



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

OBTENÇÃO SIMULTÂNEA DE FICOBILIPROTEÍNAS E ANIDRASE CARBÔNICA, E
EXTRAÇÃO SELETIVA DE C-FICOCIANINA

LUISA SALA

PROF.^a DR.^a SUSANA JULIANO KALIL

Orientadora

PROF.^a DR.^a CAROLINE COSTA MORAES

Coorientadora

RIO GRANDE, RS

2017

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

OBTENÇÃO SIMULTÂNEA DE FICOBILIPROTEÍNAS E ANIDRASE CARBÔNICA, E
EXTRAÇÃO SELETIVA DE C-FICOCIANINA

LUISA SALA

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

PROF.^a DR.^a SUSANA JULIANO KALIL

Orientadora

PROF.^a DR.^a CAROLINE COSTA MORAES

Coorientadora

RIO GRANDE, RS

2017

Ficha catalográfica

S159o Sala, Luisa.

Obtenção simultânea de ficobiliproteínas e anidrase carbônica, e extração seletiva de c-ficocianina / Luisa Sala. – 2017.
199 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio Grande/RS, 2017.

Orientadora: Dr^a. Susana Juliano Kalil.

Coorientadora. Dr^a. Caroline Costa Moraes.

1. Spirulina 2. Biocorante 3. Enzima 4. Alococianina
5. Cianobactéria 6. Dióxido de carbono I. Kalil, Susana Juliano
II. Moraes, Caroline Costa III. Título.

CDU 664

APROVAÇÃO

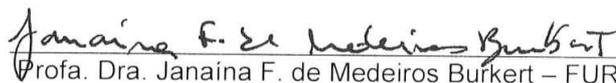
Tese defendida por Luisa Sala e aprovada em 16 de Março de 2017, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Susana Juliano Kalil – FURG



Profa. Dra. Ana Paula Manera – UNIPAMPA



Profa. Dra. Janaína F. de Medeiros Burkert – FURG



Profa. Dra. Ana Priscila Centeno da Rosa – FURG



Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert – FURG

Aos meus pais, Lili e Jucimar, que me deram muito mais do que a vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

“Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, pois cada pessoa é única, e nenhuma substitui outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só, nem nos deixa só. Leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito; mas não há os que não levam nada. Há os que deixam muito; mas não há os que não deixam nada. Essa é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente de que duas almas não se encontram por acaso”. Antoine de Saint-Exupéry

Muitas pessoas passaram e deixaram um pouco de si ao longo desta jornada acadêmica de quatro anos. Deixaram um ensinamento, um conselho, um carinho, um abraço, uma ajuda, uma discussão, uma dúvida, um choro, um olhar ou um sorriso. E é pra vocês que deixaram um pouco de si que eu quero agradecer. Muito obrigada pela amizade de todos, levarei as lembranças para sempre. Gratidão eterna!

Agradeço aos meus pais, Lili e Jucimar: pelo apoio (nas horas difíceis e boas), amor, força, incentivo, princípios, orações e também pelas velas que a mãe acendeu ao longo de toda essa jornada acadêmica. Agradeço, principalmente, pela oportunidade de estudar. Não foi fácil sair de casa e passar todo esse tempo longe. Longe da comida, da roupa lavada, da companhia de vocês, da cama arrumada, da casa limpa, dos abraços, do “acorda que tá na hora de levantar”. Tenho o maior orgulho de vocês dois, que abriram mão de muita coisa para conseguir dar a volta e ter os dois filhos estudando. Muito obrigada por tudo! Peço perdão pelas ausências, as quais foram muitas, mas necessárias para chegar até aqui.

Agradeço ao meu irmão Davi, e aos meus *nonos* Lirio e Diva. Mano, és um dos meus orgulhos! Obrigada por tudo, principalmente pelo apoio, compreensão e cuidado nas horas de aperto. *Nonos*, obrigada pelo amor, cuidado e carinho todos os dias, amo vocês!

Agradeço com muito amor ao meu namorado Rodrigo. *“Quando me vi tendo de viver comigo apenas e com o mundo, você me veio como um sonho bom e me assustei”*. Obrigado por me fazer acreditar no amor. Por entender as ausências (principalmente aquelas dos finais de semana e feriados). Por me escutar, mesmo não entendendo muitas coisas sobre essa tal de enzima-*Spirulina*-ficocianina. Obrigada pelo abraço quando meus ensaios davam errado, e eu chegava em casa triste, furiosa e chateada. Por me cuidar sempre que eu precisei. Obrigada por todo incentivo e força, pelos conselhos e conversas, pela parceria, ajuda, confiança e risadas. Por tornar meus dias mais leves e divertidos. Amo e muito!

Agradeço, com imenso carinho, a minha orientadora Professora Susana por ser mais do que “a minha orientadora”, por ser a minha segunda mãe. Obrigada por me guiar, mostrar os caminhos (que às vezes eu não os vejo), puxões de orelha, cobranças, oportunidades, princípios, discussões, conselhos, e pelos ensinamentos, não só na vida acadêmica, mas pessoais também. És um exemplo de profissional que todos deveriam seguir e que me espelho muito. Obrigada pelo apoio e por acreditar em mim durante todos esses anos. E como todos dizem, por deixar muito de ti em mim. Gratidão eterna!

Agradeço imensamente a minha amiga e coorientadora Professora Caroline. Carol, agradeço por acreditar em mim durante toda essa jornada de graduação-mestrado-doutorado, melhor não contar os anos... Obrigada pelas risadas, por tornar meus dias mais alegres, pelo apoio, ensinamentos, pelas palavras de conforto e pelo ombro amigo nas horas difíceis. Obrigada por todo o teu esforço com esse estudo, principalmente por ter feito as correções desta tese

cuidando do Pedro, gratidão eterna. Se hoje eu cheguei até aqui, é por que você tem uma grande parcela nessa caminhada. Tu és outra pessoa que deixou muito de ti em mim.

Aos meus amigos, Ailton, Ana Rafaela, Betina, Daiane, Gabrielle, João, Joana e Tchély. “*Às vezes, o que a gente acha que é só acaso, sorte ou até golpe do destino, é, na verdade, só um jeito bem charmoso que a vida encontrou de trazer os nossos maiores presentes*”. Agradeço a Joana (Jô) por ter sanado tantas dúvidas/incertezas durante esta pesquisa, pelos debates e discussões que surgiram ao longo desta jornada. Obrigada pela amizade, pelo apoio e por toda ajuda ao longo desses anos. Jô, gratidão eterna!

Ailton, agradeço pelos nossos caminhos terem se cruzado. Tu tornou meus dias mais engraçados e felizes, mesmo quando eu chorava (sei que tu nunca vais esquecer do dia da chapinha ou do “*Tiquila*”). Agradeço por teres me aturado durante todos esses anos, e com certeza tu foi uma dessas pessoas que deixou muito de ti. Obrigada por tudo!

Dai, és uma mulher com muita força e dedicação, obrigada por todo carinho!

Uma amizade linda e “*pequena*” que o doutorado me deu, Gabrielle (Gabizinha) muito obrigado por tudo, por seres essa pessoa pequena com um enorme coração e amor! Rafa, mesmo tu não morando mais aqui, nunca vou me esquecer de ti, e da tua linda família. Tchély, mesmo longe, é muito bom e importante ter uma amiga-irmã que se entende só em olhar. Obrigada pelo apoio e pelo ombro sempre que eu precisei.

Amigos, eu agradeço por todos os momentos, sejam eles de diversão (que só vocês sabem proporcionar), choros, conversas, parceria, cuidados ou abraços. Obrigada por tudo, sempre!

Agradeço à Ana por ser, literalmente, minha mãe no laboratório. Obrigada por toda força, ensinamentos e ajuda durante todos esses anos de graduação-mestrado-doutorado.

Agradeço a Rejane, que torna os meus dias mais divertidos.

Aos meus bolsistas de iniciação científica, Marina, Alexandre, Fernanda, Bruna, Laís e Júnior que auxiliaram muito no desenvolvimento deste trabalho, e também por me deixarem contribuir para a formação de vocês. Muito obrigada pela ajuda.

Agradeço a todos os amigos e colegas (Andressa, Deh, Thais, Elida, Samuel e Felipe) que passaram durante toda jornada acadêmica, do Laboratório de Microbiologia e Biosseparações, por garantirem os momentos de descontração.

Agradeço a todos os colegas que passaram pelo Laboratório de Biotecnologia – Fatiele, Bruno, Marina, Pablo e Mayara, e aos agregados – Igor e Duda, com certeza meus dias foram mais leves e divertidos com vocês ao meu lado. Agradeço as Professoras Lucielen e Michele Andrade, pelos ensinamentos, pela confiança no meu trabalho e pelas liberações necessárias para que este trabalho fosse concluído. Gratidão eterna!

Agradeço a família do Rodrigo – Gi, Fredo, Rosária, Márcio, Gô, Isaura, Isadora e Maíra, que me acolheu com muito amor. Aos amigos que ganhei – Ivan, Tiago, Rêh, Felipe, Bruno, pelos momentos de diversão.

Aos professores – Eliana, Jaqueline, André e Janaína, que em algum momento esclareceram dúvidas que surgiram ao longo do desenvolvimento desta tese, gratidão eterna!

Agradeço a todos os técnicos administrativos em educação da Escola de Química e Alimentos desta Universidade.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica do Sul da FURG, em especial ao Rudnei pelo auxílio durante a realização de análises.

Aos professores da banca examinadora pela contribuição valiosa à melhoria do trabalho.

Agradeço à FURG, por permitir um estudo de qualidade.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos e a FAPERGS pelo apoio financeiro ao projeto.

Dizem que antes de um rio entrar no mar, ele treme de medo. Olha para trás, para toda a jornada que percorreu, para os cumes, as montanhas, para o longo caminho sinuoso que trilhou através de florestas e povoados, e vê à sua frente um oceano tão vasto, que entrar nele nada mais é do que desaparecer para sempre. Mas não há outra maneira. O rio não pode voltar. Ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência. O rio precisa se arriscar e entrar no oceano. E somente quando ele entrar no oceano é que o medo desaparecerá, porque então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano, mas tornar-se oceano.

Osho

[...] E nossa história não estará pelo avesso assim sem final feliz, teremos coisas bonitas pra contar. E até lá, vamos viver, temos muito ainda por fazer, não olhe pra trás, apenas comecemos. O mundo começa agora! Apenas comecemos...

Renato Russo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Rendimento de extração e pureza de C-ficocianina com diferentes processos de ruptura celular.....50

ARTIGO 1

Tabela 1 – Precipitação de CaCO₃ sólido por anidrase carbônica de *S. platensis* LEB-52..... 74

ARTIGO 2

Tabela 1– Produção simultânea de C-ficocianina, aloficocianina e anidrase carbônica por *Spirulina platensis* LEB-52 utilizando MZ 100% no 21° d de cultivo. 101

ARTIGO 3

Tabela 1 – Composição do agente de ruptura celular e agente extrator no processo de extração seletiva de C-FC de *Spirulina platensis*. 117

ARTIGO 4

Tabela 1 – Variáveis independentes e seus níveis reais e codificados estudados no delineamento fatorial fracionado 2⁶⁻². 139

Tabela 2 – Matriz do delineamento fatorial fracionado 2⁶⁻², valores codificados e reais (entre parênteses). 140

Tabela 3 – Descrição das variáveis dos ensaios para maximização da extração de C-FC. 141

Tabela 4 – Efeito das variáveis independentes no rendimento de extração (mg·g⁻¹) de C-FC em 36 h de extração. 147

Tabela 5 – Efeito das variáveis na pureza do extrato de C-FC em 36 h de extração. 147

Tabela 6 – Efeito das variáveis independentes no rendimento de extração (mg·g⁻¹) de C-FC em 36 h de extração (após checagem de curvatura). 149

Tabela 7 – Efeito das variáveis na pureza do extrato de C-FC em 36 h de extração (após checagem de curvatura). 150

Tabela 8 – Rendimento de extração e pureza de C-FC dos Ensaios 17, 18 e 19 realizados a 17,5 °C e Ensaio B realizado a 25 °C. Letras iguais entre as médias não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância (Teste de *Tukey*). 152

Tabela 9 – Concentração, pureza e recuperação de C-FC após o processo de ultrafiltração. 155

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organização estrutural do ficobilissomo.....	35
Figura 2 – Posição das ficocianobilinas na sequência de aminoácidos da C-ficocianina. CIS e FCB são cisteína e ficocianobilina, respectivamente.	36
Figura 3 – Posição das ficocianobilinas na sequência de aminoácidos da aloficocianina. CIS e FCB são cisteína e ficocianobilina, respectivamente.	38
Figura 4 – Mecanismo catalítico do sítio ativo da anidrase carbônica durante a hidratação reversível do dióxido de carbono.....	40
Figura 5 – Esquema geral da operação do CCM em cianobactérias, baseado nos modelos clássico dos micro-organismos: <i>Synechococcus elongatus</i> PCC7942, <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 e <i>Synechococcus</i> sp. PCC7002. Designações: BCT1, BicA e SbtA são sistemas transportadores de bicarbonato; NDH-1 _{3/4} é o sistema de captura de CO ₂ ; e AC é anidrase carbônica.....	41

ARTIGO 1

Figura 1 – Rendimento de extração de anidrase carbônica (AC) expressa em termos de esterase ($U \cdot g^{-1}$) e de ficobiliproteínas ($mg \cdot g^{-1}$) em diferentes tempos de extração com concentração de biomassa de $0,2 g \cdot L^{-1}$. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias para cada biocomposto (Teste <i>Tukey</i> , $p > 0,05$).....	66
Figura 2 – Rendimento de extração de proteína solúvel ($g \cdot g^{-1}$) em diferentes tempos de extração com concentração de biomassa de $0,2 g \cdot L^{-1}$. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias (Teste <i>Tukey</i> , $p > 0,05$).....	68
Figura 3 – Rendimento de extração de anidrase carbônica (AC) expressa em termos de esterase e hidratase ($U \cdot g^{-1}$) em diferentes tempos de extração com concentração de biomassa de $23 g \cdot L^{-1}$. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias para cada biocomposto (Teste <i>Tukey</i> , $p > 0,05$).	69
Figura 4 – Extração de proteínas ($g \cdot g^{-1}_{biomassa}$) em diferentes tempos de extração com concentração de biomassa de $23 g \cdot L^{-1}$. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias (Teste <i>Tukey</i> , $p > 0,05$ e $n = 3$).....	71
Figura 5 – Microscopia eletrônica de varredura (a) células intactas de <i>Spirulina</i> e (b) após a extração assistida por ultrassom (concentração de $0,2 g \cdot L^{-1}$); e micrografia das (c) células intactas de <i>Spirulina</i> (aumento de 200 x) e (d) após a extração assistida por ultrassom (concentração de $0,2 g \cdot L^{-1}$, aumento de 400 x).....	72
Figura 6 – Espectro de absorção do extrato contendo anidrase carbônica e ficobiliproteínas após o tratamento ultrassônico (concentração de biomassa de $0,2 g \cdot L^{-1}$).	73
Figura 7 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do carbonato de cálcio precipitado (a) na presença da enzima em 8 min, (b) na ausência da enzima em 8 min, (c) na presença da enzima em 120 min e (d) na ausência da enzima em 120 min. Ampliação de x 3000.....	75

ARTIGO 2

Figura 1 – Acompanhamento do cultivo da microalga <i>Spirulina platensis</i> LEB-52 (a) concentração de biomassa e pH, e (b) produtividade de biomassa.	95
Figura 2 – (a) Concentração volumétrica ($\mu g \cdot mL^{-1}$) e (b) concentração específica ($mg \cdot g^{-1}_{biomassa}$) de ficobiliproteínas ao longo do cultivo de <i>Spirulina platensis</i> LEB-52.	97
Figura 3 – Perfil de produção de anidrase carbônica expressa em termos de esterase ao longo do cultivo de <i>Spirulina platensis</i> LEB-52.	99

Figura 4 – Relação entre a atividade enzimática de anidrase carbônica expressa em termos de hidratase e esterase ($U \cdot g^{-1}$) ao longo do cultivo de *Spirulina platensis* LEB-52..... 102

ARTIGO 3

Figura 1 – (a) Rendimento de extração ($mg \cdot g^{-1}$) e (b) pureza de C-ficocianina extraída com diferentes concentrações do LI acetato de trietilamônio em tampão tris-SO₄. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias (Teste *Tukey*, $p > 0,05$). 120

Figura 2 – (a) Rendimento de extração ($mg \cdot g^{-1}$) e (b) pureza de C-ficocianina extraída com diferentes composições do agente de ruptura celular e agente extrator. 122

Figura 3 – Espectros de absorção na região ultravioleta-visível da C-ficocianina obtida em 0, 12, 24, 36 e 48 h. (a) Ensaio 1: 10% (m/m) de LI em tampão tris-SO₄ + tampão tris-SO₄; (b) Ensaio 2: tampão tris-SO₄; (c) Ensaio 3: 10% (m/m) de acetato de trietilamônio em tampão fosfato de sódio + tampão fosfato de sódio; (d) Ensaio 5: EDTA dissódico ($3,75 mg \cdot mL^{-1}$) em tampão tris-SO₄ + tampão tris-SO₄; (e) Ensaio 6: EDTA dissódico ($3,75 mg \cdot mL^{-1}$) em tampão tris-SO₄; (f) Ensaio 7: controle – ultrassom. 123

Figura 4 – C-ficocianina extraída com diferentes composições do agente de ruptura celular e agente extrator em 48 h. Ensaio 1: 10% (m/m) de LI em tampão tris-SO₄ + tampão tris-SO₄; Ensaio 2: tampão tris-SO₄; Ensaio 3: 10% (m/m) de acetato de trietilamônio em tampão fosfato de sódio + tampão fosfato de sódio; Ensaio 5: EDTA dissódico ($3,75 mg \cdot mL^{-1}$) em tampão tris-SO₄ + tampão tris-SO₄; Ensaio 6: EDTA dissódico ($3,75 mg \cdot mL^{-1}$) em tampão tris-SO₄; Ensaio 7: controle – ultrassom. 127

ARTIGO 4

Figura 1 – Tubos de ultrafiltração Vivaspin® 15 Turbo utilizados para concentrar a C-ficocianina. 141

Figura 2 – Rendimento de extração de C-ficocianina para cada ensaio do delineamento fatorial fracionado 2^{6-2} durante 84 h: (a) 10 °C (b) 17,5 °C e (c) 25 °C. 145

Figura 3 – Pureza de C-ficocianina para cada ensaio do delineamento fatorial fracionado 2^{6-2} durante 84 h: (a) 10 °C (b) 17,5 °C e (c) 25 °C. 146

Figura 4 – Espectros de absorção para os (a) Ensaio 17; (b) Ensaio 18; e (c) Ensaio 19 correspondentes ao ponto central do delineamento fatorial fracionado 2^{6-2} durante 84 h de extração. 148

Figura 5 – (a) Rendimento de extração e (b) pureza de C-FC na maximização da extração seletiva de C-FC utilizando EDTA durante 60 h. Letras iguais entre as médias não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância (Teste de *Tukey*). 151

Figura 6 – Espectro de absorção para o (a) Ensaio A e (b) Ensaio B. 153

Figura 7 – Processo de obtenção de C-FC com grau de pureza alimentar..... 155

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: RESUMO GERAL, ABSTRACT GERAL, INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS	23
RESUMO	23
ABSTRACT	25
1 INTRODUÇÃO	27
2 OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL.....	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
CAPÍTULO II: REVISÃO DA LITERATURA	31
3 REVISÃO DA LITERATURA	33
3.1 MICROALGAS	33
3.1.1 Gênero <i>Spirulina</i>	34
3.2 FICOBILIPROTEÍNAS	35
3.2.1 C-ficocianina	36
3.2.2 Aloficocianina	37
3.3 ANIDRASE CARBÔNICA	38
3.3.1 Captura enzimática do dióxido de carbono	42
3.4 PRODUÇÃO DE FICOBILIPROTEÍNAS E ANIDRASE CARBÔNICA.....	44
3.5 RUPTURA CELULAR E EXTRAÇÃO DE BIOPRODUTOS INTRACELULARES	46
3.6 EXTRAÇÃO DE FICOBILIPROTEÍNAS E ANIDRASE CARBÔNICA.....	48
3.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	53
ARTIGO 1: EXTRAÇÃO SIMULTÂNEA DE FICOBILIPROTEÍNAS E ANIDRASE CARBÔNICA DE <i>Spirulina platensis</i> LEB-52, E CAPTURA ENZIMÁTICA DE CO₂	55
RESUMO	57
1 INTRODUÇÃO	59
2 MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1 MICRO-ORGANISMO, MEIO DE CULTIVO E CULTIVO	61
2.2 INFLUÊNCIA DO TEMPO NA RUPTURA CELULAR E EXTRAÇÃO DOS BIOPRODUTOS	61
2.3 CAPTURA E SEQUESTRO DO CO ₂	62
2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS	63
2.4.1 Concentração e rendimento de ficobiliproteínas	63
2.4.2 Atividade enzimática de anidrase carbônica	63
2.4.3 Concentração de biomassa e proteínas	64
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
3.1 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM NA RECUPERAÇÃO DOS BIOPRODUTOS.....	65
3.2 CAPTURA E SEQUESTRO DO DIÓXIDO DE CARBONO	73
4 CONCLUSÃO	76
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ARTIGO 2: PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE FICOBILIPROTEÍNAS E ANIDRASE CARBÔNICA POR <i>Spirulina platensis</i> LEB-52	85
RESUMO	87

1	INTRODUÇÃO	89
2	MATERIAL E MÉTODOS	90
2.1	MICROALGA E MEIO DE CULTIVO	90
2.2	CULTIVO DE <i>Spirulina platensis</i> LEB-52 PARA PRODUÇÃO DE FICOBILIPROTEÍNAS E ANIDRASE CARBÔNICA.....	91
2.2.1	Determinação dos parâmetros de crescimento	91
2.3	CORRELAÇÃO ENTRE AS ATIVIDADES DE ESTERASE E HIDRATASE DE ANIDRASE CARBÔNICA.....	92
2.4	MÉTODOS ANALÍTICOS	92
2.4.1	Concentração de ficobiliproteínas	92
2.4.2	Atividade enzimática de anidrase carbônica	93
2.4.3	Concentração de biomassa e determinação do pH	93
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
3.1	PRODUÇÃO DE FICOBILIPROTEÍNAS E ANIDRASE CARBÔNICA POR <i>Spirulina platensis</i> LEB-52 UTILIZANDO MEIO ZARROUK 100%	94
3.2	CORRELAÇÃO ENTRE AS ATIVIDADES DE ESTERASE E HIDRATASE DE ANIDRASE CARBÔNICA AO LONGO DO CULTIVO DE <i>Spirulina platensis</i> LEB-52	101
4	CONCLUSÃO	103
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

ARTIGO 3: EXTRAÇÃO SELETIVA DE C-FICOCIANINA DE *Spirulina platensis* UTILIZANDO LÍQUIDO IÔNICO E AGENTE QUELANTE..... 109

	RESUMO	111
1	INTRODUÇÃO	113
2	MATERIAL E MÉTODOS	115
2.1	MICRO-ORGANISMO E CULTIVO	115
2.2	EXTRAÇÃO DE C-FICOCIANINA.....	116
2.2.1	Concentração do agente de ruptura celular: líquido iônico	116
2.2.2	Composição do agente de ruptura celular e extrator	116
2.3	MÉTODOS ANALÍTICOS	117
2.3.1	Concentração, rendimento de extração e pureza de C-ficocianina	117
2.3.2	Concentração de biomassa	118
2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	118
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	119
3.1	CONCENTRAÇÃO DO LIQUIDO IÔNICO NA EXTRAÇÃO SELETIVA DE C-FC	119
3.2	COMPOSIÇÃO DO AGENTE DE RUPTURA CELULAR E AGENTE EXTRATOR	120
4	CONCLUSÃO	127
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

ARTIGO 4: EXTRAÇÃO SELETIVA DE C-FICOCIANINA COM GRAU DE PUREZA ALIMENTAR..... 133

	RESUMO	135
1	INTRODUÇÃO	137
2	MATERIAL E MÉTODOS	138
2.1	MICRO-ORGANISMO E CULTIVO	138
2.2	MAXIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO SELETIVA DE C-FICOCIANINA	139
2.2.1	Delineamento fatorial fracionado 2⁶⁻²	139
2.2.2	Maximização da extração de C-FC	140

2.3	CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE C-FICOCIANINA POR ULTRAFILTRAÇÃO	141
2.4	CONCENTRAÇÃO, RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO, RECUPERAÇÃO E PUREZA DE C-FICOCIANINA	142
2.5	CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA	143
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	143
3.1	CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE C-FC POR ULTRAFILTRAÇÃO	154
4	CONCLUSÃO	156
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157
CAPÍTULO IV: CONCLUSÃO GERAL		161
4	CONCLUSÃO GERAL	163
5	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	165
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		169
APÊNDICES		189
APÊNDICE 1		191
APÊNDICE 2		192
APÊNDICE 3		193
APÊNDICE 4		194
APÊNDICE 5		195

CAPÍTULO I

RESUMO GERAL, ABSTRACT GERAL, INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

RESUMO

Spirulina pode sintetizar uma gama de biocompostos, destacando-se os pigmentos C-ficocianina (C-FC) e aloficocianina (AFC), e a enzima anidrase carbônica (AC). A C-FC é utilizada como corante azul em alimentos e cosméticos, dependendo do seu grau de pureza; enquanto que a AFC é utilizada como biomarcador. A AC catalisa a reação reversível de hidratação do dióxido de carbono (CO_2) em íons bicarbonato, podendo ser utilizada em processos de captura enzimática de CO_2 . Estes bioprodutos são intracelulares, portanto um fator importante a ser considerado é a etapa de extração. O objetivo do presente estudo foi obter simultaneamente C-FC, AFC, e AC, e extrair C-FC com grau de pureza alimentar a partir da biomassa úmida de *Spirulina platensis* LEB-52. A presente tese foi dividida em quatro artigos. No primeiro artigo foram definidas as condições de extração assistida por ultrassom de C-FC, AFC, e AC (hidratase e esterase) a partir da biomassa úmida, além de aplicar a AC na captura enzimática do CO_2 . Com concentração celular de $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ foram necessários 12 min de ultrassom (sonda) para obter simultaneamente C-FC, AFC e AC expressa em termos de esterase. E para determinar a atividade de AC expressa em termos de hidratase, a concentração celular foi de $23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e tempo de ultrassom de 8 min. O extrato enzimático bruto de AC mostrou potencial para acelerar a reação de hidratação na captura enzimática do CO_2 e posterior precipitação na forma de carbonato de cálcio. No segundo artigo, a produção simultânea de C-FC, AFC e AC, bem como a correlação entre a atividade de AC expressa em termos de esterase e hidratase, foram avaliadas durante o cultivo da microalga *S. platensis* LEB-52. A máxima concentração intracelular de C-ficocianina ($137,4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) foi obtida em 21 d, e de aloficocianina ($100,4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) foi obtida em 20 d de cultivo. A maior concentração intracelular de anidrase carbônica expressa em termos de esterase ($46,3 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$) foi obtida no 6º d de cultivo. Estes biocompostos podem ser obtidos simultaneamente em 21 d de cultivo. Uma correlação entre a atividade de esterase e hidratase da AC ao longo do cultivo de *S. platensis* LEB-52 foi observada. No terceiro artigo, foi proposto um método inovador de ruptura celular e extração de C-FC com grau de pureza alimentar a partir da biomassa úmida. Diferentes composições do agente de ruptura celular (líquido iônico acetato de trietilamônio (LI) e ácido etilenodiamino tetra-acético disódico (EDTA)) e agente extrator (tampão tris- SO_4 e fosfato de sódio) foram testados. Quando as células foram tratadas com EDTA ($3,75 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), após 24 h, obteve-se C-FC com pureza de 1,0 e rendimento de extração de $153,0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. No quarto artigo, foi maximizado o processo de ruptura celular e extração de C-FC com grau de pureza alimentar, analisando a influência de seis variáveis do processo (concentração de EDTA, concentração de biomassa no agente de ruptura celular, concentração de biomassa no agente extrator, tempo de contato com o agente de ruptura celular, agitação e temperatura do processo de extração) através de um delineamento fatorial fracionado 2^{6-2} . Na melhor condição, foi possível obter C-FC com pureza de 1,0, rendimento de extração de $129,0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ e concentração de $0,065 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, podendo ser utilizada como corante em alimentos sem processos de purificação. Por fim, foi aplicado a ultrafiltração, a C-FC foi concentrada cerca de 8,8 vezes, apresentou grau de pureza de 1,6 e recuperação de 93,4%, com uma simples etapa de ultrafiltração foi possível obter C-FC com pureza para ser utilizada como corante em cosméticos.

Palavras-chave: *Spirulina*. Biocorante. Enzima. Aloficocianina. Cianobactéria. Dióxido de carbono.

SIMULTANEOUS OBTAINING OF PHYCOBILIPROTEINS AND CARBONIC ANHYDRASE, AND SELECTIVE EXTRACTION OF C-PHYCOCYANIN

ABSTRACT

Spirulina can synthesize a range of bioproducts, standing out the C-phycoyanin (C-PC) and allophycoyanin (APC) pigments, and the carbonic anhydrase (CA) enzyme. C-PC is used as a blue dye in foods and cosmetics, depending on its purity, while APC is used as a biomarker. CA catalyzes the interconversion of carbon dioxide (CO₂) and bicarbonate ions, and can be used in CO₂ enzymatic capture processes. These bioproducts are intracellular, so an important factor to consider is the extraction step. The aim of the present study was to simultaneously obtain C-PC, APC and CA, and to extract C-PC with food grade purity from the wet biomass of *Spirulina platensis* LEB-52. The present thesis was divided into four articles. In the first article, the conditions of ultrasound-assisted extraction of C-PC, APC, and CA (hydratase and esterase) from wet biomass were defined, and CA was applied in the enzymatic capture of CO₂. At a cell concentration of 0.2 g·L⁻¹, 12 min of ultrasound were required to simultaneously obtain C-PC, APC and CA expressed in terms of esterase. And to determine CA activity expressed in terms of hydratase, the cell concentration was 23 g·L⁻¹ and an ultrasound time of 8 min was required. The crude CA enzymatic extract showed potential to accelerate the hydration reaction in the CO₂ enzymatic capture and subsequent precipitation in the form of calcium carbonate. In the second article, the simultaneous production of C-PC, APC and CA, as well as the correlation between CA activity expressed in terms of esterase and hydratase during *S. platensis* LEB-52 cultivation were evaluated. The maximum intracellular concentration of C-phycoyanin (137.4 mg·g⁻¹) was obtained on the 21st d, and of allophycoyanin (100.4 mg·g⁻¹) on the 20th d of cultivation. The highest intracellular concentration of carbonic anhydrase expressed in terms of esterase (46.3 U·g⁻¹) was obtained on the 6th d of cultivation. These bioproducts can be obtained simultaneously in 21 d of cultivation. A correlation between esterase and hydratase activity of CA during the *S. platensis* LEB-52 cultivation was observed. In the third article, an innovative method of cell rupture and extraction of C-PC with food grade purity from the wet biomass was proposed. Different compositions of the cell rupture agent (ionic liquid – triethylammonium acetate, and ethylenediaminetetraacetic acid disodium (EDTA)) and of the extractor agent (tris-SO₄ and sodium phosphate buffer) were tested. When cells were treated with EDTA (3.75 mg·mL⁻¹) after 24 h, C-PC was obtained with a purity of 1.0 and extraction yield of 153.0 mg·g⁻¹. In the fourth article, the cell rupture and extraction process of C-PC with food purity was maximized. The influence of six process variables (EDTA concentration, biomass concentration in the cell rupture agent, biomass concentration in the extractor agent, contact time with the cell rupture agent, agitation and temperature of the extraction process) was evaluated using a fractional factorial design 2⁶⁻². In the best condition, it was possible to obtain C-PC with a purity of 1.0, extraction yield of 129.0 mg·g⁻¹ and concentration of 0.065 mg·mL⁻¹, and it can be used as a food dye without any purification process. Finally, ultrafiltration was applied, where the C-PC was concentrated about 8.8 times, presenting a purity of 1.6 and a recovery of 93.4%. With a simple ultrafiltration step it was possible to obtain C-PC with purity to be used as a cosmetics dye.

Keywords: *Spirulina*. Bio-dye. Enzyme. Allophycoyanin. Cyanobacteria. Carbon dioxide.

1 INTRODUÇÃO

As ficobiliproteínas, C-ficocianina (C-FC) e aloficocianina (AFC), são pigmentos fotossintéticos acessórios, os quais estão envolvidos na captação da luz por cianobactérias, rodofíceas, criptofíceas e glaucófitas (GLAZER, 1994; VISKARI; COLYER, 2003). Dentre as cianobactérias, *Spirulina platensis* tem ganhado considerável atenção como uma fonte de ficobiliproteínas, somando-se a isso possui o certificado GRAS (*Generally Recognized as Safe*) concedido pelo *Food and Drug Administration* (FDA), o qual autoriza o seu uso em alimentos.

A C-FC possui coloração azul e é utilizada, dependendo do seu grau de pureza, como corante natural em substituição aos corantes sintéticos nas indústrias de alimentos e cosméticos (KUDDUS et al., 2013). A AFC possui coloração verde azulada e é amplamente utilizada em técnicas bioquímicas como uma proteína fluorescente, particularmente para citometria de fluxo (JUNG; DAILEY, 1989). Estudos têm demonstrado que a C-FC apresenta propriedades antioxidantes (THANGAM et al., 2013), hepatoprotetoras (NAGARAJ et al., 2012), anti-inflamatórias (GONZÁLEZ et al., 1999; ROMAY et al., 1998) e neuroprotetora (PENTÓN-ROL et al., 2011). Além dessas propriedades, alguns estudos mostram que a C-FC apresenta efeito anticancerígeno, essa capacidade já foi demonstrada em uma variedade de células, tais como câncer de pulmão (LI et al., 2015), câncer de mama (RAVI et al., 2015), câncer de pâncreas (LIAO et al., 2016), entre outros. A AFC possui propriedades antioxidantes (GE et al., 2006) e antienterovírus (SHIH et al., 2003). A C-FC pode constituir até 20% da fração proteica de *S. platensis* (COHEN, 1997).

Outro bioproduto que pode ser obtido da *Spirulina platensis* é a enzima anidrase carbônica (AC). A AC catalisa a reação reversível de hidratação do dióxido de carbono (CO_2) em íons bicarbonato (HCO_3^-) (BADGER; PRICE, 1994). Em função desta propriedade, a AC tem potencial para aplicação na captação de CO_2 , podendo contribuir para redução da quantidade deste gás emitido na atmosfera. Entretanto, a obtenção de AC a partir de microalgas ainda é pouco explorada, principalmente para este uso (LI et al., 2012; ORES, 2014; ORES et al., 2013).

A composição bioquímica da cianobactéria varia conforme o crescimento celular, portanto é necessário coletar as células microalgais no tempo ótimo de cultivo para garantir a máxima produção dos bioprodutos para comercialização (XIE et al., 2015). O primeiro meio sintético formulado para o cultivo de *Spirulina* foi o meio Zarrouk (ZARROUK, 1966) que é ainda utilizado como meio padrão. Ores (2014) avaliou a produção de ficobiliproteínas e de

AC ao longo do cultivo da microalga *Spirulina platensis* LEB-52 utilizando o meio Zarrouk diluído 20% (v/v) com água destilada, no entanto as ficobiliproteínas começam a ser degradadas no início do cultivo (4° d). Assim, é necessário avaliar se é possível aumentar a concentração intracelular e/ou ainda estender o tempo de produção das ficobiliproteínas utilizando o meio Zarrouk 100% (sem diluições), uma vez que segundo Del Rio-Chanona et al. (2015) a fonte e a concentração de nitrogênio contribuem para o crescimento celular e para o acúmulo de C-ficocianina.

Como as ficobiliproteínas e a AC são dois bioprodutos intracelulares, um fator importante a ser considerado é a etapa de ruptura celular. O processo de ruptura celular constitui o fator chave na produção e purificação de proteínas intracelulares, o qual tem um importante efeito na recuperação e qualidade do extrato proteico obtido (BECERRA et al., 2001).

C-ficocianina pode ser extraída a partir da biomassa úmida ou seca de *Spirulina platensis* em meio aquoso. A fim de melhorar o rendimento de extração e reduzir o tempo de extração, diferentes processos que causam a ruptura celular tais como ciclos de congelamento-descongelamento (SARADA; KUMAR; RENGASAMY, 2011), sonicação (MORAES et al., 2011b), moinho de bolas (MORAES; BURKERT; KALIL, 2010), ultrassom (ORES; AMARANTE; KALIL, 2016) e campos elétricos pulsados (MARTÍNEZ et al., 2016) têm sido utilizados. No entanto, estes métodos de ruptura celular são caracterizados por uma falta de especificidade que provoca a liberação de outras impurezas ou fragmentos celulares que afetam negativamente a qualidade do extrato, bem como as operações de recuperação e purificação. Desta forma, é essencial o estudo de novos métodos de ruptura celular e extração de C-ficocianina que proporcionem um elevado rendimento de extração de C-FC e que permitam a liberação desta biomolécula para o meio aquoso de uma forma mais seletiva.

Com base no exposto, esta tese visa ampliar os estudos sobre a obtenção simultânea de ficobiliproteínas e de anidrase carbônica de *Spirulina platensis* LEB-52, além de inovar ao apresentar um novo método de ruptura celular e extração para obter C-ficocianina com grau de pureza alimentar.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obter simultaneamente as ficobiliproteínas – C-ficocianina e aloficocianina, e a enzima anidrase carbônica a partir da biomassa microalgal de *Spirulina platensis* LEB-52; e extrair C-ficocianina com grau de pureza alimentar a partir da biomassa úmida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir as condições de extração assistida por ultrassom de C-ficocianina, aloficocianina e anidrase carbônica;
- Aplicar a enzima anidrase carbônica de *S. platensis* LEB-52 na captura enzimática do dióxido de carbono e posterior precipitação em carbonato de cálcio, além de verificar a morfologia do carbonato de cálcio precipitado;
- Avaliar a produção simultânea de anidrase carbônica e de ficobiliproteínas ao longo do cultivo de *S. platensis* LEB-52;
- Verificar a correlação da atividade de esterase e de hidratase da anidrase carbônica ao longo do cultivo de *S. platensis* LEB-52;
- Extrair seletivamente C-ficocianina a partir da biomassa úmida de *Spirulina* utilizando líquido iônico – acetato de trietilamônio, e agente quelante – EDTA;
- Maximizar as condições do processo de ruptura celular e extração seletiva de C-ficocianina utilizando EDTA.

CAPÍTULO II
REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MICROALGAS

As microalgas compreendem um conjunto muito diversificado de micro-organismos fotossintéticos, predominantemente aquáticos e em sua maioria microscópicos unicelulares, que podem formar colônias, com pouca ou nenhuma diferenciação celular (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). O termo microalgas não tem valor taxonômico, engloba micro-organismos algais com clorofila *a* e outros pigmentos fotossintéticos, os quais são capazes de realizar a fotossíntese oxigênica (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001; TOMASELLI, 2004). Filogeneticamente, as microalgas são divididas em organismos procariontes ou eucariontes. Exemplos de micro-organismos procarióticos são as cianobactérias (*Cyanophyceae*) e de eucarióticos são as algas verdes (*Chlorophyta*) e diatomáceas (*Bacillariophyta*) (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

As cianobactérias (também conhecidas como algas verde azuladas) representam um dos maiores e mais versáteis grupos de procarióticos com enorme importância biológica, pois cerca de 20-30% da produtividade global fotossintética primária é originada de cianobactérias. Isto corresponde a uma fixação de 20-30 Gt de CO₂ em biomassa e liberação de cerca de 50-80 Gt de O₂ na atmosfera por estes micro-organismos procarióticos oxigênicos (SHEVELA et al., 2013).

A produção comercial em larga escala de microalgas para obtenção de bioprodutos teve início nas décadas de 60-70 com *Chlorella* e *Spirulina*, seguido pela produção de β-caroteno de *Dunaliella salina* na década de 80. Estas microalgas se reproduzem em ambientes altamente seletivos, por exemplo, o gênero *Spirulina* tem habilidade de se reproduzir em meios com elevado pH e elevada concentração do íon bicarbonato (HCO₃⁻), *D. salina* se desenvolve em ambientes com elevada salinidade, enquanto que *Chlorella* se reproduz em meios com elevada concentração de nutrientes (MOHEIMANI et al., 2015).

As microalgas são fonte de uma quantidade ilimitada de produtos, apresentando importância comercial na indústria de alimentos, química, na área médica e na aquicultura. Podem produzir uma gama de compostos naturais de valor agregado, como, por exemplo: carotenoides (DEY; RATHOD, 2013), enzimas, ficobiliproteínas (ORES; AMARANTE; KALIL, 2016), proteínas, clorofila, lipídios, ácidos graxos (PIORRECK; BAASCH; POHL,

1984), polímeros (MISHRA; JHA, 2009), composto fenólicos (LI et al., 2007), entre outros bioprodutos.

3.1.1 Gênero *Spirulina*

Pertencente a ordem *Oscillatoriales*, o gênero *Spirulina* é uma cianobactéria fotossintética, unicelular, filamentosa e se divide exclusivamente por fissão binária. É reconhecida pelo seu arranjo de tricomas multicelulares cilíndricos em uma hélice esquerda ou direita fechada ao longo de todo o comprimento. A sua coloração pode variar de verde azulado a vermelho. Algumas cepas marinhas são extremamente vermelhas, estas apresentam como pigmento fotossintético majoritário a ficoeritrina (HOLT, 1994).

As células de *Spirulina* são Gram-negativas, a parede celular é estruturalmente constituída por uma camada de mureína (peptoglicano) e externamente por uma camada de lipopolissacarídeos. A alta digestibilidade destas células é devido à falta de celulose, o que facilita seu uso para consumo humano (RICHMOND, 2004).

A biomassa de *Spirulina* apresenta um alto teor de proteínas sendo este de 60-70% (m/m, base seca), dependendo da espécie. É considerada uma fonte completa de proteínas, contendo aminoácidos essenciais, incluindo leucina, isoleucina e valina, embora com concentrações reduzidas de metionina, cistina e lisina, quando comparado com proteínas padrão tais como as de carne, ovos ou leite (VO; NGO; KIM, 2015).

Dentro deste gênero, as espécies mais importantes são: *S. platensis*, seguida da *S. máxima* e da *S. fusiformes*. O meio de cultivo Zarrouk da *S. platensis* apresenta característica alcalina (pH 9,5-10,5) o que pode ser interessante para prevenir a proliferação de alguns micro-organismos (BELAY, 1997; RICHMOND; GROBBELAAR, 1986). Além disso, *Spirulina platensis* possui o certificado GRAS (*Generally Recognized as Safe*), o qual autoriza o seu uso em alimentos.

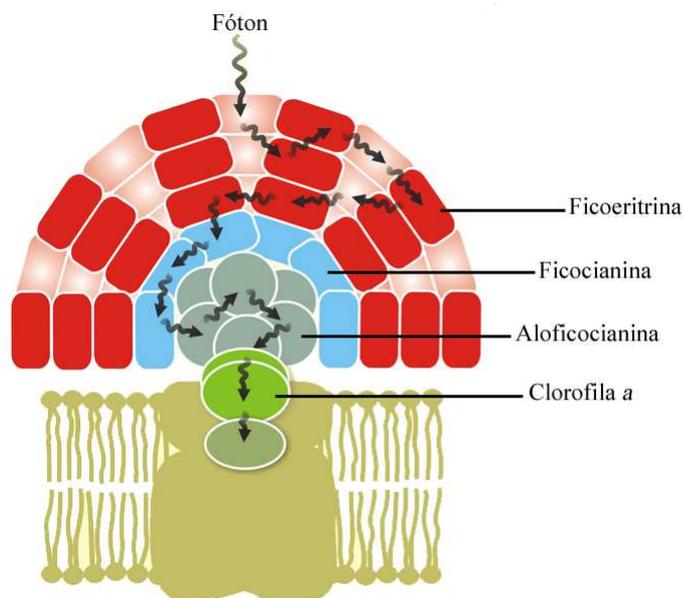
Nos últimos anos, cultivos de *Spirulina* têm sido realizados para obtenção de biocompostos com valor agregado, como polissacarídeos (KURD; SAMAVATI, 2015), ácidos graxos (AMBROZOVA et al., 2014), carotenoides (DEY; RATHOD, 2013), clorofila (AJAYAN; SELVARAJU; THIRUGNANAMOORTHY, 2012), anidrase carbônica (ORES; AMARANTE; KALIL, 2016) e ficobiliproteínas (AJAYAN; SELVARAJU; THIRUGNANAMOORTHY, 2012; ORES; AMARANTE; KALIL, 2016).

3.2 FICOBILIPROTEÍNAS

Ficobiliproteínas são pigmentos fotossintéticos acessórios, os quais estão envolvidos na captação da luz por cianobactérias, rodofíceas, criptofíceas e glaucófitas (GLAZER, 1994; VISKARI; COLYER, 2003). As ficobiliproteínas absorvem energia na faixa do espectro visível (450-650 nm), nesta faixa a clorofila *a* tem baixas absorptividades (MACCOLL, 1998). Estruturalmente, cada ficobiliproteína se constitui em uma molécula cromófora linear tetrapirrólica designada ficobilina, que por sua vez se associa covalentemente a uma apoproteína através dos resíduos específicos de cisteína (GANNTT, 1981). Nas cianobactérias e algas vermelhas, quatro principais classes de ficobiliproteínas existem: aloficocianina (AFC, verde azulado, λ_{\max} : 650-665 nm), ficocianina (FC, azul, λ_{\max} : 590-625 nm), ficoeritrina (FE, vermelho, λ_{\max} : 490-570 nm) e ficoeritrocianina (FEC, laranja, λ_{\max} : 560-600 nm) (SUN; WANG, 2003).

As ficobiliproteínas estão localizadas no interior das cianobactérias em estruturas subcelulares chamadas de ficobilissomos (Figura 1), os quais estão localizados na superfície externa da membrana tilacoide (GLAZER, 1994). As ficobiliproteínas se encontram organizadas nos ficobilissomos de modo a maximizar a transferência ressonante de energia por fluorescência. Essa transferência ocorre da FE para a FC, desta para a AFC e finalmente da AFC para o centro de reação fotossintético (clorofila *a*) (VISKARI; COLYER, 2002).

Figura 1 – Organização estrutural do ficobilissomo.



Adaptado de: GOVINDJEE e SHEVELA (2011).

neuroprotetora (PENTÓN-ROL et al., 2011). Somando-se a isso, a potencial atividade antibacteriana de C-FC purificada contra bactérias resistentes a medicamentos tem sido demonstrada (SARADA; KUMAR; RENGASAMY, 2011). Além dessas propriedades, alguns estudos mostram que a C-FC apresenta efeito anticancerígeno, sendo que essa capacidade já foi demonstrada em uma variedade de células, tais como câncer de pulmão (LI et al., 2015), câncer de mama (RAVI et al., 2015), câncer de pâncreas (LIAO et al., 2016), entre outros.

A pureza de C-FC é geralmente avaliada utilizando a razão entre a absorvância a 620 nm pela absorvância a 280 nm. A literatura reporta que quando a C-FC apresenta pureza acima de 0,7 é considerada de grau alimentício e quando maior do que 4 é de grau analítico (PATIL et al., 2006; RITO-PALOMARES; NUNEZ; AMADOR, 2001). No entanto, as empresas *Soley Biotechnology Institute* e *Delhi Nutraceuticals* comercializam C-FC liofilizada com uma classificação um pouco diferente, por exemplo, C-FC com grau de pureza entre 0,50 e 1,50 é indicada como corante na indústria alimentícia; pureza de 1,50 a 2,50 indicada como corante em cosméticos; pureza entre 2,50 e 3,50 pode ser utilizada como corante e biomarcadores; e pureza acima de 4,0 pode ser utilizada em terapias, biomarcadores e tratamentos. Assim, o valor no mercado também depende da sua pureza, C-FC com pureza de 0,5 – 0,75 é vendida por U\$ 210·kg⁻¹, pureza de 0,75 – 1,5 custa cerca de U\$ 325·kg⁻¹, pureza de 1,5 – 2,5 custa cerca de U\$ 108.800·kg⁻¹, pureza de 2,5 – 3,4 custa cerca de U\$ 959.000·kg⁻¹, e C-FC com pureza maior que 4,0 custa cerca de U\$ 4.657·g⁻¹.

O custo da biomassa seca de microalgas é estimada em U\$ 15 – 25·kg⁻¹, assim, é crucial otimizar os sistemas para aumentar a produtividade de C-FC, maximizando a eficiência econômica dos sistemas de produção de algas (QUERQUES et al., 2015).

3.2.2 Aloficocianina

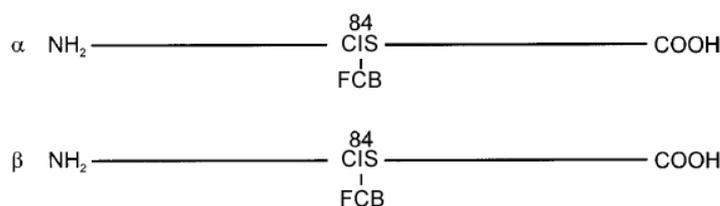
A aloficocianina (AFC) é uma ficobiliproteína solúvel em água altamente fluorescente, é composta por duas subunidades (α, β). As subunidades α e β possuem uma ligação covalente no resíduo de cisteína 84 com uma ficocianobilina (Figura 3). A aloficocianina, quando purificada, se apresenta em trímeros ($\alpha_3\beta_3$) (GLAZER, 1994). A massa molar da AFC em cianobactérias é de 130-145 kDa (MORSCHER; WEHRMEYER; KOLLER, 1980), e as subunidades individuais variam entre 15 a 18 kDa (SU et al., 2010).

AFC é amplamente utilizada em técnicas bioquímicas como uma proteína fluorescente, particularmente para citometria de fluxo (JUNG; DAILEY, 1989). Tem sido

reportado que a AFC possui propriedades antioxidantes (GE et al., 2006) e antienterovírus (SHIH et al., 2003).

A aplicação da AFC é muitas vezes limitada à dificuldade de purificar em larga escala esta proteína, uma vez que a APC e a C-FC em cianobactérias apresentam características muito similares. Além disso, a concentração de AFC é baixa. Dessa forma, separar as ficobiliproteínas e purificar grandes quantidades de AFC é um grande desafio (SU et al., 2010).

Figura 3 – Posição das ficocianobilinas na sequência de aminoácidos da aloficocianina. CIS e FCB são cisteína e ficocianobilina, respectivamente.



Adaptado de: MACCOLL (1998).

3.3 ANIDRASE CARBÔNICA

A anidrase carbônica (AC, EC 4.2.1.1) é uma metaloenzima (Zn/Cd/Fe) que catalisa a interconversão do dióxido de carbono (CO₂) em íons bicarbonato (HCO₃⁻) em muitos organismos (Equação 1) (BADGER; PRICE, 1994; KHALIFAH, 1971). Esta enzima foi primeiramente descoberta em células vermelhas do sangue humano, porém tem sido encontrada na maioria dos organismos incluindo animais, plantas, algas, arqueobactérias e eubactérias (HEWETT-EMMETT; TASHIAN, 1996; MORONEY; BARTLETT; SAMUELSSON, 2001).



A AC desempenha um papel importante em muitas funções fisiológicas que envolvem reações de carboxilação e descarboxilação, incluindo o equilíbrio ácido-básico, transporte de íons e de dióxido de carbono, reabsorção óssea, ureagênese, gliconeogênese, lipogênese, geração de fluidos corporais (BAYRAM et al., 2008), calcificação (SMITH; FERRY, 1999), formação de humor aquoso (CENTOFANTI et al., 1997), fotossíntese, respiração e também participa do transporte de carbono inorgânico (C_i) (HENRY, 1996).

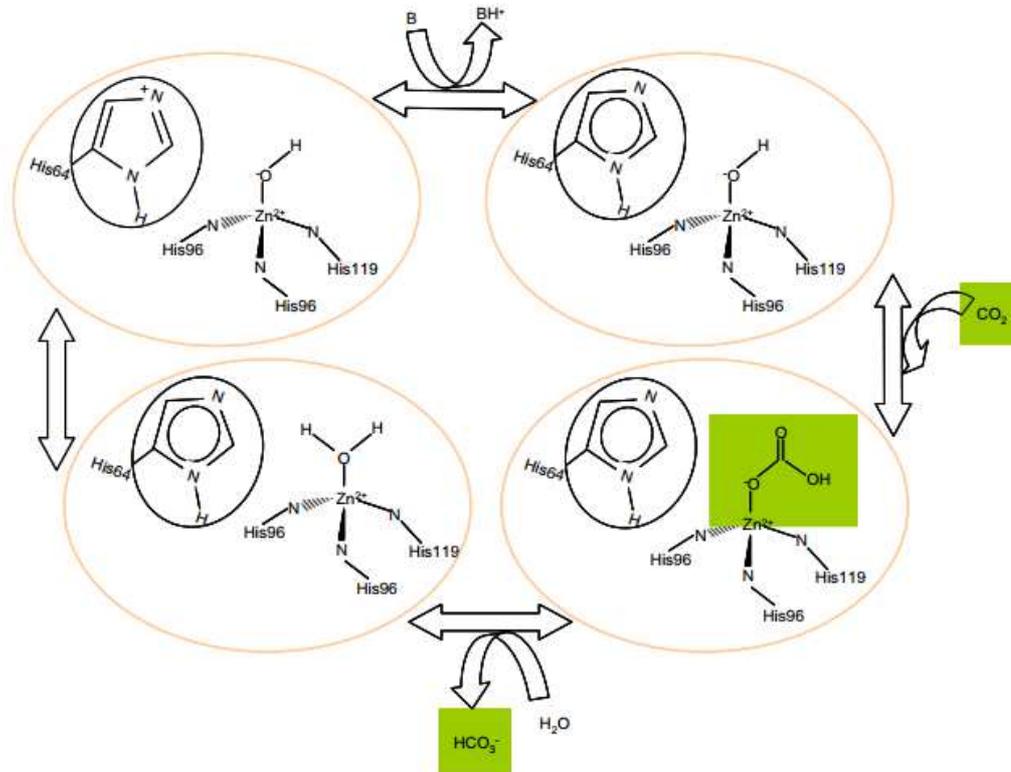
A anidrase carbônica existe em diferentes formas estruturais e massas molares. Além disso, sua atividade enzimática é variável e dependente da sua fonte de origem. A AC está entre as mais rápidas enzimas conhecidas, por exemplo, uma molécula de AC de eritrócito humano pode catalisar $1,4 \cdot 10^6$ moléculas de CO_2 em 1 segundo (KHALIFAH, 1971).

As ACs conhecidas podem ser agrupadas em cinco famílias independentes, denominadas α -AC, β -AC, γ -AC, δ -AC e ζ -AC (HEWETT-EMMETT; TASHIAN, 1996). Estas cinco famílias não apresentam similaridade na sequência primária e podem ter evoluído de forma independente. A completa distribuição destas ACs é incerta. As plantas podem ter as α -AC, β -AC e γ -AC (MORONEY; BARTLETT; SAMUELSSON, 2001), enquanto que as cianobactérias apresentam α , β , e γ ACs com Zn^{2+} no centro ativo da enzima (KUPRIYANOVA; SAMYLINA, 2015) e nos animais são encontradas somente o tipo α -AC (MORONEY; BARTLETT; SAMUELSSON, 2001). As δ -AC são encontradas em diatomáceas e as ζ -AC em algumas bactérias (KANTH; LEE; PACK, 2013).

Embora a sequência primária das famílias da AC seja diferente, as α -AC, β -AC, γ -AC e δ -AC possuem um átomo de zinco no seu sítio ativo e parecem compartilhar um mecanismo catalítico semelhante (LINDSKOG, 1997). O mecanismo catalítico da anidrase carbônica tem sido extensivamente estudado e muitos modelos têm sido propostos na literatura por Khalifah (1971), Lindskog (1977), e Silverman e Lindskog (1988). As principais etapas do mecanismo catalítico da enzima estão resumidas a seguir e apresentadas na Figura 4:

- Ataque nucleofílico na molécula de dióxido de carbono por um grupo hidroxil ligado ao zinco (Zn(II)HO^-) com a formação do complexo enzima-íon bicarbonato;
- Liberação do íon bicarbonato pelo deslocamento de uma molécula de água que se liga ao sítio ativo do zinco ($\text{Zn(II)H}_2\text{O}$);
- Transferência intramolecular de um próton para o grupamento imidazol da histidina 64 (His64);
- Transferência intermolecular de um próton para o meio externo básico, permitindo a regeneração do sítio ativo na forma Zn(II)HO^- ;
- O íon bicarbonato em solução pode ganhar um H^+ para formar ácido carbônico (H_2CO_3) ou pode perder um H^+ adicional e formar o íon carbonato (CO_3^{-2}).

Figura 4 – Mecanismo catalítico do sítio ativo da anidrase carbônica durante a hidratação reversível do dióxido de carbono.



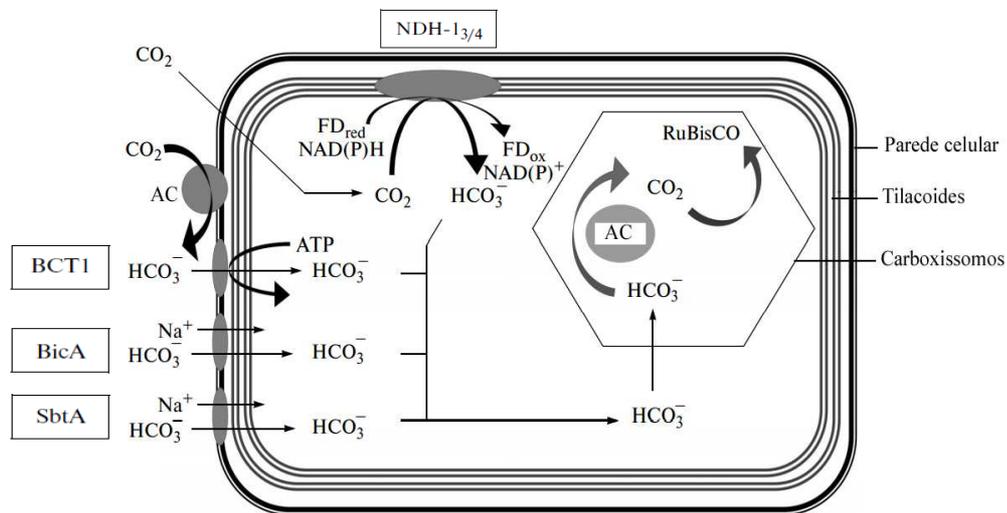
Fonte: RUSSO et al. (2013).

Nas cianobactérias, as isoenzimas da anidrase carbônica podem ser encontradas nos carboxissomos e no espaço periplasmático, enquanto que nas microalgas eucarióticas podem ser encontradas nos cloroplastos, citosol e no espaço periplasmático (MORONEY; SOMANCHI, 1999).

A função primária da enzima AC em cianobactérias, tal como em algas e plantas superiores, é aumentar a concentração de dióxido de carbono em torno da enzima fotossintética d-ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCo). As microalgas e cianobactérias vivem em um meio aquoso em que a concentração de dióxido de carbono em torno das células é significativamente menor do que em plantas aéreas. A fim de manter altas taxas de fotossíntese estes organismos desenvolveram um mecanismo de concentração de carbono (CCM – do inglês *Carbon Concentrating Mechanism*), que funciona para aumentar a concentração de CO₂ intracelular para um nível muito superior ao presente no meio ambiente circundante. O CO₂ é usado pela RuBisCo para iniciar a primeira reação no ciclo de Calvin, a carboxilação da ribulose-1,5-bisfosfato. O sistema de transporte de carbono inorgânico (Ci) e as ACs são fundamentais para o funcionamento do CCM (BADGER; PRICE, 1992, 1994, 2003).

O CCM em cianobactérias compreende os seguintes componentes estruturais e funcionais (Figura 5): (1) sistemas de captura de Ci ($\text{CO}_2 + \text{HCO}_3^-$); (2) sistema de AC, o qual é responsável pela conversão das formas de Ci e fornecendo o substrato (CO_2) para carboxilação da ribose-1,5-bifosfato pela RuBisCO; e (3) carboxissomos, microcompartimentos especializados no aumento da eficiência da fixação do CO_2 no ciclo de Calvin.

Figura 5 – Esquema geral da operação do CCM em cianobactérias, baseado nos modelos clássicos dos micro-organismos: *Synechococcus elongatus* PCC7942, *Synechocystis* sp. PCC6803 e *Synechococcus* sp. PCC7002. Designações: BCT1, BicA e SbtA são sistemas transportadores de bicarbonato; NDH-1_{3/4} é o sistema de captura de CO_2 ; e AC é anidrase carbônica.



Adaptado de: KUPRIYANOVA e SAMYLINA (2015).

As células de cianobactérias consomem Ci na forma de CO_2 e HCO_3^- (PRICE, 2011; PRICE et al., 2008). Uma vez que a molécula de CO_2 não é carregada, esta é solúvel em lipídios e portanto pode penetrar na célula pela difusão passiva através da membrana celular, desta forma esta molécula pode facilmente escapar da célula. Para evitar a fuga do CO_2 , as células de cianobactérias recorrem aos sistemas de captura de CO_2 (NDH-1_{3/4} e a enzima AC presente no espaço periplasmático, Figura 5), que convertem o CO_2 à molécula de bicarbonato carregada, o qual é insolúvel em lipídios. Devido a esta insolubilidade, a entrada de HCO_3^- só é possível através do transporte ativo (sistemas BCT1, BicA e SbtA, Figura 5) (KUPRIYANOVA; SAMYLINA, 2015). Independentemente da forma, é o íon HCO_3^- que é entregue no interior do citosol. O HCO_3^- acumulado internamente penetra nos carboxissomos, o qual contém a maior parte de RuBisCO da célula. ACs localizadas especificamente nos

carboxissomos geram o CO₂ ao redor da RuBisCo (BADGER; PRICE, 1992; VAN HILLE et al., 2003).

A atividade enzimática da AC pode ser monitorada por duas reações diferentes: hidratase e esterase. Na reação de hidratase ou delta de pH, a AC catalisa a hidratação reversível entre CO₂ e a água (H₂O), produzindo HCO₃⁻ e H⁺. A produção de prótons leva a uma alteração no pH da reação, até atingir o equilíbrio. O método delta de pH tem como base a medida da alteração do pH em função do tempo. Essas medidas são geralmente realizadas em temperaturas entre 0 – 5 °C para retardar a reação catalisada enzimaticamente, uma vez que esta é muito rápida, e as taxas iniciais são difíceis de medir (BOND et al., 2001).

A reação de esterase tem sido utilizada para monitorar a atividade enzimática da AC em adição à reação de hidratase. Esta reação é baseada na hidrólise enzimática mediada pelo *p*-nitrofenil acetato (*p*-NPA) (POCKER; STONE, 1967). A razão pela qual este ensaio é frequentemente utilizado nos estudos de AC é que o mesmo sítio ativo, que é responsável pela aceleração da hidratação do CO₂, também acelera a reação de hidrólise, que origina um produto amarelo (*p*-nitrofenol) que absorve a 400 nm e pode ser determinado por espectrofotômetro. Assim, a taxa de hidrólise acelerada pela AC pode ser convenientemente monitorada sem arrefecimento (em contraste com a medida de delta de pH) (BOND et al., 2001).

Durante o cultivo de *S. platensis* LEB-52 outras esterases sem atividade de hidratase podem ser produzidas, portanto a atividade de esterase não diz respeito unicamente a AC. Dessa forma, é importante saber se existe uma correlação entre estas duas atividades, de esterase e hidratase, ao longo do cultivo. Até o presente momento não se tem conhecimento de trabalhos que reportem essa correlação ao longo do cultivo de microalgas, incluindo cianobactérias.

3.3.1 Captura enzimática do dióxido de carbono

O dióxido de carbono (CO₂) antropogênico é considerado o maior contribuinte para o aumento do efeito estufa, o restante é atribuído ao aumento das concentrações de metano, óxido nitroso e gases fluorados (IPCC, 2014). O CO₂ é liberado durante a combustão de combustíveis fósseis, como carvão, petróleo, gás e na produção de cimento (HOUGHTON, 2007). O aumento contínuo da concentração de CO₂ na atmosfera tem sido extensivamente documentado, sendo que sua concentração aumentou de 280 ppm em 1750 (revolução

industrial) (HOUGHTON et al., 2001) para 400 ppm em setembro de 2016, e atualmente vem aumentando a uma taxa de 2,96 ppm/ano (NOAA, 2016).

Várias estratégias estão disponíveis para reduzir as emissões do CO₂ antrópico da atmosfera, como por exemplo: conversão eficiente da energia, utilização de fontes de energia com baixo conteúdo de carbono ou livres de carbono, e captura e sequestro do CO₂ (MAROTO-VALER et al., 2005). As abordagens de sequestro do CO₂ mais comuns incluem o uso de solventes químicos/físicos, adsorção em sólidos, membranas, sistemas criogênicos/condensação e sequestro geológico. Entretanto, o custo das abordagens anteriormente mencionadas é muito alto (SHEKH et al., 2012). Assim, pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de desenvolver uma tecnologia sustentável e econômica para a captura e sequestro do CO₂. Uma técnica promissora e de baixo custo é o sequestro baseado na fixação química de CO₂ na forma de minerais de carbonato, como a calcita, magnesita e dolomita, que apresenta-se como um método seguro e permanente de eliminação de CO₂. Os carbonatos são abundantes na natureza e são ambientalmente seguros e estáveis (LACKNER et al., 1995; MIRJAFARI; ASGHARI; MAHINPEY, 2007).

A mineralização do CO₂ pode ser realizada através do contato direto do CO₂ gasoso com fontes de minerais de cálcio ou magnésio ou através da dissolução de CO₂ na água seguido do contato da solução com os minerais. De qualquer maneira, vai produzir carbonato de cálcio ou de magnésio, os quais são sólidos e irão precipitar (LACKNER et al., 1995). No método indireto de mineralização do CO₂, o carbonato de cálcio é produzido através da reação entre os íons cálcio e o CO₂ aquoso. As seguintes reações ocorrem nesse processo: **(i)** primeiramente, o CO₂ gasoso se dissolve em água para formar CO₂ aquoso (Equação 2); **(ii)** o CO₂ aquoso reage com a água e forma ácido carbônico (Equação 3); **(iii)** na próxima etapa, o ácido carbônico se dissocia em íons bicarbonato e íons carbonato (Equações 4 e 5); **(iv)** por fim, na presença de cátions de cálcio, se forma o carbonato de cálcio, o qual precipita (Equação 6) (BOND et al., 2001).





Entre todas as reações, a reação de hidratação (Equação 3) é a mais lenta e é limitante da velocidade (BOND et al., 2001). Assim, a anidrase carbônica pode ser utilizada como catalisador biológico para aumentar a velocidade desta reação (MIRJAFARI; ASGHARI; MAHINPEY, 2007).

Nos sistemas de captura enzimática são empregadas ACs comerciais altamente purificadas, oriundas de sangue animal (BOND et al., 2001; FAVRE; CHRIST; PIERRE, 2009; MIRJAFARI; ASGHARI; MAHINPEY, 2007); bem como ACs comerciais purificadas e imobilizadas oriundas de sangue animal (OZDEMIR, 2009; VINOBA et al., 2011b) e humano (VINOBA et al., 2011a); AC purificada obtida a partir da bactéria *Citrobacter freundii* (RAMANAN et al., 2009); AC obtida de eritrócito bovino purificada por uma única etapa de precipitação com etanol e clorofórmio (fator de purificação: 104 e recuperação enzimática de 98%) (ORES et al., 2012); AC obtida a partir do extrato bruto de *Bacillus halodurans* (FARIDI; SATYANARAYANA, 2016); e AC obtida a partir do extrato bruto de microalgas (LI et al., 2012; ORES, 2014; ORES et al., 2013).

3.4 PRODUÇÃO DE FICOBILIPROTEÍNAS E ANIDRASE CARBÔNICA

A composição bioquímica das cianobactérias geralmente varia com a fase de crescimento celular e, portanto, as células devem ser obtidas no tempo ótimo para garantir a máxima produção dos bioprodutos para comercialização (XIE et al., 2015). Até o presente momento, com relação à produção simultânea de ficobiliproteínas e AC por cianobactérias, na literatura são encontrados os estudos do nosso grupo de pesquisa: Ores, Amarante e Kalil (2016) e Ores (2014).

Ores, Amarante e Kalil (2016) estudaram o acompanhamento destes bioprodutos ao longo do cultivo de *Spirulina* sp. LEB-18 e *Synechococcus nidulans*. Ores (2014) avaliou o perfil de produção de C-FC, AFC e AC ao longo do cultivo de *Spirulina platensis* LEB-52 utilizando o meio Zarrouk 20% (v/v) diluído com água destilada. As máximas concentrações intracelulares de C-FC e AFC foram obtidas entre o 1° e o 4° d de cultivo, sendo estas na ordem de 119,4 – 131,8 mg·g⁻¹ e 55,0 – 62,6 mg·g⁻¹, respectivamente. Após o 4° d de cultivo,

a concentração intracelular de ficobiliproteínas diminuiu gradualmente. A maior atividade específica de AC foi obtida no 6° (25,2 U·g⁻¹), 12° (24,8 U·g⁻¹) e 33° d (28,2 U·g⁻¹) de cultivo. No entanto, no 33° d, ocorreu a inibição do crescimento celular.

Os principais fatores que afetam a produção de ficobiliproteínas são a intensidade luminosa (CHEN et al., 2013; XIE et al., 2015), concentração inicial de nitrogênio (CHEN et al., 2013) e concentração inicial de biomassa (XIE et al., 2015). Chen et al. (2013) avaliaram a produção de C-FC de *Spirulina platensis* durante 10 d de cultivo variando a intensidade luminosa (100 – 1300 μmol·m⁻²·s⁻¹) e a concentração inicial de nitrato (0,03 – 0,09 mol·L⁻¹). As melhores condições de cultivo para a produção de C-FC (126 mg·g⁻¹) foram intensidade luminosa de 700 μmol·m⁻²·s⁻¹ e concentração inicial de nitrato de 0,045 mol·L⁻¹.

A influência da intensidade de luz (75 – 450 μmol·m⁻²·s⁻¹) e da concentração inicial de biomassa (0,08 – 0,24 g·L⁻¹) na produção de C-FC durante o cultivo em batelada alimentada de *Arthrospira (Spirulina) platensis* foi avaliada por Xie et al. (2015). O acúmulo intracelular de C-FC (161 mg·g⁻¹) foi máximo no 11° d de cultivo, e foi favorecido em baixas intensidades luminosas (300 μmol·m⁻²·s⁻¹), altas concentrações iniciais de biomassa (0,24 g·L⁻¹) e com alimentação em batelada de nitrato (5 mM) em 11 d. A alimentação em batelada de nitrato foi realizada quando o nitrato do meio estava quase esgotado no 8°, 9°, 10° e 11° d de cultivo. A alimentação foi realizada por impulsos até atingir uma concentração de nitrato de 5 mM.

A produção de C-FC de *Arthrospira (Spirulina) platensis* em diferentes meios de cultivo (meio Zarrouk 100% e água do mar) durante 25 d foi avaliada por Leema et al. (2010). A maior concentração intracelular de C-FC foi obtida utilizando o meio Zarrouk 100%, sendo esta de 48,4 mg·g⁻¹ em 25 d de cultivo. A produção de ficobiliproteínas por diferentes cepas de *Spirulina* foi avaliada por Saleh, Dhar e Singh (2011) durante 25 d e as maiores concentrações foram obtidas por uma cepa mutante de *Spirulina platensis*, produzindo 82,9 μg·mL⁻¹ de C-FC no 15° d de cultivo e 62,3 μg·mL⁻¹ de AFC no 25° d de cultivo.

A produção de ficobiliproteínas é associada com a concentração de nitrogênio presente no meio de cultivo (CHEN et al., 2013; XIE et al., 2015). As ficobiliproteínas são seletivamente degradadas quando as células são submetidas à depleção de nitrogênio. A depleção de nitrogênio causa a redução do conteúdo de proteínas, juntamente com aumento nos compostos ricos em energia, tais como os lipídios e carboidratos (HO; CHEN; CHANG, 2012). Assim, as ficobiliproteínas apresentam um papel secundário como compostos intracelulares de armazenamento de nitrogênio, e para manter as suas funções metabólicas, as

cianobactérias podem utilizá-las como fonte de nitrogênio quando este composto está escasso no meio de cultivo (ERIKSEN, 2008).

Dentre os fatores que afetam a produção de AC ao longo do cultivo destacam-se a concentração de CO₂ (BASU et al., 2014; RIGOBELLO-MASINI; AIDAR; MASINI, 2003; SWARNALATHA et al., 2015; XIA; GAO, 2005) e a luminosidade (RIGOBELLO-MASINI; AIDAR; MASINI, 2003). Rigobello-Masini, Aidar e Masini (2003) acompanharam a produção de AC (extracelular e total) na microalga marinha *Tetraselmis gracilis* durante 10 d. Os cultivos foram realizados com injeção de ar atmosférico e ar atmosférico livre de CO₂. No cultivo realizado com ar atmosférico livre de CO₂ a atividade de AC total e extracelular foi maior do que aquele com ar atmosférico. A ausência de luz também foi avaliada, a atividade de AC após 5 h sem iluminação diminuiu cerca de 50%, e após 25 h a AC foi totalmente inibida.

A atividade de AC em *Desmodesmus* sp., *Kirchneriella* sp. e *Acutodesmus* sp. diminuiu com o aumento da concentração de CO₂ (10, 20 e 30%) durante 72 h de cultivo (SWARNALATHA et al., 2015). Xia e Gao (2005) investigaram a atividade de AC (intracelular e extracelular) nas microalgas *Chlorella pyrenoidosa* e *Chlamydomonas reinhardtii* quando cultivadas em diferentes concentrações de CO₂ (3 – 186 µmol·L⁻¹); para ambas microalgas, a atividade de AC (intracelular e extracelular) diminuíram com o aumento da concentração de CO₂. Por outro lado, a atividade de AC de *Scenedesmus obliquus* SA1 foi favorecida com o aumento da concentração de CO₂ (0,03 – 35%) durante 23 d de cultivo (BASU et al., 2014). Assim, a produção de AC pode ser favorecida ou desfavorecida com o aumento da concentração de CO₂ dependendo do micro-organismo de estudo.

O perfil de produção de anidrase carbônica por diferentes microalgas marinhas e de água doce foi avaliado por Ores et al. (2016). As máximas atividades específicas (U·g⁻¹) de AC expressa em termos de esterase foram de: 16,4 U·g⁻¹ para *Tetraselmis suecica*, 13,9 U·g⁻¹ para *Isochrysis galbana*, 44,6 U·g⁻¹ para *Dunaliella tertiolecta*, 9,8 U·g⁻¹ para *Nannochloropsis oculata*, 24,5 U·g⁻¹ para *Phaeodactylum tricornutum*, 17,0 U·g⁻¹ para *Chlorella vulgaris* e 12,2 U·g⁻¹ para *Scenedesmus obliquus*.

3.5 RUPTURA CELULAR E EXTRAÇÃO DE BIOPRODUTOS INTRACELULARES

Os micro-organismos podem sintetizar diversos biocompostos, os quais podem ser excretados ou ainda armazenados no interior das células (AZEVEDO et al., 2009). Para a obtenção de biocompostos intracelulares, uma etapa de rompimento celular ou o aumento da

porosidade da parede celular e subsequente extração com solvente aquoso ou orgânico é necessária. As etapas de ruptura celular e extração podem ocorrer simultaneamente ou ainda separadamente, dependendo da técnica aplicada. Na ruptura celular, a parede celular deve ser rompida, permitindo que o conteúdo da célula incluindo o(s) bioproduto(s) de interesse seja(m) liberado(s) para o meio. Em geral, após a ruptura celular, uma grande quantidade de material celular, tais como organelas, sais, proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos, é liberada para o solvente. Uma vez que a eficiência da extração está diretamente relacionada com o rendimento global do processo, é importante minimizar a extração de contaminantes, a fim de favorecer os passos subsequentes do processo de purificação (MORAES; KALIL, 2014).

A escolha do método de ruptura e/ou extração vai depender das características moleculares do bioproduto a ser extraído, da parede celular do micro-organismo e da localização do bioproduto na célula. Técnicas baseadas no uso de pressão osmótica, condições abrasivas, tratamento químico, tratamento enzimático, secagem, congelamento-descongelamento e tratamento ultrassônico, podem ser utilizadas para ruptura celular de cianobactérias (MORAES et al., 2011b; ORES; AMARANTE; KALIL, 2016).

Assim que o biocomposto de interesse for liberado do interior celular, é necessário definir qual solvente é o mais indicado para a sua maior extração ou manutenção da atividade biológica, podendo ser aquoso ou não (MORAES; KALIL, 2014). Para extração de metabolitos como astaxantina e ácidos graxos poli-insaturados a partir de microalgas são utilizados solventes orgânicos, como por exemplo o diclorometano (MACHADO JR et al., 2014) e etanol (FAJARDO et al., 2007), respectivamente. Enquanto que para extrair anidrase carbônica e C-ficocianina têm sido utilizadas soluções aquosas, como por exemplo solução tampão (ORES; AMARANTE; KALIL, 2016; ORES et al., 2013; ORES et al., 2016; SILVEIRA et al., 2007) e água (MORAES; BURKERT; KALIL, 2010), respectivamente. Além do tipo de solvente, variáveis como tempo de extração, agitação, razão biomassa:agente extrator e temperatura são fatores importantes a serem estudados a fim de maximizar a extração de bioprodutos (MORAES; KALIL, 2014).

3.5.1 Extração assistida por ultrassom

Na extração assistida por ultrassom (EAU), as etapas de rompimento celular e extração do bioproduto pelo solvente ocorrem simultaneamente. O ultrassom é baseado em ondas sonoras as quais são vibrações mecânicas em meio sólido, líquido e gasoso (CASTRO;

GARCÍA, 2002). Difere-se de sons audíveis pela frequência de onda, as frequências audíveis variam entre 16 Hz e 20 kHz enquanto que as frequências do ultrassom podem variar de 20 kHz a 10 MHz (PINGRET; FABIANO-TIXIER; CHEMAT, 2013).

As ondas sonoras, ao contrário de ondas eletromagnéticas, viajam através de um meio que deve conter alguma forma de matéria, uma vez que envolvem ciclos de compressão e expansão. Na compressão, as moléculas tendem a se aglomerar enquanto que na expansão elas se separam, e durante a expansão se formam microbolhas de gás (CASTRO; GARCÍA, 2002; PRIEGO-CAPOTE; CASTRO, 2004). As microbolhas crescem a um tamanho instável e, em seguida, colapsam violentamente, liberando intensa energia local com importantes efeitos químicos e mecânicos (SANTOS; LODEIRO; CAPELO-MARTÍNEZ, 2009). Este fenômeno é conhecido como cavitação.

Nos últimos anos, muitas pesquisas têm utilizado a EAU para obtenção de bioprodutos intracelulares de micro-organismos, incluindo as cianobactérias. Dentre os bioprodutos obtidos utilizando a EAU, destacam-se carotenoides (DEY; RATHOD, 2013; GERDE et al., 2012; ZOU et al., 2013), clorofila (GERDE et al., 2012; KONG et al., 2014; PARNIAKOV et al., 2015), compostos fenólicos (PARNIAKOV et al., 2015), lipídeos (DAI; CHEN; CHEN, 2014; KERIS-SEN et al., 2014; QV; ZHOU; JIANG, 2014; SANTOS et al., 2015), proteínas (LIU et al., 2013), β -galactosidase (LEMES; ÁLVARES; KALIL, 2012), C-ficocianina (AFTARI et al., 2015; ORES; AMARANTE; KALIL, 2016) e anidrase carbônica (ORES; AMARANTE; KALIL, 2016; ORES et al., 2016).

Para fins analíticos, a EAU pode ser utilizada como um método alternativo de extração de bioprodutos intracelulares durante o monitoramento do bioproduto ao longo do cultivo, devido ao menor tempo de processamento. Além disso, o bioproduto pode ser extraído com o uso de baixas concentrações de biomassa (ORES, 2014; ORES; AMARANTE; KALIL, 2016; ORES et al., 2016).

3.6 EXTRAÇÃO DE FICOBILIPROTEÍNAS E ANIDRASE CARBÔNICA

Na literatura existem muitos estudos que reportam a extração de C-ficocianina a partir de diferentes cianobactérias. A Tabela 1 apresenta um resumo dos estudos de ruptura celular e extração em termos de rendimento e pureza de C-ficocianina. Moraes et al. (2011b) aplicaram diferentes métodos de ruptura celular (tratamento com solventes orgânicos e inorgânicos, congelamento-descongelamento, tratamento em banho ultrassônico, homogeneização com abrasivo e tratamento com lisozima) para extração de C-ficocianina a

partir da biomassa úmida de *Spirulina platensis* LEB-52. Dentre os diferentes métodos estudados, o tratamento em banho ultrassônico na presença de pérolas de vidro foi mais eficiente, com rendimento de extração de 46,75 mg·g⁻¹ e concentração de C-ficocianina de 0,21 mg·mL⁻¹.

Ao secar a biomassa de *Spirulina platensis* (CFTRI) a 60 °C e 150 °C para posterior ruptura celular, cerca de 50% do conteúdo intracelular de C-ficocianina foi perdido. A perda da C-ficocianina provavelmente está relacionada com a sua posição periférica no ficobilissomo na membrana tilacoide, além da sua sensibilidade à temperatura (SARADA; PILLAI; RAVISHANKAR, 1999). Estes autores sugerem que a biomassa úmida deve ser utilizada para a extração de C-ficocianina.

Alguns trabalhos reportam que a ruptura celular utilizando o congelamento-descongelamento é a melhor técnica para obter C-ficocianina a partir da biomassa úmida (ABALDE et al., 1998; SARADA; PILLAI; RAVISHANKAR, 1999; SINGH; KUDDUS; THOMAS, 2010; SONI; TRIVEDI; MADAMWAR, 2008).

A ruptura celular para extração de C-FC a partir da biomassa seca de *S. platensis* LEB-52 também é encontrada na literatura (MORAES; BURKERT; KALIL, 2010; SILVEIRA et al., 2007). A melhor condição de ruptura celular obtida por Moraes, Burkert e Kalil (2010) foi secar, congelar e moer a biomassa até atingir diâmetro de partícula entre 0,106 e 0,125 mm, e posterior extração de C-FC com água destilada utilizando concentração de biomassa de 0,16 g·mL⁻¹ e tempo de extração de 1 h. Nessas condições, a concentração de C-FC foi de 13,2 mg·mL⁻¹, pureza de 0,60 e rendimento de extração de 82,5 mg·g⁻¹.

Nos últimos anos, técnicas de ruptura celular como a extração assistida por ultrassom (AFTARI et al., 2015; ORES; AMARANTE; KALIL, 2016; PRABUTHAS et al., 2011), extração assistida por micro-ondas (AFTARI et al., 2015) e campos elétricos pulsados (MARTÍNEZ et al., 2016) têm sido empregadas para a obtenção de C-ficocianina.

Prabuthas et al. (2011) avaliaram o solvente (água destilada e cloreto de cálcio 1%), tempo de extração (5 – 25 min), volume do solvente (25 – 125 mL) e amplitude do ultrassom (20 – 100%) na extração assistida por ultrassom de C-FC de *Spirulina*. Os maiores rendimentos de C-FC (91,8 mg·g⁻¹) e pureza (0,62) foram obtidos quando utilizado cloreto de cálcio 1% como solvente, volume de solvente de 45,27 mL (o que corresponde a concentração de biomassa de 2,2 g·L⁻¹), tempo de extração de 9,3 min e amplitude do ultrassom de 79,7%.

Tabela 1 – Rendimento de extração e pureza de C-ficocianina com diferentes processos de ruptura celular.

Micro-organismo	Métodos de ruptura celular	Rendimento (mg·g ⁻¹)	Pureza	Referência
<i>Artrosphira platensis</i>	Extração assistida por campos elétricos pulsados**	159,9	0,46	(MARTÍNEZ et al., 2016)
<i>Oscillatoria quadripunctulata</i>	Congelamento e descongelamento**	-	0,85	(SONI; TRIVEDI; MADAMWAR, 2008)
<i>Spirulina</i>	Congelamento e descongelamento**	86,3	1,32	(SINGH; KUDDUS; THOMAS, 2010)
<i>Spirulina</i>	Extração assistida por ultrassom*	91,8	0,62	(PRABUTHAS et al., 2011)
<i>Spirulina platensis</i>	Extração assistida por ultrassom*	35,5	0,65	(AFTARI et al., 2015)
<i>Spirulina platensis</i>	Extração assistida por micro-ondas*	56,7	1,27	(AFTARI et al., 2015)
<i>Spirulina platensis</i>	Extração assistida por ultrassom*	157	-	(HADIYANTO, 2016)
<i>Spirulina platensis</i> (CFTRI)	Congelamento e descongelamento**	194,7	-	(SARADA; PILLAI; RAVISHANKAR, 1999)
<i>Spirulina platensis</i> LEB-52	Banho ultrassônico na presença de pérolas de vidro*	46,7	-	(MORAES et al., 2011b)
<i>Spirulina platensis</i> LEB-52	Secar, congelar, moer*	82,5	0,60	(MORAES; BURKERT; KALIL, 2010)
<i>Spirulina platensis</i> LEB-52	Secar, congelar, moer*	46,8	0,46	(SILVEIRA et al., 2007)
<i>Spirulina</i> sp. LEB 18	Extração assistida por ultrassom**	90,0	-	(ORES; AMARANTE; KALIL, 2016)
<i>Synechococcus</i> sp. 109201	Congelamento e descongelamento**	-	0,27	(ABALDE et al., 1998)

* Biomassa seca; **Biomassa úmida; - não informado.

A extração assistida por ultrassom e por micro-ondas de C-ficocianina da biomassa seca de *Spirulina platensis* foi estudada por Aftari et al. (2015). Parâmetros como pH (5 – 8) e tempo de extração (15 – 50 min para o micro-ondas e 1 – 9 para o ultrassom) afetaram a concentração de C-FC e a pureza em ambas técnicas. Os melhores parâmetros na extração assistida por micro-ondas foram pH 7,0 e tempo de extração de 25 min; nestas condições a C-FC extraída apresentou pureza de 1,27 e concentração de 56,7 mg·g⁻¹. Com relação à extração assistida por ultrassom, as melhores condições de extração foram pH 6,0 e tempo de extração de 7 min, obtendo-se C-FC com pureza de 0,65 e concentração de 35,5 mg·g⁻¹.

Ores, Amarante e Kalil (2016) testaram diferentes métodos de ruptura celular e extração (extração assistida por ultrassom; banho ultrassônico na presença de pérolas de vidro; agitação com pérolas de vidro; homogeneização em grau e pistilo; congelamento e descongelamento (2 e 4 ciclos); secagem e moagem; secagem, congelamento e moagem) para obtenção de C-FC, AFC e AC a partir da biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18. Dentre os métodos testados, a extração assistida por ultrassom foi a mais eficiente apresentando os maiores rendimentos de extração simultânea dos bioprodutos, sendo estes de 90,0 mg·g⁻¹ de C-FC, 70,0 mg·g⁻¹ de AFC e 25,5 U·g⁻¹ de AC. Além disso, o congelamento e descongelamento (4 ciclos) também foi eficiente para a extração de C-FC (101,0 mg·g⁻¹). Cabe ressaltar que neste trabalho a influência do tempo durante a extração assistida por ultrassom não foi avaliada, e a AC foi determinada pela reação enzimática de esterase.

No que diz respeito às células de *Spirulina*, até o presente momento, não se tem conhecimento de algum processo que extraia C-ficocianina a partir da biomassa úmida utilizando somente solventes.

Muitos estudos que reportam a anidrase carbônica a partir de microalgas visam apenas o isolamento da enzima para sua caracterização, não importando o rendimento do processo de extração. Algumas das metodologias utilizadas para a extração da enzima nesses estudos são: agitação em vórtex com pérolas de vidro (LI et al., 2012), prensa francesa (HILTONEN et al., 1995; KUPRIYANOVA et al., 2011), maceração em gral com nitrogênio líquido (RIGOBELLO-MASINI; AIDAR; MASINI, 2003) e congelamento e descongelamento (GHOSHAL; DAVID HUSIC; GOYAL, 2002).

3.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de biomassa microalgal para obtenção de compostos de alto valor agregado vem crescendo de maneira significativa nos últimos anos. Assim, estudos são necessários a respeito da produção e recuperação dos mesmos. Na literatura ainda há lacunas que dizem respeito: (i) determinação do tempo ótimo de extração assistida por ultrassom para obter simultaneamente ficobiliproteínas e anidrase carbônica a partir da biomassa de *S. platensis* LEB-52; (ii) concentração de biomassa de *S. platensis* LEB-52 necessária e o tempo de extração ótimo para determinar a atividade de AC expressa em termos de hidratase; (iii) capacidade da AC de *S. platensis* LEB-52 em catalisar a hidratação do dióxido de carbono; (iv) correlação entre a atividade de AC expressa em termos de hidratase e esterase ao longo do cultivo de *S. platensis* LEB-52; (v) produção simultânea de ficobiliproteínas e AC ao longo do cultivo de *S. platensis* LEB-52 utilizando o meio Zarrouk 100%; (vi) métodos inovadores de extração de C-ficocianina com grau de pureza alimentar a partir da biomassa úmida de *S. platensis* LEB-52. Para responder essas lacunas, este estudo foi dividido em quatro artigos, apresentados no Capítulo III.

Este estudo, além de apresentar um processo inovador de extração de C-ficocianina com grau de pureza alimentar, contribui no avanço do conhecimento para estabelecer um processo de obtenção de bioprodutos de interesse comercial – C-ficocianina, aloficocianina e anidrase carbônica, a partir da biomassa microalgal.

CAPÍTULO III
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO 1

**EXTRAÇÃO SIMULTÂNEA DE FICOBILIPROTEÍNAS E ANIDRASE
CARBÔNICA DE *Spirulina platensis* LEB-52, E CAPTURA ENZIMÁTICA DE CO₂**

EXTRAÇÃO SIMULTÂNEA DE FICOBILIPROTEÍNAS E ANIDRASE CARBÔNICA DE *Spirulina platensis* LEB-52, E CAPTURA ENZIMÁTICA DE CO₂

RESUMO

Neste trabalho avaliou-se a extração simultânea de C-ficocianina, aloficocianina e a enzima anidrase carbônica a partir da biomassa úmida de *Spirulina platensis* LEB-52. Estes bioprodutos são intracelulares, portanto, para a sua obtenção é necessário uma etapa de ruptura celular. Vários fatores influenciam a extração de bioprodutos, como por exemplo, o tempo de extração e a concentração de biomassa. Neste sentido, a influência do tempo durante a extração assistida por ultrassom foi avaliada em duas concentrações de biomassa (0,2 e 23 g·L⁻¹). Com concentração de biomassa de 0,2 g·L⁻¹, o tempo de ultrassom de 12 min foi suficiente para obter simultaneamente as ficobiliproteínas (C-ficocianina e aloficocianina) e a enzima anidrase carbônica expressa em termos de esterase. A atividade enzimática de anidrase carbônica expressa em termos de hidratase nas cianobactérias é muito baixa, portanto, para determinar a atividade de anidrase carbônica expressa em termos de hidratase a concentração celular foi 23 g·L⁻¹ e tempo de ultrassom 8 min. A extração assistida por ultrassom não é seletiva para as ficobiliproteínas, extraindo uma gama de compostos contaminantes, no entanto é um método eficiente para a rápida determinação de ficobiliproteínas na biomassa. Por fim, o extrato enzimático bruto de anidrase carbônica mostrou potencial para acelerar a reação de hidratação na captura enzimática do dióxido de carbono e posterior precipitação na forma de carbonato de cálcio (CaCO₃). O aumento do CaCO₃ no ensaio enzimático em 8 min de reação foi de 11,03 mg de sal, e em 120 min foi de 16,99 mg.

Palavras-chave: C-ficocianina. Aloficocianina. Microalga. Ultrassom. Carbonato de cálcio. Hidratase.

1 INTRODUÇÃO

Recentemente, muito interesse tem sido focado no potencial biotecnológico das microalgas, principalmente devido à identificação de diversas substâncias sintetizadas por estes organismos, como ácidos graxos poli-insaturados (SANTOS-SÁNCHEZ et al., 2016), carotenoides (MACHADO JR et al., 2014), enzimas (ORES; AMARANTE; KALIL, 2016), ficobiliproteínas (MORAES; BURKERT; KALIL, 2010; ORES; AMARANTE; KALIL, 2016), polissacarídeos (TRABELSI et al., 2016) e diversos compostos bioativos. Dentre os bioprodutos que podem ser obtidos a partir das microalgas, destacam-se as ficobiliproteínas, C-ficocianina (C-FC) e aloficocianina (AFC), e a enzima anidrase carbônica (AC).

As ficobiliproteínas são pigmentos fotossintéticos acessórios que podem ser utilizadas como corantes naturais nas indústrias de alimentos e cosméticos em substituição aos corantes sintéticos (ARAD; YARON, 1992; KUDDUS et al., 2013). Estudos têm demonstrado que a C-FC apresenta propriedade antioxidante (THANGAM et al., 2013), anti-inflamatória (ROMAY et al., 1998), hepatoprotetora (NAGARAJ et al., 2012) e neuroprotetora (PENTÓN-ROL et al., 2011). Além dessas propriedades, alguns estudos mostram que a C-FC apresenta efeito anticancerígeno, sendo que essa capacidade já foi demonstrada em uma variedade de células, tais como câncer de pulmão (LI et al., 2015), câncer de mama (RAVI et al., 2015), câncer de pâncreas (LIAO et al., 2016), entre outros. A AFC apresenta propriedade antioxidante (GE et al., 2006) e antienterovírus (SHIH et al., 2003).

A AC (EC 4.2.1.1) é uma metaloenzima que catalisa a interconversão do dióxido de carbono (CO_2) em íons bicarbonato (HCO_3^-) e prótons (H^+) (BADGER; PRICE, 1994; KHALIFAH, 1971), desempenhando um papel importante em diversos processos, como a homeostase do pH, trocas respiratórias, fotossíntese e transporte de íons (BAYRAM et al., 2008; HENRY, 1996). É amplamente distribuída nos tecidos de plantas e animais, microorganismos incluindo as cianobactérias (HEWETT-EMMETT; TASHIAN, 1996; MORONEY; BARTLETT; SAMUELSSON, 2001).

A AC tem potencial aplicação na captura enzimática de CO_2 , podendo contribuir para redução da quantidade deste gás emitido na atmosfera. De acordo com o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas, o CO_2 antropogênico é considerado o maior contribuinte para o aumento do efeito estufa, sendo o restante atribuído ao aumento das concentrações de metano, óxido nitroso e gases fluorados (IPCC, 2014). Entretanto, a obtenção de AC a partir de microalgas ainda é pouco explorada, principalmente para este uso (LI et al., 2012; ORES, 2014; ORES et al., 2013).

As ficobiliproteínas e AC podem ser obtidas simultaneamente a partir de cianobactérias como a *Spirulina*. Para o acompanhamento da produção destes bioprodutos durante o cultivo da microalga, é necessário utilizar uma técnica de ruptura celular eficiente, rápida, que utilize pequenos volumes de amostra, além de baixas concentrações de biomassa. Durante a ruptura celular, a parede celular deve ser rompida, permitindo que o conteúdo intracelular sejam liberados para o meio, mantendo as suas atividades biológicas (SMITH; CHARTER, 2011). Vários fatores influenciam a ruptura celular e a extração de biocompostos de cianobactérias, como por exemplo, o tempo de extração, solvente, concentração de biomassa, entre outros (MORAES; BURKERT; KALIL, 2010; SILVEIRA et al., 2007). Dentre as diferentes técnicas existentes para ruptura celular, a extração assistida por ultrassom, a qual é baseada no fenômeno de cavitação, tem sido amplamente utilizada para a obtenção de vários compostos intracelulares a partir de microalgas, tais como carotenoides (DEY; RATHOD, 2013; GERDE et al., 2012), clorofila (GERDE et al., 2012; PARNIAKOV et al., 2015), compostos fenólicos (PARNIAKOV et al., 2015), lipídios (DAI; CHEN; CHEN, 2014; QV; ZHOU; JIANG, 2014; SANTOS et al., 2015), proteínas (LIU et al., 2013), C-ficocianina (AFTARI et al., 2015; ORES; AMARANTE; KALIL, 2016), aloficocianina e anidrase carbônica (ORES; AMARANTE; KALIL, 2016).

Ores, Amarante e Kalil (2016) realizaram o acompanhamento dos bioprodutos – C-FC, AFC e AC (expressa em termos de esterase) ao longo do cultivo das cianobactérias *Spirulina* sp. e *Synechococcus nidulans*, os bioprodutos foram extraídos com concentração de biomassa de 0,2 g·L⁻¹. Somando-se a isso, estes autores testaram diferentes métodos de ruptura celular para obtenção simultânea de AC expressa em termos de esterase, C-FC, AFC de *Spirulina* sp. LEB 18. Dentre os métodos testados, a extração assistida por ultrassom com frequência de 20 kHz por 10 min (concentração de biomassa de 5 g·L⁻¹) proporcionou maiores rendimentos de extração dos bioprodutos, sendo estes de 25,5 U·g⁻¹ para a AC (expressa em termos de esterase), 90,0 mg·g⁻¹ e 70,0 mg·g⁻¹ para a C-FC e AFC, respectivamente. No entanto, a influência do tempo de processo de extração não foi avaliada.

Considerando a carência de estudos em extração simultânea de compostos de interesse comercial provenientes de micro-organismos e das demandas comerciais por biocorantes e enzimas, este trabalho teve por objetivo definir as condições de extração assistida por ultrassom de C-ficocianina, aloficocianina e anidrase carbônica de *Spirulina platensis* LEB-52, além de aplicar a anidrase carbônica na captura enzimática do dióxido de carbono e posterior precipitação em carbonato de cálcio e verificar a morfologia do carbonato de cálcio precipitado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMO, MEIO DE CULTIVO E CULTIVO

A cianobactéria *Spirulina platensis* LEB-52, gentilmente cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), foi utilizada para obtenção simultânea dos bioprodutos C-ficocianina, aloficocianina e anidrase carbônica. Para o preparo do inóculo, cultivo e manutenção da microalga foi utilizado o meio Zarrouk composto por ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): NaHCO_3 (16,8); K_2HPO_4 (0,5); NaNO_3 (2,5); K_2SO_4 (1,0); NaCl (1,0); $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2); CaCl_2 (0,04); $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01); EDTA (0,08); 1 mL da solução A5 e 1 mL da solução B6. A solução A5 foi composta por ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): H_3BO_3 (2,86); $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,81); $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,222); $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,079) e $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,018). A solução B6 foi composta por ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): NH_4VO_3 (0,0230); $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0,1920); $\text{NiSO}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,0448); $\text{Na}_2\text{WO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,0179); TiO_2 (0,040) e $\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,0440) (REINEHR; COSTA, 2006; ZARROUK, 1966). O meio Zarrouk foi diluído 20% (v/v) com água destilada.

O cultivo foi realizado conforme condições propostas por Ores (2014). A cianobactéria foi cultivada em Erlenmeyer de 2 L (volume útil de 1,8 L) a 25 °C, sendo adicionado 20% (v/v) de inóculo. A aeração foi realizada com auxílio de filtro de lã de vidro estéril com injeção constante de ar de 0,5 vvm. A iluminância foi promovida por lâmpadas fluorescente ($40,5 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) com fotoperíodo fixado em 12 h claro e 12 h escuro. Após 30 d (ORES, 2014), a biomassa foi recuperada por centrifugação ($4757 \times g$, 30 min, 4 °C) e destinada para extração simultânea dos bioprodutos.

2.2 INFLUÊNCIA DO TEMPO NA RUPTURA CELULAR E EXTRAÇÃO DOS BIOPRODUTOS

O rompimento celular e a extração foram realizados através do tratamento ultrassônico conforme proposto por Ores, Amarante e Kalil (2016). A biomassa úmida foi ressuspendida em tampão tris-HCl ($20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e pH 8,3) com concentração final de $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A suspensão celular (45 mL) foi submetida ao tratamento ultrassônico utilizando o homogeneizador Sonic Ruptor 250 (Omni International Inc., Estados Unidos da América) com frequência de 20 kHz (potência de 60 W). Durante o tratamento ultrassônico, a amostra foi mantida a 4 °C e alíquotas foram retiradas ao longo do tempo (4, 6, 8, 10, 12 e

14 min). Após o rompimento celular, as suspensões foram centrifugadas ($4757 \times g$, 20 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) e o sobrenadante utilizado para determinação da concentração de C-ficocianina e aloficocianina, atividade enzimática (em termos de esterase e/ou hidratase) e proteína solúvel total. Os resultados foram expressos em termos de rendimento de extração de C-FC e AFC ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomassa), e de AC ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomassa). Os experimentos foram realizados em triplicata.

As células intactas e rompidas por ultrassom foram observadas no microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM-6610LV, Japan) e no microscópio ocular. Além disso, no extrato contendo os bioprodutos, foi obtido um espectro de absorção (280 – 800 nm) utilizando o espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu UV-1800, Japão).

2.3 CAPTURA E SEQUESTRO DO CO_2

Para verificar a potencialidade do uso da anidrase carbônica obtida foram realizados ensaios de captura enzimática do CO_2 , em que a AC foi utilizada como catalisador para a hidratação do CO_2 e o mesmo foi precipitado na forma de carbonato de cálcio (CaCO_3). Os ensaios de captura enzimática e sequestro do CO_2 foram realizados conforme propostos por Ores et al. (2012) e Ores (2014).

A biomassa foi ressuspendida em tampão tris-HCl ($20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e pH 8,3) com concentração de $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (ORES, 2014). A suspensão foi submetida ao tratamento ultrassônico utilizando o homogeneizador Sonic Ruptor 250 (Omni International Inc., Estados Unidos da América) com frequência de 20 kHz (potência de 60 W) por 8 min. Durante o tratamento ultrassônico, a amostra foi mantida a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. O extrato enzimático de AC foi centrifugado por 2 vezes ($21.000 \times g$, 30 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) e filtrado em membrana de acetato de celulose com porosidade de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (Sartorius Stedim Biotech, Alemanha).

Em recipientes fechados contendo 1,25 mL de extrato enzimático adicionou-se 1,25 mL de tris hidroximetil aminometano ($1,38 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) contendo 4,5% (m/v) de cloreto de cálcio anidro (CaCl_2). A reação foi iniciada com adição de 10 mL de solução de água deionizada com CO_2 . A solução de água deionizada contendo CO_2 foi obtida através do borbulhamento do $\text{CO}_{2(\text{g})}$ em 200 mL de água deionizada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 40 min. A reação foi mantida a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Em dois intervalos de tempo (8 e 120 min) (ORES et al., 2012), a mistura reacional foi filtrada em membrana de acetato de celulose com porosidade de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (Sartorius Stedim Biotech, Alemanha) e seca ($35 \text{ }^\circ\text{C}$ por 96 h) para determinar a massa de CaCO_3 precipitado (ensaio enzimático). Ensaios não enzimáticos, onde o extrato enzimático

foi substituído por água deionizada, foram realizados. Os ensaios foram realizados em triplicata. A morfologia do cristal do CaCO_3 precipitado foi observada em microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM-6610LV, Japan).

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.4.1 Concentração e rendimento de ficobiliproteínas

As concentrações ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de C-ficocianina (C-FC, Equação 1) e aloficocianina (AFC, Equação 2) foram calculadas como descrito por Bennett e Bogorad (1973) com modificações no comprimento de onda. As leituras das absorvâncias a 620 e 652 nm representam as absorções máximas de C-ficocianina e aloficocianina, respectivamente, e foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu UV-1800, Japão). Os rendimentos de extração ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{biomassa}}$) de C-FC (Equação 3) e AFC (Equação 4) foram calculados conforme proposto por Silveira et al. (2007), onde CB é a concentração de biomassa ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

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

$$\text{AFC} = \frac{(A_{652} - 0,208 \cdot A_{620})}{5,09} \quad (2)$$

$$\text{Rendimento de C-FC} = \frac{\text{C-FC}}{\text{CB}} \cdot 1000 \quad (3)$$

$$\text{Rendimento de AFC} = \frac{\text{AFC}}{\text{CB}} \cdot 1000 \quad (4)$$

2.4.2 Atividade enzimática de anidrase carbônica

A atividade enzimática de anidrase carbônica foi monitorada através das reações: atividade de hidratase e ou atividade de esterase. A reação de hidratase (hidratação do CO_2) foi realizada segundo metodologia eletrométrica descrita por Wilbur e Anderson (1948) com modificações, a mistura reacional consistiu em 6 mL de tampão tris-HCl ($20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e pH 8,3), 0,4 mL de extrato enzimático e 4 mL de água deionizada contendo CO_2 . A reação enzimática foi mantida a 4°C . A solução de água deionizada contendo CO_2 foi obtida através

do borbulhamento do $\text{CO}_{2(g)}$ em 200 mL de água deionizada a 4 °C por 40 min. Uma unidade de atividade enzimática Wilbur-Anderson (U) é definida como $\left(\frac{t_0}{t} - 1\right)$, onde t_0 e t são os tempos para que ocorra a mudança do pH de 8,0 para 7,0 na ausência (t_0) e na presença da enzima (t), nas condições do ensaio.

A atividade de esterase foi realizada segundo metodologia proposta por Pocker e Stone (1967). A mistura reacional consistiu em 1,8 mL de tampão tris- SO_4 (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e pH 7,4), 0,2 mL de extrato enzimático e 1 mL de solução 3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de *p*-nitrofenil acetato (*p*-NPA). Após a adição do substrato, foi registrado o aumento da absorvância a 400 nm ($\epsilon_{p\text{-nitrofenol}} = 11,43 \text{ mL}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$) a cada 30 s por 4 min à temperatura ambiente em espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu UV-1800, Japan). Uma medida de referência foi obtida, conforme descrito anteriormente, com exceção da adição da solução enzimática onde esta foi substituída por água. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto, sob as condições do ensaio. A absorvidade molar do *p*-nitrofenol ($\epsilon_{p\text{-nitrofenol}}$) em tampão tris- SO_4 (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e pH 7,4) foi determinada através de regressão linear que relaciona a absorvância a 400 nm e a concentração de *p*-nitrofenol (Apêndice 1).

2.4.3 Concentração de biomassa e proteínas

A concentração de biomassa foi determinada por leitura da densidade óptica a 670 nm (COSTA et al., 2002) e conversão para biomassa seca através de curva padrão previamente preparada (Apêndice 2). Para construção da curva padrão, as células foram coletadas por centrifugação (4757 $\times g$, 30 min, 4 °C), lavadas com água destilada e ressuspendidas com água destilada para leitura da absorvância. Para determinação da biomassa seca as células lavadas com água destilada foram secas a 105 °C até massa constante. A concentração de proteína solúvel total foi analisada conforme proposto por Lowry et al. (1951) utilizando BSA (albumina de soro bovino) como padrão (Apêndice 3).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos experimentos foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de *Tukey* ou teste *T*, a fim de verificar diferenças significativas entre as condições estudadas, considerando um nível de confiança de 95%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de extração compreende basicamente duas etapas: a ruptura celular e a extração com o solvente aquoso ou orgânico. Estas duas etapas podem ocorrer concomitantemente ou não. No caso da extração assistida por ultrassom, essas duas etapas ocorrem concomitantemente. Assim, neste artigo o termo *extração* compreende ambas as etapas.

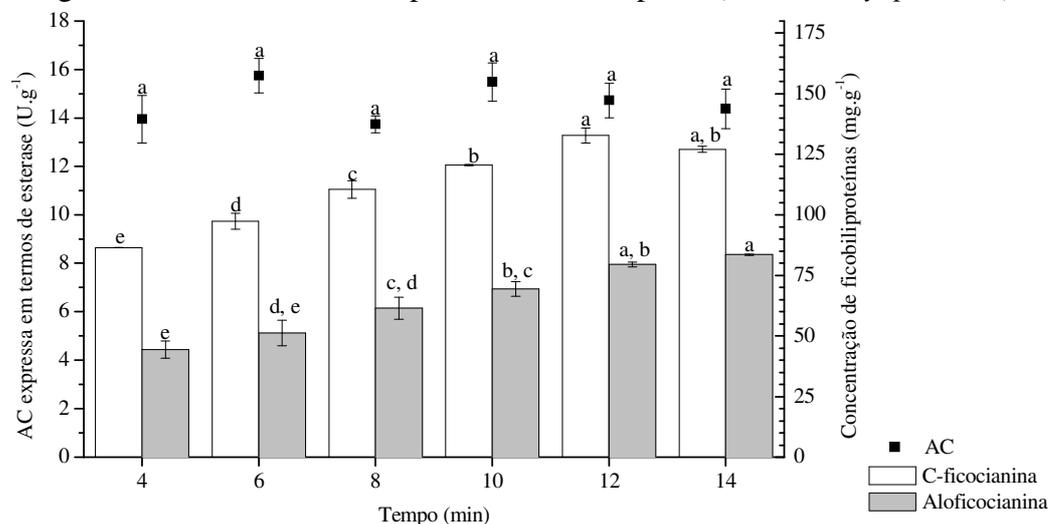
Um problema de utilizar o homogeneizador ultrassônico para bioprodutos termossensíveis, como por exemplo as ficobiliproteínas (GANTT, 1981; SARADA; PILLAI; RAVISHANKAR, 1999) e a AC, é o aumento de temperatura. Para evitar a desnaturação da AC, ou perdas significativas de C-FC e AFC, o extrato durante todo processo de extração foi mantido a 4 °C.

3.1 INFLUÊNCIA DO TEMPO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM NA RECUPERAÇÃO DOS BIOPRODUTOS

A extração dos bioprodutos foi realizada com concentração de biomassa de 0,2 g·L⁻¹. Esta concentração de biomassa foi utilizada com base no trabalho de Ores, Amarante e Kalil (2016), que realizaram o acompanhamento dos bioprodutos anidrase carbônica, aloficocianina e C-ficocianina de *Spirulina* sp. LEB 18 e *Synechococcus nidulans* utilizando concentração de biomassa fixa de 0,2 g·L⁻¹. A Figura 1 apresenta o rendimento de extração assistida por ultrassom de C-ficocianina, aloficocianina e anidrase carbônica expressa em termos de esterase em diferentes tempos de extração (4, 6, 8, 10, 12 e 14 min) com concentração de 0,2 g·L⁻¹ de *S. platensis* LEB-52.

O rendimento de extração da enzima AC expressa em termos de esterase, o qual variou de 13,7 a 15,7 U·g⁻¹ (Figura 1), não foi influenciado significativamente com o aumento do tempo de extração. Entretanto, os rendimentos de extração das ficobiliproteínas foram afetados positivamente pelo tempo. Os rendimentos de C-FC e AFC variaram de 86,4 – 132,8 mg·g⁻¹ e 44,4 – 83,6 mg·g⁻¹, respectivamente. O aumento do tempo de extração proporcionou maiores concentrações de ficobiliproteínas (mg) por g de célula, sendo os maiores rendimentos de extração obtidos a partir de 12 min. Comportamento semelhante foi observado na extração assistida por ultrassom de β-caroteno de *S. platensis*, em que o rendimento de extração aumentou com o aumento do tempo de extração (DEY; RATHOD, 2013; HADIYANTO; MARSYA; FATKHIYATUL, 2015).

Figura 1 – Rendimento de extração de anidrase carbônica (AC) expressa em termos de esterase ($U \cdot g^{-1}$) e de ficobiliproteínas ($mg \cdot g^{-1}$) em diferentes tempos de extração com concentração de biomassa de $0,2 g \cdot L^{-1}$. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias para cada biocomposto (Teste Tukey, $p > 0,05$).



Nos tempos de extração de 4 a 12 min ocorreu aumento mais pronunciado no rendimento de extração das ficobiliproteínas quando comparado aos tempos finais (12 a 14 min). No início da extração assistida por ultrassom, o gradiente de concentração das ficobiliproteínas entre o solvente de extração e a célula é elevado. No entanto, com o aumento do tempo de extração, o gradiente de concentração diminui e a extração dos bioprodutos torna-se cada vez mais difícil.

Diferentes métodos de ruptura celular de *S. platensis* LEB-52 para obtenção de C-ficocianina são reportados, destacando-se o banho ultrassônico na presença de pérolas de vidro (MORAES et al., 2011b) e o tratamento de secagem, moagem e congelamento da biomassa (MORAES; BURKERT; KALIL, 2010; SILVEIRA et al., 2007). Estes métodos apresentam rendimentos de extração de C-FC na faixa de $43,7 - 82,5 mg \cdot g^{-1}$.

C-ficocianina tem sido extraída de *Spirulina* utilizando o homogeneizador ultrassônico (AFTARI et al., 2015; FURUKI et al., 2003; JAOUEN et al., 1999; ORES; AMARANTE; KALIL, 2016; PRABUTHAS et al., 2011). Prabuthas et al. (2011) estudaram alguns parâmetros de extração de C-FC, como tempo de extração, amplitude e volume, utilizando o homogeneizador ultrassônico (50 W e 30 kHz). A melhor condição (concentração de C-FC de $0,2 mg \cdot mL^{-1}$, pureza de 0,62 e rendimento de extração de $90 mg \cdot g^{-1}$) foi obtida quando utilizou volume de 45,3 mL (concentração de biomassa de $2,2 g \cdot L^{-1}$), tempo de 9,3 min e amplitude de 79,7%. No presente trabalho, a concentração de C-FC (tempo de extração de 12 min) foi $0,028 mg \cdot mL^{-1}$. A concentração de C-FC obtida no presente trabalho

é inferior a obtida por Prabuthas et al. (2011), no entanto o rendimento de extração é 1,47 vezes superior.

Aftari et al. (2015) avaliaram o efeito do tempo (1 – 9 min) e do pH (5 – 9) na extração assistida por ultrassom (20 kHz e 100 W) de C-ficocianina de *S. platensis* seguido de congelamento e descongelamento. Ambos fatores influenciaram na extração, e os melhores resultados foram obtidos com tempo de extração de 7 min e pH de 6,0, sendo a concentração de C-ficocianina de 2,84 mg·mL⁻¹ e pureza de 0,65.

Com relação à extração de AC encontra-se o trabalho de Ores (2014), o qual estudou a influência do tempo (1 – 10 min) na extração assistida por ultrassom de AC expressa em termos de esterase de *Dunaliella tertiolecta* com concentração de biomassa de 0,1 g·L⁻¹, a partir de 3 min foram obtidos os maiores rendimentos de extração (ORES, 2014).

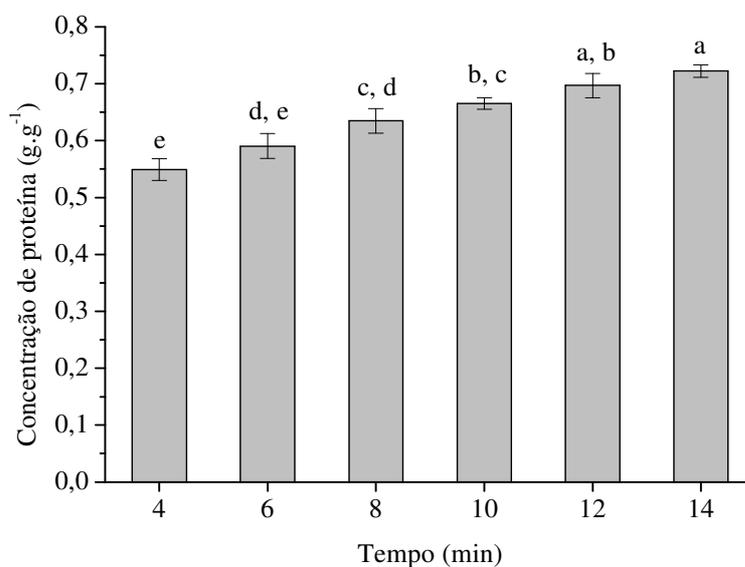
Na extração da enzima β-galactosidase utilizando o homogeneizador ultrassônico por Lemes, Álvares e Kalil (2012) foi observado que a atividade enzimática (U·mL⁻¹) e a concentração de proteínas extraídas aumentaram com o aumento do tempo de processo para uma dada concentração de células (40 g·L⁻¹).

A Figura 2 apresenta o rendimento de extração de proteínas solúveis assistida por ultrassom com concentração de biomassa de 0,2 g·L⁻¹. Conforme esperado, a extração de proteínas aumenta com o incremento no tempo de extração, de 0,55 g·g⁻¹ em 4 min para 0,72 g·g⁻¹ em 14 min; uma vez que o rendimento de extração das ficobiliproteínas aumenta ao longo do tempo de extração. Além disso, com o incremento no tempo de extração, outras proteínas são extraídas. Os maiores rendimentos de extração de proteínas ocorreram nos tempos de 12 e 14 min, sendo estes 0,69 e 0,72 g·g⁻¹. O teor de proteínas extraído é um fator muito importante quando se pensa em processos de purificação destes bioprodutos, quanto maior o número de contaminantes extraídos, maior será o custo de purificação, uma vez que provavelmente será necessário um número maior de etapas.

Comparando o ultrassom com outros métodos de ruptura celular e extração este se apresenta como um método alternativo com redução significativa no tempo (quando comparado em secar, congelar e moer a biomassa (MORAES; BURKERT; KALIL, 2010) ou ao banho ultrassônico na presença de perolas de vidro por 40 min (MORAES et al., 2011b)), com baixo custo de capital (comparado a extração assistida por campos elétricos pulsados e descargas elétricas de alta tensão), além disso pode ser implementado nas indústrias de alimentos e farmacêuticas (BARBA; GRIMI; VOROBIEV, 2015). Desta forma, os biocompostos AC expressa em termos de esterase, C-FC e AFC, podem ser obtidos utilizando

o tratamento ultrassônico por 12 min obtendo-se rendimentos de $14,7 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$, $132,8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ e $79,5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente, com concentração de biomassa de $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Figura 2 – Rendimento de extração de proteína solúvel ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) em diferentes tempos de extração com concentração de biomassa de $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias (Teste *Tukey*, $p > 0,05$).



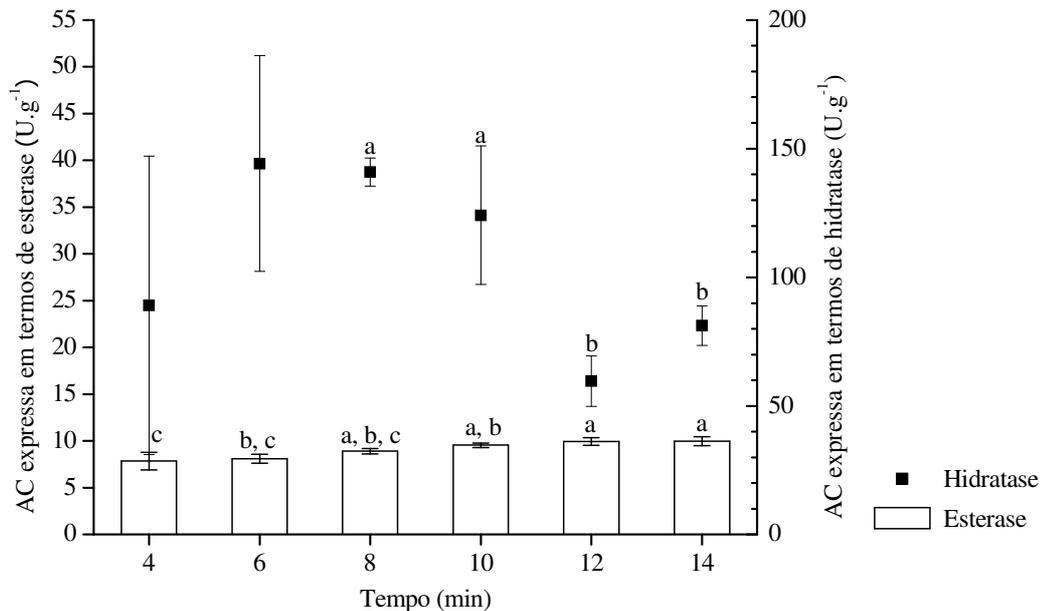
A atividade da AC expressa em termos de hidratase nas cianobactérias é muito baixa e nem sempre é detectável pela reação de hidratase (KUPRIYANOVA et al., 2003). A atividade da AC expressa em termos de hidratase, como esperado, não foi detectada na biomassa extraída com concentração de $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Soltes-Rak, Mulligan e Coleman (1997), Kupriyanova et al. (2003) e Ores (2014) também encontraram dificuldades ao determinar a atividade enzimática da AC (em termos de hidratase) em microalgas. Por esta razão, no presente trabalho, a concentração de biomassa foi aumentada para $23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, sendo possível detectar a presença da enzima. Esta concentração de biomassa foi estabelecida com testes prévios (dados não mostrados). Neste sentido, sempre que a anidrase carbônica for monitorada pela reação de hidratase, a concentração de biomassa do extrato enzimático deve ser elevada, em torno de $23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

É importante ressaltar que em extratos não puros, a atividade de esterase não diz unicamente a respeito da enzima anidrase carbônica, uma vez que a *Spirulina platensis* produz outras esterases sem atividade de hidratase; enquanto que a atividade de hidratase reflete somente a enzima anidrase carbônica. Dessa forma, se faz necessário verificar qual é o tempo de ultrassom necessário para obter ambas atividades – hidratase e esterase – com concentração de biomassa de $23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A Figura 3 apresenta a extração assistida por ultrassom

de anidrase carbônica expressa em termos de hidratase e esterase ao longo do tempo (4, 6, 8, 10, 12 e 14 min) com concentração de biomassa de 23 g·L⁻¹.

O rendimento de extração da AC expressa em termos de esterase e hidratase foi influenciado pelo tempo (Figura 3) com concentração de biomassa de 23 g·L⁻¹. A partir de 8 min não houve incremento no rendimento de extração de AC expressa em termos de esterase, sendo o rendimento em 8 min (8,9 U·g⁻¹) estatisticamente igual aos tempos de 10 a 14 min (9,5 a 10,0 U·g⁻¹). Diferentemente da extração realizada com concentração de biomassa de 0,2 g·L⁻¹ (Figura 1), o tempo influenciou positivamente o rendimento de extração de AC expressa em termos de esterase. Isto provavelmente ocorreu devido à elevada concentração de biomassa, assim é requerido um tempo adicional para romper um maior número de células e atingir o máximo rendimento de extração de AC.

Figura 3 – Rendimento de extração de anidrase carbônica (AC) expressa em termos de esterase e hidratase (U·g⁻¹) em diferentes tempos de extração com concentração de biomassa de 23 g·L⁻¹. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias para cada biocomposto (Teste Tukey, $p > 0,05$).



O aumento da concentração de biomassa (de 0,2 para 23 g·L⁻¹) afetou a eficiência de ruptura celular e extração da AC expressa em termos de esterase (Figuras 1 e 3) e como resultado o rendimento do processo diminuiu. Por exemplo, no tempo de extração de 8 min o rendimento de extração diminuiu cerca de 35% ao aumentar a concentração de biomassa de 0,2 para 23 g·L⁻¹. Comportamento similar a este foi observado quando a enzima β-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CTT7082 foi extraída utilizando banho

ultrassônico, em que o rendimento de extração da enzima diminuiu ao aumentar a concentração de biomassa de 20 para 50 g·L⁻¹ (MEDEIROS, 2008).

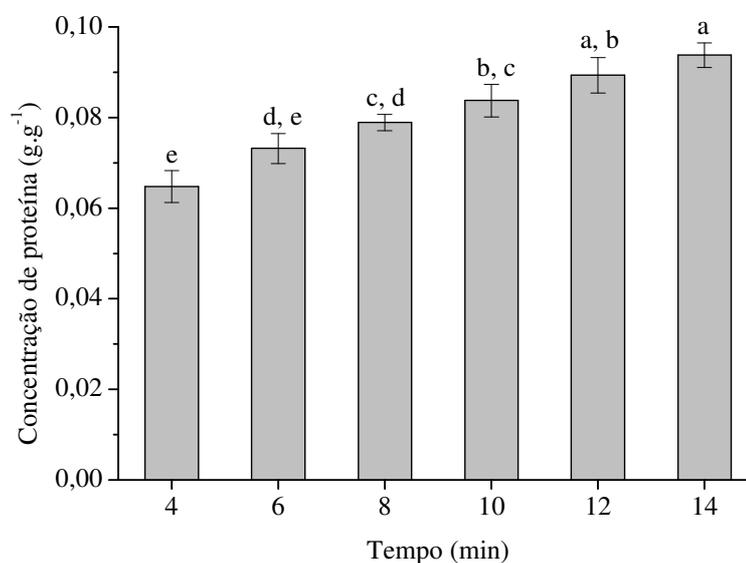
A atividade enzimática da AC expressa em termos de hidratase, especialmente nos tempos iniciais (4 e 6 min) (Figura 3), apresentou elevados desvios padrões, provavelmente relacionados com a extração heterogênea (MEDEIROS, 2008). Assim, estes dois tempos foram excluídos da análise estatística. Nos tempos de extração de 8 e 10 min, o rendimento da AC expressa em termos de hidratase (U·g⁻¹) não é estatisticamente diferente, sendo estes de 140,9 e 124,1 U·g⁻¹, respectivamente, diminuindo após os 10 min. Essa queda pode ser atribuída à instabilidade da enzima quando submetida a tempos maiores de tratamento ultrassônico, dessa forma, não é possível prever correlações entre as atividades de hidratase e esterase a partir dos resultados apresentados na Figura 3. Assim, o tempo de processo de 8 min é ideal para a extração da AC com concentração de biomassa de 23 g·L⁻¹, e assim é possível determinar a sua atividade por ambas as reações, esterase e hidratase.

O único relato, até o presente momento, encontrado na literatura em relação à determinação da AC expressa em termos de hidratase proveniente de *S. platensis* é o trabalho de Komarova et al. (1976). A enzima foi extraída utilizando o ultrassom com tempo de 6 min, no entanto os valores de atividade não podem ser comparados, pois no estudo de Komarova et al. (1976) os valores de atividade são apresentados em unidades diferentes.

A Figura 4 apresenta o rendimento de proteínas extraídas com concentração de 23 g·L⁻¹. A concentração de proteínas aumenta (0,065 a 0,094 g·g⁻¹) com o aumento do tempo de extração (4 a 14 min). Os maiores rendimentos de extração foram obtidos a partir de 12 min sendo este de 0,089 g·g⁻¹. No entanto, o rendimento de extração de proteínas foi diferente nas duas concentrações de biomassa, os maiores rendimentos de extração de proteínas (0,69 e 0,72 g·g⁻¹) foram obtidos na menor concentração de biomassa (0,2 g·L⁻¹, Figura 2), isso provavelmente ocorreu pois a eficiência do rompimento celular fica comprometida quando a concentração celular é elevada (23 g·L⁻¹).

Na literatura são encontrados muitos estudos sobre a extração de C-ficocianina (AFTARI et al., 2015; MARTÍNEZ et al., 2016; MORAES; BURKERT; KALIL, 2010; MORAES et al., 2011B; ORES; AMARANTE; KALIL, 2016; PRABUTHAS et al., 2011; SILVEIRA et al., 2007), enquanto que para extração de anidrase carbônica e de aloficocianina os estudos ainda são escassos sendo encontrado o estudo de Ores, Amarante e Kalil (2016).

Figura 4 – Extração de proteínas ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{biomassa}}$) em diferentes tempos de extração com concentração de biomassa de $23 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias (Teste *Tukey*, $p > 0,05$ e $n = 3$).



A extração assistida por ultrassom foi eficiente para a obtenção simultânea dos bioprodutos – C-FC, AFC e AC, a partir da microalga *S. platensis*. Com estes resultados é possível acompanhar a produção destes bioprodutos ao longo do cultivo da microalga. Assim, para o acompanhamento destes bioprodutos é possível extrair as ficobiliproteínas e a AC expressa em termos de esterase com baixas concentrações de biomassa ($0,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) utilizando o ultrassom por 12 min. Enquanto que, quando se deseja determinar a atividade de AC expressa em termos de hidratase, deve-se utilizar o ultrassom por 8 min e a concentração de biomassa deve ser de $23 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

A Figura 5 apresenta a microscopia eletrônica de varredura e a micrografia das células intactas e rompidas após a extração assistida por ultrassom, e a Figura 6 apresenta o espectro de absorção do extrato de ficobiliproteínas e AC após a extração assistida por ultrassom.

É possível verificar que a extração assistida por ultrassom foi eficiente para desintegrar as células (Figuras 5b e 5d), somando a isso a extração utilizando o ultrassom não é seletiva para extrair C-ficocianina e aloficocianina (Figura 6), ocasionando a extração de outros compostos. É importante ressaltar que o extrato contendo os bioprodutos apresentou coloração verde. A presença de coloração verde nos extratos microalgais também foi observada por Gerde et al. (2012) e Safi et al. (2014), os quais extraíram lipídios e proteínas, respectivamente, de diferentes microalgas utilizando o ultrassom. Estes autores atribuem este fenômeno à clorofila – um pigmento hidrofóbico, a qual é liberada durante a extração celular

e permanece mesmo depois do processo de centrifugação. Cabe ressaltar que o ultrassom apresenta outras aplicações além da extração, como por exemplo, a homogeneização de sólidos em meio líquido e emulsificação de fases imiscíveis (LIN; CHEN, 2006). Neste sentido, pode ter ocorrido a formação de estruturas micelares de clorofila no meio aquoso (SAFI et al., 2014), ou ainda alguns fragmentos celulares contendo clorofila podem ter sido reduzidos em tamanho pelo ultrassom e estes não precipitaram no *pellet* após a centrifugação (GERDE et al., 2012). A clorofila-*a* de *Spirulina platensis* apresenta absorção máxima no comprimento de onda de 680 nm (KOEHNE; TRISSEL, 1998). Assim, pode-se verificar a presença de um pico com absorção máxima no comprimento de onda de 679 nm (Figura 6) o qual é muito próximo a absorção máxima de clorofila-*a*.

Figura 5 – Microscopia eletrônica de varredura (a) células intactas de *Spirulina* e (b) após a extração assistida por ultrassom (concentração de $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); e micrografia das (c) células intactas de *Spirulina* (aumento de 200 x) e (d) após a extração assistida por ultrassom (concentração de $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, aumento de 400 x).

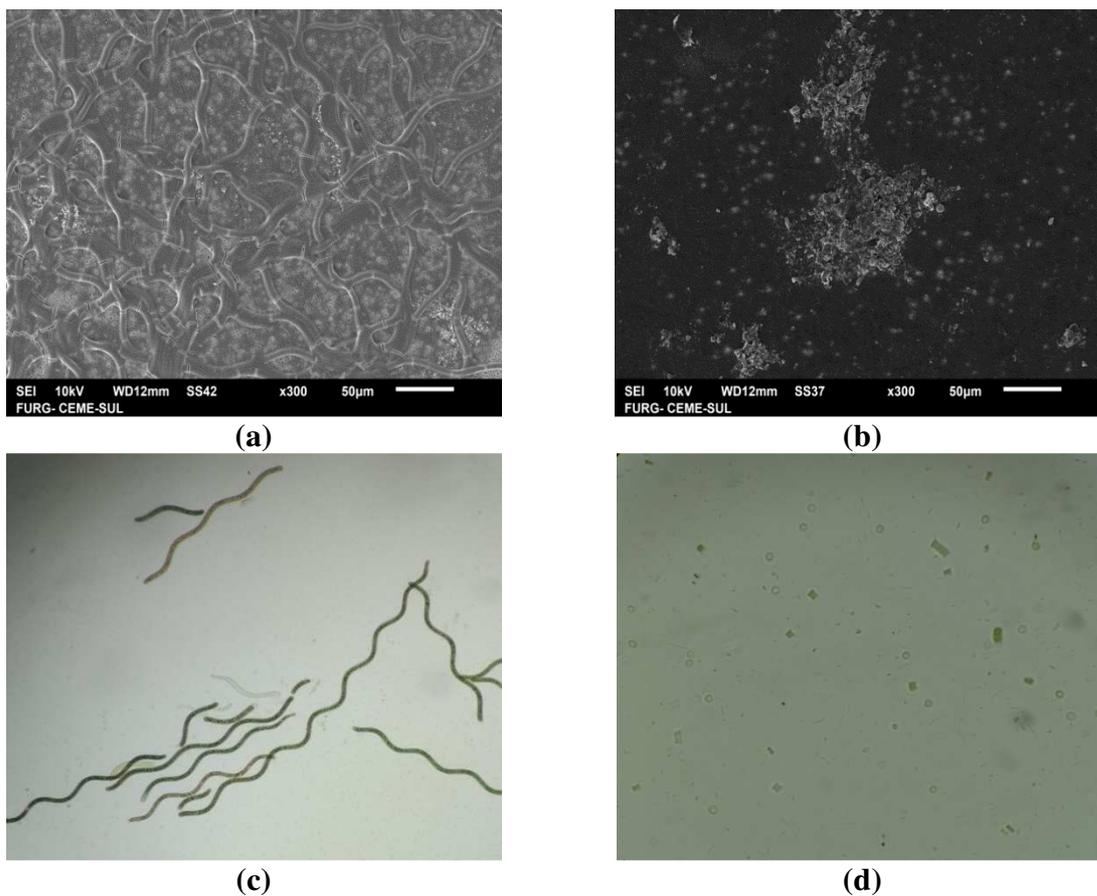
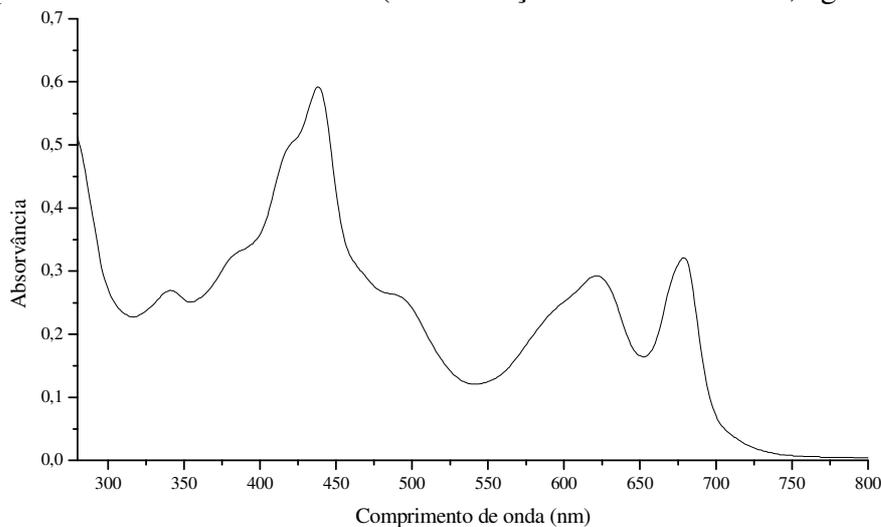


Figura 6 – Espectro de absorção do extrato contendo anidrase carbônica e ficobiliproteínas após o tratamento ultrassônico (concentração de biomassa de $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).



No espectro de absorção (Figura 6) podem ser observados vários picos de absorção além da C-ficocianina ($\lambda_{\text{máx}} = 620 \text{ nm}$) e da aloficocianina ($\lambda_{\text{máx}} = 652 \text{ nm}$). Os carotenoides, em sua grande maioria hidrofóbicos, apresentam absorção máxima na faixa de 410-510 nm. Conforme exposto anteriormente sobre a clorofila, o mesmo pode ter acontecido com os carotenoides, já que o espectro de absorção apresenta vários picos na faixa de 410-510 nm. Koehne e Trissl (1998) investigaram pigmentos que absorvem em comprimentos de ondas superiores a 700 nm da biomassa de *S. platensis* B 257.8. Neste estudo os autores realizaram o espectro de absorção do extrato da biomassa, e o perfil apresentado da biomassa de *S. platensis* B 257.8 é muito semelhante ao obtido no presente trabalho.

A pureza do extrato de C-FC extraída com ultrassom variou em torno de 0,5 a 0,6. Assim a extração assistida por ultrassom é um método eficiente para a rápida determinação e quantificação de ficobiliproteínas, no entanto a extração conjunta de outros compostos e a presença de fragmentos celulares pode dificultar a posterior purificação destes biocompostos.

3.2 CAPTURA E SEQUESTRO DO DIÓXIDO DE CARBONO

Para verificar a potencial aplicação da AC de *Spirulina* na captura enzimática do CO_2 foram realizados ensaios de captura (Tabela 1) e a forma morfológica do CaCO_3 precipitado foi visualizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV, Figura 7). A fim de minimizar a interferência dos fragmentos celulares presentes após a extração ultrassônica, o extrato enzimático foi centrifugado e filtrado.

Tabela 1 – Precipitação de CaCO₃ sólido por anidrase carbônica de *S. platensis* LEB-52.

Tempo (min)	CaCO ₃ (mg)	
	Ensaio enzimático	Ensaio não enzimático
8	20,70 ± 0,66 ^{b, A}	9,67 ± 1,10 ^{b, B}
120	48,67 ± 1,90 ^{a, A}	31,68 ± 1,70 ^{a, B}

Letras iguais minúsculas indicam que não há diferença significativa entre as médias na mesma coluna e letras iguais maiúsculas indicam que não há diferença significativa entre as médias na mesma linha (Teste *T*, $p > 0,05$ e $n = 3$).

A AC acelera a formação de HCO₃⁻ durante a hidratação de CO₂, assim a presença da enzima reduz a energia de ativação requerida, promovendo que a reação ocorra em um estado de energia mais baixo. Espera-se que a taxa de precipitação de CaCO₃ sólido seja mais rápida na presença da enzima do que sem a adição de AC (hidratação natural do CO₂). A reação na presença da anidrase carbônica (ensaio enzimático) apresentou taxas de precipitação do CaCO₃ estatisticamente superiores ao ensaio não enzimático (Tabela 1). O aumento do CaCO₃ no ensaio enzimático em 8 min de reação foi 11,03 mg de sal, e em 120 min foi 16,99 mg.

Na literatura muitos são os estudos de AC bovina (livre, imobilizada ou purificada) para a captura e sequestro do CO₂ e consequente precipitação na forma de minerais (FAVRE; CHRIST; PIERRE, 2009; MIRJAFARI; ASGHARI; MAHINPEY, 2007; ORES et al., 2012; POWER et al., 2013; SAHOO; JANG; LEE, 2012; VINOBA et al., 2012; VINOBA et al., 2011b; YADAV et al., 2012), e algumas pesquisas tem dado enfoque à captura e sequestro de CO₂ utilizando AC de micro-organismos (KIM et al., 2012; LI et al., 2013a; LI et al., 2013b; LI et al., 2010; RAMANAN et al., 2009; SHARMA; BHATTACHARYA, 2010) ou de microalgas (KANTH et al., 2012; LI et al., 2012).

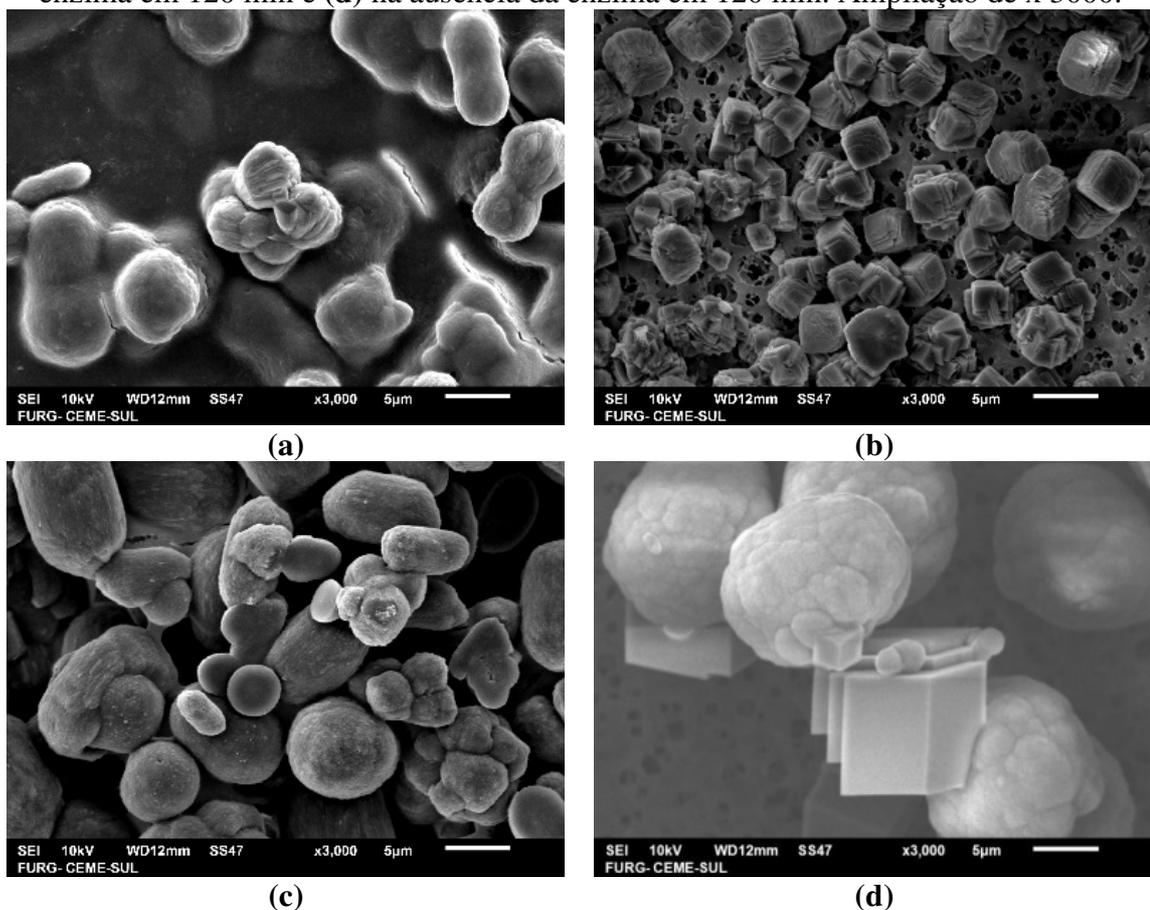
A AC purificada de *Citrobacter freundii* precipitou cerca de 15 vezes mais o carbonato quando comparada com o extrato bruto (RAMANAN et al., 2009). Li et al. (2012) avaliaram o extrato enzimático de AC intracelular e extracelular de *Chlorella vulgaris* na precipitação de CaCO₃ e verificaram que a fração intracelular precipitou uma quantidade maior de CaCO₃ (160 mg·g⁻¹_{proteína}) quando comparada com a fração extracelular (72 mg·g⁻¹_{proteína}). Ores (2014) verificou que a AC de *S. platensis* LEB-52 catalisou a hidratação do CO₂ que precipitou mais rapidamente na forma de CaCO₃ na presença da enzima (cerca de 5 mg nos tempos de 2, 6 e 30 min).

O CO₂ hidratado reage rapidamente com o íon Ca⁺² em solução com pH relativamente alto, resultando na produção de carbonato de cálcio (CaCO₃) sólido. Os cristais de CaCO₃ com diferentes morfologias, tamanhos e estruturas cristalográficas são amplamente

utilizados em indústrias como papel, tintas, pigmentos, alimentos, plásticos e medicina (KIM et al., 2012).

O CaCO_3 apresenta três polimorfos minerais cristalinos: calcita, vaterita, e aragonita. A calcita e a aragonita apresentam estruturas termodinamicamente estáveis, enquanto que a vaterita é termodinamicamente instável por esta razão se transforma facilmente em calcita ou aragonita em solução aquosa (LI et al., 2010). As partículas de calcita apresentam forma rômbrica e a aragonita se apresenta na forma de agulhas. Já as partículas de vaterita cristalizam e se agregam em partículas esféricas (OUHENIA et al., 2008; XU et al., 2006). A calcita é o polimorfo dominante em altos valores de pH e baixas temperaturas, enquanto que a vaterita e aragonita são produzidas em baixos valores de pH e altas temperaturas (KIM et al., 2012; LI et al., 2010).

Figura 7 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do carbonato de cálcio precipitado (a) na presença da enzima em 8 min, (b) na ausência da enzima em 8 min, (c) na presença da enzima em 120 min e (d) na ausência da enzima em 120 min. Ampliação de x 3000.



O tamanho e a morfologia dos cristais de CaCO_3 produzidos (Figura 7) na ausência e presença da AC foi influenciado pelo tempo de reação na captura enzimática do

CO₂. As partículas de CaCO₃ precipitadas na presença da enzima em 8 e 120 min de reação (Figura 7a e 7c) exibiram cristais predominantemente na forma vaterita. Os cristais precipitados na ausência da enzima após 8 min de reação (Figura 7b) apresentaram predominantemente na forma de calcita; enquanto que aqueles precipitados em 120 min (Figura 7d) apresentaram ambas as formas calcita e vaterita.

Mudanças na estrutura cristalográfica e/ou forma das partículas sólidas com o tempo são comumente observadas quando as partículas são mantidas em um meio líquido (FAVRE; CHRIST; PIERRE, 2009). É possível verificar que o tamanho do cristal formado em 120 min na ausência da enzima foi maior daquele formado em 8 min.

Grande parte dos estudos a respeito da captura e sequestro de CO₂ utilizam a anidrase carbônica proveniente de eritrócito bovino para acelerar a reação de hidratação do CO₂ e posterior precipitação do HCO₃⁻ em CaCO₃. Ores et al. (2012) verificaram que a AC bovina não precisa ser purificada para acelerar a hidratação do CO₂. A AC proveniente da biomassa de *Spirulina*, especialmente o extrato não purificado, pode ser utilizada como uma alternativa para catalisar a reação de hidratação do CO₂.

No entanto para usos farmacêuticos a AC precisa ser purificada. A empresa Sigma Aldrich comercializa AC purificada de eritrócito bovino a R\$ 10.680,00 g⁻¹ (fevereiro/2017). Então para esta finalidade estudos futuros inerentes à purificação desta enzima devem ser realizados, já que quando purificada representa um produto de alto valor agregado.

4 CONCLUSÃO

As ficobiliproteínas, C-ficocianina e aloficocianina, e a enzima anidrase carbônica de *S. platensis* LEB-52 foram extraídas simultaneamente utilizando o ultrassom. Para concentrações de biomassa na ordem de 0,2 g·L⁻¹, o tempo de 12 min de ultrassom foi suficiente para obter AC (em termos de esterase) e as ficobiliproteínas. Para determinar a AC (em termos de hidratase) a concentração de biomassa foi de 23 g·L⁻¹, com tempo de ultrassom de 8 min. A extração assistida por ultrassom foi eficiente para desintegrar as células, no entanto a extração utilizando o ultrassom não foi seletiva para extrair as ficobiliproteínas, promovendo a extração de outros compostos. A pureza do extrato de C-FC extraída com ultrassom variou em torno de 0,5 a 0,6. Por fim, o extrato enzimático bruto de AC mostrou potencial para acelerar a reação de hidratação na captura enzimática do CO₂ e posterior precipitação na forma de carbonato de cálcio.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFTARI, R. V.; REZAEI, K.; MORTAZAVI, A.; BANDANI, A. R. The optimized concentration and purity of *Spirulina platensis* C-phycoyanin: a comparative study on microwave-assisted and ultrasound-assisted extraction methods. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 3080-3091, 2015.
- ARAD, S. M.; YARON, A. Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 3, p. 92-97, 1992.
- BADGER, M. R.; PRICE, G. D. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 45, p. 369-392, 1994.
- BARBA, F. J.; GRIMI, N.; VOROBIEV, E. New approaches for the use of non-conventional cell disruption technologies to extract potential food additives and nutraceuticals from microalgae. **Food Engineering Reviews**, v. 7, n. 1, p. 45-62, 2015.
- BAYRAM, E.; SENTURK, M.; KUFREVIOGLU, O. I.; SUPURAN, C. T. *In vitro* inhibition of salicylic acid derivatives on human cytosolic carbonic anhydrase isozymes I and II. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 20, p. 9101-9105, 2008.
- BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **The Journal of Cell Biology**, v. 58, n. 2, p. 419-435, 1973.
- BRYANT, D.; GUGLIELMI, G.; DE MARSAC, N.; CASTETS, A.-M.; COHEN-BAZIRE, G. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. **Archives of Microbiology**, v. 123, n. 2, p. 113-127, 1979.
- COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; FILHO, P. D.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 603-607, 2002.
- DAI, Y. M.; CHEN, K. T.; CHEN, C. C. Study of the microwave lipid extraction from microalgae for biodiesel production. **Chemical Engineering Journal**, v. 250, p. 267-273, 2014.
- DEY, S.; RATHOD, V. K. Ultrasound assisted extraction of β -carotene from *Spirulina platensis*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 271-276, 2013.
- FAVRE, N.; CHRIST, M. L.; PIERRE, A. C. Biocatalytic capture of CO₂ with carbonic anhydrase and its transformation to solid carbonate. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 60, n. 3-4, p. 163-170, 2009.
- FURUKI, T.; MAEDA, S.; IMAJO, S.; HIROI, T.; AMAYA, T.; HIROKAWA, T.; ITO, K.; NOZAWA, H. Rapid and selective extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis* with ultrasonic cell disruption. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, n. 4, p. 319-324, 2003.

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

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

GERDE, J. A.; MONTALBO-LOMBOY, M.; YAO, L. X.; GREWELL, D.; WANG, T. Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 175-181, 2012.

HADIYANTO, H.; MARSYA, M. A.; FATKHIYATUL, P. Improved yield of β -carotene from microalgae *Spirulina platensis* using ultrasound assisted extraction. **Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)**, v. 77, n. 1, p. 219-222, 2015.

HENRY, R. P. Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. **Annual Review of Physiology**, v. 58, p. 523-538, 1996.

HEWETT-EMMETT, D.; TASHIAN, R. E. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the α -, β -, and γ -carbonic anhydrase gene families. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 5, n. 1, p. 50-77, 1996.

IPCC. **INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. Chapter 5: Drivers, Trends and Mitigation**. [S.I.]: [s.n], 2014. 94 p.

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

KANTH, B. K.; MIN, K.; KUMARI, S.; JEON, H.; JIN, E. S.; LEE, J.; PACK, S. P. Expression and characterization of codon-optimized carbonic anhydrase from *Dunaliella* species for CO₂ sequestration application. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 8, p. 2341-2356, 2012.

KHALIFAH, R. G. The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase: I. Stop-flow kinetic studies on the native human isoenzymes B and C. **Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 8, p. 2561-2573, 1971.

KIM, I. G.; JO, B. H.; KANG, D. G.; KIM, C. S.; CHOI, Y. S.; CHA, H. J. Biomineralization-based conversion of carbon dioxide to calcium carbonate using recombinant carbonic anhydrase. **Chemosphere**, v. 87, n. 10, p. 1091-1096, 2012.

KOEHNE, B.; TRISSL, H. W. The cyanobacterium *Spirulina platensis* contains a long wavelength-absorbing pigment C738 (F76077K) at room temperature. **Biochemistry**, v. 37, n. 16, p. 5494-500, 1998.

KOMAROVA, Y. M.; TEREKHOVA, I. V.; DOMAN, N. G.; AL'BITSKAYA, O. N. Carbonic anhydrase of blue-green alga *Spirulina platensis*. **Biokhimiya**, v. 41, n. 1, p. 183-187, 1976.

KUDDUS, M.; SINGH, P.; THOMAS, G.; AL-HAZIMI, A. Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycoerythrin. **Biomed Research International**, p. 1-9, 2013.

KUPRIYANOVA, E. V.; LEBEDEVA, N. V.; DUDOLADOVA, M. V.; GERASIMENKO, L. M.; ALEKSEEVA, S. G.; PRONINA, N. A.; ZAVARZIN, G. A. Carbonic anhydrase activity of alkalophilic cyanobacteria from soda lakes. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 50, n. 4, p. 532-539, 2003.

LI, B.; GAO, M.-H.; CHU, X.-M.; TENG, L.; LV, C.-Y.; YANG, P.; YIN, Q.-F. The synergistic antitumor effects of all-trans retinoic acid and C-phycoerythrin on the lung cancer A549 cells in vitro and in vivo. **European Journal of Pharmacology**, v. 749, p. 107-114, 2015.

LI, L.; FU, M.-L.; ZHAO, Y.-H.; ZHU, Y.-T. Characterization of carbonic anhydrase II from *Chlorella vulgaris* in bio-CO₂ capture. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 9, p. 4227-4232, 2012.

LI, W.; CHEN, W.-S.; ZHOU, P.-P.; CAO, L.; YU, L.-J. Influence of initial pH on the precipitation and crystal morphology of calcium carbonate induced by microbial carbonic anhydrase. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 281-287, 2013a.

LI, W.; CHEN, W.-S.; ZHOU, P.-P.; ZHU, S.-L.; YU, L.-J. Influence of initial calcium ion concentration on the precipitation and crystal morphology of calcium carbonate induced by bacterial carbonic anhydrase. **Chemical Engineering Journal**, v. 218, p. 65-72, 2013b.

LI, W.; LIU, L.; CHEN, W.; YU, L.; LI, W.; YU, H. Calcium carbonate precipitation and crystal morphology induced by microbial carbonic anhydrase and other biological factors. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 6, p. 1017-1021, 2010.

LIAO, G.; GAO, B.; GAO, Y.; YANG, X.; CHENG, X.; OU, Y. Phycocyanin inhibits tumorigenic potential of pancreatic cancer cells: Role of apoptosis and autophagy. **Scientific Reports**, v. 6, p. 34564, 2016.

LIN, C.-Y.; CHEN, L.-W. Engine performance and emission characteristics of three-phase diesel emulsions prepared by an ultrasonic emulsification method. **Fuel**, v. 85, n. 5-6, p. 593-600, 2006.

LIU, D.; ZENG, X. A.; SUN, D. W.; HAN, Z. Disruption and protein release by ultrasonication of yeast cells. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 18, p. 132-137, 2013.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MACHADO JR, F. R. S.; REIS, D. F.; BOSCHETTO, D. L.; BURKERT, J. F. M.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V.; BURKERT, C. A. V. Encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* in PHBV by means of SEDS technique using supercritical CO₂. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 17-21, 2014.

MARTÍNEZ, J. M.; LUENGO, E.; SALDAÑA, G.; ÁLVAREZ, I.; RASO, J. C-phycoyanin extraction assisted by pulsed electric field from *Arthrospira platensis*. **Food Research International**, 2016.

MEDEIROS, F. O. **Adsorção e purificação da enzima beta-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CTT 7082 através de cromatografia de troca iônica**. 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008.

MIRJAFARI, P.; ASGHARI, K.; MAHINPEY, N. Investigating the application of enzyme carbonic anhydrase for CO₂ sequestration purposes. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, n. 3, p. 921-926, 2007.

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

MORAES, C. C.; SALA, L.; CERVEIRA, G. P.; KALIL, S. J. C-phycoyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 1, p. 45-49, 2011.

MORONEY, J. V.; BARTLETT, S. G.; SAMUELSSON, G. Carbonic anhydrases in plants and algae. **Plant Cell and Environment**, v. 24, n. 2, p. 141-153, 2001.

NAGARAJ, S.; ARULMURUGAN, P.; RAJARAM, M. G.; KARUPPASAMY, K.; JAYAPPRIYAN, K. R.; SUNDARARAJ, R.; VIJAYANAND, N.; RENGASAMY, R. Hepatoprotective and antioxidative effects of C-phycoyanin from *Arthrospira maxima* SAG 25780 in CCl₄-induced hepatic damage rats. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 81-85, 2012.

ORES, J. C. **Produção e extração da enzima anidrase carbônica e de ficobiliproteínas a partir de microalgas**. 2014. 135 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

ORES, J. C.; AMARANTE, M. C. A.; KALIL, S. J. Co-production of carbonic anhydrase and phycobiliproteins by *Spirulina* sp. and *Synechococcus nidulans*. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 219-227, 2016.

ORES, J. C.; FERNANDES, S. S.; AMARANTE, M. C. A.; SILVA, B. P.; KALIL, S. J. Tecnologia enzimática para captura de CO₂: cultivo de microalga para obtenção de anidrase carbônica. **Vetor**, v. 23, n. 2, p. 82-92, 2013.

ORES, J. D.; SALA, L.; CERVEIRA, G. P.; KALIL, S. J. Purification of carbonic anhydrase from bovine erythrocytes and its application in the enzymic capture of carbon dioxide. **Chemosphere**, v. 88, n. 2, p. 255-259, 2012.

OUHENIA, S.; CHATEIGNER, D.; BELKHIR, M. A.; GUILMEAU, E.; KRAUSS, C. Synthesis of calcium carbonate polymorphs in the presence of polyacrylic acid. **Journal of Crystal Growth**, v. 310, n. 11, p. 2832-2841, 2008.

PARNIAKOV, O.; APICELLA, E.; KOUBAA, M.; BARBA, F. J.; GRIMI, N.; LBOVKA, N.; PATARO, G.; FERRARI, G.; VOROBIEV, E. Ultrasound-assisted green solvent extraction of high-added value compounds from microalgae *Nannochloropsis* spp. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 262-267, 2015.

PENTÓN-ROL, G.; MARÍN-PRIDA, J.; PARDO-ANDREU, G.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; ACOSTA-MEDINA, E. F.; VALDIVIA-ACOSTA, A.; LAGUMERSINDEZ-DENIS, N.; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ, E.; LLÓPIZ-ARZUAGA, A.; LÓPEZ-SAURA, P. A.; GUILLÉN-NIETO, G.; PENTÓN-ARIAS, E. C-Phycocyanin is neuroprotective against global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils. **Brain Research Bulletin**, v. 86, n. 1-2, p. 42-52, 2011.

POCKER, Y.; STONE, J. The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase. III. Kinetic studies of the enzyme-catalyzed hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate. **Biochemistry**, v. 6, n. 3, p. 668-678, 1967.

POWER, I. M.; HARRISON, A. L.; DIPPLE, G. M.; SOUTHAM, G. Carbon sequestration via carbonic anhydrase facilitated magnesium carbonate precipitation. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 16, p. 145-155, 2013.

PRABUTHAS, P.; MAJUMDAR, S.; SRIVASTAV, P.; MISHRA, H. Standardization of rapid and economical method for nutraceuticals extraction from algae. **Journal of Stored Products and Postharvest Research**, v. 2, n. 5, p. 93-96, 2011.

QV, X. Y.; ZHOU, Q. F.; JIANG, J. G. Ultrasound-enhanced and microwave-assisted extraction of lipid from *Dunaliella tertiolecta* and fatty acid profile analysis. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 20, p. 2991-2999, 2014.

RAMANAN, R.; KANNAN, K.; SIVANESAN, S. D.; MUDLIAR, S.; KAUR, S.; TRIPATHI, A. K.; CHAKRABARTI, T. Bio-sequestration of carbon dioxide using carbonic anhydrase enzyme purified from *Citrobacter freundii*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 981-987, 2009.

RAVI, M.; TENTU, S.; BASKAR, G.; ROHAN PRASAD, S.; RAGHAVAN, S.; JAYAPRAKASH, P.; JEYAKANTHAN, J.; RAYALA, S. K.; VENKATRAMAN, G.
Molecular

mechanism of anti-cancer activity of phycocyanin in triple-negative breast cancer cells. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 768, 2015.

REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Repeated batch cultivation of the microalga *Spirulina platensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 937-943, 2006.

ROMAY, C.; ARMESTO, J.; REMIREZ, D.; GONZÁLEZ, R.; LEDON, N.; GARCÍA, I. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae. **Inflammation Research**, v. 47, n. 1, p. 36-41, 1998.

SAFI, C.; URSU, A. V.; LAROCHE, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; PONTALIER, P.-Y.; VACA-GARCIA, C. Aqueous extraction of proteins from microalgae: effect of different cell disruption methods. **Algal Research**, v. 3, p. 61-65, 2014.

SAHOO, P. C.; JANG, Y.-N.; LEE, S.-W. Immobilization of carbonic anhydrase and an artificial Zn(II) complex on a magnetic support for biomimetic carbon dioxide sequestration. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 82, p. 37-45, 2012.

SANTOS-SÁNCHEZ, N. F.; VALADEZ-BLANCO, R.; HERNÁNDEZ-CARLOS, B.; TORRES-ARIÑO, A.; GUADARRAMA-MENDOZA, P. C.; SALAS-CORONADO, R. Lipids rich in ω -3 polyunsaturated fatty acids from microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 20, p. 8667-8684, 2016.

SANTOS, R. R.; MOREIRA, D. M.; KUNIGAMI, C. N.; ARANDA, D. A. G.; TEIXEIRA, C. M. L. L. Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 95-99, 2015.

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

SHARMA, A.; BHATTACHARYA, A. Enhanced biomimetic sequestration of CO₂ into CaCO₃ using purified carbonic anhydrase from indigenous bacterial strains. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 1-2, p. 122-128, 2010.

SHIH, S. R.; TSAI, K. N.; LI, Y. S.; CHUEH, C. C.; CHAN, E. C. Inhibition of enterovirus 71-induced apoptosis by allophycocyanin isolated from a blue-green alga *Spirulina platensis*. **Journal of Medical Virology**, v. 70, n. 1, p. 119-125, 2003.

SILVEIRA, S. T.; BURKERT, J. F. M.; COSTA, J. A. V.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, p. 1629-1634, 2007.

SMITH, J.; CHARTER, E. **Functional food product development**. John Wiley & Sons, 2011. p. 512.

SOLTES-RAK, E.; MULLIGAN, M. E.; COLEMAN, J. R. Identification and characterization of a gene encoding a vertebrate-type carbonic anhydrase in cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 3, p. 769-774, 1997.

THANGAM, R.; SURESH, V.; ASENATH PRINCY, W.; RAJKUMAR, M.; SENTHILKUMAR, N.; GUNASEKARAN, P.; RENGASAMY, R.; ANBAZHAGAN, C.; KAVERI, K.; KANNAN, S. C-Phycocyanin from *Oscillatoria tenuis* exhibited an antioxidant and in vitro antiproliferative activity through induction of apoptosis and G₀/G₁ cell cycle arrest. **Food Chemistry**, v. 140, n. 1-2, p. 262-272, 2013.

TRABELSI, L.; CHAIEB, O.; MNARI, A.; ABID-ESSAFI, S.; ALEYA, L. Partial characterization and antioxidant and antiproliferative activities of the aqueous extracellular polysaccharides from the thermophilic microalgae *Graesiella* sp. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2016.

VINOBA, M.; BHAGIYALAKSHMI, M.; JEONG, S. K.; YOON, Y., II; NAM, S. C. Immobilization of carbonic anhydrase on spherical SBA-15 for hydration and sequestration of CO₂. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, p. 91-96, 2012.

VINOBA, M.; KIM, D. H.; LIM, K. S.; JEONG, S. K.; LEE, S. W.; ALAGAR, M. Biomimetic sequestration of CO₂ and reformation to CaCO₃ using bovine carbonic anhydrase immobilized on SBA-15. **Energy & Fuels**, v. 25, p. 438-445, 2011.

WILBUR, K. M.; ANDERSON, N. G. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 176, n. 1, p. 147-154, 1948.

XU, A. W.; ANTONIETTI, M.; CÖLFEN, H.; FANG, Y. P. Uniform hexagonal plates of vaterite CaCO₃ mesocrystals formed by biomimetic mineralization. **Advanced Functional Materials**, v. 16, n. 7, p. 903-908, 2006.

YADAV, R. R.; MUDLIAR, S. N.; SHEKH, A. Y.; FULKE, A. B.; DEVI, S. S.; KRISHNAMURTHI, K.; JUWARKAR, A.; CHAKRABARTI, T. Immobilization of carbonic anhydrase in alginate and its influence on transformation of CO₂ to calcite. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 585-590, 2012.

ZARROUK, C. **Contribution a l'etude d'une cianophycee: Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima*** 1966. 83 f. Ph.D. thesis - Faculte des Sciences, Universite de Paris, 1966.

ARTIGO 2

**PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE FICOBILIPROTEÍNAS E ANIDRASE
CARBÔNICA POR *Spirulina platensis* LEB-52**

PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE FICOBILIPROTEÍNAS E ANIDRASE CARBÔNICA POR *Spirulina platensis* LEB-52

RESUMO

A produção simultânea de ficobiliproteínas, C-ficocianina e aloficocianina, e de anidrase carbônica, bem como a correlação entre a atividade de anidrase carbônica expressa em termos de esterase e hidratase, foram avaliadas durante o cultivo de *Spirulina platensis* LEB-52. A cianobactéria produziu simultaneamente as ficobiliproteínas e a enzima ao longo de todo cultivo. A máxima concentração intracelular de C-ficocianina ($137,4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) foi obtida em 21 d, sendo esta estatisticamente constante até 74 d de cultivo. A máxima produção intracelular de aloficocianina ($100,4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) foi obtida em 20 d de cultivo, e esta foi estatisticamente constante até 77 d de cultivo. A maior concentração intracelular de anidrase carbônica expressa em termos de esterase ($46,3 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$) foi obtida no 6º d de cultivo. Estes biocompostos podem ser obtidos simultaneamente em 21 d de cultivo sem perdas na concentração intracelular de ficobiliproteínas, $137,4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de C-ficocianina e $104,4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de aloficocianina, e com atividade de anidrase carbônica expressa em termos de esterase de $26,6 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$. Uma tendência entre a atividade de esterase e hidratase da anidrase carbônica ao longo do cultivo de *S. platensis* LEB-52 foi observada. Neste sentido, é possível utilizar a atividade de esterase – que é uma técnica mais simples e rápida, além disso, não necessita de arrefecimento (em contraste com a reação de hidratase), para monitorar a anidrase carbônica ao longo dos cultivos e processos.

Palavras-chave: C-ficocianina. Aloficocianina. Coprodução. Meio Zarrouk. Hidratase. Esterase.

1 INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Spirulina* são fontes de ficobiliproteínas (MINKOVA et al., 2003), as quais são utilizadas como biocorantes em alimentos e cosméticos (SPOLAORE et al., 2006). Além disso, a *Spirulina* apresenta certificado GRAS (*Generally Recognized as Safe*) concedido pelo FDA (*Food and Drug Administration*), o que permite o seu uso em alimentos. No entanto, pouca atenção tem sido dada ao uso desta microalga como fonte da enzima anidrase carbônica.

Ficobiliproteínas são pigmentos fotossintéticos acessórios que participam de uma cadeia de transferência de energia eficiente durante a fotossíntese (ROMÁN et al., 2002). E são responsáveis por cerca de 50% da captação de luz nas cianobactérias e algas vermelhas (WILLIAMS; GINGRICH; GLAZER, 1980). Os três principais grupos de ficobiliproteínas são as ficocianinas, aloficocianina e ficoeritrinas (BENNETT; BOGORAD, 1973). As principais ficobiliproteínas encontradas na *Spirulina platensis* são C-ficocianina (C-FC) e aloficocianina (AFC) (KUDDUS et al., 2013).

A C-FC tem sido amplamente utilizada em aplicações comerciais na indústria de alimentos e cosméticos como um corante natural azul (SEKAR; CHANDRAMOHAN, 2008). Estudos mostraram que a C-FC apresenta atividade antioxidante contra radicais hidroxil (ESTRADA; BESCÓS; FRESNO, 2001; KUDDUS et al., 2013), radicais peróxidos (BHAT; MADYASTHA, 2000) e radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (GANTAR et al., 2012), e tem sido utilizada como agente antitumoral e anti-inflamatório (REDDY et al., 2003).

A AFC é um complexo pigmento-proteína encontrado no núcleo dos ficobilissomos de *Spirulina*. Esta proteína solúvel em água é amplamente utilizada como uma sonda fluorescente, particularmente para análise de citometria de fluxo (SHAPIRO et al., 1983; YEH et al., 1987). A AFC apresenta propriedades hepatoprotetoras, antioxidantes, antiartríticas e anti-inflamatórias (REDDY et al., 2003; ROMAY et al., 1998).

A anidrase carbônica (AC) é uma metaloenzima que catalisa a interconversão entre o dióxido de carbono (CO_2) e o íon bicarbonato (HCO_3^-) (BOONE et al., 2013). Devido às suas propriedades catalíticas, estas são estudadas em sistemas enzimáticos de captura de CO_2 (SHEKH et al., 2012).

Conforme reportado no Artigo 1, é inviável o acompanhamento da produção da AC expressa em termos de hidratase ao longo do cultivo, uma vez que para a determinação da atividade é necessário alta concentração de biomassa ($23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), porém é possível monitorar a

AC pela atividade de esterase utilizando concentração de biomassa de $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. No entanto, durante o cultivo de *S. platensis* LEB-52 outras esterases sem atividade de hidratase podem ser produzidas, portanto a atividade de esterase não diz respeito unicamente a AC. Dessa forma, é importante saber se existe uma correlação entre estas duas atividades, de esterase e hidratase, ao longo do cultivo.

A composição bioquímica da cianobactéria varia conforme o crescimento celular, portanto é necessário obter as células microalgais no tempo ótimo para garantir a máxima produção dos bioprodutos para comercialização (XIE et al., 2015). O primeiro meio sintético formulado para o cultivo de *Spirulina* foi o meio de Zarrouk (ZARROUK, 1966) que é ainda utilizado como meio padrão. Ores (2014) avaliou a produção de ficobiliproteínas e de AC ao longo do cultivo da microalga *Spirulina platensis* LEB-52 utilizando o meio Zarrouk diluído 20% (v/v) com água destilada, no entanto as ficobiliproteínas começam a ser degradadas no início do cultivo (4° d). Assim, é necessário avaliar se é possível aumentar a concentração intracelular e/ou ainda estender o tempo de produção das ficobiliproteínas utilizando o meio Zarrouk 100% (sem diluições), uma vez que segundo Del Rio-Chanona et al. (2015) a fonte e a concentração de nitrogênio contribuem para o crescimento celular e para o acúmulo de ficocianina.

Com base no exposto, o objetivo deste artigo foi acompanhar a produção da AC, C-FC e AFC, além de correlacionar a atividade da AC expressa em termos de hidratase e esterase durante o cultivo de *Spirulina platensis* LEB-52.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICROALGA E MEIO DE CULTIVO

A cianobactéria *Spirulina platensis* LEB-52, gentilmente cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), foi utilizada para obtenção simultânea dos bioprodutos anidrase carbônica, C-ficocianina e aloficocianina. Para o preparo do inóculo, cultivo e manutenção da microalga foi utilizado o meio Zarrouk composto por ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): NaHCO_3 (16,8); K_2HPO_4 (0,5); NaNO_3 (2,5); K_2SO_4 (1,0); NaCl (1,0); $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2); CaCl_2 (0,04); $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01); EDTA (0,08); 1 mL da solução A5 e 1 mL da solução B6. A solução A5 foi composta por ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): H_3BO_3 (2,86); $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,81); $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,222); $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,079) e $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,018). A solução B6 foi composta por ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): NH_4VO_3 (0,0230);

KCr(SO₄)₂·12H₂O (0,1920); NiSO₄·6H₂O (0,0448); Na₂WO₄·2H₂O (0,0179); TiO₂ (0,040) e Co(NO₃)₂·6H₂O (0,0440) (REINEHR; COSTA, 2006; ZARROUK, 1966).

2.2 CULTIVO DE *Spirulina platensis* LEB-52 PARA PRODUÇÃO DE FICOBILIPROTEÍNAS E ANIDRASE CARBÔNICA

O cultivo no modo descontínuo foi realizado em Erlenmeyer de 2 L (volume útil de 1,8 L), sendo adicionado 20% (v/v) de inóculo com concentração inicial de 0,75 g·L⁻¹. O meio de cultivo utilizado foi o Zarrouk 100% (MZ 100%). As condições de cultivo utilizadas foram conforme propostas por Ores (2014). A cianobactéria foi incubada a 25 °C e a agitação foi realizada por injeção constante de ar estéril (0,5 vvm). A iluminância foi promovida por lâmpadas fluorescente do tipo *daylight* (40,5 μE·m⁻²·s⁻¹) com fotoperíodo fixado em 12 h claro/escuro. Os cultivos foram realizados em triplicata.

Ao longo do cultivo foram retiradas amostras assepticamente para o acompanhamento da concentração de biomassa, pH, anidrase carbônica, C-ficocianina e aloficocianina. A biomassa foi separada por centrifugação (4757 ×g, 30 min, 4 °C) e ressuspendida em tampão tris-HCl (20 mmol·L⁻¹, pH 8,3) com concentração final de 0,2 g·L⁻¹. A suspensão celular (8 mL) foi submetida ao tratamento ultrassônico (sonda ultrassônica) utilizando um homogeneizador Sonic Ruptor 250 (Omni International Inc., Estados Unidos da América) com frequência de 20 kHz (potência de 60 W). Durante o tratamento ultrassônico, a amostra foi mantida a 4 °C, e o tempo de ruptura celular foi 12 min (conforme determinado no Artigo 1). Após o rompimento celular, as suspensões foram centrifugadas (4757 ×g, 20 min, 4 °C) e o sobrenadante utilizado para determinação da atividade enzimática (em termos de esterase), concentração de C-ficocianina e aloficocianina.

2.2.1 Determinação dos parâmetros de crescimento

A partir dos valores de concentração de biomassa, foram determinados: concentração de biomassa máxima ($X_{m\acute{a}x}$, g·L⁻¹), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$, d⁻¹) e produtividade de biomassa (P_x , g·L⁻¹·d⁻¹). A velocidade específica máxima de crescimento foi calculada pela regressão exponencial da porção logarítmica da curva de crescimento (BAILEY; OLLIS, 1986). A produtividade de biomassa foi calculada através da Equação 1, segundo Schmidell et al. (2001).

$$P = \frac{(X_t - X_0)}{t_t - t_0} \quad (1)$$

Onde X_0 é a concentração de biomassa inicial ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) no tempo t_0 (d) e X_t é a concentração de biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) no tempo t_t (d). As produtividades em termos de anidrase carbônica (P_{AC} , $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), C-ficocianina (P_{CFC} , $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) e aloficocianina (P_{ALF} , $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) também foram calculadas.

2.3 CORRELAÇÃO ENTRE AS ATIVIDADES DE ESTERASE E HIDRATASE DE ANIDRASE CARBÔNICA

Ao longo do cultivo de *Spirulina platensis* LEB-52 no meio Zarrouk 100% foram retiradas amostras em 24, 28, 49, 54, 61 e 67 d para avaliar a correlação entre as atividades de hidratase e esterase de AC. A biomassa foi recuperada por centrifugação ($4757 \times g$, 30 min, 4°C) e ressuspensa em tampão tris-HCl ($20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e pH 8,3) com concentração final de $23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A suspensão celular (8 mL) foi submetida ao tratamento ultrassônico utilizando o homogeneizador Sonic Ruptor 250 (Omni International Inc., Estados Unidos da América) com frequência de 20 kHz (potência de 60 W) por 8 min (conforme determinado no Artigo 1). Durante o tratamento ultrassônico, a amostra foi mantida a 4°C . Após o rompimento celular, a suspensão foi centrifugada ($4757 \times g$, 20 min, 4°C) e o sobrenadante utilizado para determinação da atividade enzimática em termos de esterase e hidratase. Os cultivos foram realizados em triplicata.

2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.4.1 Concentração de ficobiliproteínas

As concentrações de C-ficocianina (C-FC, Equação 2) e aloficocianina (AFC, Equação 3) foram calculadas como descrito por Bennett e Bogorad (1973) com modificações no comprimento de onda. A leitura da absorvância a 620 e 652 nm foi realizada em espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu UV-1800, Japan).

$$C - FC = \frac{(A_{620} - 0,474 \cdot A_{652})}{5,34} \quad (2)$$

$$\text{AFC} = \frac{(A_{652} - 0,208 \cdot A_{620})}{5,09} \quad (3)$$

2.4.2 Atividade enzimática de anidrase carbônica

A atividade enzimática de anidrase carbônica foi monitorada através das reações: atividade de hidratase e/ou atividade de esterase. A reação de esterase foi realizada segundo metodologia de Pocker e Stone (1967), onde a mistura reacional consistiu em 1,8 mL de tampão tris-SO₄ (50 mmol·L⁻¹ e pH 7,4), 0,2 mL de solução enzimática e 1 mL de solução 3 mmol·L⁻¹ de *p*-nitrofenil acetato (*p*-NPA). Após a adição do substrato, foi registrado o aumento da absorvância a 400 nm ($\epsilon_{p\text{-nitrofenol}} = 11,43 \text{ mL}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\mu\text{mol}^{-1}$) a cada 30 s por 4 min à temperatura ambiente em espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu UV-1800, Japan). Uma medida de referência foi obtida, conforme descrito anteriormente, com exceção da adição da solução enzimática onde esta foi substituída por água. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto, sob as condições do ensaio. A absorvidade molar do *p*-nitrofenol ($\epsilon_{p\text{-nitrofenol}}$) em tampão tris-SO₄ (50 mmol·L⁻¹ e pH 7,4) foi determinada através de regressão linear que relaciona a absorvância a 400 nm e a concentração de *p*-nitrofenol (Apêndice 1).

A reação de hidratase (hidratação do CO₂) foi realizada segundo metodologia eletrométrica descrita por Wilbur e Anderson (1948), onde a mistura reacional consistiu em 6 mL de tampão tris-HCl (20 mmol·L⁻¹ e pH 8,3), 0,4 mL de enzima e 4 mL de água deionizada contendo CO₂. A reação enzimática foi mantida a 4 °C. A solução de água deionizada contendo CO₂ foi obtida através do borbulhamento do CO_{2(g)} em 200 mL de água deionizada a 4 °C por 40 min. Uma unidade de atividade enzimática Wilbur-Anderson (U) é definida como $\left(\frac{t_0}{t} - 1\right)$, onde t_0 e t são os tempos para que ocorra a mudança do pH de 8,0 para 7,0 na ausência (t_0) e na presença da enzima (t), nas condições do ensaio.

2.4.3 Concentração de biomassa e determinação do pH

A concentração de biomassa foi determinada por leitura da densidade óptica a 670 nm (COSTA et al., 2002) e conversão para biomassa seca através de curva padrão previamente preparada (Apêndice 2). Para construção da curva padrão, as células foram coletadas por centrifugação (4757 ×g, 30 min, 4 °C), lavadas com água destilada e

ressuspendidas com água destilada para leitura da absorvância. Para determinação da biomassa seca as células lavadas com água destilada foram secas a 105 °C até massa constante.

A determinação do pH foi realizada através da leitura da amostra em um medidor pontenciométrico Hanna pH 21 (Hanna Instruments, The United States of America).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PRODUÇÃO DE FICOBILIPROTEÍNAS E ANIDRASE CARBÔNICA POR *Spirulina platensis* LEB-52 UTILIZANDO MEIO ZARROUK 100%

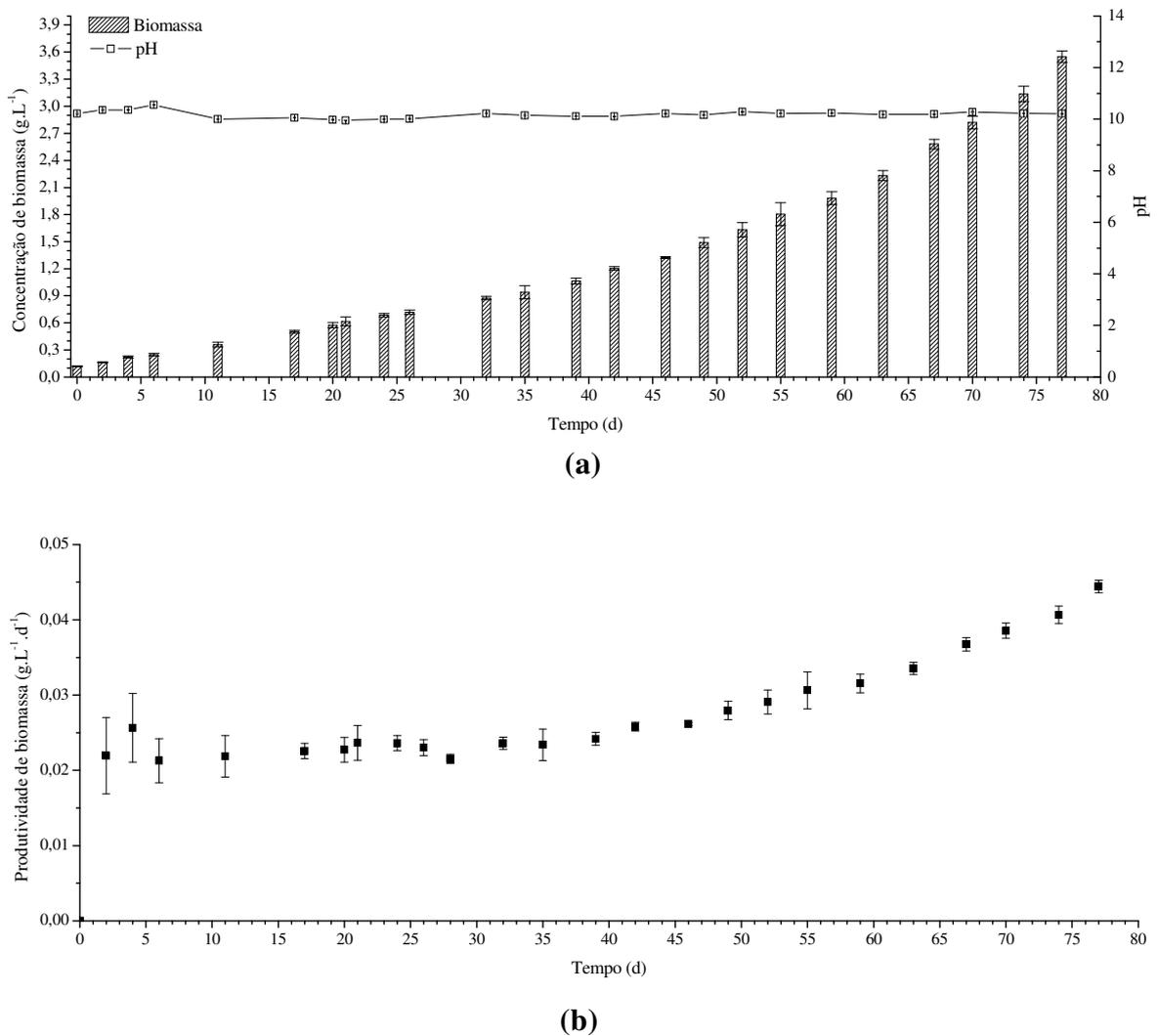
Ores (2014) acompanhou a produção das ficobiliproteínas, anidrase carbônica e biomassa ao longo do cultivo de *Spirulina platensis* LEB-52 utilizando meio Zarrouk diluído 20% (v/v) com água destilada (MZ 20%); no entanto, a concentração intracelular de ficobiliproteínas diminuiu gradualmente após o 4º d de cultivo. Desta forma, optou-se por trabalhar com o meio Zarrouk 100% (MZ 100%), uma vez que este apresenta maior concentração de nutrientes, incluindo a fonte de nitrogênio – nitrato de sódio (NaNO₃). Maior concentração de nitrogênio no meio de cultivo pode favorecer a produção intracelular de ficobiliproteínas, em especial a C-ficocianina. Assim, foi realizado o acompanhamento em termos de pH, biomassa, C-ficocianina, aloficocianina e anidrase carbônica ao longo do cultivo de *S. platensis* LEB-52 com MZ 100%.

A Figura 1 apresenta o acompanhamento da concentração de biomassa, pH e produtividade de biomassa ao longo do cultivo da cianobactéria *Spirulina platensis* LEB-52. A concentração máxima de biomassa (X_{\max}) foi $3,55 \pm 0,06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ em 77 d de cultivo (Figura 1a). A velocidade específica máxima (μ_{\max}) foi de $0,124 \pm 0,015 \text{ d}^{-1}$. Valores de μ_{\max} para *S. platensis* LEB-52 estão na ordem de 0,034 a 0,111 d^{-1} quando cultivado em MZ 100% (REICHERT; REINEHR; COSTA, 2006; REINEHR; COSTA, 2006; SALLA et al., 2016).

Comparando o perfil de produção de biomassa obtido no presente estudo com o estudo de Ores (2014) o qual cultivou *S. platensis* LEB-52 em MZ 20%, é possível verificar que a maior concentração de nutrientes no MZ 100% promoveu o crescimento da microalga por um período de tempo maior, uma vez que quando cultivada com MZ 20%, ocorreu a inibição do crescimento celular após 33 d de cultivo. Entretanto, o crescimento celular é mais acelerado no MZ 20% do que no MZ 100%. As concentrações iniciais de NaHCO₃ no MZ 100% e 20% foram de 16,80 e 3,36 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Quando as células são expostas a

altas concentrações de NaHCO_3 , a fotossíntese pode ser inibida devido à rápida entrada de sódio na célula (ANDRADE; CAMERINI; COSTA, 2008), o que justifica a desaceleração do crescimento celular nos tempos iniciais quando utilizado o MZ 100%. Além disso, com a utilização do MZ 100% foi possível obter altas concentrações de biomassa por um período de tempo maior sem inibição do crescimento, embora a concentração celular nos tempos iniciais seja inferior quando comparada com o MZ 20%. Andrade e Costa (2008b) observaram que *S. platensis* LEB-52 quando cultivada com MZ diluído a 10% alcançaram a fase de declínio celular antes do MZ 20%.

Figura 1 – Acompanhamento do cultivo da microalga *Spirulina platensis* LEB-52
(a) concentração de biomassa e pH, e (b) produtividade de biomassa.



Durante o cultivo da cianobactéria, o pH do meio se manteve alcalino (9,9 a 10,5). No MZ, a principal fonte de carbono é o bicarbonato de sódio (NaHCO_3), o qual ajuda a manter as condições alcalinas e promover o crescimento da cianobactéria *Spirulina*.

O perfil de produtividade de biomassa (Figura 1b) é praticamente constante até 46 d de cultivo, aumentando gradualmente até 77 d. A máxima produtividade de biomassa foi de $0,044 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ em 77 d. A máxima produtividade de biomassa utilizando MZ 20% foi de $0,060 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ em 4 d (ORES, 2014). A diluição do MZ para 20% promoveu um incremento de cerca de 36% na produtividade de *S. platensis* LEB-52. Na literatura pode ser verificado que a produtividade aumenta com a diluição do MZ, por exemplo, valores na ordem de $0,0226 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ para MZ 100% (REICHERT; REINEHR; COSTA, 2006); e $0,045 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (ANDRADE; COSTA, 2008a) e $0,059 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (ANDRADE; COSTA, 2008b) para o MZ 20% foram obtidos para *S. platensis* LEB-52.

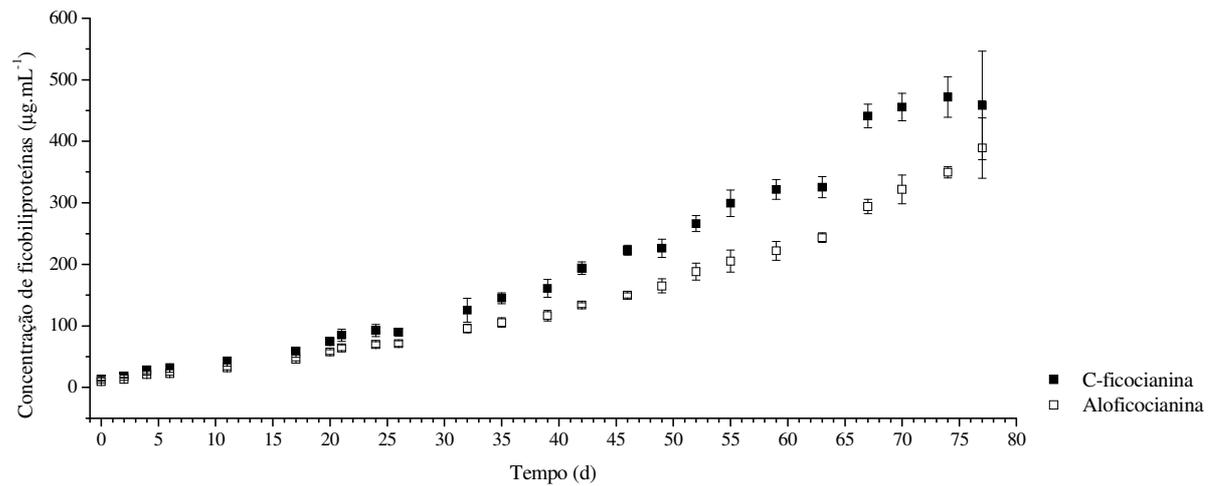
Embora a produtividade de biomassa tenha sido maior com o MZ 20%, a sua utilização é um fator limitante para alcançar concentrações de biomassa mais elevadas. Cabe ressaltar que durante este trabalho, foi observado que o uso do MZ 20% para *S. platensis* LEB-52 é mais suscetível à contaminação por outros micro-organismos. Este fato não foi observado quando utilizado o MZ 100%, principalmente durante a manutenção da cepa.

A Figura 2 apresenta o perfil de produção volumétrica e específica das ficobiliproteínas (C-ficocianina e aloficocianina) ao longo do cultivo de *S. platensis* LEB-52 com MZ 100%. As concentrações volumétricas ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Figura 2a) de C-FC e de AFC variaram de $13,0 - 471,9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $9,6 - 389,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. A diluição do MZ afeta a concentração das ficobiliproteínas. Durante o cultivo com o MZ 20%, no estudo de Ores (2014), as concentrações de C-FC e AFC variaram de $26,1 - 90,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e $13,3 - 47,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente; além disso, o perfil de produção das ficobiliproteínas no MZ 20% é diferente, a concentração volumétrica de C-FC aumentou até o 12º d de cultivo, e após diminuiu até ao final do cultivo (33 d); e a concentração de AFC aumentou até 12º d e após permaneceu praticamente constante.

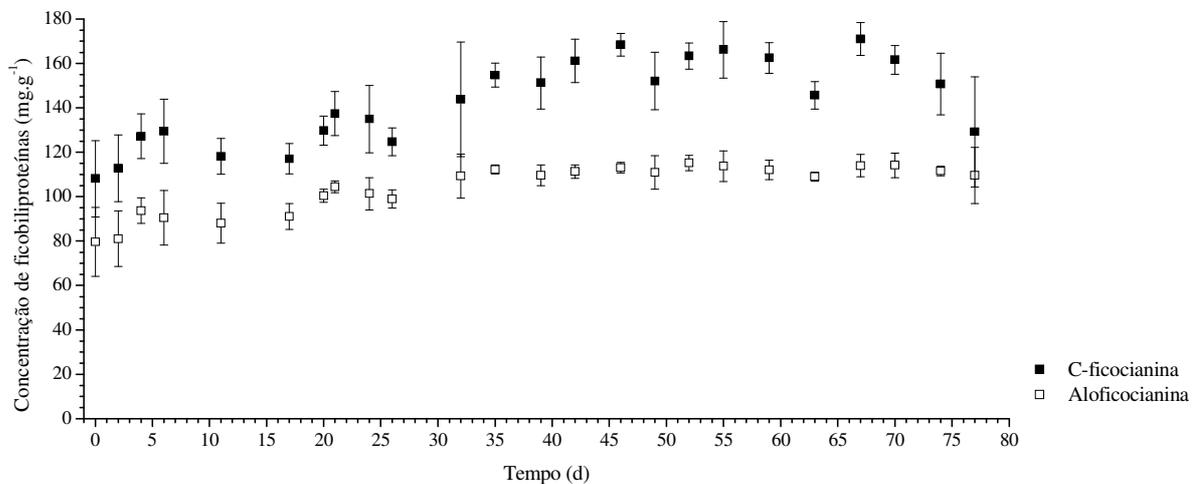
O Apêndice 4 apresenta a análise estatística da produção intracelular de ficobiliproteínas e da enzima anidrase carbônica. A produção intracelular de C-FC (Figura 2b) foi máxima em 21 d, sendo esta de $137,4 \pm 9,9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, e foi estatisticamente constante até 74 d de cultivo, variando neste período de $134,9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ a $170,9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Em 77 d, a concentração de C-FC diminuiu para $129,1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. A produção intracelular de AFC ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) foi máxima em 20 d de cultivo, sendo esta de $100,4 \pm 2,9$, e foi estatisticamente constante até 77 d de cultivo, variando neste período de $99,0 - 115,1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Na organização do ficobilissomo, a C-

FC é mais exposta (hastes periféricas) enquanto que a AFC está numa posição mais protegida (complexo central), devido a isso, ocorre primeiramente a degradação da C-FC (BAIER et al., 2014).

Figura 2 – (a) Concentração volumétrica ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e (b) concentração específica ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ biomassa) de ficobiliproteínas ao longo do cultivo de *Spirulina platensis* LEB-52.



(a)



(b)

Durante o cultivo de *S. platensis* LEB-52 em MZ 20% (ORES, 2014), as maiores concentrações intracelulares de ficobiliproteínas ocorreram no período do 1º ao 4º d de cultivo, sendo estas na ordem de 119,4 – 131,8 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para a C-FC e 55,0 – 62,6 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ para a AFC. Após o 4º d de cultivo, a concentração de ficobiliproteínas diminuiu gradualmente.

No meio Zarrouk, o nitrogênio está presente na forma de nitrato de sódio (NaNO_3) e é essencial para o crescimento de *Spirulina* (RAOOF; KAUSHIK; PRASANNA, 2006). A concentração de NaNO_3 é de 0,5 e 2,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ no MZ 20% e MZ 100%, respectivamente. A

produção intracelular de C-FC e AFC ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) por *S. platensis* LEB-52 utilizando o MZ 100% foi em média cerca de 20% e 80%, respectivamente, superior à obtida no meio ZM 20% por Ores (2014); assim a maior concentração de nutrientes no meio ZM 100% favorece a produção de ficobiliproteínas, obtendo-se maiores concentrações volumétricas e intracelulares. Além disso, a produção intracelular de ficobiliproteínas utilizando o MZ 100% se mantém por um período de tempo maior quando comparado ao MZ 20%. Com base na produção intracelular de ficobiliproteínas as células de *S. platensis* LEB-52 podem ser coletadas em 21 d quando se deseja obter C-ficocianina e em 20 d quando se deseja obter aloficocianina e para a obtenção de ambas ficobiliproteínas o cultivo pode ser interrompido em 21 d.

As ficobiliproteínas são uma das proteínas mais abundantes em muitas cianobactérias e algas, no entanto estas não são essenciais para o funcionamento das células (ERIKSEN, 2008). A produção de ficobiliproteínas está associada à concentração de nitrogênio presente no meio de cultivo (CHEN et al., 2013; XIE et al., 2015). As ficobiliproteínas são seletivamente degradadas quando as células são expostas à depleção de nitrogênio. A depleção de nitrogênio no meio de cultivo causa uma redução no conteúdo de proteína celular, juntamente com um aumento de compostos ricos em energia, como lipídios e carboidratos (HO; CHEN; CHANG, 2012). Assim, as ficobiliproteínas têm um papel secundário como compostos de armazenamento de nitrogênio intracelular, e as cianobactérias para manter as suas funções metabólicas podem utilizá-las como fonte de nitrogênio quando este composto é escasso no meio de cultivo (ERIKSEN, 2008).

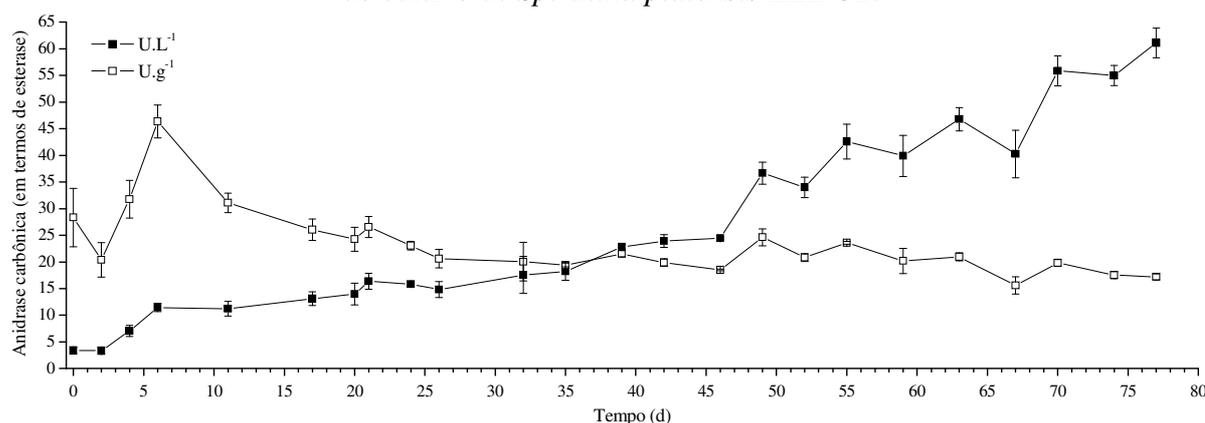
Na literatura, estudos sobre a produção de ficobiliproteínas, C-FC e AFC, ao longo do cultivo são reportados (CHEN et al., 2013; LEEMA et al., 2010; SALEH; DHAR; SINGH, 2011; XIE et al., 2015). Chen et al. (2013) avaliaram a produção de C-FC de *Spirulina platensis* durante 10 d, após estabelecer as melhores condições de crescimento, a concentração de C-FC foi de $126 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. A produção de C-FC por *Arthrospira platensis* cultivada com MZ 100% foi avaliada por Xie et al. (2015) durante 16 d, e a concentração máxima de C-FC foi de $10,3 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ em 7,5 d. Leema et al. (2010) avaliaram a produção de C-FC de *Arthrospira platensis* com MZ 100%, os melhores resultados foram obtidos no 25º d de cultivo com $48,4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de C-FC. A produção de ficobiliproteínas de diferentes cepas de *Spirulina* foi avaliada por Saleh, Dhar e Singh (2011) durante 25 d, as maiores concentrações de ficobiliproteínas foram obtidas para *Spirulina platensis* mutante, $82,9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de C-FC no 15º d de cultivo e $62,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AFC no 25º d de cultivo. No presente estudo, a *S. platensis*

LEB-52 cultivada com MZ 100% pode produzir um conteúdo intracelular de C-FC mais elevado ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) quando comparado com os estudos acima mencionados.

Além de obter as ficobiliproteínas a partir das cianobactérias, a anidrase carbônica, uma enzima que catalisa a reação de hidratação de CO_2 , pode ser obtida simultaneamente. Verificou-se a presença da enzima AC ao longo de todo cultivo e sua atividade volumétrica variou de 3,3 a $61,1 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$. O perfil da atividade volumétrica da AC (Figura 3) aumentou ao longo do cultivo. A atividade específica de AC ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$) é a relação entre sua atividade volumétrica ($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$) e a concentração de biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). A maior atividade específica de AC ($46,3 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$) foi obtida no 6º d de cultivo, porém, a concentração de biomassa neste período foi baixa ($0,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

A concentração de bicarbonato de sódio é alta no início do cultivo, e a cianobactéria *S. platensis* utilizada o íon bicarbonato como fonte primária de carbono, o qual entra na célula por transporte ativo, e este é então desidratado nos carboxissomos pela anidrase carbônica a CO_2 , o qual é incorporado no Ciclo de Calvin (COGNE; GROS; DUSSAP, 2003). A maior atividade específica de AC ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$) foi obtida nos tempos iniciais de cultivo, provavelmente devido à elevada concentração inicial do íon bicarbonato, proveniente do MZ 100%.

Figura 3 – Perfil de produção de anidrase carbônica expressa em termos de esterase ao longo do cultivo de *Spirulina platensis* LEB-52.



Com MZ 20%, a atividade volumétrica de AC variou de 4,2 a $41,6 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$, enquanto que as maiores atividades específicas de AC foram obtidas no 6º ($25,2 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$), 12º ($24,8 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$) e 33º ($28,2 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$) d de cultivo; sendo que no 33º d ocorreu inibição do crescimento celular (ORES, 2014).

As células de cianobactérias consomem carbono inorgânico sob a forma de CO_2 e HCO_3^- (PRICE, 2011; PRICE et al., 2008). Uma vez que a molécula de CO_2 não é carregada e

é lipossolúvel, pode penetrar na membrana celular por difusão passiva e escapar facilmente da célula. Para prevenir a fuga do CO₂, as células de cianobactérias desenvolveram sistemas de captura de CO₂ (NDH-13/4 e a enzima AC presente no espaço periplasmático), que convertem o CO₂ na molécula de bicarbonato carregada, a qual é insolúvel em lipídios (KUPRIYANOVA; SAMYLINA, 2015). Nas cianobactérias, as isoenzimas de AC podem ser encontradas nos carboxissomos e no espaço periplasmático. A AC nos carboxissomos converte o HCO₃⁻ acumulado em CO₂, proporcionando o substrato para a enzima fotossintética ribulose-d-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCo). O CO₂ é utilizado pela RuBisCo para iniciar a primeira reação no ciclo de Calvin, a carboxilação do bisfosfato de ribulose, enquanto que a AC no espaço periplasmático converte o CO₂ em HCO₃⁻ (KUPRIYANOVA et al., 2011; MORONEY; BARTLETT; SAMUELSSON, 2001).

O único trabalho encontrado na literatura sobre a produção de AC por cianobactérias – *Spirulina* sp. LEB-18 e *Synechococcus nidulans*, é o publicado pelo presente grupo de pesquisa (ORES; AMARANTE; KALIL, 2016). Mas vários estudos avaliaram o perfil da produção de AC por outras microalgas – *Scenedesmus obliquus* (BASU et al., 2014), *Dunaliella salina* (LI et al., 2012), *Tetraselmis gracilis* (RIGOBELLO-MASINI; AIDAR; MASINI, 2003; RIGOBELLO-MASINI; MASINI; AIDAR, 2006), *Desmodesmus* sp., *Kirchneriella* sp. e *Acutodesmus* sp. (SWARNALATHA et al., 2015).

Alguns estudos relatam que a atividade de AC é induzida por baixas concentrações de CO₂ dissolvido (AIZAWA; MIYACHI, 1986; SWARNALATHA et al., 2015). A produção de AC por *Desmodesmus* sp., *Kirchneriella* sp. e *Acutodesmus* sp. em meio rico em CO₂ (10, 20 e 30%) foi avaliada por Swarnalatha et al. (2015) durante 3 d de cultivo. No meio controle (ar atmosférico, concentração de CO₂ de 0,033%) a atividade de AC permaneceu constante durante os três dias de cultivo, no entanto a atividade de AC diminuiu com o aumento da concentração de CO₂. No presente trabalho, *S. platensis* LEB-52 foi cultivada em ar atmosférico, contendo baixas concentrações de CO₂ (0,033%, v/v), mantendo a produção de AC durante o período de cultivo.

Rigobello-Masini, Masini e Aidar (2006) avaliaram a atividade de AC extracelular no cultivo de *Tetraselmis gracilis* por 10 d. A atividade de AC aumentou quando a concentração inorgânica de carbono diminuiu ao longo do cultivo. Os autores também mostraram que o aumento da atividade foi acompanhado por uma diminuição na concentração de NO₃⁻ no meio durante o período de cultivo. Assim, a presença deste composto no meio influenciou a produção de AC pela microalga *Tetraselmis gracilis*.

Com base na atividade volumétrica e específica da AC produzida por *S. platensis* LEB-52 utilizando MZ 100%, as células podem ser obtidas no 6º d, embora a concentração de biomassa seja de $0,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

A produção máxima destes bioprodutos não ocorreu concomitantemente. Desta forma, foi considerado que dentre os três bioprodutos, a C-ficocianina é a que apresenta maior valor agregado. Assim, para a produção simultânea de ficobiliproteínas e AC por *Spirulina platensis* LEB-52 utilizando MZ 100%, as células podem ser coletadas no 21º d de cultivo sem perdas no rendimento intracelular de C-FC e AFC. A Tabela 1 apresenta os dados detalhados sobre a produção simultânea utilizando o MZ 100% no 21º d de cultivo.

Tabela 1– Produção simultânea de C-ficocianina, aloficocianina e anidrase carbônica por *Spirulina platensis* LEB-52 utilizando MZ 100% no 21º d de cultivo.

Bioproduto	Concentração	Produtividades
C-ficocianina	$84,8 \pm 10,0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ $137,4 \pm 9,9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$	$3,420 \pm 0,369 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$
Aloficocianina	$64,3 \pm 4,7 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ $104,4 \pm 2,6 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$	$2,609 \pm 0,140 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$
Anidrase carbônica	$16,4 \pm 1,5 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ $26,6 \pm 1,9 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$	$0,618 \pm 0,093 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$
Biomassa	$0,62 \pm 0,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$	$0,024 \pm 0,002 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$

3.2 CORRELAÇÃO ENTRE AS ATIVIDADES DE ESTERASE E HIDRATASE DE ANIDRASE CARBÔNICA AO LONGO DO CULTIVO DE *Spirulina platensis* LEB-52

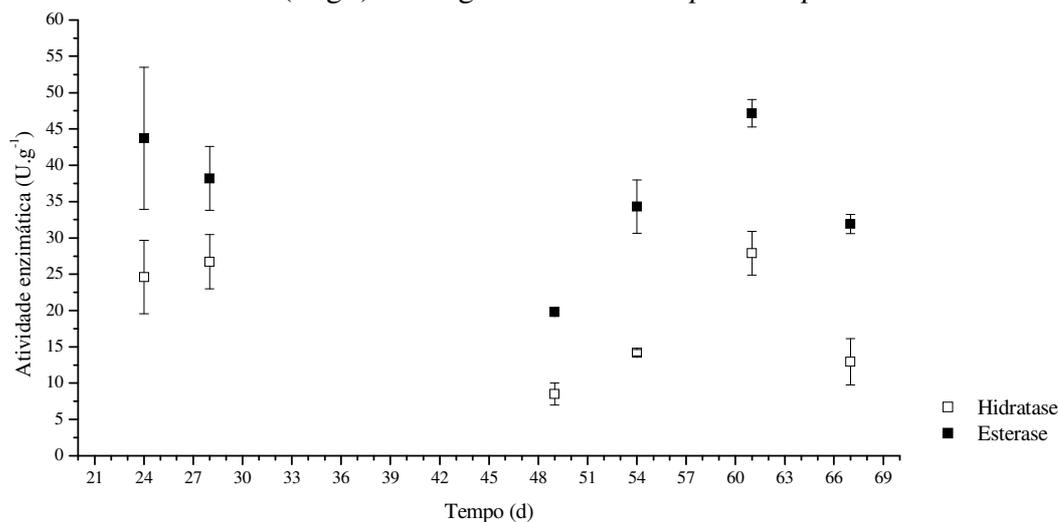
A atividade enzimática da AC pode ser monitorada por duas reações diferentes: hidratase e esterase. Na reação de hidratase, a AC catalisa a hidratação reversível entre CO_2 e a água (H_2O), produzindo íons bicarbonato (HCO_3^-) e H^+ . Este método tem como base a medida da alteração do pH em função do tempo, uma vez que a produção de prótons leva a uma alteração no pH da reação, até atingir o equilíbrio. Essas medidas são geralmente realizadas em temperaturas entre $0 - 5 \text{ }^\circ\text{C}$ para retardar a reação catalisada enzimaticamente, uma vez que esta é muito rápida, e as taxas iniciais são difíceis de medir (BOND et al., 2001).

A reação de esterase tem sido utilizada para monitorar a atividade enzimática da AC em adição a reação de hidratase. Esta reação é baseada na hidrólise enzimática mediada pelo *p*-nitrofenil acetato (POCKER; STONE, 1967). A razão pela qual este ensaio é

frequentemente utilizado nos estudos de AC é que o mesmo sítio ativo, que é responsável pela aceleração da hidratação do CO_2 , também acelera a reação de hidrólise, que origina um produto amarelo (*p*-nitrofenol) que absorve a 400 nm e pode ser determinado por espectrofotômetro (BOND et al., 2001).

Durante o cultivo de *S. platensis* LEB-52 outras esterases sem atividade de hidratase podem ser produzidas. Portanto, a atividade de esterase não reflete unicamente na presença de anidrase carbônica. Até o presente momento não se tem conhecimento de trabalhos que reportem essa correlação ao longo do cultivo de microalgas, incluindo as cianobactérias. Por esta razões, ambas atividades (hidratase e esterase) de AC ao longo do cultivo de *S. platensis* LEB-52 foram analisadas, e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4.

Figura 4 – Relação entre a atividade enzimática de anidrase carbônica expressa em termos de hidratase e esterase ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$) ao longo do cultivo de *Spirulina platensis* LEB-52.



Ambas atividades (hidratase e esterase) foram determinadas com concentração de biomassa de $23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 4), e foi verificado que há uma correlação entre as atividades. A atividade de esterase ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$) é em média $2,01 \pm 0,44$ vezes maior do que a atividade de hidratase ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$). Dessa forma, percebe-se que a atividade de AC pode ser avaliada e expressa em termos de esterase, que é uma técnica mais simples e rápida, além disso, não necessita de arrefecimento (em contraste com a reação de hidratase). Essa correlação é muito importante, uma vez que quando desejamos monitorar a produção de AC durante o cultivo pode-se utilizar baixas concentrações de biomassa ($0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e medir a atividade expressa em termos de esterase. O uso de altas concentrações de biomassa (como $23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) é inviável para acompanhamentos de cultivo.

4 CONCLUSÃO

Com a utilização do meio Zarrouk 100% (sem diluição) foi possível aumentar em média a produção intracelular ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) de C-ficocianina e de aloficocianina em cerca de 20% e 80%, respectivamente, quando comparado ao meio Zarrouk 20% (diluído com água destilada) (ORES, 2014). A máxima produção intracelular de C-ficocianina por *Spirulina platensis* LEB-52 utilizando o meio Zarrouk 100% foi de $137,4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ em 21 d de cultivo, permanecendo estatisticamente constante até 74 d de cultivo; e de aloficocianina foi de $100,4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ em 20 d de cultivo, permanecendo constante até 77 d de cultivo. A máxima produção intracelular de anidrase carbônica ($46,3 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$) foi obtida no 6º d de cultivo. A produção máxima destes biocompostos não ocorreu concomitantemente, assim estes podem ser obtidos simultaneamente em 21 d de cultivo, com concentrações de $137,4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de C-ficocianina, $104,4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de aloficocianina e $26,6 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$ de anidrase carbônica. Somando-se a isso, uma correlação entre a atividade de esterase e hidratase da anidrase carbônica ao longo do cultivo de *S. platensis* LEB-52 foi observada. Assim, pode-se utilizar a atividade de esterase, ao longo dos cultivos e processos, que é uma técnica mais simples e rápida e não necessita de arrefecimento (em contraste com a reação de hidratase) para monitorar a anidrase carbônica.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIZAWA, K.; MIYACHI, S. Carbonic-anhydrase and CO_2 concentrating mechanisms in microalgae and cyanobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 39, n. 3, p. 215-233, 1986.
- ANDRADE, M. D.; COSTA, J. A. V. Culture of microalga *Spirulina platensis* in alternative sources of nutrients. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 32, n. 5, p. 1551-1556, 2008a.
- ANDRADE, M. D. R.; CAMERINI, F. V.; COSTA, J. A. V. Perda química de carbono e cinética do crescimento celular em cultivos de *Spirulina*. **Química Nova**, v. 31, p. 2031-2034, 2008.
- ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. Outdoor and indoor cultivation of *Spirulina platensis* in the extreme south of Brazil. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 63, n. 1-2, p. 85-90, 2008b.
- BAIER, A.; WINKLER, W.; KORTE, T.; LOCKAU, W.; KARRADT, A. Degradation of phycobilisomes in *Synechocystis* sp. PCC6803. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 17, p. 11755-11766, 2014.

- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. New York: McGraw-Hill, 1986. p.
- BASU, S.; ROY, A. S.; MOHANTY, K.; GHOSHAL, A. K. CO₂ biofixation and carbonic anhydrase activity in *Scenedesmus obliquus* SA1 cultivated in large scale open system. **Bioresource Technology**, v. 164, p. 323-330, 2014.
- BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **The Journal of Cell Biology**, v. 58, n. 2, p. 419-435, 1973.
- BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. C-phycoerythrin: a potent peroxy radical scavenger *in vivo* and *in vitro*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 275, n. 1, p. 20-25, 2000.
- BOND, G. M.; STRINGER, J.; BRANDVOLD, D. K.; SIMSEK, F. A.; MEDINA, M.-G.; EGELAND, G. Development of integrated system for biomimetic CO₂ sequestration using the enzyme carbonic anhydrase. **Energy & Fuels**, v. 15, n. 2, p. 309-316, 2001.
- BOONE, C. D.; GILL, S.; HABIBZADEGAN, A.; MCKENNA, R. Carbonic anhydrase: an efficient enzyme with possible global implications. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2013, p. 1-6, 2013.
- CHEN, C.-Y.; KAO, P.-C.; TSAI, C.-J.; LEE, D.-J.; CHANG, J.-S. Engineering strategies for simultaneous enhancement of C-phycoerythrin production and CO₂ fixation with *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 307-312, 2013.
- COGNE, G.; GROS, J. B.; DUSSAP, C. G. Identification of a metabolic network structure representative of *Arthrospira (Spirulina) platensis* metabolism. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 84, n. 6, p. 667-676, 2003.
- COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; FILHO, P. D.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 603-607, 2002.
- DEL RIO-CHANONA, E. A.; ZHANG, D.; XIE, Y.; MANIRAFASHA, E.; JING, K. Dynamic simulation and optimization for *Arthrospira platensis* growth and c-phycoerythrin production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 54, n. 43, p. 10606-10614, 2015.
- ERIKSEN, N. T. Production of phycoerythrin - a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 1, p. 1-14, 2008.
- ESTRADA, J. E. P.; BESCÓS, P. B.; FRESNO, A. M. V. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **II Farmaco**, v. 56, n. 5-7, p. 497-500, 2001.
- GANTAR, M.; SIMOVIĆ, D.; DJILAS, S.; GONZALEZ, W. W.; MIKSOVSKA, J. Isolation, characterization and antioxidative activity of C-phycoerythrin from *Limnithrix* sp. strain 37-2-1. **Journal of Biotechnology**, v. 159, n. 1-2, p. 21-26, 2012.

HO, S. H.; CHEN, C. Y.; CHANG, J. S. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Bioresource Technology**, v. 113, p. 244-252, 2012.

KUDDUS, M.; SINGH, P.; THOMAS, G.; AL-HAZIMI, A. Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycoyanin. **Biomed Research International**, v. -, p. 1-9, 2013.

KUPRIYANOVA, E. V.; SAMYLINA, O. S. CO₂-concentrating mechanism and its traits in haloalkaliphilic cyanobacteria. **Microbiology**, v. 84, n. 2, p. 112-124, 2015.

KUPRIYANOVA, E. V.; SINETOVA, M. A.; MARKELOVA, A. G.; ALLAKHVERDIEV, S. I.; LOS, D. A.; PRONINA, N. A. Extracellular β -class carbonic anhydrase of the alkaliphilic cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 103, n. 1, p. 78-86, 2011.

LEEMA, J. T. M.; KIRUBAGARAN, R.; VINITHKUMAR, N. V.; DHEENAN, P. S.; KARTHIKAYULU, S. High value pigment production from *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultured in seawater. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 23, p. 9221-9227, 2010.

LI, L.; FU, M.-L.; ZHAO, Y.-H.; ZHU, Y.-T. Characterization of carbonic anhydrase II from *Chlorella vulgaris* in bio-CO₂ capture. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 9, p. 4227-4232, 2012.

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

MORONEY, J. V.; BARTLETT, S. G.; SAMUELSSON, G. Carbonic anhydrases in plants and algae. **Plant Cell and Environment**, v. 24, n. 2, p. 141-153, 2001.

ORES, J. C. **Produção e extração da enzima anidrase carbônica e de ficobiliproteínas a partir de microalgas**. 2014. 135 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

ORES, J. C.; AMARANTE, M. C. A.; KALIL, S. J. Co-production of carbonic anhydrase and phycobiliproteins by *Spirulina* sp. and *Synechococcus nidulans*. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 219-227, 2016.

POCKER, Y.; STONE, J. The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase. III. Kinetic studies of the enzyme-catalyzed hydrolysis of p-nitrophenyl acetate. **Biochemistry**, v. 6, n. 3, p. 668-678, 1967.

PRICE, G. D. Inorganic carbon transporters of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. **Photosynthesis Research**, v. 109, n. 1-3, p. 47-57, 2011.

PRICE, G. D.; BADGER, M. R.; WOODGER, F. J.; LONG, B. M. Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 7, p. 1441-1461, 2008.

RAOOF, B.; KAUSHIK, B. D.; PRASANNA, R. Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. **Biomass & Bioenergy**, v. 30, n. 6, p. 537-542, 2006.

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

REICHERT, C. C.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 1, p. 23-28, 2006.

REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Repeated batch cultivation of the microalga *Spirulina platensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 937-943, 2006.

RIGOBELLO-MASINI, M.; AIDAR, E.; MASINI, J. C. Extra and intracellular activities of carbonic anhydrase of the marine microalga *Tetraselmis gracilis* (Chlorophyta). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 267-272, 2003.

RIGOBELLO-MASINI, M.; MASINI, J. C.; AIDAR, E. The profiles of nitrate reductase and carbonic anhydrase activity in batch cultivation of the marine microalgae *Tetraselmis gracilis* growing under different aeration conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 57, n. 1, p. 18-25, 2006.

ROMÁN, R. B.; ALVAREZ-PEZ, J. M.; FERNANDEZ, F. G. A.; GRIMA, E. M. Recovery of pure β -phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. **Journal of Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 73-85, 2002.

ROMAY, C.; ARMESTO, J.; REMIREZ, D.; GONZÁLEZ, R.; LEDON, N.; GARCÍA, I. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoerythrin from blue-green algae. **Inflammation Research**, v. 47, n. 1, p. 36-41, 1998.

SALEH, A.; DHAR, D.; SINGH, P. Comparative pigment profiles of different *Spirulina* strains. **Research in Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 67-74, 2011.

SALLA, A. C. V.; MARGARITES, A. C.; SEIBEL, F. I.; HOLZ, L. C.; BRIÃO, V. B.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 133-141, 2016.

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 560.

SEKAR, S.; CHANDRAMOHAN, M. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 2, p. 113-136, 2008.

SHAPIRO, H. M.; GLAZER, A. N.; CHRISTENSON, L.; WILLIAMS, J. M.; STROM, T. B. Immunofluorescence measurement in a flow cytometer using low-power helium-neon laser excitation. **Cytometry**, v. 4, n. 3, p. 276-279, 1983.

SHEKH, A. Y.; KRISHNAMURTHI, K.; MUDLIAR, S. N.; YADAV, R. R.; FULKE, A. B.; DEVI, S. S.; CHAKRABARTI, T. Recent advancements in carbonic anhydrase-driven processes for CO₂ sequestration: minireview. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 14, p. 1419-1440, 2012.

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

SWARNALATHA, G. V.; HEGDE, N. S.; CHAUHAN, V. S.; SARADA, R. The effect of carbon dioxide rich environment on carbonic anhydrase activity, growth and metabolite production in indigenous freshwater microalgae. **Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts**, v. 9, p. 151-159, 2015.

WILBUR, K. M.; ANDERSON, N. G. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 176, n. 1, p. 147-154, 1948.

WILLIAMS, R.; GINGRICH, J.; GLAZER, A. Cyanobacterial phycobilisomes. Particles from *Synechocystis* 6701 and two pigment mutants. **Journal of Cell Biology**, v. 85, n. 3, p. 558-566, 1980.

XIE, Y. P.; JIN, Y. W.; ZENG, X. H.; CHEN, J. F.; LU, Y. H.; JING, K. J. Fed-batch strategy for enhancing cell growth and C-phycocyanin production of *Arthrospira (Spirulina) platensis* under phototrophic cultivation. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 281-287, 2015.

YEH, S. W.; ONG, L. J.; CLARK, J. H.; GLAZER, A. N. Fluorescence properties of allophycocyanin and a cross-linked allophycocyanin trimer. **Cytometry**, v. 8, n. 1, p. 91-95, 1987.

ZARROUK, C. **Contribution a l'etude d'une cianophycee: Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima*** 1966. 83 f. Ph.D. thesis - Faculte des Sciences, Universite de Paris, 1966.

ARTIGO 3

**EXTRAÇÃO SELETIVA DE C-FICOCIANINA DE *Spirulina platensis* UTILIZANDO
LÍQUIDO IÔNICO E AGENTE QUELANTE**

EXTRAÇÃO SELETIVA DE C-FICOCIANINA DE *Spirulina platensis* UTILIZANDO LÍQUIDO IÔNICO E AGENTE QUELANTE

RESUMO

Nos últimos anos, a demanda por corantes alimentares naturais vem crescendo cada vez mais à medida que os consumidores questionam o uso de corantes artificiais. A ficobiliproteína C-ficocianina (C-FC) de *Spirulina platensis* é utilizada como corante azul natural em alimentos sempre que seu grau de pureza é superior a 0,7. Este estudo propôs um método inovador de ruptura celular e extração de C-FC com grau de pureza alimentar a partir da biomassa úmida de *Spirulina platensis*. O líquido iônico (LI) acetato de trietilamônio ou o agente quelante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) foram utilizados como agente de ruptura celular; e como agente extrator foi utilizado o tampão tris-SO₄ (50 mM e pH 7,4). A C-FC não foi liberada imediatamente após o processo de ruptura celular. Após 24 h de extração, foi obtida C-FC com rendimento de extração de 140,9 mg·g⁻¹ e pureza de 0,9 quando utilizado acetato de trietilamônio 10% (m/m) como agente de ruptura celular. No entanto, o LI é um reagente oneroso, assim este pode ser substituído por EDTA (3,75 mg·mL⁻¹). Quando as células foram tratadas com EDTA, após 24 h, foi obtida C-FC com pureza de 1,0 e rendimento de extração de 153,0 mg·g⁻¹. A C-FC obtida pode ser utilizada na indústria de alimentos como corante natural sem processos prévios de purificação.

Palavras-chave: Corante. Ficobiliproteína. EDTA. Pureza. Cianobactéria.

1 INTRODUÇÃO

A C-ficocianina (C-FC), uma ficobiliproteína solúvel em água, fortemente fluorescente, é caracterizada por sua pigmentação azul e é encontrada em muitas cianobactérias, as quais são também conhecidas como algas verde azuladas. As C-FCs apresentam inúmeras aplicações industriais, podendo ser empregadas como corantes nas indústrias de alimentos e de cosméticos, mas também podem ser utilizadas como marcadores na pesquisa biomédica (ERIKSEN, 2008). Uma potencial fonte de C-FC é a cianobactéria *Spirulina platensis*, uma vez que a C-FC pode constituir até 20% da fração proteica (COHEN, 1997). Além disso, *S. platensis* possui o certificado GRAS (*Generally Recognized as Safe*), o qual autoriza o seu uso em alimentos.

C-FC pode ser obtida a partir da biomassa seca ou úmida de *Spirulina*. No entanto, quando a biomassa de *S. platensis* é seca pode perder cerca de 50% do conteúdo intracelular de C-ficocianina; a perda desta provavelmente está relacionada com a sua posição periférica no ficobilissomo na membrana tilacoide, além da sua sensibilidade à temperatura (SARADA; PILLAI; RAVISHANKAR, 1999).

Os métodos de ruptura celular e extração de C-FC a partir da biomassa de *S. platensis* LEB-52 reportados por Moraes, Burkert e Kalil (2010) e Moraes et al. (2011b) apresentam rendimento de extração na ordem de 46,7 – 82,5 mg·g⁻¹ e pureza do extrato inferior a 0,7. Ainda para a biomassa de *S. platensis* LEB-52, é possível aplicar a extração assistida por ultrassom para se obter C-FC, no entanto a aplicação de onda ultrassônicas não é considerado um método seletivo para obtenção de C-FC, pois a pureza do extrato é inferior a 0,7.

Somando-se a isso, na literatura são reportados métodos de ruptura celular e extração de C-FC a partir de *Spirulina*. Por exemplo, a extração assistida por campos elétricos pulsados proporcionou rendimentos de extração de 159,9 mg·g⁻¹ e pureza do extrato de 0,46 (MARTÍNEZ et al., 2016); a extração assistida por ultrassom resultou em rendimentos de extração na ordem de 35,5 – 91,8 mg·g⁻¹ e pureza do extrato 0,62 – 0,65 (AFTARI et al., 2015; ORES; AMARANTE; KALIL, 2016; PRABUTHAS et al., 2011); já o método de congelamento e descongelamento proporcionou rendimento de extração de 86,3 mg·g⁻¹ e pureza de 1,32 (SINGH; KUDDUS; THOMAS, 2010); e a extração assistida por micro-ondas também proporcionou rendimento de extração de 56,7 mg·g⁻¹ e pureza de 1,27 (AFTARI et al., 2015).

O grande desafio é utilizar um método de ruptura celular e extração que não acarrete em perdas no rendimento de extração de C-FC, porém permita que a pureza do extrato seja superior a 0,7. A comercialização da C-FC é em função do grau de pureza, sendo que grau de pureza acima de 0,7 é utilizada como corante em alimentos e pureza acima de 1,5 é utilizada como corante em cosméticos.

Neste contexto, para se obter maior rendimento de extração de C-FC, é necessário utilizar primeiramente a biomassa úmida (SARADA; PILLAI; RAVISHANKAR, 1999); e para maior grau de pureza do extrato é preciso utilizar um método de ruptura celular que proporcione aumento na porosidade ou desestabilização da parede celular, e evitar técnicas que resultem na produção de fragmentos celulares.

O aumento da porosidade ou a desestabilização da parede celular de microorganismos geralmente é realizado pela utilização de solventes, tais como: clorofórmio (FLORES; VOGET; ERTOLA, 1994), tolueno (FLORES; VOGET; ERTOLA, 1994), etanol (DE FARIA et al., 2013; FENTON, 1982; FLORES; VOGET; ERTOLA, 1994; MANERA, 2010), isopropanol (FENTON, 1982; MANERA et al., 2010), butanol (MANERA, 2010), metanol (FENTON, 1982) e os detergentes – Triton X-100, Tween 80, brometo de cetil-trimetilamônio (MANERA, 2010). Recentemente, os líquidos iônicos (LIs) têm sido utilizados para aumentar a permeabilidade das células da microalga *Haematococcus pluvialis* e posterior extração de astaxantina (DESAI et al., 2016). Lis são sais compostos por ânions e cátions, e, diferentemente dos sais inorgânicos, são líquidos em uma grande faixa de temperatura.

Além disso, na área médica, o aumento da permeabilidade ou a desestabilização da parede celular de bactérias patogênicas é requerido principalmente para melhorar a eficiência de antibióticos, bactericidas e lisozimas (DELVES-BROUGHTON, 1993; WOOLEY; JONES; SHOTTS, 1984). Para isso, utiliza-se o ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) diluído ou associado ao tris hidroximetil aminometano (tris) para bactérias gram-negativas, como por exemplo: *Escherichia coli* (WOOLEY; JONES; SHOTTS, 1984), *Pseudomonas aeruginosa* (WOOLEY; JONES; SHOTTS, 1984), *Proteus vulgaris* (WOOLEY; JONES; SHOTTS, 1984) e *Pseudomonas fluorescens* (DELVES-BROUGHTON, 1993).

No que diz respeito às células de *Spirulina*, até o presente momento, não se tem conhecimento de algum processo que extraia C-ficocianina a partir da biomassa úmida utilizando LI e ou ainda EDTA como agentes de ruptura celular. Desta forma, este trabalho

desenvolveu um processo inovador de extração seletiva de C-ficocianina a partir da biomassa úmida de *Spirulina platensis* utilizando líquido iônico e agente quelante – EDTA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMO E CULTIVO

A cianobactéria *Spirulina platensis* LEB-52, gentilmente cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), foi utilizada para obtenção de C-ficocianina. Para o preparo do inóculo, cultivo e manutenção da microalga foi utilizado o meio Zarrouk composto por ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): NaHCO_3 (16,8); K_2HPO_4 (0,5); NaNO_3 (2,5); K_2SO_4 (1,0); NaCl (1,0); $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2); CaCl_2 (0,04); $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01); EDTA (0,08); 1 mL da solução A5 e 1 mL da solução B6. A solução A5 foi composta por ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): H_3BO_3 (2,86); $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,81); $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,222); $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,079) e $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,018). A solução B6 foi composta por ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): NH_4VO_3 (0,0230); $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0,1920); $\text{NiSO}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,0448); $\text{Na}_2\text{WO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,0179); TiO_2 (0,040) e $\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,0440) (REINEHR; COSTA, 2006; ZARROUK, 1966).

A cianobactéria foi cultivada no modo descontínuo em Erlenmeyer de 2 L (volume útil de 1,8 L), sendo adicionado 20% (v/v) de inóculo com concentração inicial de $0,75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. O meio de cultivo utilizado foi o Zarrouk 100%. As condições de cultivo utilizadas foram conforme propostas por Ores (2014). A cianobactéria foi incubada a 25°C e a agitação foi realizada por injeção constante de ar estéril (0,5 vvm). A iluminância foi promovida por lâmpadas fluorescente do tipo *daylight* ($40,5 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) com fotoperíodo fixado em 12 h claro e 12 h escuro. Conforme reportado no Artigo 2, ao longo do cultivo (entre 21 a 74 d de cultivo) foram retiradas amostras de biomassa para os ensaios de extração. A biomassa de *Spirulina* foi recuperada por filtração em membrana de acetato de celulose com porosidade de $0,45 \mu\text{m}$ (Sartorius Stedim Biotech, Alemanha).

2.2 EXTRAÇÃO DE C-FICOCIANINA

2.2.1 Concentração do agente de ruptura celular: líquido iônico

Primeiramente, diferentes concentrações do agente de ruptura celular foram estudadas. O agente de ruptura celular foi composto por 10, 30, 50 e 70% (m/m) do líquido iônico acetato de trietilamônio ($C_8H_{19}NO_2$) em tampão tris- SO_4 (pH 7,4 e $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). O líquido iônico acetato de trietilamônio foi utilizado com base no trabalho de Attri, Venkatesu e Kumar (2011).

A biomassa foi ressuspensa no agente de ruptura celular (concentração de $1,66 \text{ mg}_{\text{biomassa}}\cdot\text{mL}^{-1}$). A suspensão foi agitada por 30 s em vórtex e incubada por 5 min. Após, a suspensão foi filtrada em membrana de acetato de celulose com porosidade de $0,45 \mu\text{m}$ (Sartorius Stedim Biotech, Alemanha) para recuperação da biomassa, e esta foi ressuspensa no agente extrator (tampão tris- SO_4 pH 7,4 e $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) com concentração de $0,5 \text{ mg}_{\text{biomassa}}\cdot\text{mL}^{-1}$. O processo de ruptura celular e extração foram realizados a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (MORAES; BURKERT; KALIL, 2010). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

No ensaio controle, a biomassa foi ressuspensa diretamente em tampão tris-HCl (pH 8,3 e $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) com concentração de $0,5 \text{ mg}_{\text{biomassa}}\cdot\text{mL}^{-1}$ e a extração assistida por ultrassom (ORES; AMARANTE; KALIL, 2016) foi realizada utilizando o homogeneizador Sonic Ruptor 250 (Omni International Inc., Estados Unidos da América) com frequência de 20 kHz (potência de 60 W). Durante o tratamento ultrassônico, a amostra foi mantida a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, e o tempo de ruptura celular foi de 12 min.

A concentração de C-FC, rendimento de extração e pureza do extrato foram determinados no período de 0 a 48 h de extração. Antes da leitura das absorvâncias, as amostras foram centrifugadas ($4757 \times g$, $10 \text{ }^\circ\text{C}$ e 20 min) para separação das células e/ou fragmentos celulares.

2.2.2 Composição do agente de ruptura celular e extrator

Após a definição da concentração do LI, ensaios foram realizados para verificar a influência da composição do agente de ruptura celular e agente extrator (Tabela 1) no processo de extração de C-FC. A molaridade e o pH dos tampões (tris- SO_4 e fosfato de sódio) foram de 50 mM e pH 7,4, respectivamente.

Nos Ensaios 1, 3 e 5, a biomassa foi ressuspensa no agente de ruptura celular (concentração de $1,66 \text{ mg}_{\text{biomassa}} \cdot \text{mL}^{-1}$). A suspensão foi agitada por 30 s em vórtex e incubada por 5 min. Após, a suspensão foi filtrada em membrana de acetato de celulose com porosidade de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (Sartorius Stedim Biotech, Alemanha) para recuperação da biomassa e esta foi ressuspensa no agente extrator com concentração de $0,5 \text{ mg}_{\text{biomassa}} \cdot \text{mL}^{-1}$. Nos ensaios 2, 4 e 6, a biomassa foi ressuspensa diretamente no agente extrator com concentração de $0,5 \text{ mg}_{\text{biomassa}} \cdot \text{mL}^{-1}$. Os processos de ruptura celular e extração foram realizados a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (MORAES; BURKERT; KALIL, 2010). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 1 – Composição do agente de ruptura celular e agente extrator no processo de extração seletiva de C-FC de *Spirulina platensis*.

Ensaio	Composição agente de ruptura celular	Agente extrator
1	10% (m/m) de acetato de trietilamônio em tampão tris-SO ₄	Tampão tris-SO ₄
2	–	Tampão tris-SO ₄
3	10% (m/m) de acetato de trietilamônio em tampão fosfato de sódio	Tampão fosfato de sódio
4	–	Tampão fosfato de sódio
5	EDTA dissódico ($3,75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) em tampão tris-SO ₄	Tampão tris-SO ₄
6	–	EDTA dissódico ($3,75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) em tampão tris-SO ₄
7	Controle – Ultrassom	

O ensaio controle foi realizado conforme descrito no item 2.2.1. A concentração de C-FC, rendimento de extração e pureza do extrato foram determinados no período de 0 a 48 h de extração. Também foram realizados espectros de absorção na faixa espectral de 280 a 800 nm utilizando o espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu UV-1800, Japão). Antes da leitura das absorvâncias, as amostras foram centrifugadas para separação das células e/ou fragmentos celulares.

2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.3.1 Concentração, rendimento de extração e pureza de C-ficocianina

A concentração de C-ficocianina (C-FC, $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, Equação 1) foi calculada como descrito por Bennett e Bogorad (1973) com pequena modificação no comprimento de onda. O

rendimento de extração de C-FC ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{biomassa}}$) foi calculado conforme a Equação 2 (SILVEIRA et al., 2007), onde CB é a concentração de biomassa ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$).

A pureza do extrato de C-ficocianina (PE) foi calculada conforme a Equação 3, onde a absorvância a 620 nm (A_{620}) indica a concentração de C-ficocianina e a absorvância a 280 nm (A_{280}) indica a concentração de proteína total na solução. As leituras de absorvância (A) a 620, 652 e 280 nm foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu UV-1800, Japão).

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

$$\text{Rendimento de C-FC} = \frac{\text{C-FC}}{\text{CB}} \cdot 1000 \quad (2)$$

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

2.3.2 Concentração de biomassa

A concentração de biomassa foi determinada por leitura da densidade óptica a 670 nm (COSTA et al., 2002) e conversão para biomassa seca através de uma curva padrão previamente preparada (Apêndice 2). Para construção da curva padrão, as células foram coletadas por centrifugação ($4757 \times g$, 30 min, 4 °C), lavadas com água destilada e ressuspendidas com água destilada para leitura da absorvância. Para determinação da biomassa seca as células lavadas com água destilada foram secas a 105 °C até massa constante.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados em triplicata sendo realizada análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de *Tukey*, a fim de verificar diferenças significativas entre as condições estudadas, considerando um nível de confiança de 95%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CONCENTRAÇÃO DO LIQUIDO IÔNICO NA EXTRAÇÃO SELETIVA DE C-FC

O LI acetato de trietilamônio foi escolhido com base no trabalho de Attri, Venkatesu e Kumar (2011), a estabilidade da enzima α -quimotripsina em diferentes famílias de LIs baseados em sais de amônio, de imidazólio e de fosfônio foi avaliada. Dentre os LIs testados, o acetato de trietilamônio apresentou os melhores resultados para estabilizar a α -quimotripsina. Somando-se a isso, os LIs baseados em sais de amônio são mais econômicos do que os baseados no imidazólio e fosfônio. Os resultados obtidos para a extração de C-ficocianina de *Spirulina platensis* estão apresentados na Figura 1.

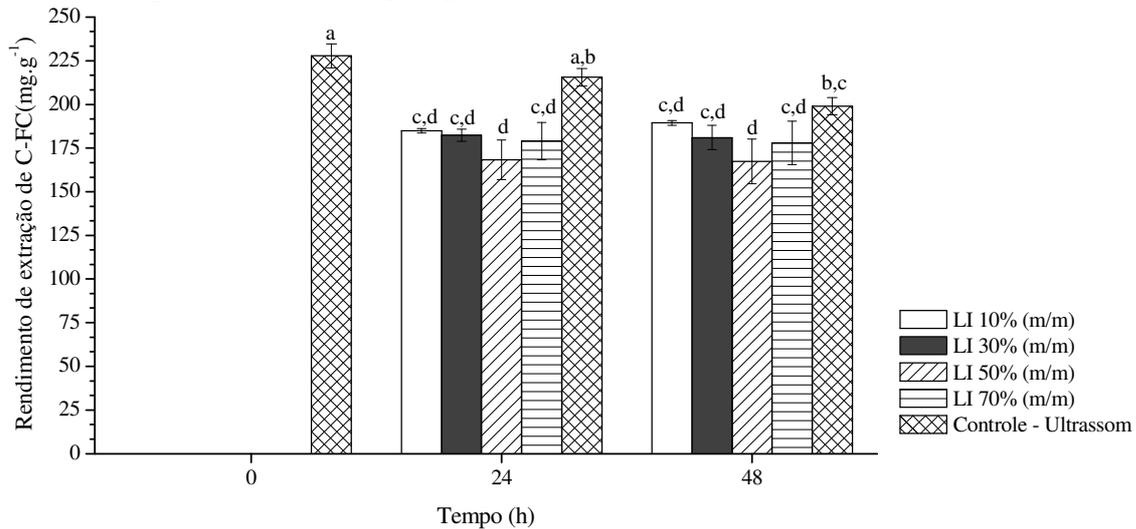
O rendimento de extração e a pureza de C-FC do ensaio controle – extração assistida por ultrassom, em 0 h, foi de 227,7 mg·g⁻¹ e 0,66, respectivamente. O rendimento de extração diminuiu ao longo do tempo de extração quando o ultrassom foi aplicado, atingindo rendimento de extração de 198,9 mg·g⁻¹ 48 h após a ruptura celular, enquanto que a pureza do extrato se manteve constante. Isso provavelmente se deve a desnaturação desta biomolécula por outros compostos que são simultaneamente extraídos, uma vez que a extração assistida por ultrassom não é seletiva.

Na biomassa tratada com LI, a liberação da C-FC não é imediata (tempo 0 h), sendo necessário um tempo adicional para a liberação desta biomolécula (Figura 1). Quando as células de *Arthrospira platensis* foram tratadas com campos elétricos pulsados (CEP), a C-FC foi liberada após 150 min do tratamento (MARTÍNEZ et al., 2016). Os autores atribuem este comportamento à massa molar da C-FC e ao tamanho do poro formado pelo CEP, compostos de baixa massa molar podem atravessar a membrana citoplasmática imediatamente após a formação do poro, enquanto que as moléculas com maior massa molar podem exigir que os poros criados pelo CEP se ampliem com o passar do tempo.

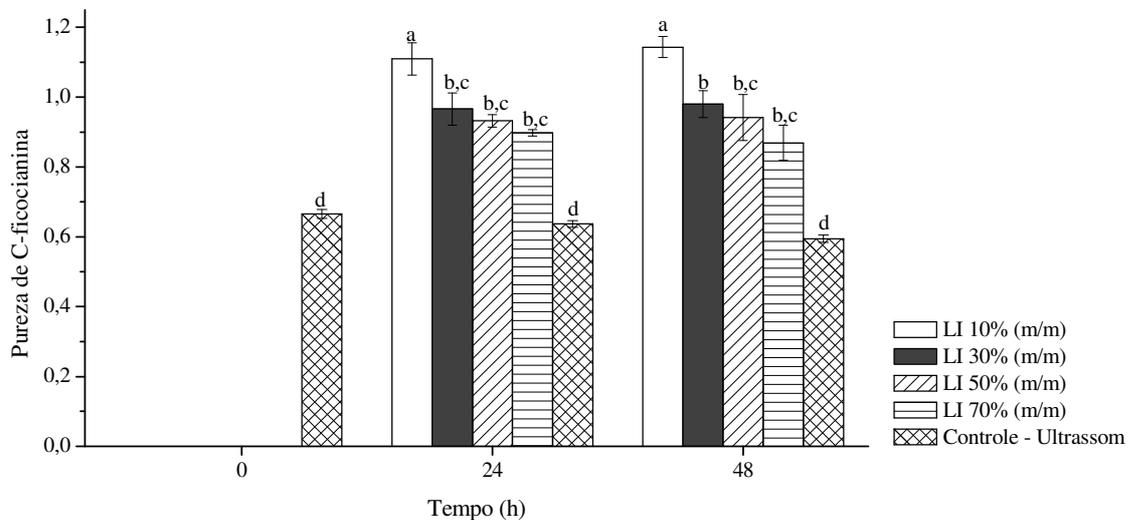
Nos ensaios em que a biomassa foi tratada com LI, o rendimento de extração e a pureza da C-FC permaneceram constantes no período de 24 a 48 h após a ruptura celular. O maior diferencial durante a extração de C-FC com LI foi no grau de pureza, o qual foi superior ao ultrassom. A maior pureza do extrato de C-FC foi obtida quando as células foram tratadas com a menor concentração do LI (10% m/m) em 24 e 48 h, sendo esta de 1,10 e 1,14, respectivamente. Neste ensaio, os rendimentos de extração de C-FC foram de 184,9 mg·g⁻¹ e 189,4 mg·g⁻¹ em 24 e 48 h, respectivamente, o que corresponde cerca de 80% do rendimento

de extração do ultrassom (24 h), no entanto o ganho em pureza é de cerca de 66% (24 h). Assim, os próximos ensaios foram realizados com concentração do LI de 10% (m/m).

Figura 1 – (a) Rendimento de extração ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) e (b) pureza de C-ficocianina extraída com diferentes concentrações do LI acetato de trietilamônio em tampão tris- SO_4 . Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias (Teste Tukey, $p > 0,05$).



(a)



(b)

3.2 COMPOSIÇÃO DO AGENTE DE RUPTURA CELULAR E AGENTE EXTRATOR

Os processos descritos na literatura utilizam métodos mecânicos/físicos (MARTÍNEZ et al., 2016; MORAES; BURKERT; KALIL, 2010; MORAES et al., 2011b; ORES; AMARANTE; KALIL, 2016; SARADA; PILLAI; RAVISHANKAR, 1999; SILVEIRA et al., 2007) ou enzimáticos (CHAUHAN; KOTHARI; RAMAMURTHY, 1994)

para romper a parede celular da cianobactéria *Spirulina*. Nestes processos, a C-FC é extraída em soluções aquosas, como por exemplo, tampão tris-HCl (pH 8,3 e 20 mmol·L⁻¹) (ORES; AMARANTE; KALIL, 2016), tampão fosfato de sódio (pH 6,8-7,0 e 10-50 mmol·L⁻¹) (CHAUHAN; KOTHARI; RAMAMURTHY, 1994; SARADA; PILLAI; RAVISHANKAR, 1999; SILVEIRA et al., 2007) e água (MARTÍNEZ et al., 2016; MORAES; BURKERT; KALIL, 2010; MORAES et al., 2011b; SILVEIRA et al., 2007). Não foram encontrados relatos na literatura que reportem o uso de tampão tris-SO₄ para extrair C-FC, como os resultados obtidos neste trabalho foram promissores com este tampão, optou-se por mantê-lo, e em adição, a extração foi avaliada com o tampão fosfato de sódio. Os tampões utilizados na composição do agente de ruptura celular e extrator foram fosfato de sódio e tris-SO₄, ambos com pH de 7,4 e molaridade de 50 mmol·L⁻¹. O perfil de extração e a pureza de C-FC obtida através do tratamento das células de *S. platensis* utilizando diferentes composições do agente de ruptura celular e agente extrator está apresentado na Figura 2. Na Figura 3 estão apresentados os respectivos espectros de absorção.

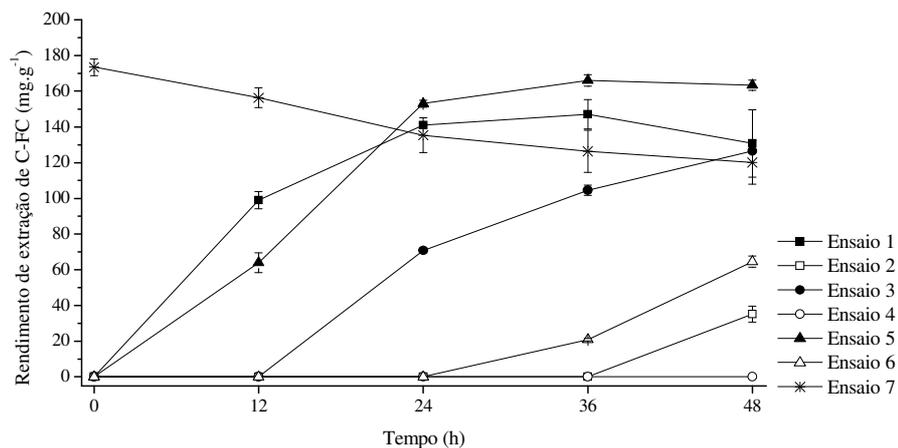
O ensaio controle – extração assistida por ultrassom – em 0 h proporcionou o maior rendimento de extração de C-ficocianina de $173,5 \pm 4,60 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (Figura 2a), e grau de pureza de $0,52 \pm 0,01$ (Figura 2b). O rendimento de extração e a pureza do ensaio controle apresentaram comportamento similar ao ensaio anterior (Figura 1), ambas respostas diminuiram ao longo do tempo de extração. Conforme dito anteriormente, a extração assistida por ultrassom não é seletiva, podendo ser confirmado pelo espectro de absorção na região do ultravioleta-visível (Figura 3f), no qual outros compostos, além da C-FC ($\lambda_{\text{máx}} = 620 \text{ nm}$), são extraídos em 0, 12, 24, 36 e 48 h. A concentração de C-FC diminui ao longo do tempo de extração ($\lambda = 620 \text{ nm}$), enquanto que a concentração de proteína permanece constante ($\lambda = 280 \text{ nm}$), conforme pode ser observado na Figura 3f.

Chauhan, Kothari e Ramamurthy (1994) ao extrair C-FC de *Spirulina* utilizando a homogeneização ultrassônica também verificaram que este método proporciona alta recuperação de C-FC e baixa pureza. Estes autores sugerem que a baixa pureza do extrato de C-FC é devido a ruptura excessiva das células, liberando outras proteínas celulares.

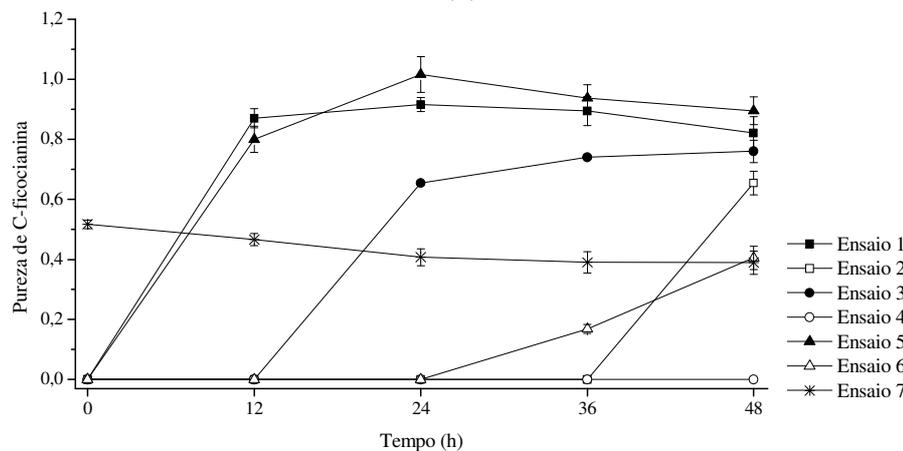
Para verificar a influência do tampão na extração seletiva de C-FC foram realizados os Ensaio 2 e 4, sem a presença do LI (Figura 2). As células quando expostas ao agente extrator tampão fosfato de sódio não liberaram C-FC durante as 48 h de extração (Ensaio 4). E quando expostas ao tampão tris-SO₄ (Ensaio 2), nos tempos avaliados, a primeira detecção de C-FC foi em 48 h, com rendimento de extração de $35,1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ e pureza de extrato de 0,65.

Figura 2 – (a) Rendimento de extração ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) e (b) pureza de C-ficocianina extraída com diferentes composições do agente de ruptura celular e agente extrator.

Ensaio 1: 10% (m/m) de LI em tampão tris- SO_4 + tampão tris- SO_4 ; Ensaio 2: tampão tris- SO_4 ; Ensaio 3: 10% (m/m) de acetato de trietilamônio em tampão fosfato de sódio + tampão fosfato de sódio; Ensaio 5: EDTA dissódico ($3,75\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em tampão tris- SO_4 + tampão tris- SO_4 ; Ensaio 6: EDTA dissódico ($3,75\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em tampão tris- SO_4 ; Ensaio 7: controle – ultrassom.



(a)

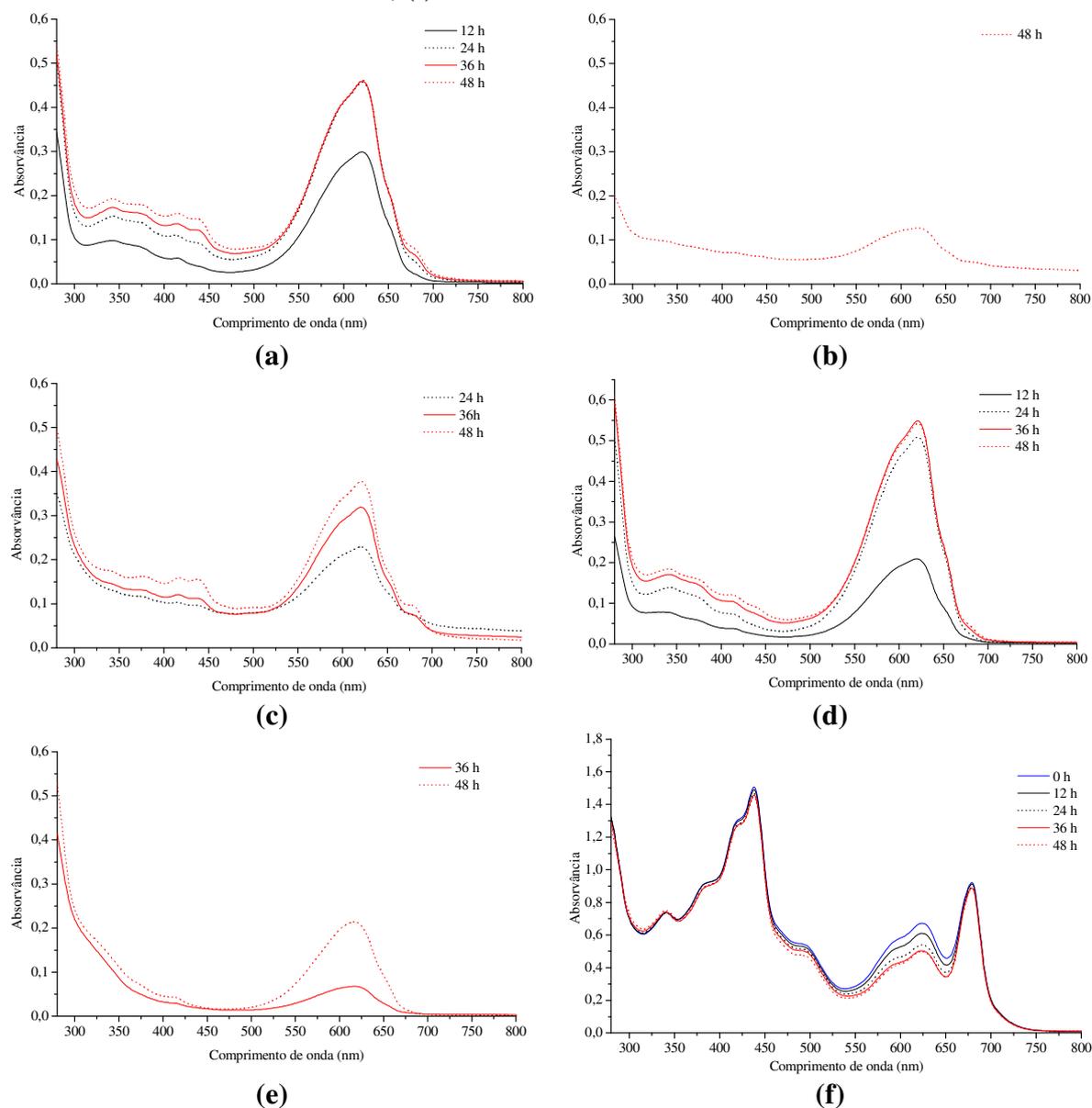


(b)

Quando as células foram tratadas na presença do LI em tampão (Figura 2a, Ensaios 1 e 3) a primeira detecção de C-FC, nos tempos avaliados, foi em 12 e 24 h utilizando o tampão tris- SO_4 e fosfato de sódio, respectivamente. A liberação de C-FC quando as células foram tratadas com LI – acetato de trietilamônio – em tampão tris- SO_4 (Ensaio 1) aumentou gradativamente até 24 h, permanecendo praticamente constante após este período; e a pureza do extrato permanece praticamente constante, variando entre 0,82 – 0,91 no período de 12 a 48 h. O espectro de absorção (Figura 3a) mostra que no período de 12 a 48 h a absorção de C-ficocianina ($\lambda=620\text{ nm}$) e de proteínas ($\lambda=280\text{ nm}$) não

se alterou, no entanto com o passar do tempo outros compostos não proteicos na faixa espectral de 300 a 500 nm foram extraídos.

Figura 3 – Espectros de absorção na região ultravioleta-visível da C-ficocianina obtida em 0, 12, 24, 36 e 48 h. **(a)** Ensaio 1: 10% (m/m) de LI em tampão tris-SO₄ + tampão tris-SO₄; **(b)** Ensaio 2: tampão tris-SO₄; **(c)** Ensaio 3: 10% (m/m) de acetato de trietilamônio em tampão fosfato de sódio + tampão fosfato de sódio; **(d)** Ensaio 5: EDTA dissódico (3,75 mg·mL⁻¹) em tampão tris-SO₄ + tampão tris-SO₄; **(e)** Ensaio 6: EDTA dissódico (3,75 mg·mL⁻¹) em tampão tris-SO₄; **(f)** Ensaio 7: controle – ultrassom.



O rendimento de extração e a pureza do extrato de C-FC quando as células foram tratadas com acetato de trietilamônio em tampão fosfato de sódio (Figura 2, Ensaio 3) aumentou gradativamente a partir de 24 até 48 h. Este fato pode ser também observado no

espectro de absorção a 620 nm (Figura 3c). O rendimento de extração e a pureza de C-FC em 48 h foram de 126,4 mg·g⁻¹ e 0,76, respectivamente.

Os cátions de LIs são estruturas orgânicas com pouca simetria geralmente baseados em imidazólio, piridínio, fosfônio e amônio. A utilização de LIs para a extração de biocompostos é descrita na literatura (CHOI et al., 2014; DESAI et al., 2016). Desai et al. (2016) aplicaram diferentes LIs baseados nos cátions imidazólio, fosfônio e amônio na permeabilização celular de *Haematococcus pluvialis* e simultânea extração de astaxantina. A eficiência da permeabilização celular foi medida pela extração de astaxantina. Os LIs baseados no cátion imidazólio foram os mais eficientes para a permeabilização celular e consequente extração da astaxantina. Estes autores atribuem a permeabilização da parede celular devido a uma possível interação entre os polissacarídeos presentes na parede celular e o LI. Choi et al. (2014) estudaram diferentes misturas de LIs (total de 12 LIs), todos baseados no cátion imidazólio, para extrair lipídios da biomassa de *Chlorella vulgaris*. O aumento da desestabilização ou permeabilidade da parede celular de *Chlorella vulgaris* foi atribuída aos íons dos LI, os quais afetam as ligações de hidrogênio da parede celular das microalgas modificando a estrutura da parede celular.

No presente trabalho, foi realizado um ensaio com acetato de trietilamônio 10% (m/m) em água destilada (dados não mostrados) para extração de C-FC, e a extração foi menor do que 5,9 mg·g⁻¹ após 48 h. Desta forma, há um efeito sinérgico entre o tampão (tris-SO₄ ou fosfato de sódio) e o LI para a desestabilização da parede celular da cianobactéria, liberando a C-ficocianina.

Silveira et al. (2007) estudaram diferentes solventes (água destilada; tampão fosfato de sódio 10 mmol·L⁻¹ e pH 7,0; tampão acetato de sódio 10 mmol·L⁻¹ e pH 5; cloreto de sódio 0,15 mmol·L⁻¹; e cloreto de cálcio 10 g·L⁻¹) para a extração de C-FC a partir biomassa seca de *S. platensis* LEB-52. As maiores concentrações de C-FC (mg·mL⁻¹) foram obtidas em 24 e 48 h após a extração utilizando o tampão fosfato de sódio, e em 72 h utilizando água. Na literatura não são encontrados trabalhos que utilizem o tampão tris-SO₄ para extração de C-FC. No entanto, neste trabalho, para a extração seletiva de C-FC a partir da biomassa úmida de *S. platensis* LEB-52, o tampão tris-SO₄ promoveu maiores rendimentos de extração e pureza de extrato quando comparado ao tampão fosfato de sódio.

O ânion acetato forma ligações de hidrogênio forte com grupos hidroxil (VERMA et al., 2008). Dessa forma, é provável que o acetato de trietilamônio associado ao tampão tris-SO₄ por ligações de hidrogênio desestabilize a parede celular da cianobactéria *Spirulina*, permitindo a liberação de C-ficocianina com grau de pureza alimentar.

Alguns estudos têm demonstrado que o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) aumenta a permeabilidade ou ainda desestabiliza a parede celular de bactérias Gram-negativas (DELVES-BROUGHTON, 1993; WOOLEY; JONES; SHOTTS, 1984). Desta forma, os Ensaio 5 e 6 foram realizados, as células foram tratadas com EDTA em tampão tris-SO₄. A C-FC é liberada gradativamente (Ensaio 5) até 36 h após ruptura celular, após este período permanece constante, atingindo rendimentos de extração de 153,0, 166,1 e 163,4 mg·g⁻¹ em 24, 36 e 48 h, respectivamente. A pureza do extrato (Ensaio 5) aumenta gradativamente até 24 h, sendo esta de 1,02, e após diminui lentamente atingindo 0,89 em 48 h de extração. Na Figura 3d é possível verificar que o incremento na extração de C-FC ($\lambda=620$ nm) e de proteínas ($\lambda= 280$ nm) no período de 12 h para 24 h. No ensaio 6, as células permaneceram em contato com o tampão tris-SO₄ contendo EDTA, a liberação da C-FC ocorreu após 36 h de extração, sendo os rendimentos de extração e a pureza bem inferiores aqueles obtidos no Ensaio 5. A presença do EDTA (Ensaio 6) pode inibir e ou desnaturar a C-FC.

A concentração de EDTA teve como base o trabalho de Wong, Nguyen e Franz (2014). Estes autores verificaram que quando as células de *Tetraselmis suecica* foram tratadas com 3,75 mg·mL⁻¹ de EDTA ocorreu um aumento significativo na intensidade fluorescente de *Nile red* para quantificação intracelular de lipídios.

O EDTA age como quelante, removendo os íons Mg²⁺ e Ca⁺² da parede celular de células Gram-negativas, permitindo a liberação dos fosfolipídios e das lipoproteínas. A perda destas duas substâncias desestabiliza a parede celular (DELVES-BROUGHTON, 1993). O tampão tris exerce um efeito sinérgico na presença do EDTA. O EDTA diluído ou associado ao tris hidroximetil aminometano (tris) é utilizado para aumentar a desestabilização da parede celular de bactérias Gram-negativas (DELVES-BROUGHTON, 1993; WOOLEY; JONES; SHOTTS, 1984). O EDTA danifica a superfície celular das bactérias Gram-negativas, enquanto que o tampão tris aumenta o efeito do EDTA (WOOLEY; JONES; SHOTTS, 1984).

Os métodos de ruptura celular e extração de C-FC a partir de *Spirulina platensis* LEB-52 descritos na literatura apresentam pureza máxima de 0,60 (MORAES; BURKERT; KALIL, 2010; SILVEIRA et al., 2007). Quando esta biomolécula foi purificada por técnicas de baixa resolução apresentou pureza de extrato inferior a 1,0 – precipitação com sulfato de amônio sem diálise: pureza de 0,88 (SILVA et al., 2009); sistema aquoso bifásico: pureza de 0,79 (ANTELO et al., 2010); e diafiltração/ultrafiltração pureza de 0,95 (FIGUEIRA, 2014). Extrato de C-FC com grau de pureza acima de 1,0 foi obtido somente quando utilizado uma sequência de técnicas de purificação e/ou técnicas de alta resolução, como por exemplo,

precipitação fracionada com sulfato de amônio (0-20%/20-50% de saturação) seguido de diálise e cromatografia de troca iônica (MORAES; KALIL, 2009) ou quando purificada por cromatografia de troca iônica em leite expandido na presença de células (MORAES et al., 2015).

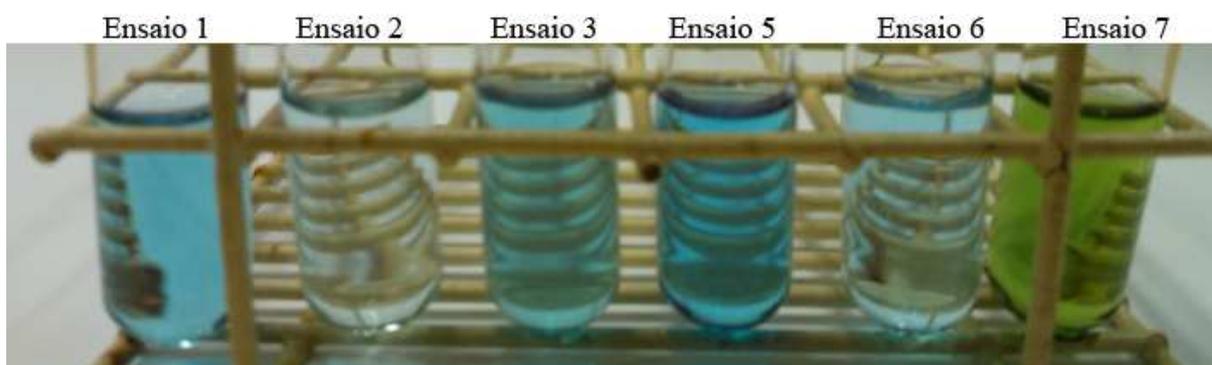
Desta forma, o LI pode ser substituído pelo EDTA para a extração seletiva de C-FC. Do ponto de vista econômico, esta substituição é vantajosa uma vez que o EDTA é em média 22 vezes mais econômico do que o acetato de trietilamônio. Comparando o Ensaio 5 (Figura 2) utilizando o EDTA após 24 h da ruptura celular, foi possível obter C-FC com pureza cerca de 2 vezes superior, e com uma perda no rendimento de extração de apenas 12% quando comparada ao ultrassom em 0 h.

Nos Estados Unidos da América, existe um código chamado de *Code Federal Regulations* (CFR) o qual regulamenta o uso de aditivos corantes isentos de certificações (Título 21, Capítulo 1, Subcapítulo A, Parte 73), além de permitir o uso de ficocianina em confeitos (incluindo doces e goma de mascar), glace, sorvetes e sobremesas congeladas, revestimento e coberturas de sobremesas, mistura e pó de bebidas, iogurtes, cremes, pudins, queijo cottage, gelatina, farinha de rosca, cereais prontos pra comer (excluindo os cereais extrusados), e formulações de revestimento aplicadas a cápsulas e comprimidos de suplementos dietéticos, permite que a ficocianina esteja diluída em EDTA (dissódico) sem ultrapassar a concentração de EDTA de 1% (em massa do diluente). Estas informações foram retiradas do e-CFR, disponível em <http://www.ecfr.gov>, o qual teve sua atualização em 23 de março de 2017.

A extração de C-FC utilizando EDTA ou LI como agente de ruptura celular é seletiva quando comparada com o ultrassom, conforme pode ser verificado nos espectros de absorção dos Ensaios 1, 5 e 7 (Figuras 3a, 3d e 3f). Além disso, o extrato extraído utilizando-se o LI ou EDTA apresenta coloração azul em contraste com aquele extraído pelo ultrassom que apresenta coloração verde, conforme a Figura 4. A presença de coloração verde nos extratos microalgais também é relatada por Gerde et al. (2012) e Safi et al. (2014), em que lipídios e proteínas, respectivamente, foram extraídos de diferentes microalgas utilizando o ultrassom. Estes autores atribuem este fenômeno à clorofila – um pigmento hidrofóbico, que é liberado durante a extração celular e permanece mesmo depois do processo de centrifugação. Cabe ressaltar que o ultrassom apresenta outras aplicações além da extração, como por exemplo, a homogeneização de sólidos em meio líquido e emulsificação de fases imiscíveis (LIN; CHEN, 2006). Neste sentido, pode ter ocorrido a formação de estruturas micelares de clorofila no meio aquoso (SAFI et al., 2014), ou ainda alguns fragmentos celulares contendo

clorofila podem ter sido reduzidos em tamanho pelo ultrassom e estes não precipitaram no *pellet* após a centrifugação (GERDE et al., 2012).

Figura 4 – C-ficocianina extraída com diferentes composições do agente de ruptura celular e agente extrator em 48 h. Ensaio 1: 10% (m/m) de LI em tampão tris-SO₄ + tampão tris-SO₄; Ensaio 2: tampão tris-SO₄; Ensaio 3: 10% (m/m) de acetato de trietilamônio em tampão fosfato de sódio + tampão fosfato de sódio; Ensaio 5: EDTA dissódico (3,75 mg·mL⁻¹) em tampão tris-SO₄ + tampão tris-SO₄; Ensaio 6: EDTA dissódico (3,75 mg·mL⁻¹) em tampão tris-SO₄; Ensaio 7: controle – ultrassom.



A melhor condição pré-estabelecida para extrair C-FC a partir da biomassa úmida de *Spirulina platensis* LEB-52 utilizando EDTA foi: concentração do EDTA de 3,75 mg·mL⁻¹ em tampão tris-SO₄ 50 mM e pH 7,4; concentração de biomassa no agente de ruptura celular de 1,66 mg·mL⁻¹; concentração de biomassa no agente extrator de 0,5 mg·mL⁻¹; tempo de contato de 5 min da biomassa com o agente de ruptura celular; e temperatura do processo de extração de 25 °C. Assim, os próximos estudos devem avaliar as condições de extração, como temperatura e agitação do processo, concentração de biomassa no agente de ruptura celular e tempo de contato da biomassa com o agente de ruptura celular, concentração de biomassa no agente extrator, concentração de EDTA, entre outros fatores.

4 CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível extrair C-FC com grau de pureza alimentar (> 0,7) utilizando como agente de ruptura celular o LI acetato de trietilamônio (10% m/m) ou o agente quelante EDTA (3,75 mg·mL⁻¹) diluídos em tampão tris-SO₄ (pH 7,4 e 50 mM). Ambos agentes de ruptura celular podem ser utilizados para a extração seletiva de C-FC, no entanto por uma questão econômica, optou-se pelo EDTA. Quando as células de *Spirulina platensis* foram tratadas com EDTA, foi possível obter em 24 h de extração, C-FC com pureza

de 1,01 e rendimento de extração de 153,0 mg·g⁻¹. Dessa forma, este trabalho inova ao apresentar um processo no qual é possível obter C-FC com grau de pureza alimentar (> 0,70), podendo assim ser extraída e aplicada na indústria de alimentos como corante natural azul sem processos prévios de purificação.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFTARI, R. V.; REZAEI, K.; MORTAZAVI, A.; BANDANI, A. R. The optimized concentration and purity of *Spirulina platensis* C-phycoerythrin: a comparative study on microwave-assisted and ultrasound-assisted extraction methods. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 3080-3091, 2015.

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

ATTRI, P.; VENKATESU, P.; KUMAR, A. Activity and stability of α -chymotrypsin in biocompatible ionic liquids: enzyme refolding by triethyl ammonium acetate. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 7, p. 2788-2796, 2011.

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

CHAUHAN, V. S.; KOTHARI, R. M.; RAMAMURTHY, V. Method for efficient extraction of phycoerythrin from *Spirulina*. **Biotechnology Techniques**, v. 8, n. 7, p. 525-528, 1994.

CHOI, S. A.; OH, Y. K.; JEONG, M. J.; KIM, S. W.; LEE, J. S.; PARK, J. Y. Effects of ionic liquid mixtures on lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. **Renewable Energy**, v. 65, p. 169-174, 2014.

COHEN, Z. The chemical of *Spirulina*. In: VONSHAK, A. (Ed.). *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*. [S.I.]: CRC Press, 1997. cap. 10.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; FILHO, P. D.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 603-607, 2002.

DE FARIA, J. T.; ROCHA, P. F.; CONVERTI, A.; PASSOS, F. M. L.; MINIM, L. A.; SAMPAIO, F. C. Statistical investigation of *Kluyveromyces lactis* cells permeabilization with ethanol by response surface methodology. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1067-1074, 2013.

DELVES-BROUGHTON, J. The use of EDTA to enhance the efficacy of nisin towards gram-Negative bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 32, n. 1-3, p. 87-97, 1993.

DESAI, R. K.; STREEFLAND, M.; WIJFFELS, R. H.; EPPINK, M. H. M. Novel astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis* using cell permeabilising ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 18, p. 1261-1267, 2016.

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

FENTON, D. M. Solvent treatment for β -d-galactosidase release from yeast cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 4, n. 4, p. 229-232, 1982.

FIGUEIRA, F. S. **Purificação de C-ficocianina e sua incorporação em nanofibras**. 2014. 141 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

FLORES, M. V.; VOGET, C. E.; ERTOLA, R. J. J. Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces lactis*) with organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 4, p. 340-346, 1994.

GERDE, J. A.; MONTALBO-LOMBOY, M.; YAO, L. X.; GREWELL, D.; WANG, T. Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 175-181, 2012.

LIN, C.-Y.; CHEN, L.-W. Engine performance and emission characteristics of three-phase diesel emulsions prepared by an ultrasonic emulsification method. **Fuel**, v. 85, n. 5-6, p. 593-600, 2006.

MANERA, A. P. **Síntese de galacto-oligossacarídeos a partir de células permeabilizadas de *Kluyveromyces marxianus***. 2010. 174 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

MANERA, A. P.; COSTA, F. A. D.; RODRIGUES, M. I.; KALIL, S. J.; MAUGERI, F. Galacto-oligosaccharides production using permeabilized cells of *Kluyveromyces marxianus*. **International Journal of Food Engineering**, v. 6, n. 6, 2010.

MARTÍNEZ, J. M.; LUENGO, E.; SALDAÑA, G.; ÁLVAREZ, I.; RASO, J. C-phycocyanin extraction assisted by pulsed electric field from *Artrosphira platensis*. **Food Research International**, 2016.

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

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

MORAES, C. C.; SALA, L.; CERVEIRA, G. P.; KALIL, S. J. C-phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 1, p. 45-49, 2011.

MORAES, C. C.; SALA, L.; ORES, J. D.; BRAGA, A. R. C.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Expanded and fixed bed ion exchange chromatography for the recovery of C-phycocyanin in

a single step by using lysed cells. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 93, n. 1, p. 111-115, 2015.

ORES, J. C. **Produção e extração da enzima anidrase carbônica e de ficobiliproteínas a partir de microalgas**. 2014. 135 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

ORES, J. C.; AMARANTE, M. C. A.; KALIL, S. J. Co-production of carbonic anhydrase and phycobiliproteins by *Spirulina* sp. and *Synechococcus nidulans*. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 219-227, 2016.

PRABUTHAS, P.; MAJUMDAR, S.; SRIVASTAV, P.; MISHRA, H. Standardization of rapid and economical method for nutraceuticals extraction from algae. **Journal of Stored Products and Postharvest Research**, v. 2, n. 5, p. 93-96, 2011.

REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Repeated batch cultivation of the microalga *Spirulina platensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 937-943, 2006.

SAFI, C.; URSU, A. V.; LAROCHE, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; PONTALIER, P.-Y.; VACA-GARCIA, C. Aqueous extraction of proteins from microalgae: effect of different cell disruption methods. **Algal Research**, v. 3, p. 61-65, 2014.

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

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

SILVEIRA, S. T.; BURKERT, J. F. M.; COSTA, J. A. V.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, p. 1629-1634, 2007.

SINGH, P.; KUDDUS, M.; THOMAS, G. An efficient method for extraction of C-phycocyanin from *Spirulina* sp. and its binding affinity to blood cells, nuclei and genomic DNA. **International Research Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 5, p. 080-085, 2010.

VERMA, A. K.; ATTRI, P.; CHOPRA, V.; TIWARI, R. K.; CHANDRA, R. Triethylammonium acetate (TEAA): a recyclable inexpensive ionic liquid promotes the chemoselective aza- and thia-Michael reactions. **Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly**, v. 139, n. 9, p. 1041-1047, 2008.

WONG, D. M.; NGUYEN, T. T. N.; FRANZ, A. K. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) enhances intracellular lipid staining with Nile red in microalgae *Tetraselmis suecica*. **Algal Research**, v. 5, p. 158-163, 2014.

WOOLEY, R. E.; JONES, M. S.; SHOTTS, E. B. Uptake of antibiotics in gram-negative bacteria exposed to EDTA-Tris. **Veterinary Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 57-70, 1984.

ZARROUK, C. **Contribution a l'etude d'une cianophycee: Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima*** 1966. 83 f. Ph.D. thesis - Faculte des Sciences, Universite de Paris, 1966.

ARTIGO 4
EXTRAÇÃO SELETIVA DE C-FICOCIANINA COM GRAU DE PUREZA
ALIMENTAR

EXTRAÇÃO SELETIVA DE C-FICOCIANINA COM GRAU DE PUREZA ALIMENTAR

RESUMO

C-ficocianina, um pigmento azul, extraída de *Spirulina platensis* tem sido utilizada como corante em alimentos e em cosméticos, e devido as suas propriedades também tem sido utilizada em pesquisas biotecnológicas, em fármacos e na área médica. O custo e a aplicação da C-ficocianina é dependente do seu grau de pureza. Neste contexto, a influência de seis variáveis (concentração de EDTA, concentração de biomassa no agente de ruptura celular e extrator, tempo de contato com o agente de ruptura celular, agitação e temperatura do processo de extração) do processo de ruptura celular e extração de C-FC foram avaliadas através de um delineamento fatorial fracionado 2^{6-2} , a fim de obter este biocomposto com maior grau de pureza e maior rendimento de extração. A temperatura do processo de extração afetou significativamente a extração de C-FC, em termos de pureza e rendimento de extração, enquanto que as demais variáveis não exerceram influência significativa. A melhor condição para obter C-ficocianina a partir da biomassa úmida de *Spirulina platensis* LEB-52 foi concentração de EDTA de $1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, concentração de biomassa no agente de ruptura celular de $1,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, concentração de biomassa no agente extrator de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, tempo de contato com o agente de ruptura celular de 1 min, sem agitação e temperatura do processo de extração de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Nestas condições, foi possível obter C-FC com grau de pureza de 1,0, rendimento de extração de $129,0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ e concentração de $0,071 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, podendo ser utilizada como corante em alimentos sem processos de purificação. Por fim, neste extrato foi aplicado a ultrafiltração, a C-FC foi concentrada cerca de 8,8 vezes ($0,625 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), apresentou grau de pureza de 1,6 e recuperação de 93,4%. Com uma simples etapa de ultrafiltração foi possível obter C-FC com grau de pureza para ser utilizada como corante em cosméticos.

Palavras-chave: Pureza alimentar. Corante. Cianobactéria. *Spirulina*. Ultrafiltração.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a preocupação do consumidor em relação à saúde e questões de segurança sobre o uso de corantes sintéticos em alimentos tem aumentado. A *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos da América e a *European Food Safety Authority* (AFSA) na Europa têm restringido o uso de corantes sintéticos em alimentos, produtos de confeitaria e bebidas, por conta da sua associação confirmada ou suspeita com o aumento do desenvolvimento do câncer ou a indução de reações alérgicas. Por estas razões, outros corantes estão em estudo e provisoriamente permitidos. A tendência na indústria de alimentos é ir progressivamente no sentido da utilização de aditivos naturais. Entre as diferentes cores, a indústria de doces e bebidas tem uma alta demanda em corantes azuis, no entanto, eles não são comuns na natureza levando assim à utilização de sintéticos. A indústria de alimentos está expressando um crescente interesse na busca por corantes naturais azuis (MARTELLI et al., 2014). Assim, o uso de C-ficocianina (C-FC), um pigmento fotossintético acessório azul, como corante natural na indústria de alimentos e cosméticos é atrativo (ARAD; YARON, 1992; KUDDUS et al., 2013).

C-ficocianina é uma ficobiliproteína presente em cianobactérias, como por exemplo, a *Spirulina*. O conteúdo intracelular de C-FC na *Spirulina* pode chegar até 20% da fração proteica (COHEN, 1997). Estudos têm mostrado que a C-ficocianina possui propriedades anticarcinogênicas (GANTAR; DHANDAYUTHAPANI; RATHINAVELU, 2012), antioxidantes (THANGAM et al., 2013), hepatoprotetora (NAGARAJ et al., 2012), anti-inflamatória (GONZÁLEZ et al., 1999), antihipertensiva (ICHIMURA et al., 2013), entre outras.

Para obtenção deste biocomposto, é preciso romper a célula para posterior extração. Os processos de ruptura celular que são descritos na literatura para obtenção de C-FC de *Spirulina* (AFTARI et al., 2015; MORAES; BURKERT; KALIL, 2010; MORAES et al., 2011B; ORES; AMARANTE; KALIL, 2016; PRABUTHAS et al., 2011; SILVEIRA et al., 2007) não atuam de forma seletiva na ruptura celular e extração de C-FC, além do baixo rendimento de extração, o extrato de C-FC apresenta pureza em geral inferior a 0,7. Para utilizar a C-FC como corante natural em alimentos, é necessário um grau de pureza superior a 0,7 (PATIL et al., 2006). Dessa forma, se a C-FC obtida apresentar pureza inferior a 0,7 é necessário purificá-la até atingir grau de pureza alimentar, encarecendo dessa forma o custo de obtenção.

Neste contexto, a obtenção deste biocomposto de forma simples, econômica e seletiva é de grande interesse ao setor industrial. A liberação seletiva de bioprodutos apresenta benefícios: reduz a liberação de proteínas contaminantes, assim aumenta a capacidade de adsorção durante a cromatografia; e evita a micronização dos fragmentos celulares com concomitante benefício nas etapas de clarificação e filtração. Em conjunto, estas vantagens tornam a recuperação seletiva do bioproduto durante a ruptura celular um dos meios mais promissores para melhorar a economia do processo de obtenção de produtos intracelulares (BALASUNDARAM; HARRISON; BRACEWELL, 2009).

O presente estudo visou maximizar as condições do processo de ruptura celular e extração de C-FC, a fim de obter este biocomposto com maior grau de pureza e maior rendimento de extração. Para tal, as variáveis concentração de EDTA, concentração de biomassa no agente de ruptura celular e extrator, tempo de contato com o agente de ruptura celular, agitação e temperatura do processo de extração foram avaliadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMO E CULTIVO

A cianobactéria *Spirulina platensis* LEB-52, gentilmente cedida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), foi utilizada para obtenção de C-ficocianina. Para o preparo do inóculo, cultivo e manutenção da microalga foi utilizado o meio Zarrouk composto por ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): NaHCO_3 (16,8); K_2HPO_4 (0,5); NaNO_3 (2,5); K_2SO_4 (1,0); NaCl (1,0); $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2); CaCl_2 (0,04); $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01); EDTA (0,08); 1 mL da solução A5 e 1 mL da solução B6. A solução A5 foi composta por ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): H_3BO_3 (2,86); $\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1,81); $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,222); $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,079) e $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,018). A solução B6 foi composta por ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): NH_4VO_3 (0,0230); $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0,1920); $\text{NiSO}_4\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,0448); $\text{Na}_2\text{WO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,0179); TiO_2 (0,040) e $\text{Co}(\text{NO}_3)_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,0440) (REINEHR; COSTA, 2006; ZARROUK, 1966).

A cianobactéria foi cultivada no modo descontínuo em Erlenmeyer de 2 L (volume útil de 1,8 L), sendo adicionado 20% (v/v) de inóculo com concentração inicial de $0,75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. O meio de cultivo utilizado foi o Zarrouk 100%. As condições de cultivo utilizadas foram conforme propostas por Ores (2014). A cianobactéria foi incubada a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e a agitação foi realizada por injeção constante de ar estéril (0,5 vvm). A iluminância foi promovida por

lâmpadas fluorescente do tipo *daylight* ($40,5 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) com fotoperíodo fixado em 12 h claro/escuro. Entre 21 d e 74 d de cultivo foram retiradas amostras de biomassa para os ensaios de extração.

2.2 MAXIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO SELETIVA DE C-FICOCIANINA

2.2.1 Delineamento fatorial fracionado 2^{6-2}

A influência de 6 variáveis (Tabela 1) foi avaliada na extração seletiva de C-ficocianina utilizando delineamento fatorial fracionado 2^{6-2} . Os níveis das variáveis independentes foram escolhidos com base na melhor condição pré-estabelecida anteriormente (Artigo 3) e com a literatura (MORAES; BURKERT; KALIL, 2010; SILVEIRA et al., 2007). A matriz do delineamento fatorial fracionado está apresentada na Tabela 2, totalizando 19 ensaios, incluindo 3 pontos centrais.

Tabela 1 – Variáveis independentes e seus níveis reais e codificados estudados no delineamento fatorial fracionado 2^{6-2} .

Variáveis independentes	Unidade	Níveis		
		-1	0	+1
X_1 : Concentração de EDTA	mg·mL ⁻¹	1,00	3,75	6,50
X_2 : Concentração de biomassa no agente de ruptura celular	mg·mL ⁻¹	1,50	2,25	3,00
X_3 : Concentração de biomassa no agente extrator	mg·mL ⁻¹	0,50	1,75	3,00
X_4 : Tempo de contato da biomassa com agente de ruptura	min	1	5,5	10
X_5 : Temperatura de extração	°C	10	17,5	25
X_6 : Agitação durante a extração	rpm	0	100	200

As células do meio de cultivo foram filtradas em membrana de acetato de celulose com porosidade de $0,45 \mu\text{m}$ (Sartorius Stedim Biotech, Alemanha) e ressuspendidas no agente de ruptura celular EDTA diluído em tampão tris-SO₄ 50 mM e pH 7,4. A suspensão foi agitada por 30 s em vórtex e incubada a 25 °C pelo tempo pré-determinado. Após, as células foram recuperadas por filtração em membrana de acetato de celulose com porosidade de $0,45 \mu\text{m}$ (Sartorius Stedim Biotech, Alemanha), e ressuspendidas no agente extrator (tampão tris-SO₄ pH 7,4 e 50 mmol·L⁻¹). Durante a extração, as amostras foram mantidas em

incubadoras com ou sem agitação orbital conforme as condições de agitação e de temperatura de cada ensaio.

Tabela 2 – Matriz do delineamento fatorial fracionado 2^{6-2} , valores codificados e reais (entre parênteses).

Ensaio	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6
1	-1 (1,0)	-1 (1,50)	-1 (0,50)	-1 (1)	-1 (10)	-1 (0)
2	+1 (6,5)	-1 (1,50)	-1 (0,50)	-1 (1)	+1 (25)	-1 (0)
3	-1 (1,0)	+1 (3,00)	-1 (0,50)	-1 (1)	+1 (25)	+1 (200)
4	+1 (6,5)	+1 (3,00)	-1 (0,50)	-1 (1)	-1 (10)	+1 (200)
5	-1 (1,0)	-1 (1,50)	+1 (3,00)	-1 (1)	+1 (25)	+1 (200)
6	+1 (6,5)	-1 (1,50)	+1 (3,00)	-1 (1)	-1 (10)	+1 (200)
7	-1 (1,0)	+1 (3,00)	+1 (3,00)	-1 (1)	-1 (10)	-1 (0)
8	+1 (6,5)	+1 (3,00)	+1 (3,00)	-1 (1)	+1 (25)	-1 (0)
9	-1 (1,0)	-1 (1,50)	-1 (0,50)	+1 (10)	-1 (10)	+1 (200)
10	+1 (6,5)	-1 (1,50)	-1 (0,50)	+1 (10)	+1 (25)	+1 (200)
11	-1 (1,0)	+1 (3,00)	-1 (0,50)	+1 (10)	+1 (25)	-1 (0)
12	+1 (6,5)	+1 (3,00)	-1 (0,50)	+1 (10)	-1 (10)	-1 (0)
13	-1 (1,0)	-1 (1,50)	+1 (3,00)	+1 (10)	+1 (25)	-1 (0)
14	+1 (6,5)	-1 (1,50)	+1 (3,00)	+1 (10)	-1 (10)	-1 (0)
15	-1 (1,0)	+1 (3,00)	+1 (3,00)	+1 (10)	-1 (10)	+1 (200)
16	+1 (6,5)	+1 (3,00)	+1 (3,00)	+1 (10)	+1 (25)	+1 (200)
17	0 (3,75)	0 (2,25)	0 (1,75)	0 (5,5)	0 (17,5)	0 (100)
18	0 (3,75)	0 (2,25)	0 (1,75)	0 (5,5)	0 (17,5)	0 (100)
19	0 (3,75)	0 (2,25)	0 (1,75)	0 (5,5)	0 (17,5)	0 (100)

X_1 : concentração de EDTA ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); X_2 : concentração de biomassa no agente de ruptura celular ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); X_3 : concentração de biomassa no agente extrator ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); X_4 : tempo de contato da biomassa com agente de ruptura ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); X_5 : temperatura de extração ($^{\circ}\text{C}$); X_6 : agitação durante a extração (rpm).

O rendimento de extração e a pureza de C-FC foram determinadas em 0, 12, 24, 48, 60, 72 e 84 h após a ruptura celular e extração. Espectros de absorção na faixa de comprimento de onda de 280 a 800 nm utilizando o espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu UV-1800, Japão) foram realizados. Antes da leitura das absorvâncias, as amostras foram centrifugadas para separação das células e/ou fragmentos celulares.

2.2.2 Maximização da extração de C-FC

Com base nos resultados obtidos no delineamento fatorial fracionado 2^{6-2} , foram realizados dois ensaios (Ensaio A e B) descritos na Tabela 3. Os experimentos foram realizados em triplicata.

As células do meio de cultivo foram filtradas em membrana de acetato de celulose com porosidade de $0,45\ \mu\text{m}$ (Sartorius Stedim Biotech, Alemanha) e ressuspensas no agente

de ruptura celular. A suspensão foi agitada por 30 s em vórtex e incubada a 25 °C pelo tempo pré-determinado. Após, as células foram recuperadas por filtração em membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,45 μm (Sartorius Stedim Biotech, Alemanha), e ressuspensas no agente extrator (tampão tris-SO₄ pH 7,4 e 50 mmol·L⁻¹).

Tabela 3 – Descrição das variáveis dos ensaios para maximização da extração de C-FC.

Variáveis	Ensaio A	Ensaio B
Concentração de EDTA (mg·mL ⁻¹)	1,00	3,75
Concentração de biomassa no agente de ruptura celular (mg·mL ⁻¹)	1,50	2,25
Concentração de biomassa no agente extrator (mg·mL ⁻¹)	0,50	1,75
Tempo de contato da biomassa com agente de ruptura (min)	1	5,5
Temperatura de extração (°C)	25	25
Agitação durante a extração (rpm)	0	100

2.3 CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE C-FICOCIANINA POR ULTRAFILTRAÇÃO

O extrato de C-ficocianina foi obtido na melhor condição estabelecida anteriormente, e este foi concentrado e purificado por ultrafiltração. Para a ultrafiltração foram utilizados os tubos Vivaspin® 15 Turbo (Sartorius Stedim Biotech, Alemanha). Estes tubos permitem a concentração de bioprodutos por ultrafiltração utilizando a força centrífuga, conforme a Figura 1. A retenção nominal da membrana de polietersulfona foi de 50 kDa (FIGUEIRA, 2014).

Figura 1 – Tubos de ultrafiltração Vivaspin® 15 Turbo utilizados para concentrar a C-ficocianina.



No ensaio de ultrafiltração, 5 mL do extrato de C-FC foi adicionado ao tubo e este foi centrifugado por 10 min, 10 °C e 3304 ×g, após foi mensurado o volume da fração permeada. No extrato inicial de C-FC, nas frações permeada e retida foram analisadas a concentração e a pureza de C-ficocianina. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.4 CONCENTRAÇÃO, RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO, RECUPERAÇÃO E PUREZA DE C-FICOCIANINA

A concentração de C-ficocianina (C-FC, mg·mL⁻¹, Equação 1) foi calculada conforme descrito por Bennett e Bogorad (1973) com pequena modificação no comprimento de onda. O rendimento de extração de C-FC (mg·g_{biomassa}⁻¹) foi calculado conforme a Equação 2 (SILVEIRA et al., 2007), onde CB é a concentração de biomassa.

A pureza do extrato de C-ficocianina (PE) foi calculada conforme a Equação 3, onde a absorvância a 620 nm (A₆₂₀) indica a concentração de C-ficocianina e a absorvância a 280 nm (A₂₈₀) indica a concentração de proteína total na solução. As leituras de absorvâncias (A) a 620, 652 e 280 nm foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu UV-1800, Japão).

A recuperação de C-FC após o processo de ultrafiltração foi calculada conforme a Equação 4, onde C-FC_{retida} e C-FC_{inicial} são as concentrações de C-FC (mg·mL⁻¹) na fração retida e inicial, respectivamente, e V_{retida} e V_{inicial} são os volumes (mL) da fração retida e inicial, respectivamente.

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

$$\text{Rendimento de C - FC} = \frac{C - FC}{CB} \cdot 1000 \quad (2)$$

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

$$\% \text{Recuperação} = \frac{C - FC_{\text{retida}} \cdot V_{\text{retida}}}{C - FC_{\text{inicial}} \cdot V_{\text{inicial}}} \cdot 100 \quad (4)$$

2.5 CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA

A concentração de biomassa foi determinada por leitura da densidade óptica a 670 nm (COSTA et al., 2002) e conversão para biomassa seca através de uma curva padrão previamente preparada (Apêndice 2). Para construção da curva padrão, as células foram coletadas por centrifugação (4757 ×g, 30 min, 4 °C), lavadas com água destilada e ressuspendidas com água destilada para leitura da absorvância. Para determinação da biomassa seca as células lavadas com água destilada foram secas a 105 °C até massa constante.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os efeitos do delineamento fatorial fracionado 2^{6-2} foram avaliados a um nível de confiança de 90%. A análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de *Tukey* foi realizada nos demais experimentos, a fim de verificar diferenças significativas entre as condições estudadas, considerando um nível de confiança de 95%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A melhor condição pré-estabelecida no Artigo 3 para extrair C-FC a partir da biomassa úmida de *Spirulina platensis* LEB-52 utilizando EDTA foi: concentração do EDTA de 3,75 mg.mL⁻¹ em tampão tris-SO₄ 50 mM e pH 7,4; concentração de biomassa no agente de ruptura celular de 1,66 mg.mL⁻¹; concentração de biomassa no agente extrator de 0,5 mg.mL⁻¹; tempo de contato de 5 min da biomassa com o agente de ruptura celular; temperatura do processo de extração de 25 °C, e sem agitação. A faixa de estudo das variáveis do delineamento fatorial fracionado 26-2 foi baseada na melhor condição pré-estabelecida no Artigo 3 e nos estudos de extração de C-FC (MORAES; BURKERT; KALIL, 2010; SILVEIRA et al., 2007). Silveira et al. (2007) verificaram que o aumento na temperatura de extração de 23,6 °C para 41 °C diminuiu significativamente a pureza do extrato de C-FC em 0,05. Dessa forma, optou-se por estudar temperaturas de extração inferiores e iguais a 25 °C. Com relação à agitação durante a extração, Moraes, Burkert e Kalil (2010) avaliaram a extração de C-FC com agitação orbital na faixa de 100 a 200 rpm e verificaram que o aumento da agitação diminuiu a pureza do extrato de C-FC, portanto no presente estudo a influência da agitação no processo de extração de C-FC na faixa de 0 a 200 rpm foi avaliada.

A Figura 2 apresenta o rendimento de extração e a Figura 3 apresenta a pureza de C-FC ao longo de 84 h para os ensaios do delineamento fatorial fracionado 2^{6-2} . O rendimento de extração variou de $3,7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (Ensaio 6, 48 h) a $155,5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (Ensaio 19, 72 h), enquanto que a pureza de C-FC variou de 0,08 (Ensaio 6, 48 h) a 1,05 (Ensaio 18, 36 h).

A temperatura do processo de extração influenciou na liberação seletiva de C-FC de *Spirulina platensis*. Quando a temperatura foi de $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$, nos tempos avaliados, a primeira detecção de C-FC foi em 36 h (Figura 2a), e quando a temperatura de extração foi de $17,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 2b) e $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 2c), a liberação de C-FC foi detectada em 12 h.

A agitação do processo influenciou somente quando a extração foi realizada à temperatura de $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 2a). Nos ensaios 1, 7, 12 e 14 – temperatura de $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e sem agitação (0 rpm), a liberação de C-FC ocorreu após 72 h da ruptura celular. Nestes ensaios, em 84 h, o rendimento de extração de C-FC foi baixo, variando de $21,0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (Ensaio 7) a $57,2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (Ensaio 1), e a pureza variou de 0,32 (Ensaio 7) a 0,61 (Ensaio 1). Em contrapartida, nos ensaios 4, 6, 9 e 15 – temperatura de $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e agitação de 200 rpm, a C-FC foi liberada a partir de 36 h, com exceção do Ensaio 6, no qual foi liberada em 48 h. O rendimento de extração máximo nestes ensaios em 48 h foi de $93,9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (Ensaio 9) e pureza de 0,66 (Ensaio 15).

Nos ensaios a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, a influência da agitação do processo de extração não ficou evidente (Figura 2c), o maior rendimento de extração de C-FC foi de $139,3 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (Ensaio 2) obtido em 24 h e a maior pureza foi de 0,87 (Ensaio 11) em 24 h.

Nos Ensaios 3, 4, 5, 9, 10 e 16, é possível verificar que ao longo da extração de C-FC, após atingir o máximo rendimento de extração, ocorreu uma diminuição na concentração e na pureza de C-FC. E nos ensaios 2, 8, 11, 13, 15, 17, 18 e 19, após atingir o máximo rendimento de extração, a concentração e a pureza de C-FC estabilizam. A redução na concentração e na pureza de C-FC pode estar relacionada à extração de outros compostos e de outras proteínas contaminantes, conforme pode ser verificado nos espectros de absorção (Apêndice 5), e/ou ainda relacionado à desnaturação da C-FC por proteases que podem ter sido extraídas ao longo do tempo.

Figura 2 – Rendimento de extração de C-ficocianina para cada ensaio do delineamento fatorial fracionado 2^{6-2} durante 84 h: (a) 10 °C (b) 17,5 °C e (c) 25 °C.

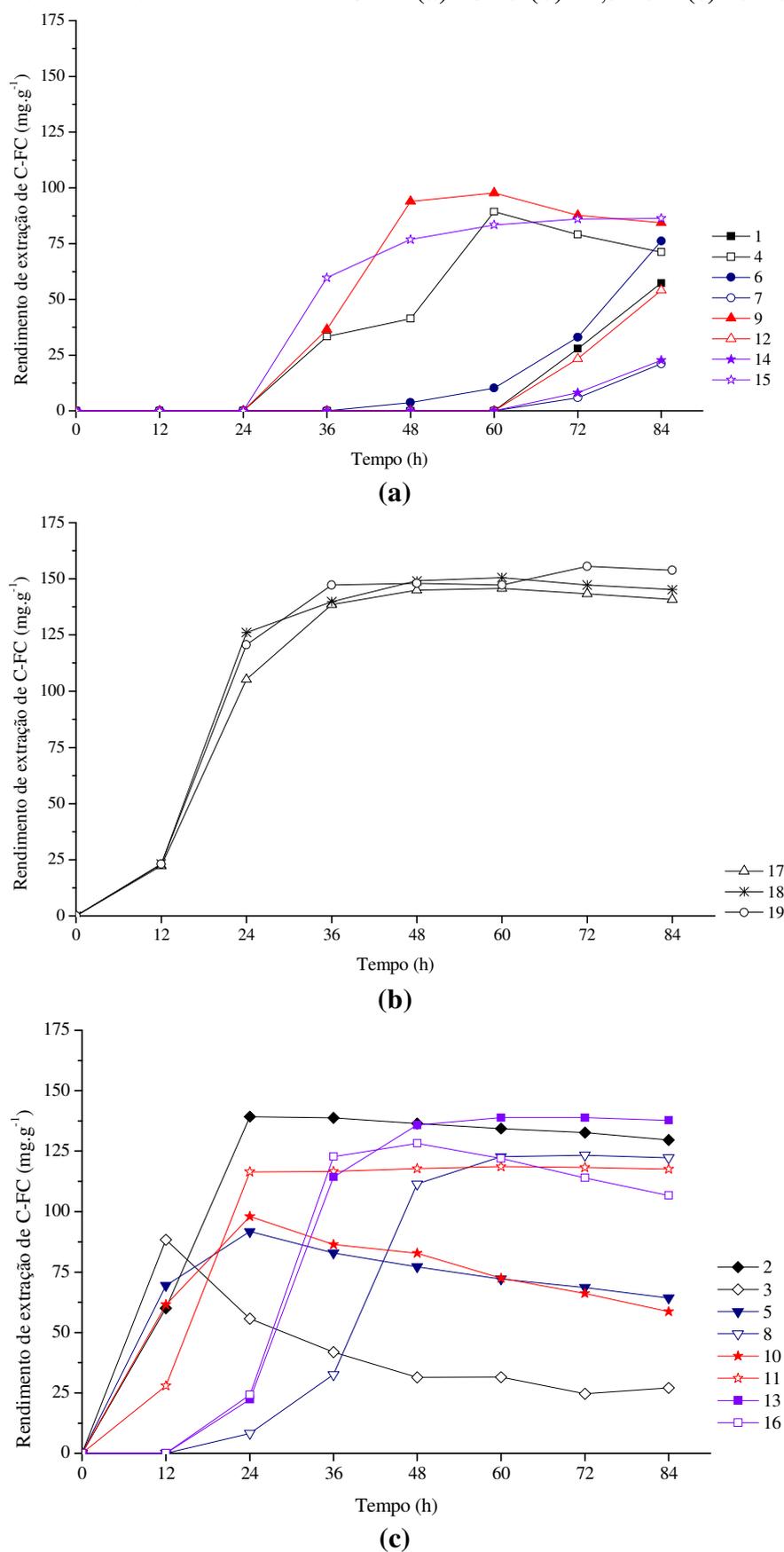
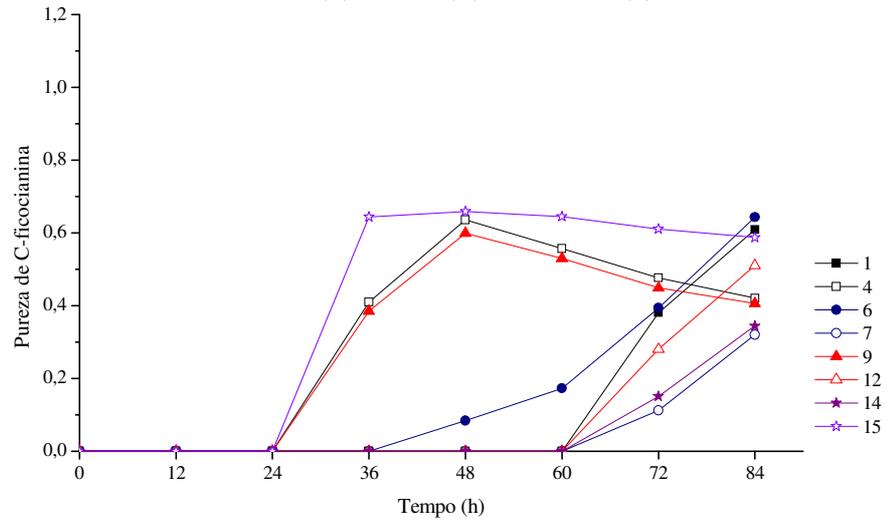
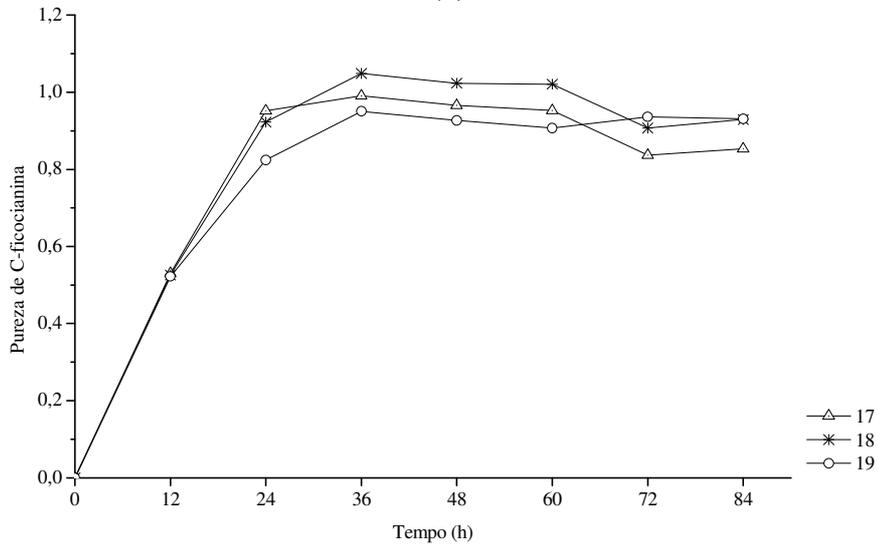


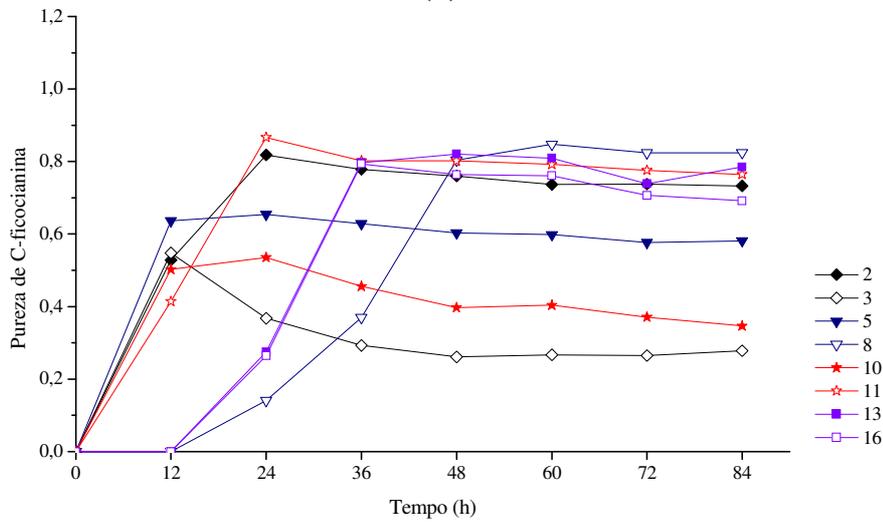
Figura 3 – Pureza de C-ficocianina para cada ensaio do delineamento fatorial fracionado 2⁶⁻² durante 84 h: **(a)** 10 °C **(b)** 17,5 °C e **(c)** 25 °C.



(a)



(b)



(c)

Este estudo visa estabelecer um processo que permita obter concomitantemente o maior rendimento de extração e pureza do extrato de C-FC no menor tempo de extração. Os maiores rendimentos de extração e a maior pureza de C-FC foram obtidos concomitantemente na condição do ponto central (Ensaio 17, 18 e 19, Figuras 2b e 3b). No intervalo de 36 h a 84 h de extração, o rendimento de extração e a pureza de C-FC estabilizaram, variando em média de 141,8 mg·g⁻¹ a 148,7 mg·g⁻¹ e 0,89 a 1,00, respectivamente.

A Figura 4 apresenta os espectros de absorção dos Ensaio 17, 18 e 19, sendo possível verificar que os espectros de absorção a partir de 36 h até 84 h não apresentaram muitas variações na faixa de 280 a 800 nm. Neste sentido, os efeitos das variáveis na extração seletiva de C-FC foram avaliados em 36 h de extração, e os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 – Efeito das variáveis independentes no rendimento de extração (mg·g⁻¹) de C-FC em 36 h de extração.

Variáveis independentes	Efeito	Erro padrão	t (12)	p-valor
Média*	67,97	11,57	5,87	< 0,001
Concentração de EDTA	-4,78	25,22	-0,19	0,853
Concentração de biomassa no agente de ruptura celular	-6,50	25,22	-0,26	0,801
Concentração de biomassa no agente extrator	-5,13	25,22	-0,20	0,842
Tempo de contato da biomassa com agente de ruptura celular	25,88	25,22	1,03	0,325
Temperatura de extração*	75,85	25,22	3,01	0,011
Agitação durante a extração	7,64	25,22	0,30	0,767

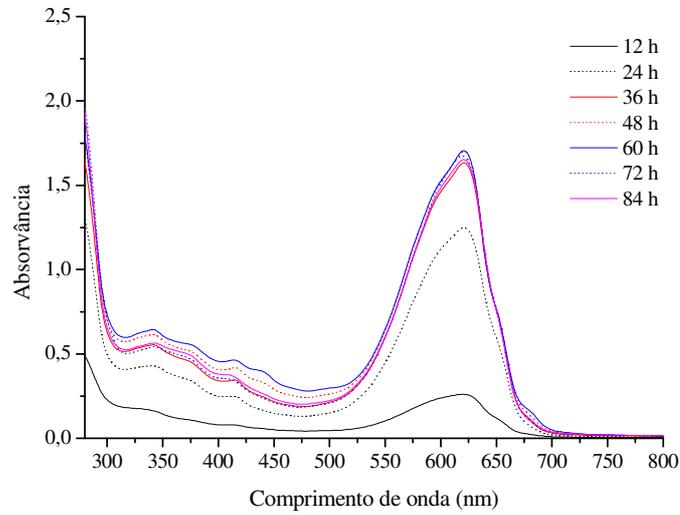
*Efeito significativo considerando $p < 0,10$.

Tabela 5 – Efeito das variáveis na pureza do extrato de C-FC em 36 h de extração.

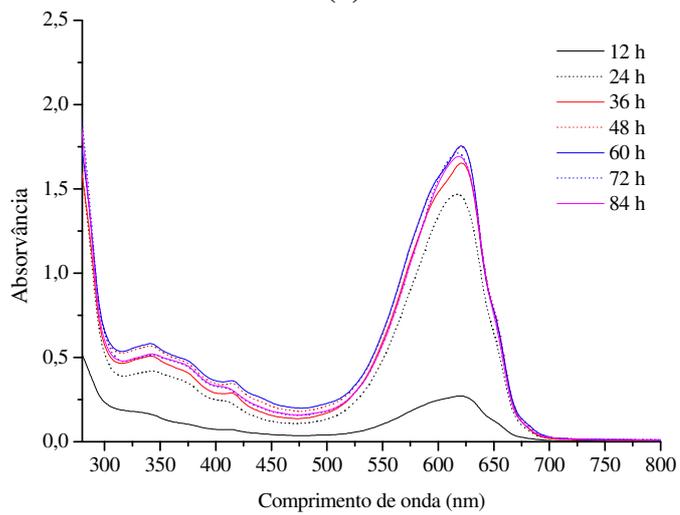
Variáveis independentes	Efeito	Erro padrão	t (12)	p-valor
Média*	0,49	0,08	6,08	< 0,001
Concentração de EDTA	-0,09	0,18	-0,53	0,608
Concentração de biomassa no agente de ruptura celular	0,03	0,18	0,19	0,853
Concentração de biomassa no agente extrator	0,01	0,18	0,08	0,939
Tempo de contato da biomassa com agente de ruptura celular	0,17	0,18	0,99	0,341
Temperatura de extração*	0,44	0,18	2,47	0,030
Agitação durante a extração	0,11	0,18	0,61	0,553

*Efeito significativo considerando $p < 0,10$.

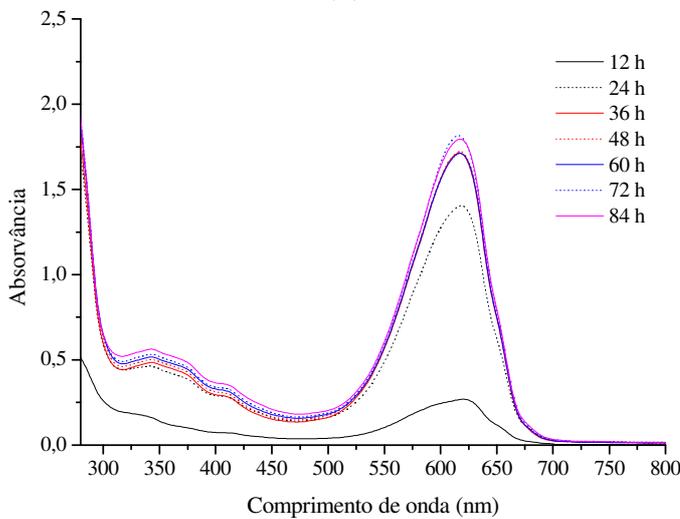
Figura 4 – Espectros de absorção para os (a) Ensaio 17; (b) Ensaio 18; e (c) Ensaio 19 correspondentes ao ponto central do delineamento fatorial fracionado 2^{6-2} durante 84 h de extração.



(a)



(b)



(c)

Conforme pode ser verificado nas Tabelas 4 e 5, apenas a temperatura do processo de extração influenciou significativamente o rendimento de extração e a pureza de C-FC, sendo que quando a temperatura passou de 10 °C para 25 °C, o rendimento de extração aumentou em média cerca de 75,8 mg·g⁻¹ e a pureza aumentou cerca de 0,44.

Considerando que a análise de efeitos do delineamento fatorial fracionado 2⁶⁻² demonstrou que apenas uma variável apresentou efeito significativo ($p < 0,10$) e que os pontos centrais do delineamento apresentaram valores superiores em termos de rendimento de extração e de pureza quando comparado aos demais ensaios, foi realizado a análise de curvatura.

Segundo Rodrigues e Iema (2009), quando se utilizam delineamentos fracionados para uma prévia seleção das variáveis, pode ocorrer que os pontos centrais apresentem valores inferiores ou superiores às demais condições dos ensaios. Quando isso ocorre, o erro padrão fica muito alto, pois na verdade os resultados não podem ser representados por um modelo de 1ª ordem, indicando possível existência de curvatura. Se a curvatura for estatisticamente significativa, o erro padrão diminui, conseqüentemente o t_{cal} aumenta e o p -valor diminui e as variáveis estatisticamente significativas deixam de ficar “mascaradas” pelo erro padrão que estava alto em razão dos pontos centrais.

As Tabelas 6 e 7 apresentam a análise de efeitos após a checagem da curvatura. Conforme pode ser verificado, a curvatura é significativa para ambas respostas – rendimento de extração e pureza. No entanto, mesmo após a checagem da curvatura, apenas a variável temperatura influenciou o rendimento de extração de C-FC e a pureza do extrato.

Tabela 6 – Efeito das variáveis independentes no rendimento de extração (mg·g⁻¹) de C-FC em 36 h de extração (após checagem de curvatura).

Variáveis independentes	Efeito	Erro padrão	t (11)	p-valor
Média*	54,11	7,93	6,82	< 0,001
Curvatura*	175,48	39,93	4,40	0,001
Concentração de EDTA	-4,78	15,86	-0,30	0,769
Concentração de biomassa no agente de ruptura celular	-6,50	15,86	-0,41	0,690
Concentração de biomassa no agente extrator	-5,13	15,86	-0,32	0,753
Tempo de contato da biomassa com agente de ruptura celular	25,88	15,86	1,63	0,131
Temperatura de extração*	75,85	15,86	4,78	0,001
Agitação durante a extração	7,64	15,86	0,48	0,640

*Efeito significativo considerando $p < 0,10$.

Tabela 7 – Efeito das variáveis na pureza do extrato de C-FC em 36 h de extração (após checagem de curvatura).

Variáveis independentes	Efeito	Erro padrão	t (11)	p-valor
Média*	0,40	0,06	6,90	< 0,001
Curvatura*	1,20	0,29	4,13	0,002
Concentração de EDTA	-0,09	0,12	-0,81	0,437
Concentração de biomassa no agente de ruptura celular	0,03	0,12	0,29	0,778
Concentração de biomassa no agente extrator	0,01	0,12	0,12	0,907
Tempo de contato da biomassa com agente de ruptura celular	0,17	0,12	1,52	0,158
Temperatura de extração*	0,44	0,12	3,78	0,003
Agitação durante a extração	0,11	0,12	0,93	0,370

*Efeito significativo considerando $p < 0,10$.

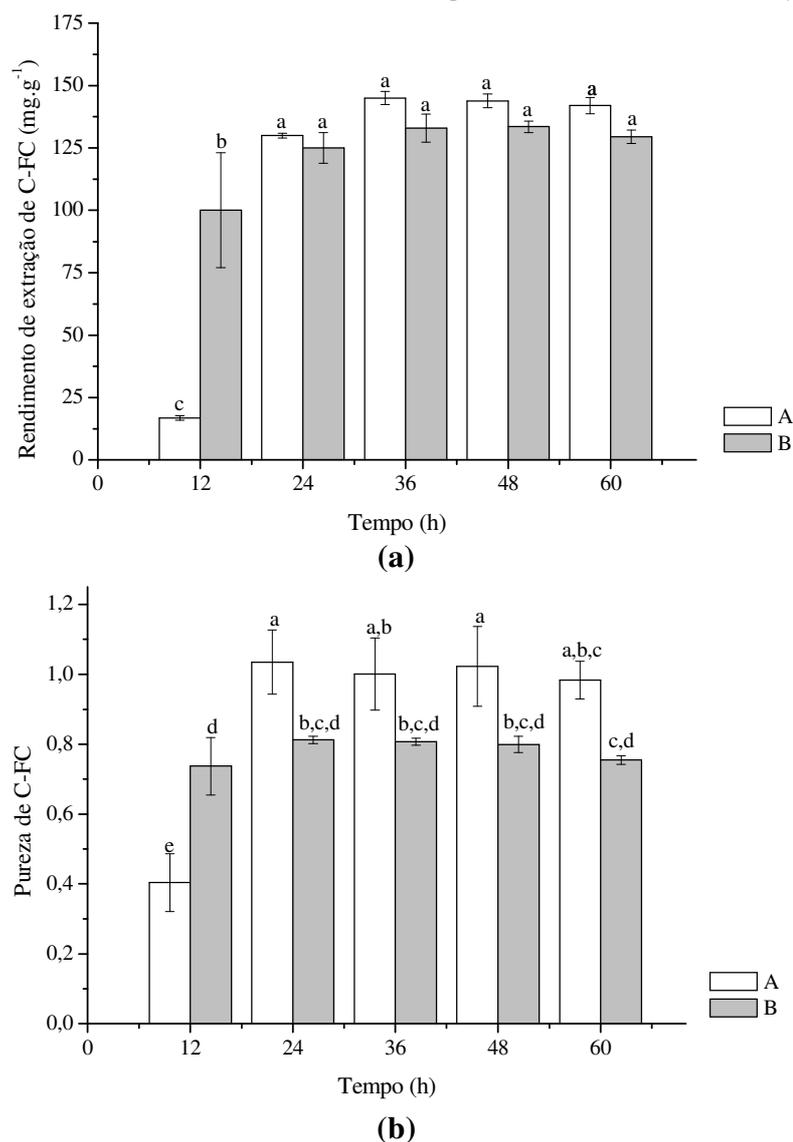
A influência da temperatura em processo de extração e C-FC tem sido reportada (MARTÍNEZ et al., 2016; SILVEIRA et al., 2007). A pureza do extrato de C-FC foi influenciada significativamente pelo aumento na temperatura do processo de extração de 23,6 °C para 41 °C, o que resultou na redução da pureza em torno de 0,05, uma vez que facilitou a extração de proteínas contaminantes (SILVEIRA et al., 2007). O aumento da temperatura do processo de 25 °C para 40 °C influenciou positivamente no rendimento de extração de C-FC ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) enquanto que a pureza do extrato não foi alterada (MARTÍNEZ et al., 2016).

A análise estatística dos resultados do delineamento fatorial fracionado indicou que a concentração de EDTA, concentração de biomassa no agente de ruptura celular, concentração de biomassa no agente extrator, tempo de contato da biomassa com agente de ruptura celular, e agitação durante a extração sejam mantidas no nível inferior (-1), e a temperatura no nível superior (+1) ou ainda que se estudem temperaturas de extração acima de 25 °C.

Conforme descrito anteriormente o ponto central apresentou os melhores resultados para a extração seletiva de C-FC, assim este não foi descartado. Neste sentido, foram realizados dois ensaios, descritos na Tabela 3: (i) condições experimentais que o delineamento fatorial fracionado 2^{6-2} indicou (Ensaio A); (ii) condições experimentais do ponto central do delineamento fatorial fracionado 2^{6-2} com exceção da temperatura do processo de extração que foi de 25 °C (Ensaio B). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5. Nestes ensaios o rendimento de extração (Figura 5a) variou de 16,8 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (Ensaio

A, 12 h) a $145,03 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (Ensaio A, 36 h) e a pureza do extrato de C-FC (Figura 5b) variou de 0,4 (Ensaio A, 12 h) a 1,03 (Ensaio A, 24 h). A cinética de extração de C-FC (Figura 5) atinge um máximo de rendimento e pureza de C-FC em 24 h e estabiliza após este período de extração.

Figura 5 – (a) Rendimento de extração e (b) pureza de C-FC na maximização da extração seletiva de C-FC utilizando EDTA durante 60 h. Letras iguais entre as médias não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância (Teste de *Tukey*).



O Ensaio B foi realizado nas mesmas condições do ponto central do delineamento fatorial fracionado 2^{6-2} (Ensaios 17, 18 e 19) com exceção da temperatura a qual foi de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Assim, a Tabela 8 apresenta o tratamento estatístico dos dados entre estes dois ensaios. A mudança da temperatura do processo de $17,5 \text{ }^\circ\text{C}$ (Ensaio 17, 18 e 19) para $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (Ensaio B) influenciou negativamente na pureza do extrato de C-FC (24 a 60 h após a extração),

enquanto que o rendimento de extração foi alterado apenas nos tempos iniciais de extração (12 h). O aumento na temperatura favoreceu a extração de outras proteínas contaminantes, o que pode ser verificado pelo espectro de absorção a 280 nm (Figura 6b e Figura 4), e assim a pureza do extrato de C-FC extraído a 25 °C foi em média 17% menor quando comparado a 17,5 °C, concordando com os resultados obtidos anteriormente por Silveira et al. (2007). Dessa forma, estudar temperaturas acima de 25 °C (temperatura ambiente) além de onerar o processo de extração, provavelmente, diminuiria a pureza.

Tabela 8 – Rendimento de extração e pureza de C-FC dos Ensaios 17, 18 e 19 realizados a 17,5 °C e Ensaio B realizado a 25 °C. Letras iguais entre as médias não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância (Teste de Tukey).

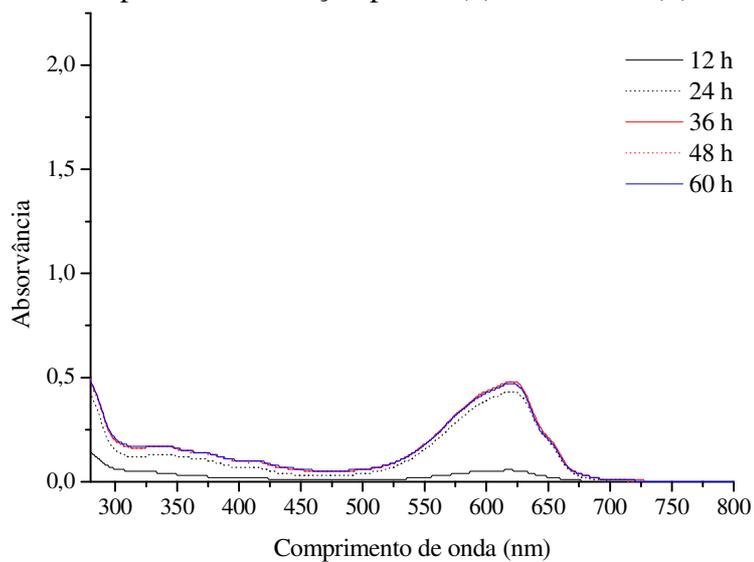
Tempo (h)	Rendimento de extração (mg·g ⁻¹)		Pureza	
	Ensaio 17, 18 e 19	Ensaio B	Ensaio 17, 18 e 19	Ensaio B
12	22,9 ± 0,5 ^d	100,1 ± 23,0 ^c	0,53 ± 0,01 ^d	0,74 ± 0,08 ^c
24	117,32 ± 10,8 ^{bc}	125,0 ± 6,2 ^{abc}	0,90 ± 0,07 ^{ab}	0,81 ± 0,01 ^{bc}
36	141,8 ± 4,7 ^{ab}	132,9 ± 5,6 ^{ab}	1,00 ± 0,05 ^a	0,81 ± 0,01 ^{bc}
48	147,4 ± 2,2 ^a	133,5 ± 2,3 ^{ab}	0,97 ± 0,05 ^a	0,80 ± 0,02 ^{bc}
60	147,8 ± 2,5 ^a	129,4 ± 2,7 ^{ab}	0,96 ± 0,06 ^a	0,75 ± 0,01 ^c

A Figura 6 apresenta os espectros de absorção para os Ensaios A e B. É possível verificar que a extração é mais seletiva no Ensaio A, uma vez que não há uma grande absorção por parte de outros compostos, os quais são extraídos na faixa de 300 – 500 nm. Aliando ambas respostas – rendimento de extração e pureza, ao menor tempo de extração, o Ensaio A em 24 h se destaca, obtendo-se pureza do extrato de C-FC 1,03 ± 0,09 e rendimento de extração 129,9 ± 1,0 mg·g⁻¹.

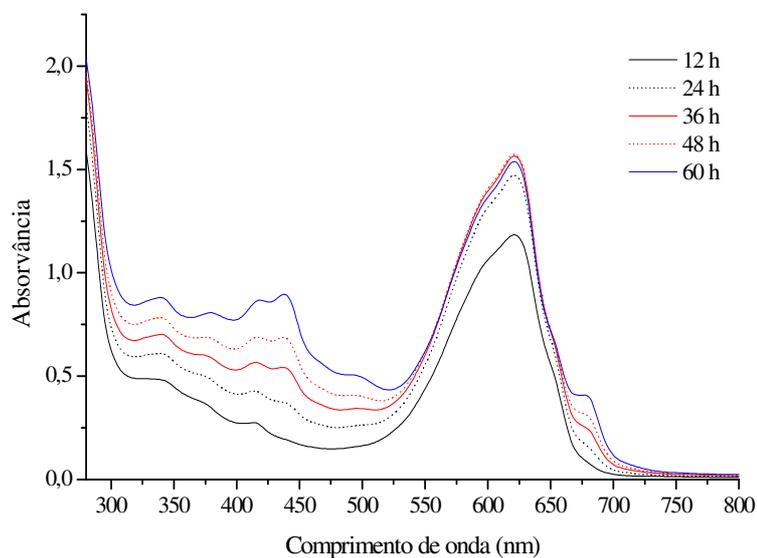
Os processos de extração de C-ficocianina da biomassa de *S. platensis* LEB-52 foram estudados por Silveira et al. (2007), Moraes, Burkert e Kalil (2010) e Moraes et al. (2011b). O processo de extração proposto por Silveira et al. (2007) foi secar a biomassa (40 °C por 48 h), congelar (-18 °C), moer (diâmetro de partícula menor de 0,106 mm), e ressuspender a biomassa com concentração de 0,08 g·mL⁻¹ em água. O processo de extração ocorreu por 4 h, a 25 °C e com agitação orbital de 100 rpm. O extrato de C-FC obtido apresentou pureza de 0,46 e rendimento de extração de 46,8 mg·g⁻¹. No estudo de Moraes, Burkert e Kalil (2010) a biomassa foi seca (40 °C até atingir umidade de 12%), congelada (-18 °C) e moída (diâmetro de partícula entre 0,106 e 0,125 mm). A biomassa foi ressuspensa em água com concentração de 0,16 g·mL⁻¹. O processo de extração ocorreu durante 1 h, a 25 °C e sem agitação. Ao final, o extrato de C-FC apresentou pureza de 0,60 e

rendimento de extração de $82,5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. No estudo de Moraes et al. (2011b), a C-FC foi obtida a partir da biomassa úmida, ressuspensa em água ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) e submetida ao banho ultrassônico (50 kHz), com pérolas de vidro, durante 40 min. O rendimento do processo de extração de C-FC foi de $43,75 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$.

Figura 6 – Espectro de absorção para o (a) Ensaio A e (b) Ensaio B.



(a)



(b)

A extração de C-FC proveniente de outras cepas de *Spirulina* é reportada na literatura (AFTARI et al., 2015; MARTÍNEZ et al., 2016; ORES; AMARANTE; KALIL, 2016; PRABUTHAS et al., 2011). Nestes trabalhos, os rendimentos de extração foram $159,9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (MARTÍNEZ et al., 2016), $86,3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (PRABUTHAS et al., 2011) e

35,5 mg·g⁻¹ de C-FC (AFTARI et al., 2015); e as purezas do extrato de C-FC foram 0,46 (MARTÍNEZ et al., 2016), 0,65 (AFTARI et al., 2015) e 1,32 (PRABUTHAS et al., 2011).

C-FC de *S. platensis* LEB-52 com grau de pureza alimentar (> 0,7) até então só era obtida quando purificada por sistema aquoso bifásico (ANTELO et al., 2010), precipitação com sulfato de amônio (SILVA et al., 2009), cromatografia de troca iônica (MORAES; KALIL, 2009; MORAES et al., 2011a; SILVEIRA et al., 2008) e ultrafiltração (FIGUEIRA, 2014). Neste sentido, este estudo é inovador uma vez que é possível extrair seletivamente C-ficocianina de *Spirulina platensis* LEB-52 com grau de pureza alimentar sem processos de purificação.

Para verificar a quantidade de C-FC que é perdida quando a biomassa é seca a 40 °C (até atingir umidade de 12%) e congelada, foi realizado um teste, a C-FC foi extraída a partir da biomassa seca nas melhores condições estabelecidas para a biomassa úmida. Com a biomassa seca, o rendimento de extração foi de 63,8 ± 4,2 mg·g⁻¹ e pureza de 0,6 ± <0,1, isto representa uma perda de 50% no conteúdo intracelular de C-FC, corroborando com os resultados obtidos por Sarada; Pillai e Ravishankar (1999). Este resultado demonstra a importância de se utilizar a biomassa úmida para a obtenção de C-FC.

3.1 CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE C-FC POR ULTRAFILTRAÇÃO

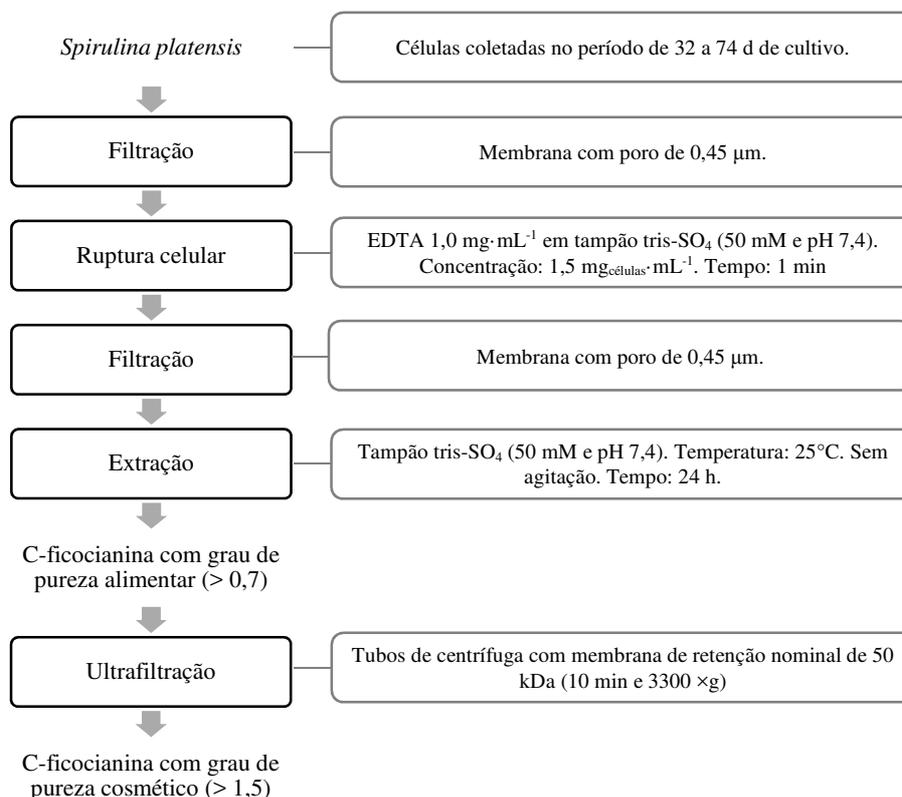
Os resultados obtidos para a concentração e purificação de C-FC estão apresentados na Tabela 9. Na ultrafiltração foi utilizado membrana com retenção nominal de 50 kDa com base no trabalho de Figueira (2014) . A C-ficocianina permaneceu na fração retida conforme esperado, uma vez que a massa molar da C-ficocianina é cerca de 120 kDa, e esta não foi detectada na fração permeada. Na fração permeada, foi verificado a presença de proteínas contaminantes (A₂₈₀). Estas proteínas que possuem massa molar inferior a 50 kDa permearam pela membrana. A remoção das proteínas contaminantes permitiu um incremento de 50% na pureza de C-FC. A recuperação média de C-FC após a ultrafiltração foi de 93,4%, parte deste bioproduto ficou aderido à membrana. Além disso, durante o processo de ultrafiltração, foi possível concentrar (mg·mL⁻¹) a C-FC cerca de 8,8 vezes.

Figueira (2014) estudou a concentração e purificação de C-ficocianina de *Spirulina platensis* LEB-52 utilizando a ultrafiltração/diafiltração, após 6 ciclos de diafiltração obteve um extrato com pureza de 0,91 e recuperação de 92%.

Tabela 9 – Concentração, pureza e recuperação de C-FC após o processo de ultrafiltração.

Frações	Concentração de C-ficocianina (mg·mL ⁻¹)	Pureza	Recuperação de C-ficocianina (%)
Inicial	0,071 ± 0,002	1,08 ± 0,17	100,0
Retida - Ultrafiltração	0,625 ± 0,050	1,62 ± 0,04	93,4 ± 2,9

Visando estabelecer um processo de extração de C-FC que resulte em obter alto rendimento de extração, e pureza de C-FC com grau alimentar, no presente estudo se estabelece um novo protocolo de ruptura celular e extração de C-FC a partir da biomassa úmida de *Spirulina* conforme fluxograma apresentado na Figura 7.

Figura 7 – Processo de obtenção de C-FC com grau de pureza alimentar.

Para a obtenção de C-ficocianina, as células da cianobactéria devem ser cultivadas em meio Zarrouk 100% e coletadas entre 32 e 74 d. As células são recuperadas por filtração e ressuspensas no agente de ruptura celular na concentração de 1,50 mg·mL⁻¹. O agente de ruptura celular é composto por EDTA 1,0 mg·mL⁻¹ diluído em tampão tris-SO₄ (50 mM e pH 7,4). A suspensão é agitada em vórtex por 30 s, e mantida em repouso por 1 min. As células são recuperadas por filtração e ressuspensas com concentração de 0,5 mg·mL⁻¹ no agente

extrator. O agente extrator é composto por tampão tris-SO₄ (50 mM e pH 7,4). O processo de extração é realizado a 25°C e sem agitação. Após 24 h, obtém-se extrato de C-FC com pureza alimentar, acima de 0,7, na ordem de 1,0 e rendimento de extração na faixa de 129,0 mg·g⁻¹. Conforme observado no Artigo 2, o rendimento de extração dependerá do tempo de cultivo das células, sabendo-se que em cultivos com maior tempo podem ser obtidos rendimentos de extração mais elevados. Assim a C-FC obtida pode ser comercializada e utilizada na indústria alimentícia sem processos prévios de purificação. Esta ainda pode ser purificada e concentrada por um processo simples que é a ultrafiltração utilizando os tubos Vivaspin® 15 Turbo com retenção nominal da membrana de 50 kDa, e assim obter C-ficocianina com grau de pureza acima de 1,5, a qual pode ser comercializada como corante em cosméticos.

4 CONCLUSÃO

Foi possível maximizar as condições de ruptura celular e extração de C-ficocianina a partir da biomassa úmida de *Spirulina platensis* LEB-52. A temperatura do processo de extração influenciou significativamente na extração de C-FC, sendo que um incremento na temperatura de 10 °C para 25 °C aumentou o rendimento de extração em 75,8 mg·g⁻¹, e a pureza em 0,44. O processo de ruptura celular consistiu em recuperar as células por filtração, ressuspender no agente de ruptura celular na concentração de 1,50 mg·mL⁻¹. O agente de ruptura celular foi composto por EDTA 1,0 mg·mL⁻¹ diluído em tampão tris-SO₄ (50 mM e pH 7,4). A suspensão foi agitada em vórtex por 30 s, e mantida em repouso por 1 min. As células foram recuperadas por filtração e ressuspensas com concentração de 0,5 mg·mL⁻¹ no agente extrator (tampão tris-SO₄ (50 mM e pH 7,4)). O processo de extração foi realizado a 25°C e sem agitação. Após 24 h, obtém-se extrato de C-FC com pureza alimentar, acima de 0,7, na ordem de 1,0 e rendimento de extração na faixa de 129,0 mg·g⁻¹. A C-FC obtida pode ser comercializada e utilizada na indústria alimentícia sem processos prévios de purificação. Somando-se a isso, a C-FC foi purificada e concentrada por ultrafiltração utilizando os tubos Vivaspin® 15 Turbo com retenção nominal da membrana de 50 kDa, e assim foi obtido C-ficocianina com grau de pureza acima de 1,5, a qual pode ser comercializada como corante em cosméticos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFTARI, R. V.; REZAEI, K.; MORTAZAVI, A.; BANDANI, A. R. The optimized concentration and purity of *Spirulina platensis* C-phycoerythrin: a comparative study on microwave-assisted and ultra

sound-assisted extraction methods. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 3080-3091, 2015.

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

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

BALASUNDARAM, B.; HARRISON, S.; BRACEWELL, D. G. Advances in product release strategies and impact on bioprocess design. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 477-485, 2009.

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

COHEN, Z. The chemical of *Spirulina*. In: VONSHAK, A. (Ed.). ***Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology***. [S.I]: CRC Press, 1997. cap. 10.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; FILHO, P. D.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 603-607, 2002.

FIGUEIRA, F. S. **Purificação de C-ficocianina e sua incorporação em nanofibras**. 2014. 141 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

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

GONZÁLEZ, R.; RODRÍGUEZ, S.; ROMAY, C.; GONZÁLEZ, A.; ARMESTO, J.; REMIREZ, D.; MERINO, N. Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acetic acid-induced colitis in rats. **Pharmacological Research**, v. 39, n. 1, p. 55-59, 1999.

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

KUDDUS, M.; SINGH, P.; THOMAS, G.; AL-HAZIMI, A. Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycoerythrin. **Biomed Research International**, p. 1-9, 2013.

- MARTELLI, G.; FOLLI, C.; VISAI, L.; DAGLIA, M.; FERRARI, D. Thermal stability improvement of blue colorant C-phycoyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 154-159, 2014.
- MARTÍNEZ, J. M.; LUENGO, E.; SALDAÑA, G.; ÁLVAREZ, I.; RASO, J. C-phycoyanin extraction assisted by pulsed electric field from *Arthrospira platensis*. **Food Research International**, 2016.
- MORAES, C. C.; BURKERT, J. F. D.; KALIL, S. J. C-phycoyanin extraction process for large-scale use. **Journal of Food Biochemistry**, v. 34, p. 133-148, 2010.
- MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Strategy for a protein purification design using C-phycoyanin extract. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5312-5317, 2009.
- MORAES, C. C.; ORES, J. C.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Recovery of C-phycoyanin in the presence of cells using expanded bed IEC. **Chromatographia**, v. 74, n. 3-4, p. 307-312, 2011a.
- MORAES, C. C.; SALA, L.; CERVEIRA, G. P.; KALIL, S. J. C-phycoyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 1, p. 45-49, 2011b.
- NAGARAJ, S.; ARULMURUGAN, P.; RAJARAM, M. G.; KARUPPASAMY, K.; JAYAPPRIYAN, K. R.; SUNDARARAJ, R.; VIJAYANAND, N.; RENGASAMY, R. Hepatoprotective and antioxidative effects of C-phycoyanin from *Arthrospira maxima* SAG 25780 in CCl₄-induced hepatic damage rats. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 81-85, 2012.
- ORES, J. C. **Produção e extração da enzima anidrase carbônica e de ficobiliproteínas a partir de microalgas**. 2014. 135 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.
- ORES, J. C.; AMARANTE, M. C. A.; KALIL, S. J. Co-production of carbonic anhydrase and phycobiliproteins by *Spirulina* sp. and *Synechococcus nidulans*. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 219-227, 2016.
- PATIL, G.; CHETHANA, S.; SRIDEVI, A. S.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Method to obtain C-phycoyanin of high purity. **Journal of Chromatography A**, v. 1127, n. 1-2, p. 76-81, 2006.
- PRABUTHAS, P.; MAJUMDAR, S.; SRIVASTAV, P.; MISHRA, H. Standardization of rapid and economical method for nutraceuticals extraction from algae. **Journal of Stored Products and Postharvest Research**, v. 2, n. 5, p. 93-96, 2011.
- REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Repeated batch cultivation of the microalga *Spirulina platensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 937-943, 2006.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009. p. 326.

- SARADA, R.; PILLAI, M. G.; RAVISHANKAR, G. A. Phycocyanin from *Spirulina* sp.: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 8, p. 795-801, 1999.
- SILVA, L. A.; KUHN, K. R.; MORAES, C. C.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Experimental design as a tool for optimization of C-phycocyanin purification by precipitation from *Spirulina platensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 5-12, 2009.
- SILVEIRA, S. T.; BURKERT, J. F. M.; COSTA, J. A. V.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, p. 1629-1634, 2007.
- SILVEIRA, S. T.; QUINES, L. K. M.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Separation of phycocyanin from *Spirulina platensis* using ion exchange chromatography. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n. 5, p. 477-482, 2008.
- THANGAM, R.; SURESH, V.; ASENATH PRINCY, W.; RAJKUMAR, M.; SENTHILKUMAR, N.; GUNASEKARAN, P.; RENGASAMY, R.; ANBAZHAGAN, C.; KAVERI, K.; KANNAN, S. C-Phycocyanin from *Oscillatoria tenuis* exhibited an antioxidant and in vitro antiproliferative activity through induction of apoptosis and G₀/G₁ cell cycle arrest. **Food Chemistry**, v. 140, n. 1-2, p. 262-272, 2013.
- ZARROUK, C. **Contribution a l'etude d'une cianophycee: Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima*** 1966. 83 f. Ph.D. thesis - Faculte des Sciences, Universite de Paris, 1966.

CAPÍTULO IV
CONCLUSÃO GERAL

4 CONCLUSÃO GERAL

O estudo demonstrou que a biomassa de *Spirulina platensis* LEB-52 apresenta-se como uma fonte atrativa para a obtenção simultânea de ficobiliproteínas – C-ficocianina e aloficocianina, e da enzima anidrase carbônica. Estes biocompostos foram obtidos a partir da biomassa úmida de *S. platensis* LEB-52. As condições de extração assistida por ultrassom para obtenção destes bioprodutos foram definidas utilizando-se duas concentrações de biomassa ($0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $23,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Com concentração de $0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ foi necessário o tempo de 12 min de ultrassom para obter C-FC, A-FC e AC (esterase). Para detectar a presença da AC expressa em termos de hidratase a concentração de biomassa foi de $23,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, uma vez que a concentração de AC (expressa em termos de hidratase) nas cianobactérias é muito baixa, e o tempo de ultrassom de 8 min. A extração assistida por ultrassom foi eficaz para a obtenção destes bioprodutos, no entanto se apresenta como um método não seletivo extraindo concomitantemente muitas impurezas e fragmentos celulares. O extrato bruto de AC mostrou potencial para acelerar a reação de hidratação do CO_2 e posterior precipitação deste na forma de carbonato de cálcio, demonstrando que esta enzima proveniente de *S. platensis* LEB-52 pode ser aplicada em processo de captura enzimática de CO_2 .

A cianobactéria produziu simultaneamente as ficobiliproteínas e a enzima ao longo de todo cultivo de *S. platensis* LEB-52 utilizando o Meio Zarrouk 100% (v/v). A máxima concentração intracelular de C-ficocianina ($137,4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) foi obtida em 21 d, sendo esta estatisticamente constante até 74 d de cultivo. A máxima produção intracelular de aloficocianina ($100,4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) foi obtida em 20 d de cultivo, e esta foi estatisticamente constante até 77 d de cultivo. A maior concentração intracelular de anidrase carbônica expressa em termos de esterase ($46,3 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$) foi obtida no 6º d de cultivo. Estes biocompostos podem ser obtidos simultaneamente em 21 d de cultivo sem perdas na concentração intracelular de ficobiliproteínas, $137,4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de C-ficocianina e $104,4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de aloficocianina, e com atividade de anidrase carbônica expressa em termos de esterase de $26,6 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$. Também, foi observado que existe uma correlação entre a atividade de esterase e hidratase da anidrase carbônica ao longo do cultivo de *S. platensis* LEB-52. Assim, é possível utilizar a atividade de esterase – que é uma técnica mais simples e rápida, além disso, não necessita de arrefecimento (em contraste com a reação de hidratase) – para monitorar a anidrase carbônica ao longo dos cultivos e processos.

Um método inovador de ruptura celular e extração de C-ficocianina com grau de pureza alimentar ($> 0,7$) utilizando como agente de ruptura celular o LI acetato de

trietilamônio ou agente quelante EDTA diluídos em tampão tris-SO₄ (pH 7,4 e 50 mM) foi proposto. Ambos agentes de ruptura celular podem ser utilizados para a extração seletiva de C-FC, no entanto por uma questão econômica, optou-se pelo EDTA. Quando as células de *S. platensis* foram tratadas com EDTA, foi possível obter em 24 h, C-FC com pureza de 1,01 e rendimento de extração de 153,0 mg·g⁻¹. A C-FC obtida nestas condições pode ser utilizada na indústria de alimentos como corante natural sem processos de purificação.

As condições de ruptura celular e extração foram maximizadas avaliando-se a influência de seis variáveis utilizando um delineamento fatorial fracionado 2⁶⁻². A temperatura do processo de extração influenciou significativamente na extração de C-FC, sendo que um incremento na temperatura de 10 °C para 25 °C aumentou o rendimento de extração em 75,8 mg·g⁻¹, e a pureza em 0,44. O processo de ruptura celular consistiu em recuperar as células por filtração e ressuspender no agente de ruptura celular na concentração de 1,50 mg·mL⁻¹. O agente de ruptura celular foi composto por EDTA 1,0 mg·mL⁻¹ diluído em tampão tris-SO₄ (50 mM e pH 7,4). A suspensão foi agitada em vórtex por 30 s, e mantida em repouso por 1 min. As células foram recuperadas por filtração e ressuspensas com concentração de 0,5 mg·mL⁻¹ no agente extrator (tampão tris-SO₄ (50 mM e pH 7,4)). O processo de extração foi realizado a 25 °C e sem agitação. Após 24 h, obtém-se extrato de C-FC com pureza alimentar, acima de 0,7, na ordem de 1,0 e rendimento de extração na faixa de 129,0 mg·g⁻¹. A C-FC obtida pode ser comercializada e utilizada na indústria alimentícia sem processos prévios de purificação. Somando-se a isso, a C-FC foi purificada e concentrada por ultrafiltração utilizando os tubos Vivaspín® 15 Turbo com retenção nominal da membrana de 50 kDa, e assim foi obtido C-ficocianina com grau de pureza acima de 1,5, a qual pode ser comercializada como corante em cosméticos.

5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Purificar por precipitação e cromatografia de troca iônica a C-ficocianina obtida através da extração com EDTA;
- Estudar a purificação simultânea da anidrase carbônica e C-ficocianina obtida através da extração com o ultrassom;
- Estudar a estabilidade da C-ficocianina obtida através da extração com EDTA;
- Caracterizar a biomassa residual obtida após a extração com o ultrassom.

CAPÍTULO V
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALDE, J.; BETANCOURT, L.; TORRES, E.; CID, A.; BAR

WELL, C. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. **Plant Science**, v. 136, n. 1, p. 109-120, 1998.

ADIR, N. Elucidation of the molecular structures of components of the phycobilisome: reconstructing a giant. **Photosynthesis Research**, v. 85, n. 1, p. 15-32, 2005.

AFTARI, R. V.; REZAEI, K.; MORTAZAVI, A.; BANDANI, A. R. The optimized concentration and purity of *Spirulina platensis* C-phycocyanin: a comparative study on microwave-assisted and ultrasound-assisted extraction methods. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 3080-3091, 2015.

AIZAWA, K.; MIYACHI, S. Carbonic-anhydrase and CO₂ concentrating mechanisms in microalgae and cyanobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 39, n. 3, p. 215-233, 1986.

AJAYAN, K. V.; SELVARAJU, M.; THIRUGNANAMOORTHY, K. Enrichment of chlorophyll and phycobiliproteins in *Spirulina platensis* by the use of reflector light and nitrogen sources: an *in-vitro* study. **Biomass and Bioenergy**, v. 47, p. 436-441, 2012.

AMBROZOVA, J.; MISURCOVA, L.; VICHA, R.; MACHU, L.; SAMEK, D.; BARON, M.; MLCEK, J.; SOCHOR, J.; JURIKOVA, T. Influence of extractive solvents on lipid and fatty acids content of edible freshwater algal and seaweed products, the green microalga *Chlorella kessleri* and the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Molecules**, v. 19, n. 2, p. 2344, 2014.

ANDRADE, M. D.; COSTA, J. A. V. Culture of microalga *Spirulina platensis* in alternative sources of nutrients. **Ciencia E Agrotecnologia**, v. 32, n. 5, p. 1551-1556, 2008a.

ANDRADE, M. D. R.; CAMERINI, F. V.; COSTA, J. A. V. Perda química de carbono e cinética do crescimento celular em cultivos de *Spirulina*. **Química Nova**, v. 31, p. 2031-2034, 2008.

ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. Outdoor and indoor cultivation of *Spirulina platensis* in the extreme south of Brazil. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 63, n. 1-2, p. 85-90, 2008b.

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

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

- ATTRI, P.; VENKATESU, P.; KUMAR, A. Activity and stability of α -chymotrypsin in biocompatible ionic liquids: enzyme refolding by triethyl ammonium acetate. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 7, p. 2788-2796, 2011.
- AZEVEDO, A. M.; ROSA, P. A. J.; FERREIRA, I. F.; AIRES-BARROS, M. R. Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 240-247, 2009.
- BADGER, M. R.; PRICE, G. D. The CO₂ concentrating mechanism in cyanobacteria and microalgae. **Physiologia Plantarum**, v. 84, n. 4, p. 606-615, 1992.
- BADGER, M. R.; PRICE, G. D. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 45, p. 369-392, 1994.
- BADGER, M. R.; PRICE, G. D. CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 383, p. 609-622, 2003.
- BAIER, A.; WINKLER, W.; KORTE, T.; LOCKAU, W.; KARRADT, A. Degradation of phycobilisomes in *Synechocystis* sp. PCC6803. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 17, p. 11755-11766, 2014.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**. McGraw-Hill, 1986. p.
- BALASUNDARAM, B.; HARRISON, S.; BRACEWELL, D. G. Advances in product release strategies and impact on bioprocess design. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 477-485, 2009.
- BARBA, F. J.; GRIMI, N.; VOROBIEV, E. New approaches for the use of non-conventional cell disruption technologies to extract potential food additives and nutraceuticals from microalgae. **Food Engineering Reviews**, v. 7, n. 1, p. 45-62, 2015.
- BASU, S.; ROY, A. S.; MOHANTY, K.; GHOSHAL, A. K. CO₂ biofixation and carbonic anhydrase activity in *Scenedesmus obliquus* SA1 cultivated in large scale open system. **Bioresource Technology**, v. 164, p. 323-330, 2014.
- BAYRAM, E.; SENTURK, M.; KUFREVIOGLU, O. I.; SUPURAN, C. T. *In vitro* inhibition of salicylic acid derivatives on human cytosolic carbonic anhydrase isozymes I and II. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 20, p. 9101-9105, 2008.
- BECERRA, M.; RODRIGUEZ-BELMONTE, E.; CERDAN, M. E.; SISO, M. I. G. Extraction of intracellular proteins from *Kluyveromyces lactis*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 135-139, 2001.

BELAY, A. Mass culture of *Spirulina* outdoors - the Earthrise farms experience. In: VONSHAK, A. (Ed.). *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell Biology, and Biotechnology*. 1997. cap.

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

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

BOND, G. M.; STRINGER, J.; BRANDVOLD, D. K.; SIMSEK, F. A.; MEDINA, M.-G.; EGELAND, G. Development of integrated system for biomimetic CO₂ sequestration using the enzyme carbonic anhydrase. *Energy & Fuels*, v. 15, n. 2, p. 309-316, 2001.

BOONE, C. D.; GILL, S.; HABIBZADEGAN, A.; MCKENNA, R. Carbonic anhydrase: an efficient enzyme with possible global implications. *International Journal of Chemical Engineering*, v. 2013, p. 1-6, 2013.

BRYANT, D.; GUGLIELMI, G.; DE MARSAC, N.; CASTETS, A.-M.; COHEN-BAZIRE, G. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Archives of Microbiology*, v. 123, n. 2, p. 113-127, 1979.

CASTRO, M. D. L.; GARCÍA, J. L. L. Analytical uses of ultrasounds. In: CASTRO, M. D. L. e GARCÍA, J. L. L. (Ed.). *Acceleration and automation of solid sample treatment*. Amsterdam: Elsevier Science, 2002. cap.

CENTOFANTI, M.; MANNI, G. L.; NAPOLI, D.; BUCCI, M. G. Comparative effects on intraocular pressure between systemic and topical carbonic anhydrase inhibitors: a clinical masked, cross-over study. *Pharmacological Research*, v. 35, n. 5, p. 481-485, 1997.

CHAUHAN, V. S.; KOTHARI, R. M.; RAMAMURTHY, V. Method for efficient extraction of phycocyanin from *Spirulina*. *Biotechnology Techniques*, v. 8, n. 7, p. 525-528, 1994.

CHEN, C.-Y.; KAO, P.-C.; TSAI, C.-J.; LEE, D.-J.; CHANG, J.-S. Engineering strategies for simultaneous enhancement of C-phycoyanin production and CO₂ fixation with *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*, v. 145, p. 307-312, 2013.

CHOI, S. A.; OH, Y. K.; JEONG, M. J.; KIM, S. W.; LEE, J. S.; PARK, J. Y. Effects of ionic liquid mixtures on lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. *Renewable Energy*, v. 65, p. 169-174, 2014.

COGNE, G.; GROS, J. B.; DUSSAP, C. G. Identification of a metabolic network structure representative of arthrospira (spirulina) platensis metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 84, n. 6, p. 667-676, 2003.

COHEN, Z. The chemical of *Spirulina*. In: VONSHAK, A. (Ed.). *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*. [S.I]: CRC Press, 1997. cap. 10.

COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; FILHO, P. D.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 7, p. 603-607, 2002.

DAI, Y. M.; CHEN, K. T.; CHEN, C. C. Study of the microwave lipid extraction from microalgae for biodiesel production. **Chemical Engineering Journal**, v. 250, p. 267-273, 2014.

DE FARIA, J. T.; ROCHA, P. F.; CONVERTI, A.; PASSOS, F. M. L.; MINIM, L. A.; SAMPAIO, F. C. Statistical investigation of *Kluyveromyces lactis* cells permeabilization with ethanol by response surface methodology. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1067-1074, 2013.

DEL RIO-CHANONA, E. A.; ZHANG, D.; XIE, Y.; MANIRAFASHA, E.; JING, K. Dynamic simulation and optimization for *Arthrospira platensis* growth and c-phycoyanin production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 54, n. 43, p. 10606-10614, 2015.

DELVES-BROUGHTON, J. The use of EDTA to enhance the efficacy of nisin towards gram-negative bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 32, n. 1-3, p. 87-97, 1993.

DESAI, R. K.; STREEFLAND, M.; WIJFFELS, R. H.; EPPINK, M. H. M. Novel astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis* using cell permeabilising ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 18, p. 1261-1267, 2016.

DEY, S.; RATHOD, V. K. Ultrasound assisted extraction of β -carotene from *Spirulina platensis*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 271-276, 2013.

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

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

FAJARDO, A. R.; CERDAN, L. E.; MEDINA, A. R.; FERNANDEZ, F. G. A.; MORENO, P. A. G.; GRIMA, E. M. Lipid extraction from the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, n. 2, p. 120-126, 2007.

FARIDI, S.; SATYANARAYANA, T. Novel alkalistable α -carbonic anhydrase from the polyextremophilic bacterium *Bacillus halodurans*: characteristics and applicability in flue gas CO₂ sequestration. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 15, p. 15236-15249, 2016.

FAVRE, N.; CHRIST, M. L.; PIERRE, A. C. Biocatalytic capture of CO₂ with carbonic anhydrase and its transformation to solid carbonate. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 60, n. 3-4, p. 163-170, 2009.

FENTON, D. M. Solvent treatment for β -d-galactosidase release from yeast cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 4, n. 4, p. 229-232, 1982.

FIGUEIRA, F. S. **Purificação de C-ficocianina e sua incorporação em nanofibras**. 2014. 141 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

FLORES, M. V.; VOGET, C. E.; ERTOLA, R. J. J. Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces lactis*) with organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 4, p. 340-346, 1994.

FURUKI, T.; MAEDA, S.; IMAJO, S.; HIROI, T.; AMAYA, T.; HIROKAWA, T.; ITO, K.; NOZAWA, H. Rapid and selective extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis* with ultrasonic cell disruption. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, n. 4, p. 319-324, 2003.

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

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

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

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

GERDE, J. A.; MONTALBO-LOMBOY, M.; YAO, L. X.; GREWELL, D.; WANG, T. Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 175-181, 2012.

GHOSHAL, D.; DAVID HUSIC, H.; GOYAL, A. Dissolved inorganic carbon concentration mechanism in *Chlamydomonas moewusii*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 4, p. 299-305, 2002.

GLAZER, A. N. Phycobiliproteins - a family of valuable, widely used fluorophores. **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 2, p. 105-112, 1994.

GONZÁLEZ, R.; RODRÍGUEZ, S.; ROMAY, C.; GONZÁLEZ, A.; ARMESTO, J.; REMIREZ, D.; MERINO, N. Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acetic acid-induced colitis in rats. **Pharmacological Research**, v. 39, n. 1, p. 55-59, 1999.

GOVINDJEE; SHEVELA, D. Adventures with cyanobacteria: a personal perspective. **Frontiers in Plant Science**, v. 2, 2011.

HADIYANTO, H. Response surface optimization of ultrasound assisted extraction (UAE) of phycocyanin from microalgae *Spirulina platensis*. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 28, n. 4, p. 227, 2016.

HADIYANTO, H.; MARSYA, M. A.; FATKHIYATUL, P. Improved yield of β -carotene from microalgae *Spirulina platensis* using ultrasound assisted extraction. **Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)**, v. 77, n. 1, p. 219-222, 2015.

HENRY, R. P. Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. **Annual Review of Physiology**, v. 58, p. 523-538, 1996.

HEWETT-EMMETT, D.; TASHIAN, R. E. Functional diversity, conservation, and convergence in the evolution of the α -, β -, and γ -carbonic anhydrase gene families. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 5, n. 1, p. 50-77, 1996.

HILTONEN, T.; KARLSSON, J.; PALMQVIST, K.; CLARKE, A.; SAMUELSSON, G. Purification and characterisation of an intracellular carbonic anhydrase from the unicellular green alga *Coccomyxa*. **Planta**, v. 195, n. 3, p. 345-351, 1995.

HO, S. H.; CHEN, C. Y.; CHANG, J. S. Effect of light intensity and nitrogen starvation on CO₂ fixation and lipid/carbohydrate production of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. **Bioresource Technology**, v. 113, p. 244-252, 2012.

HOLT, J. G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9^o. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p.

HOUGHTON, J. T.; DING, Y.; GRIGGS, D. J.; NOGUER, M.; VAN DER LINDEN, P. J.; DAI, X.; MASKELL, K.; JOHNSON, C. **Climate change 2001: the scientific basis**. New York: Cambridge University Press 2001. 881 p.

HOUGHTON, R. A. Balancing the global carbon budget. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, v. 35, p. 313-347, 2007.

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

IPCC. **INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. Chapter 5: Drivers, Trends and Mitigation**. [S.I.]: [s.n], 2014. 94 p.

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

JUNG, T. M.; DAILEY, M. O. A novel and inexpensive source of allophycocyanin for multicolor flow-cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 121, n. 1, p. 9-18, 1989.

KANTH, B. K.; LEE, J.; PACK, S. P. Carbonic anhydrase: its biocatalytic mechanisms and functional properties for efficient CO₂ capture process development. **Engineering in Life Sciences**, v. 13, n. 5, p. 422-431, 2013.

KANTH, B. K.; MIN, K.; KUMARI, S.; JEON, H.; JIN, E. S.; LEE, J.; PACK, S. P. Expression and Characterization of Codon-Optimized Carbonic Anhydrase from *Dunaliella* Species for CO₂ Sequestration Application. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 8, p. 2341-2356, 2012.

KERIS-SEN, U. D.; SEN, U.; SOYDEMIR, G.; GUROL, M. D. An investigation of ultrasound effect on microalgal cell integrity and lipid extraction efficiency. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 407-413, 2014.

KHALIFAH, R. G. The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase: I. Stop-flow kinetic studies on the native human isoenzymes B and C. **Journal of Biological Chemistry**, v. 246, n. 8, p. 2561-2573, 1971.

KIM, I. G.; JO, B. H.; KANG, D. G.; KIM, C. S.; CHOI, Y. S.; CHA, H. J. Biomineralization-based conversion of carbon dioxide to calcium carbonate using recombinant carbonic anhydrase. **Chemosphere**, v. 87, n. 10, p. 1091-1096, 2012.

KOEHNE, B.; TRISSL, H. W. The cyanobacterium *Spirulina platensis* contains a long wavelength-absorbing pigment C738 (F76077K) at room temperature. **Biochemistry**, v. 37, n. 16, p. 5494-500, 1998.

KOMAROVA, Y. M.; TEREKHOVA, I. V.; DOMAN, N. G.; AL'BITSKAYA, O. N. Carbonic anhydrase of blue-green alga *Spirulina platensis*. **Biokhimiya**, v. 41, n. 1, p. 183-187, 1976.

KONG, W. B.; LIU, N.; ZHANG, J.; YANG, Q.; HUA, S. F.; SONG, H.; XIA, C. G. Optimization of ultrasound-assisted extraction parameters of chlorophyll from *Chlorella vulgaris* residue after lipid separation using response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 9, p. 2006-2013, 2014.

KUDDUS, M.; SINGH, P.; THOMAS, G.; AL-HAZIMI, A. Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycocyanin. **Biomed Research International**, v. -, p. 1-9, 2013.

KUPRIYANOVA, E. V.; LEBEDEVA, N. V.; DUDOLADOVA, M. V.; GERASIMENKO, L. M.; ALEKSEEVA, S. G.; PRONINA, N. A.; ZAVARZIN, G. A. Carbonic anhydrase

activity of alkalophilic cyanobacteria from soda lakes. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 50, n. 4, p. 532-539, 2003.

KUPRIYANOVA, E. V.; SAMYLINA, O. S. CO₂-concentrating mechanism and its traits in haloalkaliphilic cyanobacteria. **Microbiology**, v. 84, n. 2, p. 112-124, 2015.

KUPRIYANOVA, E. V.; SINETOVA, M. A.; MARKELOVA, A. G.; ALLAKHVERDIEV, S. I.; LOS, D. A.; PRONINA, N. A. Extracellular β -class carbonic anhydrase of the alkaliphilic cyanobacterium *Microcoleus chthonoplastes*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 103, n. 1, p. 78-86, 2011.

KURD, F.; SAMAVATI, V. Water soluble polysaccharides from *Spirulina platensis*: extraction and in vitro anti-cancer activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 498-506, 2015.

LACKNER, K. S.; WENDT, C. H.; BUTT, D. P.; JOYCE JR, E. L.; SHARP, D. H. Carbon dioxide disposal in carbonate minerals. **Energy**, v. 20, n. 11, p. 1153-1170, 1995.

LEEMA, J. T. M.; KIRUBAGARAN, R.; VINITHKUMAR, N. V.; DHEENAN, P. S.; KARTHIKAYULU, S. High value pigment production from *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultured in seawater. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 23, p. 9221-9227, 2010.

LEMES, A. C.; ÁLVARES, G. T.; KALIL, S. J. Extraction of β -galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 by ultrasonic method. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, p. 7-13, 2012.

LI, B.; GAO, M.-H.; CHU, X.-M.; TENG, L.; LV, C.-Y.; YANG, P.; YIN, Q.-F. The synergistic antitumor effects of all-trans retinoic acid and C-phycoerythrin on the lung cancer A549 cells in vitro and in vivo. **European Journal of Pharmacology**, v. 749, p. 107-114, 2015.

LI, H.-B.; CHENG, K.-W.; WONG, C.-C.; FAN, K.-W.; CHEN, F.; JIANG, Y. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 771-776, 2007.

LI, L.; FU, M.-L.; ZHAO, Y.-H.; ZHU, Y.-T. Characterization of carbonic anhydrase II from *Chlorella vulgaris* in bio-CO₂ capture. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 9, p. 4227-4232, 2012.

LI, W.; CHEN, W.-S.; ZHOU, P.-P.; CAO, L.; YU, L.-J. Influence of initial pH on the precipitation and crystal morphology of calcium carbonate induced by microbial carbonic anhydrase. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 281-287, 2013a.

LI, W.; CHEN, W.-S.; ZHOU, P.-P.; ZHU, S.-L.; YU, L.-J. Influence of initial calcium ion concentration on the precipitation and crystal morphology of calcium carbonate induced by bacterial carbonic anhydrase. **Chemical Engineering Journal**, v. 218, p. 65-72, 2013b.

LI, W.; LIU, L.; CHEN, W.; YU, L.; LI, W.; YU, H. Calcium carbonate precipitation and crystal morphology induced by microbial carbonic anhydrase and other biological factors. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 6, p. 1017-1021, 2010.

LIAO, G.; GAO, B.; GAO, Y.; YANG, X.; CHENG, X.; OU, Y. Phycocyanin inhibits tumorigenic potential of pancreatic cancer cells: Role of apoptosis and autophagy. **Scientific Reports**, v. 6, p. 34564, 2016.

LIN, C.-Y.; CHEN, L.-W. Engine performance and emission characteristics of three-phase diesel emulsions prepared by an ultrasonic emulsification method. **Fuel**, v. 85, n. 5-6, p. 593-600, 2006.

LINDSKOG, S. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 74, n. 1, p. 1-20, 1997.

LIU, D.; ZENG, X. A.; SUN, D. W.; HAN, Z. Disruption and protein release by ultrasonication of yeast cells. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 18, p. 132-137, 2013.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

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

MACHADO JR, F. R. S.; REIS, D. F.; BOSCHETTO, D. L.; BURKERT, J. F. M.; FERREIRA, S. R. S.; OLIVEIRA, J. V.; BURKERT, C. A. V. Encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* in PHBV by means of SEDS technique using supercritical CO₂. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 17-21, 2014.

MANERA, A. P. **Síntese de galacto-oligossacarídeos a partir de células permeabilizadas de *Kluyveromyces marxianus***. 2010. 174 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

MANERA, A. P.; COSTA, F. A. D.; RODRIGUES, M. I.; KALIL, S. J.; MAUGERI, F. Galacto-oligosaccharides production using permeabilized cells of *Kluyveromyces marxianus*. **International Journal of Food Engineering**, v. 6, n. 6, 2010.

MAROTO-VALER, M. M.; FAUTH, D. J.; KUCHTA, M. E.; ZHANG, Y.; ANDRÉSEN, J. M. Activation of magnesium rich minerals as carbonation feedstock materials for CO₂ sequestration. **Fuel Processing Technology**, v. 86, n. 14-15, p. 1627-1645, 2005.

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

MARTÍNEZ, J. M.; LUENGO, E.; SALDAÑA, G.; ÁLVAREZ, I.; RASO, J. C-phycoyanin extraction assisted by pulsed electric field from *Arthrospira platensis*. **Food Research International**, 2016.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MEDEIROS, F. O. **Adsorção e purificação da enzima beta-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CTT 7082 através de cromatografia de troca iônica**. 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008.

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

MIRJAFARI, P.; ASGHARI, K.; MAHINPEY, N. Investigating the application of enzyme carbonic anhydrase for CO₂ sequestration purposes. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, n. 3, p. 921-926, 2007.

MISHRA, A.; JHA, B. Isolation and characterization of extracellular polymeric substances from micro-algae *Dunaliella salina* under salt stress. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 13, p. 3382-3386, 2009.

MOHEIMANI, N. R.; PARLEVLIT, D.; MCHENRY, M. P.; BAHRI, P. A.; DE BOER, K. Past, Present and Future of Microalgae Cultivation Developments. In: MOHEIMANI, N. R.; MCHENRY, M. P., *et al* (Ed.). **Biomass and Biofuels from Microalgae: Advances in Engineering and Biology**. Cham: Springer International Publishing, 2015. cap.

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

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

MORAES, C. C.; KALIL, S. J. Downstream de bioprocessos. In: STEFFENS, J.; BACKES, G. T., *et al* (Ed.). **Processos tecnológicos, biotecnológicos e engenharia de processos em alimentos**. Erechim: EdiFAPES, 2014. cap. 2.

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

MORAES, C. C.; SALA, L.; CERVEIRA, G. P.; KALIL, S. J. C-phycoyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 1, p. 45-49, 2011b.

MORAES, C. C.; SALA, L.; ORES, J. D.; BRAGA, A. R. C.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Expanded and fixed bed ion exchange chromatography for the recovery of C-phycoerythrin in a single step by using lysed cells. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 93, n. 1, p. 111-115, 2015.

MORONEY, J. V.; BARTLETT, S. G.; SAMUELSSON, G. Carbonic anhydrases in plants and algae. **Plant Cell and Environment**, v. 24, n. 2, p. 141-153, 2001.

MORSCHER, E.; WEHRMEYER, W.; KOLLER, K. P. Biliprotein assembly in the disc-shaped phycobilisomes of *Rhodella violacea*. Electron microscopical and biochemical analysis of B-phycoerythrin and B-phycoerythrin--C-phycoerythrin aggregates. **Eur J Cell Biol**, v. 21, n. 3, p. 319-27, 1980.

NAGARAJ, S.; ARULMURUGAN, P.; RAJARAM, M. G.; KARUPPASAMY, K.; JAYAPPRIYAN, K. R.; SUNDARARAJ, R.; VIJAYANAND, N.; RENGASAMY, R. Hepatoprotective and antioxidative effects of C-phycoerythrin from *Arthrospira maxima* SAG 25780 in CCl₄-induced hepatic damage rats. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 81-85, 2012.

NOAA. National Oceanic and Atmospheric Administration. 2016. Disponível em: <http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/global.html>. Acesso em: 19 de nov. 2016, 14:18:00.

ORES, J. C. **Produção e extração da enzima anidrase carbônica e de ficobiliproteínas a partir de microalgas**. 2014. 135 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

ORES, J. C.; AMARANTE, M. C. A.; KALIL, S. J. Co-production of carbonic anhydrase and phycobiliproteins by *Spirulina* sp. and *Synechococcus nidulans*. **Bioresource Technology**, v. 219, p. 219-227, 2016.

ORES, J. C.; FERNANDES, S. S.; AMARANTE, M. C. A.; SILVA, B. P.; KALIL, S. J. Tecnologia enzimática para captura de CO₂: cultivo de microalga para obtenção de anidrase carbônica. **Vetor**, v. 23, n. 2, p. 82-92, 2013.

ORES, J. D.; SALA, L.; CERVEIRA, G. P.; KALIL, S. J. Purification of carbonic anhydrase from bovine erythrocytes and its application in the enzymic capture of carbon dioxide. **Chemosphere**, v. 88, n. 2, p. 255-259, 2012.

ORES, J. D. C.; AMARANTE, M. C. A. D.; FERNANDES, S. S.; KALIL, S. J. Production of carbonic anhydrase by marine and freshwater microalgae. **Biocatalysis and Biotransformation**, p. 1-9, 2016.

OUHENIA, S.; CHATEIGNER, D.; BELKHIR, M. A.; GUILMEAU, E.; KRAUSS, C. Synthesis of calcium carbonate polymorphs in the presence of polyacrylic acid. **Journal of Crystal Growth**, v. 310, n. 11, p. 2832-2841, 2008.

OZDEMIR, E. Biomimetic CO₂ sequestration: 1. Immobilization of carbonic anhydrase within polyurethane foam. **Energy & Fuels**, v. 23, p. 5725-5730, 2009.

PARNIAKOV, O.; APICELLA, E.; KOUBAA, M.; BARBA, F. J.; GRIMI, N.; LEOVKA, N.; PATARO, G.; FERRARI, G.; VOROBIEV, E. Ultrasound-assisted green solvent extraction of high-added value compounds from microalgae *Nannochloropsis* spp. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 262-267, 2015.

PATEL, A.; MISHRA, S.; PAWAR, R.; GHOSH, P. K. Purification and characterization of C-phycoyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. **Protein Expression and Purification**, v. 40, n. 2, p. 248-255, 2005.

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

PENTÓN-ROL, G.; MARÍN-PRIDA, J.; PARDO-ANDREU, G.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; ACOSTA-MEDINA, E. F.; VALDIVIA-ACOSTA, A.; LAGUMERSINDEZ-DENIS, N.; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ, E.; LLÓPIZ-ARZUAGA, A.; LÓPEZ-SAURA, P. A.; GUILLÉN-NIETO, G.; PENTÓN-ARIAS, E. C-Phycoyanin is neuroprotective against global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils. **Brain Research Bulletin**, v. 86, n. 1-2, p. 42-52, 2011.

PINGRET, D.; FABIANO-TIXIER, A. S.; CHEMAT, F. Ultrasound-assisted extraction. In: ROSTAGNO, M. A. e PRADO, J. M. (Ed.). **Natural product extraction: principles and applications**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2013. cap. 3.

PIORRECK, M.; BAASCH, K.-H.; POHL, P. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. **Phytochemistry**, v. 23, n. 2, p. 207-216, 1984.

POCKER, Y.; STONE, J. The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase. III. Kinetic studies of the enzyme-catalyzed hydrolysis of p-nitrophenyl acetate. **Biochemistry**, v. 6, n. 3, p. 668-678, 1967.

POWER, I. M.; HARRISON, A. L.; DIPPLE, G. M.; SOUTHAM, G. Carbon sequestration via carbonic anhydrase facilitated magnesium carbonate precipitation. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 16, p. 145-155, 2013.

PRABUTHAS, P.; MAJUMDAR, S.; SRIVASTAV, P.; MISHRA, H. Standardization of rapid and economical method for nutraceuticals extraction from algae. **Journal of Stored Products and Postharvest Research**, v. 2, n. 5, p. 93-96, 2011.

PRICE, G. D. Inorganic carbon transporters of the cyanobacterial CO₂ concentrating mechanism. **Photosynthesis Research**, v. 109, n. 1-3, p. 47-57, 2011.

PRICE, G. D.; BADGER, M. R.; WOODGER, F. J.; LONG, B. M. Advances in understanding the cyanobacterial CO₂-concentrating-mechanism (CCM): functional components, Ci transporters, diversity, genetic regulation and prospects for engineering into plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 7, p. 1441-1461, 2008.

PRIEGO-CAPOTE, F.; CASTRO, L. Analytical uses of ultrasound - I. Sample preparation. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 9, p. 644-653, 2004.

QUERQUES, N.; CESTA, M.; SANTOS, R. M.; CHIANG, Y. W. Microalgal phycocyanin productivity: strategies for phyco-valorization. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 90, n. 11, p. 1968-1982, 2015.

QV, X. Y.; ZHOU, Q. F.; JIANG, J. G. Ultrasound-enhanced and microwave-assisted extraction of lipid from *Dunaliella tertiolecta* and fatty acid profile analysis. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 20, p. 2991-2999, 2014.

RAMANAN, R.; KANNAN, K.; SIVANESAN, S. D.; MUDLIAR, S.; KAUR, S.; TRIPATHI, A. K.; CHAKRABARTI, T. Bio-sequestration of carbon dioxide using carbonic anhydrase enzyme purified from *Citrobacter freundii*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 981-987, 2009.

RAOOF, B.; KAUSHIK, B. D.; PRASANNA, R. Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. **Biomass & Bioenergy**, v. 30, n. 6, p. 537-542, 2006.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 5ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 728 p.

RAVI, M.; TENTU, S.; BASKAR, G.; ROHAN PRASAD, S.; RAGHAVAN, S.; JAYAPRAKASH, P.; JEYAKANTHAN, J.; RAYALA, S. K.; VENKATRAMAN, G. Molecular mechanism of anti-cancer activity of phycocyanin in triple-negative breast cancer cells. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 768, 2015.

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

REICHERT, C. C.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 1, p. 23-28, 2006.

REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Repeated batch cultivation of the microalga *Spirulina platensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 937-943, 2006.

RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**, 2004.

RICHMOND, A.; GROBBELAAR, J. U. Factors affecting the output rate of *Spirulina platensis* with reference to mass cultivation. **Biomass**, v. 10, n. 4, p. 253-264, 1986.

RIGOBELLO-MASINI, M.; AIDAR, E.; MASINI, J. C. Extra and intracellular activities of carbonic anhydrase of the marine microalga *Tetraselmis gracilis* (Chlorophyta). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 267-272, 2003.

RIGOBELLO-MASINI, M.; MASINI, J. C.; AIDAR, E. The profiles of nitrate reductase and carbonic anhydrase activity in batch cultivation of the marine microalgae *Tetraselmis gracilis* growing under different aeration conditions. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 57, n. 1, p. 18-25, 2006.

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

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009. p.

ROMÁN, R. B.; ALVAREZ-PEZ, J. M.; FERNANDEZ, F. G. A.; GRIMA, E. M. Recovery of pure β -phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. **Journal of Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 73-85, 2002.

ROMAY, C.; ARMESTO, J.; REMIREZ, D.; GONZÁLEZ, R.; LEDON, N.; GARCÍA, I. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoerythrin from blue-green algae. **Inflammation Research**, v. 47, n. 1, p. 36-41, 1998.

RUSSO, M. E.; OLIVIERI, G.; MARZOCHELLA, A.; SALATINO, P.; CARAMUSCIO, P.; CAVALEIRO, C. Post-combustion carbon capture mediated by carbonic anhydrase. **Separation and Purification Technology**, v. 107, p. 331-339, 2013.

SAFI, C.; URSU, A. V.; LAROCHE, C.; ZEBIB, B.; MERAH, O.; PONTALIER, P.-Y.; VACA-GARCIA, C. Aqueous extraction of proteins from microalgae: effect of different cell disruption methods. **Algal Research**, v. 3, p. 61-65, 2014.

SAHOO, P. C.; JANG, Y.-N.; LEE, S.-W. Immobilization of carbonic anhydrase and an artificial Zn(II) complex on a magnetic support for biomimetic carbon dioxide sequestration. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 82, p. 37-45, 2012.

SALEH, A.; DHAR, D.; SINGH, P. Comparative pigment profiles of different *Spirulina* strains. **Research in Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 67-74, 2011.

SALLA, A. C. V.; MARGARITES, A. C.; SEIBEL, F. I.; HOLZ, L. C.; BRIÃO, V. B.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Increase in the carbohydrate content of the microalgae *Spirulina* in culture by nutrient starvation and the addition of residues of whey protein concentrate. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 133-141, 2016.

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

SANTOS-SÁNCHEZ, N. F.; VALADEZ-BLANCO, R.; HERNÁNDEZ-CARLOS, B.; TORRES-ARIÑO, A.; GUADARRAMA-MENDOZA, P. C.; SALAS-CORONADO, R. Lipids rich in ω -3 polyunsaturated fatty acids from microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 20, p. 8667-8684, 2016.

SANTOS, H. M.; LODEIRO, C.; CAPELO-MARTÍNEZ, J. L. The power of ultrasound. In: CAPELO-MARTÍNEZ, J. L. (Ed.). **Ultrasound in chemistry: analytical applications**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009. cap. 1.

SANTOS, R. R.; MOREIRA, D. M.; KUNIGAMI, C. N.; ARANDA, D. A. G.; TEIXEIRA, C. M. L. L. Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 95-99, 2015.

SARADA, D. V. L.; KUMAR, C. S.; RENGASAMY, R. Purified C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (Nordstedt) Geitler: a novel and potent agent against drug resistant bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 779-783, 2011.

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

SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p.

SEKAR, S.; CHANDRAMOHAN, M. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 2, p. 113-136, 2008.

SHAPIRO, H. M.; GLAZER, A. N.; CHRISTENSON, L.; WILLIAMS, J. M.; STROM, T. B. Immunofluorescence measurement in a flow cytometer using low-power helium-neon laser excitation. **Cytometry**, v. 4, n. 3, p. 276-279, 1983.

SHARMA, A.; BHATTACHARYA, A. Enhanced biomimetic sequestration of CO₂ into CaCO₃ using purified carbonic anhydrase from indigenous bacterial strains. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 1-2, p. 122-128, 2010.

SHEKH, A. Y.; KRISHNAMURTHI, K.; MUDLIAR, S. N.; YADAV, R. R.; FULKE, A. B.; DEVI, S. S.; CHAKRABARTI, T. Recent advancements in carbonic anhydrase-driven processes for CO₂ sequestration: minireview. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 42, n. 14, p. 1419-1440, 2012.

SHEVELA, D.; PISHCHALNIKOV, R. Y.; EICHACKER, L. A.; GOVINDJEE. Oxygenic photosynthesis in cyanobacteria. In: SRIVASTAVA, A. K.;RAI, A. N., *et al* (Ed.). **Stress Biology of Cyanobacteria**. New York: CRC Press, 2013. cap. 1.

SHIH, S. R.; TSAI, K. N.; LI, Y. S.; CHUEH, C. C.; CHAN, E. C. Inhibition of enterovirus 71-induced apoptosis by allophycocyanin isolated from a blue-green alga *Spirulina platensis*. **Journal of Medical Virology**, v. 70, n. 1, p. 119-125, 2003.

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

SILVEIRA, S. T.; BURKERT, J. F. M.; COSTA, J. A. V.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, p. 1629-1634, 2007.

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

SILVERMAN, D. N.; LINDSKOG, S. The catalytic mechanism of carbonic-anhydrase - implications of a rate-limiting protolysis of water. **Accounts of Chemical Research**, v. 21, n. 1, p. 30-36, 1988.

SINGH, P.; KUDDUS, M.; THOMAS, G. An efficient method for extraction of C-phycoyanin from *Spirulina* sp. and its binding affinity to blood cells, nuclei and genomic DNA. **International Research Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 5, p. 080-085, 2010.

SMITH, J.; CHARTER, E. **Functional food product development**. John Wiley & Sons, 2011. p.

SMITH, K. S.; FERRY, J. G. A plant-type (beta-class) carbonic anhydrase in the thermophilic methanoarchaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 20, p. 6247-6253, 1999.

SOLTES-RAK, E.; MULLIGAN, M. E.; COLEMAN, J. R. Identification and characterization of a gene encoding a vertebrate-type carbonic anhydrase in cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 3, p. 769-774, 1997.

SONI, B.; TRIVEDI, U.; MADAMWAR, D. A novel method of single step hydrophobic interaction chromatography for the purification of phycocyanin from *Phormidium fragile* and

its characterization for antioxidant property. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 1, p. 188-194, 2008.

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

SU, H. N.; XIE, B. B.; CHEN, X. L.; WANG, J. X.; ZHANG, X. Y.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Efficient separation and purification of allophycocyanin from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 22, n. 1, p. 65-70, 2010.

SUN, L.; WANG, S. Allophycocyanin complexes from the phycobilisome of a thermophilic blue-green alga *Myxosarcina concinna* Printz. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 72, n. 1-3, p. 45-53, 2003.

SWARNALATHA, G. V.; HEGDE, N. S.; CHAUHAN, V. S.; SARADA, R. The effect of carbon dioxide rich environment on carbonic anhydrase activity, growth and metabolite production in indigenous freshwater microalgae. **Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts**, v. 9, p. 151-159, 2015.

THANGAM, R.; SURESH, V.; ASENATH PRINCY, W.; RAJKUMAR, M.; SENTHILKUMAR, N.; GUNASEKARAN, P.; RENGASAMY, R.; ANBAZHAGAN, C.; KAVERI, K.; KANNAN, S. C-Phycocyanin from *Oscillatoria tenuis* exhibited an antioxidant and in vitro antiproliferative activity through induction of apoptosis and G₀/G₁ cell cycle arrest. **Food Chemistry**, v. 140, n. 1-2, p. 262-272, 2013.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. [S.I]: Blackwell Science Ltd, 2004. cap. 1.

TRABELSI, L.; CHAIEB, O.; MNARI, A.; ABID-ESSAFI, S.; ALEYA, L. Partial characterization and antioxidant and antiproliferative activities of the aqueous extracellular polysaccharides from the thermophilic microalgae *Graesiella* sp. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2016.

VAN HILLE, R. P.; ANTUNES, A. P. M.; SANYAHUMBI, D.; NIGHTINGALE, L.; DUNCAN, J. R. **Development of integrated biosorption systems for the removal and/or recovery of heavy metals from mining and other industrial wastewaters, and determination of the toxicity of metals to bioremediation processes**. p.143. 2003

VERMA, A. K.; ATTRI, P.; CHOPRA, V.; TIWARI, R. K.; CHANDRA, R. Triethylammonium acetate (TEAA): a recyclable inexpensive ionic liquid promotes the chemoselective aza- and thia-Michael reactions. **Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly**, v. 139, n. 9, p. 1041-1047, 2008.

VINOBA, M.; BHAGIYALAKSHMI, M.; JEONG, S. K.; YOON, Y., II; NAM, S. C. Immobilization of carbonic anhydrase on spherical SBA-15 for hydration and sequestration of CO₂. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, p. 91-96, 2012.

VINOBA, M.; BHAGIYALAKSHMI, M.; JEONG, S. K.; YOON, Y. I.; NAM, S. C. Capture and sequestration of CO₂ by human carbonic anhydrase covalently immobilized onto amine-functionalized SBA-15. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 41, p. 20209-20216, 2011a.

VINOBA, M.; KIM, D. H.; LIM, K. S.; JEONG, S. K.; LEE, S. W.; ALAGAR, M. Biomimetic sequestration of CO₂ and reformation to CaCO₃ using bovine carbonic anhydrase immobilized on SBA-15. **Energy & Fuels**, v. 25, p. 438-445, 2011b.

VISKARI, P. J.; COLYER, C. L. Separation and quantitation of phycobiliproteins using phytic acid in capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 972, n. 2, p. 269-276, 2002.

VISKARI, P. J.; COLYER, C. L. Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. **Analytical Biochemistry**, v. 319, n. 2, p. 263-271, 2003.

VO, T.-S.; NGO, D.-H.; KIM, S.-K. Nutritional and pharmaceutical properties of microalgal *Spirulina*. In: KIM, S.-K. (Ed.). **Handbook of Marine Microalgae**. Boston: Academic Press, 2015. cap. 19.

WILBUR, K. M.; ANDERSON, N. G. Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 176, n. 1, p. 147-154, 1948.

WILLIAMS, R.; GINGRICH, J.; GLAZER, A. Cyanobacterial phycobilisomes. Particles from *Synechocystis* 6701 and two pigment mutants. **Journal of Cell Biology**, v. 85, n. 3, p. 558-566, 1980.

WONG, D. M.; NGUYEN, T. T. N.; FRANZ, A. K. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) enhances intracellular lipid staining with Nile red in microalgae *Tetraselmis suecica*. **Algal Research**, v. 5, p. 158-163, 2014.

WOOLEY, R. E.; JONES, M. S.; SHOTTS, E. B. Uptake of antibiotics in gram-negative bacteria exposed to EDTA-Tris. **Veterinary Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 57-70, 1984.

XIA, J.-R.; GAO, K.-S. Impacts of elevated CO₂ concentration on biochemical composition, carbonic anhydrase, and nitrate reductase activity of freshwater green algae. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 47, n. 6, p. 668-675, 2005.

XIE, Y. P.; JIN, Y. W.; ZENG, X. H.; CHEN, J. F.; LU, Y. H.; JING, K. J. Fed-batch strategy for enhancing cell growth and C-phycocyanin production of *Arthrospira (Spirulina) platensis* under phototrophic cultivation. **Bioresource Technology**, v. 180, p. 281-287, 2015.

XU, A. W.; ANTONIETTI, M.; CÖLFEN, H.; FANG, Y. P. Uniform hexagonal plates of vaterite CaCO₃ mesocrystals formed by biomimetic mineralization. **Advanced Functional Materials**, v. 16, n. 7, p. 903-908, 2006.

YADAV, R. R.; MUDLIAR, S. N.; SHEKH, A. Y.; FULKE, A. B.; DEVI, S. S.; KRISHNAMURTHI, K.; JUWARKAR, A.; CHAKRABARTI, T. Immobilization of carbonic anhydrase in alginate and its influence on transformation of CO₂ to calcite. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 585-590, 2012.

YEH, S. W.; ONG, L. J.; CLARK, J. H.; GLAZER, A. N. Fluorescence properties of allophycocyanin and a cross-linked allophycocyanin trimer. **Cytometry**, v. 8, n. 1, p. 91-95, 1987.

ZARROUK, C. **Contribution a l'etude d'une cianophycee: Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima*** 1966. 83 f. Ph.D. thesis - Faculte des Sciences, Universite de Paris, 1966.

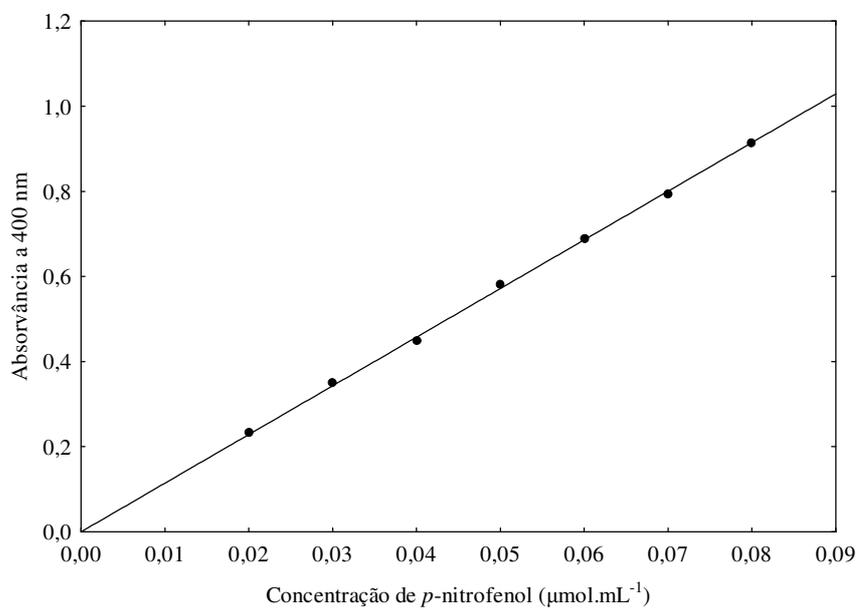
ZOU, T. B.; JIA, Q.; LI, H. W.; WANG, C. X.; WU, H. F. Response surface methodology for ultrasound-assisted extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Marine Drugs**, v. 11, n. 5, p. 1644-1655, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Curva da absorvidade molar (ϵ) do *p*-nitrofenol em tampão tris-SO₄ (50 mM e pH 7,4).

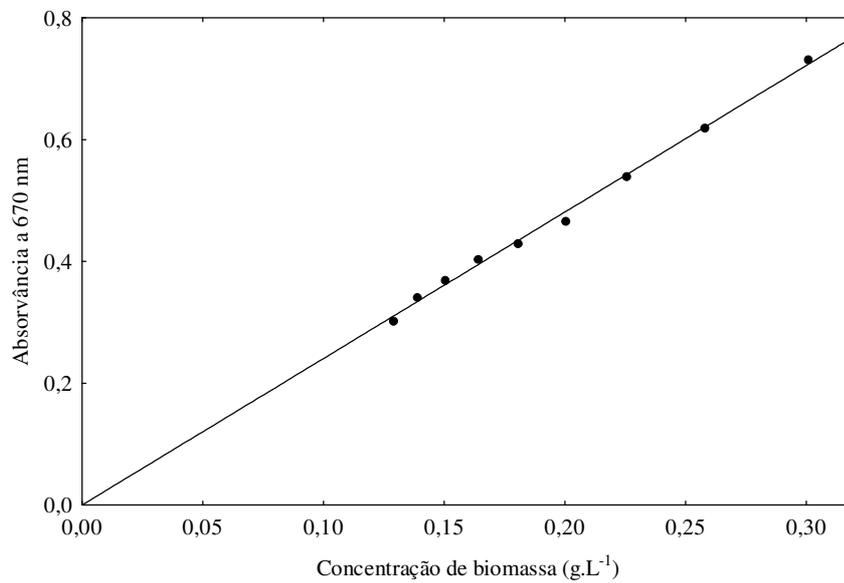
$$y = 11,43 \cdot x, R^2 = 0,999$$



APÊNDICE 2

Curva padrão da concentração de biomassa de *Spirulina platensis* LEB-52.

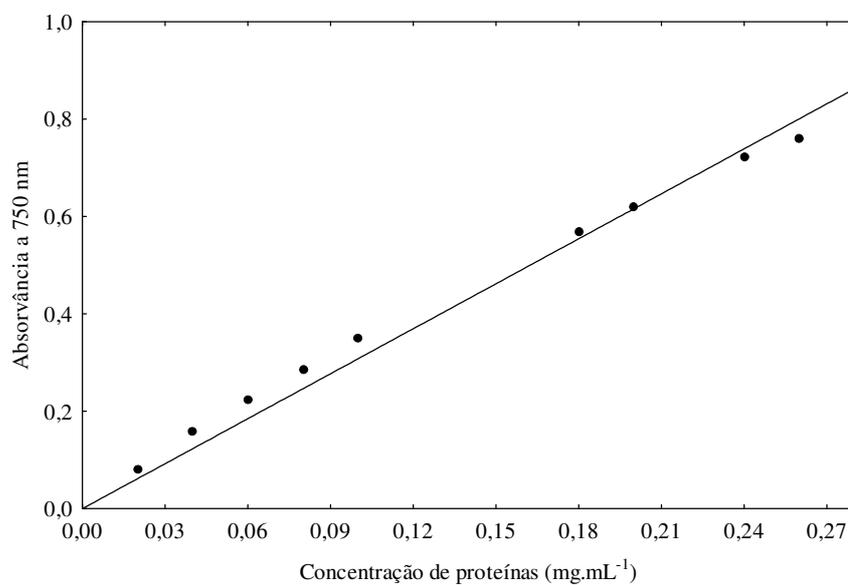
$$y = 2,405 \cdot x, R^2 = 0,996$$



APÊNDICE 3

Curva padrão de concentração proteína segundo metodologia de Lowry et al. (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

$$y = 3,079 \cdot x, R^2 = 0,989$$



APÊNDICE 4

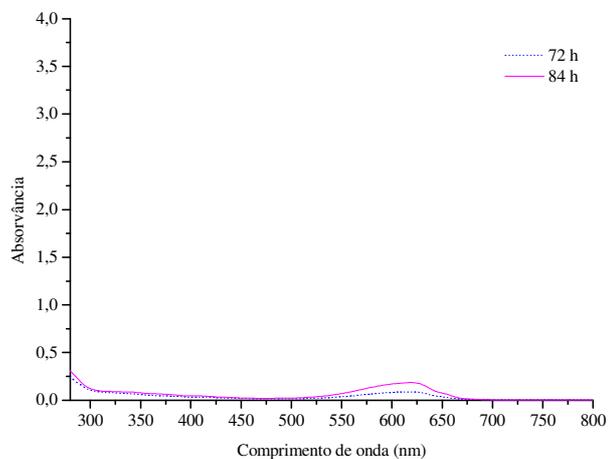
Concentração intracelular de ficobiliproteínas (C-FC e AFC) e anidrase carbônica expressa em termos de esterase ao longo do cultivo de *Spirulina platensis* LEB-52 com Meio Zarrouk 100%. Letras iguais entre as médias de uma mesma coluna não diferem estatisticamente ao nível de 5% de significância (Teste de Tukey).

Tempo (d)	Concentração de C-FC (mg·g ⁻¹)	Concentração de AFC (mg·g ⁻¹)	AC expressa em termos de esterase (U·g ⁻¹)
0	108,1 ± 17,2 ^g	79,6 ± 15,5 ^e	28,3 ± 5,5 ^{b,c,d}
2	112,7 ± 15,0 ^{f,g}	81,0 ± 12,5 ^e	20,4 ± 3,3 ^{e,f,g,h,i,j}
4	127,2 ± 10,0 ^{d,e,f,g}	93,7 ± 5,7 ^{a,b,c,d,e}	31,8 ± 3,5 ^b
6	129,4 ± 14,4 ^{c,d,e,f,g}	90,5 ± 12,3 ^{c,d,e}	46,3 ± 3,1 ^a
11	118,1 ± 8,0 ^{e,f,g}	88,0 ± 9,0 ^{d,e}	31,1 ± 1,8 ^{b,c}
17	117,0 ± 6,8 ^{e,f,g}	91,0 ± 5,8 ^{b,c,d,e}	26,0 ± 2,0 ^{b,c,d,e,f}
20	129,7 ± 6,5 ^{b,c,d,e,f,g}	100,4 ± 2,9 ^{a,b,c,d,e}	24,2 ± 2,3 ^{d,e,f,g,h}
21	137,4 ± 9,9 ^{a,b,c,d,e,f,g}	104,4 ± 2,6 ^{a,b,c,d}	26,6 ± 2,0 ^{b,c,d,e}
24	134,9 ± 15,2 ^{a,b,c,d,e,f,g}	101,3 ± 7,3 ^{a,b,c,d,e}	23,1 ± 0,8 ^{d,e,f,g,h,i}
26	124,6 ± 6,3 ^{d,e,f,g}	99,0 ± 4,1 ^{a,b,c,d,e}	20,6 ± 1,8 ^{e,f,g,h,i,j}
32	143,8 ± 25,8 ^{a,b,c,d,e,f,g}	109,3 ± 10,0 ^{a,b,c,d}	20,0 ± 3,6 ^{e,f,g,h,i,j}
35	154,7 ± 5,4 ^{a,b,c,d,e}	112,3 ± 2,0 ^{a,b,c}	19,4 ± 0,3 ^{f,g,h,i,j}
39	151,2 ± 11,7 ^{a,b,c,d,e,f}	109,6 ± 4,7 ^{a,b,c,d}	21,5 ± 0,6 ^{e,f,g,h,i,j}
42	161,1 ± 9,8 ^{a,b,c,d}	111,3 ± 3,0 ^{a,b,c}	19,9 ± 0,7 ^{e,f,g,h,i,j}
46	168,4 ± 5,2 ^{a,b}	113,0 ± 2,4 ^{a,b,c}	18,5 ± 0,2 ^{g,h,i,j}
49	152,0 ± 13,0 ^{a,b,c,d,e}	110,8 ± 7,6 ^{a,b,c,d}	24,6 ± 1,6 ^{c,d,e,f,g}
52	163,3 ± 5,9 ^{a,b,c,d}	115,1 ± 3,4 ^a	20,8 ± 0,7 ^{e,f,g,h,i,j}
55	166,1 ± 12,7 ^{a,b,c}	113,8 ± 6,8 ^{a,b}	23,6 ± 0,3 ^{d,e,f,g,h,i}
59	162,4 ± 6,9 ^{a,b,c,d}	112,1 ± 4,3 ^{a,b,c}	20,2 ± 2,4 ^{e,f,g,h,i,j}
63	145,7 ± 6,2 ^{a,b,c,d,e,f,g}	109,0 ± 2,1 ^{a,b,c,d}	21,0 ± 0,8 ^{e,f,g,h,i,j}
67	170,9 ± 7,4 ^a	114,0 ± 5,0 ^{a,b}	15,6 ± 1,6 ^j
70	161,6 ± 6,4 ^{a,b,c,d}	114,1 ± 5,5 ^a	19,8 ± 0,6 ^{f,g,h,i,j}
74	150,7 ± 13,8 ^{a,b,c,d,e,f}	111,5 ± 2,1 ^{a,b,c}	17,5 ± 0,7 ^{h,i,j}
77	129,1 ± 24,8 ^{c,d,e,f,g}	109,5 ± 12,7 ^{a,b,c,d}	17,2 ± 0,6 ^{i,j}

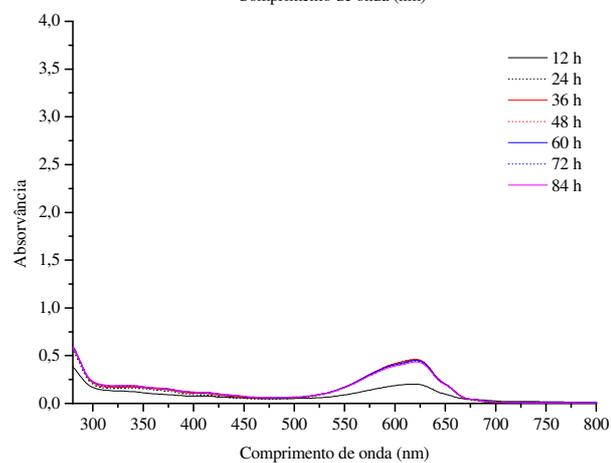
APÊNDICE 5

Espectros de absorção para os ensaios do delineamento fatorial fracionado 2^{6-2} durante 84 h de extração.

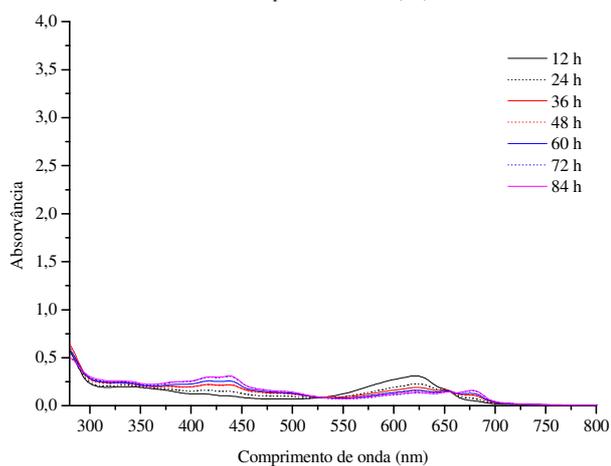
Ensaio 1



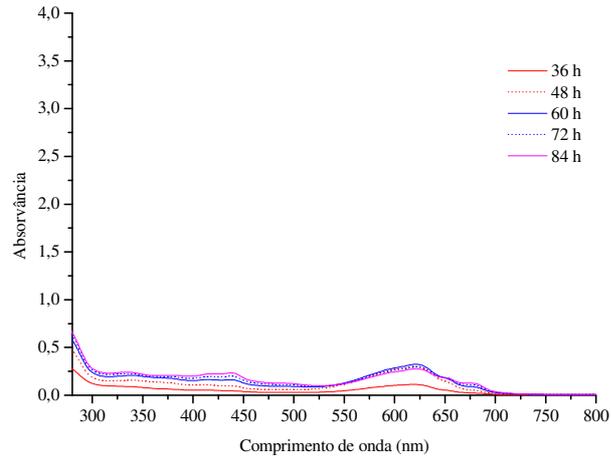
Ensaio 2



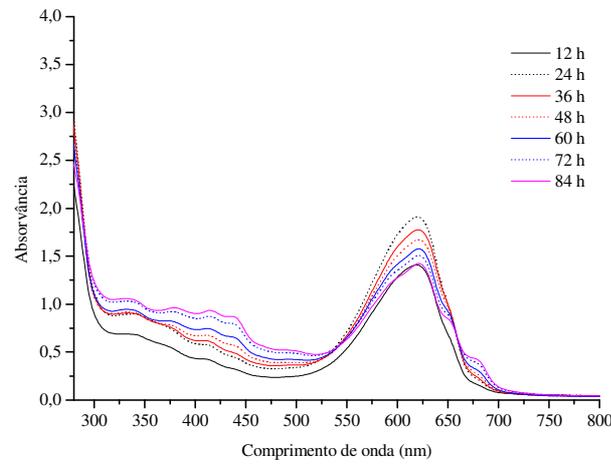
Ensaio 3



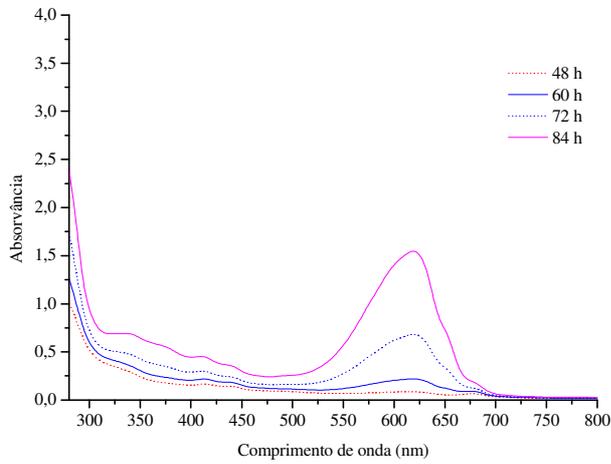
Ensaio 4



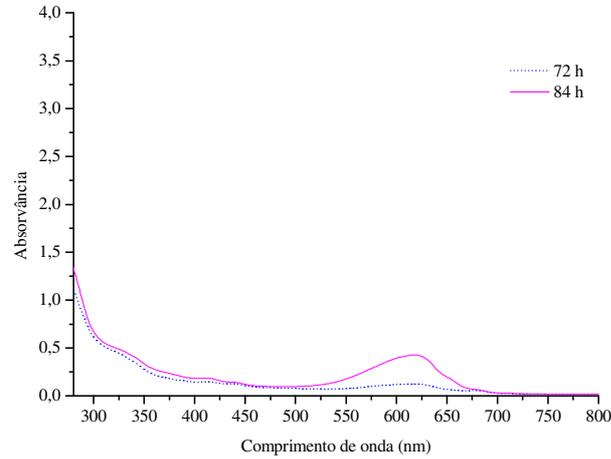
Ensaio 5



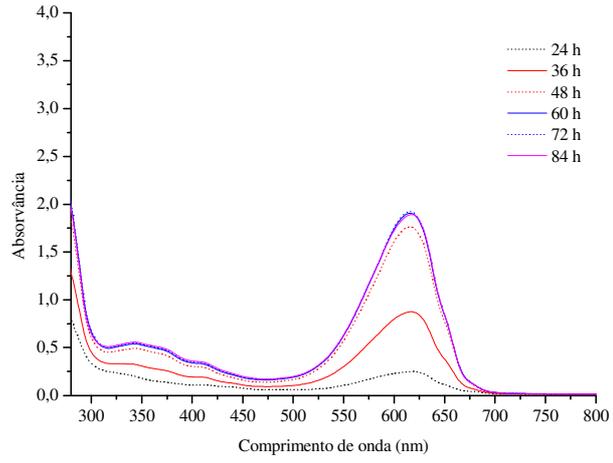
Ensaio 6



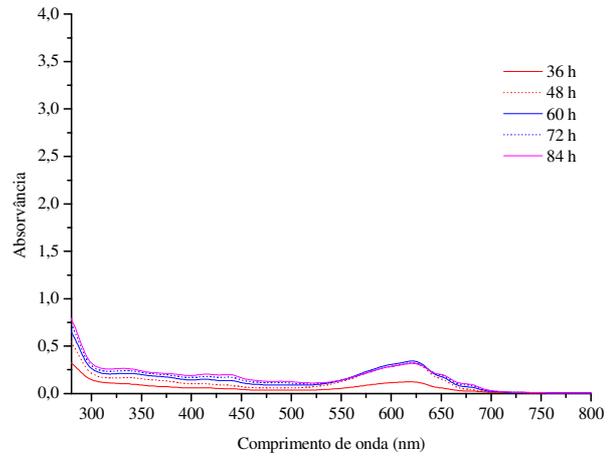
Ensaio 7



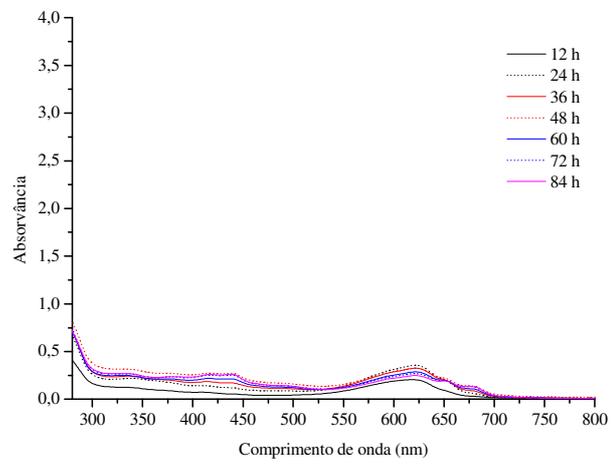
Ensaio 8



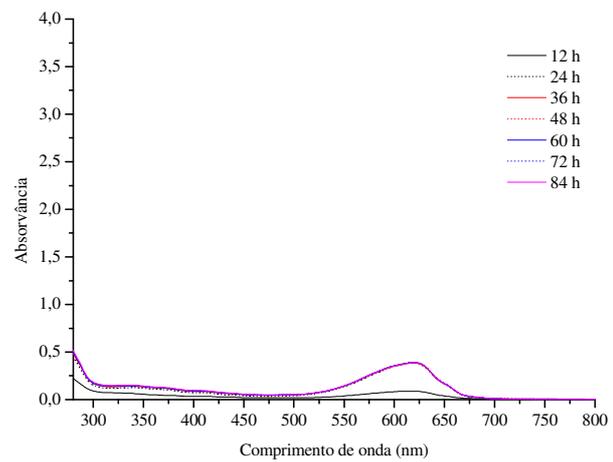
Ensaio 9



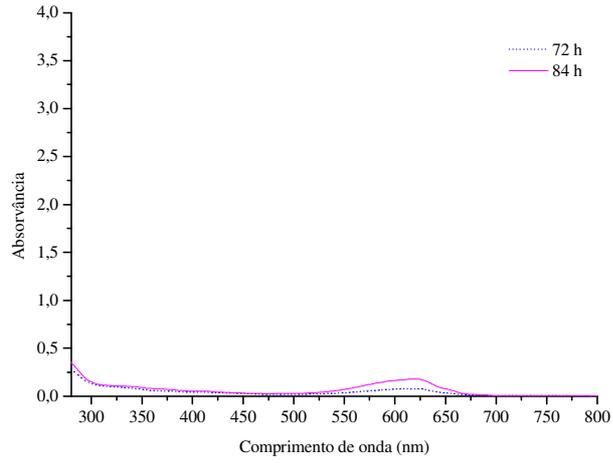
Ensaio 10



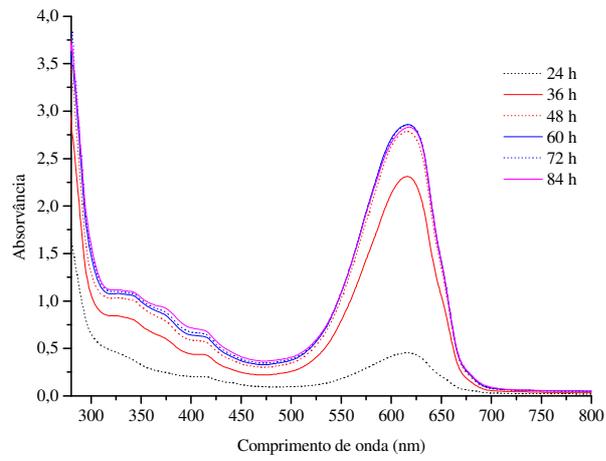
Ensaio 11



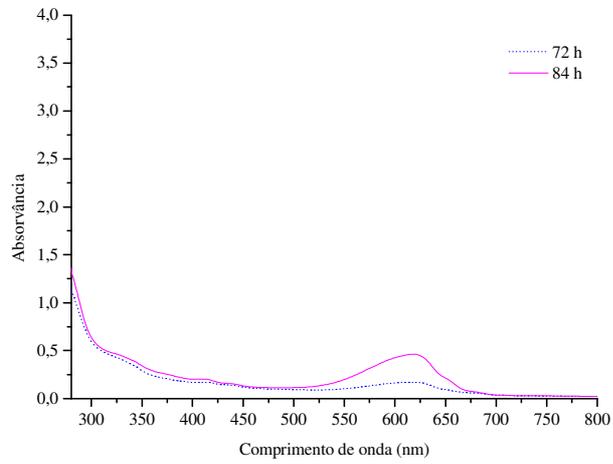
Ensaio 12



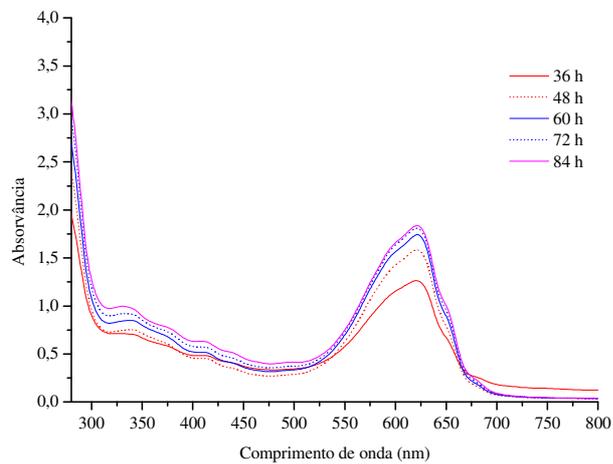
Ensaio 13



Ensaio 14



Ensaio 15



Ensaio 16

