



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

PURIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANIDRASE CARBÔNICA E C-FICOCIANINA
ANDRESSA JANTZEN DA SILVA LUCAS

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

Dr.^a. SUSANA JULIANO KALIL
Orientador

RIO GRANDE, RS

2018

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

PURIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANIDRASE CARBÔNICA E C-FICOCIANINA
ANDRESSA JANTZEN DA SILVA LUCAS

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

Dr^a. SUSANA JULIANO KALIL
Orientador

RIO GRANDE, RS
2018

Ficha catalográfica

L933p Lucas, Andressa Jantzen da Silva.
Purificação simultânea de anidrase carbônica e c-ficocianina /
Andressa Jantzen da Silva Lucas. – 2018.
127 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande –
FURG, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de
Alimentos, Rio Grande/RS, 2018.
Orientadora: Dr^a. Susana Juliano Kalil.

1. Bioprodutos 2. Precipitação por sal 3. *Spirulina platensis*
4. Ultrafiltração I. Kalil, Susana Juliano II. Título.

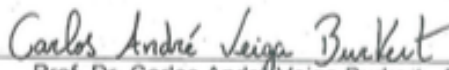
CDU 639.64

APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Andressa Jantzen da Silva Lucas e aprovada em 26 de março de 2018, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Susana Juliano Kalil (orientadora) - FURG



Prof. Dr. Carlos André Veiga Burkert - FURG



Prof. Dr. Luiz Antonio de Almeida Pinto - FURG



Prof. Dr. Paulo Fernando Marques Duarte Filho - UNIPAMPA

A meu marido e meu filho pelo simples fato de terem me escolhido.

A todos aqueles que dedicaram um pouco de seu tempo para que eu pudesse buscar o meu tempo aqui.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me colocado no lugar certo, na hora certa, rodeada de pessoas especiais, e principalmente por sempre guiar meu caminho.

Agradeço a minha mãe Lisane, por ter abdicado de sua vida para cuidar da minha, por sempre ter estado ao meu lado em todos os momentos, pela amizade verdadeira. Obrigada por ter sido a mãe do meu filho quando eu precisei deixar ele aos 4 meses para me dedicar a este estudo, se não fosse por teu apoio, carinho e dedicação para com ele certamente não estaria escrevendo estas palavras agora. Não imaginas o quanto fizestes a diferença em toda minha caminhada. Me espelho em ti e sempre te carrego comigo. Muito obrigada.

Agradeço imensamente aos meus avós, Frederico e Neuza, por terem me fornecido todo o suporte para que eu conseguisse chegar até aqui. Obrigada por terem me mostrado que o conhecimento é algo que carregaremos para o resto de nossas vidas e com ele chegamos longe. E principalmente obrigado por acreditarem que sou capaz.

Agradeço com imenso amor ao meu marido Hugo, por estar sempre ao meu lado, olhando na mesma direção, mesmo que esta acabe nos levando para caminhos diferentes. Sei que tua torcida e teu apoio são incondicionais, também sei o quanto acreditas em mim e isto com certeza me dá forças para seguir o meu caminho. Obrigada por ter sido meu pai, meu companheiro, meu amigo... Por ter me feito enxergar as coisas quando tudo parecia tão impossível... Por segurar as pontas sempre que eu preciso! Obrigada por acreditar que um dia a chegaremos lá. Obrigada pela família que construímos.

Agradeço ao meu filho Francisco, por me dedicar o amor mais puro que existe neste mundo apenas com um olhar. Obrigada por ter feito eu me tornar uma pessoa melhor. Se eu cheguei até aqui com certeza foi pensando em te dar um futuro digno, em ser exemplo para ti durante tua caminhada, tenho certeza que minhas ausências um dia serão entendidas, mesmo que leve algum tempo para isso! Obrigada por ter me escolhido, sigo minha caminhada sempre pensando em ti, na nossa família.

Agradeço a minha sogra Adriana, minha terceira mãe, por ter me dado todo apoio que precisei durante esta caminhada. O amor que dedicas ao Francisco não tem preço, a segurança que eu tenho ao sair de casa e saber que ele vai estar contigo também não. Obrigada por se fazer sempre presente nos mais diversos momentos da minha vida, saber que posso sempre contar contigo torna a vida mais leve.

Agradeço a minha irmã Gisele, por estar sempre presente em nossas vidas. És muito especial para mim e para o Francisco. Segue teu caminho que tenho certeza que ele vai ser sempre belo e iluminado.

A todos aqueles que dedicaram um pouco, ou muito, de seu tempo cuidando do meu filho enquanto eu estive ausente correndo atrás do meu tempo, o meu muito obrigada! Palavras não descreveriam o quão agradecida eu sou, levarei sempre cada um de vocês em meu coração.

Saber que eu sou rodeada de pessoas especiais e que me querem tão bem faz tudo valer a pena. Obrigada mais uma vez a minha mãe, minha avó e minha sogra. Obrigada a minha irmã Gisele e minha irmã do coração, Juliana. Meus cunhados Juliana e Gabriel e ao meu sogro

Ruy. Aos avós do meu marido, Dana Maria José, Seu Hugo e Dona Marion, obrigada também a Lili e a nossa cuidadora do coração, Célia.

Agradeço com muito carinho, a minha orientadora Professora Susana. Tua orientação foi além do que deveria, foi para vida! Aprender com os grandes nos torna grande. Para mim não existe ato mais grandioso do que o de ensinar. Em um mundo onde cada vez mais as pessoas só olham para si e por si mesmas, querer passar o seu conhecimento para que o outro um dia chegue aonde você está é a maior prova de comprometimento consigo e com o próximo!

Obrigada por ter me passado seu conhecimento, obrigada por todo ensinamento, pelos conselhos, mas principalmente obrigada pela compreensão. Você é o exemplo de pessoa e de profissional que eu quero me tornar um dia! Obrigada por fazer parte da minha caminhada, fizestes toda a diferença.

Agradeço imensamente a minha coorientadora do coração Luisa. Palavras não descreveriam o quão grata eu sou por absolutamente tudo que dedicastes a mim e ao meu projeto do início ao fim. Sei que te envolvestes nele como se fosse teu, sei que fizestes de tudo em todos os aspectos para eu alcançar o meu máximo! Obrigada por estar sempre disponível e por não medir esforços para me transmitir teu conhecimento. Tu és, com certeza, outro exemplo de pessoa e profissional para mim. Feliz daquele que vai te ter como professora e orientadora, tenho certeza que este dia vai chegar! Muito obrigada.

Agradeço aquela que me ensinou o que eu precisava para me tornar parte da família do Laboratório de Microbiologia e Biosseparações. Ana, vou carregar para vida todo o ensinamento que me passastes! Obrigada por nos apoiar e estar sempre ao nosso lado!

As minhas colegas de laboratório que viraram amigas do coração, Gabi, Marina e Thais. Obrigada por simplesmente serem vocês, obrigada por estarem sempre ao meu lado, por me ensinarem tanto, pelos momentos de risada e pelos momentos de desespero também... obrigada pelo simples fato estarem ali a qualquer momento. Aprendi com a vida que as pessoas certas aparecem na hora certa, se não fossem vocês eu não sei como seria! Obrigada por me compreenderem do início ao fim. E, principalmente, obrigada por tudo Gabi, tu tens um coração do tamanho do mundo. Felizes daqueles que tem o privilégio de conviver contigo, és uma pessoa iluminada, como poucas que eu conheço... Se existissem mais Gabrielles no mundo ele com certeza seria melhor! Esta dissertação tem um pouco de cada uma de vocês, mas muito de ti. Obrigada.

Agradeço aos meus colegas de mestrado pelo conhecimento compartilhado em especial a Marina Nogueira. Obrigada por ter me compreendido e por sempre estar disposta a me ajudar, fizestes muita diferença durante nossa caminhada.

Ao meu bolsista de iniciação científica, meu braço direito e esquerdo. Junior, sem palavras para agradecer toda a dedicação que tivestes com nosso projeto. Purificar simultaneamente C-ficocianina e anidrase carbônica com outra pessoa literalmente não teria a mesma graça e não seria tão leve quanto foi contigo. Ãããã... quero que saibas que torço muito por ti, com certeza vais chegar longe, mereces muito! Conta sempre com o que precisar!

Obrigada aos meus amigos por entenderem minhas ausências e principalmente por caminharem ao meu lado. Os conselhos de vocês e as palavras de incentivo me fazem chegar mais longe! Vocês são meus exemplos de pessoas, tenho orgulho do que cada um de nós se tornou! Obrigada por simplesmente estarem aí..

A todos os professores que contribuíram de uma forma ou de outra para minha formação durante o mestrado.

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

Agradeço à FURG, permitir um estudo de qualidade e de referência.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e a FAPERGS pelo apoio financeiro ao projeto.

"Sed fugit interea, fugit irreparabile tempus"

Virgilio

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição proximal de diferentes microalgas (base seca).	33
--	----

ARTIGO 1

Tabela 1 - Variáveis independentes e seus níveis reais e codificados estudados no delineamento fatorial 2^2 com pontos centrais.	54
Tabela 2 - Matriz do delineamento fatorial 2^2 com pontos centrais (valores codificados e reais).	54
Tabela 3 - Valores de entrada para anidrase carbônica e C-ficocianina em diferentes valores de pH.	57
Tabela 4 - Matriz do delineamento fatorial 2^2 com pontos centrais com valores reais e codificados e as respostas estudadas para anidrase carbônica (fração sobrenadante).	58
Tabela 5 - Matriz do delineamento fatorial 2^2 com pontos centrais com valores reais e codificados e as respostas estudadas para C-ficocianina (fração precipitada)	58
Tabela 6 - Efeitos das variáveis independentes no fator de purificação de anidrase carbônica.	62
Tabela 7 - Efeitos das variáveis independentes no fator de purificação de C-ficocianina.	62
Tabela 8 - Valores da ANOVA para o fator de purificação de anidrase carbônica.	62
Tabela 9 - Valores da ANOVA para o fator de purificação de C-ficocianina.	62
Tabela 10 - Valores experimentais, preditos pelo modelo e desvio relativo para o fator de purificação da anidrase carbônica.	65
Tabela 11 - Valores experimentais, preditos pelo modelo e desvio relativo para o fator de purificação da C-ficocianina.	65
Tabela 12 - Fator de purificação experimental e predito com o respectivo desvio relativo na validação do delineamento fatorial 2^2 com pontos centrais.	66

ARTIGO 2

Tabela 1 - Valores experimentais (média $\pm$ desvio padrão) obtidos no ensaio de precipitação fracionada (0-20/ 20-50%) referentes a C-ficocianina (C-FC).	86
Tabela 2 - Valores experimentais (média $\pm$ desvio padrão) obtidos no ensaio de precipitação fracionada (0-20 / 20-50%) referentes a enzima anidrase carbônica (AC).	87
Tabela 3 - Análise estatística entre os ensaios de precipitação fracionada (0-20/ 20-50%).	89
Tabela 4 - Valores experimentais (média $\pm$ desvio padrão) obtidos nos ensaios de precipitação fracionada com pH 8 referentes a C-ficocianina (C-FC).	91
Tabela 5 - Valores experimentais (média $\pm$ desvio padrão) obtidos nos ensaios de precipitação fracionada com pH 8 referentes a enzima anidrase carbônica (AC).	92
Tabela 6 - nálise estatística entre os ensaios de precipitação fracionada com pH 8.	92
Tabela 7 - Valores experimentais (média $\pm$ desvio padrão) obtidos nos ensaios de ultrafiltração utilizando tubos Vivaspin para C-ficocianina.	95
Tabela 8 - Valores experimentais (média $\pm$ desvio padrão) obtidos nos ensaios de ultrafiltração utilizando tubos Vivaspin para anidrase carbônica.	95
Tabela 9 -- Fatores de retenção e concentração (C-ficocianina, anidrase carbônica e volume) e percentual de rejeição para as membranas de polietersulfona (50 kDa e 100 kDa), em tubo Vivaspin.	96
Tabela 10 - Valores experimentais (média $\pm$ desvio padrão) obtidos nos ensaios de ultrafiltração para C-ficocianina (100 kDa).	99
Tabela 11 - Valores experimentais (média $\pm$ desvio padrão) obtidos nos ensaios de ultrafiltração para anidrase carbônica (100 kDa).	99
Tabela 12 - Fatores de retenção e concentração (C-ficocianina, anidrase carbônica e volume) e percentual de rejeição para a membrana de 100 kDa (celulose regenerada).	99

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figura 1 - Ensaios de precipitação com diferentes valores de pH (6, 7 e 8) e saturação de sulfato de amônio (40, 50 e 60%).....	60
Figura 2 - Curva de contorno para o fator de purificação da anidrase carbônica em função da saturação de sulfato de amônio e do pH.....	64
Figura 3 - Curva de contorno para o fator de purificação da C-ficocianina em função da saturação de sulfato de amônio e do pH.....	64
Figura 4 - Influência da saturação do sulfato de amônio na atividade enzimática da anidrase carbônica. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias (Teste Tukey, $p > 0,05$).....	67

ARTIGO 2

Figura 1 - Fração retida e permeada após ultrafiltração com tubos Vivaspin utilizando membrana de 50 kDa.....	94
Figura 2 - Membrana de 50 kDa após ultrafiltração.....	97
Figura 3 - Fluxo médio de permeado durante o processo de UF usando membrana de 100 kDa (celulose regenerada).....	98

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	19
RESUMO	21
ABSTRACT	23
1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
 CAPÍTULO II	 29
3 REVISÃO DA LITERATURA	31
3.1 CIANOBACTÉRIAS	31
3.2 <i>SPIRULINA PLATENSIS</i>	31
3.3 FICOBILIPROTEÍNAS	34
3.3.1 C-ficocianina	34
3.4 ANIDRASE CARBÔNICA	36
3.5 PURIFICAÇÃO DE BIOPRODUTOS	38
3.5.1 Precipitação de proteínas	40
3.5.2 Ultrafiltração	41
 CAPÍTULO III	 45
ARTIGO I: PURIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANIDRASE CARBÔNICA E C-FICOCIANINA UTILIZANDO PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO	47
RESUMO	49
1 INTRODUÇÃO	51
2. MATERIAL E MÉTODOS	52
2.1 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO	52
2.2 EXTRAÇÃO SIMULTÂNEA DE C-FICOCIANINA E ANIDRASE CARBÔNICA	53
2.3 PURIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE C-FICOCIANINA E ANIDRASE CARBÔNICA POR PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO	53
2.3.1 Delineamento fatorial 2 ² com pontos centrais	53
2.3.2 Validação do modelo	54
2.4 INFLUÊNCIA DO SAL SOBRE A ATIVIDADE DA ANIDRASE CARBÔNICA	55
2.5 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	55
2.5.1 Concentração e pureza de C-ficocianina	55
2.5.2 Atividade enzimática de anidrase carbônica	55
2.5.3 Concentração de biomassa e determinação de proteínas	56
2.6 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO PROCESSO	56
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
3.1 DELINEAMENTO FATORIAL 2 ² COM PONTOS CENTRAIS	57
3.1.1 Validação do modelo matemático	65
3.2 INFLUÊNCIA DO SAL NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ANIDRASE CARBÔNICA	66
4 CONCLUSÃO	67
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

ARTIGO II: PURIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANIDRASE CARBÔNICA E C-FICOCIANINA POR DIFERENTES TÉCNICAS.....	73
RESUMO.....	75
1 INTRODUÇÃO.....	77
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	78
2.1 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO	78
2.2 EXTRAÇÃO SIMULTÂNEA DE C-FICOCIANINA E ANIDRASE CARBÔNICA ...	79
2.3 PURIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE C-FICOCIANINA E ANIDRASE CARBÔNICA POR DIFERENTES TÉCNICAS	79
2.3.1 Precipitação fracionada com sulfato de amônio	79
2.3.2 Purificação simultânea de anidrase carbônica e C-ficocianina por ultrafiltração.....	80
2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	81
2.4.1 Concentração e pureza de C-ficocianina	81
2.4.2 Atividade enzimática de anidrase carbônica.....	81
2.4.3 Concentração de biomassa e determinação de proteínas.....	82
2.5 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO PROCESSO	82
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	83
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
3.1 PRECIPITAÇÃO FRACIONADA COM SULFATO DE AMÔNIO.....	84
3.2 ULTRAFILTRAÇÃO.....	93
4 CONCLUSÃO.....	100
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
 CAPÍTULO IV	 105
4 CONCLUSÃO GERAL.....	107
5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	109
 CAPÍTULO V.....	 111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113

CAPÍTULO I

RESUMO GERAL, ABSTRACT GERAL, INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

RESUMO

A biomassa microalgal é uma fonte potencialmente atrativa para obtenção de diversos bioprodutos, dentre eles a C-ficocianina e a anidrase carbônica. C-ficocianina é um pigmento fotossintético acessório da família das ficobiliproteínas e tem sido utilizada como corante natural na indústria de alimentos. A anidrase carbônica é uma metaloenzima que catalisa a hidratação reversível do dióxido de carbono (CO_2) com alta eficiência, sendo utilizada para captação de CO_2 através de sistemas biológicos. Os métodos de extração, separação, purificação e a qualidade da matéria-prima desempenham papéis importantes durante o processo. Muitos métodos podem ser aplicados para purificação de bioprodutos, tais como precipitação, ultrafiltração, sistema aquoso bifásico ou a combinação destes seguido de uma ou mais etapas cromatográficas. A precipitação utilizando sulfato de amônio é uma das técnicas mais adotadas, tanto em escala laboratorial como industrial. A ultrafiltração tem ganhado importância na purificação de bioprodutos, pois pode ser aplicada na produção em larga escala e é simples de ser realizada. Além disso, esta técnica é normalmente realizada à temperatura ambiente, o que minimiza o dano térmico ao produto. Neste estudo, as técnicas de precipitação com sulfato de amônio e ultrafiltração foram utilizadas para purificar simultaneamente C-ficocianina e anidrase carbônica a partir de biomassa úmida de *Spirulina platensis* LEB-5². No primeiro artigo, foi estudado a precipitação direta utilizando diferentes faixas de saturações de sulfato de amônio (40, 50 e 60%) e diferentes valores de pH (6, 7 e 8). Através de um delineamento fatorial 2² com pontos centrais verificou-se que para alcançar um maior fator de purificação para anidrase carbônica e C-ficocianina deve-se utilizar pH 8 e saturação de sulfato de amônio de 60%, obtendo-se fator de purificação de anidrase carbônica e C-ficocianina de 572,2 e 2,6 vezes, respectivamente, valores esses associados a uma elevada recuperação, 90% e 3233% para C-ficocianina e anidrase carbônica. Além disso, C-ficocianina com pureza de grau alimentar (0,71) foi obtida. Os dois bioprodutos foram separados, uma vez que C-ficocianina foi obtida na fração precipitada e anidrase carbônica na fração sobrenadante. A influência do sulfato de amônio na atividade enzimática da anidrase carbônica (U/mL) também foi avaliada, onde a atividade da anidrase carbônica (U/mL) aumentou conforme o incremento na concentração de sal. No segundo artigo, fez-se uso da precipitação fracionada com sulfato de amônio e também verificou-se que foi possível separar C-ficocianina e anidrase carbônica. Para purificação simultânea dos dois bioprodutos os melhores resultados obtidos foram utilizando pH 8 e fracionamento na faixa de 0-20% / 20-50% de saturação de sulfato de amônio. Nestas condições foram obtidos fator de purificação de 347,0 vezes e recuperação de 3049% para anidrase carbônica e fator de purificação de 2,0 vezes e recuperação de 85% para C-ficocianina com pureza de 0,75. Não foi possível purificar simultaneamente C-ficocianina e anidrase carbônica utilizando ultrafiltração. Ao utilizar tubos Vivaspin® 15 Turbo, pode-se concluir que a membrana de 50 kDa permitiu a passagem dos dois bioprodutos e a de 100 kDa reteve os dois bioprodutos devido à incrustação da membrana. Ao se utilizar membrana de 100 kDa na ultrafiltração com célula também pode-se perceber que tanto a C-ficocianina quanto a anidrase carbônica permaneceram na fração retida, fazendo com que estas condições não se apliquem ao processo de separação.

Palavras-chave: Bioprodutos. Precipitação por sal. *Spirulina platensis*. Ultrafiltração.

SIMULTANEOUS PURIFICATION OF C-PHYCOCYANIN AND CARBONIC ANHYDRASE

ABSTRACT

Microalgal biomass is a potentially attractive source for the obtaining of several bioproducts, among them C-phycoerythrin and carbonic anhydrase. C-phycoerythrin is a photosynthetic accessory pigment of the phycobiliproteins family and has been used as a natural dye in the food industry. Carbonic anhydrase is a metalloenzyme that catalyzes the reversible hydration of carbon dioxide (CO₂) with high efficiency, being used to capture CO₂ through biological systems. The methods of extraction, separation, purification and the raw material's quality play important roles during the process. Many methods may be applied in the purification of bioproducts, such as precipitation, ultrafiltration, aqueous biphasic system or their combination, followed by one or more chromatographic steps. Precipitation using ammonium sulfate is one of the most widely used techniques, both in laboratorial and industrial scale. Ultrafiltration has gained importance in the purification of bioproducts since it can be applied in large scale production and is simple to perform. In addition, this technique is usually performed at ambient temperature, which minimizes thermal damage to the product. In this study, ammonium sulfate precipitation and ultrafiltration techniques were used to simultaneously purify C-phycoerythrin and carbonic anhydrase from the wet biomass of *Spirulina platensis* LEB-52. In the first article, direct precipitation was studied using different ranges of ammonium sulfate saturations (40, 50 and 60%) and different pH values (6, 7 and 8). Through a factorial design 2² with central points, it was verified that, in order to reach a higher purification factor for carbonic anhydrase and C-phycoerythrin, pH 8 and an ammonium sulfate saturation of 60% must be used, obtaining purification factors of carbonic anhydrase and C-phycoerythrin of 572.2 and 2.6 times, respectively, values associated with high recoveries, 90% and 3233% for C-phycoerythrin and carbonic anhydrase. In addition, C-phycoerythrin with food grade purity (0.71) was obtained. The two bioproducts were separated, since C-phycoerythrin was obtained in the precipitated fraction and carbonic anhydrase in the supernatant fraction. The influence of ammonium sulfate on the enzymatic activity of carbonic anhydrase (U/mL) was also evaluated, where the carbonic anhydrase activity (U/mL) increased as the salt concentration increased. In the second article, fractional precipitation with ammonium sulfate was used and it was also found that it was possible to separate C-phycoerythrin and carbonic anhydrase. For simultaneous purification of the two bioproducts the best results were obtained using pH 8 and fractionation in the range of 0-20%/20-50% ammonium sulfate saturation. Under these conditions, a purification factor of 347.0 times and recovery of 3049% for carbonic anhydrase and purification factor of 2.0 times and recovery of 85% for C-phycoerythrin with purity of 0.75 were obtained. It was not possible to simultaneously purify C-phycoerythrin and carbonic anhydrase using ultrafiltration. When using Vivaspin® 15 Turbo tubes, it can be concluded that the 50 kDa membrane allowed the passage of the two bioproducts and the 100 kDa membrane retained the two bioproducts due to membrane incrustation. When using a 100 kDa membrane in cell ultrafiltration, it could also be seen that both C-phycoerythrin and carbonic anhydrase remained in the retained fraction, so that these conditions do not apply to the separation process.

Keywords: Bioproducts. Precipitation by salt. *Spirulina platensis*. Ultrafiltration.

1. INTRODUÇÃO

A população humana vem crescendo rapidamente e, como consequência, podemos citar a demanda crescente de alimentos, energia e água que passarão a ser sérios desafios mundiais para as próximas décadas (KING; INDERWILDI; WILLIAMS, 2010). Além disso, as preocupações com as mudanças climáticas e a dependência excessiva de combustíveis fósseis estão direcionando o investimento para alternativas mais sustentáveis (IPCC, 2014; SUBHADRA; GRINSON, 2011). A conscientização oriunda dessas restrições vem chamando a atenção para o investimento em iniciativas de pesquisa e comercialização de microalgas (WALTZ, 2009) a partir das biorrefinarias, instalações que integram os processos de conversão de biomassa em vários produtos e energia comercializáveis, otimizando o uso de recursos e minimizando o desperdício, gerando assim maiores benefícios e rentabilidade (JUNG et al., 2013).

As microalgas são organismos fotossintéticos unicelulares que estão naturalmente presentes em diferentes ambientes aquáticos, incluindo rios, lagos, oceanos e solos, podendo ser utilizados como matéria-prima para a produção de uma infinidade de bioprodutos (STEPHENSON, 2011). A *Spirulina* é uma cianobactéria fotossintética planctônica que forma grandes populações em corpos de água tropicais e subtropicais que contenham uma quantidade elevada de sais como carbonato e bicarbonato com pH alcalino 9,5 (SJORS; ALESSANDRO, 2010). Dentre os diversos compostos que podem ser obtidos através da biomassa de *Spirulina* destacam-se a anidrase carbônica (AC) e a C-ficocianina (C-FC).

C-ficocianina é uma ficobiliproteína que quando isolada de *Spirulina platensis* pode ser utilizada como ingrediente, nutriente e corante natural para alimentos (RODA-SERRAT, 2017) e cosméticos (ARIEDE et al., 2017). Além disso, pode ser usada como agente terapêutico potencial em doenças induzidas pelo estresse oxidativo (BHAT; MADYASTHA, 2001).

A anidrase carbônica (EC 4.2.1.1) é uma metaloenzima que em sua maioria contém um átomo de zinco em sua conformação, é amplamente distribuída na natureza e catalisa a hidratação reversível de dióxido de carbono (CO_2) em íons carbonato (HCO_3^-). Nas plantas, está envolvida na fixação fotossintética do CO_2 (SUPURAN, 2013), podendo ser utilizada no desenvolvimento de medicamentos para os tratamentos de glaucoma, obesidade, osteoporose, epilepsia e câncer (SUPURAN, 2012; SUPURAN, 2008).

Devido às diversas aplicações em vários campos, torna-se essencial desenvolver um método fácil e rentável para a purificação de bioprodutos de origem microalgal a fim de

atender a crescente demanda (BERMEJO et al., 2002). A purificação de produtos biotecnológicos pode ser feita por uma combinação de diferentes técnicas, tais como precipitação, ultrafiltração, sistema aquoso bifásico ou a combinação destes (LING et al., 2004), seguidos de uma ou mais etapas cromatográficas, como cromatografia de troca iônica, de afinidade, de interação hidrofóbica ou de adsorção. A finalização geralmente é feita com etapa de filtração em gel, secagem, cristalização ou liofilização do produto de interesse (KILLIKIAN; PESSOA JR, 2005).

A precipitação por sal pode ser usada para a remoção inicial de proteínas e concentração inicial da amostra, mas a aplicação do procedimento de precipitação é estritamente dependente das características e das propriedades da proteína em questão. Um sal, geralmente sulfato de amônio, é adicionado ao extrato na concentração que causa a precipitação de proteínas (BUYEL et al., 2014).

Existem diversos fatores envolvidos no processo de separação e fracionamento de proteínas por ultrafiltração: interação soluto-soluto, interação soluto-membrana, polarização, modo de transporte do soluto, entre outros vários fatores que podem ser responsáveis pelo fracionamento de proteína (ZUÑIGA et al., 2003). Separações com membranas não requerem aditivos, e podem ser realizadas em baixas temperaturas, com menor consumo de energia em comparação com outros processos de separação térmica (SAXENA et al., 2009).

O grupo de pesquisa do laboratório de Micribiologia e Biosseparações desta universidade já vem desenvolvendo estudos com diferentes métodos para a purificação de C-ficocianina, como: precipitação (SILVA et al., 2009), sistema aquoso bifásico (ANTELO et al., 2010), separação por membranas (FIGUEIRA, 2014), cromatografia de troca iônica em coluna de leito fixo (FIGUEIRA, 2014; MORAES; KALIL, 2009; SILVEIRA et al., 2008) e de leito expandido (FIGUEIRA, 2014; MORAES et al., 2011). Além disso, alguns estudos aplicam diferentes combinações das técnicas de purificação supracitadas (MORAES; BURKERT; KALIL, 2010). Entretanto, a purificação de anidrase carbônica de origem microalgal não é amplamente difundida, sendo encontrados na literatura poucos estudos abordando este assunto (HILTONEN et al, 1995; KARLSSON et al., 1995). Uma vez que ambos bioprodutos - C-ficocianina e anidrase carbônica - podem ser obtidos a partir da biomassa microalgal de *Spirulina platensis* e considerando o potencial uso comercial destes dois biocompostos, torna-se promissor e inovador estudar métodos de purificação simultânea de C-ficocianina e anidrase carbônica.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Purificar simultaneamente, a partir de biomassa microalgal de *Spirulina platensis* LEB-52, os bioprodutos C-ficocianina e anidrase carbônica por diferentes técnicas utilizando precipitação com sulfato de amônio e ultrafiltração.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência da saturação de sulfato de amônio e pH no processo de purificação simultânea de C-ficocianina e anidrase carbônica por precipitação com sulfato de amônio.
- Avaliar a precipitação fracionada com sulfato de amônio em diferentes faixas de saturação e valores de pH, a fim de estabelecer a melhor condição para o processo em termos de fator de purificação, recuperação e pureza para C-ficocianina e fator de purificação e recuperação para anidrase carbônica.
- Separar C-ficocianina e anidrase carbônica por ultrafiltração utilizando dois métodos (sistema convencional e tubos Vivaspin® Turbo) com diferentes membranas com massas molares de corte de 50 e 100 kDa.

CAPÍTULO II
REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CIANOBACTÉRIAS

Segundo a classificação de Woese e Fox (1977), os micro-organismos dividem-se em três reinos: eucariontes, arqueobactérias e eubactérias, pertencendo a esta última a divisão *Cyanophyta*, as algas “verdes-azuis” (HOEK et al., 1995; PELCZAR et al., 1993). As cianobactérias, anteriormente mencionadas como algas “verdes-azuis”, contém pigmentos encontrados em tilacoides. Os tilacoides são envolvidos pelo citoplasma e não são membrano-limitados. Estes micro-organismos apresentam como característica a ausência de membrana nuclear (são procarióticos), de retículo endoplasmático, de mitocôndrias e de aparelho de Golgi, presença de peptoglicano e ácido diaminopimérico na parede celular, sensibilidade a infecções por vírus e morfologia em geral semelhante a das bactérias (PELCZAR et al., 1993).

Distribuídas no solo, água doce e ambiente marinho, as cianobactérias são importantes membros das comunidades fitoplanctônica e perifítica (OLIVER; GRANF, 2000). Ainda, muitas espécies ocorrem em habitats extremos, como fontes termais, lagos hipersalinos e desertos (WEHR; SHEATH, 2015). As cianobactérias crescem de uma maneira muito simples e podem ser cultivadas usando energia solar, luz artificial, água e fonte de elementos essenciais como carbono, fósforo, enxofre, nitrogênio, potássio e ferro (MARKOU; VANDAMME; MUYLAERT, 2014).

Devido a sua capacidade de fixar nitrogênio, as cianobactérias devem ter sido as primeiras colonizadoras de desertos, cavidades vulcânicas e regiões polares, onde trabalharam com os líquens na fixação do nitrogênio nas rochas. As cores das cianobactérias incluem amarelo-dourado-claro, pardo, vermelho, verde esmeralda, azul, violeta e azul escuro, devido a presença de uma vasta quantidade de pigmentos, incluindo carotenoides, clorofila e ficobiliproteínas (HENRIKSON, 1994). Dentre as ficobiliproteínas estão a ficocianina, a aloficocianina e a ficoeritrina.

3.2 *Spirulina platensis*

Spirulina é classificada como uma bactéria aeróbia fotossintética, da divisão filogenética das eubactérias, pertencente ao grupo I: Cianobactérias; Sub-seção III: ordem *Oscillatoriales*; Gênero I: *Spirulina*. Assim, é uma célula tipicamente procariótica com parede

celular, membrana celular, ribossomo e região nuclear, sem núcleo verdadeiro (BROCK; MADIGAM, 1991). É uma alga verde-azulada que se desenvolve em águas fortemente alcalinas, possui tamanho microscópico e é constituída por células de 2 a 8 µm de comprimento, que formam uma espiral, o que origina seu nome. É unicelular e descendente das primeiras formas fotossintéticas surgidas a aproximadamente 3 bilhões de anos, sem mudanças evolutivas (SHIMAMATZU, 2004).

A microalga *Spirulina platensis* é usada na nutrição humana devido ao seu alto teor proteico e excelente valor nutritivo (DESMORIEUX; DECAEN, 2005; RANGEL-YAGUI et al., 2004; SPOLAORE et al., 2006). É também uma fonte valiosa de ácidos graxos essenciais (não sintetizados por seres humanos) (ZHANG et al, 2011). Segundo Ambrosi et al. (2008), *Spirulina* e os seus componentes possuem uma diversidade de atividades nutricionais e terapêuticas que fazem dela, além de um excelente suplemento alimentar, uma fonte potencial para emprego na prevenção e no tratamento de várias enfermidades. Dessa forma, constitui uma alternativa eficiente para o desenvolvimento de produtos nutracêuticos, os quais podem reduzir os efeitos colaterais originados pelos medicamentos usuais. Estudos realizados isolando compostos antioxidantes de *Spirulina* sp. (por exemplo, β-caroteno, astaxantina e outros carotenoides) demonstraram o potencial de proteção contra *stress* oxidativo, causador de um amplo espectro de doenças e envelhecimento (BARROW; SHAHIDI, 2008).

Spirulina platensis tem sido comercializada desde o início da década de 80. Na época o sucesso comercial da *Spirulina* fez com que houvesse o desenvolvimento de empresas de produção tanto no Extremo Oriente, principalmente Tailândia e Taiwan, como nos Estados Unidos. As “Earthrise Farms”, fazendas localizadas próximo a Salton Sea, criaram a primeira empresa de produção de *Spirulina* nos Estados Unidos com capital de risco dos japoneses (BENEMANN, 1990). O produto era exportado primariamente para o Japão, onde, além de ser usado como alimento natural, era submetido à extração para obter o pigmento C-ficocianina, usado como corante em produtos como gomas de mascar, sorvetes e bebidas (KATO, 1987). Assim, em um período relativamente curto de tempo, a indústria de biotecnologia de microalgas adquiriu crescente e significativa diversidade. No ano de 2005 o valor de mercado da *Spirulina* seca foi estimado em US\$ 40 milhões (SINGH; BHUSHAN; BANERJEE, 2005).

As microalgas são compostas por três principais componentes: proteína, carboidratos e lipídios. A composição proximal de diferentes microalgas, incluindo a de *Spirulina platensis*, está citada na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição proximal de diferentes microalgas (base seca).

Microalga	Proteína (%)	Carboidrato (%)	Lipídios (%)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Spirogyra</i> sp.	6-20	33-64	11-21
<i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Prymnesium parvum</i>	28-45	25-33	22-39
<i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7
<i>Synechococcus</i> sp.	63	15	11

Fonte: Suganya et al. (2015).

As proteínas são parte dos constituintes principais das microalgas e variam o percentual de acordo com a espécie. A proteína é um dos produtos considerado importante para as biorrefinarias de microalgas e pode ser usada para nutrição humana ou animal (VANTHOOR-KOOPMANS et al., 2013). Os carboidratos contidos nas algas são compostos principalmente de glicose, celulose e vários tipos de polissacarídeos. Entre estes, os polissacarídeos têm funções biológicas como moléculas de armazenamento, proteção e estruturais (AIKAWA et al., 2012). As microalgas podem acumular uma elevada percentagem de lipídios, dependendo das condições do cultivo, tais como a razão de carbono/ nitrogênio (C/N) no meio de cultivo (FAKAS et al., 2009; ZHANG et al., 2011) ou condições de *stress*, como alta temperatura, mudança de pH, elevada concentração de sal dentre outros (KWAK et al., 2016). As microalgas são capazes de produzir uma maior produtividade lipídica em comparação com outras culturas energéticas, o que as tornam atraentes como matéria-prima para a produção de biodiesel e suplementos alimentares saudáveis (YEH; CHANG, 2012).

3.3 FICOBILIPROTEÍNAS

Ficobiliproteínas são pigmentos solúveis em água, muito estáveis em pH fisiológico e altamente fluorescentes, encontradas em cianobactérias e algas vermelhas, podendo representar mais de 60% do conteúdo de proteína solúvel total, ou quase 20% da massa seca total da alga (BOGORAD, 1975). Estes compostos absorvem luz, em uma ampla variação de comprimentos de onda na parte visível do espectro, e transferem a energia de excitação para o centro da reação na membrana fotossintética para conversão em energia química. As ficobiliproteínas podem ser divididas em três principais classes dependendo das propriedades de absorção: ficoeritrinas (PE, $\lambda_{\text{máx}} = 540 - 570 \text{ nm}$), ficocianinas (PC, $\lambda_{\text{máx}} = 610 - 620 \text{ nm}$) e aloficocianina (APC, $\lambda_{\text{máx}} = 650 - 655 \text{ nm}$). Algumas cianobactérias tem um quarto tipo de biliproteína no lugar de PE, a ficoeritrocianina. Visualmente, a ficoeritrina aparece na cor roxa, as ficocianinas possuem coloração azul, e as aloficocianinas são azuis com uma insinuação para o verde (SEKAR; CHANDRAMOHAM, 2008).

Um dos mais importantes requerimentos para obtenção de ficobiliproteínas de cianobactérias é encontrar um procedimento ótimo de extração e purificação. Técnicas usadas para extrair e purificar proteínas também são aplicadas às ficobiliproteínas, mas o procedimento de purificação que funciona bem para ficobiliproteína de um organismo pode não ser a melhor escolha para a ficobiliproteína de outro organismo (ABALDE et al., 1998). O grande interesse nestas biomoléculas está na aplicação como corantes naturais. C-ficocianina, por possuir coloração natural azul, possui diversas aplicações como corantes em alimentos e cosméticos, dependendo do seu grau específico de pureza, que pode variar de 0,7 a 4,0, com respectivo aumento de seu valor comercial (SEKAR; CHANDRAMOHAN, 2008).

Diversos estudos mostram as aplicações biotecnológicas das ficobiliproteínas (Quadro 1). As aplicações estendem-se desde a indústria alimentícia, onde estas podem ser utilizadas, como corante natural nos alimentos (JESPERSEN et al., 2005; PATEL et al., 2004; SENTHILKUMAR et al., 2013; ZHOU et al., 2015), até a farmacêutica, onde são exploradas, dentre outras, suas propriedades anticancerígena (SHANAB et al., 2012) e anti-inflamatória (ROBERTSON et al., 2015).

3.3.1 C-ficocianina

C-ficocianina é um pigmento azul fotossintético presente em cianobactérias como a *Spirulina platensis*. C-ficocianina é formada por uma parte proteica e grupamento cromóforo,

sendo que esta proteína consiste em subunidades chamadas α e β . Existem diferentes estruturas cristalinas para diferentes ficocianinas, ou seja, as subunidades podem ser associadas em monômeros ($\alpha\beta$), em trímeros ($\alpha\beta$)₃ e hexâmeros ($\alpha\beta$)₆ de massas molares na faixa de 18 e 20 kDa, respectivamente (PATEL et al., 2005; NAKAMOTO; HONMA, 2006).

Quadro 1 – Aplicações biotecnológicas de ficobiliproteínas.

Aplicação	Referências
Corante alimentício (alimentos)	JESPERSEN et al., 2005; PATEL et al., 2004; SENTHILKUMAR et al., 2013; ZHOU et al., 2015
Substâncias antioxidantes (alimentos)	ROCHA et al., 2007
Terapia fotodinâmica	DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003
Substâncias antioxidantes (saúde)	SONI; VISAVADIYA; MADAMWAR, 2009
Agente protetor de danos degenerativos	RIMBAU et al., 1999
Suplementação humana	IANG; CHEN; CHEN, 2004
Nutrição animal	CHUNTAPA; POWTONGSOOK; MENASVETA, 2003
Cosméticos	STOLZ; OBERMAYER, 2005
Atividade anticancerígena	SHANAB et al., 2012
Atividade anti-inflamatória	ROBERTSON et al., 2015
Anti-envelhecimento	KYADARI et al., 2013

A ficocianina, também conhecida como C-ficocianina, cujo prefixo refere-se à origem cianobacterial, é um pigmento fotossintético da família das ficobiliproteínas (SONI et al., 2006). Devido à sua coloração azul e juntamente com a clorofila *a*, que possui coloração verde, são responsáveis pela coloração azul-esverdeada das cianobactérias (MINKOVA et al., 2003). Tem máximo de absorção visível entre 615 e 620 nm e máximo de emissão de fluorescência em ~ 650 nm. Sua massa molar varia entre 60.000 e 240.000 Daltons (BENNETT; BOGORAD, 1973) e apresenta ponto isoelétrico entre 4,6 e 5,2 (ABALDE et al., 1998; SANTIAGO-SANTOS et al., 2004). A C-ficocianina de *Spirulina platensis* LEB-52 é estável na faixa de pH de 5,0 - 7,0, e em temperaturas de 10 °C a 25 °C (SILVA, 2005).

Estudos têm mostrado que a C-ficocianina age como estimulante do sistema imunológico, aumentando a contagem de leucócitos, cuja função principal é manter a saúde dos órgãos do corpo, proteger contra o câncer e úlceras (KYADARI et al., 2013; SHANAB et al., 2012; SONI; VISAVADIYA; MADAMWAR, 2009; VONSHAK, 1997). Quando purificada, C-ficocianina apresenta ação antioxidante frente aos radicais hidroxílicos (ESTRADA et al., 2001). Tem sido também avaliada sua capacidade como agente antitumoral e anti-inflamatório (REDDY et al., 2003).

A pureza de C-ficocianina é avaliada utilizando a razão entre a absorbância a 620 nm pela absorbância a 280 nm. Quando esta é superior a 4,0, este bioproduto apresenta grau analítico. No entanto, quando este valor é superior a 0,7, o mesmo pode ser utilizado como um biocorante na indústria de alimentos e cosméticos (KUDDUS et al, 2013). O custo da C-ficocianina de grau alimentar (pureza maior do que 0,7) é de cerca de U\$ 0,21 por grama, enquanto que o custo de grau analítico (pureza superior a 4,0) chega a U\$ 6.200,00 por grama (SOLEY INSTITUTE, 2017).

A necessidade da obtenção de C-ficocianina de diferentes graus de pureza faz com que o desenvolvimento de diferentes processos de purificação se tornem essenciais, a fim de reduzir tempo através de processos com o menor número de etapas e a maior recuperação de produto possível. A precipitação com sulfato de amônio combinada com uma variedade de princípios cromatográficos tem sido empregada para se obter C-ficocianina com grau analítico e alimentício (MINKOVA et al., 2003; MINKOVA et al., 2007; SONI et al, 2006). Sistema aquoso bifásico também é um método eficiente utilizado para purificação C-ficocianina (RITO-PALOMARES; NUEZ; AMADOR, 2001) resultando em extratos puros e com rendimentos elevados (PATIL et al., 2006; PATIL; RAGHAVARAO, 2007). Figueira (2014) extraiu C-ficocianina com pureza elevada utilizando cromatografia de troca iônica em leito expandido seguido por diafiltração/ultrafiltração, e obteve C-ficocianina com grau analítico (pureza > 4,0) utilizando, a partir do extrato clarificado, a sequência envolvendo precipitação, diafiltração/ultrafiltração, cromatografia de troca iônica em leito fixo e diafiltração/ultrafiltração.

3.4 ANIDRASE CARBÔNICA

A anidrase carbônica (EC 4.2.1.1) é uma metaloenzima que catalisa a interconversão do dióxido de carbono (CO_2) e íons de bicarbonato (HCO_3^-) em muitos organismos (Equação 1) (BADGER; PRICE, 1994; KHALIFAH, 1971).



Esta enzima está presente em várias espécies, desde bactérias e algas até vertebrados superiores (SMITH; FERRY, 1999). A anidrase carbônica existe em diferentes formas, com diferentes estruturas e massa molares. Além disso, sua atividade enzimática é variável e dependente da sua fonte de origem. Está entre uma das mais rápidas enzimas conhecidas, por exemplo, uma molécula de anidrase carbônica de eritrócito humano pode catalisar $1,4 \times 10^6$ moléculas de CO_2 em um segundo (KHALIFAH, 1971).

A anidrase carbônica desempenha diferentes papéis fisiológicos, embora a reação catalisada por ela seja, preferencialmente, a mesma, a hidratação do CO_2 e a desidratação do ácido carbônico (VERPOORTER et al., 1967). Na mineralização do CO_2 , ocorre primeiramente a hidratação do CO_2 e posterior fixação na forma de minerais de carbonato. Porém a reação de hidratação 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).

Além disto, a anidrase carbônica atua em uma série de funções bioquímicas, tais como a regulação do pH do sangue, a gliconeogênese e está principalmente envolvida no transporte de CO_2 a partir de tecidos para os pulmões (GULER; CAPASSO; SUPURAN, 2015). Além destas reações, a anidrase carbônica ainda participa da hidratação de acetaldeídos e hidrólise de alguns ésteres (PANDA; GOWRISHANKAR, 2005). Existe uma grande demanda de soluções alternativas para mitigação de CO_2 na atmosfera, principal gás de efeito estufa. Entre as estratégias que podem ser utilizadas, pode-se citar a captura enzimática e sequestro de CO_2 (ORES et al., 2012; RAMANAN et al., 2009). A anidrase carbônica pode ser estudada para uso nesses sistemas devido à sua alta eficiência para catalisar a hidratação reversível de CO_2 ao bicarbonato (LI et al., 2012; ORES et al., 2012; RAMANAN et al., 2009; SHARMA; BHATTACHARYA, 2010; VINOBA et al., 2012).

Ores et al. (2012) purificaram anidrase carbônica com extração por etanol/clorofórmio e precipitação com sulfato de amônio. A purificação de anidrase carbônica por extração por etanol/clorofórmio resultou em atividade enzimática de 2623 U/mL, recuperação de 98% e fator de purificação de 104 vezes. A fração precipitada por saturação de sulfato de amônio a 60% mostrou atividade enzimática de 2162 U/mL, recuperação de 66% e fator de purificação de 1,4 vezes. A enzima purificada por ambas técnicas mostraram potencial na captura de dióxido de carbono.

Diferentes métodos de purificação da enzima anidrase carbônica vem sendo

estudados ao longo dos anos (Quadro 2). Vale ressaltar que somente os estudos de Hiltonen et al. (1995) e Karlsson et al. (1995) foram realizados com anidrase carbônica extraída a partir de microalgas. A função da anidrase carbônica em cianobactérias é aumentar a concentração de dióxido de carbono em torno da enzima fotossintética ribulose-bifosfato carboxilase (Rubisco). O dióxido de carbono é usado pela Rubisco para iniciar a primeira reação do ciclo de Calvin, a carboxilação da ribulose-bifosfato (BADGER; PRICE, 1992; VAN-HILLE et al., 2003).

Quadro 2 – Métodos de purificação para a enzima anidrase carbônica.

Organismo	Método de purificação	Referência
Eritrócito de Porquinho da Índia	Precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de exclusão (Sephadex G-75)	CARTER; PARSONS, 1970
Eritrócito de Truta-arco-íres	Etanol/ clorofórmio, cromatografia de exclusão (Sephadex G-75) e cromatografia de troca iônica	HALL, 1983
Eritrócito humano	Cromatografia de afinidade (Sephadex-4B-L-sulfanilamida)	DEMIR, 1997
Estômago bovino	Cromatografia de afinidade (Sephadex-4B-L-sulfanilamida)	DEMIR, 2005
Eritrócito bovino	Etanol/clorofórmio e precipitação com sulfato de amônio	ORES, 2012
<i>Coccomyxa</i> sp.	Precipitação com sulfato de amônio seguido de cromatografia de troca iônica e cromatografia de interação hidrofóbica	HILTONEN et al., 1995
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica	KARLSSON et al., 1995

3.5 PURIFICAÇÃO DE BIOPRODUTOS

A purificação de produtos biotecnológicos produzidos por células de animais ou microbianas constitui uma etapa complexa do processo, dadas as variadas características dos meios de cultivo e das biomoléculas de interesse, como ácidos orgânicos, antibióticos,

polissacarídeos, aminoácidos, peptídeos e proteínas (KILIKIAN; PESSOA JR, 2005). Para produtos intracelulares é necessário efetuar o rompimento celular prévio, tornando o processo de purificação de biomoléculas mais difícil em comparação aos bioprodutos extracelulares. Assim, a purificação de uma determinada proteína pode requerer muitas etapas para remover um grande número de contaminantes (NELSON; COX, 2006).

Para obter um produto homogêneo e puro, a presença de contaminantes deve ser removida ou reduzida para níveis aceitáveis. Caracterizar a natureza do contaminante é um dos principais desafios da purificação (FISCHER et al., 2012). Muitas estratégias têm sido propostas para otimizar e encurtar o processo de *downstream* utilizando materiais de menor custo ou reduzindo o número de etapas de processo. A regra geral para se projetar o processo de *downstream* é que as etapas iniciais de processo de produtos biológicos devem estar em conformidade com a plataforma de produção, enquanto etapas posteriores devem ser adaptadas às propriedades da proteína de interesse (GECHELE et al., 2014).

A purificação pode ser dividida em quatro etapas genéricas: separação de células e seus fragmentos do meio de cultivo (clarificação); concentração e/ou purificação de baixa resolução; purificação de alta resolução; e, finalmente, operações para acondicionamento final do produto. A cromatografia de troca iônica está inserida na purificação de alta resolução, que compreende a separação de classes de moléculas com características físico-químicas semelhantes, como as proteínas (KILLIKIAN; PESSOA JR, 2005). No entanto, a fim de manter a eficiência, a purificação não deve conter mais de três etapas de processo (LOJEWSKA et al., 2015).

A purificação de C-ficocianina utilizando diferentes técnicas é bem discutida. Patel et al. (2005) utilizaram precipitação fracionada com sulfato de amônio (0-25% e 25-50% de saturação) seguido por cromatografia de troca iônica, onde obtiveram ao final do processo extrato com pureza de 4,42 e recuperação de 45,6%. Chen et al. (2016) utilizaram a combinação de precipitação fracionada e cromatografia de troca iônica para purificar o bioproduto e obtiveram pureza de 4,33 no extrato com recuperação de 33%. Moraes (2006) estudou a purificação de C-ficocianina de *Spirulina platensis* por precipitação fracionada e por cromatografia de troca iônica em leite expandido e obteve extrato com pureza de grau alimentar para ambas as técnicas. Na etapa de precipitação fracionada obteve as melhores respostas na faixa de 0-20 / 20-50% de saturação de sulfato de amônio, pureza de 0,88 e 83,8% de recuperação. A fim de estudar a influência de diferentes parâmetros sobre a purificação de C-ficocianina. Silva (2005) otimizou a etapa de precipitação na purificação do bioproduto através de um planejamento experimental e obteve extrato com 0,89 de pureza, fator de

purificação de 1,7 vezes e recuperação de 91,2%. Sala (2017) extraiu C-ficocianina seletivamente utilizando EDTA como agente de ruptura celular e tampão tris-SO₄ (50 mM e pH 7,4) como agente extrator, e obteve já nesta etapa extrato com pureza acima de 0,7, após C-ficocianina foi purificada e concentrada por ultrafiltração utilizando os tubos Vivaspin® 15 Turbo com retenção nominal da membrana de 50 kDa, ao término do processo foi obtido extrato com pureza de 1,62 e recuperação de 93%. Um estudo amplo sobre a integração de diferentes técnicas de purificação para C-ficocianina foi realizado por Figueira (2014), onde o autor concluiu que para a obtenção do bioproduto com grau analítico (pureza > 4,0), deve ser aplicado, a partir de extrato clarificado, as etapas de precipitação, diafiltração/ultrafiltração, cromatografia de troca iônica em leito fixo e diafiltração/ultrafiltração. O extrato apresentou uma recuperação global de 41,6%.

Já a purificação de anidrase carbônica de origem microalgal não é muito discutida, foram encontrados somente os estudos de Hiltonen et al. (1995) e Karlsson et al. (1995). Hiltonen et al. (1995) purificaram anidrase carbônica utilizando cromatografia de troca iônica a fim de isolar e caracterizar o DNA da alga *Coccomyxa* sp. Karlsson et al. (1995) purificaram anidrase carbônica de *Chlamydomonas reinhardtii* utilizando precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e cromatografia de interação hidrofóbica a fim de relacionar a anidrase carbônica presente na alga com as da espécie humana.

3.5.1 Precipitação de proteínas

Precipitados de proteínas são agregados de diferentes moléculas proteicas, grandes o suficiente para serem observadas a olho nu, e sedimentam sob valor de força centrífuga relativamente baixa. A precipitação é um método importante de separação amplamente utilizado na purificação de proteínas, esta pode ser realizada por agentes como sais neutros, solventes orgânicos, polímeros com alta massa molar ou por ajuste apropriado do pH. A precipitação é baseada na solubilidade das proteínas, visto que estas são classificadas de acordo com o comportamento que apresentam quando presentes em diferentes solventes (KILIKIAN; PESSOA JR, 2005).

Este método pode ser utilizado para a remoção de impurezas e concentração da amostra inicial, mas a aplicação do procedimento de precipitação é estritamente dependente das características da proteína de interesse e das proteínas contaminantes. Este método permite remover até 90% das proteínas da célula. Um sal, normalmente sulfato de amônio, é adicionado

ao extrato em concentração que provoca a precipitação de proteínas. Às vezes é possível precipitar a proteína alvo usando calor em vez de sal, mas exige que a proteína seja termoestável (BUYEL et al., 2014). Em casos raros, é desejável utilizar a precipitação pelo pH, mas a proteína deve ser estável em pH extremo (LOW; O'LEARY; PUJAR, 2007).

A precipitação simples, ou em um único estágio, tem valor como técnica de concentração, entretanto a precipitação fracionada tem sido largamente utilizada industrialmente para purificação. O fracionamento em “dois-cortes” ou “dois-estágios” é o mais utilizado: consiste em um primeiro corte, em que se adiciona o precipitante em concentração suficiente para remover os contaminantes menos solúveis que a proteína de interesse; remove-se o precipitado formado; adiciona-se mais precipitante; de modo a aumentar sua concentração na fase líquida e promover a precipitação da proteína desejada na fase precipitada, com os contaminantes mais solúveis que a proteína de interesse permanecendo em solução (KILIKIAN; PESSOA JR, 2005).

O sal sulfato de amônio é comumente utilizado como agente precipitante, pois apresenta alta solubilidade e apresenta propriedades não-desnaturantes para a maioria das proteínas. A adição de pequenas quantidades de sais neutros a uma solução proteica geralmente aumenta a solubilidade – efeito *salting in*. Entretanto, o aumento da concentração de sal acima no nível ótimo leva a uma desestabilização das proteínas em solução e eventualmente promove a sua precipitação. Este efeito é conhecido como *salting out*. Em altas concentrações, os sais competem efetivamente com as moléculas de proteína pela hidratação da água. Isto promove o aumento nas interações proteína-proteína, predominando as interações entre resíduos hidrofóbicos na superfície da molécula de proteína adjacente. Tal aumento na interação proteína-proteína resulta na precipitação (WALSH, 2014).

A purificação dos biocompostos anidrase carbônica (KARLSSON et al., 1995) e C-ficocianina (CHEN et al., 2016; MINKOVA et al., 2003; MORAES et al., 2011; PATEL et al., 2005; SILVA et al., 2009) a partir de biomassa microalgal utilizando precipitação com sulfato de amônio é discutida na literatura. No entanto, a purificação simultânea destes ainda não foi estudada.

3.5.2 Ultrafiltração

A ultrafiltração por membrana consiste no transporte de soluções através de membranas semipermeáveis com poros de diâmetro de 1 a 500 nm, sob pressão de transmembrana de 100 a 500 kPa e fluxo de permeado de 10 a 200 L/hm², sendo utilizada na

separação de espécies em soluções aquosas pela massa molar, forma e/ou carga. Neste processo, a água e outras moléculas pequenas passam pela membrana, enquanto que moléculas de tamanho superior ao diâmetro do poro da membrana ficam retidas sobre esta (CUTLER, 2004; ROE, 2001; SCHMIDELL et al., 2001). As membranas de ultrafiltração podem ser feitas de polímeros, materiais cerâmicos e metálicos, sendo esta última a menos utilizada em aplicações de larga escala. A maioria dos processos de ultrafiltração fazem o uso de membranas poliméricas, constituídas principalmente de polissulfona, polietersulfona e celulose. O processo de ultrafiltração pode ser controlado por dois parâmetros principais, o fluxo de permeado e a rejeição da membrana (CUI, 2005).

Membranas de ultrafiltração foram projetadas para proporcionar alta retenção de proteínas e outras macromoléculas. Qualquer espécie capaz de atravessar os poros da película pode, assim, passar livremente pela membrana. Este arranjo permite uma combinação única de seletividade e excepcional rendimento em pressão moderada (CUTLER, 2004). Estes processos com membrana envolvem a filtração de soluções biológicas contendo proteínas, peptídeos, aminoácidos, sais e outros compostos como ácidos orgânicos, açúcares e vitaminas. Alguns exemplos incluem a concentração de proteínas de soro de leite durante a produção de uma variedade de produtos lácteos, filtração de vinho e na purificação de biocompostos (DARNON et al., 2003).

Em sistemas de ultrafiltração pode ser usado dois diferentes modos de operação. O primeiro é conhecido como fluxo perpendicular (*dead-end*), onde não ocorre o descarte do concentrado durante a produção do permeado, fazendo com que o material retido permaneça na superfície da membrana, gerando um aumento na pressão e diminuição do fluxo (OLIVEIRA, 2010). A polarização por concentração e incrustações (*fouling*) é um problema comum durante o processo de filtração ocasionando a perda de desempenho da membrana. O acúmulo de uma camada polarizada é causado pelo aumento da concentração de solutos perto da superfície da membrana, devido à sua rejeição pela barreira semipermeável e ocorre imediatamente após a filtração ser iniciada (PEEVA et al., 2012). O material retido da superfície pode ser removido por retrolavagem ou limpeza química, mas na maioria dos casos compromete a integridade da membrana irreversivelmente (METCALF; EDDY, 2007). Outro modo de operação é denominado fluxo tangencial (*cross flow*), onde o escoamento da água de entrada ocorre paralelamente à superfície da membrana; a diferença de pressão através da membrana permite a permeação de parte da água e a outra parte não permeada pode ser recirculada (OLIVEIRA, 2010).

O sucesso do fracionamento de proteínas usando ultrafiltração baseia-se tanto na

minimização da incrustação da membrana quanto na obtenção de seletividade suficientemente elevada de separação. A ultrafiltração opera em condições relativamente baixas de temperatura e pressão, não envolve mudança de fase ou adição de aditivos químicos, podendo ser aplicada na concentração de moléculas biológicas sem que ocorra a sua desnaturação ou degradação em demasia, tendo como maior vantagem o alto rendimento do produto (CUI, 2005).

Existem estudos sobre a utilização de processo de purificação por membranas para C-ficocianina. Chaiklahan et al. (2011) demonstraram o potencial de separação e purificação pelos processos de ultrafiltração e microfiltração, obtendo C-ficocianina de grau alimentar (pureza de 1,1) e aproximadamente 82% de recuperação com a utilização de ultrafiltração. Jesus (2016) removeu até 57,8% da matéria orgânica natural em suspensão no meio de cultivo de *Asthirospira platensis* utilizando membrana de ultrafiltração de 5 kDa. Figueira (2014) obteve extrato de C-ficocianina a partir da biomassa seca de *Spirulina platensis* LEB-52 com pureza de 0,95 utilizando ultrafiltração com membrana de 50 kDa, já ao integrar a diafiltração/ ultrafiltração após etapa de precipitação Figueira (2014) obteve extrato com pureza de 2,1. Sala (2017) purificou e concentrou C-ficocianina extraída seletivamente a partir da biomassa úmida de *Spirulina platensis* LEB-52 por ultrafiltração utilizando os tubos Vivaspin® 15 Turbo com retenção nominal da membrana de 50 kDa e obteve pureza acima de 1,5. Não foram encontrados na literatura trabalhos que purificaram anidrase carbônica a partir de biomassa microalgal utilizando ultrafiltração. Com base no exposto até o momento, julga-se necessário o estudo da purificação simultânea da anidrase carbônica e da C-ficocianina obtidas a partir de biomassa de *Spirulina* LEB-52, uma vez que na literatura são encontrados apenas estudos de extração simultânea (SALA, 2017; ORES, 2014) dos mesmos.

CAPÍTULO III
DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

ARTIGO I:
PURIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANIDRASE CARBÔNICA E C-FICOCIANINA
UTILIZANDO PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO

PURIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANIDRASE CARBÔNICA E C-FICOCIANINA UTILIZANDO PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO

RESUMO

Spirulina platensis é uma cianobactéria que vem sendo comercializada em vários países devido a aplicabilidade de seus constituintes, principalmente proteínas e vitaminas. Diversos compostos podem ser obtidos a partir da biomassa de *Spirulina*, dentre estes destacam-se a ficobiliproteína C-ficocianina (C-FC) e a enzima anidrase carbônica (AC). C-ficocianina é um corante azul natural que possui aplicação comercial nas indústrias de alimentos e de cosméticos. A anidrase carbônica catalisa a reação reversível de hidratação do dióxido de carbono (CO_2) em íons bicarbonato (HCO_3^-), e por este motivo a AC pode ser utilizada para aplicação na captação de CO_2 , podendo contribuir para redução da quantidade deste gás emitido na atmosfera. Os procedimentos de purificação de bioprodutos a partir de extratos de algas podem envolver diversas etapas, como por exemplo a precipitação por sal. Esta técnica é uma das operações mais adotadas tanto em escala laboratorial como industrial. O sal usualmente utilizado para precipitar proteínas é o sulfato de amônio, este é de baixo custo e pode ser posteriormente retirado por diálise ou diafiltração para que se possa continuar com as etapas de purificação. Neste estudo a influência de duas variáveis, pH e saturação de sulfato de amônio, na purificação simultânea de anidrase carbônica e C-ficocianina foi avaliada. Para tanto, foi realizado um delineamento fatorial 2^2 com pontos centrais, e as respostas estudadas foram concentração, fator de purificação, recuperação e pureza para C-ficocianina, bem como atividade enzimática, fator de purificação e recuperação para anidrase carbônica. O processo de purificação permitiu a separação dos dois bioprodutos, obtendo-se C-ficocianina na fração precipitada e anidrase carbônica na fração sobrenadante. O pH e a saturação de sulfato de amônio afetaram significativamente a purificação de C-ficocianina e anidrase carbônica em termos de fator de purificação, enquanto que para as demais respostas não exerceram influência significativa. A melhor condição para a separação e purificação dos dois bioprodutos foi 60% de saturação de sulfato de amônio e pH 8. Nestas condições foi possível obter C-ficocianina com pureza de grau alimentar (0,71), concentração de 2,0 mg/mL, fator de purificação de 2,6 vezes e recuperação de 90%, e anidrase carbônica com atividade enzimática de 0,91 U/mL, fator de purificação de 572,2 vezes e recuperação de 3233 %, valores estes explicados através de um ensaio realizado com adições crescentes de sulfato de amônio.

Palavras-chave: Bioprodutos. Precipitação por sal. *Spirulina platensis*.

1 INTRODUÇÃO

O uso de microalgas para a extração de produtos de alto valor é considerado vantajoso uma vez que elas podem ser cultivadas utilizando água, CO₂ atmosférico, carbono, nitrogênio, oxigênio, hidrogênio, dentre outros como fonte de nutriente. As microalgas são capazes de bio-sequestrar o CO₂ proveniente dos gases de combustão gerados pelas usinas, podendo contribuir para uma grande redução das emissões de gases de efeito estufa (CHEAH et al., 2015), bem como sua biomassa também pode ser utilizada para a obtenção de cosméticos, alimentos (WANG et al., 2015), combustíveis, produtos químicos e compostos de alto valor agregado (CHRISTENSON; SIMS, 2011).

Dentre os diversos compostos que podem ser obtidos da biomassa de *Spirulina* destacam-se a anidrase carbônica (AC) e a C-ficocianina (C-FC) (ORES; AMARANTE; KALIL, 2016). A C-ficocianina é uma ficobiliproteína que pode ser utilizada como pigmento natural em alimentos, tais como goma de mascar, produtos lácteos, geleias (SANTIAGO-SANTOS et al., 2004), sorvetes, sobremesas e bebidas não alcoólicas (SONANI et al., 2016), também apresenta uma variedade de efeitos benéficos a saúde, como ação antioxidante, anti-inflamatória (DENG; CHOW, 2010), antitumoral (LI et al., 2015), dentre outros. A anidrase carbônica é uma metaloenzima que vem sendo utilizada em sistemas de captura enzimática em sua forma livre ou imobilizada, pois atua catalisando com alta eficiência a hidratação reversível do dióxido de carbono (CO₂) (BOND et al., 2001; DAVY, 2009; ORES et al., 2012). Com o objetivo de reduzir os gases de efeito estufa, várias estratégias de mitigação, as quais baseiam-se em reações naturais do CO₂ nos organismos vivos, têm sido investigadas (FIGUEROA et al., 2008). A anidrase carbônica também é alvo de estudo no desenvolvimento de medicamentos para os tratamentos de glaucoma, obesidade, osteoporose, epilepsia, bem como câncer (SUPURAN, 2008; SUPURAN, 2012; SUPURAN, 2013).

Devido às diversas aplicações em vários campos, torna-se essencial desenvolver um método fácil e econômico para a purificação de bioprodutos de origem microalgal a fim de atender a crescente demanda (BERMEJO et al., 2002). A precipitação é uma das operações mais adotadas, tanto em escala laboratorial quanto industrial para purificação de proteínas. Esta técnica é considerada um processo de purificação inicial podendo envolver precipitação por sal ou por solvente, acarretando alterações na solubilidade da proteína (NELSON; COX, 2006). Por ser acessível economicamente, o sulfato de amônio é um dos sais mais utilizados para precipitar proteínas, podendo ser eliminado posteriormente da suspensão para que se possa continuar com as etapas de purificação (KILIKIAN; PESSOA JR, 2005).

Na literatura são encontrados diversos trabalhos que avaliam a purificação de C-ficocianina, porém somente alguns estudam a técnica de precipitação por sal. Figueira (2014) utilizou diferentes sequências de purificação para obter C-ficocianina de grau analítico. Para isto utilizou precipitação com sulfato de amônio, diafiltração/ultrafiltração, e cromatografia de troca iônica em leito fixo e expandido. Na etapa onde utilizou precipitação com sulfato de amônio obteve extrato com pureza de 1,54, fator de purificação de 2,7 vezes e recuperação de 81,2%. Moraes (2006) estudou a purificação de C-ficocianina de *Spirulina platensis* por precipitação fracionada e por cromatografia de troca iônica em leito expandido e obteve extrato com pureza de grau alimentar e analítico, respectivamente. Na etapa de precipitação fracionada obteve as melhores respostas na faixa de 0-20 / 20-50% de saturação de sulfato de amônio, pureza de 0,72 e 81,7% de recuperação. A fim de estudar a influência de diferentes parâmetros sobre a purificação de C-ficocianina Silva (2005) otimizou a etapa de precipitação na purificação do bioproduto através de um planejamento experimental e obteve extrato com 0,89 de pureza, fator de purificação de 1,7 vezes e recuperação de 91,2%.

Já para anidrase carbônica foi encontrado apenas um estudo que avaliou a purificação deste bioproduto extraído a partir de microalgas. Karlsson et al. (1995) purificaram anidrase carbônica de *Chlamydomonas reinhardtii* utilizando precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e cromatografia de interação hidrofóbica a fim de relacionar a anidrase carbônica presente na alga com as da espécie humana. Até o presente momento não se tem conhecimento de estudos que purifiquem e/ou separem simultaneamente os dois bioprodutos.

Mediante o exposto, esta etapa do estudo teve por objetivo purificar simultaneamente C-ficocianina e anidrase carbônica extraídas a partir do extrato de biomassa úmida de *Spirulina platensis* LEB-52 utilizando precipitação com sulfato de amônio, avaliando diferentes saturações de sulfato de amônio e pH durante o processo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO

A cepa de 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 e anidrase carbônica. Para o preparo do inóculo, cultivo e manutenção da

microalga foi utilizado o meio Zarrouk (ZARROUK, 1966).

Os cultivos foram realizados em frasco 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. A cianobactéria foi incubada a 25°C por 32 d (SALA et al., 2018) com aeração realizada por injeção constante de ar estéril (0,5 vvm). A iluminância foi de 40,5 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, com fotoperíodo fixado em 12 h claro/escuro. Ao término do cultivo, a biomassa foi recuperada por filtração em papel filtro qualitativo de fibra vegetal e espessura 0,003 mm (Fitec).

2.2 EXTRAÇÃO SIMULTÂNEA DE C-FICOCIANINA E ANIDRASE CARBÔNICA

O rompimento celular foi realizado através do tratamento ultrassônico conforme proposto por Ores, Amarante e Kalil (2016). A biomassa, em concentração de 5 g/L, foi ressuspendida em tampão Tris-SO₄ 50 mM (pH de acordo com o experimento a ser realizado) e submetida a ruptura celular e extração utilizando homogeneizador ultrassônico (Sonic Ruptor 250, Omni International Inc., EUA) com frequência de 20 kHz (ponteira micro com potência de 60 W). Durante o tratamento ultrassônico, a amostra foi mantida em banho de gelo, e o tempo de ruptura celular foi de 12 min (SALA, 2017). Após o rompimento celular, as suspensões foram centrifugadas ($4757 \times g$, 4 °C e 20 min) e o sobrenadante utilizado para os ensaios de purificação, sendo denominado extrato bruto.

2.3 PURIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE C-FICOCIANINA E ANIDRASE CARBÔNICA POR PRECIPITAÇÃO COM SULFATO DE AMÔNIO

2.3.1 Delineamento fatorial 2² com pontos centrais

A influência das variáveis pH e saturação de sulfato de amônio (Tabela 1) foi avaliada na purificação simultânea de C-ficocianina e anidrase carbônica por precipitação utilizando um delineamento fatorial 2² com pontos centrais. Os níveis das variáveis independentes foram escolhidos com base em estudos anteriores realizados por Moraes (2006), Ores (2012) e Silva et al. (2009). A matriz do delineamento fatorial 2² com pontos centrais está apresentada na Tabela 2, totalizando 7 ensaios, incluindo 3 pontos centrais.

Tabela 1 - Variáveis independentes e seus níveis reais e codificados estudados no delineamento fatorial 2^2 com pontos centrais.

Variáveis independentes	Níveis		
	-1	0	+1
X_1 : pH	6	7	8
X_2 : saturação de sulfato de amônio (%)	40	50	60

Em frasco Erlenmeyer de 50 mL contendo o extrato bruto foi adicionado, de forma gradativa, sulfato de amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ sólido na concentração de saturação desejada (40, 50 e 60%), de acordo com Scopes (1994). A adição foi feita sob refrigeração a 4 °C e constante agitação nos 30 min iniciais. Após repouso de 2 h (FIGUEIRA, 2014) a 4 °C, as amostras foram centrifugadas ($4757 \times g$, 4 °C e 20 min), o sobrenadante foi separado e o precipitado ressuspensionado em tampão Tris- SO_4 (50 mM) com diferentes valores de pH (6, 7 e 8) em uma relação volume de ressuspensão/volume inicial de 0,52 (SILVA, 2005). Nas frações de entrada, precipitado e sobrenadante foram determinadas a atividade enzimática de anidrase carbônica, concentração de C-ficocianina e de proteínas.

Tabela 2 - Matriz do delineamento fatorial 2^2 com pontos centrais (valores codificados e reais).

Ensaio	X_1	X_2
1	-1 (6)	-1 (40)
2	+1 (8)	-1 (40)
3	-1 (6)	+1 (60)
4	+1 (8)	+1 (60)
5	0 (7)	0 (50)
6	0 (7)	0 (50)
7	0 (7)	0 (50)

X_1 : pH; X_2 : saturação de sulfato de amônio (%).

2.3.2 Validação do modelo

O modelo preditivo obtido no delineamento fatorial 2^2 com pontos centrais foi validado nas condições onde apresentou o maior fator de purificação para C-ficocianina e anidrase carbônica. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.4 INFLUÊNCIA DO SAL SOBRE A ATIVIDADE DA ANIDRASE CARBÔNICA

A influência do sal sobre a atividade enzimática da anidrase carbônica foi realizada em diferentes faixas de saturação de sulfato de amônio (0, 5, 7,5, 10, 12,5, 15 e 20%). Em frasco Erlenmeyer de 50 mL contendo extrato bruto foi adicionado, de forma gradativa, sulfato de amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ sólido na concentração de saturação desejada, de acordo com Scopes (1994). A adição foi feita sob refrigeração a 4 °C e constante agitação nos 30 min iniciais. Após repouso de 2 h (FIGUEIRA, 2014) a 4 °C, as amostras foram centrifugadas ($4757 \times g$, 4 °C e 20 min) e a atividade da anidrase carbônica foi determinada no sobrenadante. A relação entre o aumento da concentração de sal e o valor de atividade foi avaliada. Para verificar a reprodutibilidade dos resultados, cada um dos ensaios descritos foi realizado em triplicata.

2.5 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

2.5.1 Concentração e pureza de C-ficocianina

A concentração de C-ficocianina (C-FC, Equação 1) foi calculada como descrito por Bennett e Bogorad (1973) com modificações no comprimento de onda (de 615 nm para 620 nm). A pureza (PE) foi calculada conforme Equação 2.

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

$$\text{PE} = \frac{A_{620}}{A_{280}} \quad (2)$$

Onde a absorvância a 620 nm (A_{620}) indica a concentração de C-ficocianina, a absorvância a 652 nm (A_{652}) indica a concentração de aloficocianina e a absorvância a 280 nm (A_{280}) indica a concentração de proteína total na solução.

2.5.2 Atividade enzimática de anidrase carbônica

A atividade enzimática da anidrase carbônica foi monitorada através da atividade de esterase segundo metodologia de Pocker e Stone (1967), onde a mistura reacional consistiu

em 1,8 mL de tampão Tris-SO₄ (50 mM e pH 7,4), 0,2 mL de solução enzimática e 1 mL de *p*-nitrofenil acetato (3 mmol/L). Após a adição do substrato, foi registrado o aumento da absorvância a 400 nm a cada 30 s por 4 min à temperatura ambiente no espectrofotômetro. 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.

2.5.3 Concentração de biomassa e determinação de proteínas

A concentração de biomassa foi determinada por leitura de densidade óptica a 670 nm (COSTA et al., 2002) e conversão para biomassa seca através de curva padrão previamente preparada. Para construção da curva padrão, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas com água destilada e ressuspensas com água 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 de proteínas foi realizada segundo metodologia descrita por Lowry et al. (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão, e também foi acompanhada por leitura em espectrofotômetro-UV a 280 nm.

2.6 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO PROCESSO

A eficiência do processo foi avaliada em termos de fator de purificação (FP, Equação 3) e recuperação (% REC, Equação 4) para C-ficocianina e anidrase carbônica.

$$FP = \frac{C_{e.s.}}{C_{e.e.}} \quad (3)$$

$$\% \text{ REC} = \frac{C_s \times V_s}{C_e \times V_e} \times 100 \quad (4)$$

Onde $C_{e.s.}$ é a concentração específica de C-FC (mg/mg_{proteína}) ou a atividade específica de AC (U/mg_{proteína}) na fração de saída, $C_{e.e.}$ é a concentração específica de C-FC (mg/mg_{proteína}) ou a atividade específica de AC (U/mg_{proteína}) na fração de entrada, C_s é a concentração de C-FC (mg/mL) ou atividade de AC (U/mL) na saída, C_e é a concentração de C-FC (mg/mL) ou atividade de AC (U/mL) na entrada, V_s é o volume da fração de saída (mL) e V_e é o volume da fração de entrada (mL).

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os efeitos do delineamento fatorial 2^2 com pontos centrais foram avaliados a um nível de confiança de 95%. 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.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DELINEAMENTO FATORIAL 2^2 COM PONTOS CENTRAIS

Uma vez que cada enzima possui um valor ótimo de pH e diferentes faixas podem causar alterações nas mesmas, optou-se por ajustar o valor de pH (6, 7 e 8) do tampão utilizado antes do rompimento celular. Portanto, a Tabela 3 apresenta a atividade de anidrase carbônica, concentração e pureza de C-ficocianina, e concentração de proteínas do extrato bruto nos diferentes valores de pH de estudo na precipitação com sulfato de amônio.

Tabela 3 - Atividade de anidrase carbônica (AC), concentração e pureza de C-ficocianina (C-FC), e concentração de proteínas do extrato bruto em diferentes valores de pH.

pH	Concentração de proteína (mg/mL)	Atividade de AC (U/mL)	Concentração de C-FC (mg/mL)	Pureza de C-FC
pH 6	2,5	0,02	1,1	0,71
pH 7	2,6	0,01	1,0	0,69
pH 8	2,0	0,02	1,1	0,67

Silva et al. (2009), através de um planejamento experimental, estudaram diferentes faixas de saturação de sulfato de amônio (43,2, 50, 60, 70 e 76,8 %) para purificação de C-ficocianina extraída a partir da biomassa seca de *Spirulina platensis* LEB-52 e concluíram que a mesma começa a precipitar a partir de 50 % de saturação de sulfato de amônio. Já Ores et al. (2012) purificaram anidrase carbônica a partir de eritrócito bovino, também utilizando diferentes faixas de saturação de sulfato de amônio (de 10 a 80%), e verificaram que a enzima precipita entre valores de 70 a 80%. Sendo assim, foi possível estabelecer diferentes faixas de saturação de sulfato de amônio a fim de obter cada bioproduto em uma fase diferente. As Tabelas 4 e 5 mostram a matriz do delineamento fatorial 2^2 com pontos centrais, com as

variáveis independentes (valores reais e codificados), e as respostas estudadas para anidrase carbônica e C-ficocianina, respectivamente. Os valores apresentados para anidrase carbônica foram os obtidos na fração sobrenadante (Tabela 4) e os resultados apresentados para C-ficocianina foram os obtidos na fração precipitada (Tabela 5) após o ensaio de precipitação com sulfato de amônio.

Tabela 4 - Matriz do delineamento fatorial 2^2 com pontos centrais com valores reais e codificados e as respostas estudadas para anidrase carbônica (fração sobrenadante).

Ensaio	X_1	X_2	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4
1	-1 (6)	-1 (40)	0,8	0,01	1,9	45
2	+1 (8)	-1 (40)	0,8	0,52	71,3	2058
3	-1 (6)	+1 (60)	0,3	0,08	39,5	342
4	+1 (8)	+1 (60)	0,2	0,91	572,2	3233
5	0 (7)	0 (50)	0,2	0,04	117,5	1126
6	0 (7)	0 (50)	0,3	0,03	116,3	1213
7	0 (7)	0 (50)	0,3	0,03	91,5	1173

X_1 : pH; X_2 : Saturação de sulfato de amônio (%); Y_1 : Concentração de proteína (mg/mL); Y_2 : Atividade de anidrase carbônica (U/mL), Y_3 : Fator de purificação; Y_4 : Recuperação (%).

Tabela 5 - Matriz do delineamento fatorial 2^2 com pontos centrais com valores reais e codificados e as respostas estudadas para C-ficocianina (fração precipitada).

Ensaio	X_1	X_2	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5
1	-1 (6)	-1 (40)	2,0	1,4	1,5	60	0,72
2	+1 (8)	-1 (40)	1,8	1,5	2,1	72	0,61
3	-1 (6)	+1 (60)	2,2	2,1	2,1	93	0,73
4	+1 (8)	+1 (60)	1,2	2,0	2,6	90	0,71
5	0 (7)	0 (50)	3,6	2,3	1,6	111	0,73
6	0 (7)	0 (50)	3,4	2,3	1,7	108	0,73
7	0 (7)	0 (50)	3,3	2,2	1,7	106	0,72

X_1 : pH; X_2 : Saturação de sulfato de amônio (%); Y_1 : Concentração de proteína (mg/mL); Y_2 : Concentração de C-ficocianina (mg/mL), Y_3 : Fator de purificação; Y_4 : Recuperação (%); Y_5 : Pureza.

Através do delineamento fatorial 2^2 com pontos centrais, pode ser observado que o fator de purificação para anidrase carbônica variou de 1,9 a 572,2 vezes, já para C-ficocianina este parâmetro variou de 1,5 a 2,6 vezes. A faixa de recuperação foi de 45 a 3233% para anidrase carbônica e de 60 a 111% para C-ficocianina. Verificou-se também, que conforme Rito-

Palomares; Nunez e Amador (2001) os extratos obtidos de C-ficocianina podem ser considerados com pureza de grau alimentar (acima de 0,70), com exceção do ensaio 2 (pH 8 e 40% de saturação de sulfato de amônio). A atividade da enzima anidrase carbônica variou de 0,01 a 0,91 U/mL, bem como a concentração de C-ficocianina variou de 1,4 mg/mL a 2,3 mg/mL. Através da Figura 1 pode-se observar que, independente do pH, a saturação de 60% foi mais eficiente para separar a C-ficocianina, já que visivelmente a fração sobrenadante não ficou com coloração azul.

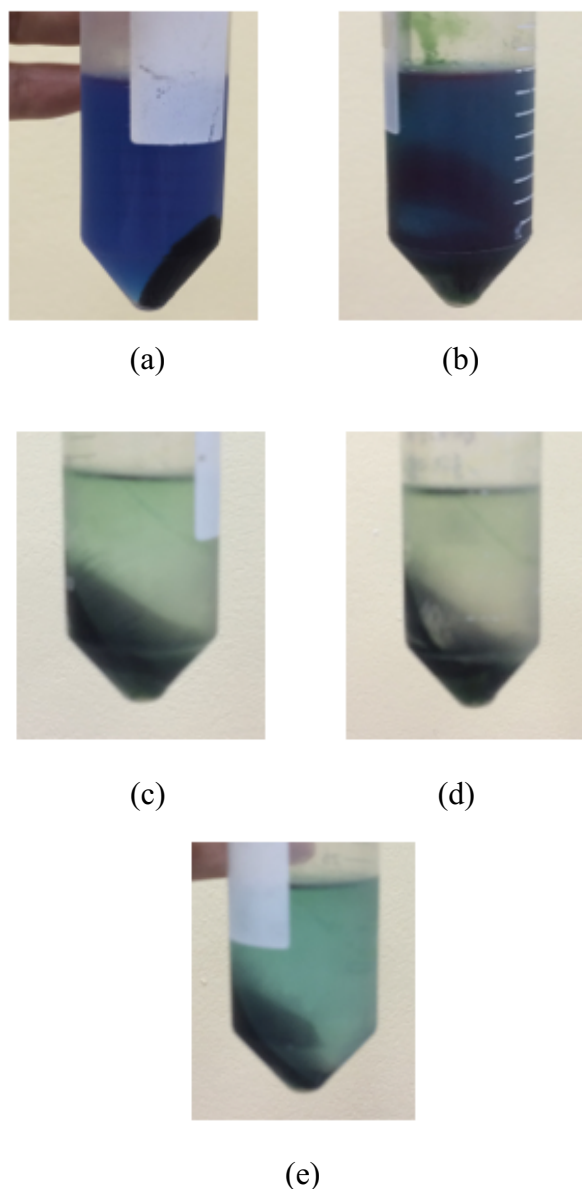
A utilização de sulfato de amônio como agente precipitante é usual antes de se aplicar um método mais sofisticado para a purificação de uma proteína. Por outro lado, o passo de precipitação muitas vezes provoca alterações no rendimento e na atividade da enzima (CHEN et al., 2016; FIGUEIRA, 2014; KANNAUJIYA; SINHA, 2016; MORAES et al., 2011; SILVA et al., 2009). De acordo com a Tabela 4, a enzima anidrase carbônica apresentou (Ensaio 4) atividade de 0,91 U/mL, fator de purificação de 572,2 vezes e recuperação de 3233%. É possível observar que com exceção do Ensaio 1, a recuperação da anidrase carbônica (Tabela 4) foi superior a 100%. Valores de recuperação acima de 100% foram obtidos na purificação de β -galactosidase (BRAGA; LEMES; KALIL, 2014), uma vez que durante o processo de purificação inibidores enzimáticos podem ser retirados, ou mesmo devido à presença de sal, o que pode ajudar a manter a proteína na forma ativa (PAN; YAO; LI, 2001), tornando possível que o sal sulfato de amônio tenha interferido na reação de atividade enzimática da anidrase carbônica expressa em termos de esterase. Desta forma, a fim de avaliar a possível interferência do sal adicionado na atividade da anidrase carbônica, foi realizado um ensaio aplicando diferentes faixas de saturação (0, 5, 7,5, 10, 12,5, 15 e 20%) no extrato bruto (apresentado no item 3.2).

Alguns estudos que avaliam o desenvolvimento de processos para a obtenção de C-ficocianina purificada utilizando precipitação com sulfato de amônio (FIGUEIRA, 2014; MINKOVA et al., 2003; MORAES et al., 2011; MORAES; KALIL, 2009; KUMAR et al., 2014; SILVA et al., 2009; SONG; ZHAO; WANG, 2013; YAN et al., 2011) são encontrados, no entanto a purificação simultânea da anidrase carbônica e da C-ficocianina ainda não foi discutida. A obtenção de processos de purificação que consigam, através de um mínimo número de etapas, fornecer dois biocompostos diferentes, é de alto valor industrial e comercial.

Silva et al. (2009) purificaram C-ficocianina de *Spirulina platensis* por precipitação direta com sulfato de amônio através de um planejamento experimental estudaram as variáveis concentração de sulfato de amônio, relação entre o volume de ressuspensão e o volume inicial, e valores de pH. O bioproduto foi extraído a partir da biomassa seca utilizando água destilada

e a etapa de precipitação teve duração de 14 h, diferente das condições utilizadas neste estudo. A maior pureza de C-ficocianina (0,72) foi obtida em 50% de saturação de sulfato de amônio, com concentração de 1,69 mg/mL e 90,1% de recuperação.

Figura 1 – Ensaio de precipitação com diferentes valores de pH (6, 7 e 8) e saturação de sulfato de amônio (40, 50 e 60%). (a) Ensaio 1: pH 6 e 40%, (b) Ensaio 2: pH 8 e 40%, (c) Ensaio 3: pH 6 e 60%, (d) Ensaio 4: pH 8 e 60%, (e) Ensaio 5: pH 7 e 50%.



C-ficocianina extraída a partir da biomassa seca de *Spirulina platensis* (pureza inicial de 0,75) foi purificada por precipitação com sulfato de amônio (saturação de 65%), apresentando pureza final de 1,5 e 80% de recuperação (KUMAR et al., 2014). Cabe ressaltar que no estudo supracitado a extração de C-ficocianina foi realizada por repetidas etapas de

congelamento e descongelamento até obtenção da coloração azul, bem como a etapa de precipitação com sulfato de amônio foi realizada por 14 h. Minkova et al. (2003) utilizaram sulfato de amônio com 70% de saturação para purificar C-ficocianina de biomassa seca de *Spirulina fusiformis* e obtiveram recuperação de 91%. A extração da C-ficocianina foi realizada por congelamento a -15 °C e posterior aquecimento a 30 °C por 1 h e a etapa de precipitação foi realizada por 14 h. O grande diferencial do presente estudo com os estudos supracitados é a utilização da biomassa úmida para a purificação, bem como o processo de extração o qual utilizou o ultrassom.

As respostas fator de purificação, recuperação e pureza foram avaliadas para ambos bioprodutos, com excessão da variável pureza para anidrase carbônica. Apenas a resposta fator de purificação apresentou modelo para C-ficocianina e anidrase carbônica. Os fatores de purificação para anidrase carbônica e C-ficocianina apresentados nas Tabelas 4 e 5 foram avaliados estatisticamente para estimar os efeitos de cada variável independente sobre as respostas ao nível de 95% de confiança (Tabelas 6 e 7). Para o fator de purificação de C-ficocianina apenas a interação entre o pH e a saturação de sulfato de amônio não apresentou efeito significativo, já para o fator de purificação da anidrase carbônica todas as variáveis, inclusive a interação apresentaram efeito significativo. Os termos que não foram significativos ($p > 0,05$) foram adicionados à falta de ajuste para o cálculo da análise de variância (ANOVA), como mostram as Tabelas 8 e 9.

Conforme observado na Tabela 6 verifica-se que ao passar do nível -1 para o nível +1 das variáveis pH e saturação de sulfato de amônio ocorreu um aumento de 301,05 e 269,27 vezes, respectivamente, no fator de purificação para anidrase carbônica. Com relação a C-ficocianina foi possível verificar um incremento de 0,56 e 0,53 vezes no fator de purificação ao passar do nível -1 para o +1 as variáveis pH e saturação de sulfato de amônio, respectivamente.

A fim de se obter dois bioprodutos em um único processo, achar a condição que melhor se adeque aos dois se torna um pouco difícil, uma vez que cada um se comporta de uma maneira. As condições do ensaio 4 foram escolhidas como sendo as que mais se adequaram ao processo devido ao fator de purificação ter sido mais elevado em ambos os casos, 2,6 para C-ficocianina e 572,2 para anidrase carbônica, valores esses associados a uma elevada recuperação, 90% e 3233% para C-ficocianina e anidrase carbônica, respectivamente, além de se ter obtido C-ficocianina com pureza de grau alimentar, 0,71.

Tabela 6 - Efeitos das variáveis independentes no fator de purificação de anidrase carbônica.

Variáveis independentes	Efeitos	Erro padrão	t(3)	p-valor
Média	144,32*	18,51	7,80	0,0044
pH	301,05*	48,98	6,15	0,0087
Saturação de sulfato de amônio	269,27*	48,98	5,50	0,0118
Interação pH x saturação de sulfato de amônio	231,63*	48,98	4,73	0,0179

*Efeito significativo ($p < 0,05$)**Tabela 7** - Efeitos das variáveis independentes no fator de purificação de C-ficocianina.

Variáveis independentes	Efeitos	Erro padrão	t(2)	p-valor
Média	1,91*	0,027	71,28	0,0002
pH	0,56*	0,071	7,89	0,0157
Saturação de sulfato de amônio	0,53*	0,071	7,47	0,0174
Interação pH x saturação de sulfato de amônio	-0,11	0,071	-1,55	0,2611

*Efeito significativo ($p < 0,05$)**Tabela 8** - Valores da ANOVA para o fator de purificação de anidrase carbônica.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}
Regressão	216797,9	3	72265,9	30,12
Resíduo	7197,4	3	2399,1	
Total	223995,3	6		

 R^2 : 0,97; $F_{0,95; 3; 6} = 9,28$ **Tabla 9** - Valores da ANOVA para o fator de purificação de C-ficocianina.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}
Regressão	0,60	2	0,218	43,58
Falta de ajuste	0,28	2	0,005	
Erro puro	0,01	2		
Total	0,88	6		

 R^2 : 0,67; $F_{0,95; 4; 6} = 19,25$

Os coeficientes de correlação (R) de 0,98 e 0,82 para anidrase carbônica e C-ficocianina, respectivamente, foram calculados na ANOVA (Tabelas 8 e 9) para a resposta fator de purificação, com isso pode-se concluir que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais. A razão $F_{\text{calculado}}$ sobre F_{tabelado} foi de 3,25 para anidrase carbônica e 2,26 para C-ficocianina, tornando o modelo preditivo e significativo para a resposta.

Dessa forma foi possível gerar as equações dos modelos com as variáveis codificadas em função das variáveis pH e saturação de sulfato de amônio nas faixas estudadas, mostradas nas Equações 6 e 7.

$$FP_{AC} = 144,32 + 150,52 X_1 + 134,64 X_2 + 115,82 X_1 \times X_2 \quad (6)$$

$$FP_{C-FC} = 1,91 + 0,28 X_1 + 0,26 X_2 \quad (7)$$

Onde FP_{AC} é o fator de purificação de anidrase carbônica, FP_{C-FC} é o fator de purificação para C-ficocianina, X_1 é o valor de pH e X_2 é a saturação de sulfato de amônio. Usando as equações acima foi possível construir as curvas de contorno para o fator de purificação da anidrase carbônica e C-ficocianina (Figuras 2 e 3).

Através da análise das curvas de contorno foi possível observar que o maior fator de purificação tanto para anidrase carbônica quanto para C-ficocianina foi obtido quando se utilizou pH 8 e saturação de sulfato de amônio de 60%. Este resultado difere dos obtidos por Silva et al. (2009), que através de um delineamento experimental estudaram a influência do pH, saturação de sulfato de amônio e volumes de ressuspensão na purificação de C-ficocianina de *Spirulina platensis* utilizando sulfato de amônio. Ao estudar valores de pH variando de 5,6 a 7 e saturação de sulfato de amônio variando de 43,2 a 76,8 foi concluído que para se obter um extrato com maior pureza e sem grandes perdas na recuperação as melhores condições seriam de 50% de saturação de sulfato de amônio em pH 7. Entretanto é importante lembrar que os autores utilizaram biomassa seca e a extração do bioproduto foi feita com água destilada.

Estes resultados mostram o quanto é importante o estudo de purificação de C-ficocianina por diferentes métodos, uma vez que alterado alguma etapa do processo as condições ótimas para a purificação de C-ficocianina podem ser outras.

As Tabelas 10 e 11 apresentam os desvios relativos, bem como os valores preditos pelo modelo e os valores experimentais relativos à variável resposta fator de purificação para anidrase carbônica e C-ficocianina.

Figura 2 – Curvas de contorno para o fator de purificação da anidrase carbônica em função da saturação de sulfato de amônio e do pH.

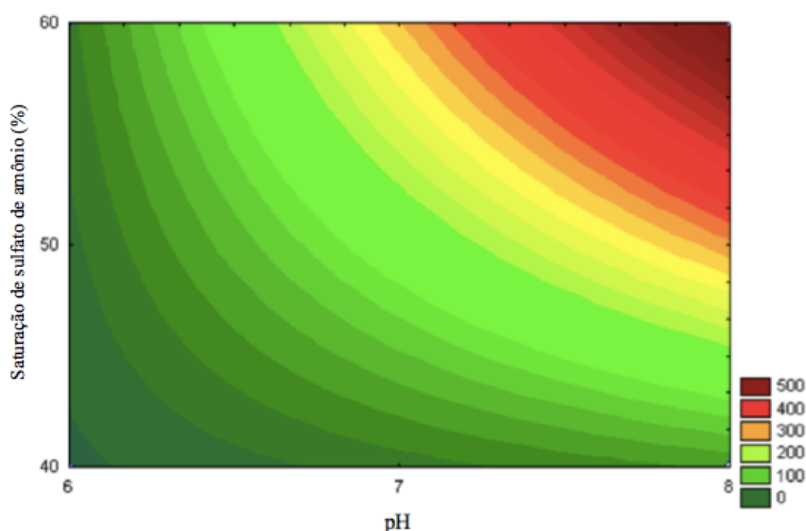
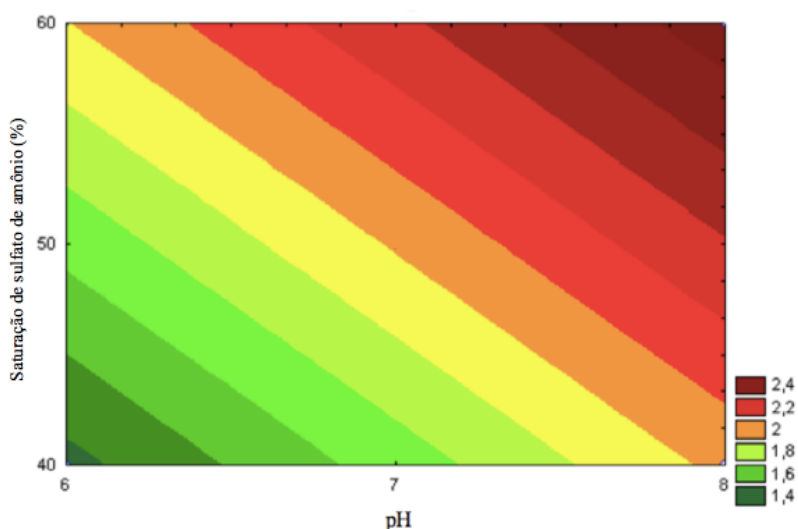


Figura 3 – Curvas de contorno para o fator de purificação da C-ficocianina em função da saturação de sulfato de amônio e do pH.



Os resultados do desvio relativo entre os resultados experimentais e preditos pelo modelo, foram inferiores a 20% (RODRIGUES E IEMMA, 2009) para C-ficocianina, nas regiões de máximos valores, dessa forma as Equações 6 e 7 preveem bem o comportamento do fator de purificação frente as variáveis estudadas nesta região. Já para anidrase carbônica o valor de desvio relativo na maioria dos casos, foi superior a 20%, com exceção do ensaio 4, o que pode ser explicado devido aos valores de fator de purificação terem sido muito elevados para a enzima, uma vez que a influência do sal não se dá sempre da mesma maneira.

Tabela 10 - Valores experimentais, preditos pelo modelo e desvio relativo para o fator de purificação da anidrase carbônica.

Ensaio	pH	Saturação de sulfato de amônio (%)	Valores preditos pelo modelo	Valores experimentais	Desvio relativo (%)
1	-1 (6)	-1 (40)	-27,0	1,9	1522,1
2	+1 (8)	-1 (40)	12,4	71,3	82,6
3	-1 (6)	+1 (60)	14,6	39,5	63,0
4	+1 (8)	+1 (60)	547,3	572,2	4,4
5	0 (7)	0 (50)	144,3	117,5	-22,9
6	0 (7)	0 (50)	144,3	116,3	-24,1
7	0 (7)	0 (50)	144,3	91,5	57,8

Tabela 11 - Valores experimentais, preditos pelo modelo e desvio relativo para o fator de purificação da C-ficocianina.

Ensaio	pH	Saturação de sulfato de amônio (%)	Valores preditos pelo modelo	Valores experimentais	Desvio relativo (%)
1	-1 (6)	-1 (40)	1,4	1,5	7,4
2	+1 (8)	-1 (40)	1,9	2,1	10,2
3	-1 (6)	+1 (60)	1,9	2,1	10,8
4	+1 (8)	+1 (60)	2,4	2,6	4,7
5	0 (7)	0 (50)	1,9	1,6	-18,6
6	0 (7)	0 (50)	1,9	1,7	-12,3
7	0 (7)	0 (50)	1,9	1,7	-9,1

3.1.1 Validação do modelo matemático

Para a validação do modelo selecionou-se os níveis das variáveis independentes onde foi obtido o maior fator de purificação (pH 8 e 60% de saturação de sulfato de amônio, ensaio 4) do delineamento fatorial 2^2 com pontos centrais. A Tabela 12 mostra os resultados da validação para a resposta fator de purificação para anidrase carbônica e C-ficocianina, respectivamente.

Na fração sobrenadante foi obtido anidrase carbônica com atividade de 0,91 U/mL, fator de purificação de 561,4 e recuperação de 3390%, já na fração precipitada foi obtido C-ficocianina com concentração de 2,1 mg/mL, fator de purificação de 2,6 e recuperação de 92%, bem como a pureza do extrato foi de 0,71.

Tabela 12 – Fator de purificação experimental e predito com o respectivo desvio relativo na validação do delineamento fatorial 2^2 com pontos centrais.

	Validação do método (AC)	Validação do método (C-FC)
Resposta predita	547,3	2,4
Resposta experimental	$561,4 \pm 3,1$	$2,6 \pm 0,3$
Desvio relativo (%)	2,51	3,16

Pode-se observar na Tabela 12 que os valores de desvio relativo foram semelhantes quando comparados aos desvios relativos obtidos no delineamento fatorial 2^2 com pontos centrais (Tabelas 10 e 11), reproduzindo assim, os valores obtidos anteriormente. Quando se compara os resultados obtidos no ensaio 4 do delineamento fatorial 2^2 com pontos centrais com a validação do método podemos observar valores de recuperação, fator de purificação e pureza bem semelhantes tanto para C-ficocianina quanto para anidrase carbônica.

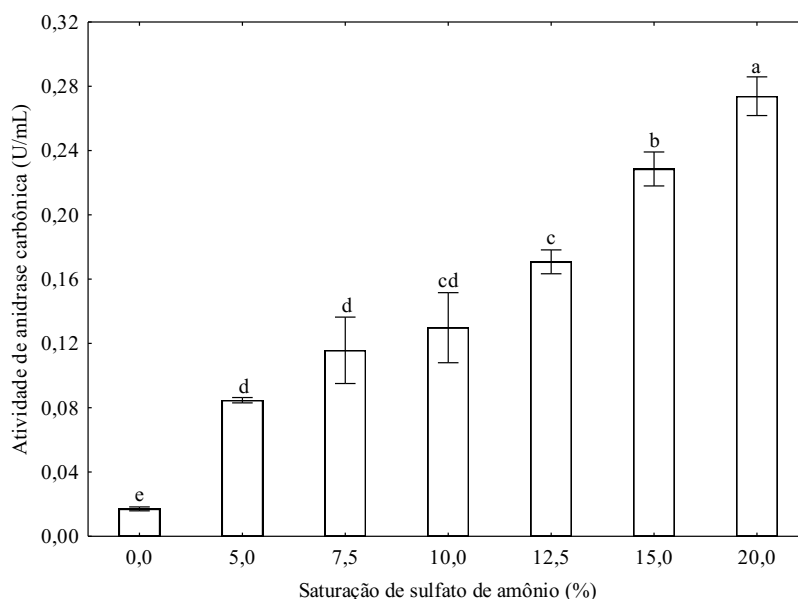
3.2 INFLUÊNCIA DO SAL NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA ANIDRASE CARBÔNICA

Diversos estudos utilizam a precipitação com sulfato de amônio para purificação de enzimas (FIGUEIRA, 2014; MOHAMED et al., 2016; MORAES et al., 2011; YAN et al., 2011; PURWANTO, 2016) antes de se aplicar um método mais sofisticado para a purificação de uma proteína. Por outro lado, o passo de precipitação muitas vezes provoca alterações no rendimento e na atividade da proteína. De acordo com a Tabela 4, pode-se notar valores muito elevados de fator de purificação e recuperação para enzima anidrase carbônica. Partindo do pressuposto de que o sal utilizado poderia aumentar a atividade enzimática da anidrase carbônica, a influência do sulfato de amônio foi estudada, e os resultados obtidos estão mostrados na Figura 4.

Observa-se que a o sal adicionado durante o processo de precipitação teve uma influência significativa no aumento da atividade da anidrase carbônica (U/mL): quanto maior a concentração de sulfato de amônio adicionado durante o processo, maior foi a atividade da enzima. Isto pode explicar os valores elevados de recuperação e fator de purificação, uma vez que estes dois parâmetros são dependentes da atividade enzimática. Ilies et al. (1997) descobriram uma nova classe de ativadores de anidrase carbônica ao estudar a influência de uma série de sais de piridínio quanto sua interação com isoenzimas de anidrase carbônica. Este estudo corrobora com os resultados obtidos durante este trabalho uma vez que indica a

possibilidade do sal sulfato de amônio ter se comportado como um ativador da atividade enzimática de anidrase carbônica expressa em termos de esterase.

Figura 4 – Influência da saturação do sulfato de amônio na atividade enzimática da anidrase carbônica. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre as médias (Teste *Tukey*, $p > 0,05$).



4 CONCLUSÃO

Foi possível purificar simultaneamente os bioprodutos C-ficocianina e anidrase carbônica a partir do extrato de biomassa úmida de *Spirulina platensis* LEB-52 utilizando precipitação com sulfato de amônio. O processo de purificação permitiu a separação dos dois bioprodutos, obtendo-se C-ficocianina na fração precipitada e anidrase carbônica na fração sobrenadante. Segundo as equações do modelo obtidas a partir do delineamento fatorial 2^2 com pontos centrais para se alcançar um maior fator de purificação para anidrase carbônica e C-ficocianina deve-se utilizar pH 8 e saturação de 60%, obtendo-se dessa maneira anidrase carbônica e C-ficocianina com fator de purificação de 572,2 e 2,6, respectivamente, valores esses associados a uma elevada recuperação, 90% e 3233% para C-ficocianina e anidrase carbônica, respectivamente, além de se ter obtido C-ficocianina com pureza de grau alimentar, 0,71. A influência do sulfato de amônio na atividade enzimática também foi estudada, concluindo-se que a atividade da anidrase carbônica (U/mL) aumenta conforme o incremento na concentração de sal.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **The Journal of Cell Biology**, v. 58, p. 419-435, 1973.
- BERMEJO, R.; ALVÁREZ-PEZ, J. M.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; MOLINA GRIMA, E. Recovery of pure B – phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. **Journal of Biotechnology**, v. 93, p. 73-85, 2002.
- BRAGA, A. R. C.; LEMES, A. C.; KALIL, S. J. Single chromatographic step for β -galactosidase purification: influence of salt and elution parameters. **Separation Science and Technology**, v. 49, p. 1817-1824, 2014.
- 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 and Fuels**, v. 15, p. 309-316, 2001.
- CHEAH, W.Y.; SHOW, P.L.; CHANG, J.S.; LING, T.C.; JUAN, J.C. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 190–201, 2015.
- CHEN, C.; KAO, P.; TAN, C. H.; SHOW, P. L.; CHEAH, W. Y.; LEE, W. L.; LING, T. C.; CHANG, J. Using an innovative pH-stat CO₂ feeding strategy to enhance cell growth and C-phycoerythrin production from *Spirulina platensis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, p. 78-85, 2016.
- CHRISTENSON, L., SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. **Biotechnology**, v. 29, p. 686–702, 2011.
- 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, p. 603-607, 2002.
- DAVY, R. Development of catalysts for fast, energy efficient post combustion capture of CO₂ into water; one alternative to monoethanolamine (MEA) solvents. **Energy Procedia**, v. 1, p. 885-892, 2009.
- DENG, R.; CHOW, T. Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae *Spirulina*. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 28, p. 33-45, 2010.
- 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.
- FIGUEROA, J. D.; FOUT, T.; PLASYNSKI, S.; MCILVRIED, H.; SRIVASTAVA, R. D. Advances in CO₂ capture technology – The U. S. Department of Energy's Carbon Sequestration Program. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 2, p. 9-20, 2008.

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, p. 345-351, 1995.

ILIES, M. A.; BANCIU, M. D.; ILIES, M.; CHIRALEU, F.; BRIGANTI, F.; SCOZZAFAVA, A.; SUPURAN, C. T. Carbonic anhydrase activators. Part 17. Synthesis and activation study of a series of 1-(1,2,4-triazole-(1H)-3-yl)-2,4,6-trisubstituted-pyridinium salts against isozymes I, II and IV. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 32, p. 911-918, 1997.

KANNAUJIYA, V. K.; SINHA, R. P. An efficient method for the separation and purification of phycobiliproteins from a rice-field cyanobacterium *Nostoc* sp. strain HKAR-11. **Chromatographia**, v. 79, p. 335-343, 2016.

KARLSSON, J.; HILTONEN, T.; DAVID HUSIC', H.; RAMAZANOV, Z.; SAMUELSSON, C. Intracellular Carbonic Anhydrase of *Chlamydomonas reinhardtii*'. **Plant Physiology**, v. 109, p. 533-539, 1995.

KILLIKIAN, B. V.; PESSOA JR, A. **Purificação de produtos biotecnológicos**. São Paulo: Ed. Manole, 2005.

KUMAR, D.; DHAR, D. W.; PABBI, S.; KUMAR, N.; WALIA, S. Extration and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (CCC540). **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 19, p. 184-188, 2014.

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-phycocyanin on the lung cancer A549 cells in vitro and in vivo. **European Journal of Pharmacology**, v. 749, p. 107-114, 2015.

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, p. 265-275, 1951.

MINKOVA, K. M.; TCHERNOV, A. A.; TCHORBADJIEVA, M. I.; FOURNADJIEVA, S. T.; ANTOVA, R. E.; BUSHEVA, M. C. Purification of C-phycocyanin from *Spirulina* (*Arthrospira*) *fusiformis*. **Journal of Biotechnology**, v. 116, p. 55-59, 2003.

MOHAMED, M. A.; MAHDY, E. M. E.; GHAZY, A. M.; EL-MEZAYEN, H. A.; GHANEM, M. M. E. The activity of detoxifying enzymes in the infective juveniles of *Heterorhabditis bacteriophora* strains: Purification and characterization of two acetylcholinesterases. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 180, p. 11-22, 2016.

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

MORAES, C. C.; ORES, J. C.; COSTA, J. A. V.; KALIL, S. J. Recovery of C-phyococyanin in the presence of cells using expanded bed IEC. **Chromatographia**, v. 74, p. 307-312, 2011.
MORAES, C.C. **Extração e purificação de C-ficocianina de *Spirulina platensis***. 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.

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.; 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, p. 255-259, 2012.

PAN, I. H.; YAO, H. J.; LI, Y. K. Effective extraction and purification of β -xylosidase from *Trichoderma koningii* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. **Enzyme Microbial Technology**, v. 28, p. 196-201, 2001.

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, p. 668-678, 1967.

PURWANTO, M. G. M. The role and efficiency of ammonium sulfate precipitation in purification process of papain crude extract. **Procedia Chemistry**, v. 18, p. 127-131, 2016.
RITO-PALOMARES, M.; NUNEZ, L.; AMADOR, D. Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for C-phyococyanin recovery from *Spirulina maxima*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 76, 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. 326 p.

SALA, L. **Extração simultânea de ficobiliproteínas e anidrase carbônica, e extração seletiva de C-ficocianina**. 2017. 190 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2017.

SALA, L.; ORES, J. C.; MORAES, C.C.; KALIL, S. J. Simultaneous production of phycobiliproteins and carbonic anhydrase by *Spirulina platensis* LEB-52. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, doi: 10.1002/cjce.23131, 2018.

SANTIAGO-SANTOS, M. C.; PONCE-NOYOLA, T.; OLIVEIRA-RAMÍREZ, R.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O. Extraction and purification of phycocyanin from *Calotrix* sp. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2047-2052, 2004.

SCOPES, R. K. **Protein Purification: Principles and Practice**. 3 ed. New York: Springer-Verlag, 1994. 380 p.

SILVA, L. A. **Purificação de ficocianina de *Spirulina platensis* por precipitação e cromatografia de permeação em gel.** 2005. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2005.

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-phyococyanin purification by precipitation from *Spirulina platensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 5-12, 2009.

SONG, W.; ZHAO, C.; WANG, S. A large-scale preparation method of high purity C- phyococyanin. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 3, p. 293-297, 2013.

SUPURAN, C.T. Carbonic anhydrases: from biomedical applications of the inhibitors and activators to biotechnologic use for CO₂ capture. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 28, p. 229–30 2013.

SUPURAN, C. T. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, p. 168–81, 2008.

SUPURAN, C. T. Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 27, p. 759–72, 2012.

YAN, S. G.; ZHU, L. P.; SU, H. N.; ZHANG, X. Y.; CHEN, X. L.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Single-step chromatography for simultaneous purification of C-phyococyanin and allophyococyanin with high purity and recovery from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 1-6, 2011.

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

ARTIGO II
PURIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANIDRASE CARBÔNICA E C-FICOCIANINA
POR DIFERENTES TÉCNICAS

PURIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE ANIDRASE CARBÔNICA E C-FICOCIANINA POR DIFERENTES TÉCNICAS

RESUMO

Spirulina platensis é uma cianobactéria que provém de populações massivas de águas tropicais e subtropicais que possuem altos níveis de carbono, bicarbonato e pH elevado. Diversos compostos podem ser obtidos a partir da biomassa de *Spirulina*, dentre estes destacam-se a ficobiliproteína C-ficocianina e a enzima anidrase carbônica. C-ficocianina é um pigmento natural azul, utilizado nas indústrias de alimentos e cosméticos como corante natural em substituição aos sintéticos. A anidrase carbônica é uma metaloenzima que se encontra amplamente distribuída na natureza e catalisa com alta eficiência a hidratação reversível do dióxido de carbono em bicarbonato. A purificação de produtos biotecnológicos produzidos por células microbianas constitui uma etapa complexa do processo dadas as variadas características dos meios de cultivo e das biomoléculas de interesse, podendo envolver etapas de precipitação, ultrafiltração, sistema aquoso bifásico ou a combinação destes seguidos de uma ou mais etapas cromatográficas, como cromatografia de troca iônica, de afinidade ou de adsorção. A precipitação com sal é uma das operações mais adotadas, tanto em escala laboratorial como industrial. O fracionamento em “dois-cortes” ou “dois-estágios” pode ser empregado quando os meios que contêm a proteína a ser purificada apresentam misturas de diferentes biomoléculas removem-se primeiro as proteínas indesejáveis e após precipitam-se uma ou mais biomoléculas alvo. A ultrafiltração é um processo semelhante à filtração tradicional em que devido à diferença de pressão aplicada, as moléculas de solventes e solutos de menor tamanho permeiam através dos poros da membrana, enquanto outras moléculas ou partículas de maior tamanho são retidas. Neste sentido o presente trabalho teve como objetivo purificar simultaneamente C-ficocianina e anidrase carbônica por diferentes técnicas utilizando precipitação fracionada com sulfato de amônio e ultrafiltração. A precipitação fracionada com sulfato de amônio foi eficiente na purificação simultânea da anidrase carbônica e C-ficocianina. Os melhores resultados obtidos foram utilizando pH 8 e fracionamento na faixa de 0-20% / 20-50% de saturação de sulfato de amônio. Nestas condições foram obtidos fator de purificação de 347,0 e recuperação de 3049% para anidrase carbônica e fator de purificação de 2,0 e recuperação de 85% para C-ficocianina com pureza de 0,75. Já a técnica de ultrafiltração (utilizando tubos Vivaspin® 15 Turbo, Vivaspin® 20 Turbo e convencional em célula) não se mostrou adequada para a purificação simultânea da C-ficocianina e anidrase carbônica. Ao testar duas membranas (tubos Vivaspin® 15 Turbo e tubos Vivaspin® 20 Turbo) observou-se que na de 50 kDa os bioprodutos foram encontrados nas duas frações (permeada e retida) e na de 100 kDa observou-se a retenção da C-ficocianina e da anidrase carbônica, devido à obstrução da membrana. Ao utilizar a célula convencional de ultrafiltração com membrana de 100 kDa também pode-se observar a retenção dos dois bioprodutos com queda acentuada no fluxo durante o processo, evidenciando também a incrustação da membrana.

Palavras-chave: Sulfato de amônio. Bioprodutos. Ultrafiltração. Precipitação fracionada.

1 INTRODUÇÃO

O crescente interesse no estudo de micro-organismos como microalgas, fungos e bactérias deve-se à importância destes nas diversas cadeias tróficas e na possibilidade da aplicação comercial em distintas áreas. Dentre estes micro-organismos, as microalgas são capazes de produzir compostos bioativos com aplicações potenciais na indústria cosmética (WANG et al., 2015), bem como estes produtos podem ser usados como nutracêuticos (CHRISTAKI et al., 2013), aditivos e corantes naturais (BOROWITZKA, 2013; SANGHVI; LO, 2010), dentre outros.

Dentre os diversos compostos que podem ser obtidos da biomassa de *Spirulina* destacam-se a anidrase carbônica (AC) e a C-ficocianina (C-FC) (ORES; AMARANTE; KALIL, 2016). C-ficocianina quando isolada de *Spirulina platensis* pode ser utilizada como corante alimentício em substituição aos sintéticos, uma vez que a microalga é legalmente autorizada como alimento ou complemento alimentar na Europa, Japão e Estados Unidos pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (VON DER WEID; DILLON; FALQUET, 2000), que emitiu o primeiro certificado *Generally Recognized as Safe* (GRAS) para *Spirulina*, deliberando o seu uso como alimento sem apresentar risco à saúde (FDA, 2015). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) reconheceu a *Spirulina* como ingrediente que pode ser utilizado nas formulações de alimentos, limitando o consumo diário do produto em 1,6 g (ANVISA, 2008).

A anidrase carbônica (EC 4.2.1.1) é uma metaloenzima que contém um átomo de zinco na sua conformação, catalisando a hidratação reversível do CO₂ em bicarbonato com alta eficiência (SHEKH et al., 2012), sendo utilizada industrialmente em sistemas de captura enzimática de CO₂ atmosférico (VINOBA et al., 2012), poluente considerado como maior contribuinte para o efeito estufa (IPCC, 2014). No processo enzimático de captura de CO₂, ocorre primeiramente a hidratação do CO₂, catalisada pela enzima e posterior fixação química na forma de minerais de carbonato, como calcita, magnesita e dolomite. Este é um método seguro e permanente de eliminação de CO₂, uma vez que estes minerais de carbonato encontram-se em abundância na natureza e são ambientalmente seguros e estáveis (MIRJAFARI; ASGHARI; MAHINPEY, 2007).

A purificação de produtos biotecnológicos pode envolver etapas de precipitação, ultrafiltração, sistema aquoso bifásico, ou a combinação destes, seguidos de uma ou mais etapas cromatográficas, como cromatografia de troca iônica, de afinidade, de interação hidrofóbica ou de adsorção. A finalização geralmente é feita com etapa de filtração em gel, secagem,

cristalização ou liofilização do produto de interesse (KILIKIAN; PESSOA JR, 2005).

Podemos citar a ultrafiltração como um processo semelhante à filtração tradicional, podendo ser controlada por dois parâmetros principais, o fluxo de permeado e a rejeição da membrana (CUI, 2005). Quando o objetivo da separação por membrana é a concentração, o retido será o produto final. Porém, no caso de purificação, tanto o retido quanto o permeado podem conter o produto desejado, dependendo das impurezas que se quer eliminar e o tamanho da molécula alvo (HABERT; RONALDO, 2006).

Já a precipitação simples, ou em um único estágio, tem valor como técnica de concentração, entretanto a precipitação fracionada tem sido largamente utilizada industrialmente para purificação. O fracionamento em “dois-cortes” ou “dois-estágios” pode ser empregado quando os meios que contém a proteína a ser purificada apresentam misturas de diferentes biomoléculas, removem-se primeiro as proteínas indesejáveis e após precipitam-se uma ou mais biomoléculas alvo (KILIKIAN; PESSOA JR, 2005). O sal sulfato de amônio é comumente utilizado como agente precipitante, pois apresenta alta solubilidade e apresenta propriedades não-desnaturantes para a maioria das proteínas (WALSH, 2014).

Na literatura são encontrados trabalhos que avaliam a purificação de C-ficocianina (FIGUEIRA, 2014; MORAES et al., 2011; SILVA et al., 2009) e anidrase carbônica (ORES et al., 2012) por precipitação com sal, bem como estudos que utilizam ultrafiltração para purificação de C-ficocianina (FIGUEIRA, 2014; MARTELLI et al., 2014; PATIL, RAGHAVARÃO, 2006; CHAIKLAHAN et al., 2011) e anidrase carbônica (CHANDRA, WAHHED, SINGH, 2013), no entanto até o presente momento não se tem conhecimento de estudos que purifiquem simultaneamente estes dois bioprodutos utilizando estas duas técnicas.

Mediante o exposto o presente trabalho teve por objetivo purificar simultaneamente, a partir do extrato de biomassa úmida de *Spirulina platensis* LEB-52, os bioprodutos C-ficocianina e anidrase carbônica utilizando diferentes técnicas de purificação, precipitação fracionada com sulfato de amônio e ultrafiltração.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICRO-ORGANISMO E MEIO DE CULTIVO

A cepa de 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 e C-ficocianina. Para o preparo do inóculo, cultivo e manutenção da microalga foi utilizado o meio Zarrouk (ZARROUK, 1966).

Os cultivos foram realizados em frasco 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. A cianobactéria foi incubada a 25 °C por 32 d (SALA et al., 2018) com aeração realizada por injeção constante de ar estéril (0,5 vvm). A iluminância foi de 40,5 $\mu\text{E}/\text{m}^2.\text{s}$, com fotoperíodo fixado em 12 h claro/escuro. Ao término do cultivo, a biomassa foi recuperada por filtração em papel filtro qualitativo de fibra vegetal e espessura 0,003 mm (Fitec, Brasil).

2.2 EXTRAÇÃO SIMULTÂNEA DE C-FICOCIANINA E ANIDRASE CARBÔNICA

O rompimento celular foi realizado através do tratamento ultrassônico conforme proposto por Ores, Amarante e Kalil (2016). A biomassa, com concentração de 5 g/L foi ressuspensa em tampão Tris-SO₄ 50 mM (pH de acordo com o experimento a ser realizado) e submetida a ruptura celular e extração utilizando homogeneizador ultrassônico (Sonic Ruptor 250, Omni International Inc., EUA) com frequência de 20 kHz (ponteira micro com potência de 60 W). Durante o tratamento ultrassônico, a amostra foi mantida a temperatura de 4 °C, e o tempo de ruptura celular foi de 12 min (SALA, 2017). Após o rompimento celular, as suspensões foram centrifugadas ($4757 \times g$, 4 °C e 20 min) e o sobrenadante utilizado para os ensaios de purificação, sendo denominado extrato bruto.

2.3 PURIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE C-FICOCIANINA E ANIDRASE CARBÔNICA POR DIFERENTES TÉCNICAS

2.3.1 Precipitação fracionada com sulfato de amônio

O extrato contendo C-ficocianina e anidrase carbônica foi concentrado e purificado por precipitação fracionada com saturação de sulfato de amônio de 0-20% / 20-50% em pH de 6, 7 e 8. Em frasco Erlenmeyer de 50 mL contendo extrato bruto foi adicionado, de forma gradativa, sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) sólido correspondente ao primeiro estágio de saturação (20%), de acordo com Scopes (1994). A adição foi feita sob refrigeração a 4 °C e constante agitação nos 30 min iniciais. As amostras permaneceram em repouso por 2 h

(FIGUEIRA, 2014) a 4 °C, após foram centrifugadas ($4757 \times g$, 4°C e 20 min), o sobrenadante foi separado e o precipitado descartado. No segundo estágio, sulfato de amônio foi adicionado ao sobrenadante até atingir saturação equivalente a 50% (SCOPES, 1994). A adição foi feita sob refrigeração a 4 °C e constante agitação nos 30 min iniciais. As amostras permaneceram em repouso por 2 h (FIGUEIRA, 2014) a 4 °C, e após foram centrifugadas ($4757 \times g$, 4 °C, por 20 min). Ao término da precipitação, o precipitado foi ressuspensionado em tampão Tris-SO₄ (50 mM e pH equivalente) em uma relação volume de ressuspensão/volume inicial de 0,52 (SILVA, 2005). As duas frações (precipitado e sobrenadante) foram armazenadas em frasco âmbar e mantidas a temperatura de 4°C até realização das análises. Os ensaios foram realizados em triplicata. A concentração de C-ficocianina, atividade de anidrase carbônica e o teor de proteínas foram determinados nas frações de entrada, sobrenadante e precipitado.

Após determinar o melhor pH de precipitação, diferentes faixas de saturação foram avaliadas (0-20% / 20-60% e 0-25% / 25-60%). As faixas de saturação foram escolhidas de acordo com estudos feitos previamente por Moraes (2006) e Ores et al. (2012).

2.3.2 Purificação simultânea de anidrase carbônica e C-ficocianina por ultrafiltração

O processo de ultrafiltração foi estudado por dois métodos diferentes: (i) tubos Vivaspin® Turbo (Sartorius Stedim Biotech, Alemanha) e (ii) sistema convencional (em módulo de membrana).

Duas membranas de polietersulfona com retenção nominal de 50 kDa e 100 kDa (FIGUEIRA, 2014) foram testadas utilizando tubos Vivaspin® 15 e Vivaspin® 20, respectivamente. Para tal, 10 mL do extrato bruto foi adicionado ao tubo, este foi centrifugado por 10 min a 10 °C e $3304 \times g$ (SALA, 2017), e após foi mensurado o volume da fração permeada e retida. Os ensaios foram realizados em triplicata. A concentração de C-ficocianina, atividade de anidrase carbônica e o teor de proteínas foram determinados nas frações de entrada, permeada e retida.

O sistema de ultrafiltração (em módulo de membrana) foi realizado utilizando configuração do tipo convencional (*dead-end*), de volume útil de 160 mL e agitação promovida por barra magnética suspensa a 5 mm da superfície da membrana, para simulação do escoamento em fluxo tangencial, sendo operado em modo descontínuo. O sistema foi operado com agitação constante, pressão de 1,5 kgf/cm² (manométrica) e temperatura de 10 °C. O gás utilizado para a operação foi o nitrogênio. Membranas de ultrafiltração com retenção nominal

de 50 kDa (polietersulfona) e 100 kDa (celulose regenerada) (FIGUEIRA, 2014) foram testadas. Para tal, 30 mL do extrato bruto foi adicionado a célula de ultrafiltração. Após o término do ensaio foi mensurado o volume da fração permeada e retida. Os ensaios foram realizados em triplicata. A concentração de C-ficocianina, atividade de anidrase carbônica e o teor de proteínas foram determinados na fração inicial, retida e permeada.

2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

2.4.1 Concentração e pureza de C-ficocianina

A concentração de C-ficocianina (C-FC, Equação 1) foi calculada como descrito por Bennett e Bogorad (1973) com modificações no comprimento de onda (de 615 nm para 620 nm). A pureza (PE), foi calculada conforme Equação 2.

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

$$PE = \frac{A_{620}}{A_{280}} \quad (2)$$

Onde a absorvância a 620 nm (A_{620}) indica a concentração de C-ficocianina, a absorvância a 652 nm (A_{652}) indica a concentração de aloficocianina e a absorvância a 280 nm (A_{280}) indica a concentração de proteína total na solução.

2.4.2 Atividade enzimática de anidrase carbônica

A atividade enzimática da anidrase carbônica foi monitorada através da atividade de esterase segundo metodologia de Pocker e Stone (1967), onde a mistura reacional consistiu em 1,8 mL de tampão Tris-SO₄ (50 mM, pH 7,4), 0,2 mL de solução enzimática e 1 mL de *p*-nitrofenil acetato (3 mmol/L). Após a adição do substrato, foi registrado o aumento da absorvância a 400 nm a cada 30 s por 4 min à temperatura ambiente no espectrofotômetro. 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.

2.4.3 Concentração de biomassa e determinação de proteínas

A concentração de biomassa foi determinada por leitura de densidade óptica a 670 nm (COSTA et al., 2002) e conversão para biomassa seca através de curva padrão previamente preparada. Para construção da curva padrão, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas com água destilada e ressuspensas com água 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 de proteínas foi realizada segundo metodologia descrita por Lowry et al. (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão, e também foi acompanhada por leitura em espectrofotômetro-UV a 280 nm.

2.5. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO PROCESSO

A eficiência do processo foi avaliada em termos de fator de purificação (FP, Equação 3) e recuperação (% REC, Equação 4) para C-ficocianina e anidrase carbônica em ambas as técnicas utilizadas.

$$FP = \frac{C_{e.s.}}{C_{e.e.}} \quad (3)$$

$$\% \text{ REC} = \frac{C_s \times V_s}{C_e \times V_e} \times 100 \quad (4)$$

Onde $C_{e.s.}$ é a concentração específica de C-FC (mg/mg_{proteína}) ou a atividade específica de AC (U/mg_{proteína}) na fração de saída, $C_{e.e.}$ é a concentração específica de C-FC (mg/mg_{proteína}) ou a atividade específica de AC (U/mg_{proteína}) na fração de entrada, C_s é a concentração de C-FC (mg/mL) ou atividade de AC (U/mL) na saída, C_e é a concentração de C-FC (mg/mL) ou atividade de AC (U/mL) na entrada, V_s é o volume da fração de saída (mL) e V_e é o volume da fração de entrada (mL).

Além disso, nos ensaios de ultrafiltração, a retenção (% Retenção) e o fator de concentração (FC) do composto de interesse foram determinados conforme as Equações 5 e 6, respectivamente.

$$\% \text{ Retenção} = \left(1 - \frac{C_p}{C_a}\right) \times 100 \quad (5)$$

$$FC = \frac{X_{\text{retido}}}{X_{\text{entrada}}} \quad (6)$$

Onde C_p é a concentração de C-FC (mg/mL) ou atividade de AC (U/mL) no permeado; C_a é a concentração de C-FC (mg/mL) ou atividade de AC (U/mL) na alimentação; X_{entrada} e X_{retido} correspondem ao composto de interesse como concentração de C-FC (mg/mL) ou atividade de AC (U/mL), nas frações de alimentação e retida, respectivamente.

Também foi determinado o fator de concentração de volume após a ultrafiltração, conforme mostra a Equação 7.

$$\text{Fator de concentração do volume} = \left(\frac{V_{\text{entrada}}}{V_{\text{saída}}}\right) \quad (7)$$

Onde V_{entrada} e $V_{\text{saída}}$ correspondem ao volume alimentado (mL) e ao volume da fração retida na membrana (mL), respectivamente.

O percentual de rejeição da anidrase carbônica ou C-ficocianina pela membrana foi calculado conforme a Equação 8 (GOTTSCALK; BON; NOBREGA, 2008).

$$\text{Rejeição (\%)} = \left(1 - \frac{X_p}{X_r}\right) \times 100 \quad (8)$$

Onde X_p e X_r correspondem a concentração de C-FC (mg/mL) ou atividade de anidrase carbônica (U/mL) na fração permeada e retida, respectivamente.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados foram submetidos à teste t ou análise de variância seguido pelo teste de *Tukey*, a fim de verificar diferenças significativas entre as condições estudadas a um nível de 95% de confiança.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PRECIPITAÇÃO FRACIONADA COM SULFATO DE AMÔNIO

Para que a separação simultânea dos bioprodutos pudesse ocorrer, era necessário se obter cada um deles em uma fração diferente. Para tal, foram tomados como base os estudos de Silva et al. (2009) e Ores et al. (2012), onde ambos utilizaram a técnica de precipitação com sulfato de amônio para purificar C-ficocianina e anidrase carbônica, respectivamente. Silva et al. (2009), através de um planejamento experimental, estudaram diferentes faixas de saturação de sulfato de amônio (43,2, 50, 60, 70 e 76,8 %) para purificação de C-ficocianina de *Spirulina platensis* e concluíram que a mesma começa a precipitar a partir de 50% de saturação de sulfato de amônio. Ores et al. (2012) purificaram anidrase carbônica a partir de eritrócito bovino utilizando diferentes faixas de saturação de sulfato de amônio (de 10 a 80%), e verificaram que a enzima precipita nos valores entre 70 e 80%. Sendo assim, foi possível estabelecer diferentes faixas de saturação de sulfato de amônio a fim de verificar qual delas mais se adequa ao processo. Os valores de pH foram escolhidos através dos estudos de Silva et al. (2009), que concluíram que maiores valores de pureza de C-ficocianina foram obtidos quando se trabalha com pH 5,6 ou 7 durante a precipitação com sulfato de amônio, bem como o estudo de Kupriyanova et al. (2003), que verificaram o efeito do pH no meio da atividade extracelular da enzima anidrase carbônica da microalga *Microcoleus chthonoplastes*, onde foi observado uma alta atividade sob condições alcalinas (pH 10).

A partir destas informações foram realizados ensaios utilizando saturação de sulfato de amônio na faixa de 0-20% / 20-50% com diferentes valores de pH (6, 7 e 8). Portanto, esperava-se, com os ensaios realizados, encontrar uma maior concentração de C-ficocianina na fração precipitada do segundo corte e uma maior atividade de anidrase carbônica na parcela do sobrenadante também do segundo corte, possibilitando assim a separação simultânea dos dois bioprodutos. Também esperava-se que os valores de fator de purificação para anidrase carbônica e C-ficocianina bem como a pureza de C-ficocianina fossem maiores do que na precipitação direta, uma vez que uma concentração maior de proteínas contaminantes é retirada no primeiro corte.

As Tabelas 1 e 2 apresentam os valores obtidos no ensaio de precipitação fracionada (0-20 / 20-50%) com diferentes valores de pH para C-ficocianina e anidrase carbônica, respectivamente. Analisando as frações (precipitado e sobrenadante) individualmente, pode-se perceber que a precipitação fracionada com sulfato de amônio se mostrou uma técnica eficaz

para a purificação simultânea de C-ficocianina e anidrase carbônica, uma vez que, conforme esperado, uma maior concentração de C-ficocianina foi obtida na fração precipitada e uma maior atividade de anidrase carbônica na fração sobrenadante para os três valores de pH utilizados (6, 7 e 8). Foram obtidos, para todos os ensaios, o mesmo valor de concentração de C-ficocianina (1,4 mg/mL). Pode-se observar também que os valores de pH influenciaram mais a atividade da anidrase carbônica do que a concentração de C-ficocianina, deixando bem claro que existe uma preferência da enzima por pH's alcalinos (KUPRIYANOVA et al., 2003). Sua atividade foi de 0,736 U/mL em pH 8 contra 0,043 e 0,119 U/mL para pH 6 e 7, respectivamente.

Uma vez que C-ficocianina é comercializada de acordo com seu grau específico de pureza, sendo este classificado acima de 0,7 em grau alimentar e acima de 4,0 em grau analítico (RITO-PALOMARES; NUEZ; AMADOR, 2001), os ensaios realizados também objetivaram um aumento na pureza em relação ao extrato inicial, uma vez que no primeiro corte são removidas uma maior concentração de proteínas contaminantes. Com base nos resultados da Tabela 1, verificou-se que o processo aplicado possibilitou a obtenção de extrato de C-ficocianina com pureza de grau alimentar ($> 0,7$) para todos valores de pH testados, sendo que o incremento obtido na pureza em relação ao extrato bruto se deu da mesma forma para todos os ensaios, valores estes apresentados na Tabela 3. Em estudo feito por Silva et al. (2009) valor semelhante de pureza de C-ficocianina (0,88) foi encontrado para precipitação fracionada na faixa de saturação de sulfato de amônio de 0-25% / 25-60% e utilizando pH 7. Moraes (2006) utilizou precipitação fracionada na faixa de 0-25% / 25-50% e obteve extrato com pureza de 0,72. Julga-se importante ressaltar que nos dois estudos foram utilizadas biomassa seca de *Spirulina platensis*, a ruptura celular foi feita por congelamento e a extração do bioproducto foi feita utilizando água destilada como solvente.

As recuperações obtidas para C-ficocianina foram iguais (85%) nos diferentes valores de pH, mostrando que a diferença de pH não exerceu influência sobre este parâmetro, corroborando com o estudo de Silva et al. (2009) que também não observou diferença significativa nos valores de recuperação quando estudou diferentes faixas de pH na purificação de C-ficocianina de *Spirulina platensis* utilizando precipitação com sulfato de amônio. Já para anidrase carbônica as recuperações foram de 630, 1384 e 3049% para os valores de pH de 6, 7 e 8, respectivamente, mostrando que neste caso a recuperação aumentou conforme o aumento de pH, fato este que pode ser explicado devido a influência que o valor de pH teve no aumento da atividade enzimática, uma vez que a recuperação está relacionada à atividade enzimática da anidrase carbônica.

Tabela 1 - Valores experimentais (média $\pm$ desvio padrão) obtidos no ensaio de precipitação fracionada (0-20 / 20-50%) referentes à C-ficocianina (C-FC).

pH	Fração	Concentração de proteína (mg/mL)	Concentração de C-FC (mg/mL)	Concentração específica C-FC (mg/mg)	Fator de purificação	Recuperação (%)	Pureza
pH 6	Entrada	$2,8 \pm < 0,1$	$1,1 \pm < 0,1$	$0,4 \pm < 0,1$	1,00	100,0	$0,71 \pm < 0,01$
	Precipitado	$2,2 \pm < 0,1$	$1,4 \pm < 0,1$	$0,6 \pm < 0,1$	$1,6 \pm < 0,1$	$85 \pm 0,5$	$0,81 \pm < 0,01$
	Sobrenadante	$0,2 \pm < 0,1$	$< 0,1 \pm < 0,1$	$< 0,1 \pm < 0,1$	$< 0,1 \pm < 0,1$	$< 1 \pm 0,2$	$0,10 \pm < 0,01$
pH 7	Entrada	$2,7 \pm < 0,1$	$1,1 \pm < 0,1$	$0,4 \pm < 0,1$	1,00	100,0	$0,68 \pm < 0,01$
	Precipitado	$2,3 \pm 0,1$	$1,4 \pm < 0,1$	$0,6 \pm < 0,1$	$1,40 \pm < 0,1$	$85 \pm 0,4$	$0,78 \pm < 0,01$
	Sobrenadante	$0,2 \pm < 0,1$	$< 0,1 \pm < 0,1$	$< 0,1 \pm < 0,1$	$< 0,1 \pm < 0,1$	$< 1 \pm 0,1$	$0,10 \pm 0,01$
pH 8	Entrada	$2,8 \pm < 0,1$	$1,1 \pm < 0,1$	$0,4 \pm < 0,1$	1,00	100,0	$0,66 \pm < 0,01$
	Precipitado	$1,7 \pm < 0,1$	$1,4 \pm < 0,1$	$0,8 \pm < 0,1$	$2,00 \pm < 0,1$	$85 \pm 0,1$	$0,75 \pm < 0,01$
	Sobrenadante	$0,2 \pm < 0,1$	$< 0,1 \pm < 0,1$	$< 0,1 \pm < 0,1$	$< 0,1 \pm < 0,1$	$< 1 \pm < 0,1$	$0,10 \pm < 0,01$

Tabela 2 - Valores experimentais (média $\pm$ desvio padrão) obtidos no ensaio de precipitação fracionada (0-20 / 20-50%) referentes à enzima anidrase carbônica (AC).

pH	Fração	Concentração de proteína (mg/mL)	Atividade AC (U/mL)	Atividade específica AC (U/mg)	Fator de purificação	Recuperação (%)
pH 6	Entrada	$2,8 \pm < 0,1$	$0,005 \pm 0,001$	$0,002 \pm 0,001$	1,00	100,0
	Precipitado	$2,2 \pm < 0,1$	$0,006 \pm 0,016$	$0,003 \pm < 0,001$	$1,6 \pm 0,2$	$77 \pm 2,5$
	Sobrenadante	$0,2 \pm < 0,1$	$0,034 \pm < 0,001$	$0,144 \pm 0,013$	$80,4 \pm 7,2$	$630 \pm 12,2$
pH 7	Entrada	$2,7 \pm < 0,1$	$0,009 \pm 0,001$	$0,003 \pm 0,001$	1,00	100,0
	Precipitado	$2,3 \pm 0,1$	$0,025 \pm 0,002$	$0,011 \pm 0,001$	$3,2 \pm 0,4$	$200 \pm 2,9$
	Sobrenadante	$0,2 \pm < 0,1$	$0,119 \pm 0,001$	$0,567 \pm 0,017$	$168,9 \pm 5,0$	$1384 \pm 12,7$
pH 8	Entrada	$2,8 \pm < 0,1$	$0,023 \pm 0,001$	$0,008 \pm 0,001$	1,00	100,0
	Precipitado	$1,7 \pm < 0,1$	$0,147 \pm 0,011$	$0,083 \pm 0,006$	$10,1 \pm 0,7$	$446 \pm 15,7$
	Sobrenadante	$0,2 \pm < 0,1$	$0,736 \pm 0,022$	$2,941 \pm 0,162$	$347,0 \pm 6,7$	$3049 \pm 36,7$

Observa-se também que o fator de purificação aumenta conforme o aumento de pH para anidrase carbônica, já para C-ficocianina o menor valor do fator de purificação foi de 1,4 vezes em pH 7, seguido por 1,6 e 2,0 vezes em pH 6 e 8, respectivamente. Os valores de fator de purificação de C-ficocianina não corroboram com os valores de incremento da pureza do extrato. O incremento da pureza de C-ficocianina foi estatisticamente igual em todos os valores de pH de estudo. Fato este que pode ter ocorrido devido a detecção de proteínas a 280 nm não ter sido alterada, no entanto, como a metodologia proposta por Lowry et al. (1951) determina proteínas com estruturas diferentes das detectadas na leitura a 280 nm, é possível que estas proteínas tenham sido retiradas durante o ensaio de precipitação, acarretando em um aumento da purificação, uma vez que a concentração de proteínas (mg/mL) em pH 8 é baixa quando comparado aos valores de pH 6 e 7.

A Tabela 3 apresenta a análise estatística entre os três ensaios de diferentes pH, a fim de verificar qual foi mais eficiente durante o processo. Nota-se que para anidrase carbônica tanto o fator de purificação quanto a recuperação se diferiram significativamente nos três ensaios, já para C-ficocianina só se observou diferença significativa no fator de purificação, sendo que a recuperação e o incremento da pureza não foram influenciadas pelo pH. Logo, o pH 8 foi escolhido para dar continuidade ao estudo de precipitação fracionada com sulfato de amônio, uma vez que o fator de purificação da C-ficocianina e o fator de purificação e recuperação da anidrase carbônica foram maiores.

Ao usar a técnica de precipitação com sulfato de amônio, é preciso conhecer os intervalos de concentração de sal onde a proteína de interesse e qualquer interferente precipitam, permitindo a purificação da biomolécula. Para se ter um melhor entendimento sobre o comportamento da precipitação na purificação simultânea de C-ficocianina e anidrase carbônica, outras faixas de saturação de sulfato de amônio foram estudadas em pH 8. As faixas de saturação de 0-20% / 20-50% (ensaio 1), 0-20% / 20-60% (ensaio 2) e 0-25% / 25-60% (ensaio 3) foram testadas e avaliadas em relação ao fator de purificação, recuperação e pureza para C-ficocianina e fator de purificação e recuperação para anidrase carbônica. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Foram obtidas concentrações de C-ficocianina muito semelhantes para todas as faixas de saturação com sulfato de amônio 1,4, 1,3 e 1,3 mg/mL, para saturação de sulfato de amônio de 0-20 / 20-50%, 0-20 / 20-60% e 0-25 / 25-60%, respectivamente, enquanto que a atividade de anidrase carbônica foi maior nas faixas de 0-20% / 20-60% e de 0-25% / 25-60% de saturação de sulfato de amônio (1,149 e 1,057 U/mL respectivamente), indicando mais uma vez que quanto maior a concentração de sal adicionada, maior é a atividade da enzima.

Tabela 3 - Análise estatística entre os ensaios de precipitação fracionada (0-20/ 20-50%).

pH	Fração				
	Sobrenadante		Precipitado		
	Fator de purificação AC	Recuperação (%) AC	Fator de purificação C-FC	Recuperação (%) C-FC	Incremento da pureza
pH 6	$80,4 \pm 7,2^c$	$630 \pm 12,2^c$	$1,6 \pm < 0,1^b$	$85 \pm 0,5^a$	$1,15 \pm < 0,01^a$
pH 7	$168,9 \pm 5,0^b$	$1384 \pm 12,7^b$	$1,4 \pm < 0,1^c$	$85 \pm 0,4^a$	$1,14 \pm < 0,01^a$
pH 8	$347,0 \pm 6,7^a$	$3049 \pm 36,7^a$	$2,0 \pm < 0,1^a$	$85 \pm 0,1^a$	$1,13 \pm < 0,01^a$

* Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ao nível de 95% de confiança (Tukey).

O extrato com maior pureza de C-ficocianina 0,75 foi obtido na faixa de 0-20% / 20-50% e valores muito semelhantes de pureza (0,7 e 0,67) foram obtidos nos outros dois ensaios para faixas de saturação de sulfato de amônio de 0-25 / 25-60% e 0-20 / 20-60%. Kannaujiya e Sinha (2016) purificaram C-ficocianina a partir da cianobactéria *Nostoc* sp. utilizando como um dos passos precipitação fracionada com sulfato de amônio e obtiveram pureza de 0,92 na faixa de saturação de 0-20 / 20-60% de sulfato de amônio.

O maior fator de purificação para C-ficocianina (2,0), foi obtido na faixa de saturação de sulfato de amônio de 0-20% / 20-50% e o mesmo foi menor em concentrações mais altas de sal pois, como já foi discutido, existe a possibilidade de com o aumento do sal outras proteínas ou impurezas tenham precipitado também. Nota-se que o fator de purificação da anidrase carbônica (512,0) foi maior na faixa de saturação de 0-25% / 25-60%. A recuperação da anidrase carbônica foi de 3049, 2118 e 3182%, para os ensaios de 0-20% / 20-50%, 0-20 / 20-60% e 0-25 / 25-60%, respectivamente. Já para C-ficocianina, estes valores foram de 85, 82 e 88%, respectivamente para os mesmos ensaios. Román et al. (2002) utilizaram precipitação de 65% de saturação com sulfato de amônio para recuperar ficoeritrina de *Porphyridium cruentum* e obtiveram recuperação de 75%. Figueira (2014) e Moraes (2006) utilizaram precipitação fracionada com faixa de saturação de 0-20% / 20-50% para purificar C-ficocianina de *Spirulina platensis* e obtiveram recuperação de 81,2% e 81,7% respectivamente. Silva et al. (2009) obtiveram 91,2% de recuperação com precipitação na faixa de 50% de saturação a fim de purificar C-ficocianina de *Spirulina platensis*. Kannaujiya e Sinha (2016) obtiveram 96% de recuperação utilizando 60% de saturação de sulfato de amônio.

Embora a recuperação de C-ficocianina tenha sido maior na faixa de saturação de 0-25% / 25-60%, a mesma não se difere significativamente da faixa de saturação de 0-20% / 20-50%, conforme a Tabela 6. O incremento da pureza de C-ficocianina nas faixas de saturação de 0-20% / 20-50% e 0-25% / 25-60% foi estatisticamente igual. O fator de purificação de C-ficocianina não apresentou diferença significativa nas faixas de saturação de sulfato de amônio de 0-20% / 20-60% e 0-25% / 25-60%.

Já para anidrase carbônica, a faixa de saturação de sulfato de amônio de 0-25/ 25-60 apresentou o maior fator de purificação (512,0) e foi estatisticamente diferente das demais faixas, enquanto que as maiores recuperações enzimáticas de anidrase carbônica foram obtidas nas faixas de 0-20 / 20-50% e 0-25 / 25-60%. Portanto, a melhor faixa de saturação para purificação simultânea de anidrase carbônica e C-ficocianina utilizando pH 8 é a de 0-20% / 20-50%, corroborando com os estudos anteriores de Moraes (2006) e Silva et al. (2009).

Tabela 4 - Valores experimentais (média $\pm$ desvio padrão) obtidos nos ensaios de precipitação fracionada com pH 8 referentes à C-ficocianina (C-FC).

Faixa de saturação (%)	Fração	Concentração de proteína (mg/mL)	Concentração de C-FC (mg/mL)	Concentração		Recuperação (%)	Pureza
				específica C-FC (mg/mg)	Fator de purificação		
0-20/ 20-50	Entrada	$2,8 \pm < 0,1$	$1,1 \pm < 0,1$	$0,4 \pm < 0,1$	1,00	100,0	$0,66 \pm < 0,01$
	Precipitado	$1,8 \pm < 0,1$	$1,4 \pm < 0,1$	$0,8 \pm < 0,1$	$2,00 \pm 0,01$	$85 \pm 0,1$	$0,75 \pm < 0,01$
	Sobrenadante	$0,2 \pm < 0,1$	$< 0,1 \pm < 0,1$	$< 0,1 \pm < 0,1$	$0,04 < 0,01$	$< 1 \pm < 0,1$	$0,10 \pm < 0,01$
0-20/ 20-60	Entrada	$2,8 \pm < 0,1$	$1,0 \pm < 0,1$	$0,4 \pm < 0,1$	1,00	100,0	$0,62 \pm < 0,01$
	Precipitado	$2,7 \pm < 0,1$	$1,3 \pm < 0,1$	$0,5 \pm < 0,1$	$1,38 \pm 0,01$	$82 \pm 0,1$	$0,67 \pm < 0,01$
	Sobrenadante	$0,2 \pm < 0,1$	$< 0,1 \pm < 0,1$	$< 0,1 \pm < 0,1$	$0,08 \pm 0,01$	$< 1 \pm 0,1$	$0,05 \pm < 0,01$
0-25/ 25-60	Entrada	$2,8 \pm 0,1$	$1,0 \pm < 0,1$	$0,4 \pm < 0,1$	1,00	100,0	$0,63 \pm < 0,01$
	Precipitado	$2,6 \pm < 0,1$	$1,3 \pm < 0,1$	$0,5 \pm < 0,1$	$1,43 \pm 0,02$	$88 \pm < 0,1$	$0,70 \pm < 0,01$
	Sobrenadante	$0,2 \pm < 0,1$	$< 0,1 \pm < 0,1$	$< 0,1 \pm < 0,1$	$0,04 \pm 0,01$	$< 1 \pm 0,1$	$0,02 \pm < 0,01$

Tabela 5 - Valores experimentais (média $\pm$ desvio padrão) obtidos nos ensaios de precipitação fracionada com pH 8 referentes à enzima anidrase carbônica (AC).

Faixa de saturação (%)	Fração	Concentração de proteína (mg/mL)	Atividade AC (U/mL)	Atividade específica AC (U/mg)	Fator de purificação	Recuperação (%)
0-20/ 20-50	Entrada	$2,8 \pm < 0,1$	$0,023 \pm 0,001$	$0,008 \pm 0,001$	1,00	100,0
	Precipitado	$1,8 \pm < 0,1$	$0,147 \pm 0,011$	$0,083 \pm 0,006$	$10,1 \pm 0,7$	$446 \pm 15,7$
	Sobrenadante	$0,2 \pm < 0,1$	$0,736 \pm 0,022$	$2,941 \pm 0,162$	$347,0 \pm 6,7$	$3049 \pm 36,7$
0-20/ 20-60	Entrada	$2,8 \pm < 0,1$	$0,054 \pm 0,001$	$0,019 \pm 0,001$	1,00	100,0
	Precipitado	$2,7 \pm < 0,1$	$0,361 \pm 0,010$	$0,142 \pm 0,048$	$5,9 \pm 0,3$	$371 \pm 23,8$
	Sobrenadante	$0,2 \pm < 0,1$	$1,149 \pm 0,001$	$6,180 \pm 0,443$	$319,6 \pm 22,9$	$2118 \pm 10,9$
0-25/ 25-60	Entrada	$2,8 \pm 0,1$	$0,033 \pm 0,001$	$0,012 \pm 0,001$	1,00	100,0
	Precipitado	$2,6 \pm < 0,1$	$0,308 \pm 0,06$	$0,120 \pm 0,030$	$8,6 \pm 0,2$	$544 \pm 1,9$
	Sobrenadante	$0,2 \pm < 0,1$	$1,057 \pm 0,13$	$5,537 \pm 1,010$	$512,0 \pm 30,8$	$3182 \pm 38,9$

Tabela 6 - Análise estatística entre os ensaios de precipitação fracionada com pH 8.

Faixa de saturação (%)	Fração				
	Sobrenadante		Precipitado		
	Fator de purificação AC	Recuperação (%) AC	Fator de purificação C-FC	Recuperação (%) C-FC	Incremento da pureza
0-20/ 20-50	$347,0 \pm 6,7^b$	$3049 \pm 36,7^a$	$2,0 \pm < 0,1^a$	$85 \pm 0,1^{ab}$	$1,13 \pm < 0,01^a$
0-20/ 20-60	$319,6 \pm 22,9^b$	$2118 \pm 10,9^b$	$1,4 \pm < 0,1^b$	$82 \pm 0,1^b$	$1,08 \pm < 0,01^b$
0-25/ 25-60	$512,0 \pm 30,8^a$	$3182 \pm 38,9^a$	$1,4 \pm < 0,1^b$	$88 \pm < 0,1^a$	$1,11 \pm < 0,01^{ab}$

* Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ao nível de 95% de confiança (Tukey).

Apesar de se ter um fator de purificação mais baixo para anidrase carbônica nesta faixa, o mesmo não ocorreu para o valor de recuperação da enzima, bem como para os valores de fator de purificação, recuperação e pureza para C-ficocianina.

A partir dos resultados obtidos na melhor condição estabelecida pela precipitação direta (Artigo 1) e fracionada na faixa de 0-20 / 20-50% de saturação de sulfato de amônio foi realizada a análise estatística a fim de verificar a diferença entre as médias de cada ensaio. A precipitação direta apresentou maiores valores para fator de purificação e recuperação de anidrase carbônica e fator de purificação e recuperação de C-ficocinina (a pureza do extrato foi igual para ambos ensaios), sendo que destes, apenas o fator de purificação da C-ficocianina e a recuperação da anidrase carbônica não apresentaram diferença significativa pelo teste t ($p > 0,05$). Neste sentido, a precipitação direta foi escolhida como melhor técnica a ser aplicada na purificação simultânea de anidrase carbônica e C-ficocianina, além disto há uma diminuição do tempo de processo e de etapas na purificação dos bioprodutos, acarretando assim na redução de custos.

Diversos estudos têm utilizado a precipitação com sulfato de amônio para purificação de enzimas (ALI et al., 20013; AZARKAN et al., 2003; MOHAMED et al., 2016; PURWANTO, 2016; ZHANG, 1999; KANNAUJIYA; SINHA, 2016, YAN et al. 2011). No entanto, a pureza de C-ficocianina obtida após a precipitação com sulfato de amônio ainda é considerada baixa mediante aspecto de comercialização. Logo, após esta etapa faz-se necessário aplicar outras técnicas como ultrafiltração ou cromatografia de troca iônica, por exemplo. São encontrados na literatura estudos que utilizam processos de purificação por membranas para C-ficocianina (CHAIKLAHAN, 2011; FIGUEIRA, 2014; JESUS, 2016; SALA, 2017), porém não são encontrados trabalhos que purificam anidrase carbônica a partir de biomassa microalgal utilizando esta técnica. Desta maneira, julga-se necessário o estudo da purificação simultânea destes dois bioprodutos utilizando a ultrafiltração.

3.2 ULTRAFILTRAÇÃO

Os resultados obtidos para a concentração e purificação de C-ficocianina e anidrase carbônica estão apresentados nas Tabelas 7 e 8. Na ultrafiltração utilizando tubos Vivaspin® 15 Turbo e Vivaspin® 20 Turbo foram utilizadas membranas com retenção nominal de 50 kDa e 100 kDa, respectivamente, com base no trabalho de Figueira (2014). Ao analisar a membrana de 50 kDa (Tabelas 7 e 8) percebe-se que esta técnica não se aplica à separação simultânea de

C-ficocianina e anidrase carbônica, pois ambos bioprodutos foram encontrados nas duas parcelas analisadas (retido e permeado). C-ficocianina foi obtida com maior concentração na fração retida, 0,9 mg/mL, mas também foi possível detectar uma concentração de 0,4 mg/mL na fração permeada. O fator de purificação para C-ficocianina foi de 1,0 na fração retida e 0,8 na fração permeada, com recuperação de 82% e 13%, respectivamente, sendo que parte deste bioproduto ficou aderido à membrana. Obteve-se atividade de anidrase carbônica de 0,02 U/mL na fração retida e 0,01 U/mL na fração permeada com fator de purificação de 1,0 e 0,8, respectivamente. Foi possível recuperar 78% da enzima na fração retida e 11% na fração permeada. Também foi verificado a presença de proteínas contaminantes (A_{280}) nas duas parcelas (retido e permeado), fazendo com que a pureza do extrato permanecesse praticamente a mesma na fração permeada (0,78) e retida (0,81) em relação à pureza de entrada (0,78).

Levando em consideração que diversos estudos relatam que o uso da extração assistida por ultrassom levou à desintegração de partículas, na lise celular e na ruptura de moléculas, resultando em redução de tamanho de partículas e aumento da área superficial (ADWUYI; DESHMAME, 2015; GONZÁLEZ-FERNANDEZ et al., 2012; SALA, 2017; SRIBALA et al., 2016), uma justificativa para C-ficocianina ter permeado a membrana seria a possível desagregação de suas subunidades (com massa molar inferior a 50 kDa) durante o processo de ruptura celular, permitindo assim que concentrações de C-ficocianina fossem encontradas na fração permeada após a ultrafiltração, conforme Figura 1.

Figura 1 – Fração permeada após ultrafiltração com tubos Vivaspin® 15 Turbo utilizando membrana de 50 kDa.



Tabela 7 - Valores experimentais (média $\pm$ desvio padrão) obtidos nos ensaios de ultrafiltração utilizando tubos Vivaspín para C-ficocianina.

Membrana	Fração	Concentração de proteína (mg/mL)	Concentração de C-FC (mg/mL)	Concentração específica C-FC (mg/mg)	Fator de purificação	Recuperação (%)	Pureza
50 kDa	Entrada	$2,4 \pm < 0,1$	$0,8 \pm < 0,1$	$0,3 \pm < 0,1$	1	100	$0,78 \pm < 0,01$
	Retido	$2,7 \pm < 0,1$	$0,9 \pm < 0,1$	$0,3 \pm < 0,1$	$1,0 \pm < 0,1$	$82 \pm 0,1$	$0,81 \pm < 0,01$
	Permeado	$1,7 \pm < 0,1$	$0,4 \pm < 0,1$	$0,3 \pm < 0,1$	$0,8 \pm < 0,1$	$13 \pm < 0,1$	$0,78 \pm < 0,01$
100 kDa	Entrada	$2,9 \pm < 0,1$	$0,5 \pm < 0,1$	$0,2 \pm < 0,1$	1	100	$0,75 \pm < 0,01$
	Retido	$3,8 \pm 0,1$	$1,4 \pm < 0,1$	$0,4 \pm < 0,1$	$2,1 \pm < 0,1$	$102 \pm 0,1$	$0,77 \pm < 0,01$
	Permeado	$0,7 \pm < 0,1$	$0,1 \pm < 0,1$	$0,1 \pm < 0,1$	$0,7 \pm < 0,1$	$7 \pm < 0,1$	$0,51 \pm < 0,01$

Tabela 8 - Valores experimentais (média $\pm$ desvio padrão) obtidos nos ensaios de ultrafiltração utilizando tubos Vivaspín para anidrase carbônica.

Membrana	Fração	Concentração de proteína (mg/mL)	Atividade AC (U/mL)	Atividade específica AC (U/mg)	Fator de purificação	Recuperação (%)
50 kDa	Entrada	$2,4 \pm < 0,1$	$0,02 \pm < 0,01$	$0,008 \pm 0,001$	1	100
	Retido	$2,7 \pm < 0,1$	$0,02 \pm < 0,01$	$0,008 \pm < 0,001$	$1,0 \pm < 0,01$	$78 \pm 0,9$
	Permeado	$1,7 \pm < 0,1$	$0,01 \pm < 0,01$	$0,007 \pm < 0,001$	$0,8 \pm < 0,01$	$11 \pm 0,3$
100 kDa	Entrada	$2,9 \pm < 0,1$	$0,03 \pm < 0,01$	$0,009 \pm 0,001$	1	100
	Retido	$3,8 \pm 0,1$	$0,04 \pm < 0,01$	$0,010 \pm < 0,001$	$1,1 \pm < 0,01$	$56 \pm 0,1$
	Permeado	$0,7 \pm < 0,1$	$0,06 \pm < 0,01$	$0,008 \pm < 0,002$	$0,8 \pm < 0,01$	$9 \pm 2,0$

Ao analisar a membrana de 100 kDa (Tabelas 7 e 8) percebe-se que grande parte dos bioprodutos ficaram na fração retida da membrana. C-ficocianina foi obtida com concentração de 1,4 mg/mL, com fator de purificação de 2,1 e recuperação de 102%, com pureza de 0,77. Anidrase carbônica apresentou atividade de 0,04 U/mL, fator de purificação de 1,2 e recuperação de 56%. Uma vez que os tubos Vivaspin® 20 Turbo permitem a concentração de bioprodutos por ultrafiltração utilizando força centrífuga, a pressão aplicada durante o processo é maior, o que pode ter acarretado na obstrução dos poros da membrana resultando na incrustação. A incrustação ocorre devido a deposição de partículas coloidais na superfície da membrana e nos poros da membrana (ZEMAN; ZYDNEY, 1996). Este fenômeno pode ser verificado ao analisar os valores de proteína nas diferentes parcelas (permeado e retido) após a ultrafiltração. Observa-se que uma grande quantidade delas (3,8 mg/mL) ficou na parcela retida corroborando com o fato de ter ocorrido obstrução dos poros com consequente acúmulo de partículas, não permitindo a separação dos bioprodutos durante o processo.

A Tabela 9 apresenta os fatores de retenção e concentração para as membranas de 50 kDa e 100 kDa. O fator de retenção foi maior para C-ficocianina quando se utilizou membrana de 100 kDa, já para anidrase carbônica o fator de retenção foi praticamente o mesmo nas duas membranas (88 e 89%). O fator de retenção dos dois bioprodutos mostra, tanto na membrana de 50 kDa quanto na de 100 kDa, que C-ficocianina e anidrase carbônica ficaram retidas em sua grande maioria, não havendo a separação dos mesmos, indicando que nenhuma das membranas foi eficiente na separação dos dois bioprodutos. Em relação aos valores obtidos para fator de concentração da C-ficocianina, anidrase carbônica e volume, os ensaios realizados com ambas as membranas também demonstram a ineficiência do processo de ultrafiltração para separar os dois bioprodutos.

Tabela 9 - Fatores de retenção e concentração (C-ficocianina, anidrase carbônica e volume) e percentual de rejeição para as membranas de polietersulfona (50 kDa e 100 kDa), em tubo Vivaspin.

Membrana	Fator de retenção (%)		Fator de concentração			Rejeição (%)	
	C-FC	AC	C-FC	AC	Volume	C-FC	AC
50 kDa	87±1,4	88±1,5	1,2±0,1	1,2±0,1	1,5±0,1	49±0,8	47±1,3
100 kDa	92±0,1	89±2,9	2,8±0,2	1,5±< 0,1	2,7±< 0,1	95±0,3	88±2,8

*Média de três valores ± desvio padrão.

Para os ensaios de ultrafiltração utilizando célula convencional foram realizados

experimentos com membranas de 50 kDa (polietersulfona) e 100 kDa (celulose regenerada), sendo que a escolha das membranas foi feita de acordo com estudos realizados por Figueira (2014). Quando foi utilizada a membrana de 50 kDa não foi possível avaliar o processo, pois o extrato alimentado não permeou a membrana, ainda permanecendo em sua totalidade na fração retida após 5 h de ensaio. Isto pode ter ocorrido devido à extração assistida por ultrassom não ser seletiva na extração de C-ficocianina, ocasionando também a extração de outros compostos (SALA, 2017) que por serem de difícil retirada, durante a ultrafiltração, os mesmos podem se depositar diretamente sobre a superfície da membrana, resultando em incrustação (MARSHALL; MUNRO; TRSGKDH, 1993; RABILLER-BAUDRY et al., 2002), uma vez que o bloqueio dos poros e seu impacto no comportamento de filtração dependem do tamanho relativo das partículas e dos poros da membrana. A Figura 2 apresenta a membrana de ultrafiltração de 50 kDa após 5 h de ensaio, evidenciando a incrustação ocorrida durante o processo.

As Tabelas 10 e 11 apresentam os valores obtidos no ensaio de ultrafiltração convencional utilizando membrana de 100 kDa. Ao analisar os resultados obtidos percebe-se que novamente os dois bioprodutos ficaram na fração retida, não havendo separação dos mesmos. Foi obtido extrato com concentração de 2,2 mg/mL de C-ficocianina e atividade de 0,03 U/mL de anidrase carbônica. O fator de purificação para C-ficocianina foi de 1,1 com recuperação de 85%, parte do bioproduto ficou aderido à membrana. Já para anidrase carbônica o fator de purificação foi de 1,2 com recuperação de 71%. A pureza do extrato de C-ficocianina foi de 0,77.

Figura 2 – Membrana de 50 kDa após ultrafiltração.



A Tabela 12 apresenta os fatores de retenção e concentração para a membrana de 100 kDa. O fator de retenção foi de 93% para C-ficocianina e 80% para anidrase carbônica. O

percentual de rejeição da C-ficocianina pela membrana foi de 94% e da anidrase carbônica foi de 71%, indicando que a membrana de 100 kDa não foi eficiente na separação dos dois bioprodutos. Em relação aos valores obtidos para fator de concentração da C-ficocianina, anidrase carbônica e volume, os ensaios realizados também demonstram que o processo de ultrafiltração não foi eficiente para as condições de extrato utilizadas.

Na Figura 3 é mostrado o perfil de comportamento do fluxo médio em função do tempo de operação para dois experimentos durante o processo de ultrafiltração utilizando membrana de 100 kDa. Na condição estudada foi observada a diminuição acentuada do fluxo de permeado no início do processo de ultrafiltração, comportamento este típico dos fenômenos de polarização de concentração e de incrustação da membrana. Segundo Ghosh e Cui (2000), conforme a solução é concentrada, a concentração de proteínas na superfície da membrana se eleva, aumentando a camada polarizada. Dependendo da situação, pode ocorrer a formação de uma camada gel, a qual leva a uma maior queda do fluxo de permeado. O fluxo médio variou entre 13,7 e 3,7 L/h.m². A redução do fluxo de permeado foi de 73% em 1,92 h.

Embora a ultrafiltração não tenha se mostrado eficiente na separação e purificação de anidrase carbônica e C-ficocianina valores satisfatórios de pureza foram obtidos quando se utilizou a precipitação com sulfato de amônio. Tanto a precipitação fracionada quanto a direta se mostraram técnicas eficazes para a purificação simultânea destes dois bioprodutos, uma vez que após o processo se obteve anidrase carbônica com atividade satisfatória e C- ficocianina com pureza de grau alimentar (> 0,7).

Figura 3 - Fluxo médio de permeado durante o processo de UF usando membrana de 100 kDa (celulose regenerada).

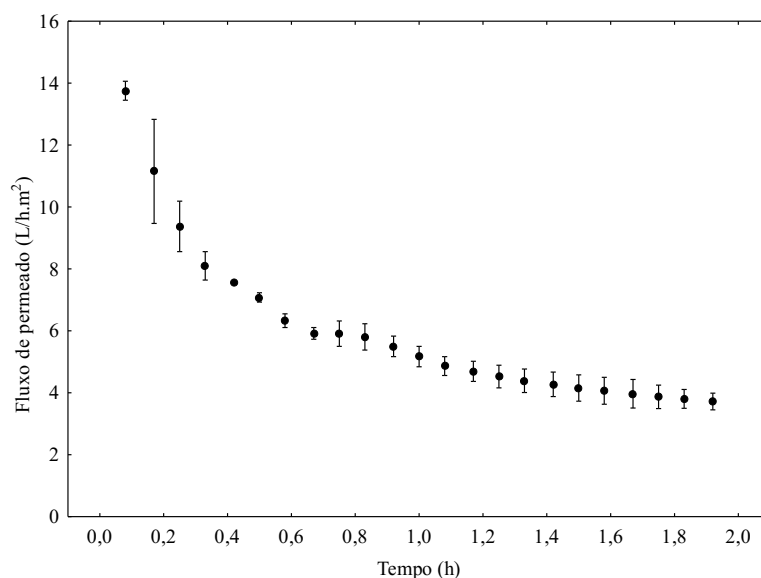


Tabela 10 - Valores experimentais (média $\pm$ desvio padrão) obtidos nos ensaios de ultrafiltração para C-ficocianina (100 kDa).

Fração	Concentração de proteína (mg/mL)	Concentração de C-FC (mg/mL)	Concentração específica C-FC (mg/mg)	Fator de purificação	Recuperação (%)	Pureza
Entrada	3,1 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ < 0,1	0,4 $\pm$ < 0,1	1	100	0,76 $\pm$ 0,01
Retido	5,4 $\pm$ 0,4	2,2 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ < 0,1	1,1 $\pm$ 0,1	85 $\pm$ 1,1	0,77 $\pm$ 0,02
Permeado	1,0 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ < 0,1	0,1 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,4	5 $\pm$ 1,5	0,43 $\pm$ 0,05

Tabela 11 - Valores experimentais (média $\pm$ desvio padrão) obtidos nos ensaios de ultrafiltração para anidrase carbônica (100 kDa).

Fração	Concentração de proteína (mg/mL)	Atividade AC (U/mL)	Atividade específica AC (U/mg)	Fator de purificação	Recuperação (%)
Entrada	3,1 $\pm$ 0,1	0,02 $\pm$ < 0,01	0,01 $\pm$ < 0,01	1	100
Retido	5,4 $\pm$ 0,4	0,03 $\pm$ < 0,01	0,01 $\pm$ < 0,01	1,2 $\pm$ 0,1	71 $\pm$ 3,8
Permeado	1,0 $\pm$ 0,1	0,01 $\pm$ < 0,01	0,01 $\pm$ < 0,01	0,8 $\pm$ 0,1	20 $\pm$ 2,1

Tabela 12 - Fatores de retenção e concentração (C-ficocianina, anidrase carbônica e volume) e percentual de rejeição para a membrana de 100 kDa (celulose regenerada).

Membrana	Fator de retenção (%)		Fator de concentração			Rejeição (%)	
	C-FC	AC	C-FC	AC	Volume	C-FC	AC
100 kDa	93 $\pm$ 1,1	80 $\pm$ 2,3	1,7 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,1	94 $\pm$ 1,3	71 $\pm$ 2,2

*Média de três valores $\pm$ desvio padrão.

4 CONCLUSÃO

No presente trabalho, foram utilizadas duas técnicas para purificar simultaneamente anidrase carbônica e C-ficocianina a partir de biomassa úmida de *Spirulina platensis* LEB-52. Foi possível separar e purificar simultaneamente os dois bioprodutos utilizando precipitação fracionada com sulfato de amônio. Os melhores resultados obtidos foram utilizando pH 8 e fracionamento na faixa de 0-20% / 20-50% de saturação de sulfato de amônio. Nestas condições foram obtidos fator de purificação de 347,0 vezes e recuperação de 3049% para anidrase carbônica e fator de purificação de 2,0 vezes e recuperação de 85% para C-ficocianina com um incremento na pureza do extrato de 1,13 vezes.

Não foi possível purificar simultaneamente C-ficocianina e anidrase carbônica utilizando ultrafiltração. Ao utilizar tubos Vivaspin® 15 Turbo e Vivaspin® 20 Turbo, pode-se concluir que a membrana de 50 kDa permitiu a passagem dos dois bioprodutos e a de 100 kDa reteve os dois bioprodutos devido a incrustação da membrana. Ao se utilizar membrana de 100 kDa na ultrafiltração com célula também pode-se perceber que tanto C-ficocianina quanto anidrase carbônica permaneceram na fração retida não separando os dois bioprodutos, também pode-se notar um declínio acentuado do fluxo durante o processo, o que evidencia mais uma vez a incrustação da membrana, fazendo com que estas condições não se apliquem ao processo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEWUYI, Y. G.; DESHMANE, V. G. Intensification of enzymatic hydrolysis of cellulose using high-frequency ultrasound: an investigation of the effects of process parameters on glucose yield. **Energy Fuels**, v. 29, p. 4998–5006, 2015.

ALI, S. M.; LING, T. C.; MUNYAND, S.; TAN, Y. S.; RAMAM, J.; SABARATINAN, V. Recovery and partial purification of fibrinolytic enzymes of *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc by an aqueous two-phase system. **Separation and Purification Technology**, v. 122, p. 359 - 366, 2013.

AZARKAN, M.; MOUSSAOUI, A.E.; VANWUYTSWINKEL, D.; DEHON, G.; LOOZE, Y. Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. **Journal of Chromatografer**, v. 790, p. 229–238, 2003.

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

BRASIL. ANVISA. **Decreto no 50040, de 24 de janeiro de 1961**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> 2008a. Acesso em: 11/09/2016.

BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, p. 743–756, 2013.

CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; LOHA, V.; TIA, S.; BUNNAG, B. Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp using a membrane process. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7159-7164, 2011.

CHANDRA, M.; WAHEED, A.; SINGH, R.K. Characterization of functionally active immobilized carbonic anhydrase purified from sheep blood lysates. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 231-241, 2013.

CHRISTAKI, E.; BONOS, E.; GIANNENASA, I.; FLOROU-PANERIA, P. Functional properties of carotenoids originating from algae. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 93, p. 5–11, 2013.

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, p. 603-607, 2002.

CUI, Z. Protein separation using ultrafiltration – an example of multi-scale complex systems. **China Particuology**, v. 3, p. 343-348, 2005.

Food and Drug Administration of the United States of America (FDA). **Color Additive Status List**. Disponível em: <https://www.fda.gov/ForIndustry/ColorAdditives/ColorAdditiveInventories/ucm106626.htm>, Acesso em: 23/01/2017

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.

GHOSH, R.; CUI, Z. F. Purification of lysozyme using ultrafiltration. **Biotchenology Bioengineering**, v. 68, p. 191-2003, 2000.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; SIALVE, B.; BERNET, N.; STEYER, J. P. Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of *Scenedesmus* biomass on methane production. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 610–616, 2012.

GOTTSCHALK, L.M.F.; BON, E.P.S.; NOBREG, R. Lignin peroxidase from *Streptomyces viridosporus* T7A: enzyme concentration using ultrafiltration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 147, p. 23-32, 2008.

HABERT, A. C. B.; RONALDO, N. **Processos de separação por membranas**. [S.I.]: E-papers, 2006. Disponível em: <http://www.e-papers.com.br/produtos.asp?codigo_produto=865> Acesso em: 4 de fev. 2017.

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

JESUS, C. K. C. **Reaproveitamento de meio de cultivo de *Arthrospira platensis* tratado por processos de microfiltração e ultrafiltração**. 2016. 102 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

KILIKIAN, B. V.; PESSOA JR, A. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005. 440 p.

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, p. 532-539, 2003.

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, p. 265-275, 1951.

MARSHALL, A. D.; MUNRO, P. A.; TRSGKDH, G. The effect of protein fouling in microfiltration and ultrafiltration on permeate flux, protein retention and selectivity: a literature review. **Desalination**, v.91, p. 65–108, 1993.

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

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

MOHAMED, M. A.; MAHDY, E. M. E.; GHAZY, A. M.; EL-MEZAYEN, H. A.; GHANEM, M. M. E. The activity of detoxifying enzymes in the infective juveniles of *Heterorhabditis bacteriophora* strains: Purification and characterization of two acetylcholinesterases. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 180, p. 11-22, 2016.

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

MORAES, C.C. **Extração e purificação de C-ficocianina de *Spirulina platensis***. 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2006.

NAKAMOTO, H.; HONMA, D. Interaction of a small heat shock protein with light-harvesting cyanobacterial phycocyanins under stress conditions. **FEBS Letters**, v. 580, p. 3029-3034, 2006.

OLIVER, R.L.; GRANF, G.G. **The ecology of Cyanobacteria: their diversity in time and space**. [S.I.]: Virtual Books, 2000. Disponível em: <http://www.springer.com/in/book/9780792347354>. Acesso em: 27 de jan. 2017.

ORES, J. C.; 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, p. 255-259, 2012.

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

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

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, p. 668-678, 1967.

PURWANTO, M. G. M. The role and efficiency of ammonium sulfate precipitation in purification process of papain crude extract. **Procedia Chemistry**, v. 18, p. 127-131, 2016.

RABILLER-BAUDRY, M.; LE MAUX, M.; CHAUFER, B.; BEGOIN, L. Characterisation of cleaned and fouled membrane by ATR—FTIR and EDX analysis coupled with SEM: application to UF of skimmed milk with a PES membrane. **Desalination**, v. 146, p. 123–128, 2002.

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

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, p. 73-85, 2002.

SANGHVI, A. M.; LO, Y. M. Present and potential industrial applications of macro and microalgae. **Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture**, v. 2, p. 187–194, 2010.

SALA, L. **Extração simultânea de ficobiliproteínas e anidrase carbônica, e extração seletiva de C-ficocianina**. 2017. 190 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2017.

SALA, L.; ORES, J. C.; MORAES, C.C.; KALIL, S. J. Simultaneous production of phycobiliproteins and carbonic anhydrase by *Spirulina platensis* LEB-52. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, doi: 10.1002/cjce.23131, 2018.

SCOPES, R. K. **Protein Purification: Principles and Practice**. 3 ed. New York: Springer-Verlag, 1994. 380 p.

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, p. 1419-1440, 2012.

SILVA, L. A. **Purificação de ficocianina de *Spirulina platensis* por precipitação e cromatografia de permeação em gel**. 2005. 78f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade federal do Rio Grande, Rio Grande, 2005.

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-phycoerythrin purification by precipitation from *Spirulina platensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 5-12, 2009.

SRIBALA, G.; CHENNURU, R.; MAHAPATRA, S.; VINU, R. Effect of alkaline ultrasonic pre-treatment on crystalline morphology and enzymatic hydrolysis of cellulose. **Cellulose**, v. 23, p. 1725–1740, 2016.

VINOBA, M.; BHAGIYALAKSHMI, M.; JEONG, S. K.; YOONA, Y. I. NAMA, S. C. Carbonic anhydrase conjugated to nanosilver immobilized onto mesoporous SBA – 15 for sequestration of CO₂. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 75, p. 60-67, 2012.

VON DER WEID, D.; DILLON, J. C.; FALQUET, J. Malnutrition: a silent massacre. **Geneve: Antenna Technology**, v. 1, p. 13, 2000.

WALSH, G. **Proteins: biochemistry and biotechnology**. [S.I.]: John Wiley & Sons, 2014.

WANG, H-M. D.; CHEN, C-C.; HUYNH, P.; CHANG, J-S. Exploring the potential of using algae in cosmetics. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 355–362, 2015.

YAN, S. G.; ZHU, L. P.; SU, H. N.; ZHANG, X. Y.; CHEN, X. L.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Single-step chromatography for simultaneous purification of C-phycoerythrin and allophycoerythrin with high purity and recovery from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 1-6, 2011.

ZARROUK, C. **Contribution a l'étude d'une cianophyce: Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima***. 1966. Faculte des Sciences, Universite de Paris 1966.

ZEMAN, L.J.; ZYDNEY, A.L. **Microfiltration and ultrafiltration. Principles and applications**. New York: Marcel Dekker, 1996.

ZHANG, Y.; CHEN, F. A simple method for efficient separation and purification of C-phycoerythrin and allophycoerythrin from *Spirulina platensis*. **Biotechnology Techniques**, v. 13, p. 601-603, 1999.

CAPÍTULO IV
CONCLUSÃO GERAL

4 CONCLUSÃO GERAL

Para a purificação simultânea de anidrase carbônica e C-ficocianina a partir de biomassa úmida de *Spirulina platensis* LEB-52 foram utilizados precipitação com sulfato de amônio, direta e fracionada e ultrafiltração. Tanto na precipitação direta quanto na fracionada foi possível purificar simultaneamente os dois bioprodutos, uma vez que C-ficocianina ficou na fração precipitada e anidrase carbônica na fração sobrenadante. Através de um delineamento fatorial 2^2 com pontos centrais verificou-se que para se alcançar um maior fator de purificação para anidrase carbônica e C-ficocianina deve-se utilizar pH 8 e saturação de 60%, obtendo-se dessa maneira anidrase carbônica e C-ficocianina com fator de purificação de 572,2 vezes e 2,6 vezes, respectivamente, valores esses associados a uma elevada recuperação, 90% e 3233% para C-ficocianina e anidrase carbônica. Além disso, C-ficocianina apresentou pureza de grau alimentar (0,71). A influência que o sal sulfato de amônio exerce sobre a anidrase carbônica também foi estudada, concluindo-se que a atividade da enzima (U/mL) aumenta conforme o incremento na concentração de sal.

Utilizando precipitação fracionada com sulfato de amônio verificou-se que para purificação simultânea dos dois bioprodutos os melhores resultados obtidos foram utilizando pH 8 e fracionamento na faixa de 0-20% / 20-50% de saturação de sulfato de amônio. Nestas condições foram obtidos fator de purificação de 347,0 vezes e recuperação de 3049% para anidrase carbônica e fator de purificação de 2,0 vezes e recuperação de 85% para C-ficocianina com pureza de 0,75.

Não foi possível purificar simultaneamente C-ficocianina e anidrase carbônica utilizando ultrafiltração. Ao utilizar tubos Vivaspin® 15 Turbo, pode-se concluir que a membrana de 50 kDa permitiu a passagem dos dois bioprodutos e a de 100 kDa reteve os dois bioprodutos devido a incrustação da membrana. Ao se utilizar membrana de 100 kDa na ultrafiltração com célula também pode-se perceber que tanto C-ficocianina quanto anidrase carbônica permaneceram na fração retida, fazendo com que estas condições não se apliquem ao processo.

5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar diferentes técnicas para a separação e purificação de C-ficocianina e anidrase carbônica a partir de biomassa úmida de *Spirulina platensis* LEB-52 que proporcione extrato com maior pureza.
- Caracterizar a biomassa residual obtida após a extração com o ultrassom.
- Estudar a captura enzimática do CO₂ utilizando a anidrase carbônica purificada por precipitação com sulfato de amônio extraída da biomassa de *Spirulina platensis*.
- Estudar a estabilidade da anidrase carbônica extraída da biomassa de *Spirulina platensis*.

CAPÍTULO V
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABALDE, J.; BETANCOURT, L.; TORRES, E.; CID, A.; BARWELL, C. Purification and characterization of phycocyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. **Plant Science**, v. 136, p. 109-120, 1998.
- ADEWUYI, Y. G.; DESHMANE, V. G. Intensification of enzymatic hydrolysis of cellulose using high-frequency ultrasound: an investigation of the effects of process parameters on glucose yield. **Energy Fuels**, v. 29, p. 4998–5006, 2015.
- AIKAWA, S.; IZUMI, Y.; MATSUDA, F.; HASUNUMA, T.; CHANG, J. S.; KONDO, A. Synergistic enhancement of glycogen production in *Arthrospira platensis* by optimization of light intensity and nitrate supply. **Bioresource Technology**, v. 108, p. 211–215, 2012.
- ALI, S. M.; LING, T. C.; MUNYAND, S.; TAN, Y. S.; RAMAM, J.; SABARATINAN, V. Recovery and partial purification of fibrinolytic enzymes of *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc by an aqueous two-phase system. **Separation and Purification Technology**, v. 122, p. 359 - 366, 2013.
- AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. Propriedades de saúde de *Spirulina* spp. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, p. 109-117, 2008.
- 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.
- ARIEDE, M. B.; CANDIDO, T. M.; JACOME, A. L. M.; VELASCO, M. V. R.; CARVALHO, J. C. M.; BABY, A. R. Cosmetic attributes of algae – A review. **Algal Research**, v. 25, p. 483-487, 2017.
- AZARKAN, M.; MOUSSAOUI, A.E.; VANWUYTSWINKEL, D.; DEHON, G.; LOOZE, Y. Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. **Journal of Chromatography**, v. 790, p. 229–238, 2003.
- BADGER, M. R.; PRICE, G. D. The CO₂ concentrating mechanism in cyanobacteria and microalgae. **Physiologia Plantarum**, v. 84, 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.
- BARROW, C.; SHAHIDI, F. **Marine nutraceuticals and functional foods**. 1 ed. Flórida: CRC Press, 2008. 512 p.
- BENEMANN, J. R. Microalgae products and production: an overview. **Developments in Industrial Microbiology**, v. 31, p. 247-256, 1990.
- BENNETT, A.; BOGORAD, L. Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **The Journal of Cell Biology**, v. 58, p. 419-435, 1973.

BERMEJO, R.; ALVÁREZ-PEZ, J. M.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F. G.; MOLINA GRIMA, E. Recovery of pure B – phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. **Journal of Biotechnology**, v. 93, p. 73-85, 2002.

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 and Fuels**, v. 15, p. 309-316, 2001.

BHAT, V. D.; MADYASTHA, K. M. Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: protection against oxidative damage to DNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, p. 262-266, 2001.

BRAGA, A. R. C.; LEMES, A. C.; KALIL, S. J. Single chromatographic step for β -galactosidase purification: influence of salt and elution parameters. **Separation Science and Technology**, v. 49, p. 1817-1824, 2014.

BRASIL. ANVISA. **Decreto no 50040, de 24 de janeiro de 1961**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> 2008a. Acesso em: 11/09/2016.

BOGORAD, L. Phycobiliproteins and complementary chromatic adaptation. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 26, p. 369-401, 1975.

BROCK, T. D.; MADIGAN, H. T. **Biology of Microorganism**. 6. ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1991, 523p.

BOROWITZKA, M. A. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, p. 743–756, 2013.

BUYEL, J.F.; GRUCHOW, H.M.; BOES, A.; FISCHER, R. Rational design of a host cell protein heat precipitation step simplifies the subsequent purification of recombinant proteins from tobacco. **Biochemical Engineering Journal**, v. 88, p. 162-170, 2014.

CARTER, M. J; PARSONS, D.S. The purification and properties of carbonic anhydrases from guinea-pig erythrocytes and mucosae of the gastrointestinal tracto. **Biochemistry Journal**, v.120, p. 797–808, 1970.

CHAIKLAHAN, R.; CHIRASUWAN, N.; LOHA, V.; TIA, S.; BUNNAG, B. Separation and purification of phycocyanin from *Spirulina* sp using a membrane process. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7159-7164, 2011.

CHANDRA, M.; WAHEED, A.; SINGH, R.K. Characterization of functionally active immobilized carbonic anhydrase purified from sheep blood lysates. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 231-241, 2013.

CHEAH, W.Y.; SHOW, P.L.; CHANG, J.S.; LING, T.C.; JUAN, J.C. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 190–201, 2015.

- CHEN, C.; KAO, P.; TAN, C. H.; SHOW, P. L.; CHEAH, W. Y.; LEE, W. L.; LING, T. C.; CHANG, J. Using an innovative pH-stat CO₂ feeding strategy to enhance cell growth and C-phycocyanin production from *Spirulina platensis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, p. 78-85, 2016.
- CHRISTAKI, E.; BONOS, E.; GIANNENASA, I.; FLOROU-PANERIA, P. Functional properties of carotenoids originating from algae. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 93, p. 5–11, 2013.
- CHRISTENSON, L.; SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. **Biotechnology**, v. 29, p. 686–702, 2011.
- CHUNTAPA, B.; POWTONGSOOK, S.; MENASVETA, P. Water quality control using *Spirulina platensis* in shrimp culture tanks. **Aquaculture**, v. 220, p. 355–66, 2003.
- COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1489-1493, 2007.
- CONVERTI, C.; LODI, A.; BORGHI, A. D.; SOLISIO, C. Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift-tubular reactor system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 13-18, 2006.
- 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, p. 603-607, 2002.
- CUI, Z. Protein separation using ultrafiltration – an example of multi-scale complex systems. **China Particuology**, v. 3, p. 343-348, 2005.
- CUTLER, P. **Protein purification protocols**. New Jersey: Humana Press, 2004.
- DARNON, E.; MORIN, E.; BELLEVILLE, M. P.; RIOS, G. M. Ultrafiltration within downstream processing: some process design considerations. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 42, p. 299-309, 2003.
- DAVY, R. Development of catalysts for fast, energy efficient post combustion capture of CO₂ into water; one alternative to monoethanolamine (MEA) solvents. **Energy Procedia**, v. 1, p. 885-892, 2009.
- DEMIR, N.; DEMIR, Y.; BAKAN, E. A different structural feature for carbonic anhydrases in human erythrocytes. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 27, p. 279–87, 1997.
- DEMIR, Y.; NADAROG˘LU, H.; DEMIR, N. Purification and characterization of carbonic anhydrase from bovine stomach and effects of some known inhibitors on enzyme activity. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 75–80, 2005.
- DENG, R.; CHOW, T. Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae *Spirulina*. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 28, p. 33-45, 2010.

DERNER, R. B. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muellei* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados**. 2006. 139 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - 2006.

DESMORIEUX, H.; DECAEN, N. Convective drying of *Spirulina* in thin layer. **Journal of Food Engineering**, v. 66, p. 497–503, 2005.

DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature**, v. 3, p. 380- 387, 2003.

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

FAKAS, S.; PAPANIKOLAOU, S.; BATSOS, A.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; MALLOUCHOS, A.; AGGELIS, G. Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*. **Biomass & Bioenergy**, v. 33, p. 573–580, 2009.

Food and Drug Administration of the United States of America (FDA). **Color Additive Status List**. Disponível em:
<https://www.fda.gov/ForIndustry/ColorAdditives/ColorAdditiveInventories/ucm106626.htm>,
 Acesso em: 23/01/2017

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.

FIGUEROA, J. D.; FOUT, T.; PLASYNSKI, S.; MCILVRIED, H.; SRIVASTAVA, R. D. Advances in CO₂ capture technology – The U. S. Department of Energy's Carbon Sequestration Program. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 2, p. 9-20, 2008.

FISCHER, R.; SCHILLBERG, S.; HELLWIG, S.; TWYMAN, R.M.; DROSSARD, J. GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins. **Biotechnology**, v. 30, p. 434-439, 2012.

GECHELE, E.; SCHILLBERG, S.; MERLIN, M.; PEZZOTTI, M.; AVESANI, L. A downstream process allowing the efficient isolation of a recombinant amphiphilic protein from tobacco leaves. **Journal of Chromatography**, v. 960, p. 34-42, 2014.

GHOSH, R.; CUI, Z. F. Purification of lysozyme using ultrafiltration. **Biotchnology Bioengineering**, v. 68, p. 191-2003, 2000.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C.; SIALVE, B.; BERNET, N.; STEYER, J. P. Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of *Scenedesmus* biomass on methane production. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 610–616, 2012.

GOTTSCHALK, L.M.F.; BON, E.P.S.; NOBREG, R. Lignin peroxidase from *Streptomyces viridosporus* T7A: enzyme concentration using ultrafiltration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 147, p. 23-32, 2008.

GULER, O. O.; CAPASSO, C.; SUPURAN, C.T. A magnificent enzyme superfamily: carbonic anhydrases, their purification and characterization. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, C.T. v. 1, p. 1-6, 2015.

HABERT, A. C. B.; RONALDO, N. **Processos de separação por membranas**. [S.I.]: E-papers, 2006. Disponível em: http://www.e-papers.com.br/produtos.asp?codigo_produto=865. Acesso em: 4 de fev. 2017.

HALL, G. E.; SCHRAER, R. Characterization of a high activity carbonic anhydrase isozyme purified from erythrocytes of *Salmo gairdneri*. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v.75, p. 81–92, 1983.

HENRIKSON, R. **Microalga *Spirulina*: Superalimento del futuro**. Barcelona: Ediciones S. A. Urano, 1994.

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, p. 345-351, 1995.

HOEK, V. D.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: an introduction to phycology**. 1 ed. United Kingdom: Cambridge University Press, 1995. 640 p.

LANG, S.; XUEMING, L.; CHEN, F.; CHEN, Z. Current microalgal health food RandD activities in China. **Hydrobiologia**, v. 512, p. 45-8, 2004.

ILIES, M. A.; BANCIU, M. D.; ILIES, M.; CHIRALEU, F.; BRIGANTI, F.; SCOZZAFAVA, A.; SUPURAN, C. T. Carbonic anhydrase activators. Part 17. Syntesis and activation study of a series of 1-(1,2,4-triazole-(1H)-3-yl)-2,4,6-trisubstituted-pyridinium salts against isozymes I, II and IV. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 32, p. 911-918, 1997.

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

JESPERSEN, L.; STROMDAHL, L. D.; OLSEN, K.; SKIBSTED, L. H. Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. **European Food Research and Technology**, v. 220, p. 261-266, 2005.

JESUS, C. K. C. **Reaproveitamento de meio de cultivo de *Arthrospira platensis* tratado por processos de microfiltração e ultrafiltração**. 2016. 102 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

JUNG, K, A.; LIM, S.; KIM, Y.; PARK, J. M. Potentials of macroalgae as feedstocks for biorefinery. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 182–90, 2013.

KANNAUJIYA, V. K.; SINHA, R. P. An efficient method for the separation and purification of phycobiliproteins from a rice-field cyanobacterium *Nostoc* sp. strain HKAR-11. **Chromatographia**, v. 79, p. 335-343, 2016.

KARLSSON, J.; HILTONEN, T.; DAVID HUSIC', H.; RAMAZANOV, Z.; SAMUELSSON, C. Intracellular carbonic anhydrase of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiology**, v. 109, p. 533-539, 1995.

KATO, T. Utilization of blue pigments from *Spirulina* particular for frozen desserts and drinks. **New Food Industry**, v.29, p. 17-21, 1987.

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, p. 2561-2573, 1971.

KILIKIAN, B. V.; PESSOA JR, A. **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005. 440 p.

KING, D.; INDERWILDI, O. R.; WILLIAMS, A. The future of industrial biorefineries. In: WORLD ECONOMIC FORUM, 2010, Suíça. Disponível em: <https://energiatalgud.ee/img_auth.php/f/fa/World_Economic_Forum_The_Future_of_Industrial_Biorefineries_2010.pdf> Acesso em: 02 de Dez. 2017. Suíça: VIRTUAL BOOKS, 2010.

KUDDUS, M.; SINGH, P.; THOMAS, G.; AL-HAZIMI, A. Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycocyanin. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 3, p.491-512, 2013.

KUMAR, D.; DHAR, D. W.; PABBI, S.; KUMAR, N.; WALIA, S. Extraction and purification of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* (CCC540). **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 19, p. 184-188, 2014.

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, p. 532-539, 2003.

KWAK, H.S.; KIM, J.Y.H.; WOO, H.M.; JIN, E.; MIN, B.K.; SIM, S.J. Synergistic effect of multiple stress conditions for improving microalgal lipid production. **Algal Research**, v. 19, p. 215–224, 2016

KYADARI, M.; FATMA, T.; AZAD, R.; VELPANDIAN, T. Evaluation of antiangiogenic and antiproliferative potential of the organic extract of green algae *Chlorella pyrenoidosa*. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 45, p. 569, 2013.

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-phycocyanin on the lung cancer A549 cells in vitro and in vivo. **European Journal of Pharmacology**, v. 749, p. 107-114, 2015.

LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, p. 1-11, 2012.

LING, T. C.; LOONG, C. K.; TAN, W. S.; TEY, B. T.; ABDULLANH, W. M. W.; ARIFF, A. Purification of filamentous bacteriophage M13 by expanded bed anion exchange chromatography. **The Journal of Microbiology**, v. 42, p. 228-232, 2004.

LOJEWSKA, E.; KOWALCZYK, T.; OLEJNICZAK, S.; SAKOWICZ, T. Extraction and purification methods in downstream processing of plant-based recombinant proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 120, p. 110-117, 2015.

LOW, D.; O'LEARY, R.; PUJAR, N.S. Future of antibody purification. **Journal of Chromatography B**, v. 848, p. 48-63, 2007.

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, p. 265-275, 1951.

MARKOU, G.; VANDAMME, D.; MUYLAERT, K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: the supply of nutrients. **Water Research**, v. 65, p. 186–202, 2014.

MARSHALL, A. D.; MUNRO, P. A.; TRSGKDH, G. The effect of protein fouling in microfiltration and ultrafiltration on permeate flux, protein retention and selectivity: a literature review. **Desalination**, v.91, p. 65–108, 1993.

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

METCALF; EDDY. **Water reuse: issues, technologies and applications**. 1. ed. McGraw-Hill, 2007. 1569 p.

MILANO, J.; ONG, H.C.; MASJUKI, H.; CHONG, W.; LAM, M.K.; LOH, P.K.; VELLAYAN, V. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. **Renewable Sustainable Energy**, v. 58, p. 180–197, 2016.

MINKOVA, K. M.; TCHERNOV, A. A.; TCHORBADJIEVA, M. I.; FOURNADJIEVA, S. T.; ANTOVA, R. E.; BUSHEVA, M. C. Purification of C-phycoerythrin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*. **Journal of Biotechnology**, v. 116, p. 55-59, 2003.

MINKOVA, K. K.; TCHORBADJIEVA, M.; TCHERNOV, A.; STOJANOVA, M.; GIGOVA, L.; BUSHEVA, M. Improved procedure for separation and purification of *Arthronema africanum* phycobiliproteins. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 647–651, 2007.

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

MOHAMED, M. A.; MAHDY, E. M. E.; GHAZY, A. M.; EL-MEZAYEN, H. A.; GHANEM, M. M. E. The activity of detoxifying enzymes in the infective juveniles of *Heterorhabditis bacteriophora* strains: Purification and characterization of two acetylcholinesterases. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 180, p. 11-22, 2016.

MORAES, C. C.; BURKERT, J. F. D.; KALIL, S. J. C-phycoerythrin 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- phycoerythrin extract. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5312-5317, Nov 2009.

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

MORAES, C.C. **Extração e purificação de C-ficocianina de *Spirulina platensis***. 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2006.

MULITERNO, A.; MOSELE, P. C.; COSTA, J. A. V.; HEMKEMEIER, M.; BERTOLIN, T. E; COLLA, L. M. Cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* em batelada alimentada. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 1132-1138, 2005.

NAKAMOTO, H.; HONMA, D. Interaction of a small heat shock protein with light-harvesting cyanobacterial phycoerythrins under stress conditions. **FEBS Letters**, v. 580, p. 3029-3034, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.

OLIVEIRA T. F. de. **Tratamento de água para abastecimento público por sistema de separação por membrana de ultrafiltração: Estudo de caso na ETA Alto da Boa Vista**. 2010. 95f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

OLIVER, R.L.; GRANF, G.G. **The ecology of Cyanobacteria: their diversity in time and space**. [S.I.]: Virtual Books, 2000. Disponível em: <http://www.springer.com/in/book/9780792347354>. Acesso em: 27 de jan. 2017.

ONCEL, S.; SUKAN, F. V. Comparison of two different pneumatically mixed column photobioreactors for the cultivation of *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*). **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4755-4760, 2007.

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

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.; 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, p. 255-259, 2012.
- PAN, I. H.; YAO, H. J.; LI, Y. K. Effective extraction and purification of β -xylosidase from *Trichoderma koningii* fermentation culture by aqueous two-phase partitioning. **Enzyme Microbial Technology**, v. 28, p. 196-201, 2001.
- PANDA, T.; GOWRISHANKAR, B. Production and applications of esterases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 160-169, 2005.
- PATEL, A.; MISHRA, S.; PAWAR, R.; GHOSH, P. K.; Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. **Protein Expression and Purification**, v. 40, p. 248-255, 2005.
- PATEL, A.; PAWAR R.; MISHRA S.; SONAWANE, S.; GHOSH, P. K. Kinetic studies on thermal denaturation of C-phycocyanin. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 41, p. 254-257, 2004.
- PATIL, G.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Aqueous two phase extraction for purification of C-phycocyanin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 156–164, 2007.
- PATIL, G.; CHETHANA, S.; SRIDEVI, A. S.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Method to obtain C-phycocyanin of high purity. **Journal of Chromatography A**, v. 1127, p. 76–81, 2006.
- PEEVA, P. D.; KNOCH, T.; PIEPER, T.; ULBRICHT, M. Cross-flow ultrafiltration of protein solutions through unmodified and surface functionalized polyethersulfone membranes - Effect of process conditions on separation performance. **Separation and Purification Technology**, v. 92, p. 83-92, 2012.
- PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S. KRIEG, N. R. **Microbiology: concepts and applications**. São Paulo: MacGraw-Hill Ltda, 1993.
- PELIZER, I. H.; DANESI, E. D.; RANGEL, C. O.; SASSANO C. E. N.; CARVALHO J. C. M.; SATO, S.; MORAES, I. O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 371-375, 2003.
- 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, p. 668-678, 1967.
- PURWANTO, M. G. M. The role and efficiency of ammonium sulfate precipitation in purification process of papain crude extract. **Procedia Chemistry**, v. 18, p. 127-131, 2016.
- RABILLER-BAUDRY, M.; LE MAUX, M.; CHAUFER, B.; BEGOIN, L. Characterisation of cleaned and fouled membrane by ATR—FTIR and EDX analysis coupled with SEM: application to UF of skimmed milk with a PES membrane. **Desalination**, v. 146, p. 123–128, 2002.

- 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 and Biotechnology**, v. 25, p. 981-987, 2009.
- RANGEL-YAGUI, C. O.; DANESI, E. D. G.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 133-141, 2004.
- REDDY, M. J.; SUBHASHINI, 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, p. 385-392, 2003.
- RIMBAU, V.; CAMINS, A.; ROMAY, C.; GONZALEZ, R.; PALLAS, M. Protective effects of C-phycocyanin against kainic acid induced neuronal damage in rat hippocampus. **Neuroscience Letters**, v. 276, p. 75-78, 1999.
- RITO-PALOMARES, M.; NUNEZ, L.; AMADOR, D. Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for C-phycocyanin recovery from *Spirulina maxima*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 76, p. 1273-1280, 2001.
- ROBERTSON, R.C.; GUIHÉNEUF, F.; BAHAR, B.; SCHMID, M.; STENGEL, D.B.; FITZGERALD, G.F.; ROSS, R.P.; STANTON, C.; The anti-inflammatory effect of algae-derived lipid extracts on lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human THP-1 macrophages. **Marine Drugs**, v. 13, p. 5402–5424, 2015.
- RODA-SERRAT, M.C.; CHRISTENSEN, K.V.; EL-HOURI, R.B.; FRETTE, X.; CHRISTENSEN, L.P. Fast cleavage of phycocyanobilin from phycocyanin for use in food colouring. **Food Chemistry**, doi: 10.1016/j.foodchem.2017.07.149, 2017.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor, 2009. 326 p.
- ROCHA, F. D.; PEREIRA, R. C.; KAPLAN, M. A. C.; TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 631-639, 2007.
- ROE, S. **Protein Purification Techniques**. New York: Oxford University Press, 2001.
- 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, p. 73-85, 2002.
- SANGHVI, A. M.; LO, Y. M. Present and potential industrial applications of macro and microalgae. **Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture**, v. 2, p. 187–194, 2010.

SALA, L. **Extração simultânea de ficobiliproteínas e anidrase carbônica, e extração seletiva de C-ficocianina**. 2017. 190 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2017.

SALA, L.; ORES, J. C.; MORAES, C.C.; KALIL, S. J. Simultaneous production of phycobiliproteins and carbonic anhydrase by *Spirulina platensis* LEB-52. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, doi: 10.1002/cjce.23131, 2018.

SANTIAGO-SANTOS, M. C.; PONCE-NOYOLA, T.; OLIVEIRA-RAMÍREZ, R.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O. Extraction and purification of phycocyanin from *Calotrix* sp. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2047-2052, 2004.

SANTOS, R. C. **Influência da temperatura, iluminância e taxa de aeração na concentração de biomassa da cianobactéria *Spirulina platensis***. 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

SAXENA, A.; TRIPATHI, B. P.; KUMAR, M.; SHAHI, V. K. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: an overview. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, p. 1-22, 2009.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001.

SCOPES, R. K. **Protein Purification: Principles and Practice**. 3 ed. New York: Springer-Verlag, 1994. 380 p.

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

SENTHILKUMAR, N.; SURESH, V.; THANGAM, R.; KURINJIMALAR, C.; KAVITHA, G.; MURUGAN, P.; KANNAN, S.; RENGASAMY, R. Isolation and characterization of macromolecular protein R-phycoerythrin from *Portieria hornemannii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 55, p. 150-160, 2013.

SHANAB, S.M.; MOSTAFA, S.S.; SHALABY, E.A.; MAHMOUD, G.I. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, p. 608–615, 2012.

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, 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, p. 1419-1440, 2012.

SHIMAMATZU, H. Mass production of *Spirulina*, and edible microalga. **Hydrobiology**, v. 512, p. 39-44, 2004.

SILVA, L. A. **Purificação de ficocianina de *Spirulina platensis* por precipitação e cromatografia de permeação em gel**. 2005. 78f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade federal do Rio Grande, Rio Grande, 2005.

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.; 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, p. 477-482, 2008.

SINGH, S.; BHUSHAN, K. N.; BANERJEE, U. C. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, p. 73–95, 2005.

SJORS, V. I.; ALESSANDRO, F. **Algae based biofuels, applications and coproducts**.

[S.I.]: Virtual Books, 2010. Disponível em:

<http://www.fao.org/docrep/012/i1704e/i1704e.pdf>. Acesso em: 10 de nov. 2017.

SMITH, K.; FERRY, J. G. A plant-type (beta-class) carbonic anhydrase in the thermophilic methanobacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, 6247-6253, 1999.

SOLEY INSTITUTE. **C-phycocyanin** price. Disponível em: <http://www.soleybio.com/c-phycocyanin.html> Acesso em: 19 de dezembro de 2017.

SONANI, R.R.; RASTOGI, R. P.; PATEL, R.; MADAMWAR, D. Recent advances in production, purification and applications of phycobiliproteins. **World Journal of Biological Chemistry**, v.7, p. 100-109, 2016.

SONG, W.; ZHAO, C.; WANG, S. A large-scale preparation method of high purity C- phycocyanin. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 3, p. 293-297, 2013.

SONI, B.; KALAWADIA, B.; TRIVEDI, U.; MADAMWAR, D. Extraction, purification and characterization of phycocyanin from *Oscillatoria quadripunctulata* – isolated from the rocky shores of Bet Dwarka, Gurajat, India. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2017-2023, 2006.

SONI, B.; VISAVADIYA, N. P.; MADAMWAR, D. Attenuation of diabetic complications by C-phycoerythrin in rats: antioxidant activity of C-phycoerythrin including copper-induced lipoprotein and serum oxidation. **British Journal of Nutrition**, v. 102, p. 102–109, 2009.

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

SRIBALA, G.; CHENNURU, R.; MAHAPATRA, S.; VINU, R. Effect of alkaline ultrasonic pre-treatment on crystalline morphology and enzymatic hydrolysis of cellulose. **Cellulose**, v. 23, p. 1725–1740, 2016.

STEPHENSON, P. G.; MOORE, C. M.; TERRY, M. J.; ZUBKOV, M. V.; BIBBY, T. S. Improving photosynthesis for algal biofuels: toward a green revolution. **Trends in Biotechnology**, v. 29, p. 15–23, 2011.

STOLZ, P.; OBERMAYER, B. Manufacturing microalgae for skin care. **Cosmetics Toiletries**, v. 120, p. 99–106, 2005.

SUBHADRA, B.; GRINSON-GEORGE. Algal biorefinery-based industry: an approach to address fuel and food insecurity for a carbon-smart world. **Journal of the Science Food Agriculture**, v. 91, p. 2–13, 2011.

SUGANYA, T.; VARMAN, M.; MASJUKY, H. H.; RENGANATHAN, S. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 909–941, 2015.

SUPURAN, C.T. Carbonic anhydrases: from biomedical applications of the inhibitors and activators to biotechnologic use for CO₂ capture. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 28, p. 229–30 2013.

SUPURAN, C. T. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, p. 168–81, 2008.

SUPURAN, C. T. Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 27, p. 759–72, 2012.

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 the bioremediation processes**. [S.I.]: Water Research Commission, 2003. Disponivel em: http://www.wrc.org.za/Pages/DisplayItem.aspx?ItemID=7719&FromURL=%2FPages%2FKH_ResearchReport.aspx%3Fdt%3D1%26ms%3D20%3B%26d%3DDevelopment+of+integrated+biosorption+systems+for+the+removal+and%2For+recovery+of+heavy+metals+from+mining+and+other+industrial+wastewaters+and+determination+of+the+toxicity+of+metals+to+bioremediation+processes%26start%3D1580. Acesso em: 02 de março 2017.

VANTHOOR-KOOPMANS, M.; WIJFFELS, R.H.; BARBOSA, M.J.; EPPINK, M.H.M. Biorefinery of microalgae for food and fuel. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 142–149, 2013.

VERPOORTER, J. A.; MEHT, S.; EDSALL, J. T. Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 242, p. 4221–4229, 1967.

VINOBA, M.; BHAGIYALAKSHMI, M.; JEONG, S. K.; YOONA, Y. I. NAMA, S. C. Carbonic anhydrase conjugated to nanosilver immobilized onto mesoporous SBA – 15 for sequestration of CO₂. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 75, p. 60-67, 2012.

VON DER WEID, D.; DILLON, J. C.; FALQUET, J. Malnutrition: a silent massacre. **Geneve: Antenna Technology**, v. 1, p. 13, 2000.

VONSHAK, A. ***Spirulina platensis (Arthrospira) - Physiology, cell biology and biotechnology***. [S.I.]: CRC Press, 1997.

WALSH, G. **Proteins: biochemistry and biotechnology**. [S.I.]: John Wiley & Sons, 2014.

WALTZ, E. Biotech's green gold? **Nature Biotechnology**, v. 27, p. 15–8, 2009.

WANG, H-M. D.; CHEN, C-C.; HUYNH, P.; CHANG, J-S. Exploring the potential of using algae in cosmetics. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 355–362, 2015.

WEHR, J. D.; SHEATH, R.G. **Freshwater habitats for algae**. London: Academic Press, 2015.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. **Evolution**, v. 74, p. 5088-5090, 1977.

YAN, S. G.; ZHU, L. P.; SU, H. N.; ZHANG, X. Y.; CHEN, X. L.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Single-step chromatography for simultaneous purification of C-phycocyanin and allophycocyanin with high purity and recovery from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 1-6, 2011.

YEH, K-L.; CHANG, J-S. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. **Bioresource Technology**, v. 105, p. 120–127, 2012.

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

ZEMAN, L.J.; ZYDNEY, A.L. **Microfiltration and ultrafiltration. Principles and applications**. New York: Marcel Dekker, 1996.

ZHANG, J.; FANG, X.; ZHU, X-L.; LI, Y.; XU, H-P.; ZHAO, B-F.; CHEN, L.; ZHANG, X-D. Microbial lipid production by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus* O₃ grown in fed-batch culture. **Biomass & Bioenergy**, v. 35, p. 1906–1911, 2011.

ZHANG, Y.; CHEN, F. A simple method for efficient separation and purification of C-phycocyanin and allophycocyanin from *Spirulina platensis*. **Biotechnology Techniques**, v. 13, p. 601-603, 1999.

ZHOU, Q.; ZHANG, P.; ZHANG, G.; PENG, M. Biomass and pigments production in photosynthetic bacteria wastewater treatment: effects of photoperiod. **Bioresource Technology**, v. 190, p. 196–200, 2015.

ZUÑIGA, A. D. G.; PEREIRA, J. A. M.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; ROJAS, E. E. G. Técnicas usadas no processo de purificação de biomoléculas. **CEPPA**, v. 21, p. 61-82, 2003.

