



instituto de **química**

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Estabilização do corante azul natural ficocianina de *S. maxima* em pH ácido para aplicação em bebidas

Raphael de Oliveira Ribeiro

Projeto Final de Curso

Orientadora

Prof. Anita Ferreira do Valle, D.Sc. Instituto de Química/UFRJ

Outubro de 2023

ESTABILIZAÇÃO DO CORANTE AZUL FICOCIANINA DE S. MAXIMA EM PH ÁCIDO PARA APLICAÇÃO EM BEBIDAS

Raphael de Oliveira Ribeiro

Projeto Final de Curso submetido ao Corpo Docente do Instituto de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Químico com Atribuições Tecnológicas.

Aprovado por:

Anita Ferreira do Valle, doutorado

Samuel Ferreira Damaciano, mestrado

Arthur Lima e Silva, mestrado

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Outubro de 2023

CIP - Catalogação na Publicação

d484e de Oliveira Ribeiro, Raphael
Estabilização do corante azul ficocianina de *S. maxima* em pH ácido para aplicação em bebidas / Raphael de Oliveira Ribeiro. -- Rio de Janeiro, 2023.
94 f.

Orientadora: Anita Ferreira do Valle.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Bacharel em Química, 2023.

1. C-ficocianina. 2. *Spirulina maxima*. 3. Estabilidade. I. Ferreira do Valle, Anita, orient.
II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

Dedico esse trabalho aos meus avós maternos, Celi Eugênia de Oliveira e Armando de Olivera, e à minha vó paterna, Edna de Marins.

AGRADECIMENTOS

Agradeço o apoio incondicional de meus pais, Carla Reis e Luís Otávio Ribeiro, e de meu irmão, Luis Henrique Ribeiro, e tudo mais que me proporcionaram ao longo da minha vida.

Agradeço por ter encontrado uma pessoa tão especial como Anna Karolina Saraiva Rangel, que me motiva sempre a seguir na direção dos meus, agora nossos, sonhos. Agradeço também pelo suporte que seus pais, Evanilço Rangel e Jane Saraiva, e demais parentes, me deram desde o início da nossa relação.

Agradeço a toda minha família, todos que já se foram e os que permanecem, por serem sempre presentes em todos os momentos da minha vida.

Agradeço aos amigos e colegas que conheci e convivi ao longo da graduação, e aos companheiros e companheiras de laboratório que diariamente ajudam no avanço dessa equipe que construímos conjuntamente.

Agradeço à Universidade Federal do Rio de Janeiro pela formação proporcionada, ao Laboratório de Estudos Aplicados à Fotossíntese pelo acolhimento, e ao Departamento de Bioquímica e ao Instituto de Química pela estrutura e organização das atividades acadêmicas realizadas.

Agradeço ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBITI) da UFRJ pela bolsa fornecida, através do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), que abarcou o projeto integralmente ao longo da sua execução.

Agradeço à toda e qualquer pessoa que passou pela minha vida e me fez pensar, refletir, observar, crescer, sentir, amar e viver. A todos vocês, obrigado.

Resumo do Projeto Final apresentado ao Instituto de Química como parte dos requisitos necessários para conclusão do curso de Química – Atribuições Tecnológicas.

ESTABILIZAÇÃO DO CORANTE AZUL NATURAL FICOCIANINA DE *S. MAXIMA* EM PH ÁCIDO PARA APLICAÇÃO EM BEBIDAS

Raphael de Oliveira Ribeiro

Outubro de 2023

Orientadora Responsável: Prof^a. Anita Ferreira do Valle, D. Sc.

Atualmente, a busca por alternativas de corantes naturais na indústria alimentícia é crescente, visando a substituição de corantes sintéticos que apresentam malefícios à saúde. Microalgas são algumas das principais fontes de extração desses corantes, como as ficobiliproteínas. Essas moléculas, compostas por cromóforos ancorados às proteínas hidrossolúveis, atuam no ciclo fotossintético desses microrganismos e, uma vez extraídas, têm aplicação como aditivos naturais. Esse projeto tem como foco a C-ficocianina, um corante azul, natural e atóxico amplamente utilizado na indústria alimentícia global. O corante apresenta boa estabilidade em faixas de pH entre 5.0 e 8.0 e temperaturas abaixo de 40 °C, justificando estudos da sua estabilidade em condições adversas. Com isso, esse trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e otimização de estratégias visando a estabilização da C-ficocianina em bebidas carbonatadas com pH de 3,3. A C-ficocianina utilizada nesse trabalho foi extraída do cultivo otimizado de *S. maxima*. A partir de estudos prévios em torno de estratégias para estabilizar o corante nas condições adversas citadas, optou-se por aprofundar estudo em torno da reação de hidrólise enzimática do corante. Testes preliminares usando os parâmetros de tempo de reação, protease, concentração de enzima e de C-ficocianina e solvente da reação revelaram quais desses seriam fixados para as próximas etapas do estudo, tendo como solvente a água e papaína como a enzima com os melhores resultados. Através de planejamentos experimentais, as condições ótimas para a hidrólise do corante foram determinadas: 37 °C, 30 minutos e concentração de 2,67 mg de papaína/mL. Após 30 minutos de reação, o padrão de hidrólise foi avaliado por meio de SDS-PAGE, que, devido à igualdade dos padrões das bandas de proteínas, pode confirmar as condições ótimas previamente determinadas através do planejamento experimental.

ABSTRACT

Currently, the search for natural dye alternatives in the food industry is constantly increasing, aiming to replace synthetic dyes that have adverse health effects. Microalgae are some of the main sources for the extraction of these dyes, such as phycobiliproteins. These molecules, composed of chromophores anchored to water-soluble proteins, function in the photosynthetic cycle of these microorganisms and once extracted, have applications as natural additives. This project focuses on C-phycoerythrin, a red, natural, and non-toxic dye widely used in the global food industry. The dye exhibits good stability in pH ranges between 5.0 and 8.0 and temperatures below 40 °C, justifying studies of its stability under adverse conditions. Therefore, this work aims to develop and optimize strategies for stabilizing C-phycoerythrin in carbonated beverages with a pH of 3.3. The C-phycoerythrin used in this study was extracted from the optimized cultivation of *S. maxima*. Based on previous studies regarding strategies to stabilize the dye under the mentioned adverse conditions, it was decided to delve into the enzymatic hydrolysis reaction of the dye. Preliminary tests using reaction time parameters, protease, enzyme and C-phycoerythrin concentration, and reaction solvent revealed which of these would be fixed for the next stages of the study, with water as the solvent and papain as the enzyme with the best results. Through factorial statistical designs, the optimal conditions for dye hydrolysis were determined: 37 °C, 30 minutes, and a concentration of 2.67 mg of papain/mL. After 30 minutes of reaction, the hydrolysis pattern was evaluated using SDS-PAGE, which, due to the equality of the protein band patterns, confirmed the previously determined optimal conditions through experimental planning.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1a** – Estrutura da molécula da ficocianina composta pelas subunidades α e β de proteínas (CHOI *et al.*, 2018). 19
- Figura 1b** – Estrutura da ficocianobilina composta de tetrapirrol ligado, através de ligações tioéter, a resíduos de cisteína, de acordo com Zheng *et al.* (2013). 19
- Figura 2** – Descrição das etapas Preparatória, Pré-prospectiva, Prospectiva e Pós-prospectiva, e das respectivas atividades executadas em cada fase da metodologia elegida. Adaptado de Bahruth, Antunes e Bomtempo (2006). 23
- Figura 3** – Número total de artigos obtidos nas buscas com conjuntos de palavras-chave na plataforma *Scopus* (azul mais claro), número de artigos após retirados os que apareciam para mais de um conjunto de palavras-chave (azul claro) e número de artigos final após selecionados os relevantes para o escopo do projeto (azul escuro). 25
- Figura 4** – Gráfico representando porcentagem de artigos relevantes (azul) e irrelevantes (vermelho) do número total de artigos após retirada dos que apareciam para mais de um conjunto de palavras-chave. 25
- Figura 5** – Gráfico relacionando, dentre os 98 artigos relevantes, o número de artigos publicados em cada ano do período de tempo selecionado. 26
- Figura 6** – Porcentagem de artigos publicados em cada país no período de tempo selecionado de 2018 à 2023, sendo destacados os valores dos mais recorrentes. 26
- Figura 7** – Número de artigos divididos em cada categoria Meso, definidas de acordo com os assuntos mais recorrentes dentre o conjunto de artigos relevantes. 27
- Figura 8** – Gráfico com as porcentagens de artigos atribuídos a cada taxonomia Micro dentro da taxonomia meso de Condições de Cultivo. 28
- Figura 9** – Gráfico com as porcentagens de artigos atribuídos a cada taxonomia Micro dentro da taxonomia meso de Condições de Cultivo. 28
- Figura 10** – Gráfico com as porcentagens de artigos atribuídos a cada taxonomia Micro dentro da taxonomia meso de Métodos de Extração. 29
- Figura 11** – Gráfico com as porcentagens de artigos atribuídos a cada taxonomia Micro dentro da taxonomia meso de Métodos de Purificação. 29

- Figura 12** – Gráfico com as porcentagens de artigos atribuídos a cada taxonomia Micro dentro da taxonomia meso de Formas de Aplicação. 30
- Figura 13** – Gráfico com as porcentagens de artigos atribuídos a cada taxonomia Micro dentro da taxonomia meso de Modelagem e Simulação. 30
- Figura 14** – Gráfico com as porcentagens de artigos atribuídos a cada taxonomia Micro dentro da taxonomia meso de Estabilidade. 31
- Figura 15** – Gráfico com as porcentagens de artigos atribuídos a cada taxonomia Micro dentro da taxonomia meso de Co-produção e Caracterização da Biomassa. 31
- Figura 16** – Fluxograma representativo de toda a metodologia abordada no capítulo II desse trabalho, bem como as demais etapas de análise e discussão dos resultados e, enfim, as conclusões. 49
- Figura 17a** – Amostras de C-ficocianina em bebida após 3 dias da reação de hidrólise com papaína como protease. 59
- Figura 17b** – Amostras de C-ficocianina em bebida após 3 dias da reação de hidrólise com pepsina como protease. 59
- Figura 18** – Gráfico de Pareto referente à concentração final de C-PC (mg/mL), correlacionando a significância dos diferentes polinômios de cada variável independente do primeiro planejamento experimental. 63
- Figura 19** – Superfície de resposta do tempo de reação (h) e da massa de pepsina (g), expressos em função da concentração final de C-PC (mg/mL), para o primeiro planejamento experimental. 63
- Figura 20** – Superfície de resposta do tempo de reação (h) e da concentração inicial de C-PC (mg/mL), expressos em função da concentração final de C-PC (mg/mL), para o primeiro planejamento experimental. 64
- Figura 21** – Superfície de resposta da concentração inicial de C-PC (mg/mL) e da massa de pepsina (g), expressos em função da concentração final de C-PC (mg/mL), para o primeiro planejamento experimental. 64
- Figura 22** – Gráfico de Pareto referente ao grau de pureza, correlacionando a significância dos diferentes polinômios de cada variável independente do primeiro planejamento experimental. 65

- Figura 23** – Superfície de resposta do tempo de reação (h) e da massa de pepsina (g), expressos em função do grau de pureza, para o primeiro planejamento experimental. 65
- Figura 24** – Superfície de resposta do tempo de reação (h) e da concentração inicial de C-PC (mg/mL), expressos em função do grau de pureza, para o primeiro planejamento experimental. 66
- Figura 25** – Superfície de resposta da concentração inicial de C-ficocianina (mg/mL) e da massa de pepsina (g), expressos em função do grau de pureza, para o primeiro planejamento experimental. 66
- Figura 26** – Gráfico de Pareto referente à concentração de C-PC (mg/mL), correlacionando, para o bloco da papaína, a significância dos diferentes polinômios de cada variável independente do segundo planejamento experimental. 68
- Figura 27** – Superfície de resposta do tempo de reação (h) e da massa de papaína (g), expressos em função da concentração final de C-PC (mg/mL), para o segundo planejamento experimental. 69
- Figura 28** – Gráfico de Pareto referente ao grau de pureza, correlacionando, para o bloco da papaína, a significância dos diferentes polinômios de cada variável independente do segundo planejamento experimental. 69
- Figura 29** – Superfície de resposta do tempo de reação (h) e da massa de papaína (g), expressos em função do grau de pureza, para o segundo planejamento experimental. 70
- Figura 30** – Gráfico de Pareto referente à concentração de C-PC (mg/mL), correlacionando, para o bloco da pepsina, a significância dos diferentes polinômios de cada variável independente do segundo planejamento experimental. 71
- Figura 31** – Superfície de resposta do tempo de reação (h) e da massa de pepsina (g), expressos em função da concentração final de C-PC (mg/mL), para o segundo planejamento experimental. 71
- Figura 32** – Gráfico de Pareto referente ao grau de pureza, correlacionando, para o bloco da pepsina, a significância dos diferentes polinômios de cada variável independente do segundo planejamento experimental. 72
- Figura 33** – Superfície de resposta do tempo de reação (h) e da massa de pepsina (g), expressos em função do grau de pureza, para o segundo planejamento experimental. 72

Figura 34 – Gráfico de Pareto referente à concentração de C-PC (mg/mL), correlacionando a significância dos diferentes polinômios de cada variável independente do quarto planejamento experimental. 74

Figura 35 – Superfície de resposta do tempo de reação (h) e da massa de papaína (g), expressos em função da concentração final de C-PC (mg/mL), para o quarto planejamento experimental. 75

Figura 36 – Gráfico de Pareto referente ao grau de pureza, correlacionando a significância dos diferentes polinômios de cada variável independente do quarto planejamento experimental. 75

Figura 37 – Superfície de resposta do tempo de reação (h) e da massa de papaína (g), expressos em função do grau de pureza, para o quarto planejamento experimental. 76

Figura 38 – Gráfico de Pareto referente à concentração de C-PC (mg/mL), correlacionando a significância dos diferentes polinômios de cada variável independente do quinto planejamento experimental. 77

Figura 39 – Superfície de resposta do tempo de reação (min) e da massa de papaína (g), expressos em função da concentração final de C-PC (mg/mL), para o quinto planejamento experimental. 78

Figura 40 – Gráfico de Pareto referente ao grau de pureza, correlacionando a significância dos diferentes polinômios de cada variável independente do quinto planejamento experimental. 78

Figura 41 – Superfície de resposta do tempo de reação (min) e da massa de papaína (g), expressos em função do grau de pureza, para o quinto planejamento experimental. 79

Figura 42 – Gráfico de Pareto referente à concentração de C-PC (mg/mL), correlacionando a significância dos diferentes polinômios de cada variável independente do sexto planejamento experimental. 80

Figura 43 – Superfície de resposta do tempo de reação (min) e da massa de C-ficocianina (g), expressos em função da concentração final de C-PC (mg/mL), para o sexto planejamento experimental. 81

Figura 44 – Gráfico de Pareto referente ao grau de pureza, correlacionando a significância dos diferentes polinômios de cada variável independente do sexto planejamento experimental.

81

Figura 45 – Superfície de resposta do tempo de reação (min) e da massa de C-ficocianina (g), expressos em função do grau de pureza, para o sexto planejamento experimental.

82

Figura 46 – Gel de poliacrilamida contendo 9 poços, sendo estes: 1 – padrão de massas moleculares; 2 – padrão de C-ficocianina; 3 – padrão de papaína; poços 4 a 9 – amostras de C-ficocianina digerida com papaína com tempo inicial de 30 minutos (poço 4), aumentando com incrementos de 30 minutos para cada poço subsequente (5 – 60, 6 – 90, 7 – 120, 8 – 150 e 9 – 180). Também são destacadas as bandas referentes aos padrões de C-ficocianina e papaína.

83

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 – Níveis taxonômicos Meso e suas subdivisões, em taxonomias micro.	27
--	----

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Conjuntos de palavras-chave escolhidos para busca de artigos na plataforma <i>Scopus</i> .	23
Tabela 2 – Parâmetros determinados na Fase 3 da metodologia seguida, detalhando o conjunto de critérios para busca de artigos na plataforma <i>Scopus</i> .	24
Tabela 3 – Número total de artigos encontrados, divididos em cada conjunto de palavras-chave escolhidos para busca na plataforma <i>Scopus</i> .	24
Tabela 4 – Relação de enzimas, proporção de C-ficocianina:enzima, massa de enzima (g) e tempo de reação (h) para a primeira sequência de testes da hidrólise enzimática.	51
Tabela 5 – Relação de enzimas, matriz na qual ocorreu a hidrólise, proporção de C-ficocianina:enzima e massa de enzima (g) para a segunda sequência de testes da hidrólise enzimática.	52
Tabela 6 – Variáveis – proporção C-PC:pepsina, tempo de reação (h) e concentração de C-PC (mg/mL) –, pontos centrais e pontos +/- 1 de cada variável do Primeiro planejamento experimental.	53
Tabela 7 – Conjunto de amostras gerado para o Primeiro planejamento experimental com triplicata do ponto central (amostras 15, 16 e 17).	53
Tabela 8 – Variáveis – tempo de reação (h) e massa de enzima (g), podendo essa ser pepsina ou papaína –, pontos centrais, pontos +/- 1 e pontos +/- 1,41 α de cada variável do Segundo planejamento experimental.	54
Tabela 9 – Conjunto de amostras gerado para o Segundo planejamento experimental com triplicata do ponto central (amostras 9, 10 e 11).	54
Tabela 10 – Variáveis – tempo de reação (h) e massa de papaína (g) –, pontos centrais, pontos +/- 1 e pontos +/- 1,41 α de cada variável do Terceiro e Quarto planejamento experimental.	55
Tabela 11 – Conjunto de amostras gerado para os Terceiro e Quarto planejamentos experimentais com triplicata do ponto central (amostras 9, 10 e 11).	55
Tabela 12 – Variáveis – tempo de reação (min) e massa de papaína (g) –, pontos centrais, pontos +/- 1 e pontos +/- 1,41 α de cada variável do Quinto planejamento experimental.	56

- Tabela 13** – Conjunto de amostras gerado para o Quinto planejamento experimental com triplicata do ponto central (amostras 9, 10 e 11). 56
- Tabela 14** – Variáveis – tempo de reação (min) e massa de C-PC (g) –, pontos centrais, pontos +/- 1 e pontos +/- 1,41 α de cada variável do Sexto planejamento experimental. 57
- Tabela 15** – Conjunto de amostras gerado para o Sexto planejamento experimental com triplicata do ponto central (amostras 9, 10 e 11). 57
- Tabela 16** – Esquema de poços, com descrição das amostras em cada poço, para a execução da técnica de SDS-PAGE. 58
- Tabela 17** – Parâmetros da primeira sequência de testes em torno da hidrólise enzimática, sendo eles enzima utilizada, massa de enzima (g) e tempo de reação (h). São apresentados, para cada amostra, os resultados qualitativos observados após o tempo de reação referente e posterior aplicação em bebida de pH ácido. 60
- Tabela 18** – Parâmetros da segunda sequência de testes em torno da hidrólise enzimática, sendo eles enzima utilizada, massa de enzima (g) e tempo de reação (h). São apresentados, para cada amostra, os resultados quantitativos de Grau de Pureza observados após o tempo de reação referente e posterior aplicação em bebida de pH ácido. 61
- Tabela 19** – Conjunto amostral gerado para o primeiro planejamento experimental da reação de hidrólise enzimática, especificando cada parâmetro por amostra (proporção C-PC:Pepsina; tempo de reação (h); e concentração inicial de C-PC em mg/mL – [C-PC]_i), bem como os respectivos resultados em função da concentração final de C-PC em mg/mL ([C-PC]_f) e Grau de Pureza (GP). 62
- Tabela 20** – Conjunto amostral gerado para o segundo planejamento experimental da reação de hidrólise enzimática, com dois blocos espelhados para papaína e pepsina, especificando cada parâmetro por amostra (tempo de reação (h) e massa de enzima (g)), bem como os respectivos resultados em função da concentração de C-PC (mg/mL) e Grau de Pureza (GP). 67
- Tabela 21** – Conjunto amostral gerado para o terceiro planejamento experimental da reação de hidrólise enzimática, especificando cada parâmetro por amostra (tempo de reação (h) e massa de papaína (g)), bem como os respectivos resultados em função da concentração de C-PC (mg/mL). 73
- Tabela 22** – Conjunto amostral gerado para o quarto planejamento experimental da reação de hidrólise enzimática, especificando cada parâmetro por amostra (tempo de reação (h) e massa

de papaína (g)), bem como os respectivos resultados em função da concentração de C-PC (mg/mL) e do grau de pureza. 73

Tabela 23 – Conjunto amostral gerado para o quinto planejamento experimental da reação de hidrólise enzimática, especificando cada parâmetro por amostra (tempo de reação (min) e massa de papaína (g)), bem como os respectivos resultados em função da concentração de C-PC (mg/mL) e do grau de pureza. 76

Tabela 24 – Conjunto amostral gerado para o sexto planejamento experimental da reação de hidrólise enzimática, especificando cada parâmetro por amostra (tempo de reação (min) e massa de C-PC (g)), bem como os respectivos resultados em função da concentração de C-PC (mg/mL) e do grau de pureza. 79

SUMÁRIO

1. Introdução	19
2. Justificativa	22
3. Objetivos	23
4. Capítulo I – Prospecção Tecnológica	24
4.1 – Metodologia	24
4.2 – Resultados	25
4.2.1 – Taxonomia Macro	26
4.2.2 – Taxonomia Meso	27
4.2.3 – Condições de cultivo	29
4.2.4 – Coleta de biomassa	29
4.2.5 – Métodos de extração	30
4.2.6 – Métodos de purificação	30
4.2.7 – Formas de aplicação	31
4.2.8 – Modelagem e simulação	31
4.2.9 – Estabilidade	32
4.2.10 – Co-produção e caracterização da biomassa	32
4.3 – Discussão	33
4.3.1 – Taxonomia Macro	34
4.3.2 – Taxonomia Meso	34
4.3.3 – Condições de cultivo	35
4.3.4 – Coleta de biomassa	38
4.3.5 – Métodos de extração	38
4.3.6 – Métodos de purificação	40
4.3.7 – Formas de aplicação	42
4.3.8 – Modelagem e simulação	44
4.3.9 – Estabilidade	45

4.3.10 – Co-produção e caracterização da biomassa	49
5. Capítulo II – Estratégias de estabilização de C-ficocianina em bebida ácida	51
5.1 – Metodologia Experimental	51
5.1.1 – Obtenção da biomassa	51
5.1.2 – Extração de C-ficocianina	51
5.1.3 – Estratégias para estabilização da C-ficocianina em pH ácido	52
5.1.4 – Hidrólise enzimática	52
5.1.4.1 – Primeiro planejamento experimental	54
5.1.4.2 – Segundo planejamento experimental	56
5.1.4.3 – Terceiro e quarto planejamento experimental	57
5.1.4.4 – Quinto planejamento experimental	58
5.1.4.5 – Sexto planejamento experimental	59
5.1.5 – Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida	60
5.2 – Resultados	60
5.2.1 – Extração de C-ficocianina	60
5.2.2 – Estratégias para estabilização da C-ficocianina em pH ácido	61
5.2.3 – Hidrólise enzimática	61
5.2.3.1 – Primeiro planejamento experimental	64
5.2.3.2 – Segundo planejamento experimental	69
5.2.3.3 – Terceiro e quarto planejamento experimental	75
5.2.3.4 – Quinto planejamento experimental	78
5.2.3.5 – Sexto planejamento experimental	81
5.2.4 – Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida	84
5.3 – Discussão	85
5.3.1 – Extração de C-ficocianina	85

5.3.2 – Estratégias para estabilização da C-ficocianina em pH ácido	86
5.3.3 – Hidrólise enzimática	90
5.3.3.1 – Primeiro planejamento experimental	92
5.3.3.2 – Segundo planejamento experimental	94
5.3.3.3 – Terceiro e quarto planejamento experimental	96
5.3.3.4 – Quinto planejamento experimental	97
5.3.3.5 – Sexto planejamento experimental	98
5.3.4 – Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida	100
6. Perspectivas	101
7. Conclusões Gerais	102
8. Bibliografia	104

1. Introdução

A crescente demanda social por alternativas sustentáveis e naturais que substituam produtos contendo aditivos artificiais faz crescer, em conjunto, as pesquisas de bases científica e tecnológica em torno das microalgas. Nesse sentido, microalgas do gênero *Arthrospira*, antes conhecido como *Spirulina*, destacam-se como fontes de diversos bioprodutos de alto valor agregado comumente usados para suplementação alimentar, desenvolvimento de terapêuticos e estudos de diagnósticos, e biocombustíveis (PARK *et al.*, 2022). Além disso, a facilidade do cultivo e coleta dessas cianobactérias, bem como as suas altas taxas de crescimento relativo, são outro ponto para o grande interesse comercial em torno delas. É importante denotar, entretanto, que ainda existem muitas barreiras com relação ao cultivo em larga escala dessas microalgas, em especial pelo desafio de minimizar os problemas em torno de energia e meio ambiente de uma planta industrial, enquanto mantém-se o custo-benefício para a obtenção dos produtos de interesse.

Das microalgas classificadas pelo gênero supracitado, a *Arthrospira maxima* foi a espécie da qual o corante utilizado nesse projeto foi extraído. *A. maxima* é uma cianobactéria filamentosa helicoidal nativa de corpos de água alcalinos que possui cor verde-azulada, sendo o azul proveniente da concentração de pigmentos em complexos de ficobiliproteínas presentes em suas células, os ficobilissomas, e o verde das clorofilas (STANIC-VUCINIC *et al.*, 2018).

Entre os produtos bioativos presentes nessa cianobactéria, destaca-se a C-ficocianina, uma das ficobiliproteínas hidrossolúveis que compõem as estruturas celulares que auxiliam no processo de fotossíntese da microalga absorvendo ondas eletromagnéticas na região do visível e transformando-as em energia química, os ficobilissomas, presentes nas membranas tilacóides do cloroplasto (STANIC-VUCINIC *et al.*, 2018), e que se apresenta naturalmente em grande quantidade nas células desse microrganismo (OSÓRIO *et al.*, 2020). Estruturalmente, essa substância é composta por cadeias de tetrapirróis lineares – cromóforos chamados ficocianobilinas – ligadas com resíduos de cisteína de duas subunidades de proteínas, α e β , através de ligações tioéter (**Figura 1**) (CHOI *et al.*, 2018; MACCOLL, 1998; ANTELO, 2007; RODA-SERRAT *et al.*, 2018). Por ser um corante hidrossolúvel, sua extração pode ser recorrentemente realizada com soluções aquosas de diferentes forças iônicas (REIS *et al.*, 1998; SARADA *et al.*, 1999), diminuindo a incidência de passivos ambientais. No entanto, a literatura mostra estudos de métodos físico-químicos para auxiliar na extração eficiente desse composto

que, até então, não apresentam-se como possibilidades viáveis para aplicação em larga escala (JAESCHKE *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2020; THEVARAJAH *et al.*, 2022; BERROUANE *et al.*, 2022).

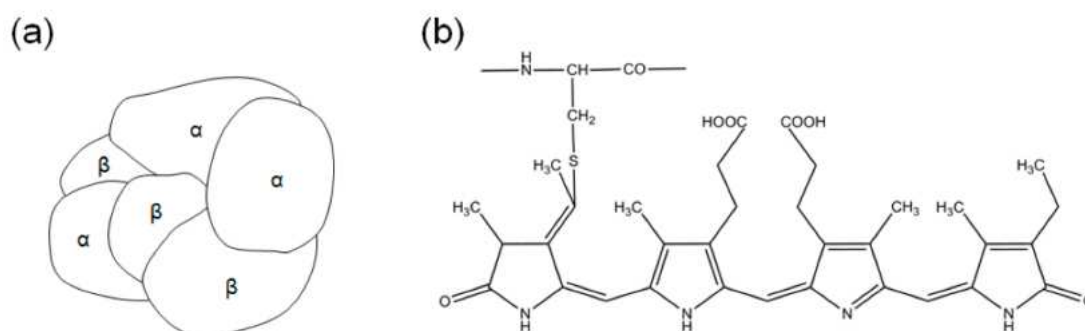


Figura 1: (a) Estrutura da molécula da ficocianina composta pelas subunidades α e β de proteínas (CHOI *et al.*, 2018). (b) Estrutura da ficocianobilina composta de tetrapirrol ligado, através de ligações tioéter, a resíduos de cisteína, de acordo com Zheng *et al.* (2013).

A definição de uma substância como corante ou pigmento deve levar em consideração, entre outros fatores, mas principalmente, a matriz na qual está presente. Segundo Saron e Felisberti (2005), ambos os termos definem substâncias com capacidade colorante, ou seja, que causam mudança na cor percebida, entretanto, se diferem pelo tamanho de partículas e solubilidade em um dado meio. Sendo assim, a C-ficocianina quando inserida na estrutura dos ficobilissomas dentro das células de *Arthrospira maxima* é insolúvel no meio e, portanto, seria classificada como um pigmento. Já no caso da extração e posterior aplicação dessa ficobiliproteína em bebida, com o intuito da alteração de cor do produto, essa, uma vez que se apresenta solúvel nessa matriz, é classificada como um corante.

Ainda, segundo resolução indeferida pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, do Ministério da Saúde (1977): “classifica-se como corante a substância ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de alimento (e bebida)”. Portanto, levando em consideração as referências apresentadas com relação ao uso e definição de termos referentes a colorantes, bem como à substâncias colorantes aplicadas em alimentos e bebidas, a molécula de C-ficocianina será referenciada como corante para o escopo do presente trabalho.

Para melhor entendimento do projeto, é necessário determinar com clareza a natureza do problema investigado, seja ela a melhoria da estabilidade do corante em pH ácido, ou a promoção de maior solubilidade do mesmo em matriz ácida. A solubilidade do corante estudado

em soluções aquosas é inquestionável, dada a relação soluto-solvente presente nesse sistema (MARTINS; LOPES; ANDRADE, 2013). Sabe-se, ainda, que a C-ficocianina tem sua estrutura modificada, como mostra Jespersen *et al.* (2004), quando fora da faixa ótima de pH entre 5 e 6, formando agregados e precipitando nessas condições. Dessa maneira, seria possível considerar que estratégias capazes de manter o corante em solução mesmo em condições ácidas (pH ~3,0) estariam melhorando sua solubilidade.

Não obstante, pesquisas em torno da estabilidade relativa de alimentos contam, no geral, com análises quantitativas de medidas como cor, textura e alterações de composição durante uma faixa de tempo bem definida (DE AZEREDO; FARIA; BRITO, 2012). O mesmo modelo de ensaio é visto, com recorrência, aplicado à estabilidade de C-ficocianina em altas temperaturas (CHAIKLAHAN; CHIRASUWAN; BUNNAG, 2012; KANNAUJIYA; SINHA, 2016) e, em alguns casos, em pH ácido (ZHANG; LI; ABBASPOURRAD, 2020). Assim, cabe a consideração de que, uma vez avaliados um ou mais parâmetros ligados à instabilidade do corante ao longo de um determinado período de tempo, seria possível alcançar estratégias para melhorar sua estabilidade. Enfim, em vista da modificação estrutural que a C-ficocinina sofre em condições ácidas (JESPERSEN *et al.*, 2004), estratégias que impedissem tal alteração em sua estrutura, enquanto avaliando parâmetros de, por exemplo, cor e concentração ao longo de um determinado tempo, poderiam ser consideradas estratégias de estabilização do corante, como é o caso desse projeto, ao contrário de estratégias de aumento de solubilidade.

De acordo com Mainardi e Bidoia (2022), os planejamentos fatoriais vêm sendo amplamente utilizados em diferentes áreas da ciência e tecnologia, e para os mais diversos fins, como: determinar a combinação otimizada entre parâmetros distintos, desenhar superfícies de resposta e gráficos de contorno, entre outros. Dentre as vantagens dessa metodologia de planejamentos experimentais, destaca-se a obtenção de respostas sobre a interação de dois ou mais parâmetros em um dado sistema usando o menor número de ensaios possíveis (MONTGOMERY, 2012). Deste modo, avaliar a formulação, aplicação e análise de planejamentos experimentais para um determinado trabalho, além de reduzir tempo e custos de análises, pode proporcionar a facilitação de interpretações de respostas e interações que, antes, seriam de extrema complexidade.

2. Justificativa

Em vista aos riscos que corantes sintéticos comumente utilizados na indústria alimentar apresentam à saúde, apesar da regulação vigente controlar seu uso (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1977), a busca pela substituição deles por corantes naturais e que não ofereçam perigos adicionais à saúde do consumidor é um dos interesses desse projeto. Ademais, a mudança do perfil dos consumidores atualmente, tanto em contextos de preocupação com a saúde e o bem-estar, como no contexto de sustentabilidade e preservação do meio ambiente, explicita a disposição pelo estudo em torno da estabilização desse corante natural e atóxico extraído de *Arthrospira maxima* com um processo que, comparado ao processo de obtenção de demais corantes sintéticos, como o azul brilhante, reduz a geração de resíduos e passivos ambientais. Por fim, a busca por estratégias que expandam os limites da aplicação desse corante para quaisquer fins e propósitos gera, por si só, inovação. Outrossim, a otimização de processos que permitam sua aplicação com maior alcance de matrizes e condições abre caminhos para a ampliação do uso, manejo e inserção do cultivo dessa microalga, que cumpre todos os 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável previstos pela ONU, na sociedade, o que, por sua vez, gera condições para a melhora coletiva dos setores social, econômico e ambiental de uma dada região.

3. Objetivos

O presente projeto tem como objetivo geral estabilizar o corante azul ficocianina, para sua utilização em pH ácidos, abaixo de 4.0, para aplicação em bebidas comerciais, em termos de:

- Construir uma prospecção tecnológica que mostre o estado da arte do tema, nos últimos 5 anos;
- Avaliar estratégias para estabilização do corante em bebidas ácidas;
- Elucidar, através da metodologia de planejamento experimental, características da estratégia selecionada.

4. Capítulo I – Prospecção Tecnológica

4.1. Metodologia

Nesse capítulo, ao invés da revisão tradicional da literatura associada ao tema do projeto, decidiu-se por seguir uma metodologia de prospecção tecnológica com uso da ferramenta de Monitoramento e Sistemas de Inteligência, descrita por Bahruth, Antunes e Bomtempo (2006). A estratégia em questão dispõe de quatro etapas, desde a Etapa Preparatória, passando pela Pré-prospectiva e pela Prospectiva em si, terminando com a Pós-prospectiva, de acordo com a **Figura 2**.

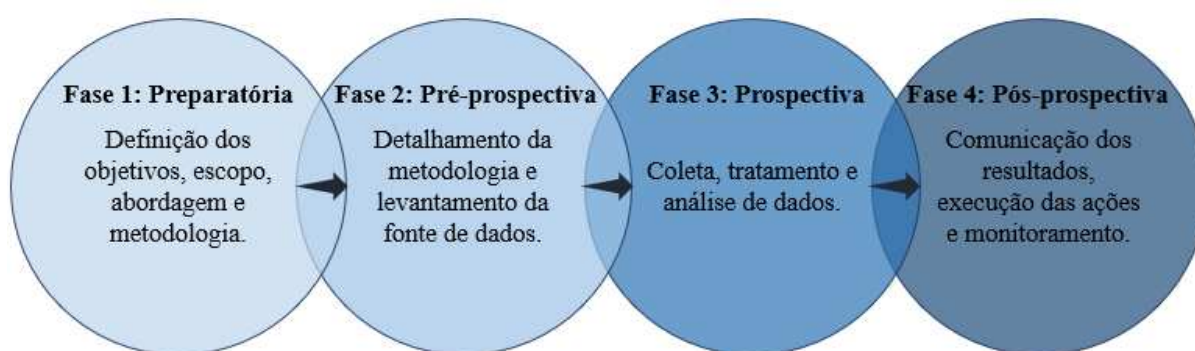


Figura 2: Descrição das etapas Preparatória, Pré-prospectiva, Prospectiva e Pós-prospectiva, e das respectivas atividades executadas em cada fase da metodologia elegida. Adaptado de Bahruth, Antunes e Bomtempo (2006).

Para o escopo do presente trabalho, a primeira fase consistiu, basicamente, da escolha da ferramenta de prospecção adequada, uma vez que os objetivos do projeto fossem determinados. Já para a fase de Pré-prospectiva, foi decidido que sua execução seria realizada através da plataforma *Scopus* (<http://www.scopus.com/>), base de artigos referenciados da Editora *Elsevier*.

O início da terceira etapa se deu, como mostra a **Tabela 1**, pela determinação das palavras-chave combinadas para a obtenção dos artigos. Além disso, foram definidos outros parâmetros importantes para a busca na plataforma, sendo esses o período de publicações, tipo de documento, idiomas e critério de busca (**Tabela 2**).

Tabela 1: Conjuntos de palavras-chave escolhidos para busca de artigos na plataforma *Scopus*.

Palavras-Chave
phycocyanin AND pH AND <i>Spirulina</i>
phycocyanin AND pH AND <i>Arthrospira</i>
phycocyanin AND stability AND <i>Spirulina</i>
phycocyanin AND stability AND <i>Arthrospira</i>

Tabela 2: Parâmetros determinados na Fase 3 da metodologia seguida, detalhando o conjunto de critérios para busca de artigos na plataforma *Scopus*.

Parâmetros	Selecionados
Tipo de Documento	<i>Article & Review</i>
Idiomas	Inglês, Português
Intervalo de Tempo	2018 até 2023
Critério de Busca	<i>Abstract, title & keywords</i>

Por fim, a partir dos artigos obtidos, foi feito o tratamento e análise do conjunto, através da retirada de artigos irrelevantes para o escopo desse trabalho e da divisão dos mesmos em taxonomias de diferentes dimensões (macro, meso e micro), como apresentado na Seção 4.2 desse capítulo. A quarta e última fase da metodologia têm sua execução permeada através das Seções 4.2 e 4.3 do presente capítulo.

4.2. Resultados

Inicialmente, os conjuntos de palavras-chave forneceram 215 artigos no total, porém retirando artigos repetidos, restaram 134 artigos a analisar (73%; **Figura 4**). Desses, apenas 98 mostraram-se relevantes para o escopo desse trabalho, como mostra a **Tabela 3** e a **Figura 3**, abaixo. A partir desse número final foi feita a divisão dos artigos dentro das taxonomias Macro, Meso e Micro, descritas abaixo.

Tabela 3: Número total de artigos encontrados, divididos em cada conjunto de palavras-chave escolhidos para busca na plataforma *Scopus*.

Palavras-Chave	Resultados sem filtro
phycocyanin AND pH AND <i>Spirulina</i>	69
phycocyanin AND pH AND <i>Arthrospira</i>	56
phycocyanin AND stability AND <i>Spirulina</i>	53
phycocyanin AND stability AND <i>Arthrospira</i>	37

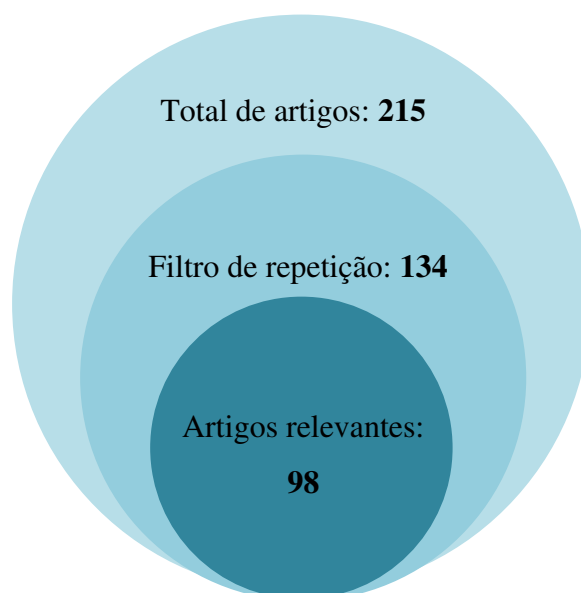


Figura 3: Número total de artigos obtidos nas buscas com conjuntos de palavras-chave na plataforma *Scopus* (azul mais claro), número de artigos após retirados os que apareciam para mais de um conjunto de palavras-chave (azul claro) e número de artigos final após selecionados os relevantes para o escopo do projeto (azul escuro).

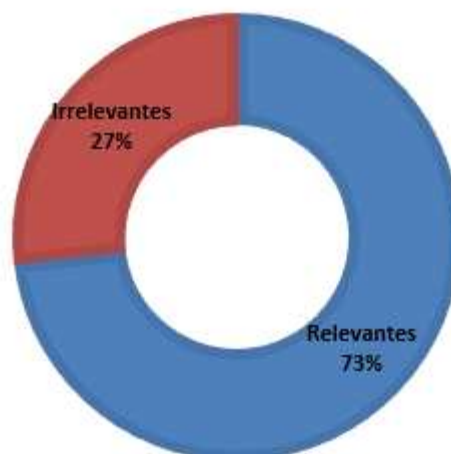


Figura 4: Gráfico representando porcentagem de artigos relevantes (azul) e irrelevantes (vermelho) do número total de artigos após retirada dos que apareciam para mais de um conjunto de palavras-chave.

4.2.1. Taxonomia Macro

Os resultados da organização taxonômica macro resultaram em gráficos dos números de artigos, dentre os 98 relevantes, divididos entre publicações por ano (**Figura 5**) e número de artigos publicados em cada país (**Figura 6**). Para a faixa de tempo entre 2018 e julho de 2023, foram observados os seguintes números de publicações por ano, respectivamente: 20 (2018), 16 (2019), 20 (2020), 13 (2021), 21 (2022) e 8 (julho de 2023). Dentre as publicações divididas em cada país, nota-se os de maior recorrência sendo o Brasil (14%), Indonésia (13%), Estados Unidos da América (11%), China (10%) e Bélgica (8%).

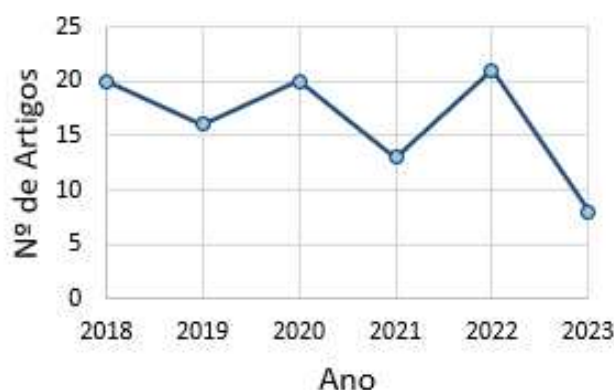


Figura 5: Gráfico relacionando, dentre os 98 artigos relevantes, o número de artigos publicados em cada ano do período de tempo selecionado.

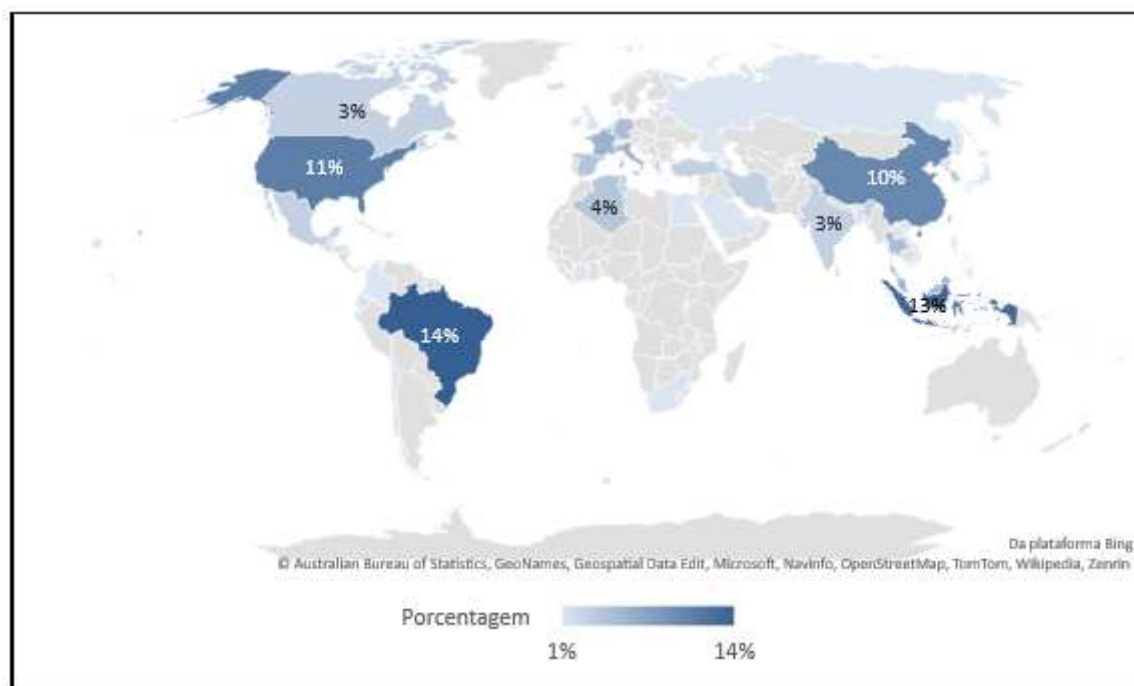


Figura 6: Porcentagem de artigos publicados em cada país no período de tempo selecionado de 2018 à 2023, sendo destacados os valores dos mais recorrentes.

4.2.2. Taxonomia Meso

A **Figura 7** mostra a divisão dos artigos relevantes em cada categoria meso. As três taxonomias meso com maior número de artigos associados foram, respectivamente, Estabilidade (58 artigos), Modelagem e Simulação (32 artigos) e Métodos de Extração (25 artigos). Cada subtópico das taxonomias Meso, chamadas de taxonomias Micro, serão apresentadas nas seções a seguir e podem ser observadas no **Quadro 1**.



Figura 7: Número de artigos divididos em cada categoria Meso, definidas de acordo com os assuntos mais recorrentes dentre o conjunto de artigos relevantes.

Quadro 1: Níveis taxonômicos Meso e suas subdivisões, em taxanomoias micro.

Níveis Taxonômicos				
Meso	Micro	Meso	Micro	
Condições de Cultivo	Luz	Modelagem e Simulação	Cinética	
	Nutrientes		Econômica	
	Modo de cultivo		Equipamentos	
	Uso de efluentes		Otimização	
	Parâmetros físico-químicos		Encapsulação	
Coleta de Biomassa	<i>Spray-dryer</i>	Estabilidade	Estabilizantes	
	Filtração		Complexação	
	Outros		Temperatura	
Métodos de Extração	Química/Bioquímica		Co-produção e caracterização da biomassa	pH
	Congelamento/Descongelamento			Modificação Estrutural
	Homogeneização			Atividade Antioxidante
	Ultrassom			Coloração
	Microondas			Clorofila
	Extração física			Ficoeritrina
Métodos de Purificação	Cromatografia			Co-produção e caracterização da biomassa
	Membranas	Carotenóides		
	Precipitação	Vitaminas		
	Ultrafiltração	Proteínas		
			Fenólicos e flavonóides	

	Adsorção com polímeros		
Formas de Aplicação	Alimentícia		Polissacarídeos e Biopolímeros
	Farmacêutica		
	Cosmético		
	Outras		

4.2.3. Condições de Cultivo

Nessa categoria Meso, as taxonomias Micro com maior número de artigos atribuídos foram, em ordem, Nutrientes e Parâmetros Físico-químicos, com 29%, Modo de Cultivo e Luz, com 16% e, por fim, efluentes, com 10%.

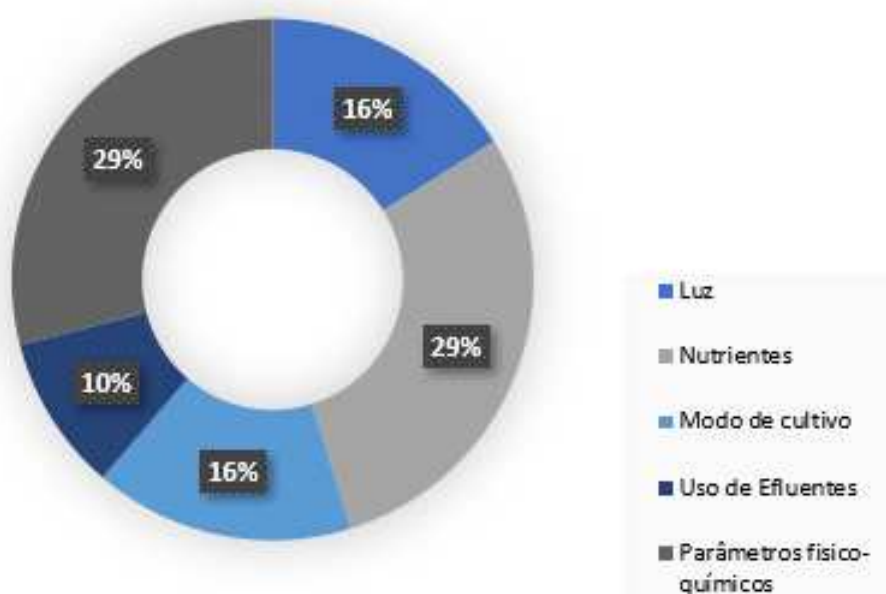


Figura 8: Gráfico com as porcentagens de artigos atribuídos a cada taxonomia Micro dentro da taxonomia meso de Condições de Cultivo.

4.2.4. Coleta de Biomassa

Para essa categoria Meso, à todas as taxonomias Micro (*Spray-dryer*, Filtração e Outros) foi atribuído apenas 1 artigo, apresentando o mesmo valor percentual no gráfico abaixo.

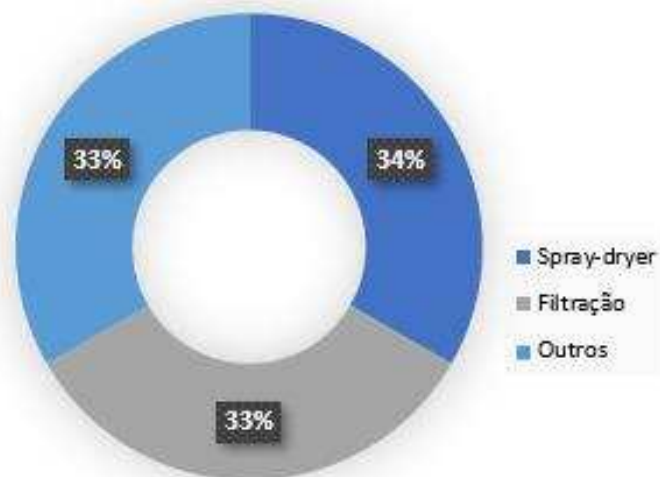


Figura 9: Gráfico com as porcentagens de artigos atribuídos a cada taxonomia Micro dentro da taxonomia meso de Coleta de Biomassa.

4.2.5. Métodos de Extração

Com relação a taxonomia meso referente aos Métodos de Extração, obteve-se as porcentagens para as taxonomias Micro de 33% para Química/Bioquímica, 20% para Extração Física, 18% para Ultrassom, 15% para Congelamento/Descongelamento, 8% para Microondas e 6% para Homogeneização.

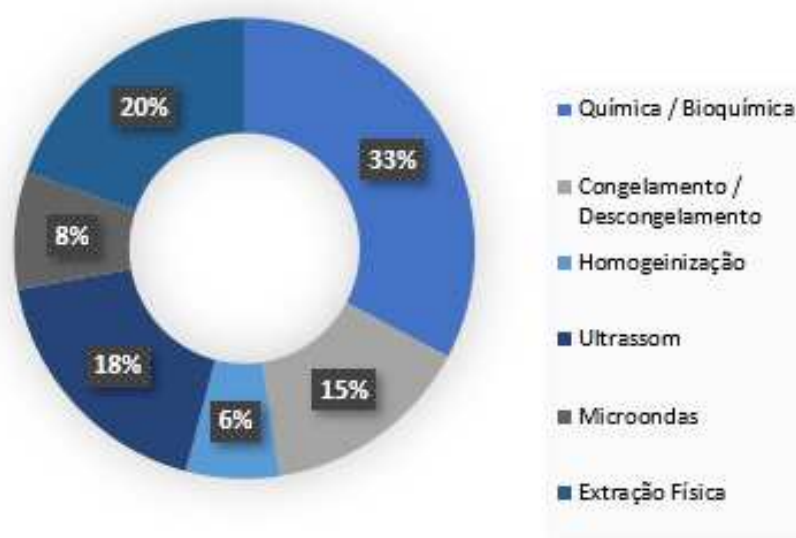


Figura 10: Gráfico com as porcentagens de artigos atribuídos a cada taxonomia Micro dentro da taxonomia meso de Métodos de Extração.

4.2.6. Métodos de Purificação

Os artigos relacionados aos Métodos de Purificação mostraram os seguintes valores percentuais referentes ao total de 13 artigos: 37% para Cromatografia, 21% para Precipitação e Polímero, 13% para Ultra-filtração e 8% para Membranas.

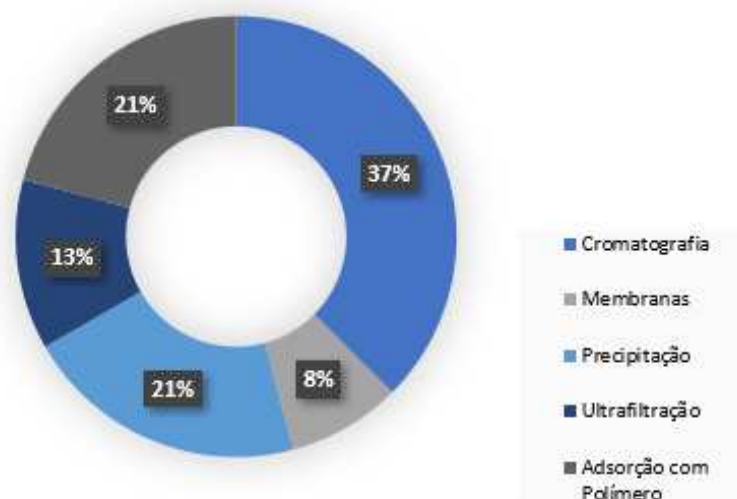


Figura 11: Gráfico com as porcentagens de artigos atribuídos a cada taxonomia Micro dentro da taxonomia meso de Métodos de Purificação.

4.2.7. Formas de Aplicação

Dentre as taxonomias Micro relacionadas às Formas de Aplicação, a com maior porcentagem de recorrência entre os artigos encontrados foi a Alimentícia, com 50%, seguida da Farmacêutica, com 25%, de Outras, com 15%, e de Cosmético, com 10%.

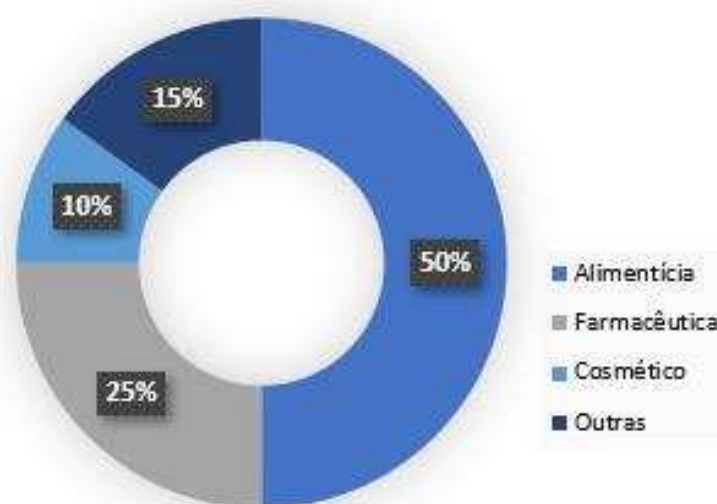


Figura 12: Gráfico com as porcentagens de artigos atribuídos a cada taxonomia Micro dentro da taxonomia meso de Formas de Aplicação.

4.2.8. Modelagem e Simulação

A presente categoria Meso apresentou as seguintes porcentagens para suas taxonomias Micro: 43% para Otimização, 39% para Cinética e 9% para Econômica e Equipamentos.

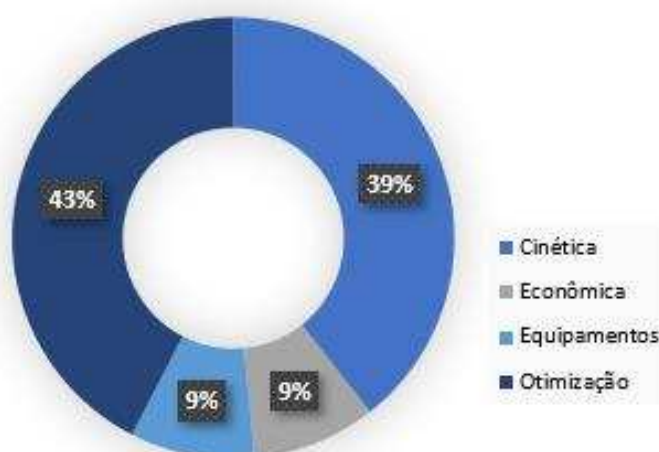


Figura 13: Gráfico com as porcentagens de artigos atribuídos a cada taxonomia Micro dentro da taxonomia meso de Modelagem e Simulação.

4.2.9. Estabilidade

A taxonomia Meso de Estabilidade, com o maior número de artigos atribuídos, apresentou a seguinte distribuição entre suas taxonomias Micro: Temperatura (27%), Atividade Antioxidante (14%), Complexação (13%), pH (11%), Estabilizantes e Encapsulação (10%), Coloração (8%) e Modificação Estrutural (7%).

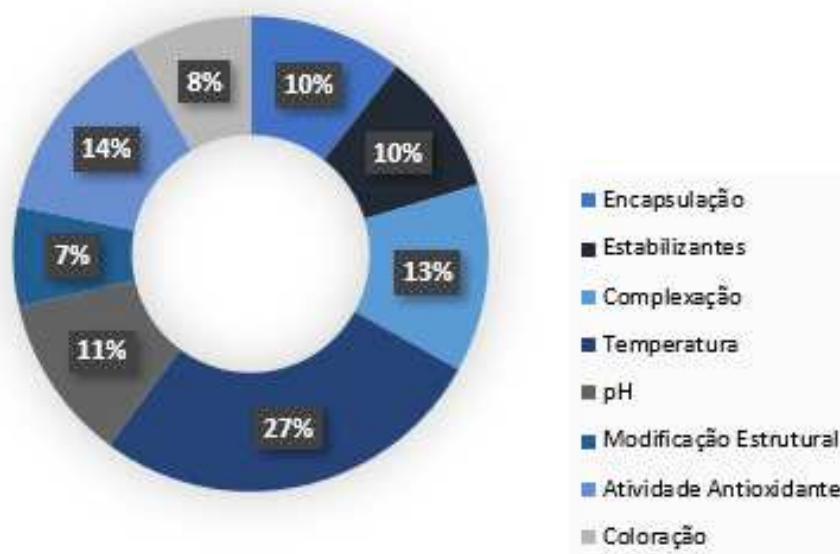


Figura 14: Gráfico com as porcentagens de artigos atribuídos a cada taxonomia Micro dentro da taxonomia meso de Estabilidade.

4.2.10. Co-produção e Caracterização da Biomassa

Para as taxonomias Micro dentro a taxonomia de Co-produção e Caracterização da Biomassa, têm-se a seguinte distribuição percentual relativa ao total de artigos: 24% desses estão relacionados a Proteínas, 22% à Aloficocianina, 17% à Clorofila e 14% a Ficoeritrina. Dentre os menos citados, 10% relacionam-se a Carotenóides, 7% a Lipídeos e 2% a Vitaminas, Fenólicos e Flavonóides, e Polissacarídeos e Biopolímeros.

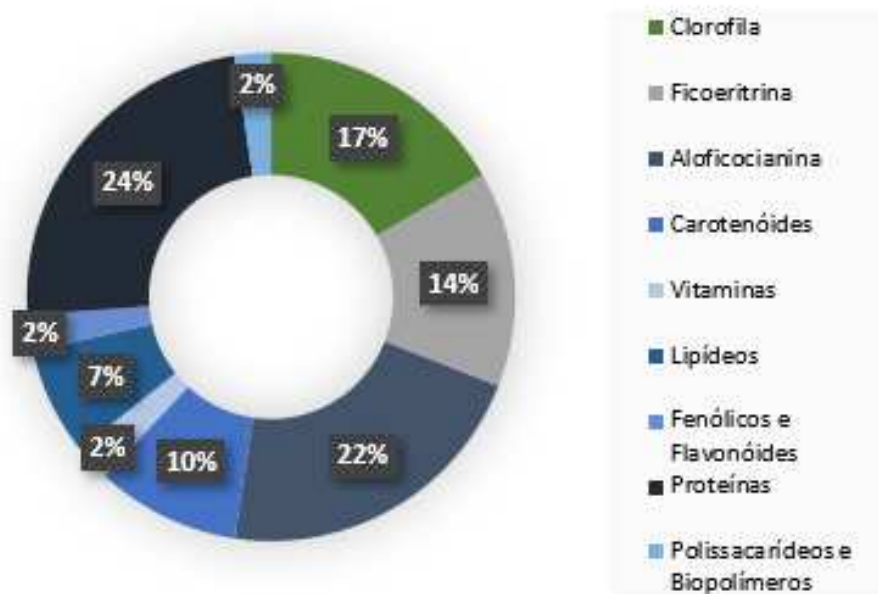


Figura 15: Gráfico com as porcentagens de artigos atribuídos a cada taxonomia Micro dentro da taxonomia meso de Co-produção e Caracterização da Biomassa.

4.3. Discussão

A necessidade de filtros com relação ao total de artigos provém, justamente, da intenção de direcionar ao máximo as buscas em torno do tema, ou temas, centrais do projeto. Nesse caso, o termo *phycocyanin* foi recorrentemente pareado com o gênero da microalga trabalhada, *Arthrospira* ou *Spirulina*, e alternadamente combinado com as palavras-chave *stability* e pH, conceitos intimamente conectados ao cerne dos objetivos desse trabalho.

Além dos conjuntos de palavras-chave, outro parâmetro importante para a busca adequada de artigos foi o período de tempo das publicações de interesse. A faixa de tempo foi limitada entre os anos de 2018 e 2023, dando preferência, assim, para pesquisas tratando das últimas inovações sobre o assunto, ao invés de buscar pesquisas de base, de igual utilidade e importância, geralmente presentes em publicações mais antigas.

Já a divisão em taxonomias levou em consideração, a princípio, três categorias de dimensão – Macro, Meso e Micro. A taxonomia Macro agrupa as informações básicas de cada trabalho, como ano de publicação, resumo, país, revista, entre outros, enquanto a Meso trata da divisão dos tópicos mais recorrentes no conjunto de artigos reunidos, como observado no **Quadro 1**. Por fim, as taxonomias Micro, que são subtópicos das categorias Meso, especificam

ainda mais o que é abordado em cada trabalho, facilitando, assim, a busca por referências como um todo.

Inicialmente, a análise dos 134 artigos distintos obtidos da pesquisa indicou que apenas 73% foram considerados como relevantes para esse trabalho. Dentre os critérios para a retirada dos artigos irrelevantes, têm-se, principalmente, trabalhos que citavam a ficobiliproteína de interesse, mas não a tinham como foco principal do estudo. Ainda, outro fator para exclusão foi a presença de estudos em torno da ficocianina extraída de outros microrganismos que não do gênero *Arthrospira* (*Spirulina*).

4.3.1. Taxonomia Macro

Do gráfico apresentado na **Figura 5**, depreende-se que os estudos em torno da C-ficocianina se mantiveram praticamente nos mesmos valores desde 2018, com exceção do período até julho de 2023, que mostrou o menor valor de publicações por ano (8 artigos). Isso se deve, principalmente, pela busca de artigos, no ano de 2023, se limitar a um período de 7 meses, ao invés de 12 meses como os demais anos.

Há, ainda, a porcentagem de publicações distribuída por país (**Figura 6**), que revela dados fundamentais para o entendimento da importância dada a esse tema pelo mundo. Como observado anteriormente, o Brasil é o maior produtor de pesquisas em torno de C-ficocianina extraída da microalga *Arthrospira*. Embora seja liderança no sentido de trabalhos acadêmicos, o Brasil possui apenas 3 solicitações de patentes, segundo Bastos *et al.* (2021). Ou seja, a interlocução entre trabalhos acadêmicos e desenvolvimento tecnológico não é plena.

4.3.2. Taxonomia Meso

A escolha das categorias dentro dessa taxonomia se deu, novamente, pela recorrência de certos temas dentro da pesquisa realizada na base *Scopus*. Resumindo os objetivos principais do presente trabalho como sendo a estabilidade de C-ficocianina avaliada por modelos estatísticos de otimização, pode-se inferir que, a princípio, a escolha acertiva de palavras-chave resultou numa amostragem específica. Destaca-se como um exemplo dessa amostragem o artigo “*Carboxylated chitosan improved the stability of phycocyanin under acidified conditions*”, de Zhuxin *et al.* (2023), que discorre sobre os efeitos da complexação de C-ficocianina com o polissacarídeo modificado, quitosana, em condições de pH ácido. Com relação às demais

categorias dentro dessa taxonomia, descreve-se abaixo os pontos relevantes que devem aparecer em um artigo para que esse seja incluído em uma das categorias Meso. As definições de cada taxonomia Micro são apresentadas nas Seções 4.3.3 à 4.3.10.

- **Condições de Cultivo:** artigos avaliando condições de cultivo de microalga do gênero *Arthrospira* (*Spirulina*), como Nutrientes, Luz e Modo de cultivo, direcionados para a produção de C-ficocianina, ou que façam a caracterização desse corante após o cultivo.
- **Coleta da Biomassa:** trabalhos avaliando a forma de coleta e processamento da biomassa cultivada, com o enfoque em alterações ou na caracterização da C-ficocianina após diferentes tipos de processamento.
- **Método de Extração:** artigos avaliando diferentes técnicas de extração da C-ficocianina, ou diferentes parâmetros de um dado método de extração e seus efeitos nas características do corante, como: pureza, rendimento, atividade, entre outros.
- **Método de Purificação:** estudos contendo comparações de métodos de purificação, ou discorrendo sobre técnicas inéditas e inovadoras, que forneçam, também, informações sobre a caracterização do corante.
- **Formas de Aplicação:** artigos que citem ou abordem uma ou mais áreas de aplicação do estudo realizado em torno de C-ficocianina, como Alimentícia, farmacêutica, entre outros.
- **Modelagem e Simulação:** trabalhos que possuam, interligados aos estudos à cerca do corante, metodologias estatísticas que envolvam modelos cinéticos ou de otimização, bem como simulação, por exemplo, econômica, dentro dos demais assuntos abordados no artigo.
- **Estabilidade:** artigos que discorram sobre técnicas para estabilização do corante durante extração, purificação ou em condições adversas de temperatura, pH, entre outros. Estão presentes, também, artigos que avaliam a estabilidade da coloração e atividade antioxidante após técnica de purificação, extração ou outro processamento qualquer.
- **Co-produção e Caracterização da Biomassa:** trabalhos que possuam análises que caracterizem, além da C-ficocianina, outros componentes da biomassa cultivada, sendo Clorofila, Carotenóides, Ficoeritrina, Aloficocianina, entre outros.

4.3.3. Condições de Cultivo

Começando a avaliação de cada taxonomia Meso, juntamente com suas respectivas taxonomias Micro, para a categoria de Condições de Cultivo, apresentada em 16% dos 98 artigos relevantes, destaca-se o seguinte trabalho: “*Outdoor pilot-scale cultivation of Spirulina sp. LEB-18 in different geographic locations for evaluating its growth and chemical composition*”, de Jesus *et al.* (2018). Esse trabalho, produzido por pesquisadores da Bahia e da região Sul do Brasil, avaliou as diferenças no crescimento e no perfil químico, incluindo quantidade de C-ficocianina, do cultivo aberto em escala piloto da mesma cepa de microalgas nessas duas regiões geográficas distintas. Resultados indicaram que o crescimento do cultivo na região Nordeste apresentou taxas maiores, devido a maior temperatura média e incidência solar comparadas às condições climáticas da região Sul. Ademais, ambos os cultivos demonstraram alta estabilidade térmica, o que, por sua vez, poderia resultar em amostras de C-ficocianina mais resistentes às condições adversas de temperatura (YOSHIDA *et al.*, 2021).

A taxonomia Micro referente à Luz classificou 5 artigos que avaliaram o efeito de diferentes condições luminosas, como incidência, comprimentos de onda e fotoperíodo, em cultivos de *Arthrospira sp.*, como é o caso do artigo “*Spirulina cultivated under different light emitting diodes: Enhanced cell growth and phycocyanin production*”. Nesse trabalho, novamente produzido por pesquisadoras(es) brasileiras(os), Prates *et al.* (2018) relata os efeitos de diferentes cores de LED, com diferentes fotoperíodos, no crescimento celular de *Spirulina sp.*, bem como no acúmulo de C-ficocianina. Os dados revelaram que a incidência de LED verde por seis horas adicionais ao período claro, ou seja, 12 horas com luz branca, 6 horas com LED verde e 6 horas de período escuro, forneceu a maior concentração de C-ficocianina dentre as condições testadas, ao mesmo tempo que aumentou a produtividade da biomassa.

A categoria de Nutrientes que, juntamente com os Parâmetros Físico-químicos, classificou 29% dos artigos dessa taxonomia Meso, buscou agregar trabalhos que avaliaram alternativas aos nutrientes convencionais usados no cultivo da microalga e sua relação com a produção do corante de interesse. Coloca-se em destaque o título “*Mathematical Model of a Bubble Column for the Increased Growth of Arthrospira platensis and the Formation of Phycocyanin*”, escrito por García e Mejía (2021), da Colômbia. O estudo alcançou a condição ótima da concentração de CO₂ no cultivo de *A. platensis* (0,8% v/v), através do modelo gerado cujos parâmetros foram, entre outros, a quantidade de bicarbonato e pH do meio de cultivo,

para analisar a formação de C-ficocianina. Os resultados podem ser de interesse para estudos futuros que avaliem a conversão das fontes de carbono para cultivos dessa microalga com foco na produção do corante azul.

A taxonomia Micro de Modo de Cultivo, representada por 16% dos artigos sobre Condições de Cultivo, agregou os efeitos de diferentes modos de cultivo da cianobactéria em questão, como cultivo contínuo, de batelada alimentada, ou de longa duração. O artigo “*Long-Term Cultivation of a Native Arthrospira platensis (Spirulina) Strain in Pozo Izquierdo (Gran Canaria, Spain): Technical Evidence for a Viable Production of Food-Grade Biomass*”, de Guidi *et al.* (2021), apresenta o cultivo de *S. platensis* em escala industrial por 26 dias adicionado meio de cultura reutilizado. Esse modelo, que forneceu uma biomassa com conteúdo de proteínas (acima de 60%) e C-ficocianina (7,2%) comparativos à biomassas comerciais, mostrou-se como potencial exemplo de culturas em regiões áridas e semi-áridas capazes de fornecer bioprodutos de alto valor.

O Uso de Efluentes, categoria com menor porcentagem de artigos relacionados (10%), avalia importantes alternativas do cultivo de microalgas usando como nutrientes diferentes rejeitos e efluentes industriais. Nessa taxonomia, destaca-se o artigo “*Assessment of transient effects of alternative nitrogen sources in continuous cultures of Arthrospira sp. using proteomic, modeling and biochemical tools*”, de Sachdeva *et al.* (2018), cujo foco foi analisar o comportamento do cultivo de *Arthrospira sp.* com batelada alimentada alternando entre sais nitrato e sais de amônio como fontes de nitrogênio. Nesse sentido, o estudo demonstrou que é possível obter um aumento de 20% a 30% do rendimento de proteínas e pigmentos quando comparado ao cultivo natural dessa espécie, abrindo possibilidades para estudos inovadores de tratamento de efluentes com altas concentrações de sais de amônio.

Por fim, a categoria de Parâmetros Físico-químicos, que agregou o maior número de artigos dentro dessa taxonomia Meso (9 artigos), classificou artigos que avaliassem condições de temperatura e pH, por exemplo, no cultivo de *Arthrospira sp.* No artigo “*Commercial Potential of the Cyanobacterium Arthrospira maxima: Physiological and Biochemical Traits and the Purification of Phycocyanin*”, Park *et al.* (2022) destaca o potencial comercial de *Arthrospira maxima* em função da otimização das condições de temperatura (25 °C) e pH (7-8), bem como dos produtos de valor agregado possíveis de serem obtidos. O trabalho citado

recebe destaque por ser um dos poucos artigos que investigou o cultivo da espécie *A. maxima*, da qual é extraído o corante utilizado no presente estudo de estabilidade.

4.3.4. Coleta da Biomassa

A taxonomia Meso sobre Coleta da Biomassa foi a de menor recorrência dentre os artigos relevantes, com apenas 2 artigos classificados na mesma. Entende-se que isso se deve à pouca relação desse tópico com o foco deste trabalho, a saber, estratégias para garantir a estabilidade de C-ficocianina em bebida ácida. Isso fica claro ao analisar os dois artigos classificados nessa categoria, sendo eles: “*Effect of Electrofiltration on the Dewatering Kinetics of Arthrospira platensis and Biocompound Recovery*”, de Aoude *et al.* (2022), e “*Effects of processing on stability of water- and fat-soluble vitamins, pigments (C-phycoyanin, carotenoids, chlorophylls) and colour characteristics of Spirulina platensis*”, de Nouri, Abbasi e Rahimi (2018).

O primeiro estudo avalia uma tecnologia inovadora de coleta de biomassa através da filtração assistida por corrente elétrica (vide taxonomia Micro de Filtração), que forneceu resultados menos custosos com relação à filtração e secagem da biomassa de *A. platensis*, porém relatou a degradação de muitos de seus biocompostos, como a C-ficocianina. O segundo artigo avaliou os efeitos na cor e produção de biocompostos de *S. platensis*, partindo de diferentes formas de coleta e processamento da biomassa, como a técnica de *spray-drying* (taxonomia Micro *Spray-dryer*) e vários outros exemplos (coleta assistida por microondas, vácuo, etc; vide taxonomia Micro Outros). Seus resultados tem foco em diferentes componentes, relatando pouco sobre a C-ficocianina, mas depreende-se do artigo que a técnica de *spray-dryer* é uma boa opção para o tratamento da biomassa sem gerar perdas de seus biocompostos. No geral, os artigos ainda apresentam relevância para a prospecção proposta, visto que as técnicas abordadas são inovadoras e estão, no geral, no mesmo nível de maturidade tecnológica inicial da grande maioria dos artigos obtidos.

4.3.5. Método de Extração

Comentando sobre uma das categorias de maior impacto na busca de artigos, com 26 artigos no total, os métodos de extração de C-ficocianina, isolados ou assistidos entre si, oferecem uma gama de possibilidades e de vantagens. O artigo “*Extraction, purification*

and stability of C-phycoyanin from Arthrospira platensis”, de Fabre *et al.* (2022), resume com qualidade as diferentes técnicas existentes para a extração de C-ficocianina, desde as mais comuns e recorrentemente utilizadas, até as mais recentes e inovadoras.

Os métodos Químicos e Bioquímicos de extração compõem a maior parte dos artigos agrupados nessa categoria Meso, com 33% de recorrência. Isso se deve ao fato de que esse é um método barato e acessível, do ponto de vista técnico e material, como exemplifica o artigo “*Efficient extraction of phycobiliproteins from dry biomass of Spirulina platensis using sodium chloride as extraction enhancer*”, de Wang *et al.* (2023). O uso de sais e reagentes presentes na grande maioria dos laboratórios de pesquisa na área, como o cloreto de sódio usado no artigo citado, favorece a aplicação de técnicas do tipo. Além disso, essa técnica, como será visto ao longo dessa seção, é utilizada em consonância com grande parte dos outros métodos citados, mais uma vez justificando o número de artigos sobre o método (FABRE *et al.*, 2022).

Mesmo sendo uma das técnicas mais simples e comuns para a extração de C-ficocianina, existem estudos pioneiros sobre o tema, especificamente o uso de líquidos iônicos próticos, como relata o artigo de Rodrigues *et al.* (2019), de nome “*Evaluation of protic ionic liquids as potential solvents for the heating extraction of phycobiliproteins from Spirulina (Arthrospira) platensis*”. Nesse viés, o grupo argumenta sobre a aplicação desses solventes orgânicos de alto valor tecnológico e comercial como potencial técnica passível de escalonamento na extração de C-ficocianina.

Outro método de reconhecido valor e eficiência é o Congelamento/Descongelamento, que classifica 15% dos artigos dessa taxonomia Meso. Como mostra o artigo de Berrouane *et al.* (2022), “*Freeze-thaw-, enzyme-, ultrasound- and pulsed electric field-assisted extractions of C-phycoyanin from Spirulina platensis dry biomass*”, a técnica citada é, geralmente, a que proporciona melhor rendimento e pureza do corante, apesar de não ser a mais eficiente, em termos de custo e tempo. Esse artigo exemplifica, também, a extração bioquímica utilizando enzimas, uma técnica não tão comum por estar atribuída à degradação do corante e de suas propriedades nutracêuticas.

As técnicas de Homogeneização foram as de menor recorrência entre os artigos relevantes (6%). Essa é uma técnica que, como explicita a revisão feita por Jaeschke *et al.* (2021) em “*Phycocyanin from Spirulina: A review of extraction methods and stability*”, não apresenta os melhores resultados de rendimento ou eficiência. Não obstante, visto que a maior

parte das tecnologias abordadas nessa e em outras seções das taxonomias Meso estão em estágio inicial de desenvolvimento, é possível que em maior escala essa seja uma alternativa viável para a extração do pigmento.

O método de extração via Ultrassom, isolado ou assistido de outras técnicas, apresenta-se como o terceiro de maior recorrência nessa categoria (18%). O trabalho “*Comparative Study of the Efficiency of Additives in the Extraction of Phycocyanin-C from Arthrospira maxima Using Ultrasonication*”, de Martínez-Vega, Villafaña-Estarrón e Escalante (2022), descreve precisamente como esse método de ruptura celular pode ser economicamente viável, independente da escala de extração na qual se aplica tal técnica.

Mesmo sendo o segundo método menos citado entre os artigos relevantes, com 8%, técnicas assistidas por microondas ainda estão presentes entre as pesquisas dessa categoria Meso, como mostra o artigo de Rodrigues *et al.* (2020), “*Application of protic ionic liquids in the microwave-assisted extraction of phycobiliproteins from Arthrospira platensis with antioxidant activity*”. O trabalho estuda o uso da mesma tecnologia inovadora citada anteriormente, líquidos iônicos próticos, para extração de C-ficocianina assistida por microondas, revelando as limitações em torno da última técnica. Sendo a tecnologia de microondas uma de custo razoavelmente alto e, ainda, apresentando barreiras inerentes com relação ao seu escalonamento, essa é uma técnica que, não sendo acoplada às demais, perde espaço dentro dessa categoria (JAESCHKE *et al.*, 2021).

Compondo o segundo maior número de artigos classificados entre os Métodos de Extração (20%), as técnicas de Extração Física de C-ficocianina englobam o uso de altas pressões para ruptura celular, bem como o uso de correntes elétricas auxiliando filtrações. Segundo Li *et al.* (2020), no trabalho “*Extraction of phycocyanin—A natural blue colorant from dried spirulina biomass: Influence of processing parameters and extraction techniques*”, esse é mais um exemplo de técnicas que, quando estudadas isoladas, não geram os melhores resultados de rendimento e pureza do pigmento. Entretanto, sua recorrência entre os artigos dessa categoria deve-se, como o caso das extrações químicas e bioquímicas, pelo número de estudos da consonância dessa com as demais técnicas citadas acima (FABRE *et al.*, 2022).

4.3.6. Método de Purificação

As técnicas de purificação são, geralmente, avaliadas quando deseja-se utilizar o corante em ensaios farmacêuticos ou em estudos de modelagem, cuja alta pureza é essencial para a obtenção de resultados confiáveis. Nesse sentido, e, juntamente pelo fato de comporem o conjunto de técnicas mais caras relacionadas ao tema estudado, essas apresentam-se apenas em 13% dos artigos relevantes. Não obstante, há uma crescente busca por métodos de extração mais baratos que forneçam um corante com grau de pureza suficientemente alto, como 0,7 para a indústria alimentícia, para, assim, retirar a necessidade de uma etapa adicional e cara, para um processo, por exemplo, de escala industrial (THEVARAJAH *et al.*, 2022).

O principal resultado dentre essa categoria Meso foi a taxonomia de Cromatografia, com 37% dos artigos classificados. Essa predominância com relação à técnica é percebida ao analisar o trabalho de Amarante *et al.* (2020a), de nome “*Design strategies for C-phycoerythrin purification: Process influence on purity grade*”. Nele, diferentes combinações de técnicas de purificação são realizadas, todas envolvendo a cromatografia de troca iônica. Os resultados revelam valores de pureza de C-ficocianina altíssimos, ao mesmo tempo que mantém sua atividade antioxidante, característica que muitas vezes é a almejada nos ensaios de purificação. O estudo de Thevarajah *et al.* (2022) argumenta que apesar da cromatografia ser uma técnica bem amadurecida do ponto de vista tecnológico e de se apresentar como o estado da arte com relação a métodos de purificação, sua aplicação na purificação do corante em questão ainda se limita às aplicações, geralmente, farmacêuticas, que justificam o custo envolvido na técnica pelo produto final de maior pureza e valor agregado.

A técnica com o menor número de artigos classificados (8%) foi a de Membranas, que segue uma lógica de aplicação e estudo similar à discutida na Seção sobre os Métodos de Extração de Microondas, por exemplo. O artigo “*Optimization of Extraction Method and Characterization of Phycocyanin Pigment from Spirulina platensis*”, de Julianti *et al.* (2019), retrata bem essa realidade, apresentando resultados de três técnicas acopladas, entre as quais a de diálise, fornecendo um pigmento de pureza menor que o trabalho citado acima, que utiliza duas técnicas apenas. Contudo, a depender do grau de pureza desejado, essa técnica se apresenta como uma alternativa barata e funcional (PARK *et al.*, 2022).

Pode-se considerar que a Precipitação, que apresentou o segundo maior número de artigos relacionados (21%), é a técnica de purificação análoga ao método de extração químico

citado na seção anterior. Nesse sentido e, utilizando como exemplo o trabalho de Fernandes *et al.* (2023), “*Exploring the Benefits of Phycocyanin: From Spirulina Cultivation to Its Widespread Applications*”, a técnica utiliza do conceito fundamental de purificação de proteínas, o efeito *salting-out*, que causa, ao aumentar a força iônica do meio, um maior número de interações proteína-proteína, formando agregados que precipitam (JESPERSEN *et al.*, 2004). Sendo assim, essa é uma das técnicas mais baratas disponíveis e, apesar da sua eficiência relativamente menor quando comparada a outros métodos, a utilização de sulfato de amônio 50%, por exemplo, já foi relatada como suficiente para obter um grau de pureza de C-ficocianina [A_{620}/A_{280}] acima de 0,7 (DAMASCIANO, 2022).

A técnica de Ultrafiltração, que envolve o uso de membranas com poros de tamanhos específicos para reter certas proteínas, classificou 13% dos artigos presentes nessa taxonomia Meso. Usando, novamente, como exemplo o trabalho de Amarante *et al.* (2020), percebe-se que essa técnica, similarmente ao método utilizando membranas, aparece na literatura, geralmente, acoplado às demais técnicas. Não obstante, quando acoplada às técnicas de extração, como a eletrofiltração, esse método foi considerado com grande potencial para aplicação em larga escala (THEVARAJAH *et al.*, 2022).

Por fim, o método de Adsorção com Polímeros classificou, assim como a técnica de Precipitação, 21% dos artigos presentes nessa taxonomia Meso. A relevância dessa técnica na categoria de purificação se dá de forma similar à técnica de Precipitação, apesar da adsorção em polímeros ser mais recente e possuir tecnologias menos amadurecidas, como mostra o trabalho de Fekrat *et al.* (2019): “*Optimization of chitosan/activated charcoal-based purification of Arthrospira platensis phycocyanin using response surface methodology*”. Apesar disso, à medida que crescem, também, os estudos em torno dos polímeros, biopolímeros e materiais similares em outras áreas da ciência, o espaço ocupado por essa técnica na purificação de C-ficocianina apresenta tendência de crescimento (SUN *et al.*, 2023).

4.3.7. Formas de Aplicação

No escopo desse trabalho, estudos presentes nessa categoria Meso mostraram-se raros, com 18% do total de artigos relevantes, devido a grande parte desses possuir uma natureza exploratória, sem a necessidade de uma aplicação direta. Ainda assim, trabalhos incluídos nessa

categoria são de extrema importância social e econômica, e têm crescido vigorosamente, como mostram Fernandes *et al.* (2023) e Sun *et al.* (2023).

Assim como metade dos artigos apresentados nessa categoria Meso (50%), esse Projeto de Conclusão de Curso inclui-se na categoria de Formas de Aplicação e possui enfoque na área de ciência de alimentos. Dois exemplos de artigos sobre a aplicação de C-ficocianina em matrizes alimentícias são “*Colour stability and antioxidant activity of C-phycoerythrin-added ice creams after in vitro digestion*”, de Amarante *et al.* (2020b), e “*The application of a phycoerythrin extract obtained from *Arthrospira platensis* as a blue natural colorant in beverages*”, de García, Longo e Bermejo (2021). Enquanto o primeiro artigo estudou a estabilidade da cor e da atividade antioxidante após aplicação em sorvete, o segundo avaliou a capacidade do corante em reproduzir cores semelhantes aos tons de azul em bebidas comerciais já disponíveis no mercado.

A segunda maior área de aplicação foi a Farmacêutica, com 25% dos artigos classificados. O reconhecimento da aplicação de C-ficocianina nessa área provém diretamente da exploração do potencial nutracêutico da ficobiliproteína, como mostra o trabalho de Munawaroh *et al.* (2020): “*In-vitro molecular docking analysis of microalgae extracted phycoerythrin as an anti-diabetic candidate*”. O estudo mostrou, através de simulações de docagem molecular (BERRY; FIELDING; GAMIELDIEN, 2015), que a C-ficocianina tem potencial para fornecer um terapêutico anti-diabético com menos efeitos colaterais. Existem ainda, muitos trabalhos direcionando o pigmento para tratamentos contra câncer (MAHENDRAN *et al.*, 2022; LI; GILLILAN; ABBASPOURRAD, 2021; SOROR *et al.*, 2022) e outros que estudam sua atividade antioxidante, direcionada, majoritariamente, para a área de cosméticos.

Com relação as aplicações na área de Cosméticos, essa taxonomia Micro apresentou-se em 10% dos artigos, a menor fração dentre as demais categorias presentes nessa taxonomia Meso. Além do trabalho de revisão de Fernandes *et al.* (2023) citado anteriormente, o único artigo abordando essa grande área foi “*Application of phycoerythrin from *Arthrospira (Spirulina) platensis* as a hair dye*”, de Krasesintra *et al.* (2022). Nesse trabalho, foi explorada a aplicação do corante como tinta capilar e sua resistência após um certo número de lavagens. Entretanto, apesar de ser a única menção de aplicação direta na área, seu estudo é intensivo e presente em diversos produtos cosméticos, como explicita o trabalho de Kuddus *et al.* (2013).

A última categoria abordada nas Formas de Aplicação foi a categoria denominada como “Outras”, que classificou 15% dos artigos dessa taxonomia Meso. Essa taxonomia Micro englobou a aplicação de C-ficocianina na indústria têxtil, com o trabalho “*Wastewater effluents analysis from sustainable algae-based blue dyeing with phycocyanin*”, de Moldovan *et al.* (2022), na área de química ambiental, com o artigo “*Immobilization of Phycocyanin in a Rice Hull Nanosilica/Calcium-Alginate Bead System for Cadmium Ion Remediation*”, de Sinad *et al.* (2021), e, enfim, na área de química analítica, especificamente para a análise de fluorescência, com o estudo de Zheng *et al.* (2019), “*Phycocyanin fluorescent probe from *Arthrospira platensis*: preparation and application in LED-CCD fluorescence density strip qualitative detection system*”. Apesar de não se apresentarem em grande número, provavelmente devido à limitação de tempo elegida, esses trabalhos mostram a gama de aplicabilidade desse pigmento, bem como o quão recente são as tecnologias com sua aplicação direta.

4.3.8. Modelagem e Simulação

Ferramentas estatísticas estão, atualmente, presentes em grande parte das pesquisas nas grandes áreas de Ciências da Natureza e Ciências Exatas (MONTGOMERY, 2012). De forma similar, a categoria de Modelagem e Simulação classificou o segundo maior número de artigos na prospecção realizada, com 33% do total. Ainda segundo Montgomery (2012), as taxonomias Micro apresentadas a seguir poderiam ser classificadas como diferentes áreas de estudo (Físico-química, Economia, Engenharia e Estatística) e, por isso, formam um amplo e diverso conjunto de artigos analisados e representativos da diversidade presente nesse campo de estudo.

Modelos cinéticos apresentaram-se em grande número dentro dessa taxonomia Meso, com 39% dos artigos. Trabalhos como o de Böcker *et al.* (2019), de nome “*Biphasic short time heat degradation of the blue microalgae protein phycocyanin from *Arthrospira platensis**”, representam bem o impacto dos estudos cinéticos no campo da estabilidade de C-ficocianina. Como a instabilidade dessa macromolécula está diretamente ligada à processos químicos, bioquímicos e físico-químicos (JESPERSEN *et al.*, 2004), é essencial que existam trabalhos capazes de caracterizar e elucidar as características intrínsecas desses processos no corante estudado.

Classificando apenas 9% dos artigos nessa taxonomia Meso, as modelagens e simulações econômicas aparecem em 3 artigos que fazem uma revisão sobre modelos de

cultivo, técnicas de extração e purificação, bem como as vantagens da C-ficocianina. Mesmo em número reduzido, os artigos que agrupam as principais características, tendências e inovações de um dado objeto de estudo são de grande valor, como exemplifica o trabalho de Thevarajah *et al.* (2022). Com o título “*Large-scale production of Spirulina-based proteins and c-phycoerythrin: A biorefinery approach*”, o estudo aborda, estruturado pelo conceito de biorrefinarias (JUNIOR; EMBRAPA, 2011), a viabilidade econômica da produção de C-ficocianina e outros produtos secundários, como biopolímeros, biofertilizantes e biodiesel, em larga escala.

Representando, também, 9% dos artigos sobre Modelagem e Simulação, a taxonomia Micro sobre Equipamentos explana, uma vez mais, a gama de aplicações possíveis para o corante estudado. Moreira *et al.* (2018), com o trabalho “*Development of pH indicator from PLA/PEO ultrafine fibers containing pigment of microalgae origin*”, ilustram essa realidade através do desenvolvimento de embalagens inteligentes com indicadores de pH, usando fibras ultrafinas contendo o pigmento. Apesar da maturação inicial presente nessa abordagem, evidencia-se o potencial comercial dessas tecnologias que, em breve, comporão o estado da arte dos estudos em torno desse pigmento.

Compondo a maior parte dos artigos dessa taxonomia Meso, com 43%, a categoria de Otimização mostra a relevância dos métodos estatísticos para os estudos nessa área. Seja utilizando superfícies de resposta, como o trabalho já citado de Martínez-Vega, Villafaña-Estarrón e Escalante (2022), seja buscando as condições ótimas de um dado processo, como o artigo de Pan-utai, Kahapana e Iamtham (2018), “*Extraction of C-phycoerythrin from Arthrospira (Spirulina) and its thermal stability with citric acid*”, ou, enfim, utilizando metodologias de planejamentos experimentais factoriais, como o caso do trabalho “*Optimization of phycoerythrin extraction from Spirulina platensis using different techniques*”, de İltar *et al.* (2018), essa categoria apresenta inúmeras opções estatísticas interessantes para qualquer tipo de estudo quantitativo.

4.3.9. Estabilidade

Os principais resultados nessa etapa metodológica foram no tópico de Estabilidade, com 59% dos artigos classificados. Grande parte das técnicas estudadas envolvem, principalmente, a complexação do corante com polímeros e macromoléculas (Buecker *et al.*, 2022; Li; Zhang;

Abbaspourrad, 2022; Lee *et al.*, 2022), a adição de compostos capazes de proteger essa molécula (Faieta *et al.*, 2020; Huo *et al.*, 2022) e, enfim, a encapsulação da mesma usando diferentes materiais como base (Guarienti *et al.*, 2021; İlter *et al.*, 2021; Purnamayati *et al.*, 2018). Essencialmente, essa taxonomia Meso agrupou técnicas capazes de diminuir a degradação das propriedades da C-ficocianina (Encapsulação, Estabilizantes e Complexação), bem como estudos abordando especificamente a estabilidade de seu potencial antioxidante (Atividade Antioxidante), ou, em outras ocasiões, da sua viva coloração (Coloração). Por fim, estão presentes, também, nessa categoria as taxonomias Micro envolvendo o estudo estabilidade desse pigmento em torno de condições adversas, sendo elas Temperatura, pH e Modificação Estrutural.

Das taxonomias Micro relacionadas à estratégias visando melhorar a estabilidade do corante, a Encapsulação aparece em segundo lugar, com 10% dos artigos relacionados na categoria Estabilidade. O trabalho “*Microencapsulation of phycocyanin by spray-drying method: Effect of process parameters and wall materials*”, de İlter *et al.* (2022), faz uma revisão geral sobre a técnica de microencapsulação de C-ficocianina por *spray-drying*, com os melhores parâmetros e materiais para tal. Sendo um assunto predominante na área de ciência de materiais, a encapsulação apresenta tamanho potencial, também, devido à possibilidade de aplicação em diferentes áreas abordadas na seção “Formas de Aplicação”, como explicitam os trabalhos de Soror *et al.* (2022) e de Dewi, Kurniasih e Purnamayati (2018).

Também com 10% dos artigos classificados, e apenas um artigo a menos que a taxonomia Micro anterior, o uso de estabilizantes é recorrente dentre os estudo de Estabilidade de C-ficocianina. Estudos como os de Huo *et al.* (2022), “*Improving the Thermal and Oxidative Stability of Food-Grade Phycocyanin from Arthrospira platensis by Addition of Saccharides and Sugar Alcohols*”, e Faieta *et al.* (2020), “*Role of saccharides on thermal stability of phycocyanin in aqueous solutions*”, retratam algumas das classes de moléculas com potencial efeito estabilizante da atividade antioxidante do pigmento em questão sob temperaturas elevadas. É evidente, portanto, que os estudos dessas técnicas estão atrelados geralmente a, pelo menos, uma condição adversa para o corante e, também, a uma propriedade de interesse do mesmo (JAESCHKE *et al.*, 2021), reiterando a importância dos estudos de estabilidade nesse campo.

As estratégias de Complexação representaram 13% dos artigos totais dentre a categoria de Estabilidade. Os trabalhos de Buecker *et al.* (2022) e Zhang, Li e Abbaspourrad (2020), respectivamente, “*High Molecular Weight λ -Carrageenan Improves the Color Stability of Phycocyanin by Associative Interactions*” e “*Improvement of the colloidal stability of phycocyanin in acidified conditions using whey protein-phycocyanin interactions*”, explicitam o potencial relacionado a estratégias dessa natureza, principalmente pelos agentes complexantes se tratarem, geralmente, de macromoléculas encontradas e extraídas de fontes naturais. Como mostra Jaeschke *et al.* (2021), a complexação como estratégia de melhoria da estabilidade apresenta, também, grande potencial de aplicação nas áreas farmacêutica e alimentícia, visto que os complexantes, por vezes, são permitidos para o consumo segundo as regulações vigentes (ANVISA, 2010).

Estudos sobre os efeitos da Temperatura na estabilidade do corante formaram o maior número de artigos classificados na categoria de Estabilidade, com 27% do total. Os estudos presentes nessa categoria variam desde trabalhos que avaliam como se dá a degradação físico-química da C-ficocianina em altas temperaturas, como é o caso do artigo “*Physicochemical degradation of phycocyanin and means to improve its stability: A short review*”, de Adjali *et al.* (2022), a trabalhos que investigam a estabilidade do pigmento após alguma das etapas de seu processamento, como o estudo de Lee *et al.* (2022), “*Increased thermal stability of phycocyanin extracted from *Spirulina platensis* by cysteine addition during enzyme extraction*”, bem como artigos que avaliam a temperatura como um dos parâmetro do processamento estudado, como o trabalho de Ferreira-Santos *et al.* (2020), “*Influence of thermal and electrical effects of ohmic heating on C-phycocyanin properties and biocompounds recovery from *Spirulina platensis**”. Percebe-se, portanto, que além de permear diferentes categorias do campo de estudo sobre a C-ficocianina, a temperatura possui maior enfoque, dentre as demais categorias, do estudo de estratégias ligadas à estabilidade do corante.

Alterações no pH, apesar de serem, também, um dos principais fatores de degradação do corante, não têm tanto enfoque dentre essa taxonomia Meso (11%), mais ainda quando pensando em estratégias capazes de lidar com esse problema. Destacam-se nessa categoria, a qual está intimamente ligada com os objetivos do presente projeto de conclusão de curso, três artigos em especial: “*Improved pH stability, heat stability, and functionality of phycocyanin after PEGylation*”, de Li, Zhang e Abbaspourrad (2022), “*Improvement stability of phycocyanin*

from Spirulina platensis encapsulated by water soluble chitosan nanoparticles”, de Gustiningtyas *et al.* (2020), e “*Phycocyanin-rich water-in-oil-in-water (W1/O/W2) double emulsion with nanosized particles: Improved color stability against light exposure*”, de Li e Abbaspourrad (2022). Todos esses artigos apresentam estratégias para incrementar a estabilidade da C-ficocianina, com foco, respectivamente, na reação de complexação com PEG (polietilenoglicol), no processo de encapsulação com partículas de quitosana solubilizadas em água, e, enfim, na técnica inovadora de emulsão dupla com partículas nanométricas do sistema, enriquecido de C-ficocianina, água-óleo-água. Percebe-se, desses exemplos, que, diferentemente dos estudos em torno da temperatura, não há, no período de tempo selecionado, outros assuntos abordados sobre pH que não o desenvolvimento de estratégias estabilizantes.

É interessante ressaltar, entretanto, que em nenhum momento a reação de hidrólise enzimática aparece nessa categoria, muito provavelmente porque sua ação proteolítica pode reduzir a atividade antioxidante desse corante. Ademais, as únicas menções sobre uso de enzimas relacionado ao corante dentre os 98 artigos foram em dois métodos de extração, descritos nos trabalhos de Berrouane *et al.* (2022) e Lee *et al.* (2022). Dessa forma, evidencia-se a janela de oportunidade em torno da técnica descrita no Capítulo 2 desse trabalho, que estuda o uso de enzimas para melhorar a estabilidade de C-ficocianina em pH ácido.

A taxonomia Micro de menor recorrência dentro da categoria de Estabilidade (7%) foi a de Modificação Estrutural. Um destaque dentre os estudos obtidos nessa categoria foi o trabalho de Selig *et al.* (2018), “*Protection of blue color in a spirulina derived phycocyanin extract from proteolytic and thermal degradation via complexation with beetpectin*”, que avaliou a proteção do corante de mudanças estruturais, nesse caso degradação proteolítica, através da complexação com pectina extraída de beterraba. Grande parte das pesquisas que surgiram nessa categoria indetificam-se como similares ao trabalho citado acima, ou são ligadas à revisões de técnicas e estabilidade do corante no geral (VÁZQUEZ-RODRÍGUEZ; ESCALANTE, 2022; CHENTIR *et al.*, 2019; MINIC *et al.*, 2018). Sendo assim, como as causas de modificações estruturais são menos recorrentes nos problemas atacados pelos estudos de estabilidade do pigmento do que, por exemplo, as de temperatura e pH, essa é uma categoria com menos espaço no escopo desse trabalho.

A análise da Atividade Antioxidante aparece em segundo lugar em números de artigos relacionados nessa taxonomia Meso, com 14% do total. Como exemplificam os artigos de

Mahendran *et al.* (2022) e Hadiyanto *et al.* (2019), respectivamente, “*Isolation and purification of phycocyanin pigments from Spirulina sp. biomass and evaluation of its anticancer and antioxidant potential*” e “*Utilization of carrageenan and chitosan as coating material in phycocyanin encapsulation*”, os estudos da atividade antioxidante se apresentam, geralmente, relacionados a aplicações diretas do corante devido as suas propriedades nutraceuticas, ou ligados a diferentes processamentos com fins variados, mas que desejam manter presente a capacidade antioxidante do pigmento. Considerando, ainda, a argumentação em volta do papel das moléculas antioxidantes na saúde humana feita por Coultate (2009), justifica-se os esforços em torno da disponibilização de novos produtos com tais propriedades em mercados mais amplos e acessíveis.

A segunda taxonomia menos recorrente, com 8% dos artigos, foi a Coloração. Apesar de ser o principal chamariz da C-ficocianina, como explicita Stanic-vucinic (2018), a rara cor azul percebida através dessa molécula apresenta-se como interesse secundário na prospecção realizada. Trabalhos como os de Faieta *et al.* (2020) e García, Longo e Bermejo (2021), já citados anteriormente, são exemplos de como a coloração é avaliada como parâmetro, geralmente, ligado a aplicação direta do corante, já que existem outros parâmetros, que não sua cor, com análises de maior interesse. A pouca recorrência desse tópico, uma vez diretamente ligado à aplicação direta de C-ficocianina, revela, também, que a grande parte das tecnologias desenvolvidas nesse campo estão em processo inicial de maturação.

4.3.10. Co-produção e Caracterização da Biomassa

A última taxonomia Meso analisada nesse modelo de revisão é uma que, devido ao escopo do trabalho, não recebe muito enfoque (18%). Sua presença se dá, majoritariamente, em conjunção com análises de condições de cultivo das microalgas, como explana o trabalho já mencionado de Thevarajah *et al.* (2022), cujos objetivos tangenciam a determinação dos biocompostos, visando caracterizar o valor do produto e do processo estudado. Ainda assim, trabalhos envolvendo caracterização de proteínas e demais pigmentos, por exemplo, são fundamentais quando se deseja a formulação de metodologias de purificação inovadoras. Ademais, o conhecimento em torno dos compostos secundários, no viés do presente trabalho, é fundamental ao tentar emplacar o conceito de biorrefinaria, a qual apresenta potencial de

permitir o escalonamento de processos de produção em grande escala de C-ficocianina (JUNIOR; EMBRAPA, 2011; THEVARAJAH *et al.*, 2022).

As taxonomias Micro contendo outros pigmentos presentes na célula de *Arthrospira maxima* comporam mais de 60% dos artigos classificados na categoria de Co-produção e Caracterização da Biomassa, sendo esses: Clorofila (17%), Ficoeritrina (14%), Aloficocianina (22%) e Carotenóides (10%). Os artigos “*Influence of spectral light quality on the pigment concentrations and biomass productivity of Arthrospira platensis*”, de Lima *et al.* (2018), e “*The Effect of pH on Contamination Reduction and Metabolite Contents in Mass Cultures of Spirulina (Arthrospira platensis Gomont)*”, de Mufidatun *et al.* (2023), retratam bem o tipo de trabalho encontrado nessa prospecção em torno da caracterização de clorofila e carotenóides, nos quais esses pigmentos aparecem como interesse secundário. Isso vale para as outras ficobiliproteínas citadas, ficoeritrina e aloficocianina, como mostram os trabalhos mencionados anteriormente de Rodrigues *et al.* (2019) e Sun *et al.* (2023), visto que a prospecção, com foco na ficobilina azul, não aborda as principais fontes naturais de extração desses pigmentos. Ainda assim, esses compostos possuem interesse mercadológico, principalmente quando estudando o conceito de biorrefinarias, mas, também, pelas características nutracêuticas desses outros pigmentos, como é o caso da atividade antioxidante de alguns carotenóides.

As taxonomias Micro de Vitaminas, Fenólicos e Flavonóides, e Polissacarídeos e Biopolímeros classificaram apenas um artigo cada (2%), com um total de 2 artigos. São eles os trabalhos já citados de Nouri, Abbasi e Rahimi (2018), para vitaminas, assim como o artigo de Ferreira-Santos *et al.* (2020), para as outras duas categorias. Trata-se de compostos fora do foco da presente prospecção e, também, de uma fonte que produz predominantemente proteínas, sendo assim, não existem muitos estudos em torno dos mesmos.

Os Lipídeos, presentes em 7% dos artigos classificados nessa categoria, são mencionados em artigos que abordam, no geral, a caracterização da biomassa de *Spirulina sp.* Seguindo a mesma lógica discutida para os demais compostos e, tomando como exemplos, novamente, os trabalhos de Nouri, Abbasi e Rahimi (2018), Lima *et al.* (2018) e Mufidatun *et al.* (2023), esses compostos aparecem como produtos secundários dessa biomassa.

A categoria com maior número de artigos classificados, 24%, foram as Proteínas. A presença delas nas cianobactérias do gênero *Arthrospira* é, por si só, merecedora de destaque, além do fato de comporem parte da estrutura do corante estudado. Muitos trabalhos, como os

de Guidi *et al.* (2021), Thevarajah *et al.* (2022) e Khandual *et al.* (2021) – “*Phycocyanin content and nutritional profile of Arthrospira platensis from Mexico: efficient extraction process and stability evaluation of phycocyanin*” –, expressam, primeiramente, a importância desse componente para a comercialização e na qualidade da biomassa de *Spirulina* como um produto por si só, mas exemplificam, também, a relação entre produção de biomassa, proteínas e C-ficocianina, para um cultivo integrado em larga escala (JAESCHKE *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2020; THEVARAJAH *et al.*, 2022; BERROUANE *et al.*, 2022).

5. Capítulo II – Estratégias de estabilização de C-ficocianina em bebida ácida

5.1. Metodologia

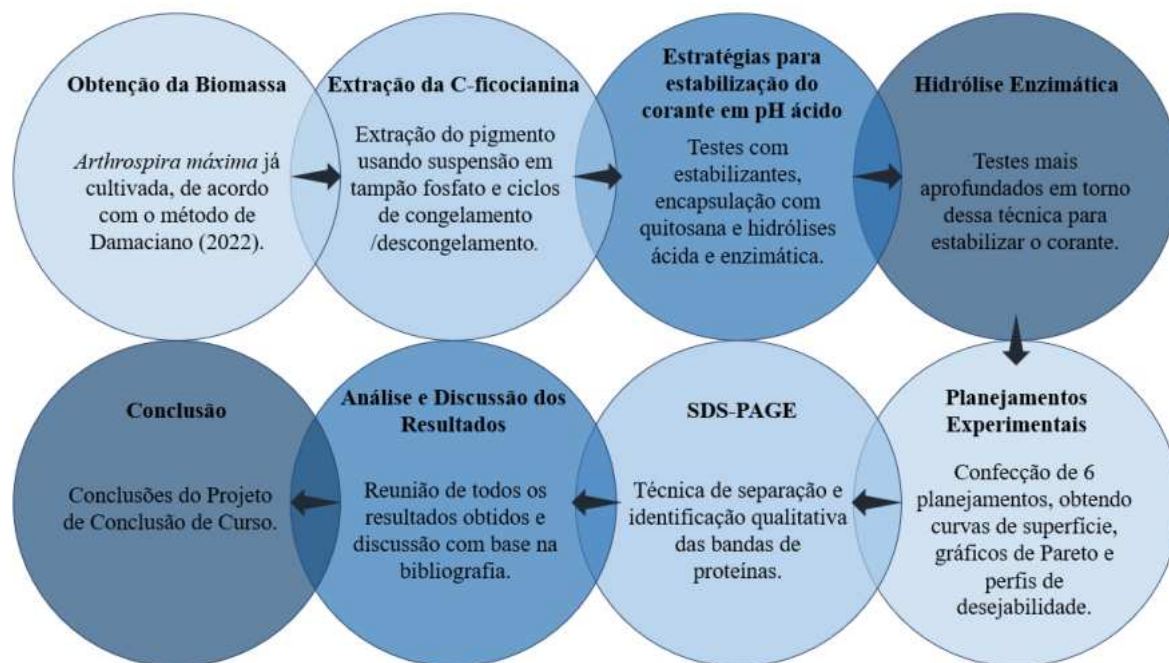


Figura 16: Fluxograma representativo de toda a metodologia abordada no capítulo II desse trabalho, bem como as demais etapas de análise e discussão dos resultados e, enfim, as conclusões.

5.1.1. Obtenção da biomassa

Baseando-se nas condições de cultivo otimizadas para produção e extração de C-ficocianina a partir de *Arthrospira maxima* propostas por Damaciano (2022), da cepa (LEAF 046) integrante da Coleção de Microalgas do Laboratório de Estudos Aplicados em Fotossíntese (CMLEAF), do Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, foi obtida a biomassa utilizada nesse trabalho.

5.1.2. Extração de C-ficocianina

Para extrair o corante da biomassa, usando como base os métodos propostos por Silveira *et al.* (2007), Chen *et al.* (2016) e Wicaksono *et al.* (2019), utilizou-se a proporção de 1,0 g de biomassa seca para cada 100 mL de solução tampão fosfato de sódio com força iônica 0,1 M e pH 6,0 para formar a suspensão a ser submetida aos ciclos de congelamento/descongelamento de 24 horas (SARADA *et al.*, 1999).

Ao final de 5 ciclos de congelamento e descongelamento da suspensão de biomassa em solução tampão, as amostras foram centrifugadas à 22.000 G (centrífuga Sorvall RC-5B, rotor SS-34) e o sobrenadante recuperado foi caracterizado por técnica de absorção molecular com espectrofotômetro na região UV-VIS (MACCOLL *et al.*, 1973; MORAES *et al.*, 2011). A caracterização do extrato bruto de ficocianina foi feita através da determinação da concentração de ficocianina – **Equação 1** (BENNET; BOGORAD, 1978) – e grau de pureza da ficocianina – **Equação 2** (ABALDE *et al.*, 1998).

$$[C-PC] = (A_{620} - 0,474 \times A_{652}) / 5,34 \text{ (Equação 1)}$$

Onde [C-PC] refere-se à concentração de ficobilina presente em solução em mg/mL; A₆₂₀ é o valor de absorbância no comprimento de onda de 620 nm; e A₆₅₂ é o valor de absorbância observado no comprimento de onda de 652 nm.

$$GP = A_{620}/A_{280} \text{ (Equação 2)}$$

Onde GP é o grau de pureza, representando a proporção de cromóforo por conteúdo protéico da solução do corante; A₆₂₀ é o valor de absorbância no comprimento de onda de 620 nm; e A₂₈₀ é o valor de absorbância observado no comprimento de onda de 280 nm.

Após a caracterização do pigmento, uma etapa adicional foi realizada para algumas das amostras de corante, sendo essa a secagem das amostras líquidas através de liofilização (DELTA 1-24 LSC plus).

5.1.3. Estratégias para estabilização da C-ficocianina em pH ácido

Foram realizados testes com diferentes estratégias visando a estabilização de C-ficocianina em bebida ácida (pH ~3), sendo eles: alteração da força iônica, hidrólise ácida, hidrólise enzimática e encapsulamento com polímero hidrossolúvel (quitosana). Para a alteração da força iônica da solução, utilizou-se NaCl em diferentes concentrações, glicose em diferentes concentrações, CaCl₂ 10 mM, sorbitol 50% m/v e MgSO₄ 1,25 M. Para a hidrólise ácida, TCA (ácido tricloroacético) 25% foi adicionado à solução de corante em água, por 1, 2, 3 e 4 horas em banho termostático à 37 °C. Para a execução da hidrólise enzimática, foram

escolhidas três proteases (pepsina, papaína e tripsina), sendo essas adicionadas, em diferentes concentrações, à solução contendo corante e água; a reação ocorreu em estufa à 37 °C durante 1, 2, 3 e 48 horas. Para a encapsulação com quitosana hidrossolúvel, realizou-se, primeiramente, a depolimerização da quitosana para, então, realizar o encapsulamento de C-ficocianina, como descreve o método proposto por Gustiningtyas *et al.* (2020). Para todas as estratégias a solução de C-ficocianina (C-PC) tinha a concentração de 10,0 mg/mL.

5.1.4. Hidrólise enzimática

Em seguida, testes envolvendo as mesmas três enzimas e diferentes condições reacionais foram realizados. Esses testes focaram na redução de variáveis e da ampla faixa de valores dos parâmetros em torno desse tratamento de C-ficocianina, a fim de, posteriormente, usar ferramentas estatísticas para determinar as condições ótimas da reação estudada. As três enzimas selecionadas foram, novamente, pepsina, papaína e tripsina, e as relações de condições reacionais da primeira sequência de testes está relacionada na **Tabela 4**, abaixo. As massas das proteases são referentes à uma massa fixa de 0,01 g de C-ficocianina em 1 mL de água e, nessa etapa, todos os resultados obtidos foram qualitativos, examinando se o corante tratado nas diferentes condições permaneceria estável ou não na bebida ácida.

Tabela 4: Relação de enzimas, proporção de C-ficocianina:enzima, massa de enzima (g) e tempo de reação (h) para a primeira sequência de testes da hidrólise enzimática.

Enzimas	C-PC:Enzima	Massa Enzima (g)	Tempo de reação (h)
Papaína	1:0,1	0,001	1
	1:0,05	0,0005	1
	1:0,1	0,001	24
	1:0,05	0,0005	24
Pepsina	1:0,1	0,001	1
	1:0,05	0,0005	1
	1:0,1	0,001	24
	1:0,05	0,0005	24
Tripsina	1:0,1	0,001	1
	1:0,05	0,0005	1

1:0,1	0,001	24
1:0,05	0,0005	24

A partir dos resultados qualitativos obtidos na primeira sequência de testes, foi decidido realizar outra sequência de testes com alterações nos parâmetros avaliados. Primeiramente, retirou-se a tripsina para a segunda sequência, além disso, foi adicionado o parâmetro de matrizes na qual a reação de hidrólise ocorre, tendo como opções bebida (pH ~3) e água destilada (pH ~6). As massas aplicadas para cada enzima foram alteradas, passando a variar de 0,0005 g a 0,0100 g de enzima. A massa de C-ficocianina foi fixada em 10,0 mg, adicionada em 1,0 mL da matriz escolhida para cada amostra. O conjunto de amostras está relacionado na **Tabela 5**, abaixo.

Tabela 5: Relação de enzimas, matriz na qual ocorreu a hidrólise, proporção de C-ficocianina:enzima e massa de enzima (g) para a segunda sequência de testes da hidrólise enzimática.

Enzimas	Matriz	C-PC:Enzima	Massa Enzima (g)
Papaína	Bebida	1:1	0,01
		1:0,5	0,005
		1:0,2	0,002
		1:0,1	0,001
		1:0,05	0,0005
Papaína	Água	1:1	0,01
		1:0,5	0,005
		1:0,2	0,002
		1:0,1	0,001
		1:0,05	0,0005
Pepsina	Bebida	1:1	0,01
		1:0,5	0,005
		1:0,2	0,002
		1:0,1	0,001
		1:0,05	0,0005
Pepsina	Água	1:1	0,01

1:0,5	0,005
1:0,2	0,002
1:0,1	0,001
1:0,05	0,0005

5.1.4.1. Primeiro planejamento experimental

O primeiro planejamento experimental foi elaborado em torno das condições que mostraram melhores resultados preliminares, de acordo com a seção 5.1.4 acima, usando apenas pepsina como a protease da hidrólise enzimática e água como matriz da reação. Usando o *software* Statistica® para realizar o design experimental, o delineamento composto central (DCC) foi escolhido como metodologia de planejamento experimental, contando com três variáveis independentes – proporção C-PC:Pepsina, tempo de reação e concentração de C-ficocianina – e valores em torno do ponto central variando em +/- 1, como demonstrado na **Tabela 6** abaixo. Esse planejamento gerou 14 amostras distintas e 1 representativa do ponto central, que foi feita em triplicata, totalizando 17 amostras, conforme a **Tabela 7** abaixo, para garantir a reprodutibilidade do processo (MONTGOMERY, 2012; RODRIGUES; IEMMA, 2014). As proporções de C-PC:Pepsina são referentes à uma massa de 30 mg de C-ficocianina para cada amostra, dispostas em um volume de água de 3,0 mL, fixando a concentração da ficobilina em 10 mg/mL.

A partir dos resultados de cada amostra, usando a concentração de C-PC e o grau de Pureza como variáveis dependentes, superfícies de respostas foram geradas, bem como gráficos de Pareto, para avaliar o impacto de cada variável na análise dos parâmetros da reação estudada.

Tabela 6: Variáveis – proporção C-PC:pepsina, tempo de reação (h) e concentração de C-PC (mg/mL) –, pontos centrais e pontos +/- 1 de cada variável do Primeiro planejamento experimental.

Variáveis	+1	0	-1
C-PC:Pepsina	1:0,05	1:0,04	1:0,03
Tempo de Reação (h)	72	48	24
Concentração C-PC (mg/mL)	10	7,5	5

Tabela 7: Conjunto de amostras gerado para o Primeiro planejamento experimental com triplicata do ponto central (amostras 15, 16 e 17).

Amostras	C-PC:Pepsina	Tempo de Reação (h)	Concentração de C-PC (mg/mL)
1	1:0,03	24	5
2	1:0,03	24	10
3	1:0,03	72	5
4	1:0,03	72	10
5	1:0,05	24	5
6	1:0,05	24	10
7	1:0,05	72	5
8	1:0,05	72	10
9	1:0,03	48	7,5
10	1:0,05	48	7,5
11	1:0,04	24	7,5
12	1:0,04	72	7,5
13	1:0,04	48	5
14	1:0,04	48	10
15 (C)	1:0,04	48	7,5
16 (C)	1:0,04	48	7,5
17 (C)	1:0,04	48	7,5

5.1.4.2. Segundo planejamento experimental

A partir do segundo planejamento experimental (**Tabela 9**), decidiu-se por seguir a metodologia de delineamento composto central rotacional (DCCR), já que essa possui uma maior faixa de valores investigados por planejamento. Nesse sentido, a metodologia conta com um ponto central (0), dois pontos +/- 1 e com dois pontos extras de +/- $1,41\alpha$, dispostos na **Tabela 8**. Dessa vez, foram escolhidos apenas 2 parâmetros de variáveis independentes, sendo eles: tempo de reação em horas e massa da enzima (g), contudo, mantiveram-se como variáveis dependentes para as análises o Grau de Pureza e a Concentração de C-ficocianina. Além disso, foram realizados dois blocos desse planejamento: um com utilizando a pepsina e o segundo a papaína como protease da reação, como especificado na **Tabela 9**, abaixo. Com isso, esse planejamento contou, para cada bloco, com um total de 8 amostras diferentes entre si e 1 amostra representativa do ponto central, que foi feita em triplicata, totalizando 11 amostras. Ademais, o planejamento usou como parâmetros fixos em suas análises: temperatura de reação à 37 °C; massa de C-ficocianina de 0,0300 g; e volume de amostra de 3,0 mL. A partir dos resultados de cada amostra, expressos nas variáveis dependentes, superfícies de respostas foram geradas, bem como gráficos de Pareto, para avaliar o impacto de cada variável na análise dos parâmetros da reação estudada.

Tabela 8: Variáveis – tempo de reação (h) e massa de enzima (g), podendo essa ser pepsina ou papaína –, pontos centrais, pontos +/- 1 e pontos +/- 1,41 α de cada variável do Segundo planejamento experimental.

Variáveis	Ponto +1,41 α	Ponto +1	0	Ponto -1	Ponto -1,41 α
Tempo de Reação (h)	6,828	6	4	2	1,172
Massa de Enzima (g)	0,00512	0,0045	0,0030	0,0015	0,00088

Tabela 9: Conjunto de amostras gerado para o Segundo planejamento experimental com triplicata do ponto central (amostras 9, 10 e 11).

Amostras	Tempo de Reação (h)	Massa de Enzima (g)
1	2,000	0,0015
2	2,000	0,0045
3	6,000	0,0015
4	6,000	0,0045
5	1,172	0,0030
6	6,828	0,0030
7	4,000	0,0008
8	4,000	0,0051
9 (C)	4,000	0,0030
10 (C)	4,000	0,0030
11 (C)	4,000	0,0030

5.1.4.3. Terceiro e quarto planejamento experimental

Para os terceiro e quarto planejamentos experimentais, foi aplicada, novamente, a metodologia de delineamento composto central rotacional (DCCR). Nesse sentido, a metodologia conta com um ponto central (0), dois pontos +/- 1 e com dois pontos extras de +/- 1,41 α , dispostos na **Tabela 10**. Para ambos os planejamentos aqui contidos, mantiveram-se como variáveis independentes, o tempo de reação em horas e a massa de enzima (g). Da mesma forma, para as variáveis dependentes foram utilizados o Grau de Pureza e a Concentração de C-ficocianina nas amostras. Dessa vez, no entanto, retirou-se da análise o bloco de reações usando a pepsina como protease, por isso, a variável da massa de enzima será referenciada, a partir de agora, como massa de papaína. Com isso, cada um desses planejamentos contou com um total de 8 amostras diferentes entre si e 1 amostra representativa do ponto central, que foi feita em triplicata, totalizando 11 amostras, como exposto na **Tabela 11**. Ademais, o planejamento usou como parâmetros fixos em suas análises: temperatura de reação à 37 °C; massa de C-ficocianina de 0,0300 g; e volume de amostra de 3,0 mL. A partir dos resultados de cada amostra, expressos nas variáveis dependentes, foram geradas superfícies de resposta, bem como gráficos de Pareto para avaliar, além do impacto de cada variável na análise dos

parâmetros da reação estudada, os valores indicados como ótimos para cada parâmetro através da regressão linear do polinômio gerado pelo planejamento.

Tabela 10: Variáveis – tempo de reação (h) e massa de papaína (g) –, pontos centrais, pontos +/- 1 e pontos +/- 1,41 α de cada variável do Terceiro e Quarto planejamento experimental.

Variáveis	Ponto +1,41 α	+1	0	-1	Ponto -1,41 α
Tempo de Reação (h)	6,828	6	4	2	1,172
Massa de Papaína (g)	0,0165	0,0117	0,0102	0,0087	0,0051

Tabela 11: Conjunto de amostras gerado para os Terceiro e Quarto planejamentos experimentais com triplicata do ponto central (amostras 9, 10 e 11).

Amostras	Tempo de Reação (h)	Massa de Papaína (g)
1	2,000	0,0087
2	2,000	0,0117
3	6,000	0,0087
4	6,000	0,0117
5	1,172	0,0102
6	6,828	0,0102
7	4,000	0,0051
8	4,000	0,0165
9 (C)	4,000	0,0102
10 (C)	4,000	0,0102
11 (C)	4,000	0,0102

5.1.4.4. Quinto planejamento experimental

Para o quinto planejamento experimental, foi aplicada, uma vez mais, a metodologia de delineamento composto central rotacional (DCCR). Assim, a metodologia conta com um ponto central (0), dois pontos +/- 1 e com dois pontos extras de +/- 1,41 α , dispostos na **Tabela 12**. Nesse planejamento, mantiveram-se como variáveis independentes, o tempo de reação, dessa vez em minutos, e a massa de enzima (g). Da mesma forma, para as variáveis dependentes foram utilizados o Grau de Pureza e a Concentração de C-ficocianina nas amostras. Com isso, o planejamento contou com um total de 8 amostras diferentes entre si e 1 amostra representativa do ponto central, que foi feita em triplicata, totalizando 11 amostras, como exposto na **Tabela 13**. Ademais, o planejamento usou como parâmetros fixos em suas análises: temperatura de reação à 37 °C; massa de C-ficocianina de 0,0300 g; e volume de amostra de 3,0 mL. A partir dos resultados de cada amostra, expressos nas variáveis dependentes, foram geradas superfícies de resposta, bem como gráficos de Pareto para avaliar, além do impacto de cada variável na

análise dos parâmetros da reação estudada, os valores indicados como ótimos para cada parâmetro através da regressão linear do polinômio gerado pelo planejamento.

Tabela 12: Variáveis – tempo de reação (min) e massa de papaína (g) –, pontos centrais, pontos +/- 1 e pontos +/- 1,41 α de cada variável do Quinto planejamento experimental.

Variáveis	Ponto +1,41 α	+1	0	-1	Ponto -1,41 α
Tempo de Reação (min)	68	60	40	20	12
Massa de Papaína (g)	0,0165	0,0117	0,0102	0,0087	0,0051

Tabela 13: Conjunto de amostras gerado para o Quinto planejamento experimental com triplicata do ponto central (amostras 9, 10 e 11).

Amostras	Tempo de Reação (min)	Massa de Papaína (g)
1	20	0,0087
2	20	0,0117
3	60	0,0087
4	60	0,0117
5	12	0,0102
6	68	0,0102
7	40	0,0051
8	40	0,0165
9 (C)	40	0,0102
10 (C)	40	0,0102
11 (C)	40	0,0102

5.1.4.5. Sexto planejamento experimental

Para o sexto, e último, planejamento experimental, foi aplicada, outra vez, a metodologia de delineamento composto central rotacional (DCCR). Assim, a metodologia conta com um ponto central (0), dois pontos +/- 1 e com dois pontos extras de +/- 1,41 α , dispostos na **Tabela 14**. Nesse planejamento, no entanto, usou-se como variáveis independentes, o tempo de reação em minutos e a massa de C-ficocianina (C-PC) em gramas. Para as variáveis dependentes foram utilizados o Grau de Pureza e a Concentração de C-ficocianina nas amostras. Com isso, o planejamento contou com um total de 8 amostras diferentes entre si e 1 amostra representativa do ponto central, que foi feita em triplicata, totalizando 11 amostras, como exposto na **Tabela 15**. Ademais, o planejamento usou como parâmetros fixos em suas análises: temperatura de reação à 37 °C; massa de papaína de 0,0080 mg; e volume de amostra de 3,0 mL. A partir dos resultados de cada amostra, expressos nas variáveis dependentes, foram geradas superfícies de resposta, bem como gráficos de Pareto para

Av. Athos da Silveira Ramos, 149 – quinto andar (bloco A), Sala 524A - Cidade Universitária - RJ - CEP 21941-

avaliar, além do impacto de cada variável na análise dos parâmetros da reação estudada, os valores indicados como ótimos para cada parâmetro através da regressão linear do polinômio gerado pelo planejamento.

Tabela 14: Variáveis – tempo de reação (min) e massa de C-PC (g) –, pontos centrais, pontos +/- 1 e pontos +/- 1,41 α de cada variável do Sexto planejamento experimental.

Variáveis	Ponto +1,41 α	+1	0	-1	Ponto -1,41 α
Tempo de Reação (min)	34	30	20	10	6
Massa de C-PC (g)	0,03410	0,03000	0,02000	0,01000	0,00590

Tabela 15: Conjunto de amostras gerado para o Sexto planejamento experimental com triplicata do ponto central (amostras 9, 10 e 11).

Amostras	Tempo de Reação (min)	Massa de C-PC (g)
1	10	0,01000
2	10	0,03000
3	30	0,01000
4	30	0,03000
5	6	0,02000
6	34	0,02000
7	20	0,00590
8	20	0,03410
9 (C)	20	0,02000
10 (C)	20	0,02000
11 (C)	20	0,02000

5.1.5. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida

Amostras contendo o corante foram submetidas à hidrólise enzimática com diferentes tempos de incubação (**Tabela 16**). Posteriormente, essas amostras, juntamente com padrão de ficocianina e papaína, foram sujeitas a eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 12% (p/v) a 30 mA (LAEMMLI, 1970). Para tal, as amostras foram preparadas com adição de tampão (100 mM DTT; 100 mM β -mercaptoetanol; 2% dodecil sulfato de sódio; 0,1% azul de bromofenol; 10% glicerol; 50 mM Tris-HCl) e aquecimento a 95°C por 5 minutos. A técnica foi realizada à temperatura ambiente, com o sistema mini-protein da BioRad, e usando como tampão de corrida uma solução de 50 mM Tris-HCl, Glicina 150 mM e Dodecil sulfato de sódio 0,1% (p/v). O gel foi, então, corado com solução de Coomassie coloidal (Blue Silver), pelo método proposto por Candiano *et al.* (2004), por cerca de 12 horas em placa agitadora e descorado em água destilada por, aproximadamente, 24 horas. A análise das bandas foi

realizada após registro em fotodocumentador DNR Minibis-Pro (BioAmerica®), comparando-as ao padrão de massas moleculares (Bench Mark 10747012, Invitrogen) aplicado ao gel juntamente com as amostras (Poço 1 – **Tabela 16**).

Tabela 16: Esquema de poços, com descrição das amostras em cada poço, para a execução da técnica de SDS-PAGE.

Poços	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Amostras	Padrão	Ficocianina pura	Papaína pura	C-PC 30 min	C-PC 60 min	C-PC 90 min	C-PC 120 min	C-PC 150 min	C-PC 180 min

5.2. Resultados

5.2.1. Extração de C-ficocianina

Uma vez finalizados os ciclos de congelamento e descongelamento da suspensão de biomassa em tampão fosfato de pH 6,0, a amostra de C-PC extraída foi caracterizada, em termos de sua concentração e pureza, com os respectivos valores de 2,72 mg/mL e 0,790. Além disso, foi obtido um rendimento final de extração de 43%.

5.2.2. Estratégias para estabilização da C-ficocianina em pH ácido

Para as diferentes estratégias testadas a fim de alcançar a estabilização do corante em bebida de pH ácido (~3,0), os resultados, no geral, não se mostraram promissores, com exceção do método de hidrólise enzimática. A adição de estabilizantes diversos resultou em amostras que, após um intervalo entre 6 e 12 horas, mostravam perda na coloração azul intensa e formação de precipitado coloidal, salvo o caso de amostra adicionada de NaCl 33%, que manteve o corante em solução por, aproximadamente, 2 dias. No caso da estratégia de hidrólise ácida, o corante, após o tempo de reação com TCA 25%, que variou entre 1, 2, 3 e 4 horas, apresentou degradação na sua cor, terminando com um precipitado de tom esverdeado e insolúvel, mesmo em água destilada (pH ~6,0). A estratégia com quitosana apresentou resultados positivos na encapsulação do corante, após o processo descrito na seção 4.1.3, bem como na sua capacidade de mantê-lo em solução na bebida ácida, contudo, sua capacidade colorífica foi severamente reduzida, resultando em uma solução incolor e turva. Por fim, a reação de hidrólise enzimática, com as diferentes proteases citadas anteriormente, apresentou

resultados gerais positivos com relação à capacidade de manter o corante em solução de pH ácido, com exceção do grupo de amostras hidrolisadas com tripsina, que foi o único incapaz de manter a estabilidade de C-ficocianina em pH ácido para algumas amostras. Todas as amostras hidrolisadas com papaína e pepsina, independente do tempo ou massa de enzima utilizada, apresentaram coloração azul intensa, apesar de obter diferentes tons entre as duas enzimas (**Figura 17**).

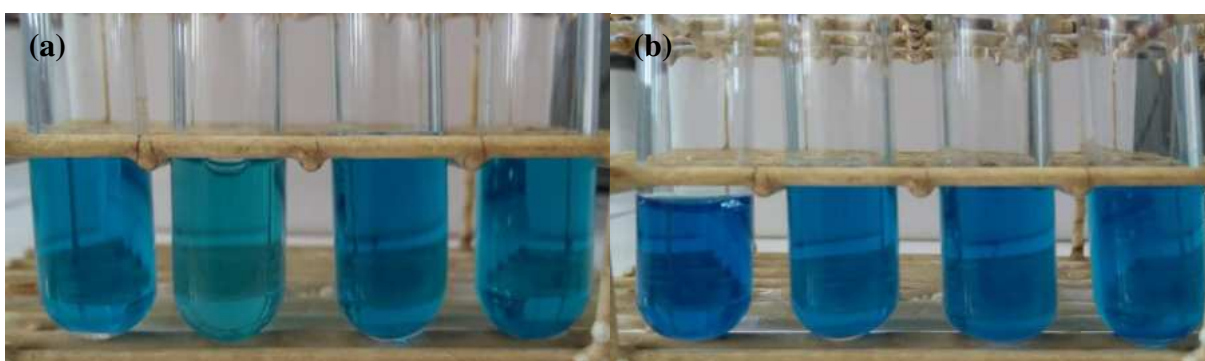


Figura 17: Amostras de C-ficocianina em bebida após 3 dias da reação de hidrólise com: (a) papaína como protease; e (b) pepsina como protease.

5.2.3. Hidrólise enzimática

Seguindo para os testes que avaliaram mais parâmetros da reação de hidrólise enzimática, na **Tabela 17**, abaixo, estão expostos os resultados qualitativos obtidos para cada combinação de parâmetros. Para esse conjunto de resultados, considera-se como “estável” uma amostra de C-ficocianina que, após hidrolisada e adicionada em bebida de pH ácido, não apresentou perda significativa de cor ou presença de precipitado. Ainda, considera-se como “instável” uma amostra que, após a reação proposta e adição na bebida, apresentou perda da coloração azul e presença de precipitado coloidal. A definição da classificação dos resultados contendo “estável com mudanças de cor” refere-se a amostras de C-ficocianina que, apesar de se manterem em solução após adicionadas, resultaram em uma mudança do tom ou intensidade do azul original, antes da reação de hidrólise, como mostram as Figuras 17a e 17b, acima. Na Figura 17b, não houve mudança significativa da cor, diferente da Figura 17a, onde é perceptível um tom mais esverdeado da solução.

Tabela 17: Parâmetros da primeira sequência de testes em torno da hidrólise enzimática, sendo eles enzima utilizada, massa de enzima (g) e tempo de reação (h). São apresentados, para cada amostra, os resultados qualitativos observados após o tempo de reação referente e posterior aplicação em bebida de pH ácido.

Enzimas	Proporção C-PC:Enzima	Massa Enzima (g)	Tempo de reação (h)	Resultados
Papaína	1:0,1	0,001	1	Estável com mudanças de cor
	1:0,05	0,0005	1	Estável com mudanças de cor
	1:0,1	0,001	24	Estável com mudanças de cor
	1:0,05	0,0005	24	Estável com mudanças de cor
Pepsina	1:0,1	0,001	1	Estável
	1:0,05	0,0005	1	Estável
	1:0,1	0,001	24	Estável
	1:0,05	0,0005	24	Estável
Tripsina	1:0,1	0,001	1	Instável
	1:0,05	0,0005	1	Instável
	1:0,1	0,001	24	Instável
	1:0,05	0,0005	24	Instável

A partir dos resultados apresentados para a primeira sequência de testes em torno da hidrólise enzimática (**Tabela 17**), foi preparado um segundo conjunto de amostras de C-ficocianina, como descrito na seção 5.1.4, da Metodologia desse capítulo. Na **Tabela 18**, abaixo, estão expostos os resultados em função do Grau de Pureza medido para cada amostra, de acordo com a **Equação 2** descrita na seção 5.1.2. Além desse parâmetro quantitativo, foi observado qualitativamente que, assim como os resultados da seção 5.2.2, o corante permaneceu em solução ácida e sem formação de precipitado para todas as amostras, apresentando, porém, mudanças do tom azulado para as amostras hidrolisadas com papaína, como mostram as **Figuras 17a e 17b**.

Tabela 18: Parâmetros da segunda sequência de testes em torno da hidrólise enzimática, sendo eles enzima utilizada, massa de enzima (g) e tempo de reação (h). São apresentados, para cada amostra, os resultados quantitativos de Grau de Pureza observados após o tempo de reação referente e posterior aplicação em bebida de pH ácido.

Enzimas	Matriz	Proporção C-PC:Enzima	Massa Enzima (g)	Grau de Pureza
Papaína	Bebida	1:1	0,01	1,066
		1:0,5	0,005	0,660
		1:0,2	0,002	0,703
		1:0,1	0,001	0,469
		1:0,05	0,0005	0,484
	Água	1:1	0,01	0,661
		1:0,5	0,005	0,976
		1:0,2	0,002	1,001
		1:0,1	0,001	1,002
		1:0,05	0,0005	0,772
Pepsina	Bebida	1:1	0,01	0,850
		1:0,5	0,005	1,172
		1:0,2	0,002	0,889
		1:0,1	0,001	0,676
		1:0,05	0,0005	0,791
	Água	1:1	0,01	1,406
		1:0,5	0,005	1,664
		1:0,2	0,002	1,611
		1:0,1	0,001	1,663
		1:0,05	0,0005	1,283

5.2.3.1. Primeiro planejamento experimental

O primeiro planejamento experimental avaliou os parâmetros de proporção de corante:pepsina, tempo de reação (h) e concentração inicial de C-ficocianina, e foi formulado com a metodologia fatorial de delineamento composto central (DCC). Na **Tabela 19**, dispõem-se os resultados, em função da concentração final de C-ficocianina e grau de pureza, de cada amostra do planejamento gerado. Destaca-se que as amostras com maiores valores de concentração final de C-ficocianina foram, respectivamente: 14, 6, 8 e 2; enquanto para o grau de pureza, as amostras com maiores valores foram: 2, 8, 16 e 14, respectivamente.

Tabela 19: Conjunto amostral gerado para o primeiro planejamento experimental da reação de hidrólise enzimática, especificando cada parâmetro por amostra (proporção C-PC:Pepsina; tempo de reação (h); e concentração inicial de C-PC em mg/mL – $[C-PC]_i$), bem como os respectivos resultados em função da concentração final de C-PC em mg/mL ($[C-PC]_f$) e Grau de Pureza (GP).

Amostras	C-PC:Pepsina	Tempo de Reação (h)	$[C-PC]_i$ (mg/mL)	$[C-PC]_f$ (mg/mL)	GP
1	1:0,03	24	5	0,072	0,40
2	1:0,03	24	10	0,256	5,55
3	1:0,03	72	5	0,067	1,57
4	1:0,03	72	10	0,168	0,59
5	1:0,05	24	5	0,085	1,07
6	1:0,05	24	10	0,291	0,95
7	1:0,05	72	5	0,038	0,32
8	1:0,05	72	10	0,277	3,25
9	1:0,03	48	7,5	0,156	1,98
10	1:0,05	48	7,5	0,132	1,27
11	1:0,04	24	7,5	0,121	1,56
12	1:0,04	72	7,5	0,160	1,20
13	1:0,04	48	5	0,068	0,79
14	1:0,04	48	10	0,296	2,50
15 (C)	1:0,04	48	7,5	0,153	0,90
16 (C)	1:0,04	48	7,5	0,141	2,71
17 (C)	1:0,04	48	7,5	0,141	0,62

A partir do gráfico de Pareto gerado para a variável dependente de concentração final de C-PC (**Figura 18**) é possível inferir que apenas o parâmetro independente linear de concentração inicial de C-ficocianina foi significativo nesse planejamento. Ademais, percebe-se, pelas superfícies de resposta, uma geometria planar para a combinação dos parâmetros de tempo de reação e proporção C-PC:enzima (**Figura 19**), bem como um aumento na concentração final do corante para maiores valores de concentração inicial de C-ficocianina, independente da relação com os outros dois parâmetros (**Figuras 20 e 21**).

Ainda, são apresentados o gráfico de Pareto para a variável dependente de Grau de Pureza (**Figura 22**), do qual pode-se depreender que, para essa resposta, nenhuma das variáveis independentes selecionadas foi significativa. Das três superfícies de resposta referentes à essa resposta, percebe-se que os melhores resultados estão ligados, novamente, a valores maiores de concentração inicial de C-ficocianina (**Figuras 24 e 25**). Contudo, nota-se, a partir da **Figura 23**, que os melhores resultados dessa resposta provêm de valores menores de tempo de reação e massa de pepsina.

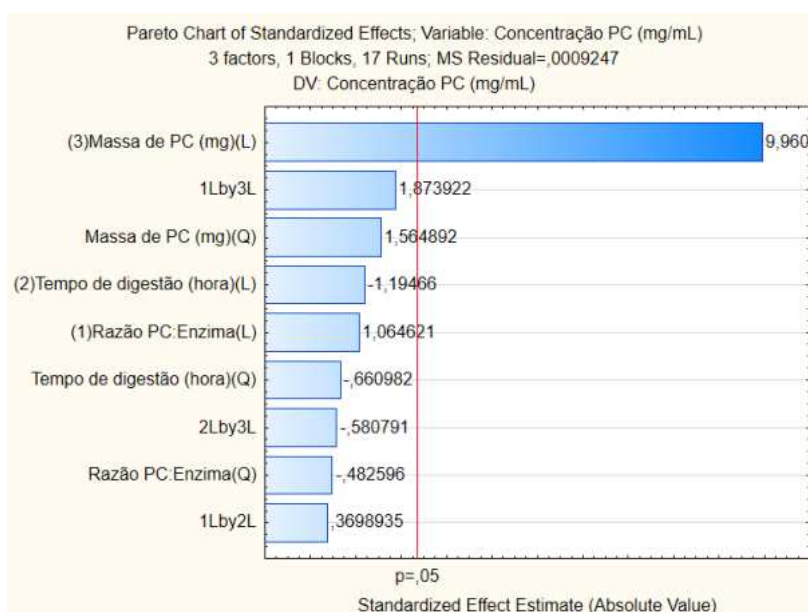


Figura 18: Gráfico de Pareto referente à concentração final de C-PC (mg/mL), correlacionando a significância dos diferentes polinômios de cada variável independente do primeiro planejamento experimental.

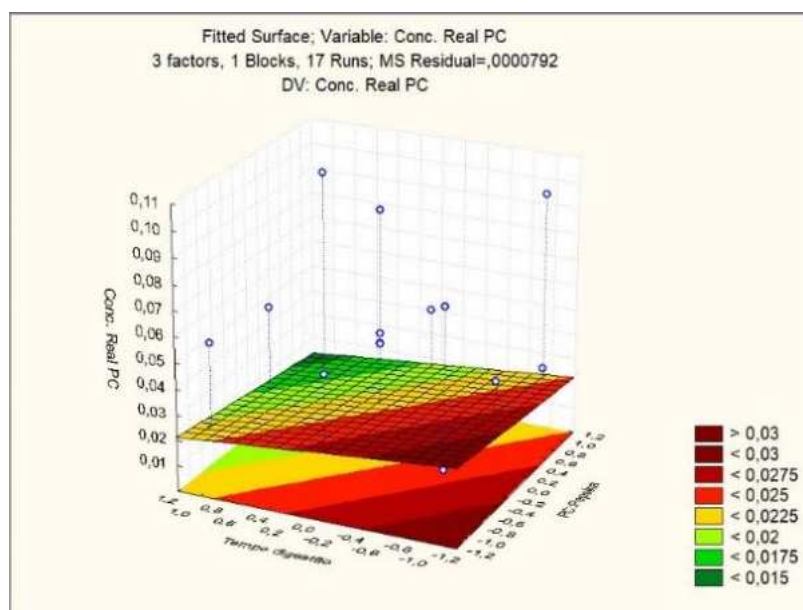


Figura 19: Superfície de resposta do tempo de reação (h) e da massa de pepsina (g), expressos em função da concentração final de C-PC (mg/mL), para o primeiro planejamento experimental.

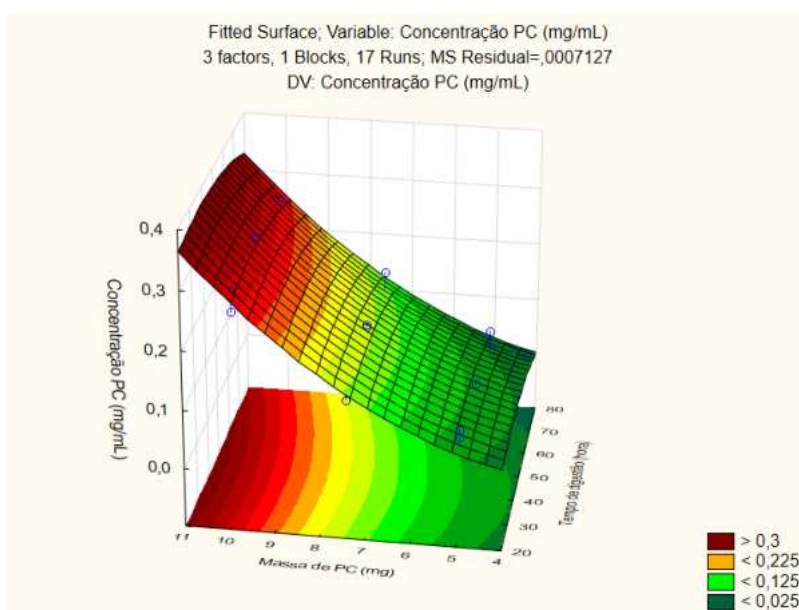


Figura 20: Superfície de resposta do tempo de reação (h) e da concentração inicial de C-PC (mg/mL), expressos em função da concentração final de C-PC (mg/mL), para o primeiro planejamento experimental.

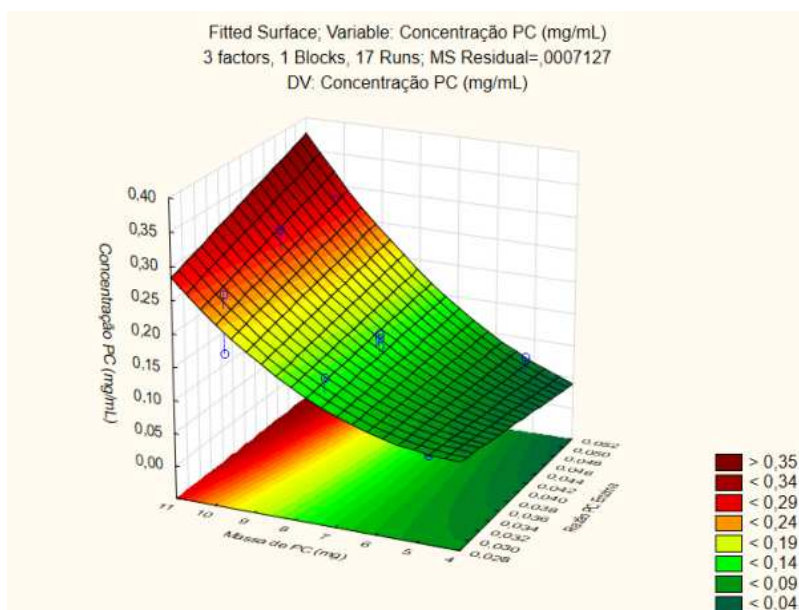


Figura 21: Superfície de resposta da concentração inicial de C-PC (mg/mL) e da massa de pepsina (g), expressos em função da concentração final de C-PC (mg/mL), para o primeiro planejamento experimental.

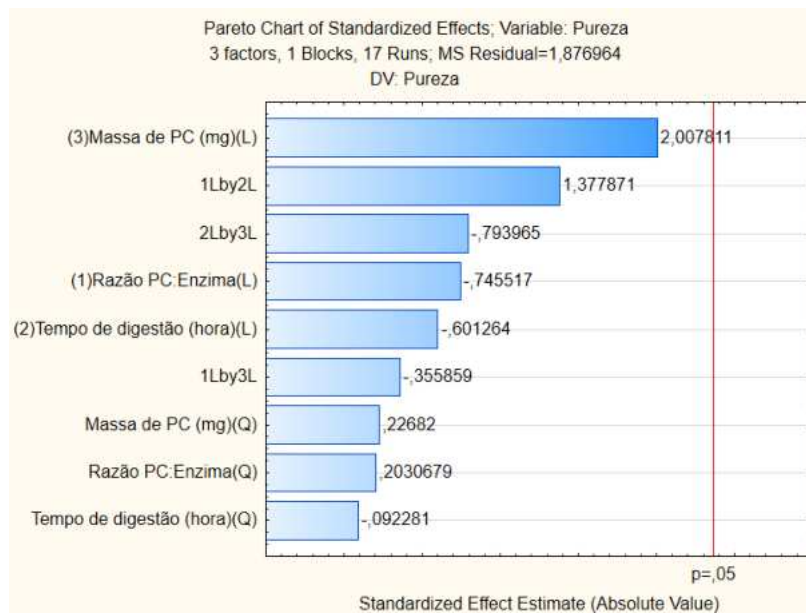


Figura 22: Gráfico de Pareto referente ao grau de pureza, correlacionando a significância dos diferentes polinômios de cada variável independente do primeiro planejamento experimental.

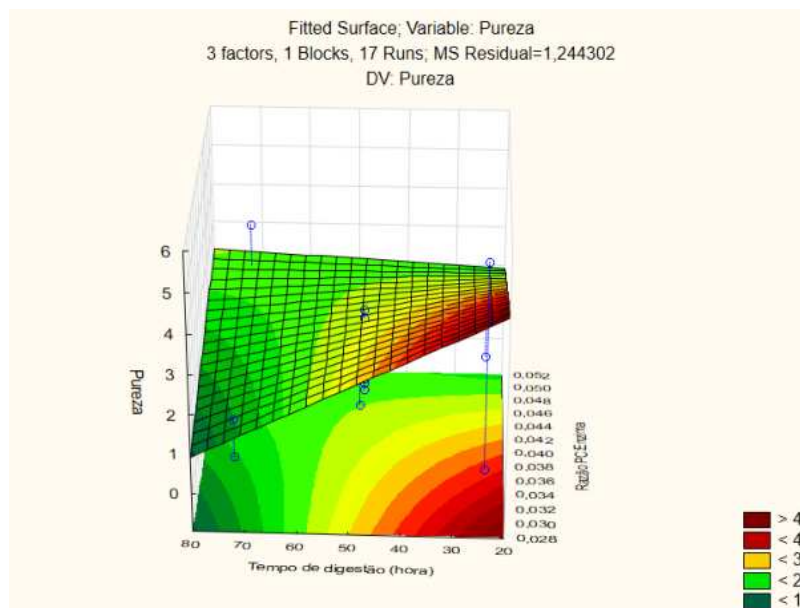


Figura 23: Superfície de resposta do tempo de reação (h) e da massa de pepsina (g), expressos em função do grau de pureza, para o primeiro planejamento experimental.

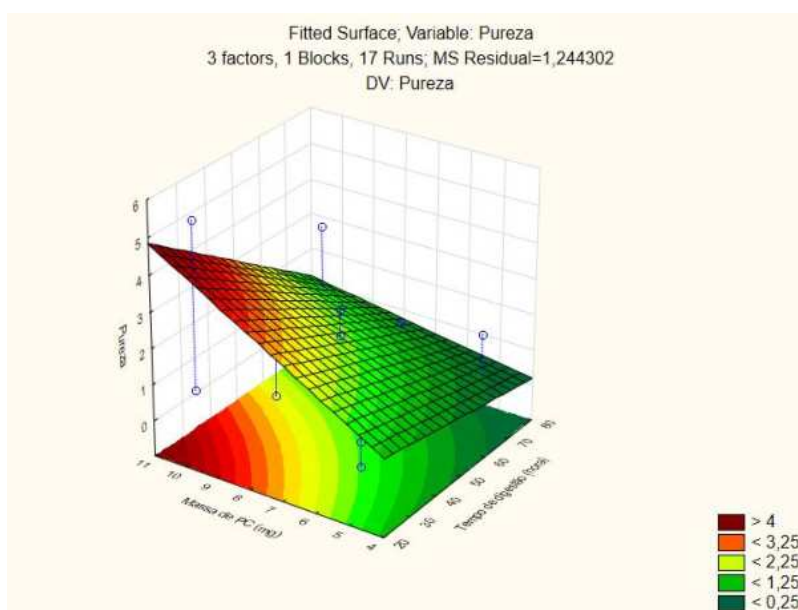


Figura 24: Superfície de resposta do tempo de reação (h) e da concentração inicial de C-PC (mg/mL), expressos em função do grau de pureza, para o primeiro planejamento experimental.

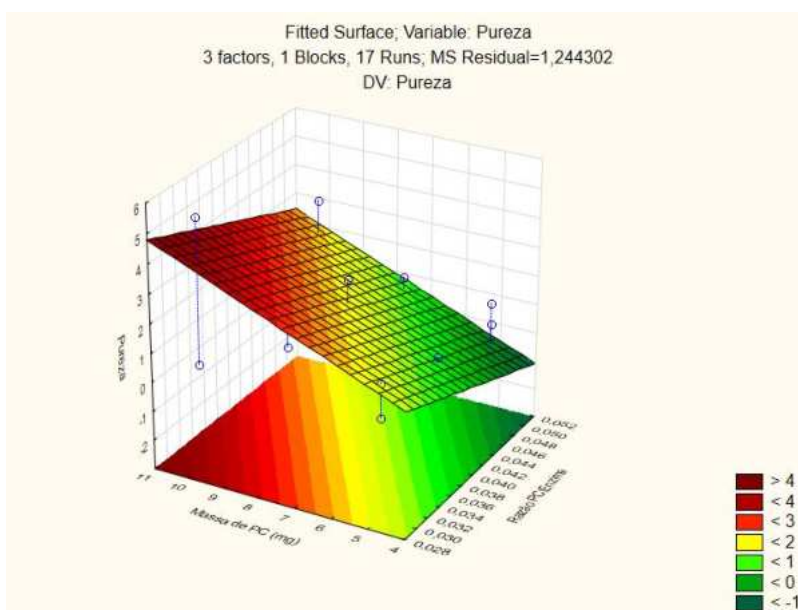


Figura 25: Superfície de resposta da concentração inicial de C-ficocianina (mg/mL) e da massa de pepsina (g), expressos em função do grau de pureza, para o primeiro planejamento experimental.

5.2.3.2. Segundo planejamento experimental

O segundo planejamento experimental foi proposto, com base nas alterações descritas no item 5.4.1.2 da Metodologia desse capítulo. O planejamento foi feito em dois blocos, cada qual usando uma enzima distinta – papaína ou pepsina. Os valores obtidos para cada amostra desse planejamento, em cada bloco, estão expostos na **Tabela 20**, abaixo, em função das variáveis dependentes de concentração de C-PC (mg/mL) e grau de pureza (GP). Para o bloco que usou papaína como protease da reação, destacam-se com maiores valores, respectivamente, as amostras 1, 5 e 3 para a concentração de C-PC, e as amostras 8, 7 e 10 para o grau de pureza. Já para o bloco que usou pepsina como protease, destacam-se as amostras 1, 2 e 5, com os maiores valores de concentração de C-ficocianina, e as amostras 3, 4 e 10 com os maiores valores de grau de pureza.

Tabela 20: Conjunto amostral gerado para o segundo planejamento experimental da reação de hidrólise enzimática, com dois blocos espelhados para papaína e pepsina, especificando cada parâmetro por amostra (tempo de reação (h) e massa de enzima (g)), bem como os respectivos resultados em função da concentração de C-PC (mg/mL) e Grau de Pureza (GP).

Enzima	Amostras	Tempo de Reação (h)	Massa de Enzima (g)	[C-PC] (mg/mL)	GP
Papaína	1	2,0	0,0015	0,236	1,518
	2	2,0	0,0045	0,223	1,779
	3	6,0	0,0015	0,149	2,062
	4	6,0	0,0045	0,102	0,829
	5	1,2	0,0030	0,230	1,625
	6	6,8	0,0030	0,062	0,519
	7	4,0	0,0008	0,216	2,797
	8	4,0	0,0051	0,177	4,125
	9 (C)	4,0	0,0030	0,211	1,733
	10 (C)	4,0	0,0030	0,196	2,603
	11 (C)	4,0	0,0030	0,201	2,219
Pepsina	1	2,0	0,0015	0,414	1,506
	2	2,0	0,0045	0,416	1,875
	3	6,0	0,0015	0,373	2,156
	4	6,0	0,0045	0,364	2,004
	5	1,2	0,0030	0,396	1,699
	6	6,8	0,0030	0,325	1,473
	7	4,0	0,0008	0,320	1,453
	8	4,0	0,0051	0,296	1,491
	9 (C)	4,0	0,0030	0,278	0,967
	10 (C)	4,0	0,0030	0,384	1,974
	11 (C)	4,0	0,0030	0,275	1,299

Analisando os gráficos e superfícies de resposta geradas para o bloco de amostras hidrolisadas com papaína, percebe-se, pelo gráficos de Pareto referente à variável dependente de concentração de C-PC (**Figura 26**), que os polinômios quadrático e linear do tempo de reação, bem como o linear para a massa de papaína, são significativos nesse planejamento. Ademais, percebe-se pela análise da superfície de resposta (**Figura 27**) que os maiores valores de concentração de C-PC estão ligados a tempos de reação menores (entre 1 e 2 horas) e a quaisquer valores da faixa de massa de papaína. Já pelo gráfico de Pareto relacionado ao grau de pureza (**Figura 28**), percebe-se que nenhum dos polinômios das variáveis independentes apresentou significância para a análise. No entanto, percebe-se pela superfície de resposta gerada (**Figura 29**) que há um ponto de sela nessas condições, indicando que, os melhores resultados para o tempo de reação apresentaram-se em 4 horas, e que valores nos extremos superiores e inferiores da massa de papaína apresentaram os melhores valores da análise.

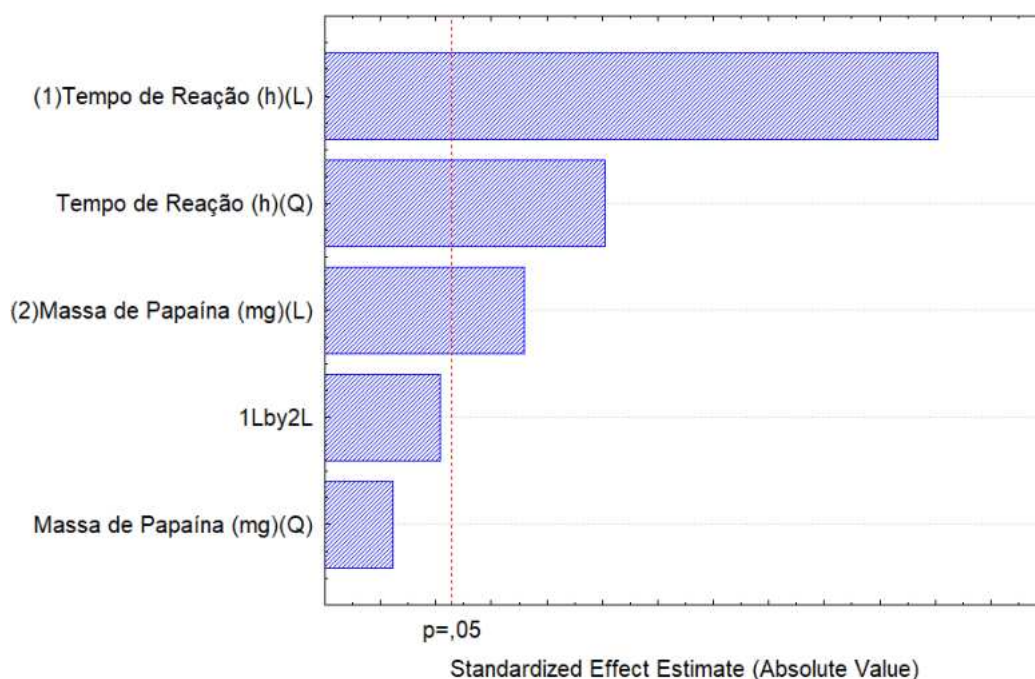


Figura 26: Gráfico de Pareto referente à concentração de C-PC (mg/mL), correlacionando, para o bloco da papaína, a significância dos diferentes polinômios de cada variável independente do segundo planejamento experimental.

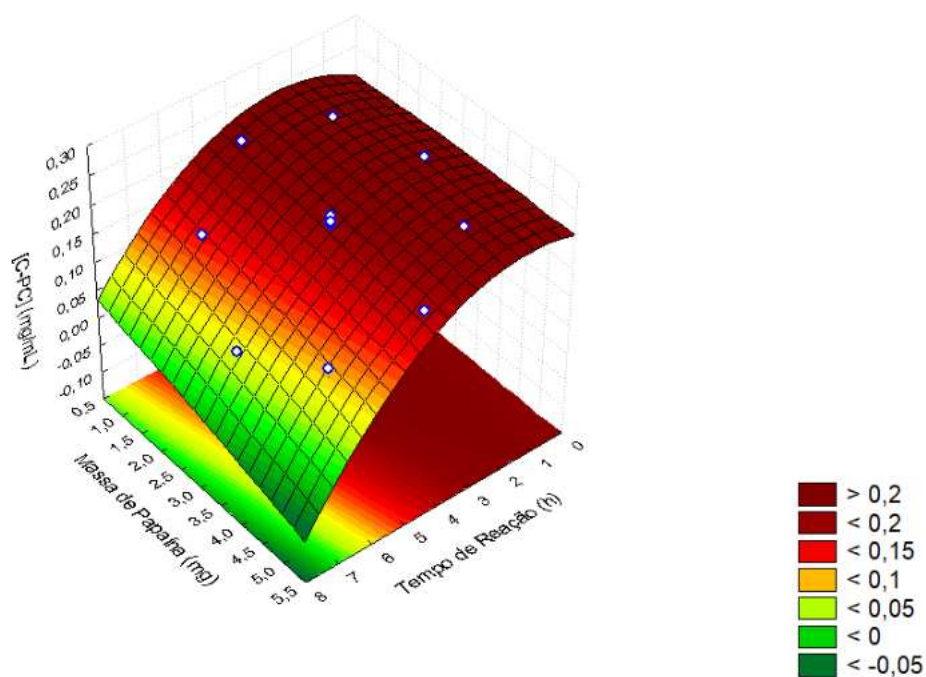


Figura 27: Superfície de resposta do tempo de reação (h) e da massa de papaína (g), expressos em função da concentração final de C-PC (mg/mL), para o segundo planejamento experimental.

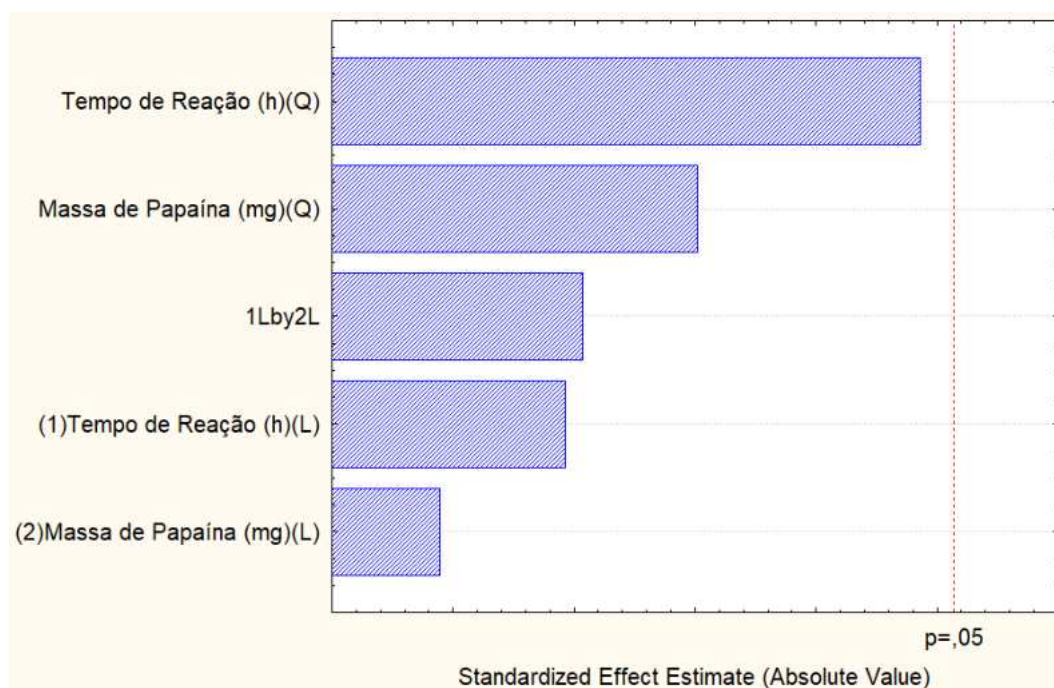


Figura 28: Gráfico de Pareto referente ao grau de pureza, correlacionando, para o bloco da papaína, a significância dos diferentes polinômios de cada variável independente do segundo planejamento experimental.

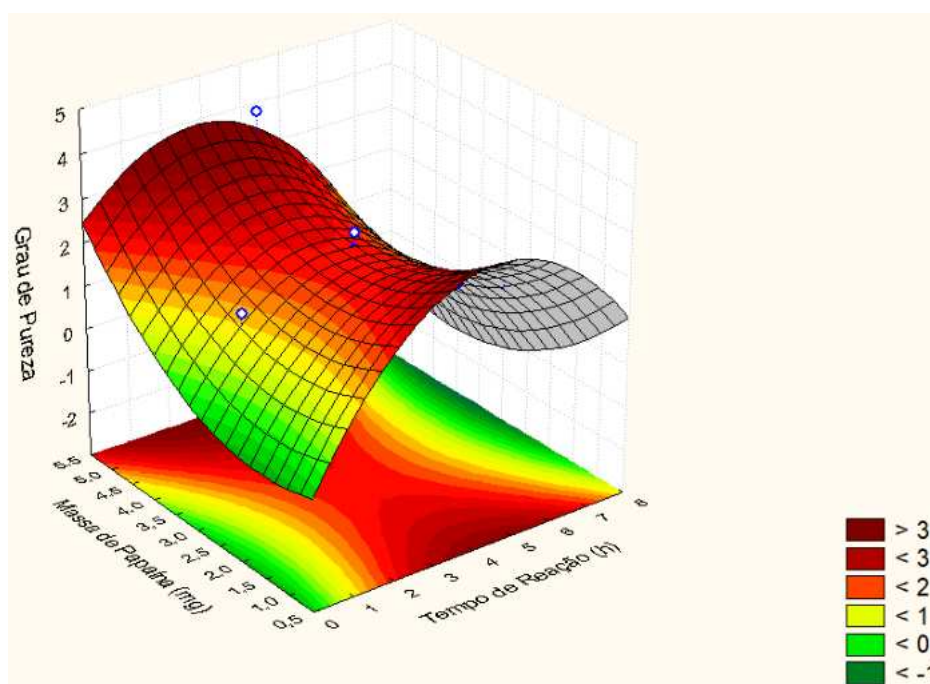


Figura 29: Superfície de resposta do tempo de reação (h) e da massa de papaína (g), expressos em função do grau de pureza, para o segundo planejamento experimental.

Analisando, agora, os resultados do bloco de amostras hidrolisadas com pepsina, percebe-se pelo gráfico de Pareto da concentração de C-PC (**Figura 30**) que nenhum polinômio das variáveis independentes selecionadas se mostrou significativo para o planejamento. Já a superfície de resposta gerada para essa mesma resposta (**Figura 31**) revela um ponto de mínimo em torno de 4 e 5 horas de reação, ou seja, a faixa onde os menores valores de concentração de C-PC seriam encontrados, enquanto revela um aumento nos valores de concentração de C-PC (até 0,55 mg/mL) para tempos abaixo de 1 hora, e um aumento similar para tempos maiores de 7 horas (até 0,45 mg/mL). A massa de pepsina não demonstrou comportamento significativo através dessa primeira superfície de resposta. As respostas com relação ao grau de pureza, iniciando com o gráfico de Pareto gerado (**Figura 32**), mostraram, novamente, que nenhum polinômio das variáveis foi significativo para as análises realizadas. Enfim, a superfície de resposta para essa resposta (**Figura 33**) revela, uma vez mais, um ponto de mínimo, dessa vez atrelado às duas variáveis independentes estudadas – tempo de reação e massa de pepsina – para valores de 2 a 3 horas, e abaixo do ponto central da massa de pepsina ($> 0,0030$ g). Percebe-se, também, que os melhores valores referentes ao grau de pureza, de acordo com essa mesma superfície de resposta, seriam encontrados para a combinação de tempo de reação mínimo com

o máximo de massa de pepsina, ou para um tempo de reação máximo combinado com uma massa de pepsina mínima.

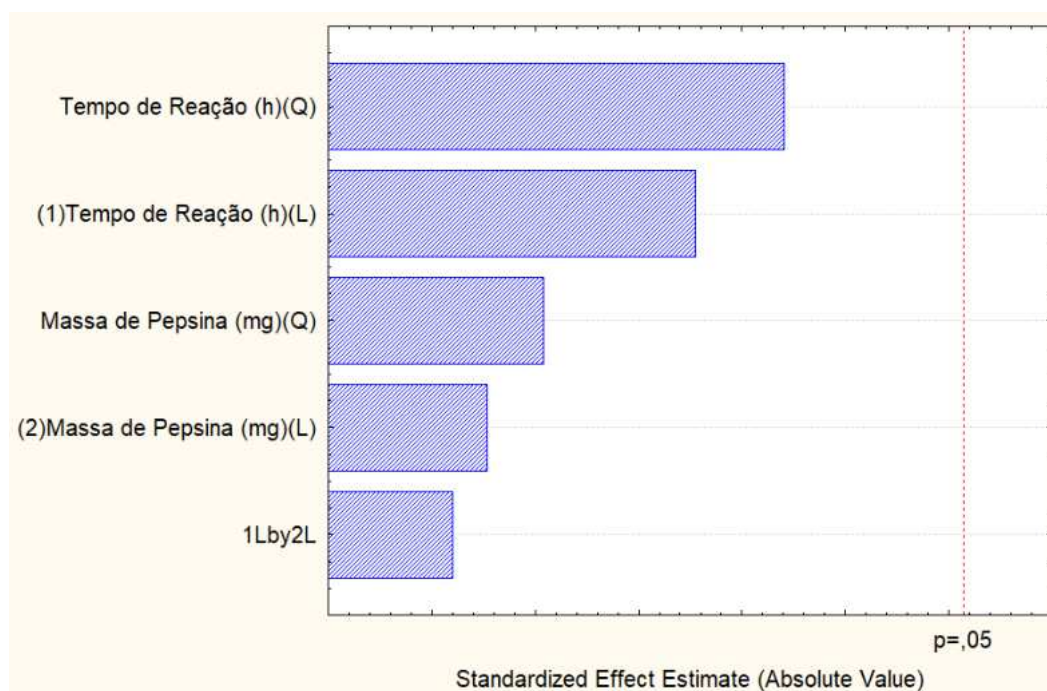


Figura 30: Gráfico de Pareto referente à concentração de C-PC (mg/mL), correlacionando, para o bloco da pepsina, a significância dos diferentes polinômios de cada variável independente do segundo planejamento experimental.

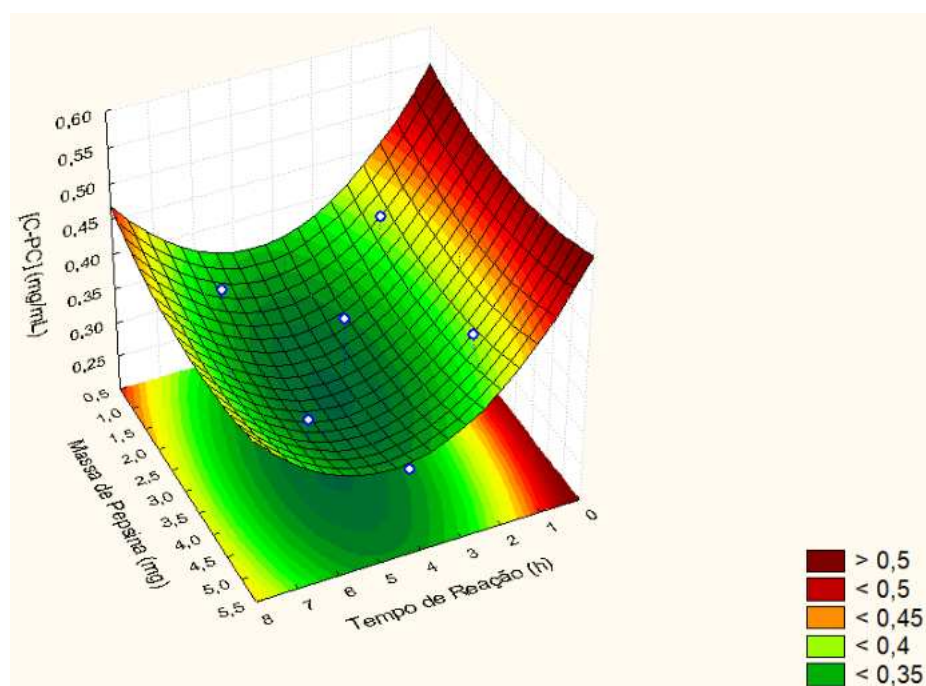


Figura 31: Superfície de resposta do tempo de reação (h) e da massa de pepsina (g), expressos em função da concentração final de C-PC (mg/mL), para o segundo planejamento experimental.

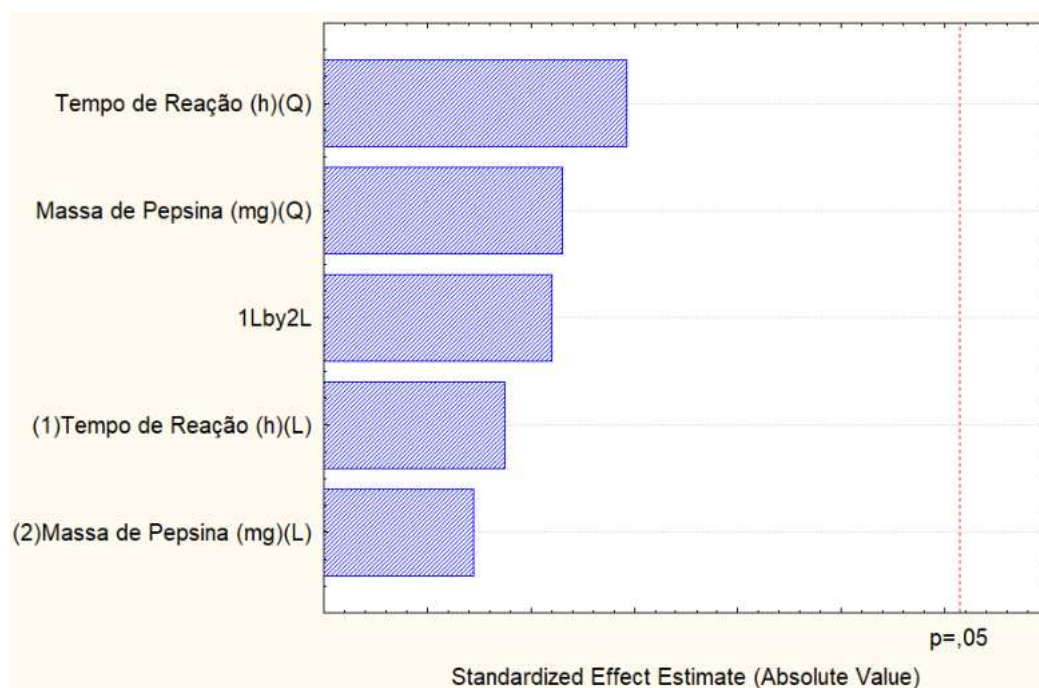


Figura 32: Gráfico de Pareto referente ao grau de pureza, correlacionando, para o bloco da pepsina, a significância dos diferentes polinômios de cada variável independente do segundo planejamento experimental.

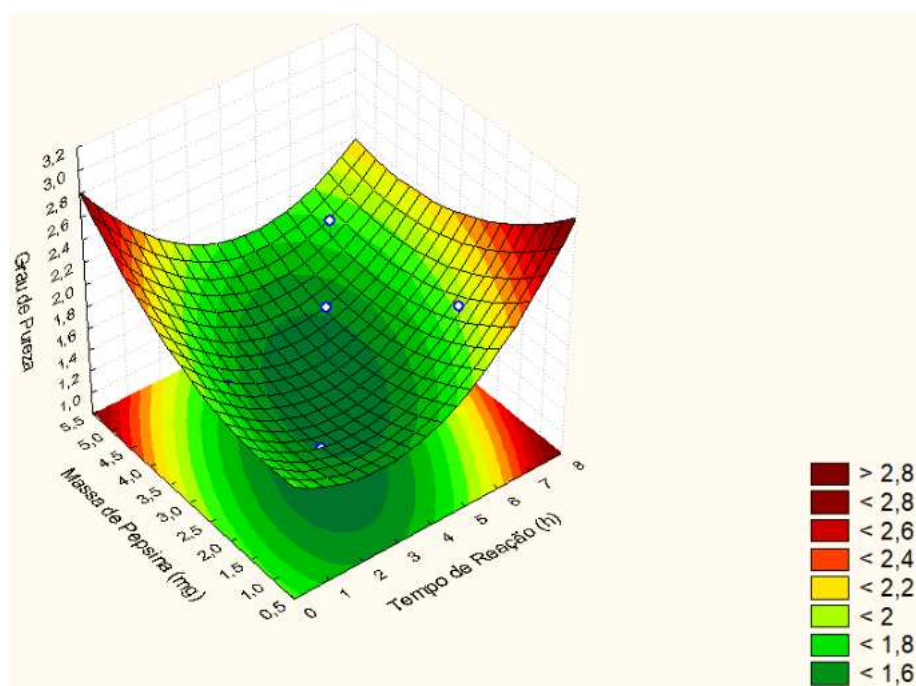


Figura 33: Superfície de resposta do tempo de reação (h) e da massa de pepsina (g), expressos em função do grau de pureza, para o segundo planejamento experimental.

5.2.3.3. Terceiro e quarto planejamento experimental

Os resultados do terceiro planejamento experimental, expostos na **Tabela 21** abaixo, foram obtidos apenas em função da concentração de C-ficocianina, devido a condições explicitadas no item 5.3.3.3 da seção Discussão à frente. Nota-se que os maiores valores obtidos para a concentração da ficobilina foram das amostras 5 e 7 com, respectivamente, 0,112 e 0,102 mg/mL.

Tabela 21: Conjunto amostral gerado para o terceiro planejamento experimental da reação de hidrólise enzimática, especificando cada parâmetro por amostra (tempo de reação (h) e massa de papaína (g)), bem como os respectivos resultados em função da concentração de C-PC (mg/mL).

Amostras	Tempo de Reação (h)	Massa de Papaína (g)	[C-PC] (mg/mL)
1	2,000	0,0087	0,082
2	2,000	0,0117	0,079
3	6,000	0,0087	0,066
4	6,000	0,0117	0,055
5	1,172	0,0102	0,112
6	6,828	0,0102	0,032
7	4,000	0,0051	0,102
8	4,000	0,0165	0,032
9 (C)	4,000	0,0102	0,052

10 (C)	4,000	0,0102	0,037
11 (C)	4,000	0,0102	0,038

A partir da réplica desse conjunto amostral, usando novos lotes de corante puro e de papaína, fez-se o quarto planejamento experimental. A partir dos resultados expostos na **Tabela 22**, destaca-se que as amostras com maiores valores de concentração de C-ficocianina foram, respectivamente, 5, 1 e 7, enquanto que para o grau de pureza as amostras com maiores valores foram 7, 5 e 1, respectivamente.

Tabela 22: Conjunto amostral gerado para o quarto planejamento experimental da reação de hidrólise enzimática, especificando cada parâmetro por amostra (tempo de reação (h) e massa de papaína (g)), bem como os respectivos resultados em função da concentração de C-PC (mg/mL) e do grau de pureza.

Amostras	Tempo de Reação (h)	Massa de Papaína (g)	[C-PC] (mg/mL)	Grau de Pureza
1	2,000	0,0087	1,014	1,228
2	2,000	0,0117	0,860	1,181
3	6,000	0,0087	0,619	0,823
4	6,000	0,0117	0,573	0,780
5	1,172	0,0102	1,087	1,350
6	6,828	0,0102	0,577	0,800
7	4,000	0,0051	0,963	1,391
8	4,000	0,0165	0,650	0,804
9 (C)	4,000	0,0102	0,736	0,940
10 (C)	4,000	0,0102	0,727	0,885
11 (C)	4,000	0,0102	0,857	1,131

Avaliando o gráfico de Pareto gerado para a concentração de C-PC (**Figura 34**), nota-se que os polinômios das variáveis que apresentaram significância para essa análise foram o tempo de reação linear e a massa de papaína linear. A partir da superfície de resposta gerada (**Figura 35**), percebe-se que os maiores valores de concentração de C-PC estão relacionados a menores valores de tempo de reação e de massa de papaína. Com relação ao gráfico de Pareto obtido para o grau de pureza (**Figura 36**), percebe-se que, assim como o gráfico apresentado na **Figura 34**, com relação à concentração de C-ficocianina, os polinômios das variáveis que apresentaram significância para esse planejamento foram o tempo de reação linear e a massa de papaína linear. Ainda, analisando a superfície de resposta apresentada na **Figura 37**, percebe-se, uma vez mais, que os maiores valores de grau de pureza estão ligados a menores valores de tempo de reação e massa de papaína. Por fim, o perfil de desejabilidade gerado para esse planejamento indica, através de regressão linear dos polinômios analisados, que os melhores

resultados das variáveis independentes de tempo de reação e de massa de papaína, com relação as duas respostas dependentes selecionadas, seriam com o menor valor de tempo de reação (1,2 horas ou 72 minutos, ponto -1,41) e com o valor de, aproximadamente, 0,0080 g de papaína (ponto -1).

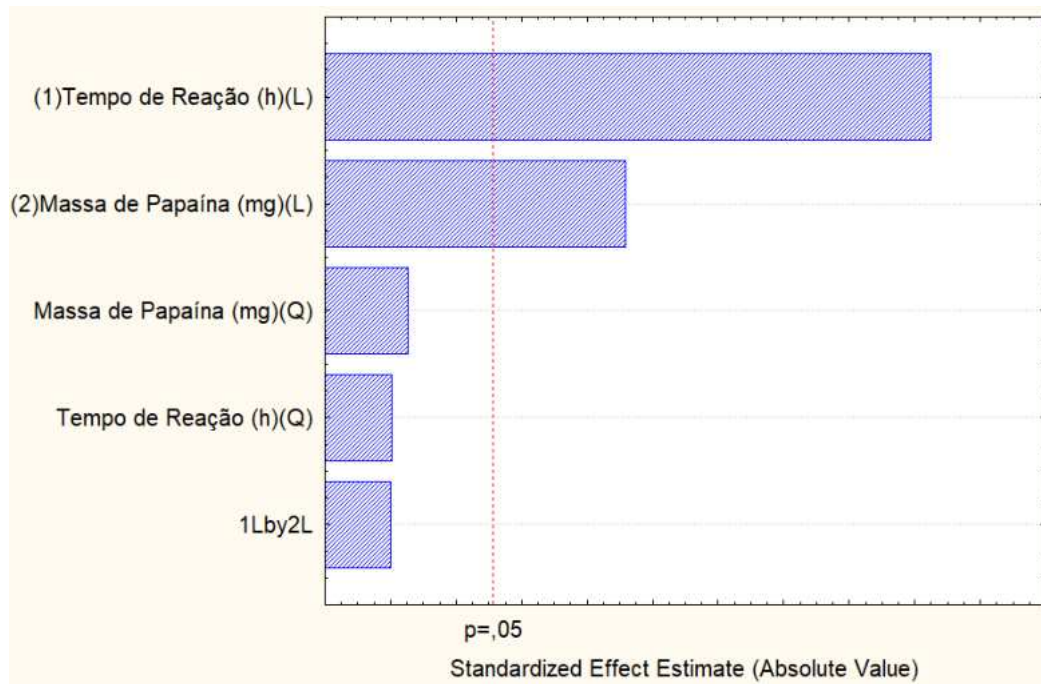


Figura 34: Gráfico de Pareto referente à concentração de C-PC (mg/mL), correlacionando a significância dos diferentes polinômios de cada variável independente do quarto planejamento experimental.

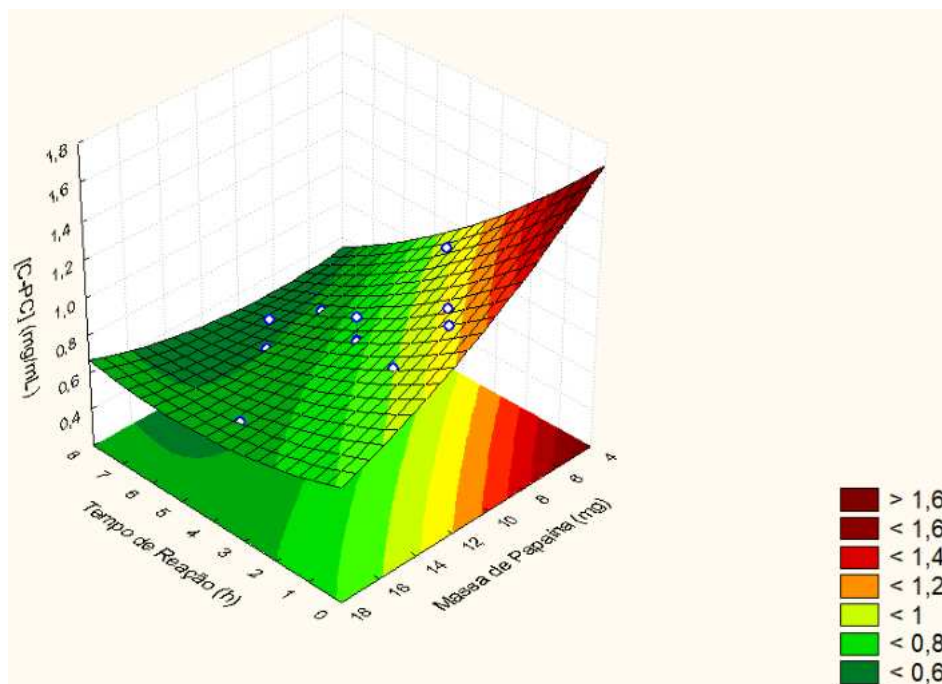


Figura 35: Superfície de resposta do tempo de reação (h) e da massa de papaína (g), expressos em função da concentração final de C-PC (mg/mL), para o quarto planejamento experimental.

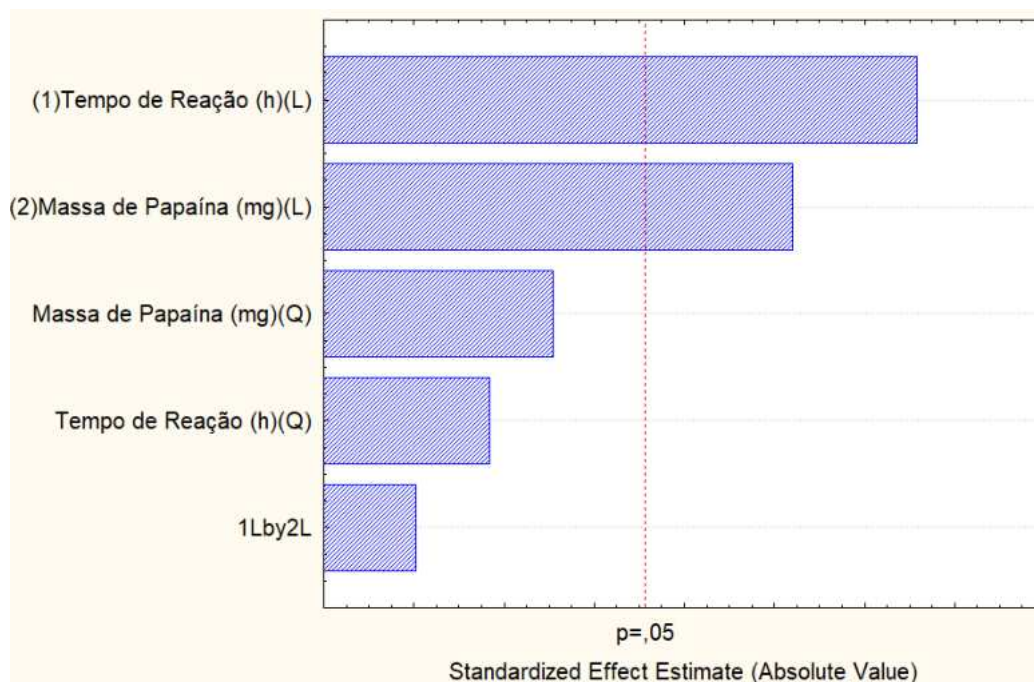


Figura 36: Gráfico de Pareto referente ao grau de pureza, correlacionando a significância dos diferentes polinômios de cada variável independente do quarto planejamento experimental.

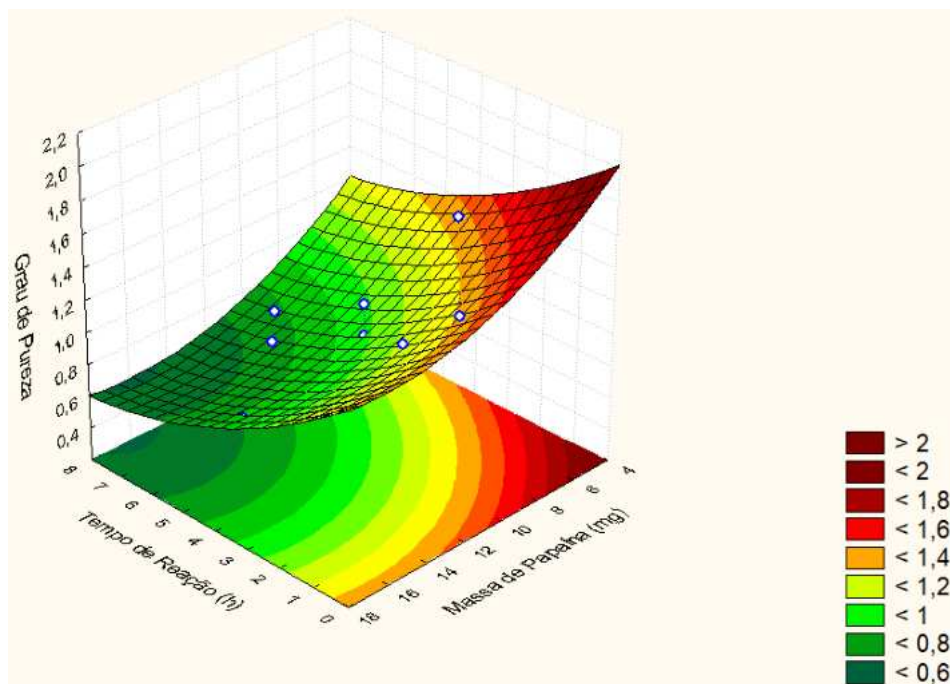


Figura 37: Superfície de resposta do tempo de reação (h) e da massa de papaína (g), expressos em função do grau de pureza, para o quarto planejamento experimental.

5.2.3.4. Quinto planejamento experimental

Para o quinto planejamento experimental, a partir dos resultados expostos na **Tabela 23**, destaca-se que as amostras com maiores valores de concentração de C-ficocianina foram, respectivamente, 7, 2 e 1, enquanto que para o grau de pureza as amostras com maiores valores foram 7, 5 e 1, respectivamente.

Tabela 23: Conjunto amostral gerado para o quinto planejamento experimental da reação de hidrólise enzimática, especificando cada parâmetro por amostra (tempo de reação (min) e massa de papaína (g)), bem como os respectivos resultados em função da concentração de C-PC (mg/mL) e do grau de pureza.

Amostras	Tempo de Reação (min)	Massa de Papaína (g)	[C-PC] (mg/mL)	Grau de Pureza
1	20	0,0087	1,609	0,696
2	20	0,0117	1,614	0,679
3	60	0,0087	1,439	0,624
4	60	0,0117	1,455	0,594
5	12	0,0102	1,549	0,698
6	68	0,0102	1,343	0,543
7	40	0,0051	1,626	0,713
8	40	0,0165	1,310	0,562
9 (C)	40	0,0102	1,526	0,642
10 (C)	40	0,0102	1,539	0,646
11 (C)	40	0,0102	1,407	0,624

Avaliando o gráfico de Pareto gerado para a concentração de C-PC (**Figura 38**), nota-se que os polinômios das variáveis que apresentaram significância para essa análise foram o tempo de reação linear e a massa de papaína linear. A partir da superfície de resposta gerada (**Figura 39**), percebe-se que os maiores valores de concentração de C-PC estão relacionados, novamente, a menores valores de tempo de reação e de massa de papaína, assim como é possível destacar um perfil mais próximo do ponto máximo de uma curva. Com relação ao gráfico de Pareto obtido para o grau de pureza (**Figura 40**), percebe-se que, assim como o gráfico apresentado na **Figura 38**, os polinômios das variáveis que apresentaram significância para esse planejamento foram o tempo de reação linear e a massa de papaína linear. Ainda, analisando a superfície de resposta apresentada na **Figura 41**, percebe-se, uma vez mais, que os maiores valores de grau de pureza estão ligados a menores valores de tempo de reação e massa de papaína. Por fim, o perfil de desejabilidade gerado para esse planejamento indica, através de regressão linear dos polinômios analisados, que os melhores resultados das variáveis independentes de tempo de reação e de massa de papaína, com relação as duas respostas dependentes selecionadas, seriam com o menor valor de tempo de reação (12 minutos – ponto -1,41) e com o valor de, aproximadamente, 0,0080 g de papaína (ponto -1).

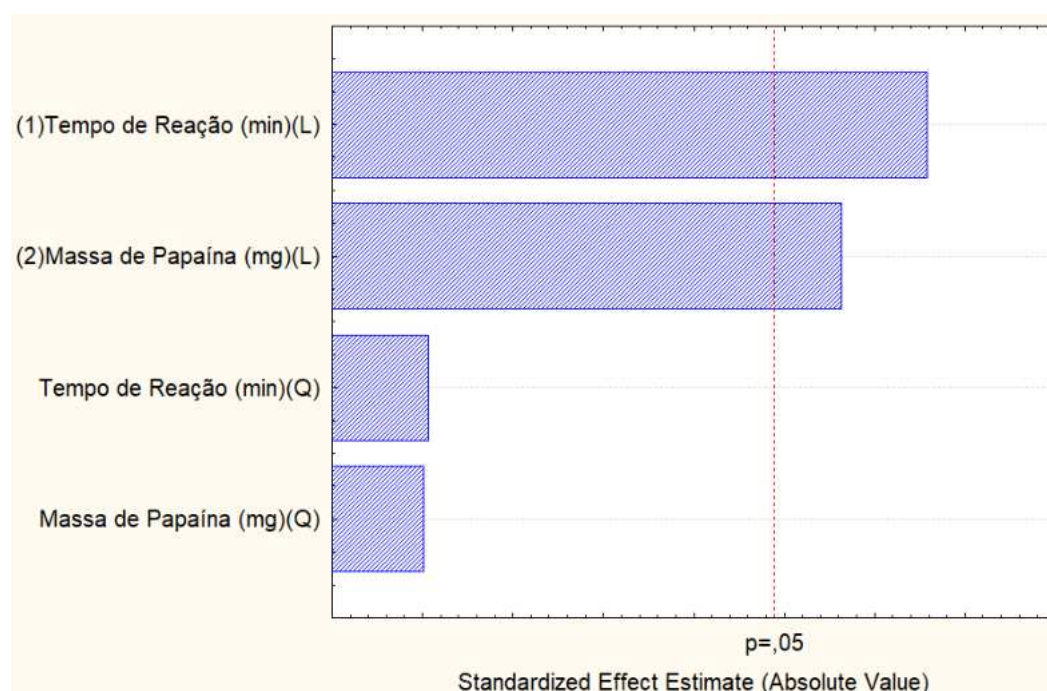


Figura 38: Gráfico de Pareto referente à concentração de C-PC (mg/mL), correlacionando a significância dos diferentes polinômios de cada variável independente do quinto planejamento experimental.

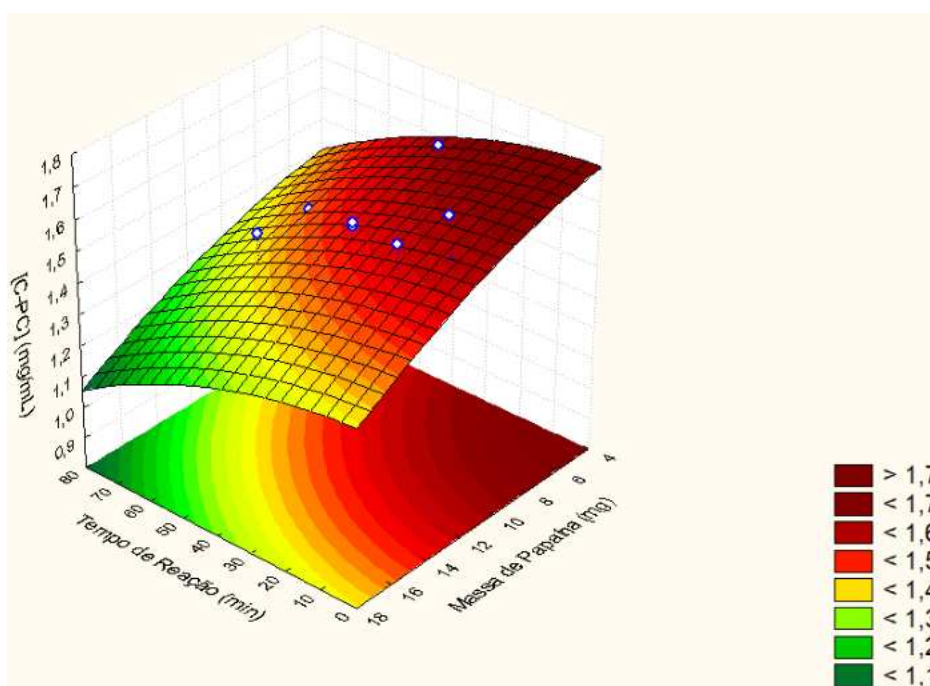


Figura 39: Superfície de resposta do tempo de reação (min) e da massa de papaína (g), expressos em função da concentração final de C-PC (mg/mL), para o quinto planejamento experimental.

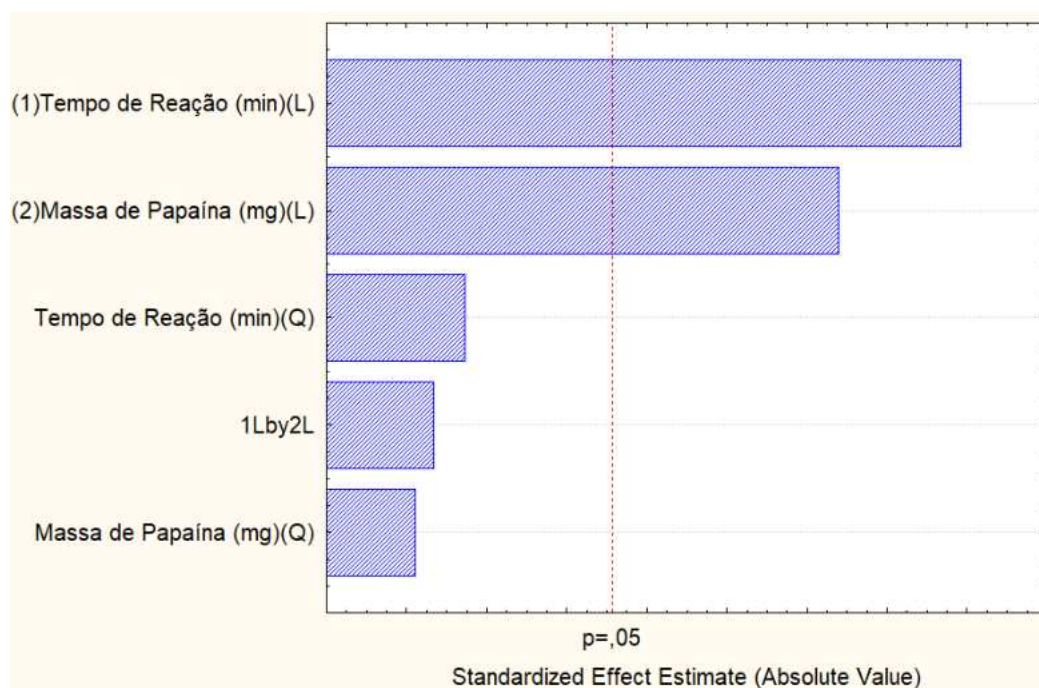


Figura 40: Gráfico de Pareto referente ao grau de pureza, correlacionando a significância dos diferentes polinômios de cada variável independente do quinto planejamento experimental.

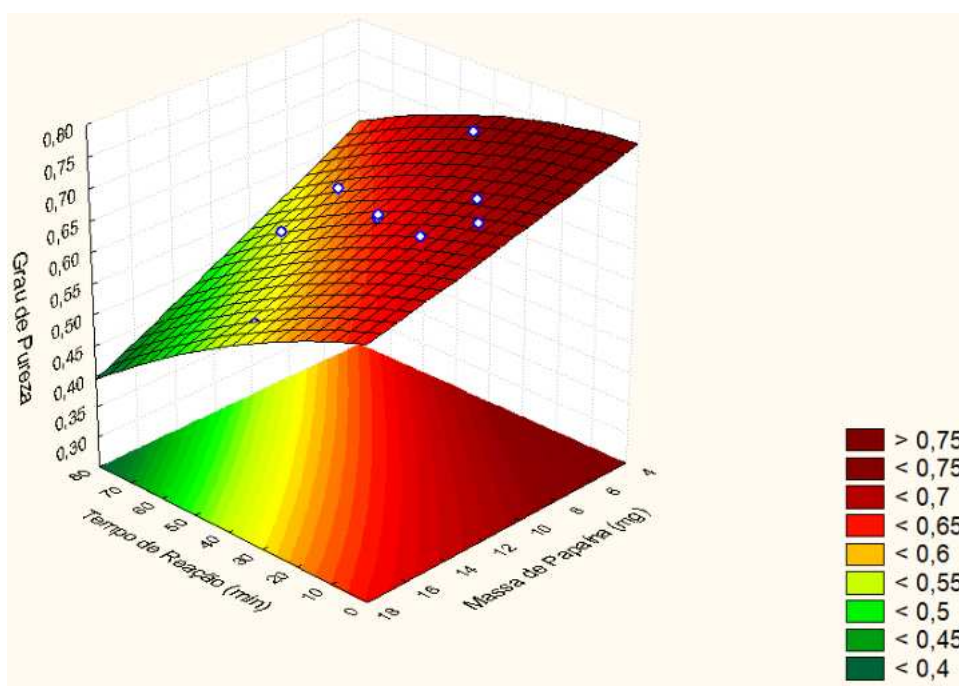


Figura 41: Superfície de resposta do tempo de reação (min) e da massa de papaína (g), expressos em função do grau de pureza, para o quinto planejamento experimental.

5.2.3.5. Sexto planejamento experimental

Para o sexto planejamento experimental, a partir dos resultados expostos na **Tabela 24**, destaca-se que as amostras com maiores valores de concentração de C-ficocianina foram, respectivamente, 2, 8 e 4, enquanto para o grau de pureza as amostras com maiores valores foram 8, 2 e 4, respectivamente.

Tabela 24: Conjunto amostral gerado para o sexto planejamento experimental da reação de hidrólise enzimática, especificando cada parâmetro por amostra (tempo de reação (min) e massa de C-PC (g)), bem como os respectivos resultados em função da concentração de C-PC (mg/mL) e do grau de pureza.

Amostras	Tempo de Reação (min)	Massa de C-PC (g)	[C-PC] (mg/mL)	Grau de Pureza
1	10 min	0,01000	0,149	0,465
2	10 min	0,03000	0,431	0,786
3	30 min	0,01000	0,173	0,525
4	30 min	0,03000	0,427	0,767
5	6 min	0,02000	0,339	0,648
6	34 min	0,02000	0,334	0,632
7	20 min	0,00590	0,108	0,467
8	20 min	0,03410	0,430	0,809
9 (C)	20 min	0,02000	0,334	0,659

10 (C)	20 min	0,02000	0,339	0,671
11 (C)	20 min	0,02000	0,347	0,666

Avaliando o gráfico de Pareto gerado para a concentração de C-PC (**Figura 42**), nota-se que os polinômios que apresentaram significância para essa análise foram o linear e quadrático da massa de C-ficocianina. A partir da superfície de resposta gerada (**Figura 43**), percebe-se que os maiores valores de concentração de C-PC estão relacionados a maiores valores de massa de C-ficocianina, enquanto não apresentam grande variação com relação ao tempo de reação. Com relação ao gráfico de Pareto obtido para o grau de pureza (**Figura 44**), percebe-se que somente o polinômio linear da massa de C-PC apresentou significância para esse planejamento. Ainda, analisando a superfície de resposta apresentada na **Figura 45**, percebe-se, que os maiores valores de grau de pureza estão ligados, novamente, a maiores valores de massa de C-ficocianina, sendo possível notar, também, uma leve curvatura com relação ao tempo de reação, indicando melhores valores para o ponto central (20 minutos). Por fim, o perfil de desejabilidade gerado para esse planejamento indica, através de regressão linear dos polinômios analisados, que os melhores resultados das variáveis independentes de tempo de reação e de massa de C-ficocianina, com relação as duas respostas dependentes selecionadas, seriam com o valor médio de tempo de reação (20 minutos – ponto 0) e com o valor de, aproximadamente, 34 mg de C-ficocianina (ponto +1,41).

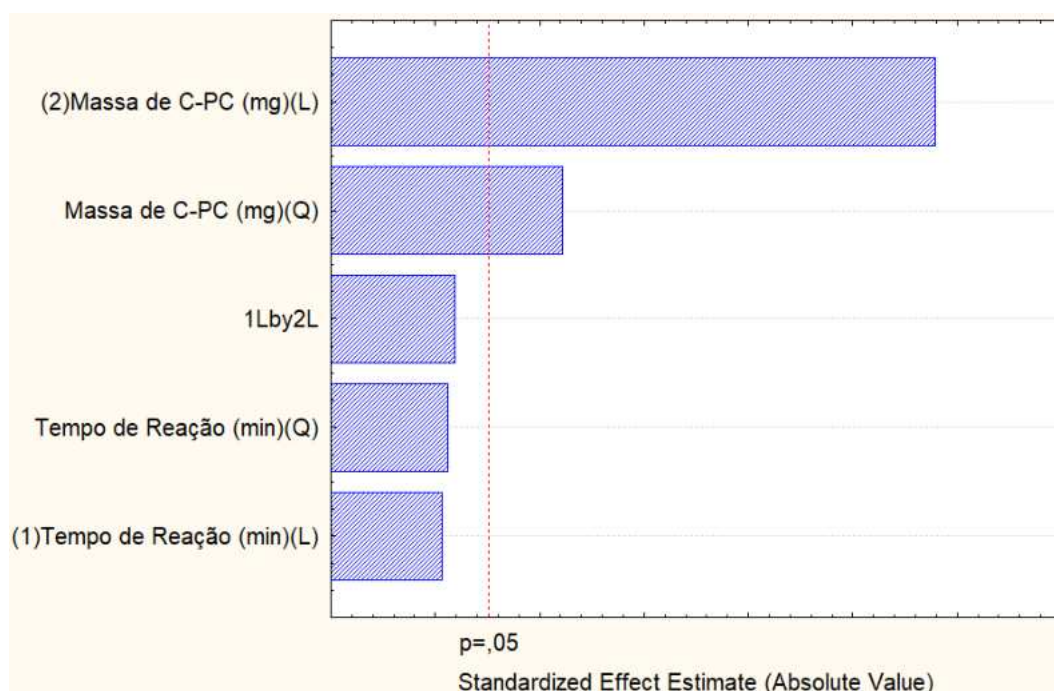


Figura 42: Gráfico de Pareto referente à concentração de C-PC (mg/mL), correlacionando a significância dos diferentes polinômios de cada variável independente do sexto planejamento experimental.

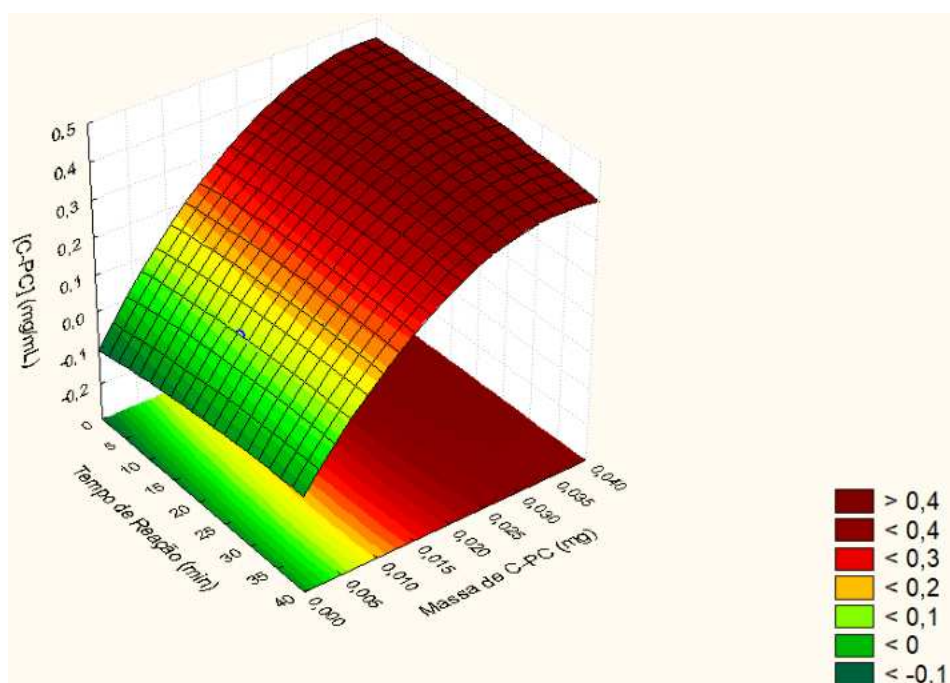


Figura 43: Superfície de resposta do tempo de reação (min) e da massa de C-ficocianina (g), expressos em função da concentração final de C-PC (mg/mL), para o sexto planejamento experimental.

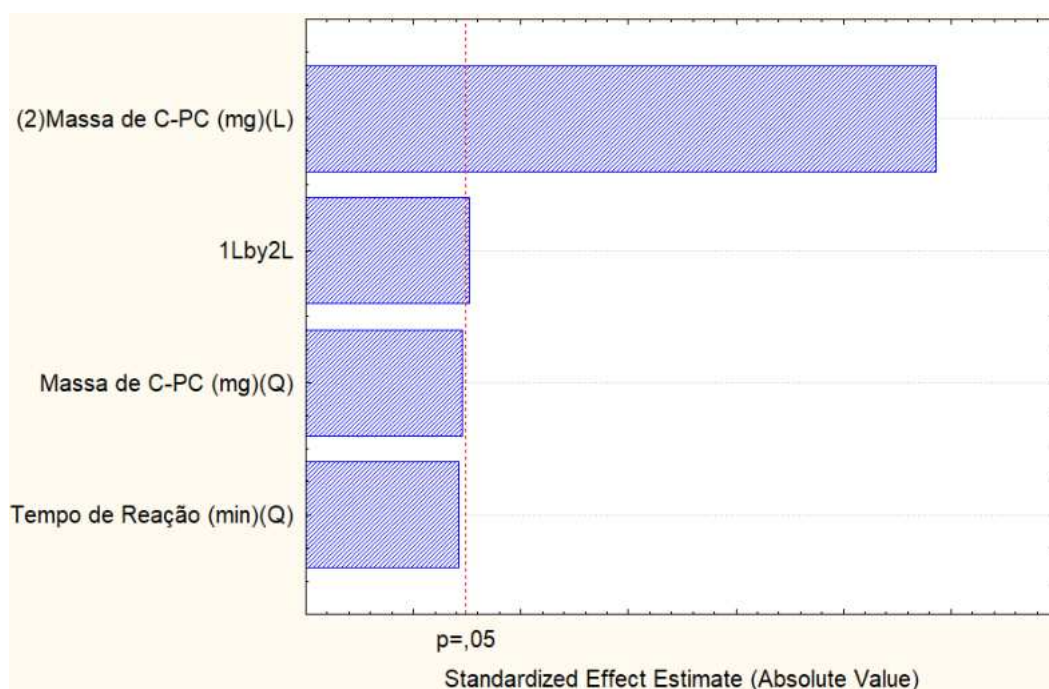


Figura 44: Gráfico de Pareto referente ao grau de pureza, correlacionando a significância dos diferentes polinômios de cada variável independente do sexto planejamento experimental.

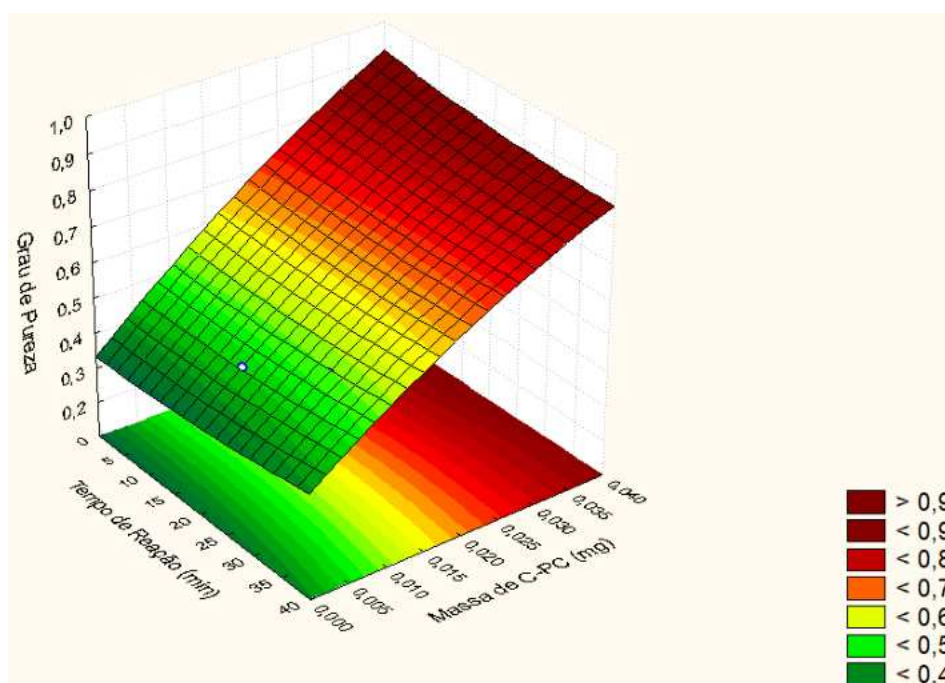


Figura 45: Superfície de resposta do tempo de reação (min) e da massa de C-ficocianina (g), expressos em função do grau de pureza, para o sexto planejamento experimental.

5.2.4. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida

A partir da análise do perfil de bandejamento dos padrões e amostras, apresentados na **Figura 46**, percebe-se a presença de duas bandas características da C-ficocianina, a primeira com massa molecular de aproximadamente 150 kDa e a segunda de aproximadamente 75 kDa (poço 2). Além disso, nota-se uma banda, referente ao padrão de papaína, entre as massas de 20 kDa e 25 kDa (poço 3). Já para as bandas das amostras (poços 4 à 9), não estão presentes as bandas características da C-ficocianina, enquanto que é notável a presença da banda característica da papaína em todas os poços de amostras. Enfim, apesar do padrão de bandas de menor massa molecular das amostras se mostrar pouco definido, nota-se uma semelhança no perfil apresentado para todas as amostras.

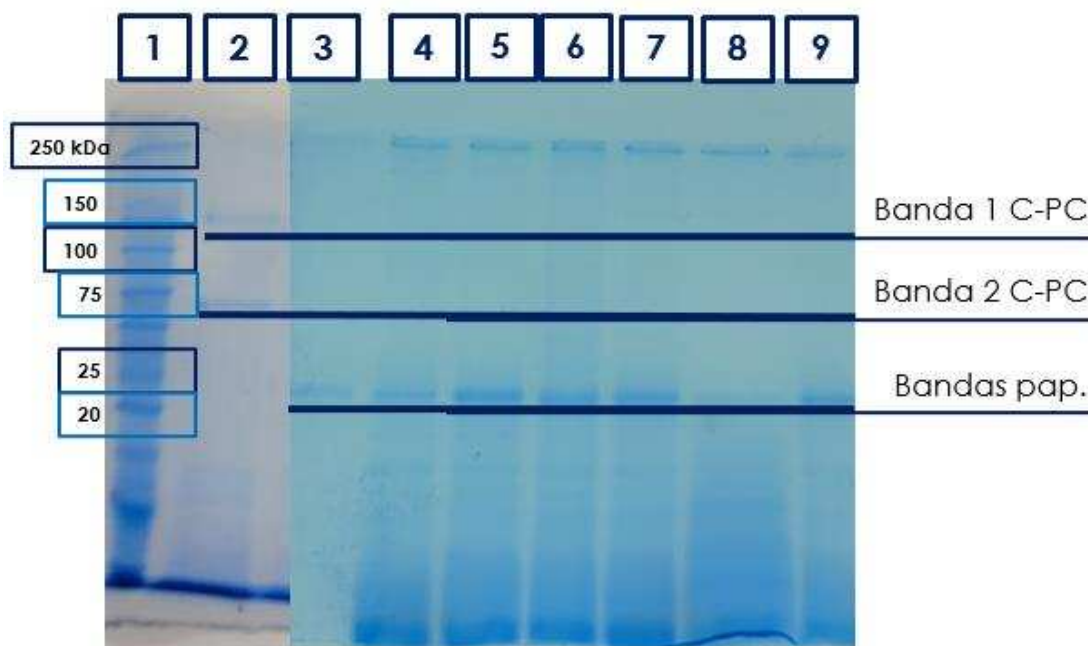


Figura 46: Gel de poliacrilamida contendo 9 poços, sendo estes: 1 – padrão de massas moleculares; 2 – padrão de C-ficocianina; 3 – padrão de papaína; poços 4 à 9 – amostras de C-ficocianina digerida com papaína com tempo inicial de 30 minutos (poço 4), aumentando com incrementos de 30 minutos para cada poço subsequente (5 – 60, 6 – 90, 7 – 120, 8 – 150 e 9 – 180). Também são destacadas as bandas referentes aos padrões de C-ficocianina e papaína.

5.3. Discussão

5.3.1. Extração de C-ficocianina

Como discutido no item 4.3.5 da discussão do capítulo 1, um dos métodos de extração de maior robustez e facilidade de aplicação, em escala laboratorial, é o que aplica ciclos de congelamento e descongelamento (BERROUANE *et al.*, 2022; JAESCHKE *et al.*, 2021). Esse método, acoplado com o uso de sais tamponantes para manter o pH em condições ótimas para estabilidade do corante e aumentar a força iônica, oferece alguns dos melhores resultados observados na literatura a partir da quebra das células da microalga pelos microcristais de gelo lentamente formados ao longo das 24 horas de congelamento e pelo gradiente de concentração gerado pelos sais em solução, melhor disponibilizando o pigmento para o meio de extração (SARADA *et al.*, 1999; SILVEIRA *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2016; WICAKSONO *et al.*, 2019). Assim, sendo esse o método ideal para o escopo desse trabalho, a caracterização do corante extraído mostrou valores de concentração (2,72 mg/mL) e pureza (0,790) adequados para a quantidade e intensidade de cor necessária, bem como para a aplicação no setor alimentício, sem a necessidade de posterior processo de purificação, apresetando, ainda, alto rendimento de extração (43%) quando comparado com outras técnicas de extração (SUN *et al.*, 2023; JAESCHKE *et al.*, 2021).

5.3.2. Estratégias para estabilização da C-ficocianina em pH ácido

A adição de compostos a fim de garantir maior estabilidade para o corante em questão é amplamente estudada, como discutido na seção 4.3.9, do capítulo I. A revisão de Jaeschke *et al.* (2021) apresenta a maioria dos aditivos químicos com função tamponante, ou seja, compostos que mantêm o pH em condições próximas do ideal para a C-ficocianina. Entretanto, visto que, para os escopos do presente trabalho, a alteração do pH da matriz de interesse não é uma opção, considerou-se outra abordagem teórica: o efeito *salting-in*. Esse efeito tem como base a alteração da força iônica do meio, que afeta como as moléculas do solvente, nesse caso a água, interagem entre si e como formam a camada de solvatação em torno das proteínas no meio (JENKINS, 1998), buscando aumentar a solubilidade das mesmas. É importante ressaltar, no entanto, que a adição de diferentes íons em um dado sistema pode ocasionar, também, o efeito conhecido como *salting-out*, cuja consequência é exatamente a oposta, ou seja, diminuindo a solubilidade das proteínas em questão.

O sistema em questão, por ter pH ácido, possui grande concentração de íons hidrônio (H_3O^+). Assim sendo, a própria característica de baixa solubilidade de C-ficocianina nessas condições pode ser atribuída, entre outros fatores, ao efeito *salting-out*. Com isso, foi proposta a adição de componentes permitidos para aplicação em alimentos e bebidas (ANVISA, 2023a; ANVISA, 2023b), como NaCl, $CaCl_2$ e $MgSO_4$ (JAESCHKE *et al.*, 2021; JENKINS, 1998), no sistema composto por bebida e corante, seguindo a mesma lógica para a adição de glicose e sorbitol (BRAGA *et al.*, 2016), a fim de aumentar a solubilidade do corante nesse sistema.

Entretanto, os resultados obtidos indicaram que o aumento da força iônica na condição ácida em questão gerou pouco ou nenhum efeito positivo na solubilidade do corante. Para todos os aditivos em todas as concentrações, com exceção de NaCl 33%, houve a predominância do efeito *salting-out*, impossibilitando a coloração da bebida e causando precipitação do corante estruturalmente alterado pelo pH da solução. Apesar do resultado positivo, ao longo de 2 dias, da adição de NaCl 33% em bebida ácida contendo o corante, essa alta concentração do sal não é interessante para uma bebida gaseificada comercial.

Como descrito por Jespersen *et al.* (2004), as condições ótimas de temperatura, pH e luz para manter a C-ficocianina estável em dado sistema são atribuídas as propriedades das proteínas ancoradas ao cromóforo dessa molécula. Assim, estratégias visando retirar parte das cadeias proteicas dessa molécula e, assim, aumentar seu grau de pureza associado (ABALDE *et al.*, 1998), poderiam oferecer bons resultados para a estabilidade do corante em condições adversas de pH. Então, foi proposta a reação de hidrólise ácida da ficobiliproteína como uma dessas estratégias que, mesmo causando possível degradação parcial de algumas propriedades do corante, seria viável para o escopo do presente trabalho. O uso de ácido tricloroacético (TCA) foi empregado pela sua recorrência na literatura em torno dessa reação aplicado à proteínas e preparos enzimáticos diversos com fins de consumo humano (ARISTOY; TOLDRÁ, 1991; GREENBERG; SHIPE, 1979; YVON; CHABANET; PÉLISSIER, 1989).

Entretanto, após a reação, foi observada a degradação completa do corante, que não se mostrou solúvel em pH ácido ou neutro. Esse fato pode ser explicado pela capacidade dissociativa do TCA, um ácido orgânico forte (PERLMUTTER-HAYMAN; TAPUHI, 1977), que, mesmo em 1 hora de reação, causou alteração estrutural de toda a molécula de C-ficocianina, desde a porção proteica, até o ficocianobilina com capacidade colorífica.

Como discorrem Sun *et al.* (2023) e Thevarajah *et al.* (2022), a encapsulação de C-PC é outra estratégia de grande potencial tecnológico para melhorar diversos aspectos da estabilidade desse corante. Devido à menor complexidade do método descrito por Gustiningtyas *et al.* (2020) em comparação com outros apresentados na literatura, a metodologia de despolimerização da quitosana, para torná-la solúvel em água, seguido da reação de encapsulação do corante foi a escolhida. Usando ciclos de exposição à luz com comprimentos de onda na região do ultravioleta, são obtidos os monômeros do polissacarídeo quitosana, permitindo sua reação em solução aquosa que, por sua vez, evita o uso de solventes orgânicos e adição de passivos ambientais no processo. Uma vez disponibilizado em solução aquosa, os monômeros de quitosana agem como encapsulantes na presença de tripolifosfato de sódio como *cross-linker*, formando nanopartículas de quitosana rico em corante (GUSTININGTYAS *et al.*, 2020).

Já que no presente trabalho não foi feita análise alguma em torno do tamanho das partículas formadas, não é possível afirmar que o encapsulamento aconteceu dimensionado em nanômetros. Entretanto, o êxito do processo de encapsulação foi confirmado por varredura feita entre 500 nm e 700 nm, observando certa diminuição na absorbância da amostra de C-ficocianina encapsulada em seu comprimento de máxima absorção, quando comparada com amostras de C-PC “livres”. Dessa forma, as partículas de quitosana ricas em corante foram adicionadas à bebida de pH ácido, resultando em uma solução estável e sem precipitados ao longo do período de observação. No entanto, a capacidade colorífica do corante foi reduzida pela encapsulação que, além disso, tornou a solução turva, ou seja, impossibilitando a sua aplicação para os objetivos do presente trabalho de colorir bebida ácida, apesar do sucesso na estabilidade em condições adversas de pH.

Segundo a RDC N° 728 (ANVISA, 2022), que regula sobre “[...] enzimas e preparações enzimáticas para uso como coadjuvantes de tecnologia na produção de alimentos destinados ao consumo humano”, é permitido o uso das enzimas previamente selecionadas (pepsina, papaína e tripsina) sob o pretexto de aplicação na bebida com finalidade tecnológica. Assim sendo, essas três foram selecionadas pelas suas condições ótimas, ou seja, as faixas de pH e temperatura nas quais possuem maior atividade.

A pepsina, protease presente no suco gástrico de inúmeros animais, incluindo o ser humano, é amplamente aplicada e estudada no setor alimentício, mas não apenas limitada a ele

(FRUTON, 2002). Por estar presente em matriz naturalmente ácida, sua solubilidade e atividade em pH entre 1 e 5 é de grande interesse para esse trabalho, bem como sua temperatura ótima, que, seguindo a lógica da temperatura média do corpo humano, deveria estar entre 36 °C e 37 °C (FRUTON, 1970). Ademais, os trabalhos de Fruton (1970; 2002) revelam ampla atividade clivando fragmentos de cisteína, o qual se apresenta justamente na ligação do tipo tioéster das cadeias proteicas com o cromóforo da C-ficocianina (STANIC-VUCINIC, 2018), justificando assim sua escolha para reação de hidrólise enzimática.

Com relação à papaína, enzima naturalmente presente no mamão (*Carica papaya L.*), seu uso é comum como aditivo amaciante de carnes, justamente pela sua característica proteolítica (AMRI; MAMBOYA, 2012). Ainda, Amri e Mamboya (2012) relatam sua especificidade para quebra de ligações peptídicas envolvendo a cisteína, que, novamente, se adequa aos interesses do presente trabalho. Por fim, destaca-se sua ampla faixa de atividade em pH ácidos, neutros e alcalinos (3,0 – 9,0), bem como sua atividade ótima associada a temperatura ambiente, que se adequa as necessidades desse trabalho.

Sobre a tripsina, também presente no corpo humano, especificamente no intestino, Huber e Bode (1978) e Rick (1974) são exemplos dos estudos amplos em torno da caracterização e aplicação da protease. Apesar da sua faixa ótima de pH para sua ativação (7,0 – 9,0) (RICK, 1974), por apresentar alta atividade à temperatura ambiente, essa foi outra das opções de enzima selecionadas.

Como discutido no primeiro capítulo desse projeto, são poucos os estudos recentes que abordam a hidrólise enzimática como estratégia para aprimorar a estabilidade de C-ficocianina. Assim, diversas massas das enzimas foram aplicadas nas amostras, apresentadas na **Tabela 4**, referentes à proporções entre substrato e enzima previamente determinados, visto que a proporção seria um dos principais parâmetros a se avaliar nesse estudo. Outro parâmetro fundamental é o tempo de reação, já que esse representa, além do custo envolvido no processo, a eficiência do mesmo com relação à hidrólise do corante. A temperatura, por outro lado, é limitada pelo corante, que acima de 40 °C apresenta alta degradação térmica, assim como pelas proteases, que foram selecionadas com base na atividade em baixas temperaturas, sendo essa fixada em 37 °C para todo o escopo desse trabalho. Enfim, visto que o corante e todos os outros componentes desse trabalho são compostos solúveis em água, nesse primeiro momento, decidiu-se por utilizar água destilada como matriz da reação.

Assim, uma vez finalizada a reação de hidrólise enzimática, as amostras foram adicionadas à bebida e sua estabilidade em pH ácido foi analisada qualitativamente. Resultados indicaram como positiva a teoria inicial de maior estabilidade atribuída a maiores valores de grau de pureza das amostras, visto que todas, exceto as tratadas com tripsina, mantiveram sua cor e não apresentaram formação de precipitado para os primeiros 5 dias observados. Portanto, dentre todas as estratégias previamente discutidas, a hidrólise enzimática apresenta-se com maior potencial para cumprir com os objetivos do presente trabalho.

5.3.3. Hidrólise enzimática

Após os resultados de testes envolvendo diferentes estratégias, abordados no item anterior desse capítulo, decidiu-se por repertir as análises em torno da reação de hidrólise enzimática a fim de reduzir a ampla faixa de parâmetros da reação e seus valores associados. Ainda, buscando explorar duas possíveis faixas de valores distantes entre si, justifica-se a escolha por tempos de reação de 1 e 24 horas, visando entender qual desses valores apresentaria potencial para estudos mais profundos. Vale salientar, ainda, que, com relação à faixa de trabalho escolhida para o parâmetro de massa de enzimas (0,001 e 0,0005 g), dois fatores foram essenciais para a escolha da faixa de trabalho: o desejo por um método barato e a falta de literatura envolvendo essa metodologia de tratamento enzimático aplicada à estabilidade do corante, como citado anteriormente. Isto é, quanto menor a quantidade de reagentes usados para alcançar o objetivo desse projeto, menor o custo da técnica desenvolvida (THEVARAJAH *et al.*, 2022) e, também, por ser tratar de uma reação de clivagem de fragmentos proteicos de um composto contendo quantidades significativas de proteínas, uma atividade enzimática elevada poderia resultar na degradação completa do corante, impedindo sua ação colorante na bebida.

Com isso, os resultados da primeira sequência desses testes (**Tabela 4**) seguem um padrão previsível com relação às proteases selecionadas, no qual as únicas amostras em que o corante apresentou instabilidade na bebida foram, novamente, as que usaram tripsina em seu tratamento. Isso pode ser explicado pela baixa atividade dessa enzima no pH da matriz da reação, água destilada, em torno de 6,0 (RICK, 1974). Entretanto, a obtenção de respostas positivas para amostras tratadas com pepsina e papaína, e em ambos os tempos de reação e quantidades de enzima, revela que a análise qualitativa é insuficiente para determinar quais condições aproximam-se das ótimas, encaminhando, assim, para a segunda sequência dos testes preliminares com mudanças nos parâmetros analisados (**Tabela 5**).

Seguindo, agora, com a exclusão da tripsina, visto que sua atividade em pH ácido é classificada como baixa (HUBER; BODE, 1978; RICK, 1974), e mantendo fixo em 24 horas o tempo de reação, a segunda etapa dos testes preliminares foi proposta objetivando a análise quantitativa das amostras, assim como a obtenção de mais clareza nos dados sobre a massa de enzima aplicada. Nesse sentido, o Grau de Pureza de cada amostra proveniente das diferentes condições reacionais – sendo essas a enzima utilizada, a matriz da reação e a massa de enzima – foi medido após as 24 horas de reação. Sobre o grau de pureza, apresentado na **Equação 2** do item 5.1.2, esse é um parâmetro que analisa a proporção de cromóforo (A_{620}) e proteínas (A_{280}) na composição de C-ficocianina, ou seja, é uma razão dessas duas parcelas que revela um maior grau de pureza quanto menor for a presença de proteínas com relação ao cromóforo.

Nesse momento, esperava-se, através de tal medida, traçar a correlação previamente teorizada de que quanto maior o grau de pureza observado, ou seja, quanto mais fragmentos proteicos fossem clivados e retirados da composição do corante, melhor será sua estabilidade em condições de pH ácido. Dessa forma, mantinha-se em voga a ideia inicial de que, estruturalmente, as principais causadoras da instabilidade desse composto eram, de fato, as proteínas covalentemente ligadas ao cromóforo. Ao passo que o projeto se desenvolveu com maior maturidade, foi determinado, como será abordado através dos resultados subsequentes, que essa medida de proporção entre cromóforo e proteína não deve ser a única considerada para os objetivos do presente estudo.

Com relação à seleção e modificação dos parâmetros analisados nessa segunda etapa de testes preliminares, além das citadas anteriormente, têm-se a análise da reação em matriz diferente da aquosa e, também, a ampliação da faixa de valores de massa de enzima aplicada. A primeira tem como motivação a busca, primeiramente, pela economia de etapas de um aspirado processo em escala industrial. Isto é, uma vez comprovada a eficiência da reação ocorrida diretamente na bebida, faz-se desnecessária a etapa de adição do corante após tratamento e, assim, ganham-se vantagens da concepção do processo (THEVERAJAH *et al.*, 2022). Já a última mudança foi tomada em razão da resposta generalizada e, portanto, insuficiente da primeira sequência de testes em torno da hidrólise enzimática (**Tabela 17**), cujos resultados falharam em determinar qual valor de massa de protease e de tempo de reação mais se aproxima do otimizado. Por conseguinte, decidiu-se por fixar o tempo de reação, em um

primeiro momento, e avaliar com mais detalhes uma gama maior de valores de massas os quais, variando, agora, de 0,5 mg até 10 mg de enzima.

Conseqüentemente, dado o contexto das escolhas tomadas para essa etapa de testes, analisando os resultados em função do grau de pureza (**Tabela 18**), percebe-se que, em valores absolutos, os resultados obtidos para as amostras tratadas com a pepsina em água são os maiores, para todas as massas de enzima usadas; o maior grau de pureza obtido foi da amostra tratada com 5,0 mg de pepsina em água (1,664), seguido pela amostra tratada com 1,0 mg de pepsina em água (1,663), com valor estatisticamente igual. Salvo a amostra hidrolisada com 10,0 mg de papaína em bebida, todas as amostras cujas reações ocorreram diretamente na bebida resultaram em valores menores que as amostras de mesma massa enzimática hidrolisadas em água. Ademais, todas as reações catalisadas pela pepsina apresentaram valores superiores às amostras que reagiram com papaína.

Em vista desses resultados e da discussão anterior sobre a atividade das enzimas nas condições de pH e temperatura, esses dois parâmetros, ajustados para as limitações existentes, não seriam suficientes para explicar os menores valores obtidos para amostras hidrolisadas em bebida. Teoriza-se, portanto, sobre a disponibilidade do substrato em questão, ou seja, sendo a bebida uma matriz complexa e saturada de componentes de diferentes funções tecnológicas e sensoriais, é possível que tenha havido menor disponibilidade do substrato para as proteases, do que a reação em água destilada. Assim, novos parâmetros determinaram-se válidos para investigação, enquanto a protease e a matriz da reação, avaliados nessa segunda etapa de testes, puderam ser fixados a partir dos planejamentos experimentais seguintes.

5.3.3.1. Primeiro planejamento experimental

Uma vez determinados alguns dos parâmetros essenciais para os objetivos desse estudo, a metodologia de delineamento composto central (DCC) foi adotada para o primeiro planejamento experimental proposto. Essa metodologia é um planejamento fatorial de segunda ordem, ou seja, considera em sua regressão linear a interação entre os fatores escolhidos para uma dada resposta, segundo uma distribuição polinomial segundo a **Equação 3** (MONTGOMERY, 2012), abaixo.

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \epsilon \text{ (Equação 3)}$$

Assim, atribui-se às variáveis independentes uma faixa de valores, em torno de um ponto central, a fim de construir o espaço amostral quadrático determinado pelo *software*. Dessa forma, o conjunto de amostras possui um número mínimo, com diferentes combinações entre as variáveis independentes (parâmetros e condições nas quais seria realizado o experimento), para fornecer o máximo de resultados correlacionados às variáveis dependentes (respostas obtidas das amostras após o experimento em torno dos parâmetros previamente determinados) (MONTGOMERY, 2012).

Nessa etapa do projeto, os parâmetros selecionados para análise, leia-se, as variáveis independentes, foram o tempo de reação, a massa de pepsina e a concentração de C-ficocianina. A primeira dessas foi escolhida com o objetivo de retomar a investigação, agora com amparo estatístico, em torno da sua condição ótima, visto que a duração durante a qual a reação ocorre é de suma importância para a estruturação eficiente de um processo em escala industrial. À massa de enzima são conferidos, dessa vez, valores abaixo do menor valor de massa testado anteriormente, variando de 0,15 mg a 0,50 mg de pepsina, devido ao ótimo resultado obtido no extremo inferior da faixa de massas analisado. No caso da concentração de C-ficocianina, foi decidida a inclusão dessa variável visando determinar, se houver, uma diferença entre a concentração inicial e a concentração final do corante nas amostras. Enfim, todas as amostras preparadas em torno dos parâmetros citados foram conectadas às respostas, ou variáveis dependentes, de grau de pureza e concentração de C-ficocianina (mg/mL).

No entanto, é importante ressaltar uma inconsistência na escolha dos fatores independentes que, em realidade, apresentavam significativa dependência, especificamente com referência à concentração de C-ficocianina e à proporção C-PC:Enzima. Tal escolha constitui-se como um erro, pois, ao atribuir valores variáveis à um parâmetro que serve de base para determinar outro dos fatores analisados, têm-se, além da dependência entre esses, a variação para além do que a metodologia de *design* experimental fatorial abarca. Outra ressalva, ainda com relação às escolhas dos parâmetros trabalhados nessa etapa, refere-se à presença de um mesmo parâmetro nos conjuntos de variáveis dependentes e independentes, a concentração de C-ficocianina, que direciona os resultados à uma relação íntima entre fatores e respostas que poderia ser prejudicial ao restante da análise. Por conta disso, os resultados do primeiro planejamento experimental proposto não apresentaram perfis de Pareto ou Superfícies de

resposta razoáveis para o escopo do presente trabalho, como observado pelas figuras dispostas no item 5.2.3.1 dos resultados.

Todavia, ainda que a escolha de fatores tenha sido, em parte, erroneamente fundamentada, há inferências valiosas entre os resultados obtidos, principalmente pensando nas próximas etapas do estudo. A mais branda e previsível dessas, depreendida através dos Diagramas de Pareto apresentados, é a significância estatística da concentração de C-ficocianina, como variável independente, com relação à resposta de concentração de C-ficocianina. Dentre as informações possíveis de serem abstraídas desses gráficos, apenas essa correlação de significância foi observada, fruto, possivelmente, da escolha dos parâmetros comentado anteriormente. Porém, das superfícies de respostas relacionadas à variável dependente de grau de pureza – **Figuras 22, 23 e 24** –, compreende-se que, os valores que mais se aproximam da condição ótima estão na extremidade inferior da faixa de trabalho. Ou seja, essas superfícies de respostas mostram um padrão de melhor resposta com menores tempos de reação e massas de enzima, contrapondo os resultados dos testes preliminares com relação às 24 horas de reação e, também, sugerindo a necessidade de mudanças metodológicas para os planejamentos futuros.

5.3.3.2. Segundo planejamento experimental

À medida que os resultados do primeiro planejamento experimental, opondo-se aos dos testes preliminares, indicaram a extremidade inferior das faixas de valores como os mais próximos da condição ótima, outra metodologia de planejamento experimental foi idealizada. O delineamento composto central rotacional (DCCR) tem a expansão do espaço amostral como principal diferença do método DCC, como demonstra Montgomery (2012), através do dimensionamento da variação na faixa de valores (α), cuja consequência é a maior capacidade de respostas com um menor número de amostras necessárias.

Dessa forma, dispondo, ainda, do grau de pureza e da concentração de C-PC como as variáveis dependentes, para os parâmetros independentes houve três principais alterações: a fixação da concentração de C-ficocianina, a mudança dos valores de tempo de reação e a retomada dos estudos com a papaína. Referente à quantidade de corante utilizado, objetivou-se corrigir o erro metodológico anterior, como arguido acima, e, para tal, foi determinada uma quantidade a ser usada de forma que cada amostra tivesse concentração inicial de 10 mg/mL. Como sugerido pelo planejamento anterior, o tempo de reação ótimo estava próximo ou abaixo

das 24 horas de reação, logo, visando analisar o outro extremo desse parâmetro deixado de lado desde os testes preliminares, a faixa de valores passou a ser de 2 a 6 horas, com as expansões inerentes ao método garantindo amostras com 6,8 horas (6 horas e 48 minutos) e 1,2 horas (72 minutos). Finalmente, como o planejamento pretérito revelou um possível desvio nas interpretações sobre os testes introdutórios do projeto, decidiu-se por realizar dois blocos de análise nessa etapa, a saber, ambos contendo como segunda variável independente a massa de enzima, variando a última entre pepsina e papaína.

Comparando os dois blocos de análise, as amostras hidrolisadas com papaína mostraram, em valores brutos, concentrações de C-ficocianina menores que as amostras com as mesmas condições de tempo de reação e massa de enzima tratadas com pepsina. Esse fato está ligado, principalmente, às diferenças de cores das amostras do bloco da papaína com as do bloco da pepsina, tendo o primeiro apresentado coloração tendendo ao verde e, assim, afastando-se da cor medida no comprimento de onda de 620 nm. As principais suspeitas para tal mudança na coloração era com relação à papaína utilizada, a qual, possivelmente, havia degradado devido ao seu estoque inadequado.

No entanto, apesar dos valores brutos indicarem boas tendências de resultados para a pepsina, os gráficos de pareto (**Figuras 26, 28, 30 e 32**) e superfícies de resposta do planejamento (**Figuras 27, 29, 31 e 33**) mostram maiores detalhes. A começar pelos Gráficos de Pareto, dos quatro diagramas obtidos no total, referentes aos dois blocos de enzima e às duas variáveis dependentes, apenas o gerado para as amostras hidrolisadas com papaína cuja resposta estava ligada à Concentração de C-PC apresentou parâmetros independentes significativos para a análise. Entre eles, o tempo de reação linear e quadrático, bem como a massa de papaína linear.

Assim sendo, deduz-se, primeiramente, que, para o escopo desse planejamento, a pepsina não se mostra adequada para futuros testes. Isto é, aparentemente, é plausível afirmar que a aplicação de maior eficiência para essa protease será obtida em tempos de reação maiores, próximos de 24 horas. Seguindo uma ideia de economia de processos em escala industrial, é evidente que a papaína, pelos resultados positivos para tempos de reação na redondeza de 4 horas ou menos, mostra-se como a protease de maior potencial para o presente estudo. Analisando, agora, as superfícies de resposta obtidas para as duas respostas do planejamento em função do tempo de reação e da massa de pepsina (**Figuras 31 e 33**), nota-se que, em

oposição ao comportamento de pico esperado em um estudo buscando as condições de otimização de um processo, há um vale nas superfícies referentes, indicando que nesses pontos há a menor eficiência, ou os piores resultados possíveis, para essa reação.

Com relação aos dados do bloco da papaína, especialmente para a superfície de resposta cujo Gráfico de Pareto demonstrou significância de variáveis – **Figura 27** –, informações extremamente relevantes foram obtidas. A princípio, percebe-se que, apesar de não ser exatamente o formato culminante de um resultado ótimo, a superfícies de resposta mostra uma extensa área de valores máximos da resposta nas faixas entre e abaixo das 4 horas de reação e em toda a faixa trabalhada de massa de enzima. Por conseguinte, mostra-se adequado, além de prosseguir os estudos utilizando a papaína como protease na reação, propor faixas de trabalho diferentes, com relação à massa de enzima, enquanto mantém-se a faixa de trabalho usada para o tempo de reação.

Ainda, pode-se depreender que o grau de pureza, analisado no primeiro e no presente planejamento experimental, não possui ligação significativa com as variáveis independentes elegidas. Então, levanta-se a hipótese de que essa variável dependente não seria adequada para as análises em questão, visto que sua contribuição para o estudo seria indicar as amostras com maior estabilidade na bebida ácida, segundo a teoria de que quanto menor a porção protéica do corante, maior sua estabilidade. No entanto, esse paralelo, a princípio, não pôde ser traçado e, mais, faz-se possível a determinação *booleana* da estabilidade a partir de dados qualitativos e visuais das amostras, sendo esses a presença ou não de precipitado do corante na bebida. Deste modo, a obtenção de resposta em função do Grau de Pureza das amostras mostrou-se, aparentemente, insuficiente até esse momento do estudo.

5.3.3.3. Terceiro e quarto planejamento experimental

Até esse ponto do projeto, esteve sendo usada a mesma amostra de C-ficocianina extraída previamente, entretanto, como seu tempo de armazenamento varia dependendo da condição de estocagem e, no máximo, chega à 3 meses, esse lote de corante não era mais adequado para uso no projeto. Essa conclusão não se fez presente, porém, até que estivesse encerrada a execução do terceiro planejamento experimental, ao final do qual, pelos resultados de concentração muito abaixo do esperado (**Tabela 21**), notou-se o problema em questão. Há, também, o fato da mudança do reagente isolado de papaína usado a partir desse planejamento, o que poderia indicar que devido à degradação da última enzima usada, sua atividade estava

prejudicada e os resultados, por conta disso, não estavam dentro do esperado. Nesse sentido, em vista das discordâncias presentes, decidiu-se repetir as condições do planejamento, iniciando-se o quarto planejamento experimental, no qual foi usado um novo lote de C-ficocianina extraído pareado com o novo reagente de papaína.

Com relação à escolha dos parâmetros utilizados nesse momento, com exceção das questões citadas acima, a principal mudança foi o aumento dos valores de massa de papaína usada na reação. Mantendo-se o mesmo intervalo para α que o planejamento anterior, os valores variaram, agora, de 8,7 à 11,7 mg de protease, sendo as extensões dessa faixa nos valores de 16,5 e 5,1 mg de papaína. Dessa forma, avaliando as mesmas variáveis dependentes, apesar do grau de pureza não resultar em grandes informações até então, foram obtidas a superfície de resposta, o gráfico de Pareto e o perfil de desejabilidade para esse conjunto de amostras, relacionadas abaixo.

A primeira informação possível de se inferir é que, ao contrário das indicações dos últimos planejamentos experimentais, dessa vez há significância de alguns parâmetros para as duas respostas obtidas. Sendo essas, para ambas as variáveis dependentes (grau de pureza e concentração de C-PC), o tempo de reação linear e massa de papaína linear. Isso indica que, mesmo as arguições anteriores sobre a análise do grau de pureza sendo válidas e verdadeiras, há, sim, uma possível correlação entre a estabilidade do corante e a proporção entre cromóforo e proteínas na sua estrutura.

Não obstante, como foi obtido, de forma inédita até então, a relação de significância das duas variáveis independentes, com as mesmas parcelas polinomiais e para ambas as respostas analisadas, decidiu-se por gerar, através da regressão linear interna do *software* em questão, o perfil de desejabilidade para esse planejamento experimental. Nas superfícies de respostas, é possível notar que, para a massa de papaína, há uma acentuada inclinação conforme essa alcança seus menores valores, enquanto para o tempo de digestão há uma igual, porém mais branda, inclinação também na direção da extremidade inferior da faixa de trabalho. Por fim, o perfil de desejabilidade obtido elucidou a tendência observada até então, indicando que as melhores condições da hidrólise enzimática do corante C-ficocianina, relacionadas ao grau de pureza e à concentração de C-ficocianina após a reação, seriam com o tempo de reação de 1,2 horas (72 minutos) e massa de papaína de 8,0 mg.

Faz-se, todavia, a indispensável ressalva de que, especificamente com relação ao tempo de reação, há ainda espaço para obter mais dados que indiquem se esse, de fato, é o valor ideal ou se há um valor ainda menor que se adequa nesse propósito. Assim, foi realizado o quinto planejamento experimental com o objetivo de determinar, o tempo de reação ideal usando uma faixa de tempo menor que 60 minutos.

5.3.3.4. Quinto planejamento experimental

Neste planejamento, manteve-se a faixa de valores para a massa de papaína usada nos planejamentos 3 e 4. Em contrapartida, para o tempo de reação, decidiu-se por posicionar a faixa de trabalho entre 20 e 60 minutos de reação, com as extensões propostas na metodologia com valores de 68 e 12 minutos. Espera-se, assim, obter uma vez mais a inclinação perceptível nas superfícies de respostas do último planejamento, ou, idealmente, o pico das superfícies de resposta para esses parâmetros.

Seguindo o mesmo padrão do planejamento anterior, essa análise iniciar-se-á pela obtenção da significância dos parâmetros em função das respostas avaliadas. Essas, por sua vez, limitaram-se, outra vez, para ambas as variáveis dependentes, ao tempo de reação linear e à massa de papaína linear. O resultado mais relevante, entretanto, infere-se a partir das superfícies de resposta e do perfil de desejabilidade obtidos.

A observação visual da superfície de resposta referente à concentração de corante, bem como a referente à pureza, revela um perfil gráfico mais próximo do pico desejado. Para a resposta da concentração de C-ficocianina, percebe-se a mesma inclinação visível desde o último planejamento, dessa vez, porém, com maior curvatura em direção aos menores tempos de reação. Já no caso do grau de pureza, o mesmo padrão obtido no planejamento anterior se repete, no entanto, as cores mais escuras revelam que essas massas, combinadas com o ajuste do tempo de reação, aproximam, ainda mais, os resultados do ponto ótimo existente. Em termos quantitativos, o perfil de desejabilidade revela, enfim, que, com as presentes combinações realizadas nesse planejamento, as melhores condições para a reação estudada seriam com tempo de reação de 12 minutos, usando, repetidamente, 8,0 mg de papaína.

5.3.3.5. Sexto planejamento experimental

Nesse momento, com o volume de dados acumulados até então, somado aos resultados quantitativos sobre possíveis condições ótimas e os resultados qualitativos positivos, para o sexto planejamento experimental foram propostas mudanças nas variáveis independentes do

conjunto de amostras. A começar pela retirada da massa de papaína como variável, visto que por dois planejamentos seguidos foi confirmada a massa ideal no valor de 8,0 mg de papaína, sendo ela fixada nesse valor para o presente planejamento. Em seu lugar, retomou-se a massa de C-ficocianina, pretendendo avaliar quais mudanças, se houver, esse novo paralelo pode causar na indicação do valor de tempo ótimo de reação através das superfícies de resposta e do perfil de desejabilidade.

Comparando com o primeiro planejamento experimental, que também utilizou a massa de C-PC como variável, a significância dos parâmetros independentes para as respostas avaliadas apresentou diferenças. Como esperado, para a concentração de C-ficocianina, apenas os fatores de massa de C-PC linear e quadrático foram significativos, no entanto, diferentemente do resultado dos gráficos de Pareto anteriores, para a pureza, a porção linear da massa de C-PC também apresentou significância (**Figura 44**). Com relação às superfícies de resposta (**Figuras 43 e 45**), foi observado um padrão de maiores valores das variáveis dependentes quanto maior fosse a massa de C-PC, resultado também esperado. Já com relação ao tempo de reação, sendo insignificativo para as respostas avaliadas, esse resultou em um perfil quase constante independente da massa de C-PC usada. Por fim, o perfil de desejabilidade relatou que as condições ideais para o paralelo realizado seria utilizando, como esperado, o maior valor de massa de C-PC (34 mg) durante um tempo de reação de 20 minutos.

No entanto, testes qualitativos de solubilidade revelaram que, nessas condições durante os 20 minutos de reação, o corante não se mantinha estável na bebida ácida. Isto é, diferente do observado com relação a estabilidade de, até, 30 dias de outros planejamentos, essa amostra resultou em perdas de coloração e formação de precipitado na bebida. Não obstante, com um tempo de 30 minutos de reação, que apresentou alguns dos melhores resultados brutos (**Tabela 24**), o teste qualitativo com relação à sua estabilidade foi positivo. Assim sendo, de acordo com os diferentes planejamentos experimentais formulados, aliado às diferentes condições ótimas sugeridas, definiu-se que, para o escopo do projeto, o corante apresentaria melhor resultados de estabilidade em bebida ácida caso a reação ocorresse à 37 °C por 30 minutos usando 8,0 mg de papaína em 3,0 mL de água, ou concentração de protease de 2,67 mg/mL.

Vale salientar que o padrão gráfico e de valores obtidos e analisados na totalidade dos planejamentos experimentais realizados não resultaria em um ponto ótimo adequado para o projeto. Isso se deve ao fato de as respostas escolhidas serem indiretamente ligadas à análise de

estabilidade do corante, ou seja, a análise da concentração de C-PC e do grau de pureza são utilizadas como respostas referentes à estabilidade para esse estudo especificamente, por indicarem dois fatores importantes para aplicação do corante na bebida. O mesmo paralelo não é observado em outros estudos de estabilidade, que levam em consideração, por exemplo, a análise de cor instrumental (AMARANTE *et al.*, 2020). Assim sendo, supõe-se que o principal motivo para os planejamentos indicarem, repetidamente, os limites inferiores de cada faixa de valor proposto para tempo de reação e massa de enzima como os melhores resultados é devido à degradação do corante ao longo da reação de hidrólise enzimática. Em outras palavras, o estudo analisou um fator (concentração de C-PC) que inerentemente seria menor após a reação estudada e, com isso, os valores ótimos de tempo de reação e massa de enzima, se aproximariam sempre do 0, que significaria a não realização da reação. Ao mesmo tempo, foi feita a suposição inicial de que há uma correlação entre maior grau de pureza do corante e sua maior estabilidade em pH ácido. No entanto, não é possível afirmar que tal relação é verdadeira através das respostas obtidas pelos planejamentos experimentais realizados, ou através da proposta analítica por trás da formulação desses planejamentos. Dessa forma, apesar de não obter resultados ótimos através das superfícies de resposta geradas, a correlação desses dados com as observações qualitativas de coloração na bebida, estabilidade ao longo dos dias e a não formação de precipitado, supre as necessidades desse projeto.

5.3.4. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida

A partir da determinação das melhores condições da reação de hidrólise enzimática no estudo, foi proposta a realização de técnica eletroforética para evidenciar esses resultados. Com essa técnica, seguindo o princípio de separação por massa molecular e, conseqüentemente, tamanho de cada proteína, foi possível avaliar, através da comparação dos fragmentos proteicos das amostras com os padrões aplicados, se há mudanças no padrão de clivagem das proteases ao final e além dos 30 minutos sugeridos como tempo ideal, explicitados pela **Figura 46**.

Considerando as duas bandas características da C-ficocianina como os fragmentos protéicos referentes aos trímeros e hexâmeros, de aproximadamente 111 kDa e 222 kDa, respectivamente, que compõem essa molécula (STANIC-VUCINIC, 2018), infere-se, inicialmente, que fora o padrão, não há presença dessas bandas características do corante nas amostras tratadas com a protease. Nota-se, também pela **Figura 46**, que as duas primeiras

bandas do padrão não estão exatamente nos pontos esperados da massa molecular anteriormente citada, no entanto, estando a primeira próxima de 150 kDa e a segunda de 75 kDa, a proporção de aproximadamente o dobro da massa molecular esperada para os hexâmeros com relação aos trímeros dessa molécula comprova sua presença. Ademais, é possível notar em todas as amostras a presença da banda característica da papaína, em torno de 23 kDa (AMRI; MAMBOYA, 2012), assim como no padrão da enzima, justificado pela presença da protease no padrão e em cada amostra analisada, visto que a reação de hidrólise enzimática ocorre na presença dessa enzima em específico. O padrão de proteínas, disposto no poço 1, indica as massas moleculares de fragmentos mais comuns e bem separados, ajudando na percepção das bandas separadas no gel, bem como na distinção dos fragmentos pela sua massa.

Por fim, elucidando os resultados discutidos anteriormente, percebe-se que para cada amostra, o padrão de fragmentos proteicos, mesmo após os 30 e 180 minutos, é o mesmo, indicando, de fato, que após o tempo de reação considerado ideal, não há mudança adicional no padrão de clivagem da protease.

6. Perspectivas

Em vista do grande interesse em torno de estratégias que permitam a aplicação mais ampla de C-ficocianina, o presente trabalho não termina em si mesmo, deixando espaço para propostas como:

- Validação da atividade enzimática com relação ao tempo e conversão, através de estudos de modelagem cinética, avaliando, principalmente, a relação não-linear entre a formação dos produtos da reação de hidrólise enzimática.
- Investigação de estratégias, acopladas a esse estudo, para melhorar estabilidade térmica do corante com fins de aplicação em bebidas carbonatadas ácidas que possuam etapa de aquecimento em seu processo de produção, como a etapa de pasteurização presente na produção de cerveja;
- Análise dos limites de aplicação com relação ao pH da matriz, aprofundando estudos sobre a estratégia de hidrólise enzimática presente nesse estudo;
- Análise sensorial de formulações e bebidas ácidas após a aplicação do corante tratado, visando compreender se o perfil de sabores e aromas é afetado pela presença de C-ficocianina e, sendo o caso, se a percepção é positiva ou negativa da parte dos consumidores.

7. Conclusões Gerais

A partir dos resultados e discussões apresentados ao longo dos dois capítulos do presente trabalho, depreende-se que:

- A C-ficocianina, para o escopo desse trabalho, pode ser referenciada como um corante, devido à sua solubilidade em meio aquoso, sendo esse o principal componente da bebida;
- O trabalho evidenciou características de estabilidade do corante em condições adversas de pH, visto que as estratégias propostas impedem a modificação estrutural que tem por consequência, principalmente, a precipitação de C-ficocianina e a perda da coloração da solução;
- A prospecção tecnológica proposta foi capaz de agrupar importantes trabalhos e com a especificidade certa para o escopo do estudo, girando, majoritariamente, em torno da estabilidade do corante e de metodologias de modelagem estatística;
- Apesar da principal estratégia para estabilização investigada nesse trabalho ser a hidrólise enzimática, não foi encontrado, nos últimos cinco anos, nenhum artigo que relate o uso de estratégia similar buscando a melhorar a estabilidade do corante após sua extração;
- Duas das estratégias propostas para estabilização do corante em pH ácido foram bem-sucedidas: a encapsulação com quitosana que, apesar de não ser ideal para o escopo desse trabalho, foi capaz de manter a C-ficocianina em solução ácida, e a hidrólise enzimática, que se mostrou a estratégia de maior potencial tecnológico para os escopos do presente trabalho;
- A modelagem estatística, através de planejamentos fatoriais, possibilitou o estudo em torno das condições de otimização da reação de hidrólise enzimática, principalmente com relação à enzima utilizada, ao tempo de reação e a massa de enzima aplicada;
- Não é possível afirmar que houve otimização desse processo através dos planejamentos propostos, no entanto, as melhores condições reacionais para se produzir e, potencialmente, escalonar esse processo de produção de bebida carbonatada colorida foram alcançadas;

- As melhores condições para reação de hidrólise enzimática de C-ficocianina, utilizando a papaína como protease, compreendem a reação ocorrendo em matriz aquosa de pH neutro (~6,0) à 37 °C por 30 minutos, utilizando a concentração de 2,67 mg/mL de papaína para cada 10 mg/mL de C-ficocianina.
- A técnica de eletroforese SDS-PAGE, revelou que a suposição de que após os 30 minutos de reação não é obtido eficiência melhor para o tratamento do corante com fins de aplicação na bebida ácida.

8. Bibliografia

ABALDE, Julio *et al.* Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. **Plant Science**, v. 136, n. 1, p. 109-120, ago. 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0168-9452\(98\)00113-7](https://doi.org/10.1016/s0168-9452(98)00113-7). Acesso em: 06 jun. 2023.

ADJALI, Aida *et al.* Physicochemical degradation of phycocyanin and means to improve its stability: A short review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, dez. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2021.12.005>. Acesso em: 06 jun. 2023.

AKABERI, Sahar *et al.* Impact of incubation conditions on protein and C-Phycocyanin recovery from *Arthrospira platensis* post- pulsed electric field treatment. **Bioresource Technology**, v. 306, p. 123099, jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123099>. Acesso em: 06 jun. 2023.

ÁLVAREZ, Xavier; OTERO, Ana. Nutrient removal from the centrate of anaerobic digestion of high ammonium industrial wastewater by a semi-continuous culture of *Arthrospira* sp. and *Nostoc* sp. PCC 7413. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, n. 5, p. 2785-2794, 23 jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02175-4>. Acesso em: 06 jun. 2023.

AMARANTE, Marina Campos Assumpção de *et al.* Analytical grade C-phycocyanin obtained by a single-step purification process. **Process Biochemistry**, v. 90, p. 215-222, mar. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.020>. Acesso em: 06 jun. 2023.

AMARANTE, Marina Campos Assumpção de *et al.* Design strategies for C-phycocyanin purification: Process influence on purity grade. **Separation and Purification Technology**, v. 252, p. 117453, dez. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117453>. Acesso em: 06 jun. 2023.

AMRI, Ezekiel; MAMBOYA, Florence. Papain, a plant enzyme of biological importance. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 99-104, 1 fev. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3844/ajbbbsp.2012.99.104>. Acesso em: 06 jun. 2023.

ANTELO, Francine da Silva. Purificação de ficocianina de *Spirulina platensis* através de sistema aquoso bifásico e caracterização cinética da desnaturação térmica. 2007. reponame:Repositório Institucional da FURG, [s. l.], 2007. Disponível em: <http://repositorio.furg.br/handle/1/2906> . Acesso em: 29 set. 2023.

ANVISA. Instrução Normativa nº 211, de 1º de março de 2023. Estabelece as funções tecnológicas, os limites máximos e as condições de uso para os aditivos alimentares e os coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 8 mar. 2023. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-211-de-1-de-marco-de-2023-468509746>. Acesso em 15 ago. 2023.

ANVISA. Resolução de Diretoria Colegiada n° 728, de 1° de julho de 2022. Dispõe sobre as enzimas e as preparações enzimáticas para uso como coadjuvantes de tecnologia na produção de alimentos destinados ao consumo humano. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 6 jul. 2022. Disponível em:

<https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_728_2022_.pdf/b89b0a07-2051-4a8b-a96a-c837ebf79964>. Acesso em 15 ago. 2023.

ANVISA. Resolução de Diretoria Colegiada n° 778, de 1° de março de 2023. Dispõe sobre os princípios gerais, as funções tecnológicas e as condições de uso de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia em alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 8 mar. 2023. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-778-de-1-de-marco-de-2023-468499613>>. Acesso em 15 ago. 2023.

AOUDE, Christa *et al.* Effect of Electrofiltration on the Dewatering Kinetics of *Arthrospira platensis* and Biocompound Recovery. **Separations**, v. 9, n. 12, p. 410, 5 dez. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/separations9120410>. Acesso em: 06 jun. 2023.

ARISTOY, Maria Concepcion; TOLDRA, Fidel. Deproteinization techniques for HPLC amino acid analysis in fresh pork muscle and dry-cured ham. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, n. 10, p. 1792-1795, out. 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf00010a020>. Acesso em: 06 jun. 2023.

BAHRUTH, E. B.; ANTUNES, A. M. S.; BOMTEMPO, J. V. **Prospecção tecnológica na priorização de atividades de CeT. In: Gestão em Biotecnologia**. Editora E-papers. Rio de Janeiro. p. 300–324, 2006.

BERROUANE, Nour El Houda *et al.* Freeze–thaw-, enzyme-, ultrasound- and pulsed electric field-assisted extractions of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* dry biomass. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 16, n. 2, p. 1625-1635, 24 jan. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01264-3>. Acesso em: 06 jun. 2023.

BERRY, Michael; FIELDING, Burtram; GAMIELDIEN, Junaid. Practical Considerations in Virtual Screening and Molecular Docking. *In: BERRY, Michael; FIELDING, Burtram; GAMIELDIEN, Junaid. Emerging Trends in Computational Biology, Bioinformatics, and Systems Biology*. [S. l.]: Elsevier, 2015. p. 487-502. ISBN 9780128025086. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802508-6.00027-2>. Acesso em: 06 jun. 2023.

BÖCKER, L. *et al.* Biphasic short time heat degradation of the blue microalgae protein phycocyanin from *Arthrospira platensis*. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 52, p. 116-121, mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.11.007>. Acesso em: 06 jun. 2023.

BRAGA, Anna Rafaela Cavalcante *et al.* Improvement of Thermal Stability of C-Phycocyanin by Nanofiber and Preservative Agents. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 40, n. 6, p. 1264-1269, 29 fev. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfpp.12711>. Acesso em: 06 jun. 2023.

BUCHWEITZ, M. Natural Solutions for Blue Colors in Food. *In*: BUCHWEITZ, M. **Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages**. [S. l.]: Elsevier, 2016. p. 355-384. ISBN 9780081003718. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100371-8.00017-8>. Acesso em: 06 jun. 2023.

BUECKER, Stephan *et al.* Influence of storage temperature on the stability of heat treated phycocyanin- λ -carrageenan complexes in liquid formulations. **Green Chemistry**, v. 24, p. 4174-4185, abr. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D2GC00809B>. Acesso em: 06 jun. 2023.

BUECKER, Stephan *et al.* High Molecular Weight λ -Carrageenan Improves the Color Stability of Phycocyanin by Associative Interactions. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 6, 10 jun. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.915194>. Acesso em: 06 jun. 2023.

BUECKER, Stephan *et al.* Thermal and acidic denaturation of phycocyanin from *Arthrospira platensis*: Effects of complexation with λ -carrageenan on blue color stability. **Food Chemistry**, v. 380, p. 132157, jun. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132157>. Acesso em: 06 jun. 2023.

CAMPOS ASSUMPÇÃO DE AMARANTE, Marina *et al.* Colour stability and antioxidant activity of C-phycocyanin-added ice creams after in vitro digestion. **Food Research International**, v. 137, p. 109602, nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109602>. Acesso em: 06 jun. 2023.

CARNEIRO, Julia Geracila de Mello e. Características funcionais de concentrados proteicos de soro de leite de cabras. 1997. [s.n., s. l.], 1997. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/254345>. Acesso em: 06 jun. 2023.

CHAIKLAHAN, Ratana; CHIRASUWAN, Nattayaporn; BUNNAG, Boosya. Stability of phycocyanin extracted from *Spirulina sp.*: Influence of temperature, pH and preservatives. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 659-664, abr. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.010>. Acesso em: 06 jun. 2023.

CHANG, Yu-Kaung *et al.* Isolation of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* microalga using Ionic liquid based aqueous two-phase system. **Bioresource Technology**, v. 270, p. 320-327, dez. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.138>. Acesso em: 06 jun. 2023.

CHEN, Chun-Yen *et al.* Using an innovative pH-stat CO₂ feeding strategy to enhance cell growth and C-phycocyanin production from *Spirulina platensis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 112, p. 78-85, ago. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.04.009>. Acesso em: 8 out. 2023.

CHEN, Kuei-Hsiang *et al.* A rapid and efficient technique for direct extraction of C-phycocyanin from highly turbid *Spirulina platensis* algae using hydrophobic interaction chromatography in stirred fluidized bed. **Biochemical Engineering Journal**, v. 140, p. 47-56,

dez. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.09.005>. Acesso em: 06 jun. 2023.

CHENTIR, Imene *et al.* Biofunctional gelatin-based films incorporated with food grade phycocyanin extracted from the Saharian cyanobacterium *Arthrospira* sp. **Food Hydrocolloids**, v. 89, p. 715-725, abr. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.11.034>. Acesso em: 06 jun. 2023.

CHENTIR, Imene *et al.* Stability, bio-functionality and bio-activity of crude phycocyanin from a two-phase cultured Saharian *Arthrospira* sp. strain. **Algal Research**, v. 35, p. 395-406, nov. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.09.013>. Acesso em: 06 jun. 2023.

CHEW, Kit Wayne *et al.* Liquid biphasic flotation for the purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* microalga. **Bioresource Technology**, v. 288, p. 121519, set. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121519>. Acesso em: 06 jun. 2023.

CHOI, Woon Yong; LEE, Hyeon Yong. Kinetic Analysis of Stabilizing C-Phycocyanin in the *Spirulina platensis* Extracts from Ultrasonic Process Associated with Effects of Light and Temperature. **Applied Sciences**, v. 8, n. 9, p. 1662, 14 set. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app8091662>. Acesso em: 06 jun. 2023.

COULTATE, T. P. **Food: The chemistry of its components**. 5. ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2009. 501 p. ISBN 9780854041114.

DAMACIANO, Samuel Ferreira. **Otimização do cultivo de *Spirulina maxima* e extração de ficocianina da sua biomassa para uso como corante natural em sorvetes**. 90 f. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2023.

DE AZEREDO, Henriette; FARIA, José; BRITO, Edy. Fundamentos de cinética de degradação e estimativa de vida de prateleira. *In*: DE AZEREDO, Henriette. **Fundamentos de estabilidade de Alimentos**. 2ª edição. Brasília, DF: Embrapa, 2012. 103-128.

DE JESUS, Cristiane Santos *et al.* Outdoor pilot-scale cultivation of *Spirulina* sp. LEB-18 in different geographic locations for evaluating its growth and chemical composition. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 86-94, maio 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.149>. Acesso em: 06 jun. 2023.

DEWI, E. N.; KURNIASIH, R. A.; PURNAMAYATI, L. The Application of Microencapsulated Phycocyanin as a Blue Natural Colorant to the Quality of Jelly Candy. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 116, p. 012047, fev. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/116/1/012047>. Acesso em: 06 jun. 2023.

DIANURSANTI; TAURINA, Zarahmida; INDRAPUTRI, Claudia Maya. Optimization growth of *Spirulina platensis* in bean sprouts extract medium with urea fertilizer for

phycocyanin production as antioxidant. *In: 2ND BIOMEDICAL ENGINEERING'S RECENT PROGRESS IN BIOMATERIALS, DRUGS DEVELOPMENT, AND MEDICAL DEVICES: Proceedings of the International Symposium of Biomedical Engineering (ISBE) 2017.* [S. l.]: Author(s), 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.5023961>. Acesso em: 06 jun. 2023.

EBRAHIMI, Alireza *et al.* Separation and Purification of C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* Using Aqueous Two-Phase Systems Based on Triblock Thermosensitive Copolymers. **Food and Bioprocess Technology**, 12 abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03057-6>. Acesso em: 06 jun. 2023.

FABRE, J. F. *et al.* Extraction, purification and stability of C-phycocyanin from *Arthrospira platensis*. **European Food Research and Technology**, 10 mar. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00217-022-03987-z>. Acesso em: 06 jun. 2023.

FAIETA, Marco *et al.* Effect of Encapsulation Process on Technological Functionality and Stability of *Spirulina Platensis* Extract. **Food Biophysics**, v. 15, n. 1, p. 50-63, 8 ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11483-019-09602-1>. Acesso em: 06 jun. 2023.

FAIETA, Marco *et al.* High hydrostatic pressure treatment of *Arthrospira (Spirulina) platensis* extracts and the baroprotective effect of sugars on phycobiliproteins. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 70, p. 102693, jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102693>. Acesso em: 06 jun. 2023.

FAIETA, M. *et al.* Role of saccharides on thermal stability of phycocyanin in aqueous solutions. **Food Research International**, v. 132, p. 109093, jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109093>. Acesso em: 06 jun. 2023.

FEKRAT, Farzaneh *et al.* Optimization of chitosan/activated charcoal-based purification of *Arthrospira platensis* phycocyanin using response surface methodology. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 2, p. 1095-1105, 10 set. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1626-8>. Acesso em: 06 jun. 2023.

FERNANDES, Raquel *et al.* Exploring the Benefits of Phycocyanin: From *Spirulina* Cultivation to Its Widespread Applications. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 4, p. 592, 14 abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph16040592>. Acesso em: 06 jun. 2023.

FERREIRA-SANTOS, Pedro *et al.* Influence of thermal and electrical effects of ohmic heating on C-phycocyanin properties and biocompounds recovery from *Spirulina platensis*. **LWT**, v. 128, p. 109491, jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109491>. Acesso em: 06 jun. 2023.

FRUTON, Joseph S. A History Of Pepsin And Related Enzymes. **The Quarterly Review of Biology**, v. 77, n. 2, p. 127-147, jun. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/340729>. Acesso em: 06 jun. 2023.

FRUTON, JOSEPH S. Specificity and Mechanism of Pepsin Action. *In*: FRUTON, JOSEPH S. **Structure–Function Relationships of Proteolytic Enzymes**. [S. l.]: Elsevier, 1970. p. 222-236. ISBN 9780122118500. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-211850-0.50022-7>. Acesso em: 06 jun. 2023.

GARCÍA, Ana Belén; LONGO, Eleonora; BERMEJO, Ruperto. The application of a phycocyanin extract obtained from *Arthrospira platensis* as a blue natural colorant in beverages. **Journal of Applied Phycology**, 21 jul. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02522-z>. Acesso em: 06 jun. 2023.

GARCÍA, Hugo Fabian Lobatón; MEJIA, Natali López. Mathematical Model of a Bubble Column for the Increased Growth of *Arthrospira platensis* and the Formation of Phycocyanin. **International Journal of Technology**, v. 12, n. 2, p. 232, 13 abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.14716/ijtech.v12i2.4256>. Acesso em: 06 jun. 2023.

GIANNOGLOU, Marianna *et al.* Kinetic study of the combined effect of high pressure and pH-value on *Arthrospira Platensis* (Spirulina) proteins extraction. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 85, p. 103331, maio 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2023.103331>. Acesso em: 06 jun. 2023.

GLIGORIJEVIĆ, Nikola *et al.* Nutraceutical phycocyanobilin binding to catalase protects the pigment from oxidation without affecting catalytic activity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 251, p. 119483, abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119483>. Acesso em: 06 jun. 2023.

GREENBERG, Norman A.; SHIPE, W. F. Comparison of the abilities of trichloroacetic, picric, sulfosalicylic, and tungstic acids to precipitate protein hydrolysates and proteins. **Journal of Food Science**, v. 44, n. 3, p. 735-737, maio 1979. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1979.tb08487.x>. Acesso em: 06 jun. 2023.

GUARIENTI, Cíntia *et al.* Effects of microencapsulation on the preservation of thermal stability and antioxidant properties of Spirulina. **Journal of Food Measurement and Characterization**, 3 set. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01140-0>. Acesso em: 06 jun. 2023.

GUIDI, Flavio *et al.* Long-Term Cultivation of a Native *Arthrospira platensis* (Spirulina) Strain in Pozo Izquierdo (Gran Canaria, Spain): Technical Evidence for a Viable Production of Food-Grade Biomass. **Processes**, v. 9, n. 8, p. 1333, 30 jul. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pr9081333>. Acesso em: 06 jun. 2023.

GUSTININGTYAS, A. *et al.* Improvement stability of phycocyanin from *Spirulina platensis* encapsulated by water soluble chitosan nanoparticles. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 414, p. 012005, 10 jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/414/1/012005>. Acesso em: 06 jun. 2023.

HADIYANTO *et al.* Utilization of carrageenan and chitosan as coating material in phycocyanin encapsulation. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**,

v. 633, p. 012038, 8 out. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1757-899x/633/1/012038>. Acesso em: 06 jun. 2023.

HUBER, Robert; BODE, Wolfram. Structural basis of the activation and action of trypsin. **Accounts of Chemical Research**, v. 11, n. 3, p. 114-122, mar. 1978. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ar50123a006>. Acesso em: 06 jun. 2023.

HUO, Yan *et al.* Improving the Thermal and Oxidative Stability of Food-Grade Phycocyanin from *Arthrospira platensis* by Addition of Saccharides and Sugar Alcohols. **Foods**, v. 11, n. 12, p. 1752, 14 jun. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods11121752>. Acesso em: 06 jun. 2023.

İLTER, Işıl *et al.* Improving the stability of phycocyanin by spray dried microencapsulation. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 7, jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfpp.15646>. Acesso em: 06 jun. 2023.

İLTER, Işıl *et al.* Microencapsulation of phycocyanin by spray-drying method: Effect of process parameters and wall materials. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 46, n. 4, 20 fev. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfpp.16434>. Acesso em: 06 jun. 2023.

İLTER, Işıl *et al.* Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 70, p. 78-88, jul. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.04.007>. Acesso em: 06 jun. 2023.

IRAWATI, D. *et al.* The effect of using different polar solvents on the stability of thermal extraction phycocyanin from *Spirulina platensis*. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 441, p. 012050, 25 fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/441/1/012050>. Acesso em: 06 jun. 2023.

JABRI KAROUI, Iness; HAMMAMI, Majdi; ABDERRABBA, Manef. The use of D-Optimal Mixture Design in the development of date stone and spirulina tablet formulation as a phycocyanin dietary supplement. **Comptes Rendus. Chimie**, v. 26, S1, p. 1-14, 3 mar. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.5802/crchim.222>. Acesso em: 06 jun. 2023.

JESPERSEN, Lone *et al.* Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. **European Food Research and Technology**, v. 220, n. 3-4, p. 261-266, 10 nov. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00217-004-1062-7>. Acesso em: 06 jun. 2023.

JULIANTI, Elin *et al.* Optimization of Extraction Method and Characterization of Phycocyanin Pigment from *Spirulina platensis*. **Journal of Mathematical and Fundamental Sciences**, v. 51, n. 2, p. 168-176, ago. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5614/j.math.fund.sci.2019.51.2.6>. Acesso em: 06 jun. 2023.

JUNIOR, Sílvio. o Potencial e a importância das Biorrefinarias para o Brasil. *In*: JUNIOR, Sílvio. **Biorrefinarias: Cenários e Perspectivas**. 1ª edição. Brasília, DF: Embrapa, 2011. 17-28.

KAUSDAM, Sakawduan. Kinetic models for phycocyanin production by fed-batch cultivation of the *Spirulina platensis*. **International Journal of GEOMATE**, v. 17, n. 61, 1 set. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21660/2019.61.89205>. Acesso em: 06 jun. 2023.

KANNAUJIYA, Vinod K.; SINHA, Rajeshwar P. Thermokinetic stability of phycocyanin and phycoerythrin in food-grade preservatives. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 2, p. 1063-1070, 9 jun. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0638-x>. Acesso em: 06 jun. 2023.

KHANDUAL, Sanghamitra *et al.* Phycocyanin content and nutritional profile of *Arthrospira platensis* from Mexico: efficient extraction process and stability evaluation of phycocyanin. **BMC Chemistry**, v. 15, n. 1, 5 abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13065-021-00746-1>. Acesso em: 06 jun. 2023.

KRASEASINTRA, Oranit *et al.* Application of phycocyanin from *Arthrospira (Spirulina) platensis* as a hair dye. **Frontiers in Marine Science**, v. 9, 1 nov. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1024988>. Acesso em: 06 jun. 2023.

KUDDUS, M. *et al.* Recent Developments in Production and Biotechnological Applications of C-Phycocyanin. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-9, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/742859>. Acesso em: 06 jun. 2023.

LEE, Chi-Woo *et al.* Increased thermal stability of phycocyanin extracted from *Spirulina platensis* by cysteine addition during enzyme extraction. **Food Science and Technology**, 11 jun. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/fst.15021>. Acesso em: 06 jun. 2023.

LI, Ying *et al.* Extraction of phycocyanin—A natural blue colorant from dried spirulina biomass: Influence of processing parameters and extraction techniques. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 3, p. 727-735, 30 jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14842>. Acesso em: 06 jun. 2023.

LI, Ying; ABBASPOURRAD, Alireza. Phycocyanin-rich water-in-oil-in-water (W1/O/W2) double emulsion with nanosized particles: improved color stability against light exposure. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, p. 112930, out. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112930>. Acesso em: 06 jun. 2023.

LI, Ying; GILLILAN, Richard; ABBASPOURRAD, Alireza. Tuning C-Phycocyanin Photoactivity via pH-Mediated Assembly–Disassembly. **Biomacromolecules**, v. 22, n. 12, p. 5128-5138, 12 nov. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c01095>. Acesso em: 06 jun. 2023.

LI, Ying; ZHANG, Zhong; ABBASPOURRAD, Alireza. Improved pH stability, heat stability, and functionality of phycocyanin after PEGylation. **International Journal of Biological Macromolecules**, out. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.261>. Acesso em: 06 jun. 2023.

LIMA, Gustavo M. *et al.* Influence of spectral light quality on the pigment concentrations and biomass productivity of *Arthrospira platensis*. **Algal Research**, v. 31, p. 157-166, abr. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.012>. Acesso em: 06 jun. 2023.

LOWRY, Oliver H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal Of Biological Chemistry**. Washington University School Of Medicine, St. Louis, Missouri, p. 265-275. 1 nov. 1951. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6). Acesso em: 06 jul. 2023.

MACCOLL, Robert; HABIG, William; BERNS, Donald S. Characterization of phycocyanin from *Chroococcus* species. **Journal of Biological Chemistry**, v. 248, n. 20, p. 7080-7086, out. 1973. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)43364-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)43364-4). Acesso em: 30 set. 2023.

MACCOLL, Robert. Cyanobacterial Phycobilisomes. **Journal of Structural Biology**, v. 124, n. 2-3, p. 311-334, dez. 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.4062>. Acesso em: 29 set. 2023.

MAIA, Geraldo Arraes; MONTEIRO, José Carlos Sabino; GUIMARÃES, Antonio Cláudio Lima. Estudo da estabilidade físico-química e química do suco de caju com alto teor de polpa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 43-46, jan. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0101-20612001000100010>. Acesso em: 06 jun. 2023.

MAINARDI, Pedro Henrique; BIDOIA, Ederio Dino. Fundamental concepts and recent applications of factorial statistical designs. **Brazilian Journal of Biometrics**, v. 40, n. 1, 4 mar. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.28951/bjb.v40i1.552>. Acesso em: 06 jun. 2023.

MARTÍNEZ-VEGA, Jorge Eugenio; VILLAFANA-ESTARRÓN, Erika; ESCALANTE, Froylán M. E. Comparative Study of the Efficiency of Additives in the Extraction of Phycocyanin-C from *Arthrospira maxima* Using Ultrasonication. **Molecules**, v. 28, n. 1, p. 334, 31 dez. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules28010334>. Acesso em: 06 jun. 2023.

MARTINS, Beatriz Ferraz *et al.* Análise paramétrica da injeção de polímeros em um campo de petróleo da bacia Potiguar. *In*: MARTINS, Beatriz Ferraz *et al.* **Engenharia na Prática: Importância Teórica e Tecnológica**. [S. l.]: Atena Editora, 2020. p. 46-54. ISBN 9786557063088. Disponível em: <https://doi.org/10.22533/at.ed.0882024085>. Acesso em: 06 jun. 2023.

- MARTINS, Cláudia Rocha; LOPES, Wilson Araújo; ANDRADE, Jailson Bittencourt de. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1248-1255, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-40422013000800026>. Acesso em: 06 jun. 2023.
- MEHAR, Jitendra *et al.* Automation of pilot-scale open raceway pond: A case study of CO₂-fed pH control on Spirulina biomass, protein and phycocyanin production. **Journal of CO₂ Utilization**, v. 33, p. 384-393, out. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2019.07.006>. Acesso em: 06 jun. 2023.
- MINIC, Simeon *et al.* Characterization and effects of binding of food-derived bioactive phycocyanobilin to bovine serum albumin. **Food Chemistry**, v. 239, p. 1090-1099, jan. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.066>. Acesso em: 06 jun. 2023.
- MINIC, Simeon *et al.* Covalent binding of food-derived blue pigment phycocyanobilin to bovine β -lactoglobulin under physiological conditions. **Food Chemistry**, v. 269, p. 43-52, dez. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.138>. Acesso em: 06 jun. 2023.
- MOLDOVAN, Simona *et al.* Wastewater effluents analysis from sustainable algae-based blue dyeing with phycocyanin. **Textile Research Journal**, p. 004051752211194, 8 set. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/00405175221119419>. Acesso em: 06 jun. 2023.
- MONTGOMERY, Douglas C. **Design and analysis of experiments**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2013. ISBN 9781118146927.
- MOREIRA, Juliana Botelho *et al.* Antioxidant ultrafine fibers developed with microalga compounds using a free surface electrospinning. **Food Hydrocolloids**, v. 93, p. 131-136, ago. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.015>. Acesso em: 06 jun. 2023.
- MOREIRA, Juliana Botelho *et al.* Development of pH indicator from PLA/PEO ultrafine fibers containing pigment of microalgae origin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1855-1862, out. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.028>. Acesso em: 06 jun. 2023.
- MORR, C. V. *et al.* A Collaborative Study to Develop a Standardized Food Protein Solubility Procedure. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 6, p. 1715-1718, nov. 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb10572.x>. Acesso em: 06 jun. 2023.
- MUFIDATUN, Anita *et al.* The Effect of pH on Contamination Reduction and Metabolite Contents in Mass Cultures of Spirulina (*Arthrospira platensis* Gomont). **International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology**, v. 13, n. 1, p. 84, 5 fev. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.18517/ijaseit.13.1.16582>. Acesso em: 06 jun. 2023.

MUNAWAROH, Heli Siti Halimatul *et al.* Photostabilization of phycocyanin from *Spirulina platensis* modified by formaldehyde. **Process Biochemistry**, v. 94, p. 297-304, jul. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.04.021>. Acesso em: 06 jun. 2023.

MUNAWAROH, H. S. H. *et al.* Characterization of phycocyanin from *Spirulina fusiformis* and its thermal stability. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1013, p. 012205, maio 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1013/1/012205>. Acesso em: 06 jun. 2023.

NG, I.-Son *et al.* Enhancement of C-phycocyanin purity using negative chromatography with chitosan-modified nanofiber membrane. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 615-628, jul. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.235>. Acesso em: 06 jun. 2023.

NOURI, E.; ABBASI, H.; RAHIMI, E. Effects of processing on stability of water- and fat-soluble vitamins, pigments (C-phycocyanin, carotenoids, chlorophylls) and colour characteristics of *Spirulina platensis*. **Quality Assurance and Safety of Crops & Foods**, v. 10, n. 4, p. 335-349, 13 dez. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3920/qas2018.1304>. Acesso em: 06 jun. 2023.

OLIVEIRA, Ricardo A. G. *et al.* A química e toxicidade dos corantes de cabelo. **Química Nova**, v. 37, No. 6, 1037-1046, maio 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140143>. Acesso em: 06 jun. 2023.

OSÓRIO, Catarina *et al.* Pigments Content (Chlorophylls, Fucoxanthin and Phycobiliproteins) of Different Commercial Dried Algae. **Separations**, v. 7, n. 2, p. 33, 11 jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/separations7020033>. Acesso em: 29 set. 2023.

PAN-UTAI, Wanida; IAMTHAM, Siriluck. Enhanced Microencapsulation of C-Phycocyanin from *Arthrospira* by Freeze-Drying with Different Wall Materials. **Food Technology and Biotechnology**, v. 58, n. 4, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.17113/ftb.58.04.20.6622>. Acesso em: 06 jun. 2023.

PAN-UTAI, Wanida; IAMTHAM, Siriluck. Physical extraction and extrusion entrapment of C-phycocyanin from *Arthrospira platensis*. **Journal of King Saud University - Science**, v. 31, n. 4, p. 1535-1542, out. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.05.026>. Acesso em: 06 jun. 2023.

PAN-UTAI, Wanida; KAHAPANA, Wareerat; IAMTHAM, Siriluck. Extraction of C-phycocyanin from *Arthrospira* (*Spirulina*) and its thermal stability with citric acid. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 1, p. 231-242, 14 maio 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1155-x>. Acesso em: 06 jun. 2023.

PARK, Jihae *et al.* Commercial Potential of the Cyanobacterium *Arthrospira maxima*: Physiological and Biochemical Traits and the Purification of Phycocyanin. **Biology**, v. 11,

n. 5, p. 628, 20 abr. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biology11050628>. Acesso em: 06 jun. 2023.

PELEGRINE, D. H.; GASPARETTO, C. A. Estudo da solubilidade das proteínas presentes no soro de leite e na clara de ovo. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 5, n. 1, p. 57-65, 30 abr. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.15871/1517-8595/rbpa.v5n1p57-65>. Acesso em: 06 jun. 2023.

PERLMUTTER-HAYMAN, Berta; TAPUHI, Eliana. The dissociation constants of di- and trichloroacetic acids measured by a distribution method. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 22, n. 1, p. 22-24, jan. 1977. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/je60072a018>. Acesso em: 06 jun. 2023.

JAESCHKE, Débora *et al.* Phycocyanin from Spirulina: A review of extraction methods and stability. **Food Research International**, v. 143, p. 110314, maio 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110314>. Acesso em: 06 jun. 2023.

POTT, Robert W. M. The release of the blue biological pigment C-phycoyanin through calcium-aided cytolysis of live Spirulina sp. **Coloration Technology**, v. 135, n. 1, p. 17-21, 1 out. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cote.12373>. Acesso em: 06 jun. 2023.

PRATES, Denise da Fontoura *et al.* Spirulina cultivated under different light emitting diodes: Enhanced cell growth and phycocyanin production. **Bioresource Technology**, v. 256, p. 38-43, maio 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.122>. Acesso em: 06 jun. 2023.

PURNAMA, FNW; AGUSTINI, TW; KURNIASIH, RA. The effect of different temperature on the stability of phycocyanin on microcapsule Spirulina platensis. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 530, p. 012008, 16 set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/530/1/012008>. Acesso em: 06 jun. 2023.

PURNAMAYATI, L.; DEWI, EN; KURNIASIH, R. A. Phycocyanin stability in microcapsules processed by spray drying method using different inlet temperature. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 116, p. 012076, fev. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/116/1/012076>. Acesso em: 06 jun. 2023.

REIS, A. *et al.* Production, extraction and purification of phycobiliproteins from Nostoc sp. **Bioresource Technology**, v. 66, n. 3, p. 181-187, dez. 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(98\)00064-9](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(98)00064-9). Acesso em: 29 set. 2023.

RICK, Wirnt. Trypsin. *In*: RICK, Wirnt. **Methods of Enzymatic Analysis**. [S. l.]: Elsevier, 1974. p. 1013-1024. ISBN 9780120913022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-091302-2.50099-2>. Acesso em: 06 jun. 2023.

RODA-SERRAT, Maria Cinta *et al.* Fast cleavage of phycocyanobilin from phycocyanin for use in food colouring. **Food Chemistry**, v. 240, p. 655-661, fev. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.149>. Acesso em: 29 set. 2023.

RODRIGUES, Renata Débora Pinto *et al.* Application of protic ionic liquids in the microwave-assisted extraction of phycobiliproteins from *Arthrospira platensis* with antioxidant activity. **Separation and Purification Technology**, v. 252, p. 117448, dez. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117448>. Acesso em: 06 jun. 2023.

RODRIGUES, Renata Débora Pinto *et al.* Evaluation of protic ionic liquids as potential solvents for the heating extraction of phycobiliproteins from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Algal Research**, v. 38, p. 101391, mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.101391>. Acesso em: 06 jun. 2023.

RODRIGUES, Renata Débora Pinto *et al.* Ultrasound-assisted extraction of phycobiliproteins from *Spirulina (Arthrospira) platensis* using protic ionic liquids as solvent. **Algal Research**, v. 31, p. 454-462, abr. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.021>. Acesso em: 06 jun. 2023.

RUIZ-DOMÍNGUEZ, Mari Carmen *et al.* Rapid Green Extractions of C-Phycocyanin from *Arthrospira maxima* for Functional Applications. **Applied Sciences**, v. 9, n. 10, p. 1987, 15 maio 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app9101987>. Acesso em: 06 jun. 2023.

SACHDEVA, Neha *et al.* Assessment of transient effects of alternative nitrogen sources in continuous cultures of *Arthrospira sp.* using proteomic, modeling and biochemical tools. **Bioresource Technology**, v. 267, p. 492-501, nov. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.062>. Acesso em: 06 jun. 2023.

SARADA, R.; PILLAI, Manoj G.; RAVISHANKAR, G. A. Phycocyanin from *Spirulina sp.*: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. *Process Biochemistry*, v. 34, n. 8, p. 795-801, out. 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0032-9592\(98\)00153-8](https://doi.org/10.1016/s0032-9592(98)00153-8). Acesso em: 29 set. 2023.

SARON, Clodoaldo; FELISBERTI, Isabel. Ação de colorantes na degradação e estabilização de polímeros. **Química Nova**, v. 29, No. 1, 124-28, agosto 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100022>. Acesso em: 06 jun. 2023.

SELIG, Michael J. *et al.* Protection of blue color in a spirulina derived phycocyanin extract from proteolytic and thermal degradation via complexation with beet-pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 74, p. 46-52, jan. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.07.027>. Acesso em: 06 jun. 2023.

SHUNMUGIAH MAHENDRAN *et al.* Isolation and purification of phycocyanin pigments from *Spirulina sp.* biomass and evaluation of its anticancer and antioxidant potential. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 14 maio 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02765-x>. Acesso em: 06 jun. 2023.

SILVEIRA, S. T. *et al.* Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, p. 1629-1634, maio 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.050>. Acesso em: 8 out. 2023.

SIMON, Ursula *et al.* Demonstration of protein capture and separation using three-dimensional printed anion exchange monoliths fabricated in one-step. **Journal of Separation Science**, 26 out. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jssc.202000722>. Acesso em: 06 jun. 2023.

SINAD, Korina Vida *et al.* Immobilization of Phycocyanin in a Rice Hull Nanosilica/Calcium-Alginate Bead System for Cadmium Ion Remediation. **Philippine Journal of Science**, v. 150, n. 3, 21 maio 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.56899/150.03.30>. Acesso em: 06 jun. 2023.

SITI HALIMATUL MUNAWAROH, Heli *et al.* In-vitro molecular docking analysis of microalgae extracted phycocyanin as an anti-diabetic candidate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 161, p. 107666, set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107666>. Acesso em: 06 jun. 2023.

SOROR, Abel-Fattah Salah *et al.* Evaluation of Green Silver Nanoparticles Fabricated by *Spirulina platensis* Phycocyanin as Anticancer and Antimicrobial Agents. **Life**, v. 12, n. 10, p. 1493, 26 set. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/life12101493>. Acesso em: 06 jun. 2023.

STANIC-VUCINIC, Dragana *et al.* *Spirulina* Phycobiliproteins as Food Components and Complements. In: STANIC-VUCINIC, Dragana *et al.* **Microalgal Biotechnology**. [S. l.]: InTech, 2018. ISBN 9781789233322. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.73791>. Acesso em: 06 jun. 2023.

SUKHINOV, Daniil V. *et al.* Increased C-phycocyanin extract purity by flocculation of *Arthrospira platensis* with chitosan. **Algal Research**, v. 58, p. 102393, out. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102393>. Acesso em: 06 jun. 2023.

SUN, Han *et al.* Microalgae-Derived Pigments for the Food Industry. **Marine Drugs**, v. 21, n. 2, p. 82, 25 jan. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md21020082>. Acesso em: 15 ago. 2023.

JENKINS, Terry W. Three solutions of the protein solubility problem. **Protein Science**, v. 7, n. 2, p. 376-382, fev. 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pro.5560070218>. Acesso em: 06 jun. 2023.

THEVARAJAH, Bavatharny *et al.* Large-scale Production of *Spirulina*-based Proteins and c-phycocyanin: A Biorefinery Approach. **Biochemical Engineering Journal**, p. 108541, jul. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108541>. Acesso em: 15 ago. 2023.

TONG, Xueyu *et al.* Spectroscopic and molecular docking studies on the interaction of phycocyanobilin with peptide moieties of C-phycocyanin. **Spectrochimica Acta Part A**:

Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 236, p. 118316, ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118316>. Acesso em: 06 jun. 2023.

VÁZQUEZ-RODRÍGUEZ, Josmar Araud; ESCALANTE, Froylán Mario Espinoza. Analysis of the stability of phycocyanin when trehalose and citric acid are used as protectants in nutraceutical gelatin candies under in vitro digestion assays'. **Food Science and Technology**, v. 42, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/fst.40621>. Acesso em: 06 jun. 2023.

WANG, Feng *et al.* Efficient extraction of phycobiliproteins from dry biomass of *Spirulina platensis* using sodium chloride as extraction enhancer. **Food Chemistry**, p. 135005, nov. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135005>. Acesso em: 06 jun. 2023.

WICAKSONO, H. A.; SATYANTINI, W. H.; MASITHAH, E. D. The spectrum of light and nutrients required to increase the production of phycocyanin *Spirulina platensis*. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 236, p. 012008, 1 mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/236/1/012008>. Acesso em: 8 out. 2023.

WIJAYANTI, Marini *et al.* Characterization of *Arthrospira platensis* cultured in wastewater of *Clarias* catfish farming media: DNA barcode, helical form, growth, and phycocyanin. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 21, n. 12, 1 dez. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d211252>. Acesso em: 06 jun. 2023.

YU, Jiajia *et al.* Continuous cultivation of *Arthrospira platensis* for phycocyanin production in large-scale outdoor raceway ponds using microfiltered culture medium. **Bioresource Technology**, v. 287, p. 121420, set. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121420>. Acesso em: 06 jun. 2023.

YUAN, Biao *et al.* A review of recent strategies to improve the physical stability of phycocyanin. **Current Research in Food Science**, nov. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.11.019>. Acesso em: 06 jun. 2023.

YVON, MIREILLE; CHABANET, CLAIRE; PÉLISSIER, JEAN-PIERRE. Solubility of peptides in trichloroacetic acid (TCA) solutions Hypothesis on the precipitation mechanism. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 34, n. 3, p. 166-176, 12 jan. 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1989.tb00227.x>. Acesso em: 06 jun. 2023.

ZHANG, Zhong; LI, Ying; ABBASPOURRAD, Alireza. Improvement of the colloidal stability of phycocyanin in acidified conditions using whey protein-phycocyanin interactions. **Food Hydrocolloids**, v. 105, p. 105747, ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105747>. Acesso em: 06 jun. 2023.

ZHENG, Jing *et al.* Phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis* protect against diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress. **American Journal of Physiology-**

Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 304, n. 2, p. R110—R120, 15 jan. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00648.2011>. Acesso em: 8 out. 2023.

ZHENG, Yunquan *et al.* Phycocyanin fluorescent probe from *Arthrospira platensis*: preparation and application in LED-CCD fluorescence density strip qualitative detection system. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 2, p. 1107-1115, 28 set. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1631-y>. Acesso em: 06 jun. 2023.

ZHUXIN, Li *et al.* Carboxylated chitosan improved the stability of phycocyanin under acidified conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 123474, jan. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123474>. Acesso em: 06 jun. 2023.

ZIDANE, Salima; BOULEGHLEM, Hocine; MOHAMED SEGHIR, Abdallah. Water compatibility of M'sila region (South- East Algeria) for cultivation of *Spirulina* & evaluation of methods of extraction of Phycocyanin and investigation of stability by β -Cyclodextrin. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, 1 ago. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.9755/ejfa.2022.v34.i9.2879>. Acesso em: 06 jun. 2023.