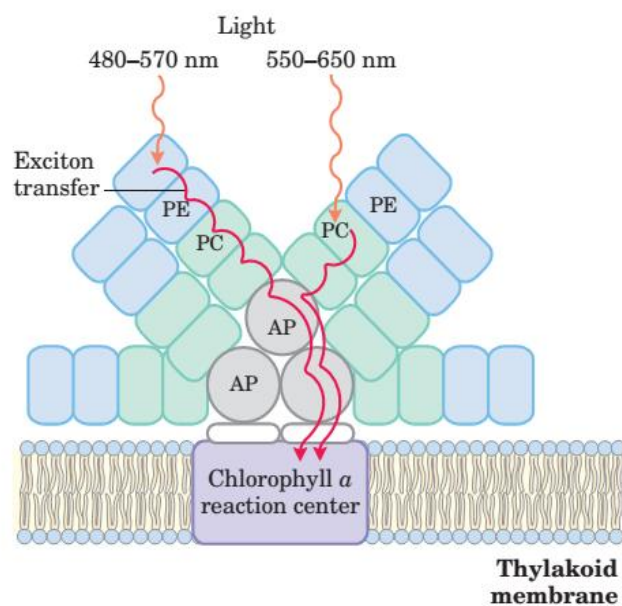


Figura 2. Representação esquemática de um ficobilissoma que pode ser encontrado em cianobactérias e algas vermelhas: ficoeritrina (PE), ficocianina (PC) e aloficocianina (AP) [18].

Devido à sua elevada solubilidade em água, estabilidade e bioatividade, as ficobiliproteínas têm interesse especial em diferentes setores, como na indústria alimentar, farmacêutica e cosmética [4, 9]. Entre as ficobiliproteínas, a R-PE tem sido apontada como uma proteína importante no campo do diagnóstico médico e investigação biomédica [12].

1.3 R-ficoeritrina

Entre as ficobiliproteínas, a R-PE é a mais abundante nas algas vermelhas e cianobactérias. É composta por três subunidades polipeptídicas, formando um complexo $[(\alpha\beta)_6\gamma]$, onde α tem entre 18 e 20 kDa, β tem 19,5 e 21 kDa e γ tem 30 kDa [18, 23]. É uma proteína oligomérica e hidrossolúvel, de peso molecular correspondente a 240 kDa [23, 25] com propriedades fluorescentes interessantes, sendo o seu máximo de emissão de fluorescência a 580 nm [11, 26].

A R-PE foi ainda referida pela sua elevada estabilidade, nomeadamente a mudanças no pH, temperatura, e tempo de armazenamento [13]. Galland-Irmouli e colaboradores referem que, no que diz respeito a variações de pH, não foram observadas alterações em relação aos valores que variam de 4 a 10 [25]. Do mesmo modo, essa estabilidade é mantida em gamas de temperaturas entre 4 a 40 °C, e até 8 horas de exposição à luz [13].

A R-PE é comumente usada para varias aplicações na industria alimentar, cosmética, imunologia e citometria de fluxo [10, 24]. Além disso, a procura, pesquisa e utilização da R-PE como um corante natural tem aumentado, devido à crescente demanda por corantes naturais de uso alimentar, farmacêutico, cosmético e têxtil [27].

1.4 Métodos convencionais de extração e purificação

Apesar das diversas aplicações das ficobiliproteínas, nomeadamente da R-PE, a capacidade limitada dos atuais processos de extração e purificação faz aumentar o seu custo, rondando este os 6 a 12 US\$ por mg [28].

Alguns procedimentos de extração sólido-líquido envolvem o choque osmótico, que implica a imersão da biomassa em água por um ou mais dias [29]. Este método tem a grande desvantagem de serem necessárias várias horas para a extração, podendo assim provocar a degradação parcial de R-PE por protéases. Outros procedimentos já descritos passam pela extração sólido-líquido usando água [29] ou tampão fosfato [30] como solventes. Na maioria dos casos estes processos envolvem um primeiro passo de moagem das macroalgas depois de congeladas em azoto líquido, visando a máxima destruição da parede celular e uma melhor

acessibilidade do solvente aos compostos de interesse. Em seguida, faz-se a homogeneização do pó resultante no solvente aquoso escolhido, e a remoção das partículas sólidas por meio de filtração, seguido por uma centrifugação [31]. Entretanto, um novo procedimento de extração foi recentemente proposto, no qual foi proposta a extração utilizando soluções aquosas de cloreto de colina em tampão Mcllvaine (0,5 M a pH 5,9) que mostraram um aumento significativo do rendimento da extração de ficobiliproteínas em cerca de 46,5 % quando comparado com o sistema convencional que usava uma solução 20 mM de tampão de fosfato de sódio [17].

Por outro lado, o procedimento de purificação começa geralmente com um passo preliminar de pré-purificação utilizando uma precipitação em sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, que elimina frações de alto peso molecular tais como açúcares e outras proteínas [33, 34]. Outros passos clássicos para a purificação, são normalmente realizados por meio de técnicas cromatográficas, nomeadamente cromatografia de afinidade, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de filtração em gel [34, 35], cromatografia de permuta iônica [33] e eletroforese em gel de poli-acrilamida [21, 23]. Estas técnicas são frequentemente apontadas como de elevado preço, demoradas, de difícil aumento de escala e de baixa seletividade [17], como é o caso da eletroforese. Desta forma, o desenvolvimento e otimização de métodos de purificação eficientes, que promovam a manutenção da estrutura química e atividade biológica das ficobiliproteínas, associado a custos menores, torna-se essencial.

1.5 Sistemas Aquosos Bifásicos – plataformas alternativas de purificação

Tal como referido anteriormente, métodos convencionais de purificação, nomeadamente métodos cromatográficos apresentam alguns inconvenientes, nomeadamente o possível uso de solventes orgânicos cuja volatilidade pode provocar riscos para a saúde humana e riscos para o ambiente [34]. Neste contexto, métodos de extração líquido-líquido vêm sendo aplicados, e em particular sistemas

aquosos bifásicos (SABs), uma alternativa simples, não cromatográfica e de mais baixo custo [34, 35].

Os SABs são sistemas de extração líquido-líquido que consistem na formação de duas fases aquosas, macroscópicas, formada pela dissolução em água, acima de certas concentrações, de dois solutos hidrofílicos imiscíveis, normalmente designados por formadores de fase. A formação de duas fases é o reflexo de um processo complexo de competição de interações entre os dois formadores de fases e as moléculas de água entre si. A formação das duas fases pode ser originada pela combinação de dois polímeros, um polímero e um sal, dois sais, ou mais recentemente, pela combinação de líquidos iónicos como os formadores de fase mais convencionais. Os líquidos iónicos podem ser usados como formador de fase principal ou como adjuvante ou eletrólito, onde são usados em menor quantidade apenas com o objetivo de alterarem as propriedades principais das duas fases aquosas formadas [38–40]. Em comparação com outros processos de extração líquido-líquido com base em solventes orgânicos, os SABs são conhecidos por favorecerem a estabilidade de moléculas biologicamente ativas durante o processo de fracionamento, prevenindo assim mudanças estruturais e perda das suas atividades biológicas [39], devido ao seu elevado teor de água (70 a 90%) [30, 37], principalmente nos sistemas que usam os líquidos iónicos como adjuvantes ou eletrólitos.

Os líquidos iónicos são sais constituídos por um catião orgânico de grandes dimensões e um anião orgânico ou inorgânico. Estes sais apresentam propriedades diferenciadoras e vantajosas como a não-volatilidade nas condições atmosféricas, a alta estabilidade química e térmica e a elevada capacidade de solvatação [40] para diferentes biomoléculas. Estudos apontam que a adição de líquidos iónicos na formação dos SABs permite manipular uma série de propriedades destes sistemas, em particular a diferença de polaridade entre as fases aquosas formadas [36]. [36]. Em trabalhos já publicados, a adição de líquido iónico como adjuvante mostrou-se promissora, nomeadamente para a extração de antioxidantes como o ácido vanílico e gálico [38] e IgG [41].

A purificação eficiente de proteínas utilizando SABs depende tanto das propriedades e condições dos sistemas de purificação aplicados (tipo e natureza

dos formadores de fase aplicados, pH, temperatura, entre outros [42]), como da(s) proteína(s) a purificar (ponto isoelétrico, carga maioritária da superfície da proteína, entre outras).

Este método de extração líquido-líquido de base aquosa representa uma alternativa a outros métodos de purificação de biomoléculas, nomeadamente proteínas. Uma vez que os SABs não revelam problemas significativos de aumento de escala [43], representam assim uma abordagem económica e eficiente quando se trata de separação de bio-produtos.

1.6 Objetivos

Devido ao elevado valor comercial das ficobiliproteínas, e ao aumento desse valor quando se trata de extratos purificados, o objetivo deste trabalho assenta no desenvolvimento de uma metodologia de purificação mais eficiente no que diz respeito à separação das proteínas fluorescentes (ficobiliproteínas) das não fluorescentes, extraídas em simultâneo da biomassa.

Assim sendo, este trabalho divide-se em três etapas principais:

- 1- Obtenção de um extrato rico em ficobiliproteínas a partir de macroalgas vermelhas cultivadas em aquacultura (ALGAplus) usando uma metodologia conhecida [17];
- 2- Otimização de um passo de pré-purificação através da promoção de processos de precipitação com soluções aquosas de sulfato de amónio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ [44] e com acetona (adaptado de [45]);
- 3- Purificação das ficobiliproteínas através do uso de sistemas aquosos bifásicos poliméricos, aplicados com e sem líquido iónico como adjuvante.

2. Parte Experimental

2.1 Materiais

Amostras frescas de *Gracilaria* sp. (**Figura 3**) foram recolhidas em ambiente de crescimento de aquacultura (40,60° N e -8,67° E) em abril de 2016. A biomassa foi cultivada pela ALGAplus, Ltda, empresa especializada na produção de macroalgas marinhas, localizada em Ílhavo, Portugal. Após colheita, as várias amostras de macroalga foram lavadas, pelos menos três vezes, com água corrente e água destilada. De seguida, foram pesadas e posteriormente armazenadas a -20 °C até a sua utilização.



Figura 3. *Gracilaria* sp. fresca recolhida dos tanques da ALGAplus.

O sulfato de amónio (99%), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e a acetona foram comprados à Panreac e VWR Chemicals, respetivamente.

Os componentes do tampão de fosfato de potássio ($\text{K}_2\text{HPO}_4 / \text{KH}_2\text{PO}_4$), o fosfato de potássio di-básico, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 98\%$) foram comprados à PANREAC Applichem, e o fosfato de potássio monobásico ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \geq 99,5\%$), foi comprado à Sigma-Aldrich.

O polietilenoglicol (PEG) com massas moleculares de 400 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (PEG 400) e 600 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (PEG 600) foram adquiridos à Acros Organics. Os PEGs com massas moleculares de 1000 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (PEG 1000) foi fornecido pela Fulka, os PEGs 1500 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (PEG 1500), 4000 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (PEG 4000), 6000 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (PEG 6000) e 8000 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (PEG 8000), foram comprados à Sigma-Aldrich.

Para as soluções tampão constituídas por citrato de potássio, $\text{K}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (99%) e ácido cítrico, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ foram adquiridas a partir da Acros Organics e Frilabo, respetivamente.

O cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio, [C₂mim]Cl (98%) e cloreto de 1-hexil-3-metilimidazólio, [C₆mim]Cl (98%), foram usados como adjuvantes e comprados à IoLiTec (Ionic Liquids Technologies, Alemanha) (**Figura 4**).

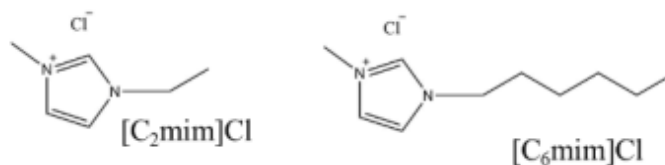


Figura 4. Estrutura química dos líquidos iônicos usados, cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio, [C₂mim]Cl, e cloreto de 1-hexil-3-metilimidazólio, [C₆mim]Cl.

2.2 Metodologia

2.2.1 Extração sólido-líquido

O procedimento seguido foi adaptado da metodologia proposta por Martins et al. [17]. Inicialmente, a biomassa lavada pelo menos três vezes com água corrente e destilada foi triturada depois de congelada em azoto líquido. A biomassa foi posteriormente homogeneizada numa solução tampão de fosfato de sódio (20 mM, pH 7). Utilizou-se uma razão sólido-líquido de 0,5 (massa de macroalga fresca/volume de solvente), à temperatura ambiente, com agitação contínua (IKA KS 4000 controlo IC), durante 20 minutos e protegido da exposição à luz. O extrato foi filtrado e de seguida centrifugado (Heraeus Megafuge Thermo Scientific 16R Centrifugar) a 5000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. O extrato rico em ficobiliproteínas foi recolhido e o seu espectro de absorção lido num leitor de microplacas de UV-Vis (Synergy HT leitor de microplacas - BioTek), medido para o intervalo de comprimentos de onda entre os 200-700 nm, para abranger toda a gama de UV-Visível que permite uma análise de proteínas totais, ficobiliproteínas e outras possíveis interferências.

2.2.2. Pré-purificação

Neste passo de pré-purificação foram comparados dois métodos de precipitação de proteínas: a precipitação com sulfato de amónio e a precipitação com acetona.

Na precipitação com sulfato de amónio foi adicionada uma quantidade de sal correspondente a 30% (m/v) ao extrato obtido na extração sólido-líquido. Posteriormente, a mistura foi homogeneizada e colocada por 4h a 4 °C de acordo com a literatura [15, 32]. Para a precipitação com acetona utilizou-se uma proporção de 1:4 de acetona:extrato de ficobiliproteínas e reservou-se a solução durante 1 hora a -20 °C, de acordo com [45]. Para finalizar ambos os procedimentos, centrifugaram-se as soluções (5000 rpm a 4 °C, 30 minutos), e analisaram-se os espectros de absorção (num leitor de microplacas de UV-Vis Synergy HT leitor de microplacas - BioTek) do sobrenadante e assim como do precipitado, depois de ressuspendido em tampão fosfato.

2.2.3 Purificação de ficobiliproteínas usando sistemas aquosos bifásicos (SABs)

Neste trabalho foram testados SABs de base polimérica, nomeadamente sistemas compostos por polietilenoglicol e sal, cujos diagramas de fase se encontram já descritos na literatura [36, 46]; para maior detalhe consultar o Anexo A – Figuras A1, A2 e A3. Os pontos de mistura usados foram escolhidos acima das curvas binodais de forma a garantir a formação das duas fases. Numa primeira fase foi estudado o efeito do tamanho do polímero na separação das proteínas fluorescentes das não fluorescentes, tidas neste trabalho como contaminantes. Neste trabalho foram usados os sistemas compostos por 15% (m/m) de PEG 1000, 1500, 4000, 6000 e 8000 g.mol⁻¹ [36] + 15% (m/m) K₂HPO₄/KH₂PO₄ (40% e pH 7) + 70% (m/m) de extrato rico em ficobiliproteínas. Foram ainda estudados PEGs de massa molar mais pequena (400, 600 e 1000 g.mol⁻¹) mas estes foram aplicados na formação de sistemas compostos por tampão citrato de potássio a 50% e pH 7 [46], tendo para estes sistemas sido escolhido o ponto de mistura representado por 30% (m/m) K₃C₆H₅O₇ /C₆H₈O₇ + 30% (m/m) de PEG + 40% (m/m) de extrato rico em ficobiliproteínas. No estudo da purificação das ficobiliproteínas foram ainda estudadas as condições de pH (6, 7 e 8) para o sistema PEG + tampão citrato potássio [46]) e de aplicação de líquidos iónicos como adjuvantes, nomeadamente considerando o sistema composto por 15% (m/m) de PEG + 15% (m/m)

K_2HPO_4/KH_2PO_4 + 65% (m/m) de extrato rico em ficobiliproteínas + 5% (m/m) de líquido iônico, considerando as curvas binodais descritas em [36].

Após a preparação dos sistemas, a mistura foi homogeneizada e centrifugada a 1000 rpm durante 10 minutos a 25 °C, para promover a separação das duas fases aquosas. Ambas as fases (topo e fundo) foram recolhidas e pesadas, sendo o seu volume igualmente determinado. Os espectros de absorção de cada fase dos SABs foram medidos no intervalo entre 200 e 700 nm no leitor de microplacas UV-Vis e a concentração de proteínas totais (280 nm) e de ficobiliproteínas (565 nm) foi calculada a partir de curvas de calibração previamente definidas com, respetivamente, albumina de soro bovino e R-ficoeritrina (Anexo B - Figura B1 e B2). A performance dos sistemas foi determinada através do cálculo da eficiência de extração [EE (%)], parâmetro calculado segundo a equação 1:

$$EE(\%) = \frac{v_{topo} \times [R - PE]_{topo}}{m_{extrato\ bruto}} \times 100 \quad (1)$$

onde v_{topo} representa o volume da fase de topo (rica em ficobiliproteínas), $[R-PE]_{topo}$ é a concentração de R-ficoeritrina na fase de topo, $m_{extrato\ bruto}$ refere-se à massa de extrato bruto rico em ficobiliproteínas (obtido a partir do passo de extração sólido-líquido) adicionada a cada sistema.

3. Resultados

Este trabalho teve como objetivo a purificação de ficobiliproteínas através do uso de SABs de base polimérica, com e sem líquidos iônicos adicionados como adjuvantes. Neste sentido, diversos foram os sistemas aplicados e as condições estudadas para a mais eficiente purificação das ficobiliproteínas extraídas da macroalga vermelha *Gracilaria* sp. Neste trabalho, o processo integrado foi estudado, considerando a aplicação de um primeiro passo de pré-purificação (uso de metodologias de precipitação de proteínas com sulfato de amónio e acetona) seguido de uma etapa de purificação, esta desenvolvida pela aplicação dos SABs.

3.1 Pré-purificação: precipitação com sulfato de amónio e acetona

Este trabalho começou pelo estudo do passo de pré-purificação, onde foram testados dois procedimentos de precipitação de proteínas. Testaram-se a precipitação com sulfato de amónio (30% m/v) e a precipitação com acetona (proporção de 1:4 de acetona:extrato bruto e rico em ficobiliproteínas). Os resultados obtidos podem ser observados na **Figura 5**.

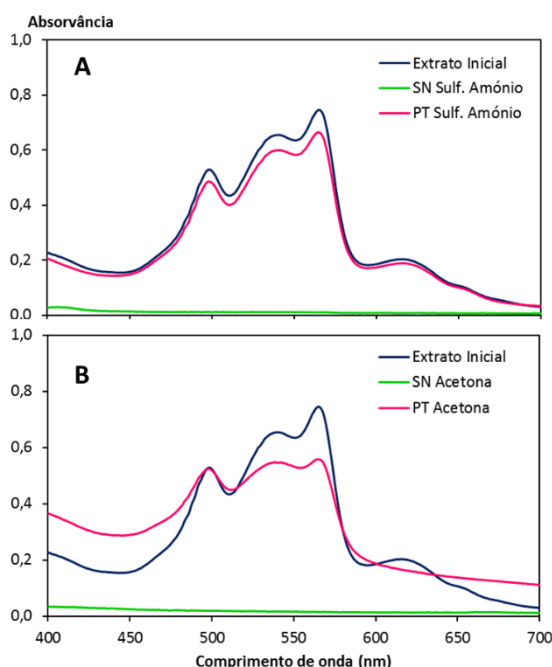


Figura 5. Espectro de absorção das frações obtidas dos passos de precipitação com: (A) sulfato de amónio; (B) acetona, onde SN corresponde ao sobrenadante e PT corresponde ao precipitado posteriormente ressuspenso em tampão fosfato de potássio 20 mM (pH 7).

Pela análise da **Figura 5(A)** observa-se que o espectro de absorção do extrato inicial é muito semelhante ao espectro determinado para o precipitado após ter sido ressuspenso no tampão fosfato de potássio (pH 7), permitindo concluir que não há perdas nem alterações significativas na estrutura conformacional das ficobiliproteínas nem alterações estruturais nos seus cromóforos. Por outro lado, a **Figura 5(B)** mostra que, após o passo de precipitação com acetona, houve uma perda de ficobiliproteínas e alteração da sua estrutura quando os espectros do extrato inicial e do precipitado são comparados.

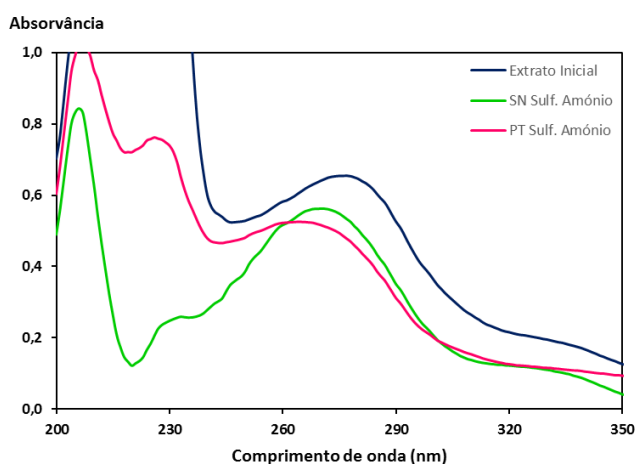


Figura 6. Espectro de absorção das frações obtidas dos passos de precipitação com sulfato de amônio; onde SN corresponde ao sobrenadante e PT corresponde ao precipitado posteriormente ressuspenso em tampão fosfato de potássio 20 mM (pH 7).

Além disso, observou-se (**Figura 6**) que após precipitação com sulfato de amônio, o teor de proteínas totais, quantificados a partir da absorvância no comprimento de onda de 280 nm, diminuiu em 30%, tendo por isso sido adotado este método para pré-purificar os restantes extratos aplicados no estudo do efeito do uso de SABs como técnicas de purificação das ficobiliproteínas.

3.2 Purificação: Sistemas aquosos bifásicos

Após a etapa de pré-purificação procedeu-se à aplicação dos SABs para o fracionamento das ficobiliproteínas (proteínas fluorescentes) das proteínas contaminantes (não-fluorescentes) nos extratos pré-purificados. Foram usados sistemas polímero + sal e polímero + sal + líquido iónico (adjuvante), compostos

por PEGs de diferentes pesos moleculares e duas soluções tampão, tampão fosfato de potássio e tampão citrato de potássio. Diferentes pontos de mistura foram adotados para as duas soluções tampão: 15% (m/m) de PEG + 15% (m/m) K_2HPO_4/KH_2PO_4 + 65% (m/m) de extrato; 30% (m/m) de PEG + 30% (m/m) $K_3C_6H_5O_7/C_6H_8O_7$ + 40% (m/m) de extrato. Os sistemas foram avaliados segundo a eficiência de extração [EE (%)] calculada para as proteínas totais e ficobiliproteínas para a fase de topo dos sistemas (fase onde as ficobiliproteínas estão maioritariamente concentradas).

3.2.1 Estudo da variação do peso molecular do polímero

Nesta fase do trabalho pretende-se estudar o efeito da variação da massa molar do PEG no fracionamento das proteínas fluorescentes das não-fluorescentes do extrato pré-purificado. Os principais resultados da eficiência de extração estão representados na **Figura 7**.

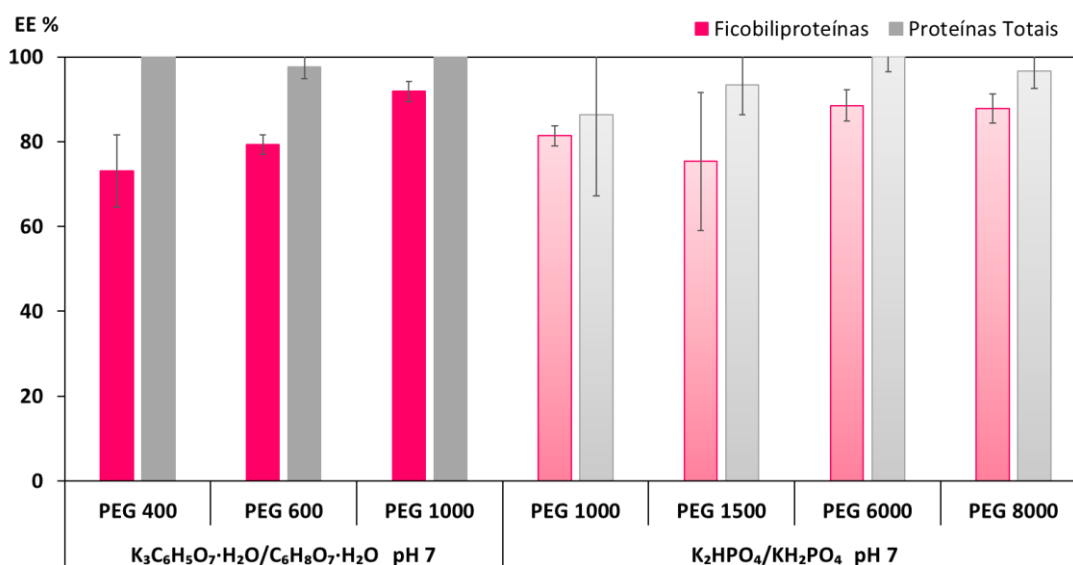


Figura 7. Eficiência de extração (%) dos sistemas compostos por tampão + PEGs de diferentes massas molares + água. Ponto de mistura usado para os sistemas com tampão citrato de potássio: 30% (m/m) de PEG + 30% (m/m) $K_3C_6H_5O_7/C_6H_8O_7$ + 40% (m/m) de extrato; e para os sistemas com o tampão fosfato de potássio: 15% (m/m) de PEG + 15% (m/m) K_2HPO_4/KH_2PO_4 + 70% (m/m) de extrato.

A partir da análise da **Figura 7**, verificou-se que, tanto as proteínas totais como as ficobiliproteínas migram preferencialmente para a fase de topo, o que é indicado pelo intervalo de valores de eficiência de extração obtidos para as ficobiliproteínas (entre $73 \pm 2 \%$ e $92 \pm 2 \%$) e para as proteínas contaminantes (entre $84 \pm 8 \%$ e 100%). Nos resultados mostrados na **Figura 7**, não é possível observar uma diferença significativa na migração das proteínas, nem pela variação do tamanho do PEG nem pela variação da solução tampão.

3.2.3 Estudo do efeito do pH

Porque as proteínas não-fluorescentes e as ficobiliproteínas não apresentaram migração preferencial para fases opostas quando SABs com diferentes PEGs e sais foram testados, estudou-se também o efeito da manipulação do pH para o sistema com PEG 400, que foi o que mostrou uma maior diferença (apesar de pequena) na migração das proteínas fluorescentes e não fluorescentes. O pH é uma das condições mais testadas uma vez que em relação à purificação de proteínas é normalmente capaz de alterar a carga à superfície das proteínas (considerando a diferença entre o pH do sistema e o ponto isoelétrico destas macromoléculas) o que em determinados trabalhos mostrou ser promissor na sua purificação [47]. Neste trabalho foram testados os pHs 6, 7 e 8, de forma a não comprometer a estabilidade das ficobiliproteínas que é definida como dentro do intervalo de pH de 4 a 10 [25]. Na **Figura 8** podem observar-se os resultados da eficiência de extração para os sistemas estudados.

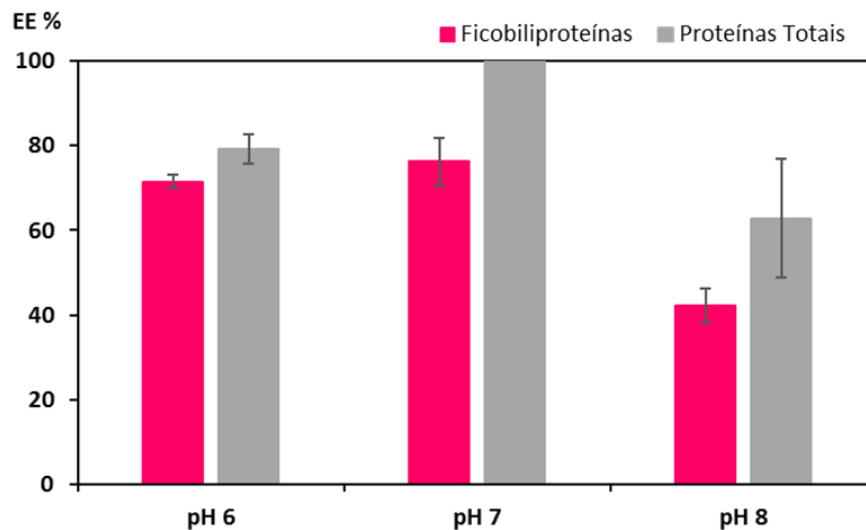


Figura 8. Eficiência de extração (%) dos sistemas compostos por PEG 400 + tampão citrato de potássio + água a diferentes pHs, 6, 7 e 8, para o ponto de mistura de 30% (m/m) de PEG 400 + 30% (m/m) $K_3C_6H_5O_7/C_6H_8O_7$ + 40% (m/m) de extrato.

Ao observar a **Figura 8** é possível verificar mais uma vez que não houve uma separação eficiente das ficobiliproteínas das proteínas totais, havendo uma migração preferencial de ambas para a fase de topo, para os pHs de 6 e 7. Para o sistema a pH 8, verifica-se que, apesar das eficiências de extração de ficobiliproteínas e proteínas totais serem mais baixas para a fase de topo, era expectável que estas se encontrassem na fase de fundo. Contudo, depois de calculada a eficiência de extração das ficobiliproteínas e das proteínas totais para a fase de fundo, estas encontram-se próximas de 0. Ao analisar o balanço de massa deste sistema obteve-se um valor de $45,7 \pm 0,8$ o que leva a crer que houve desnaturação a pH 8 de uma quantidade considerável de proteína, tornando o sistema a pH 8 inviável.

3.2.2 Sistemas adjuvados com líquido iónico

Considerando a reduzida capacidade dos sistemas convencionais PEG + sal na separação das proteínas não-fluorescentes das fluorescentes, e tendo em conta a importância da manipulação das propriedades das fases na purificação, nomeadamente pela sua diferença de polaridades, foram testados SABs adjuvados

com 5% de dois líquidos iônicos, no caso o cloreto de 1-etil-3-metilimidazólio, [C₂mim]Cl e o cloreto de 1-hexil-3-metilimidazólio, [C₆mim]Cl. Na **Figura 9** estão apresentados os resultados da eficiência de extração para os sistemas adjuvados testados.

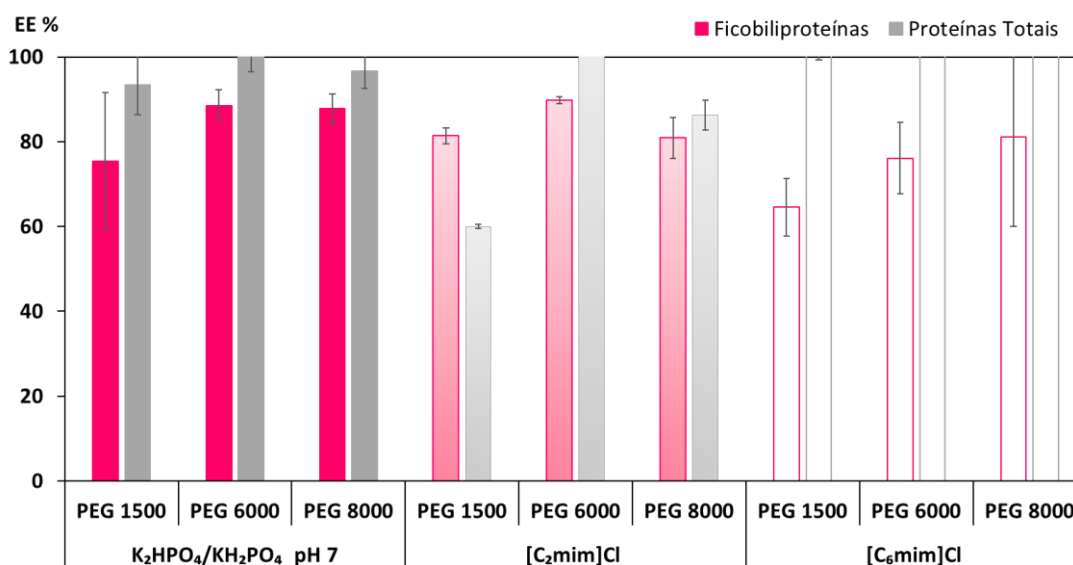


Figura 9. Eficiência de extração (%) para os sistemas com e sem o uso dos líquidos iônicos [C₂mim]Cl e [C₆mim]Cl como adjuvantes, para os sistemas tampão fosfato de potássio (pH 7) + PEG de diferentes pesos moleculares + extrato.

Uma vez mais, ao analisar a **Figura 9** verifica-se que a adição de 5% de líquido iônico não melhorou de uma forma muito significativa o fracionamento das ficobiliproteínas comparativamente com os sistemas sem adjuvante. Apesar do sistema PEG 1500 + tampão fosfato de potássio (pH 7) + extrato + 5% [C₆mim]Cl parecer o mais promissor considerando a diferença dos valores de eficiência de extração, chegou-se à conclusão que não se trata de maior seletividade do sistema para a separação das proteínas fluorescentes das não fluorescentes, mas sim de perdas associadas à possível desnaturação das proteínas, que são comprovadas pelos valores de balanço de massa calculado para estes sistemas (Anexo C). Verifica-se ainda que, independente do peso molecular do PEG ou do tamanho da cadeia alquílica dos dois líquidos iônicos testados, tanto as proteínas totais como as ficobiliproteínas apresentam uma tendência de migração preferencial para a fase

de topo, não existindo por isso uma purificação significativa quando estes sistemas são aplicados.

4. Conclusão

A ficoeritrina é uma das ficobiliproteínas encontradas em macroalgas vermelhas e já foi reconhecida pelo seu grande potencial. Com o objetivo de estudar a purificação destas proteínas fluorescentes, sistemas aquosos bifásicos com e sem o uso de líquidos iônicos como adjuvantes foram aplicados.

O processo de purificação estudado neste trabalho foi desenvolvido pela aplicação de duas etapas distintas, onde o primeiro passo seria uma etapa de pré-purificação do extrato obtido após a extração das proteínas da biomassa, que permitiria de forma simples retirar grande parte das proteínas contaminantes sem prometer a estrutura e conteúdo de ficobiliproteínas. Verificou-se que, ao contrário do que acontece com a precipitação com acetona, a precipitação com sulfato de amônio permite a manutenção da estrutura das ficobiliproteínas e dos seus cromóforos, permitindo em simultâneo a remoção de 30% das proteínas contaminantes.

Com o objetivo de aumentar a pureza dos extratos de ficobiliproteínas, foram usados sistemas aquosos bifásicos baseados em sistemas polímero-sal. Foram testados diferentes sais, nomeadamente soluções tampão, diferentes massas moleculares de PEG, e sistemas adjuvados com dois líquidos iônicos. Foi ainda estudado o efeito da variação do pH no fracionamento das proteínas. Verificou-se que para todos os sistemas estudados, a tendência de migração das proteínas totais e ficobiliproteínas foi significativamente a mesma, e para a fase de topo rica em PEG. Assim sendo, não foi possível destacar um sistema para o fracionamento das ficobiliproteínas.

5. Trabalho Futuro

Considerando os resultados obtidos, serão necessárias testar outras plataformas de purificação que poderão passar pela aplicação de outros SABs, nomeadamente compostos por líquido iónico e tampão, assim como sistemas adjuvados com líquidos iónicos de outras famílias.

6. Referências

- [1] B. D. E. Reviere, "Natureza E Posição Das 'Algas' Na Árvore Filogenética do Mundo Vivo," in *Algas*, Artmed., vol. 1, F. I. M. ; Burliga A. L. ; Reviere B. de ; Prado J. F. ; Rézig S. H., Ed. 2007, pp. 19–57.
- [2] J. Gonciarz and M. Bizukojc, "Algae as production systems of bioactive compounds," *Eng. Life Sci.*, pp. 1–29, 2013.
- [3] A. Demirbas and Demirbas M. Fatih, *Algae Energy-Algae as a New Source of Biodiesel*, Springer-V., vol. 1. 2010.
- [4] S. I. Hollar, *A closer Look at Bacteria, Algae, and Protozoa*, Britannica., vol. 1. 2012.
- [5] A. C. R. Gomes, "Biologia das Algas e Plantas (BAP) 2009/2010," 2009.
- [6] A. A. El Gamal, "Biological importance of marine algae," *Saudi Pharm. J.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–25, 2010.
- [7] L. Barsanti and P. Gualtieri, *Algae Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*, Press Tayl., vol. 53, no. 9. 2006.
- [8] R. Pangestuti and S. K. Kim, "Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae," *J. Funct. Foods*, vol. 3, no. 4, pp. 255–266, 2011.
- [9] M. Francavilla, M. Franchi, M. Monteleone, and C. Caroppo, "The red seaweed *Gracilaria gracilis* as a multi products source," *Mar. Drugs*, vol. 11, no. 10, pp. 3754–3776, 2013.
- [10] P. A. Harnedy and R. J. FitzGerald, "Extraction of protein from the macroalga *Palmaria palmata*," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 51, no. 1, pp. 375–382, 2013.
- [11] C. M. Hilditch, P. Balding, R. Jenkins, A. J. Smith, and L. J. Rogers, "R-phycoerythrin from the macroalga *Corallina officinalis* (Rhodophyceae) and application of a derived phycofluor probe for detecting sugar-binding sites on cell membranes," *J. Appl. Phycol.*, vol. 3, no. 4, pp. 345–354, 1991.

- [12] E. J. Paula, E. M. Plastino, E. C. Oliveira, F. Berchez, F. Chow, and M. C. Oliveira, "Introdução à biologia das criptógamas," São Paulo, 2007.
- [13] M. Munier, S. Jubeau, A. Wijaya, M. Morançais, J. Dumay, L. Marchal, P. Jaouen, and J. Fleurence, "Physicochemical factors affecting the stability of two pigments: R-phycoerythrin of *Grateloupia turuturu* and B-phycoerythrin of *Porphyridium cruentum*," *Food Chem.*, vol. 150, pp. 400–407, 2014.
- [14] C. Brunet, G. Johnsen, J. Lavaud, and S. Roy, "Selected pigment applications in oceanography: Pigments and photoacclimation processes," *Phytoplankt. Pigment. Charact. Chemotaxon. Appl. Oceanogr.*, vol. 1, pp. 445–471, 2015.
- [15] J. Dumay, M. Morançais, M. Munier, C. Le Guillard, and J. Fleurence, "R-Phycoerythrin and Phycobiliproteins: Function, Structure and Utilization," in *Advances in Botanical Research*, vol. 71, Elsevier, 2014, pp. 321–343.
- [16] B. R. Green and W. W. Parson, "Light-harvesting Antennas in Photosynthesis.," *Adv. Photosynth. Respir.*, vol. 13, 2003.
- [17] M. Martins, F. Vieira, I. Correia, R. Ferreira, H. Abreu, J. A. P. Coutinho, and S. P. M. Ventura, "Recovery of phycobiliproteins from the red macroalga *Gracilaria* sp. using ionic liquid aqueous solutions," *Green Chem.*, vol. 1, pp. 4287–4296, 2016.
- [18] D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 15th ed. New York: SARA TENNEY, 2008.
- [19] J. Fleurence, "R-Phycoerythrin from red macroalgae: Strategies for extraction and potential application in Biotechnology," *Appl. Biotechnol. Food Sci. Policy*, vol. 1, no. 1, pp. 63–68, 2003.
- [20] A. N. Syad, K. P. Shunmugiah, and P. D. Kasi, "Seaweeds as nutritional supplements: Analysis of nutritional profile, physicochemical properties and proximate composition of *G.Acerosa* and *S.Wightii*," *Biomed. Prev. Nutr.*, vol. 3, no. 2, pp. 139–144, 2013.
- [21] R. S. Rasmussen and M. T. Morrissey, "Marine Biotechnology for Production

- of Food Ingredients,” *Adv. Food Nutr. Res.*, vol. 52, no. 6, pp. 237–292, 2007.
- [22] S. M. A. Kawsar, Y. Fujii, R. Matsumoto, H. Yasumitsu, and Y. Ozeki, “Protein R-phycoerythrin from marine red alga *Amphiroa anceps*: extraction, purification and characterization,” *Phycol. Balc.*, vol. 17, no. 3, pp. 347–354, 2011.
- [23] L. Talarico, “R-phycoerythrin from *Audouinella saviana* (Nemaliales, Rhodophyta). Ultrastructural and biochemical analysis of aggregates and subunits,” *Phycologia*, vol. 29, no. 3, pp. 292–302, 1990.
- [24] G. Wang, “Isolation and purification of phycoerythrin from red alga *Gracilaria verrucosa* by expanded-bed-adsorption and ion-exchange chromatography,” *Chromatographia*, vol. 56, no. 7–8, pp. 509–513, 2002.
- [25] A. V. Galland-Irmouli, L. Pons, M. Luçon, C. Villaume, N. T. Mrabet, J. L. Guéant, and J. Fleurence, “One-step purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Palmaria palmata* using preparative polyacrylamide gel electrophoresis,” *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, vol. 739, no. 1, pp. 117–123, 2000.
- [26] C. Denis, A. Massé, J. Fleurence, and P. Jaouen, “Concentration and pre-purification with ultrafiltration of a R-phycoerythrin solution extracted from macro-algae *Grateloupia turuturu*: Process definition and up-scaling,” *Sep. Purif. Technol.*, vol. 69, no. 1, pp. 37–42, 2009.
- [27] S. Sekar and M. Chandramohan, “Phycobiliproteins as a commodity: Trends in applied research, patents and commercialization,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 20, no. 2, pp. 113–136, 2008.
- [28] M. Caswell and D. Zilberman, “Algoculture,” in *IIFET 2000 Proceedings*, 2000, pp. 1–10.
- [29] J. F. Niu, G. C. Wang, and C. K. Tseng, “Method for large-scale isolation and purification of R-phycoerythrin from red alga *Polysiphonia urceolata* Grev,” *Protein Expr. Purif.*, vol. 49, no. 1, pp. 23–31, 2006.

- [30] L. Sun, S. Wang, X. Gong, M. Zhao, X. Fu, and L. Wang, "Isolation, purification and characteristics of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Heterosiphonia japonica*," *Protein Expr. Purif.*, vol. 64, no. 2, pp. 146–154, 2009.
- [31] F. J. Deive, A. Rodríguez, a. B. Pereiro, J. M. M. Araújo, M. a. Longo, M. a. Z. Coelho, J. N. C. Lopes, J. M. S. S. Esperança, L. P. N. Rebelo, and I. M. Marrucho, "Ionic liquid-based aqueous biphasic system for lipase extraction," *Green Chem.*, vol. 13, no. 2, pp. 390–396, 2011.
- [32] L. N. Liu, X. L. Chen, X. Y. Zhang, Y. Z. Zhang, and B. C. Zhou, "One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*," *J. Biotechnol.*, vol. 116, no. 1, pp. 91–100, 2005.
- [33] E. D'Agnolo, R. Rizzo, S. Paoletti, and E. Murano, "R-phycoerythrin from the red alga *Gracilaria longa*," *Phytochemistry*, vol. 35, no. 3, pp. 693–696, 1994.
- [34] M. V. Quental, M. Caban, M. M. Pereira, P. Stepnowski, J. A. P. Coutinho, and M. G. Freire, "Enhanced extraction of proteins using cholinium-based ionic liquids as phase-forming components of aqueous biphasic systems," *Biotechnol. J.*, vol. 10, no. 9, pp. 1457–1466, 2015.
- [35] J. F. B. Pereira, V. C. Santos-Ebinuma, J. A. C. Teixeira, and A. Jr Pessoa, "Sistemas aquosos bifásicos uma ferramenta sustentável para a extração de ácido clavulânico a partir de diferentes fontes," in *XX Simpósio Nacional de Bioprocessos*, 2015.
- [36] R. L. de Souza, V. C. Campos, S. P. M. Ventura, C. M. F. Soares, J. A. P. Coutinho, and Á. S. Lima, "Effect of ionic liquids as adjuvants on PEG-based ABS formation and the extraction of two probe dyes," *Fluid Phase Equilib.*, vol. 375, pp. 30–36, 2014.
- [37] A. F. M. Cláudio, A. M. Ferreira, C. S. R. Freire, A. J. D. Silvestre, M. G. Freire, and J. A. P. Coutinho, "Optimization of the gallic acid extraction using ionic-liquid-based aqueous two-phase systems," *Sep. Purif. Technol.*, vol.

- 97, pp. 142–149, 2012.
- [38] M. R. Almeida, H. Passos, M. M. Pereira, Á. S. Lima, J. A. P. Coutinho, and M. G. Freire, “Ionic liquids as additives to enhance the extraction of antioxidants in aqueous two-phase systems,” *Sep. Purif. Technol.*, vol. 128, pp. 1–10, 2014.
- [39] L. H. M. Da Silva and W. Loh, “Sistemas aquosos bifásicos: Fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas,” *Quim. Nova*, vol. 29, no. 6, pp. 1345–1351, 2006.
- [40] A. M. e M. G. F. Ferreira, “Extração e Purificação de Produtos De Valor Acrescentado Utilizando Sistemas Aquosos Bifásicos Constituídos por Líquidos Iônicos,” *Soc. Port. Quim.*, vol. 139, p. 23, 2015.
- [41] A. M. Ferreira, V. F. M. Faustino, D. Mondal, J. A. P. Coutinho, and M. G. Freire, “Improving the extraction and purification of immunoglobulin G by the use of ionic liquids as adjuvants in aqueous biphasic systems,” *J. Biotechnol.*, vol. 236, pp. 166–175, 2016.
- [42] M. T. H. Cavalcanti, T. S. Porto, B. de Barros Neto, J. L. Lima-Filho, A. L. F. Porto, and A. Pessoa, “Aqueous two-phase systems extraction of alpha-toxin from *Clostridium perfringens* type A,” *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 833, no. 2, pp. 135–140, 2006.
- [43] J. A. Asenjo and B. A. Andrews, “Aqueous two-phase systems for protein separation: Phase separation and applications,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1238, no. September 2011, pp. 1–10, 2012.
- [44] J. F. Niu, G. C. Wang, B. C. Zhou, X. Z. Lin, and C. S. Chen, “Purification of R-phycoerythrin from *Porphyra haitanensis* (Bangiales, Rhodophyta) using expanded-bed absorption,” *J. Phycol.*, vol. 43, no. 6, pp. 1339–1347, 2007.
- [45] “Acetone precipitation of proteins,” *Thermo Fisher Scientific Inc.*, 2007. [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com>.
- [46] M. M. Pereira, R. A. P. Cruz, M. R. Almeida, Á. S. Lima, J. A. P. Coutinho, and M. G. Freire, “Single-step purification of ovalbumin from egg white using

- aqueous biphasic systems,” *Process Biochem.*, vol. 51, pp. 781–791, 2016.
- [47] S. Saravanan, J. R. Rao, B. U. Nair, and T. Ramasami, “Aqueous two-phase poly(ethylene glycol)-poly(acrylic acid) system for protein partitioning: Influence of molecular weight, pH and temperature,” *Process Biochem.*, vol. 43, no. 9, pp. 905–911, 2008.

7. Anexos

Anexo A – Curvas binodais dos sistemas aquosos bifásicos usados

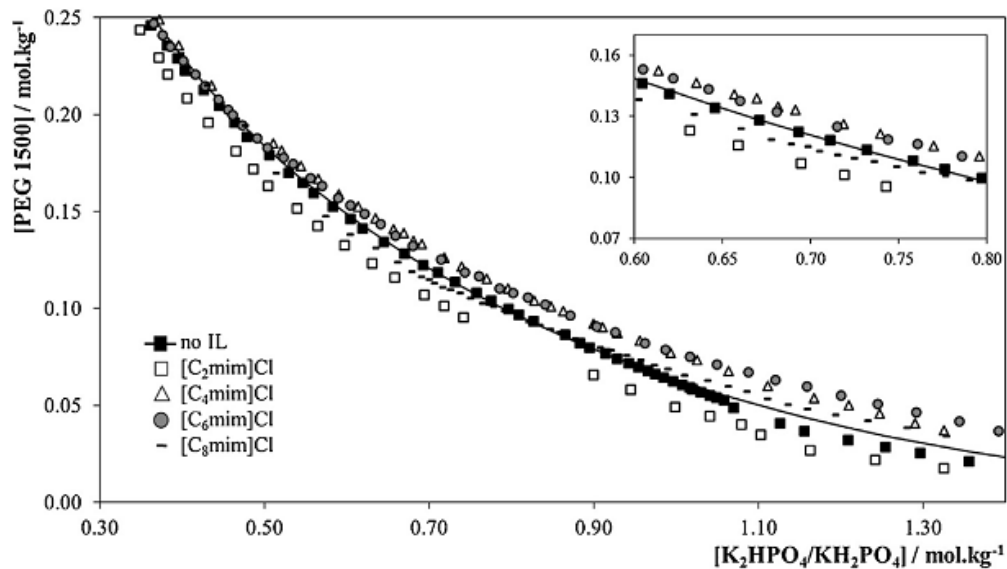


Figura A 1. Curvas binodais para sistemas compostos por PEG 1500+ K_2HPO_4/KH_2PO_4 (pH 7) + 5 wt% de líquido iônico + água, ($T = 298$ K) Cl e respetiva curva do sistema não adjuvado (linha preta) [36].

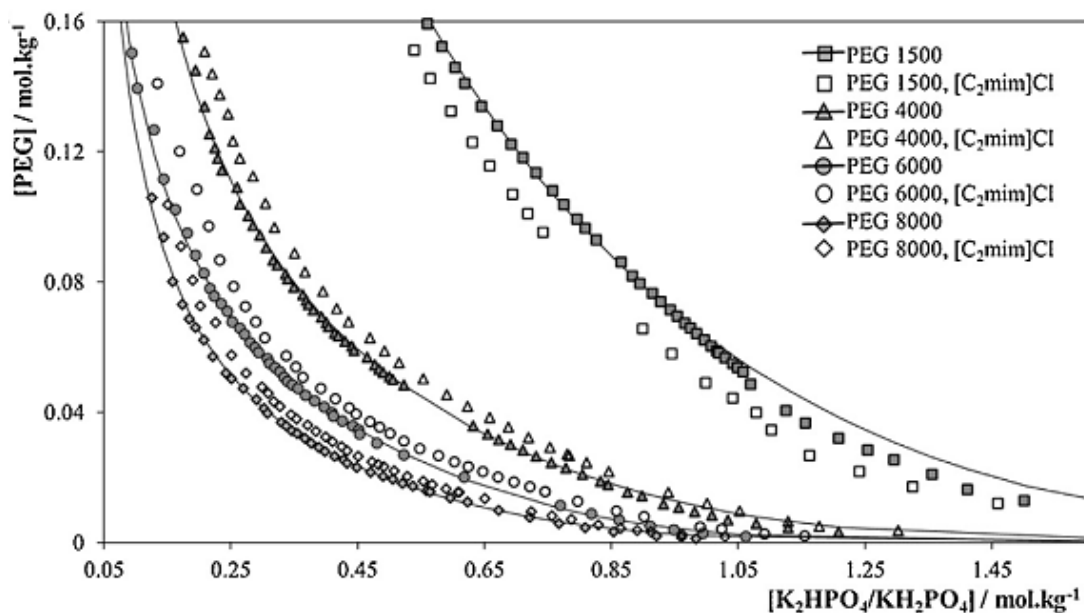


Figura A 2. Curvas binodais para sistemas a $298 (\pm 1)$ K, compostos por PEG (1500, 4000, 6000, e 8000) + K_2HPO_4/KH_2PO_4 (pH 7) + água + 5 wt% $[C_2mim]Cl$ e respetivas curvas em sistemas não adjuvados (linha preta) [36].

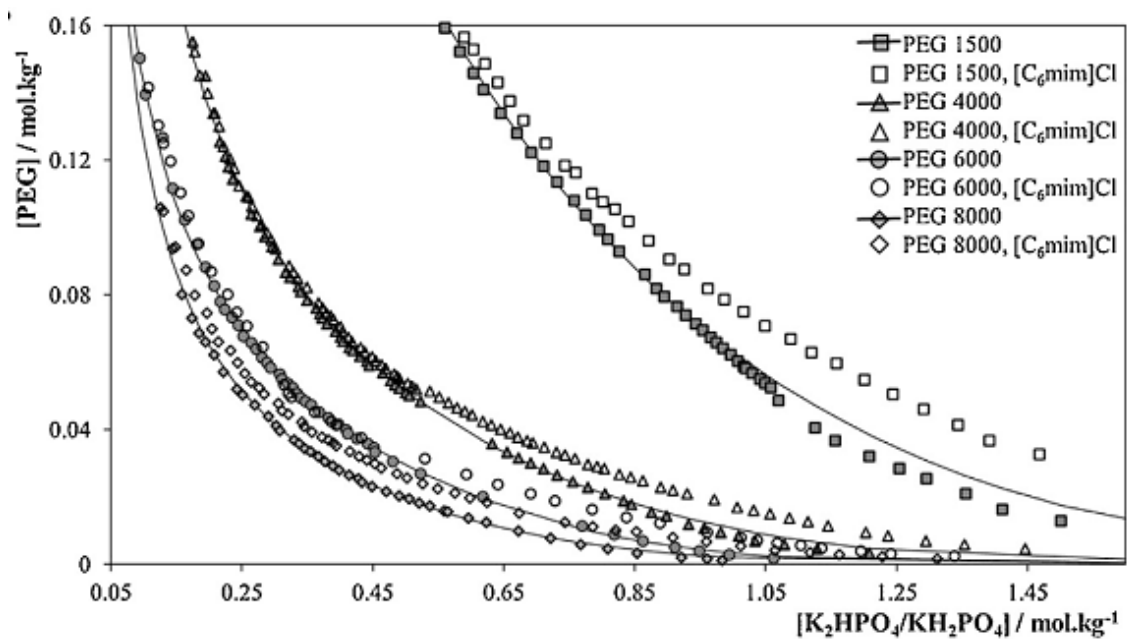


Figura A 3. Curvas binodais para sistemas a 298 (\pm 1) K, compostos por PEG (1500, 4000, 6000, e 8000) + K_2HPO_4/KH_2PO_4 (pH 7) + água + 5 wt% $[C_6mim]Cl$, e respectivas curvas em sistemas não adjuvados (linha preta) [36].

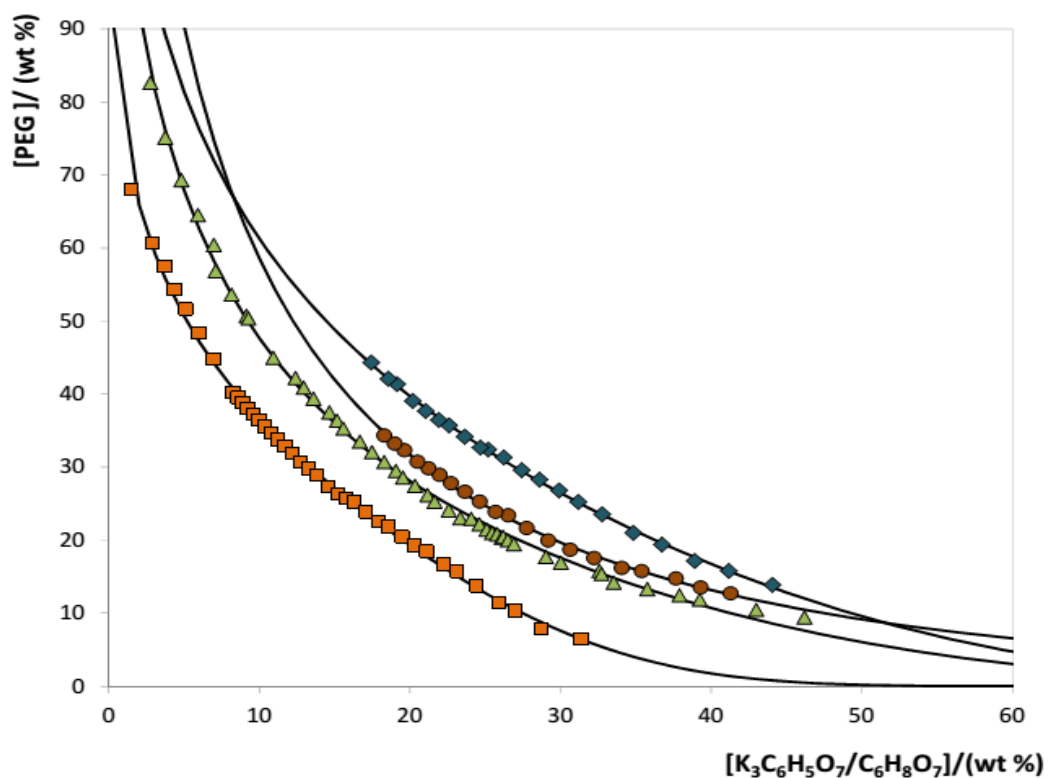


Figura A 4. Curvas binodais para os sistemas compostos por PEG 400 + $K_3C_6H_5O_7/C_6H_8O_7$ + água, ($T = 298$ K) a pH 5 (\blacklozenge); pH 6 (\bullet); pH 7 (\blacktriangle); pH 8 (\blacksquare) [46].

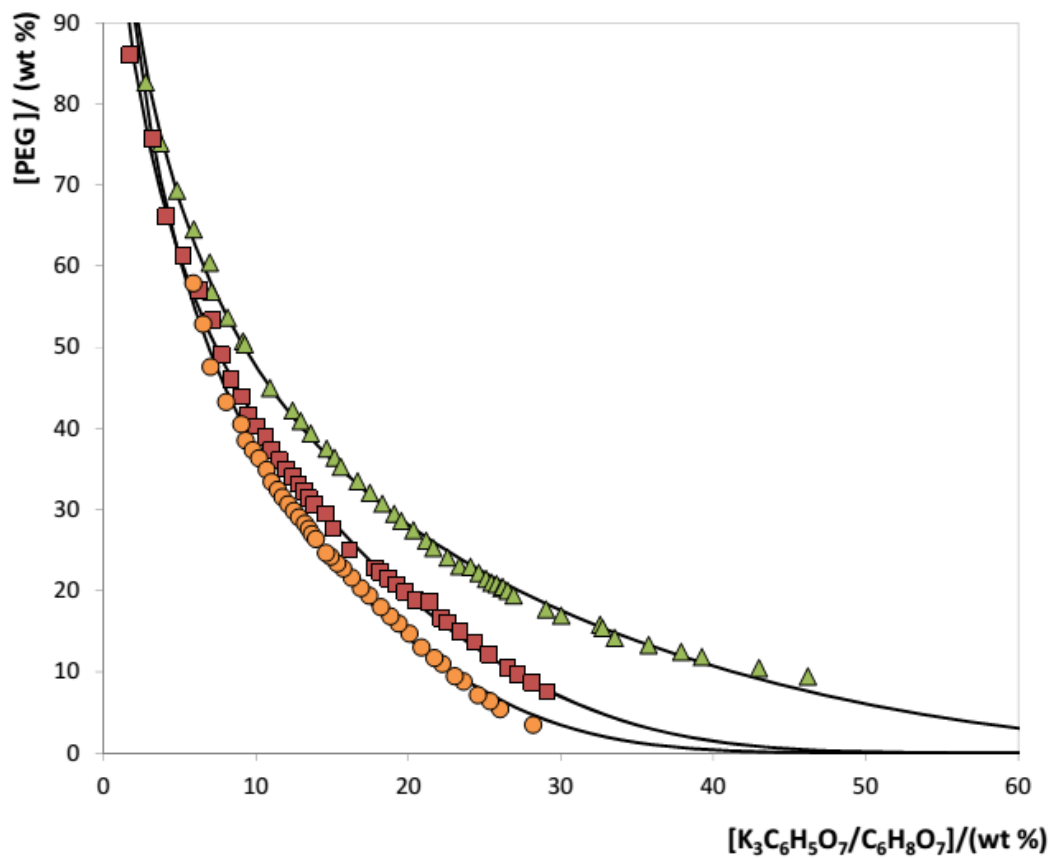


Figura A 5. Curvas binodais para os sistemas compostos por PEG + K₃C₆H₅O₇/C₆H₈O₇ + água (T= 298 K, pH 7): PEG 400 (▲); PEG 600 (■); PEG 1000 (●) [46].

Anexo B – Curvas de calibração

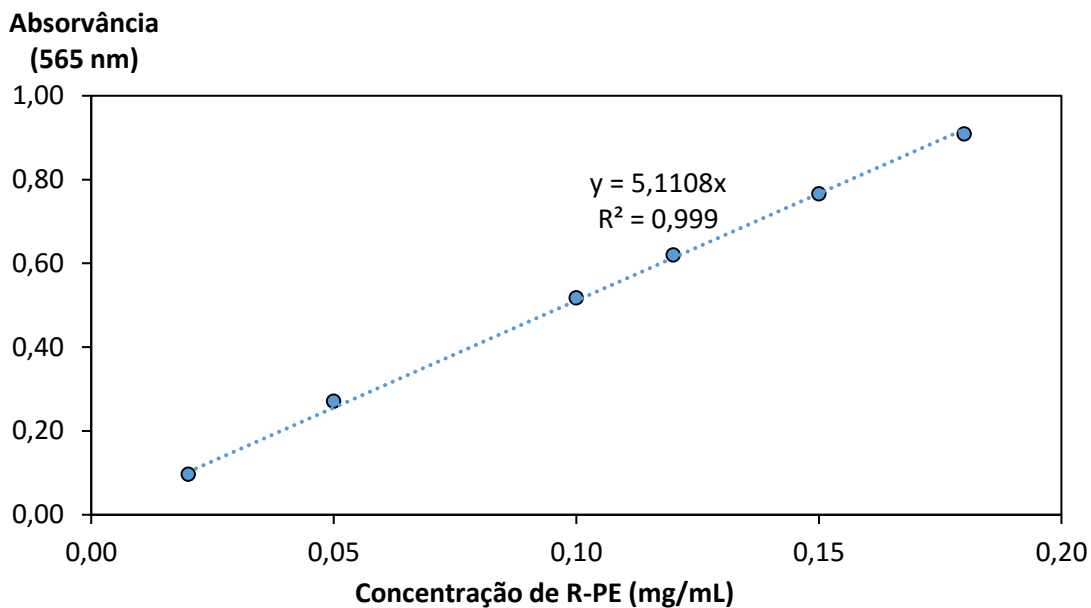


Figura B 1. Curva de calibração para quantificação das ficobiliproteínas em solução aquosa a 565 nm usando um leitor de microplacas UV-Vis (Synergy HT microplate reader – BioTek) e R-ficoeritrina como proteínas modelo.

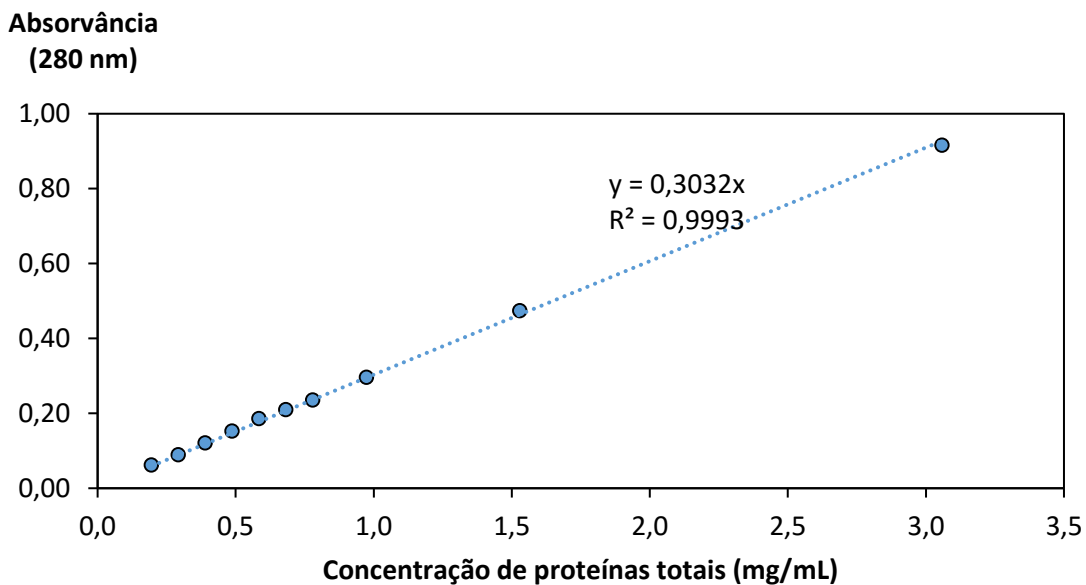


Figura B 2. Curva de calibração para quantificação das proteínas totais em solução aquosa a 280 nm usando um leitor de microplacas UV-Vis (Synergy HT microplate reader – BioTek) e proteína de soro bovino como proteína modelo.

Anexo C- Balanços de massa

Equação correspondente ao Balanço de massa (BM),

$$BM = \frac{mR - PE_{Topo} + mR - PE_{Fundo}}{mR - PE_{Inicial}} \times 100$$

onde, $mR-PE_{Topo}$, $mR-PE_{Fundo}$ e $mR-PE_{Inicial}$ correspondem, respetivamente, à massa de R-ficoeritrina no topo, fundo e à inicialmente adicionada aos sistemas pela adição do extrato.

Tabela C 1. Balanços de massa aos sistemas estudados

	BM ± σ	
30% (m/m) de PEG + 30% (m/m) K₃C₆H₅O₇/C₆H₈O₇ + 40% (m/m) de extrato	PEG 400	72 ± 2
	PEG 600	83 ± 7
	PEG 1000	95 ± 4
15% (m/m) de PEG + 15% (m/m) K₂HPO₄/KH₂PO₄ + 70% (m/m) de extrato	PEG 1000	81 ± 2
	PEG 1500	78 ± 16
	PEG 4000	77 ± 3
	PEG 6000	84 ± 1
30% (m/m) de PEG 400 + 30% (m/m) K₃C₆H₅O₇/C₆H₈O₇ + 40% (m/m) de extrato	pH 6	73 ± 1
	pH 7	72 ± 2
	pH 8	45,7 ± 0,8
15% (m/m) de PEG + 15% (m/m) K₂HPO₄/KH₂PO₄ + 65% (m/m) de extrato + 5% (m/m) [C₂mim]Cl	PEG 1500	82 ± 2
	PEG 6000	106 ± 6
	PEG 8000	93 ± 3
15% (m/m) de PEG + 15% (m/m) K₂HPO₄/KH₂PO₄ + 65% (m/m) de extrato + 5% (m/m) [C₆mim]Cl	PEG 1500	67 ± 6
	PEG 6000	71 ± 4
	PEG 8000	70 ± 4

