



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**RUBIELLE SILVA DOS SANTOS**

**EXTRAÇÃO POR ULTRASSOM DE FICOBILIPROTEÍNAS DE *Spirulina platensis*  
UTILIZANDO LÍQUIDOS IÔNICOS DE COLINA**

**FORTALEZA – CE  
2023**

RUBIELLE SILVA DOS SANTOS

EXTRAÇÃO POR ULTRASSOM DE FICOBILIPROTEÍNAS DE *Spirulina platensis*  
UTILIZANDO LÍQUIDOS IÔNICOS DE COLINA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Química do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha.

FORTALEZA – CE  
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S238e Santos, Rubielle Silva dos.

Extração por ultrassom de ficobiliproteínas de *Spirulina platensis* utilizando líquidos iônicos de colina / Rubielle Silva dos Santos. – 2023.  
62 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Curso de Engenharia Química, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha.

1. Microalga. 2. Ficobiliproteínas. 3. *Spirulina (Arthrospira) platensis*. 4. Ultrassom. 5. Líquidos iônico. I. Título.

CDD 660

---

RUBIELLE SILVA DOS SANTOS

EXTRAÇÃO POR ULTRASSOM DE FICOBILIPROTEÍNAS DE *Spirulina platensis*  
UTILIZANDO LÍQUIDOS IÔNICOS DE COLINA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia Química do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Aprovado em: 13/07/2023.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Daniel Vasconcelos Gonçalves  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Carla Luzia Borges Reis  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Ao meu esposo e minha filha.

Aos meus pais e irmão.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, porque Nele vivemos, nos movemos e existimos. E me mostrou em cada situação que estava ao meu lado me dando forças pra continuar.

Ao meu esposo Thalisson, que sempre fez o possível pra me ajudar e me animar nos momentos em que eu não tinha mais forças. E pela nossa filha Agatha que nascerá em breve.

Aos meus pais, Adalberto e Arionete, e meu irmão, Adonai, que me ajudaram de muitas formas durante esse tempo. Pelos ensinamentos e puxões de orelha; não somos perfeitos, mas o cuidado um com o outro nunca faltou.

Aos meus amigos pelas orações e por fazerem a caminhada mais leve.

Às amigadas que a engenharia química me deu, Heslen, Edneide e Bárbara, pelo companheirismo em cada etapa.

À professora Valderez que de forma tão gentil e atenciosa atendeu meu pedido pra ser minha orientadora, fornecendo todo suporte possível neste trabalho.

À Carla, também pela disponibilidade, gentileza e conhecimentos passados a mim.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente na minha formação, meu muito obrigada.

Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.

Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou;

Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de edificar;

Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de dançar;

Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar;

Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora;

Tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de falar;

Tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz.

## RESUMO

Ficobiliproteínas são corantes naturais, ou ainda, pigmentos fotossintetizantes, um grupo de cromoproteínas presentes em cianobactérias como em micro algas azul-esverdeadas ou vermelhas. E devido ao seu alto potencial biotecnológico, tem ganhado destaque nas áreas farmacêutica e nutracêutica, bem como, em pesquisas e análises biomédicas e nas indústrias de alimentos e de cosméticos. Dentre as principais ficobiliproteínas existentes, a principal é a ficocianina, estando presentes também a aloficocianina e ficoeritrina em menor quantidade. Além disso, suas propriedades cromóforas, antioxidantes, anticancerígenas e anti-inflamatórias chamam atenção frente ao corrente uso de corantes alimentares sintéticos com potencial tóxico e carcinogênico. A extração dessas proteínas pode ser feita por maceração, micro-ondas, turbo-extração e ultrassom. Neste ponto, a escolha do método de extração e do solvente utilizados, são variáveis importantes a serem consideradas. Para este trabalho, foi utilizado o método de extração por ultrassom e como solventes, os líquidos iônicos de colina (bissulfato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio, acetato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio, hidróxido de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio e citrato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio) foram empregados, avaliando a viabilidade dos LIs de colina e seu desempenho em comparação ao do tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) que é o tampão tipicamente utilizado para a extração de ficobiliproteínas. Foram analisados a concentração, a produtividade, o rendimento e os potenciais antioxidantes das ficobiliproteínas extraídas. Verificou-se também que os LIs de colina escolhidos não apresentaram bom desempenho na extração de ficobiliproteínas, se comparado ao tampão fosfato de sódio. Apesar disso, pode-se observar que menores tempos de extração são necessários, pois os valores de concentração para 60 min de extração, na maioria das vezes, atingiram o máximo de concentração, além de verificar-se que, possivelmente, valores pH próximos da neutralidade devem fornecer condições melhores para as extrações. Nas análises dos produtos obtidos, apenas as ficobiliproteínas extraídas com LI de acetato apresentaram atividade antioxidante e, ainda assim, com valores menores que os valores resultantes da extração com tampão.

**Palavras-chave:** Microalga. Ficobiliproteínas. *Spirulina (Arthrospira) platensis*. Ultrassom. Líquidos iônicos.

## ABSTRACT

Phycobiliproteins are natural dyes, or even photosynthetic pigments, a group of chromoproteins present in cyanobacteria such as blue-green or red microalgae. And due to its high biotechnological potential, it has gained prominence in the pharmaceutical and nutraceutical areas, as well as in biomedical research and analysis and in the food and cosmetics industries. Among the main existing phycobiliproteins, the main one is phycocyanin, with allophycocyanin and phycoerythrin also being present in smaller amounts. In addition, its chromophore, antioxidant, anticancer and anti-inflammatory properties draw attention to the current use of synthetic food dyes with toxic and carcinogenic potential. The extraction of these proteins can be done by maceration, microwave, turbo-extraction and ultrasound. At this point, the choice of extraction method and solvent used are important variables to be considered. For this work, the method of extraction by ultrasound was used and as solvents, ionic liquids of choline ((2-hydroxyethyl)-trimethylammonium bisulfate, (2-hydroxyethyl)-trimethylammonium acetate, (2-hydroxyethyl)-trimethylammonium and (2-hydroxyethyl)-trimethylammonium citrate) were employed, evaluating the viability of choline ILs and their performance compared to sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) which is the buffer typically used for the extraction of phycobiliproteins. The concentration, productivity, yield and antioxidant potential of the extracted phycobiliproteins were analyzed. Although the results were not good, some important questions could be verified and presented in this study. Despite this, it can be observed that shorter extraction times are necessary, since the concentration values for 60 min of extraction, in most cases, reached the maximum concentration, in addition to verifying that, possibly, pH values close to the neutrality should provide better conditions for extractions. It was also verified that the chosen choline ILs did not perform well in the extraction of phycobiliproteins, when compared to the sodium phosphate buffer. In the analyzes of the products obtained, only the phycobiliproteins extracted with acetate LI showed antioxidant activity and, even so, with values lower than the values resulting from the extraction with buffer.

**Keywords:** Microalgae. Phycobiliproteins. *Spirulina (Arthrospira) platensis*. Ultrasound. Ionic liquids.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Visão microscópica das principais microalgas .....	20
Figura 2 -	<i>Spirulina (Arthrospira) platensis</i> visto do microscópio.....	22
Figura 3 -	Organização estrutural do Ficobilissoma (PE - Ficoeritrina; PC - Ficocianina; APC - Aloficocianina) .....	23
Figura 4 -	Estrutura cristalina da ficocianina de <i>Nostoc</i> sp. R76DM.....	24
Figura 5 -	Estrutura da aloficocianina da cianobactéria <i>Nostoc</i> sp. WR13 .....	25
Figura 6 -	Estrutura da R-Ficoeritrina, 1EXY .....	26
Figura 7 -	Etapas do rompimento celular com o uso do ultrassom.....	28
Figura 8 -	Estrutura química da colina.....	31
Figura 9 -	Espectro de FT-IR dos líquidos iônicos sintetizados.....	32
Figura 10 -	Reação de redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil a 2,2-difenil-picril-hidrazina, através de compostos antioxidantes .....	36
Figura 11 -	Reação de síntese do LI hidróxido de (2-hidroxietyl)-trimetilamônio [ChOH] .....	38
Figura 12 -	Alíquotas em triplicatas retiradas durante a extração. ....	41
Figura 13 -	Soluções de líquidos iônicos antes e depois das extrações. ....	43
Figura 14 -	Concentração (mg/L) de ficocianina (barra azul escura) e aloficocianina (barra azul clara) obtidas por extração em ultrassom da microalga <i>Spirulina platensis</i> por diferentes líquidos iônicos de colina e em tampão fosfato de sódio 0,1 M a pH 7. a) Extração utilizando tampão fosfato de sódio 0,1 M a pH 7; b) Extração utilizando líquido iônico acetato de (2-hidroxietyl)-trimetilamônio; c) Extração utilizando líquido iônico citrato de (2-hidroxietyl)-trimetilamônio; d) Extração utilizando líquido iônico bissulfato de (2-hidroxietyl)-trimetilamônio. ....	46
Figura 15 -	Produtividade de ficocianina e aloficocianina (mg/L.min) obtidas por extração em ultrassom da microalga <i>Arthrospira platensis</i> por diferentes líquidos iônicos de colina e em tampão fosfato de sódio 0,1 M a pH 7. a) Extração utilizando tampão fosfato de sódio 0,1 M a pH 7; b) Extração utilizando líquido iônico acetato de (2-hidroxietyl)-trimetilamônio; c) Extração utilizando líquido iônico citrato de (2-	

	hidroxietil)-trimetilamônio; d) Extração utilizando líquido iônico bissulfato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio.....	49
Figura 16 -	Rendimento de A) ficocianina (mg/g) e B) aloficocianina obtidas em 60 minutos de extração em ultrassom da microalga <i>Arthrospira platensis</i> por diferentes líquidos iônicos de colina e em tampão fosfato de sódio 0,1 M a pH 7. a) Extração utilizando tampão fosfato de sódio 0,1 M a pH 7; b) Extração utilizando líquido iônico acetato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio; c) Extração utilizando líquido iônico hidróxido de (2-hidroxietil)-trimetilamônio; d) Extração utilizando líquido iônico citrato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio; e) Extração utilizando líquido iônico bissulfato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio.....	51
Figura 17 -	Comparativo entre microalgas antes da extração (a) e microalgas após extração com cada solvente (b-f).....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Toxicidade dos líquidos iônicos de colina frente a <i>Artemia salina</i> .....	34
Tabela 2 – Descrição, estrutura química e abreviatura dos nomes dos quatro líquidos iônicos obtidos a partir da colina.....	44
Tabela 3 – Propriedades dos LIs de colina sintetizados a 25°C .....	44
Tabela 4 – Valores obtidos de pH e Teor de água dos LIs .....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[ChAc]	Acetato de (2-hidroxietyl)-trimetilamônio
[ChBis]	Bissulfato de (2-hidroxietyl)-trimetilamônio
[ChCit]	Citrato de (2-hidroxietyl)-trimetilamônio
[ChOH]	Hidróxido de (2-hidroxietyl)-trimetilamônio
°C	Graus Celsius
µm	Micrômetros
AF	Alofocianina
Ch	Colina
cm	Centímetros
DL <sub>50</sub>	Dose Letal 50
DMSO-d6	Dimetil-sulfóxido deuterado
DO	Densidade óptica
FC	Ficocianina
FE	Ficoeritrina
FT-IR	Fourier transform infrared (Infravermelho por transformada de Fourier)
g	Grama
GRAS	Generally Regarded As Safe
kHz	Quilohertz
L	Litro
LDL	Low-density lipoprotein (Lipoproteína de baixa densidade)
LI	Líquido iônico
m	Mol
M	Molar
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
mg/g	Micrograma por grama
min	Minutos
mL	Mililitros
mmol	Milimol
mPa.s	Milipascal-segundo
nm	Nanômetros
pH	Potencial hidrogeniônico

RMN de  $^{13}\text{C}$  Ressonância Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$

RMN de  $^1\text{H}$  Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$

rpm Rotações por minuto

v Volume

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	18
2.1 Objetivos Gerais .....	18
2.2 Objetivos Específicos .....	18
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	19
3.1 Microalgas e cianobactérias .....	19
3.2 <i>Spirulina (Arthrospira) platensis</i> .....	21
3.3 Ficobiliproteínas .....	23
3.4 Extração assistida por ultrassom .....	26
3.5 Líquidos Iônicos .....	28
3.6 Líquidos iônicos de Colina .....	30
3.7 Breve estudo sobre a atividade antioxidante .....	34
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	37
4.1 Cultivo da <i>Spirulina (Arthrospira) platensis</i> .....	37
4.2 Síntese dos Líquidos Iônicos .....	37
4.2.1 Síntese de Hidróxido de (2-hidroxietyl)-trimetilamônio [ChOH] .....	37
4.2.2 Síntese de Citrato de (2-hidroxietyl)-trimetilamônio [ChCit] .....	38
4.2.3 Síntese de Acetato de (2-hidroxietyl)-trimetilamônio [ChAc] .....	39
4.2.4 Síntese de Bissulfato de (2-hidroxietyl)-trimetilamônio [ChBis] .....	39
4.3 Caracterização dos Líquidos Iônicos .....	39
4.4 Extração por ultrassom de ficobiliproteínas .....	40
4.5 Determinação das ficobiliproteínas extraídas .....	40
4.5.1 Determinação da concentração, pureza, rendimento e produtividade .....	40
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	43
5.1 Caracterização dos Líquidos Iônicos .....	43
5.2 Determinação das ficobiliproteínas extraídas .....	46
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	54
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	55

## 1 INTRODUÇÃO

Microalgas são organismos unicelulares, procariontes ou eucariontes, ricas em fontes de carbono, apresentam grande diversidade e possuem substâncias de alto valor biotecnológico (ABREU, 2021). Sua produção comercial teve início na década de 1950 em virtude de uma possível escassez de proteína animal, objetivando fontes proteicas alternativas para o século XXI. Desde então, diversas pesquisas surgiram na intenção de caracterizar os componentes bioquímicos das inúmeras espécies de microalgas descobertas ao longo desses anos (DANTAS et al., 2018).

Isso se deve a sua estrutura simples e, por isso, são organismos que se reproduzem facilmente e não apresentam elevadas exigências nutricionais para isso (MONÇÃO; MAXWEL, 2015). Esse fato permite um cultivo rápido, relativamente fácil e eficiente para obtenção de grande quantidade de biomassa extraída (ABREU, 2021).

Dentre a grande quantidade de espécies já descobertas, a *Spirulina (Arthospira) platensis* vem ganhando destaque. Trata-se de uma cianobactéria autótrofa e procarionte verde-azulada que pode ser encontrada em ambientes salinos e alcalinos. Seu cultivo pode ocupar terras improdutivas e requer baixo consumo de água quando comparado a plantações de soja, por exemplo (BORBA; FERREIRA, 2018).

*S. platensis* é formada majoritariamente por proteínas, aproximadamente 74% considerando sua massa seca. Grande parte de suas proteínas contêm todos os aminoácidos essenciais, apresenta também quantidades consideráveis de outros nutrientes indispensáveis, pigmentos, fibras e minerais (BORBA; FERREIRA, 2018).

Dentre os importantes bioprodutos extraídos da *Spirulina (Arthospira) platensis* encontram-se as ficobiliproteínas, que são pigmentos proteicos atóxicos, hidrossolúveis, de cor azul (ficocianina, aloficocianina) e vermelha (ficoeritrina). São solúveis em água, muito estáveis em pHs fisiológicos (CARLOS, 2020). Devido a esse fato, seu potencial primário é como corante natural principalmente para indústrias alimentícias e de cosméticos, porém existe uma vasta gama de possíveis aplicações relacionadas a suas demais características. Dentre elas podemos destacar sua utilização como marcadores para anticorpos ou outras moléculas biológicas em análises médicas, para tratamento de efluentes industriais, agente farmacêutico devido a sua atividade antioxidante e anti-inflamatória, entre outras (Rodrigues et al., 2018; Rodrigues et al., 2019; Carlos et al., 2021).

Por isso, se faz necessário além de bons métodos de cultivo, dispor de bons métodos de extração destes bioprodutos, de forma eficiente e que cause o menor impacto possível em sua estrutura e em seu produto final. Métodos como maceração dinâmica, micro-ondas e ultrassom têm sido estudados e otimizados na intenção de obter-se cada vez melhores resultados. Neste estudo, optou-se pelo método de extração assistida por ultrassom por apresentar uma alternativa ambientalmente amigável para a indústria alimentícia e por dispor de menos tempo para a extração. Além disso, baixos custos operacionais e equipamentos de fácil manuseio também constituem vantagens da tecnologia de ultrassom (RODRIGUES, 2017).

Nos processos de extração envolvendo ultrassom, ondas mecânicas que se propagam através do meio em ciclos de compressão e rarefação em frequências entre 20 kHz e 100 kHz, promovem o fenômeno chamado de cavitação (FERREIRA et al., 2020). Esse fenômeno envolve a nucleação, o crescimento e o colapso de microbolhas nos líquidos, acarretando em um aumento pontual da temperatura e da pressão no meio por onde as ondas se propagam, bem como a formação de micro jatos. Os micros jatos são responsáveis pela erosão e/ou ruptura das partículas sólidas presentes no meio, proporcionando uma boa eficiência de extração (Ferreira et al. 2020; Rodrigues et al., 2018; Silva et al., 2017).

Para otimização do processo, deve-se dispor de bons solventes de extração. Assim, optou-se pela utilização de Líquidos Iônicos (LIs), pois muitas pesquisas já demonstraram seu bom desempenho em extrações e sua facilidade de obtenção (Rodrigues et al., 2020; Rodrigues et al. 2019).

Líquidos iônicos constituem uma classe de solventes promissora frente aos solventes comerciais. Tratam-se de sais que apresentam ponto de fusão abaixo do ponto de fusão da água (100 °C), formados inteiramente por íons, um cátion orgânico e um ânion que pode ser orgânico ou inorgânico (Frizzo, 2007). Suas unidades carregadas possuem baixa pressão de vapor e, portanto, são considerados não voláteis (ARAÚJO, 2018).

. Estes líquidos apresentam a vantagem que propriedades como densidade, viscosidade, ponto de fusão e solubilidade em água ou outros solventes podem ser ajustados alterando o ânion e/ou cátion (FRIZZO, 2007; Reis et al., 2017). Estas características permitem com que sejam projetados para uma função específica, por isso são descritos como “*designers solvents*” (MIQUEL, 2013).

Então, neste presente estudo, foi avaliado o desempenho de quatro líquidos iônicos de colina na extração de ficobiliproteínas usando o processo de ultrassom, a partir de condições de extração previamente estudada, com variações de tempo de extração e comparados com o tampão de fosfato de sódio, solvente geralmente utilizado.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a extração de ficobiliproteínas da microalga *Spirulina platensis* por processo ultrassom utilizando diferentes líquidos iônicos de colina e comparar os resultados com o processo de extração usando o tampão fosfato.

### 2.2 Objetivos Específicos

1. Sintetizar os líquidos iônicos hidróxido de (2-hidroxietil)-trimetilamônio, bissulfato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio, acetato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio e citrato de (2-hidroxietil)-trimetilamônio por reação ácido-base;
2. Caracterizar os líquidos iônicos de colina sintetizados em relação a densidade, viscosidade, pH e teor de água;
3. Avaliar a eficiência dos líquidos iônicos sintetizados na extração de ficobiliproteínas da microalga *Spirulina platensis* por processo de ultrassom.
4. Avaliar o tempo de extração, determinando a produtividade e o rendimento dos processos;
5. Avaliar quais líquidos foram mais eficientes, comparando os resultados obtidos usando o tampão como solvente.
6. Determinar a capacidade antioxidante dos extratos obtidos de ficobiliproteínas;

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Microalgas e cianobactérias

O crescente interesse em estudos de microrganismos se dá pelo fato de que esses organismos apresentam grande importância nas diversas cadeias tróficas e na possibilidade de aplicação comercial, principalmente em áreas como, saúde humana e animal, alimentícia e de cosméticos (MEIRELES, 2018).

Nesse contexto, estes produtos naturais podem ser utilizados para a obtenção de compostos de alto valor agregado, de interesse das indústrias alimentícias, químicas e farmacêuticas. Quando comparado com vegetais e animais, as microalgas têm como vantagens: o cultivo contínuo e a rápida multiplicação desses microrganismos (MEIRELES, 2018).

Microalgas são organismos unicelulares, fotossintetizantes, pois possuem clorofila A – clorofila que possui um grupo metil ligado ao carbono 3 do anel 2, diferente da clorofila B (Xu et al., 2001) – e outros pigmentos fotossintetizantes, apresentam dimensões que variam de algumas poucas centenas de micrômetros. São, geralmente, coloridas, devido a presença de pigmentos proteicos e pigmentos acessórios (MEIRELES, 2018).

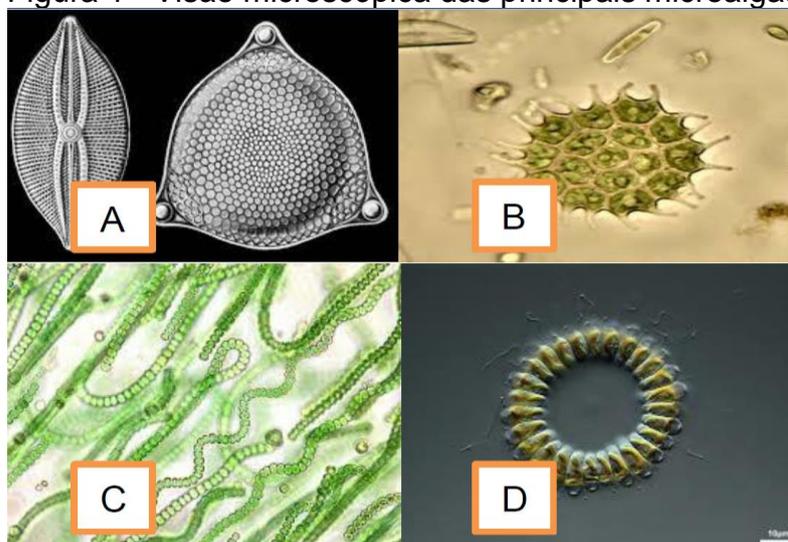
Têm sido tradicionalmente classificadas quanto aos tipos de pigmentos, a natureza química dos produtos de reserva e pelos constituintes da parede celular. Também têm sido considerados aspectos citológicos e morfológicos, tais como a ocorrência de células flageladas, a estrutura dos flagelos, os processos de formação do núcleo e da divisão celular, a presença e a caracterização de envoltório do cloroplasto e a possível conexão entre o retículo endoplasmático e a membrana nuclear. Além disso, as microalgas são classificadas em procariontes e eucariontes (DERNER et al., 2006; OHSE et al., 2007; MORAES, 2007 apud MEIRELES, 2018).

As microalgas apresentam potencial de produzir uma grande quantidade de biomassa, superior à maioria das culturas atuais e têm sido investigadas como fonte para produção de biocombustíveis, alimento, ração e compostos bioativos. Devido à demanda crescente por alimentos e fontes alternativas de energia, os lipídios de microalga têm despertado interesse por serem ricos em ácidos graxos insaturados de cadeia longa (RYCKEBOSCH et al., 2012).

Além disso, contêm diversos compostos bioativos associados à prevenção de doenças. Compostos fenólicos e carotenoides possuem caráter antioxidante e atuam na prevenção de câncer e doenças cardiovasculares. Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (ômega 3), também estão associados à prevenção de doenças cardiovasculares. Esteróis possuem papel importante na diminuição dos níveis de colesterol LDL e atividade anti-inflamatória (FRANCAVILLA et al., 2010; ZULIANI et al., 2009; PLAZA et al., 2009).

São classificadas por Ohse e colaboradores (2007) de acordo com as características supracitadas e conforme sua abundância. Estes pesquisadores descreveram as quatro classes mais importantes (Figura 1), que são: diatomáceas (*Bacillariophyceae*), algas verdes (*Chlorophyceae*), algas verde-azuladas (*Cyanobacteria*) e algas douradas (*Chrysophyceae*).

Figura 1 - Visão microscópica das principais microalgas



A) *Bacillariophyceae*; B) *Chlorophyceae*; C) *Cyanobacteria* D) *Chrysophyceae* (Fonte: MEIRELES, 2018).

Hoje, as *Cyanophyceae* ou algas verde-azuladas são, geralmente, referidas como *Cyanobactérias*. O termo cianobactéria reconhece que essas algas procarióticas são mais intimamente relacionadas com as bactérias procarióticas do que com as eucarióticas (BOONE; CASTENHOLZ; GARRITY, 2000 apud SILVA, 2022).

As cianobactérias foram identificadas como uma nova e rica fonte de compostos bioativos e têm sido considerado um dos grupos mais promissores de

organismos para produzi-los (BHADURY; WRIGHT, 2004; DAHMS; YING; PFEIFFER, 2006 apud SILVA, 2022).

A maioria produz o pigmento ficocianina que conferem às células uma cor azulada quando presente em concentração suficientemente elevada, sendo responsáveis pelo nome popular de algas verde-azuladas; em alguns casos, o pigmento acessório vermelho, ficoeritrina, também é formado e a aloficocianina (WHITTON; POTTS, 2002).

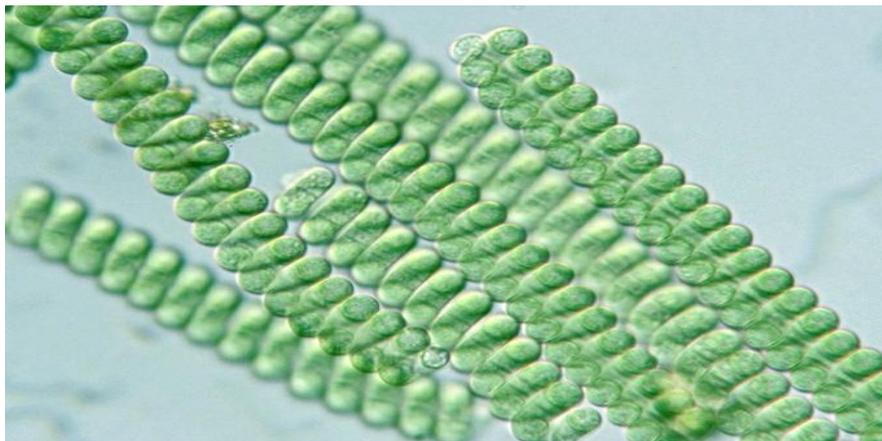
### **3.2 *Spirulina (Arthrospira) platensis***

Dentre essas microalgas, podemos destacar a *Spirulina (Arthrospira) platensis*. A *Spirulina* foi reclassificada como *Arthrospira*, porém, o termo *Spirulina* já muito estabelecido, continua a ser amplamente utilizado. Trata-se de uma cianobactéria filamentosa que pode ser encontrada em ambientes e alcalinos, seu cultivo é simples e econômico, podendo ser cultivada em terras improdutivas ou mesmo em efluentes industriais, sendo assim, uma boa alternativa para a diminuição de impactos ambientais decorrentes destes efluentes (BORBA; FERREIRA, 2018).

Devido ao seu valor nutricional e por ser facilmente absorvida pelo corpo humano, pode ser utilizada como alimento, uma vez que sua membrana não contém celulose (SEO et al., 2013 apud MEIRELES, 2018).

Os primeiros relatos de seu uso como alimento datam da pré-história, por informações de que tribos de caçadores coletavam massas gelatinosas de algas verde-azuladas e as consumiam cruas ou cozidas. Para enriquecer suas dietas, também consumiam algas filamentosas coletadas em lagos alcalinos, as quais foram classificadas no gênero *Spirulina* (AMBROSI et al., 2008).

Figura 2 - *Spirulina (Arthrospira) platensis* visto do microscópio.



Fonte: INNSPUB JOURNAL PUBLISHER - BLOG SITE.

Podemos citar também sua utilização em programas espaciais, sendo recomendada pela *National Aeronautics and Space Administration* (NASA) como suplemento alimentar primário durante as missões.

Nos últimos anos, foram desenvolvidos diversos alimentos com adição da biomassa de microalgas, em especial a microalga *S. platensis* recebeu o certificado GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*), garantindo a sua utilização como alimento, sem riscos para a saúde dos consumidores (DA SILVA, 2018), isto é, produto geralmente reconhecido como seguro, sendo uma das microalgas (ou cianobactéria) mais estudadas em todo mundo.

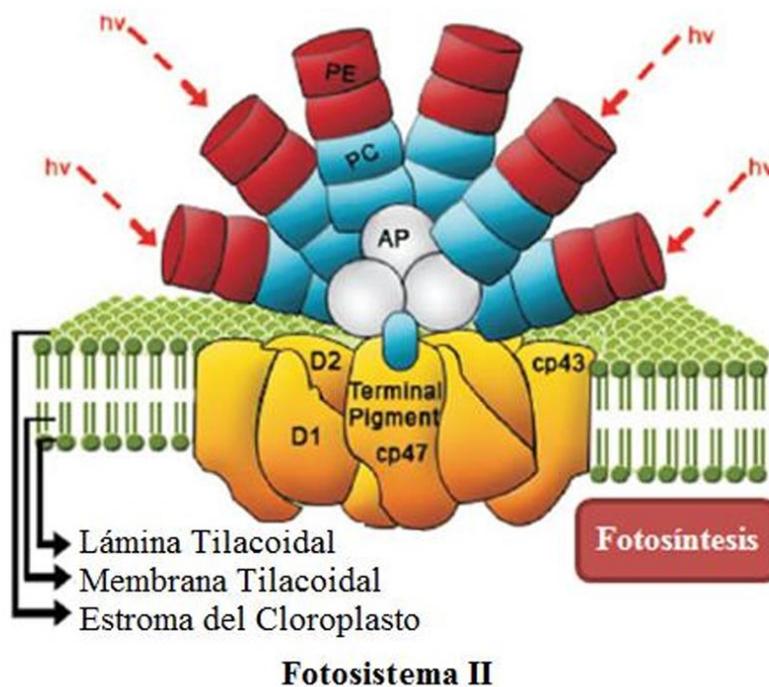
No Brasil, pesquisas estão sendo conduzidas para sua utilização como aditivo alimentar em diferentes produtos e na merenda escolar devido a um projeto de pesquisadores do sul, com parcerias entre os setores público e privado (WALTER, 2011; OLIVEIRA, 2012 apud MEIRELES, 2018).

A *Spirulina* representa uma das fontes mais ricas de proteínas, podendo fornecer conteúdo superior ao de carnes e peixes (15-20%) e também da soja (35%). A maior parte de sua massa seca é formada por proteínas, (aprox. 74%), variando de acordo com a espécie e condições de crescimento. Além disso, contêm todos os aminoácidos essenciais, sendo, inclusive, fonte de minerais e vitaminas (BORBA; FERREIRA, 2018).

### 3.3 Ficobiliproteínas

Dentre os bioprodutos de valor presentes na *Spirulina*, destacamos as ficobiliproteínas. As ficobiliproteínas estão localizadas nas ficobilissomas (Figura 03), e estão situadas sobre a superfície externa da membrana do tilacóide e atuam como importantes pigmentos fotossintéticos acessórios, participando de um conjunto de transferência de energia muito eficiente na fotossíntese, sendo responsável por cerca de 50% da captação de luz a partir de cianobactérias (MORAES et al., 2011; HORVÁTH et al., 2013 apud MEIRELES, 2018).

Figura 3 - Organização estrutural do Ficobilissoma (PE - Ficoeritrina; PC - Ficocianina; APC - Aloficocianina)



Fonte: VÁZQUEZ, 2011.

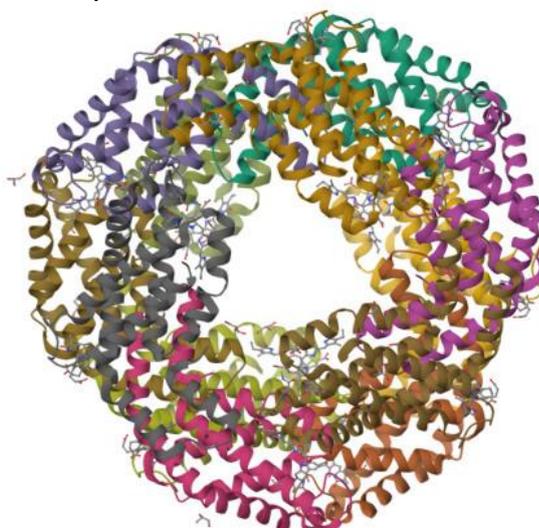
A clorofila é a parte essencial do centro das reações de fotossíntese, porém absorve debilmente a luz entre 450 nm e 600 nm, por isso, é ineficiente na captação da luz solar. Para superar este inconveniente, os organismos desenvolveram os chamados pigmentos acessórios ou pigmentos captadores de luz (VÁZQUEZ, 2011). Estes pigmentos absorvem a luz de maneira eficiente nas regiões de mínima absorção da clorofila e transferem a energia para a clorofila do centro da reação. As ficobiliproteínas são estes pigmentos: Ficocianina (FC), Aloficocianina (AF) e Ficoeritrina (FE) (FRIEDRICH et al. 1981 apud VÁZQUEZ, 2011).

As ficobiliproteínas são complexos proteína-pigmento, solúveis em água, absorção a luz na região do espectro visível (450 nm - 650 nm) contribuindo de 30-50% com a capacidade de captação por células fotossintetizantes (ABALDE et al., 1998; HILDITCH et al., 1991 apud VÁZQUEZ, 2011).

A quantidade dos pigmentos acessórios é uma característica inerente a cada espécie microalgal, no entanto, pode ser foto-estimulada em cultivos fotoautotróficos (PRATES et al., 2015)

Dentre as ficobiliproteínas citadas, a ficocianina é o principal alvo de pesquisas e estudos, pois pode chegar a 20% em peso seco de microalga e possui características importantes como: boa solubilidade em água, alta estabilidade na faixa de pH 5-7, cor azulada e fluorescência, características que possibilita sua aplicação em diagnósticos (Ji et al., 2023), como biocorantes alimentícios e também elas podem ser utilizadas como agentes antitumorais (Carlos et al., 2021), anti-inflamatórios e antioxidantes (Rodrigues et al., 2020), em cosméticos, ensaios diagnósticos e na medicina, como potenciais fontes de nutracêuticos e fármacos (Ji et al., 2023). A Figura 4 apresenta a estrutura da ficociacina extraída de *Nostoc. sp.* obtida do Data Protein.

Figura 4 - Estrutura cristalina da ficocianina de *Nostoc sp.* R76DM.



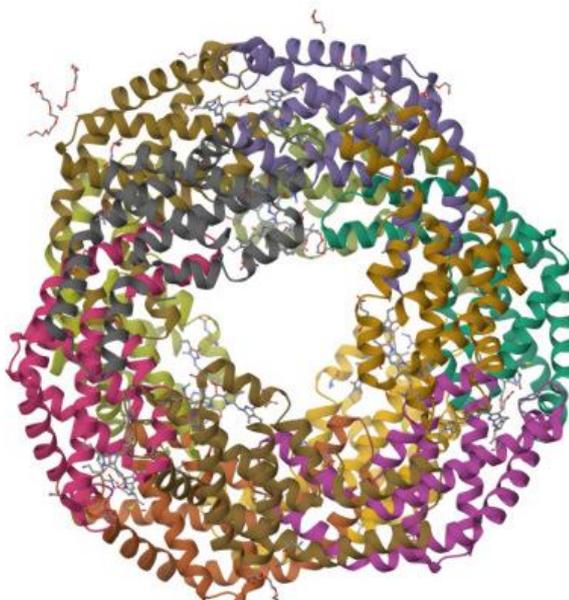
Fonte: PDB, 2023.

A aloficocianina, por sua vez, apresenta coloração verde-azulada com absorção máxima na faixa de comprimento de onda de 650 nm - 655 nm, sendo mais utilizada em estudos espectroscópicos e como marcador fluorescente, devido ao seu

grande coeficiente de absorção (REIKSEN, 2008 apud CAETANO, 2018). Essa ficobiliproteína compõe o núcleo do ficobilissoma, sendo o componente mais estável deste núcleo, sendo apontada como pigmento de membrana (PEREIRA, 2009 apud CAETANO, 2018). A Figura 5 apresenta a estrutura da alofococianina pesquisada no Data Protein.

A alofococianina possui propriedades antioxidantes, anti-enterovírus, porém é de limitada aplicação por ser encontrada em menor quantidade nas cianobactérias e pela falta de métodos eficientes para sua purificação (FAN et al., 2012 apud CAETANO, 2018).

Figura 5 - Estrutura da alofococianina da cianobactéria *Nostoc* sp. WR13



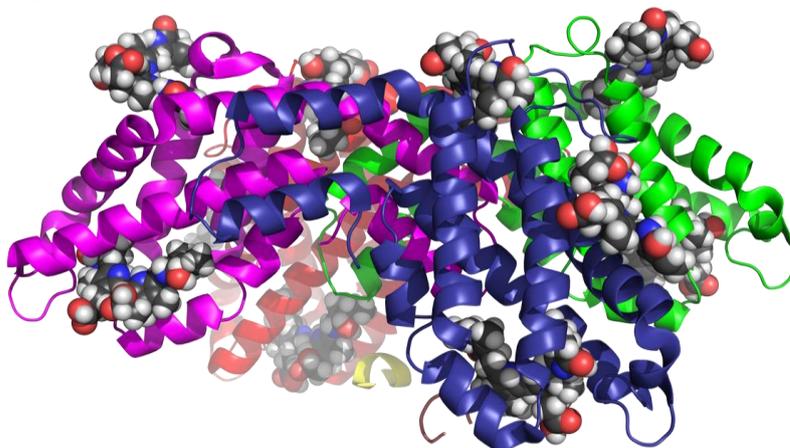
Fonte: Data Protein, 2023.

Já a ficoeritrina compõe o núcleo do ficobilissomo, sendo o componente mais estável deste núcleo, sendo apontada como pigmento de membrana. Possui propriedades antioxidantes, anti-enterovírus, porém é de limitada aplicação por ser encontrada em menor quantidade nas cianobactérias e pela falta de métodos eficientes para sua purificação (RODRIGUES et al., 2018). São mais frequentes em algas vermelhas, porém, também compõem algas verde-azuladas, mesmo que em pequena quantidade. A Figura 06 apresenta a estrutura da ficoeritrina obtida do Quanta Biodesign Limited.

As ficoeritrinas são as principais responsáveis pela capacidade das algas vermelhas crescerem abundantemente em águas profundas, pois possuem um

eficiente espectro de absorção de luz de 450 nm a 570 nm e, diante disso, estas algas marinhas são frequentemente encontradas em zonas mais baixas da região intermaré da costa do que as verdes e as pardas (CARLOS et al., 2021).

Figura 6 - Estrutura da R-Ficoeritrina, 1EXY



Fonte: QUANTA BIODESIGN LIMITED, 2023.

### 3.4 Extração assistida por ultrassom

Todas as vantagens das ficobiliproteínas só podem ser bem aproveitadas quando se dispõe de bons métodos de cultivo, extração e purificação.

Microalgas são dotadas de uma rígida parede celular que impede ou dificulta a extração de componentes específicos. Para superar essa barreira, uma operação inicial de rompimento celular é necessária a fim de permitir o acesso aos componentes internos, facilitando o processo de extração (ARAÚJO et al., 2013).

O método convencional alia aquecimento mais agitação mecânica e proporciona um maior controle das condições de extração. Embora permita maior controle das condições de extração e apresente boa reprodutibilidade, é prolongado. Outra desvantagem deste método reside no fato de que o emprego de temperaturas elevadas encarece o processo de extração (RODRIGUES, 2017). As principais variáveis a serem consideradas neste método são temperatura, pH e razão solvente:biomassa (SILVEIRA et al., 2007). As principais desvantagens são o maior consumo energético e o longo tempo de extração empregado, fatores que dificultam a ampliação de escala.

A extração assistida por ultrassom tem recebido destaque, pois se trata de uma metodologia de intensificação do processo tornando possível a obtenção de

elevadas taxas de extração em menores tempos (SILVA; GARCIA; FRANCISCATO, 2016).

De acordo com Rodrigues (2017), a cavitação é o principal fenômeno que ocorre durante a extração por ultrassom e é caracterizada pelo colapso violento de bolhas em um campo de pressão alternado, que provoca aumento de temperatura, gerando perturbações na parede celular dos tecidos biológicos, facilitando a liberação de compostos extraíveis. Além disso, neste processo a frequência de operação, o pH e a razão solvente:biomassa são variáveis importantes.

A cavitação gerada pelo ultrassom é conhecida por produzir diversos efeitos na matriz vegetal, tais como: a circulação do líquido (agitação do solvente) no sistema e a geração de turbulência que pode auxiliar no aumento da transferência de massa (SILVA; GARCIA; FRANCISCATO, 2016). Liu et al. (2005) também mostraram que ultrassom de alta intensidade pode acelerar o transporte de calor e massa em uma variedade de operações no processamento de alimentos e tem sido empregado com sucesso para melhorar a secagem, mistura, homogeneização e extração. Vilku et al. (2008) apontaram que o uso do ultrassom gera perturbações nas paredes celulares dos diferentes tecidos biológicos, facilitando a liberação de compostos extraíveis, e pode melhorar o transporte em massa de solvente de uma fase contínua para dentro das células.

O ultrassom é também uma nova tecnologia utilizada para melhorar o processo de extração de compostos lipofílicos ou hidrofóbicos a partir de materiais vegetais ou animais.

Desse modo, dentre as vantagens da extração assistida por ultrassom, pode-se listar:

- Redução do tempo de extração
- Consumo reduzido de solvente
- Extração em temperaturas inferiores poder evitar danos térmicos ao extrato e minimizar a perda (SILVA; GARCIA; FRANCISCATO, 2016)
- Baixos custos operacionais
- Equipamento de fácil manuseio (FAIRBANKS, 2001)
- Aspectos ambientais, pois é um método mais sustentável em comparação com algumas técnicas de extração convencionais. Ela requer menos consumo de energia e solventes orgânicos, o que pode

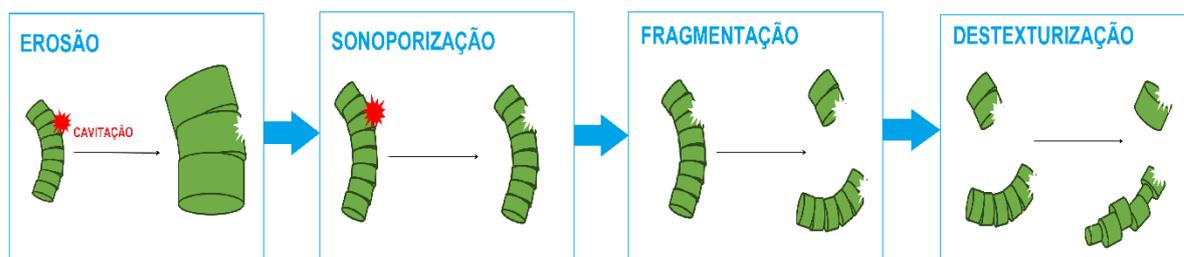
reduzir o impacto ambiental associado à extração de compostos de interesse (MEHTA et al., 2022).

Apesar de todas as vantagens, também é necessário estar atento às desvantagens que o método apresenta, a fim de propor melhorias. Dentre elas podemos citar:

- Custos e complexidade: custos relativamente altos dos equipamentos e mão-de-obra especializada.
- Requer ajustes e otimização
- Pode causar mudanças nas estruturas das moléculas (MEHTA et al., 2022)
- Risco de formação de espuma devido a cavitação: A espuma pode dificultar a extração eficiente dos compostos desejados e também pode causar problemas operacionais.

A Figura 7 apresenta um fluxograma simplificado das etapas que tem num processo de extração usando o ultrassom.

Figura 7 - Etapas do rompimento celular com o uso do ultrassom



Fonte: Vernés et al., 2019.

### 3.5 Líquidos Iônicos

Uma das formas de otimizar a extração é o emprego de solventes eficientes, que possibilitem extrair o máximo da substância desejada possível, causando menos danos à sua estrutura e preservando suas propriedades.

Além disso, a escolha do solvente é um ponto crucial nos processos de extração sólido-líquido. Um bom solvente deve apresentar algumas propriedades desejáveis, tais como: elevada seletividade, elevado coeficiente de distribuição, alta solubilidade do soluto, recuperabilidade, estabilidade química, baixa viscosidade, baixa pressão de vapor para diminuir as perdas de solvente para o ambiente, ser

acessível e apresentar baixo custo (MESQUITA, 2015 apud RODRIGUES, 2017). Nesse cenário, se destacam os líquidos iônicos, pois satisfazem grande parte dessas condições.

Líquidos iônicos são sais líquidos à baixas temperaturas, pois apresentam ponto de fusão abaixo de 100 °C. Líquidos iônicos (LIs) compartilham propriedades físico-químicas únicas, como pressão de vapor insignificante, não inflamabilidade, alta estabilidade térmica e química, renovabilidade, solubilidade variável, alta condutividade e amplo potencial eletroquímico, por isso têm sido largamente estudados e reconhecidos como alternativas promissoras para muitas aplicações, algumas delas de grande potencial industrial (KAUR et al., 2018 apud GAO et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2016 apud RODRIGUES, 2017).

Citando algumas dessas aplicações, tem-se:

- Síntese orgânica (Wang et al., 2003)
- Catálise (Souza et al., 2003)
- Eletroquímica (Jiang et al., 2004)
- Biocatálise (Ventura et al., 2012b; Sintra et al., 2014)
- Imobilização enzimática (Souza et al., 2013; Oliveira et al., 2014)
- Vários processos de extração (Freire et al., 2012; Ventura et al., 2012a, 2012c)
- Inclusive, de proteínas (DESAI et al., 2014; LIYA GE et al., 2010; YUANCHAO PEI et al., 2009; VASANTHA et al., 2015).

São facilmente sintetizados por reação de neutralização de uma base de Brønsted e um ácido de Brønsted, onde ocorre uma transferência de prótons do ácido para a base. São compostos por um cátion orgânico e um ânion que pode ser orgânico ou inorgânico (ABBASI et al., 2020 apud REIS, 2021).

O ânion é responsável pelas propriedades e interações químicas, ao passo que o cátion é responsável pelas propriedades físicas, tais como: ponto de fusão, viscosidade, densidade, por isso, permitem com que sejam projetados para uma função específica, bastando escolher o cátion e o ânion envolvidos que satisfaçam as necessidades exigidas. Por esse motivo, também são conhecidos como “designers solvents” (ABBASI et al., 2020; AGHAEI; SOBATI, 2022 apud REIS, 2021).

Nos últimos anos, o crescimento da pesquisa envolvendo líquidos iônicos se tornou exponencial. As constantes descobertas sobre seu papel na ciência, bem como suas aplicações tecnológicas, tornaram esse assunto um caso de constante

geração de novos produtos, invenções e até mesmo inovações (SPEZIALI; SINISTERRA, 2015).

A inclusão dos líquidos iônicos como uma nova classe de materiais, primeiramente considerada não-tóxica e adequada para processos verdes, tem sido tema de estudos de toxicidade em vários níveis biológicos, a fim de avaliar os riscos para o meio ambiente a partir do seu uso nos processos de produção. De fato, alguns estudos já demonstraram que os líquidos iônicos derivados do imidazol são mais tóxicos que certos solventes orgânicos voláteis já utilizados na indústria química, como metanol e diclorometano (ARAÚJO, 2018). Também é de conhecimento estabelecido que cada organismo irá apresentar comportamento específico frente a um tipo de LI aplicado, por isso, é de grande importância a escolha adequada do LI utilizado para cada aplicação, desse modo, pode-se evitar certa toxicidade microbiana. Esse fato, torna os LIs uma boa alternativa a aplicações biotecnológicas (GANSKE et al., 2006; SANTOS, 2013; QUIJANO et al., 2010 apud SANTOS, 2021)

No entanto, as viscosidades da maioria dos LIs, que também é o caso dos LIs de colina, são maiores que as dos solventes orgânicos, o que conseqüentemente levaria a uma diminuição nas taxas de transferência de massa. Vários estudos recentes têm focado na extração sólido-líquido usando microemulsões à base de líquidos iônicos. A microemulsão é um método promissor que permite a extração seletiva de biomoléculas nas indústrias alimentícia e química (AMIRI-RIGI; ABBASI, 2019 apud GAO et al., 2020).

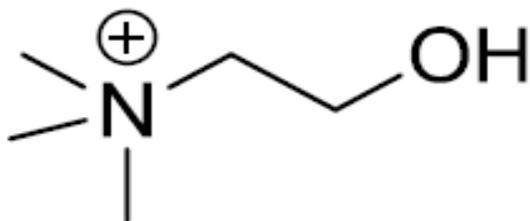
### **3.6 Líquidos iônicos de Colina**

No presente trabalho, foram utilizados LIs de colina, os quais foram sintetizados conforme Reis (2021). A síntese de LIs formados a partir de biomateriais, como a colina (Ch), foi primeiramente proposta por Fukaya et al. no ano de 2007.

A colina é um importante precursor para a síntese de Lis, trata-se de um nutriente essencial, composta pelo cátion (2-hidroxietil)-trimetilamônio, um tipo de sal de amônio quaternário que faz parte de vitaminas do complexo B (ARAÚJO, 2018).

Essa amina natural é encontrada em uma variedade superior a 630 alimentos e é necessária para a síntese de inúmeras biomoléculas, como neurotransmissores, componentes essenciais presentes nas membranas, entre outros (ZEISEL, 2009 apud Araújo, 2018).

Figura 8 – Estrutura química da colina.

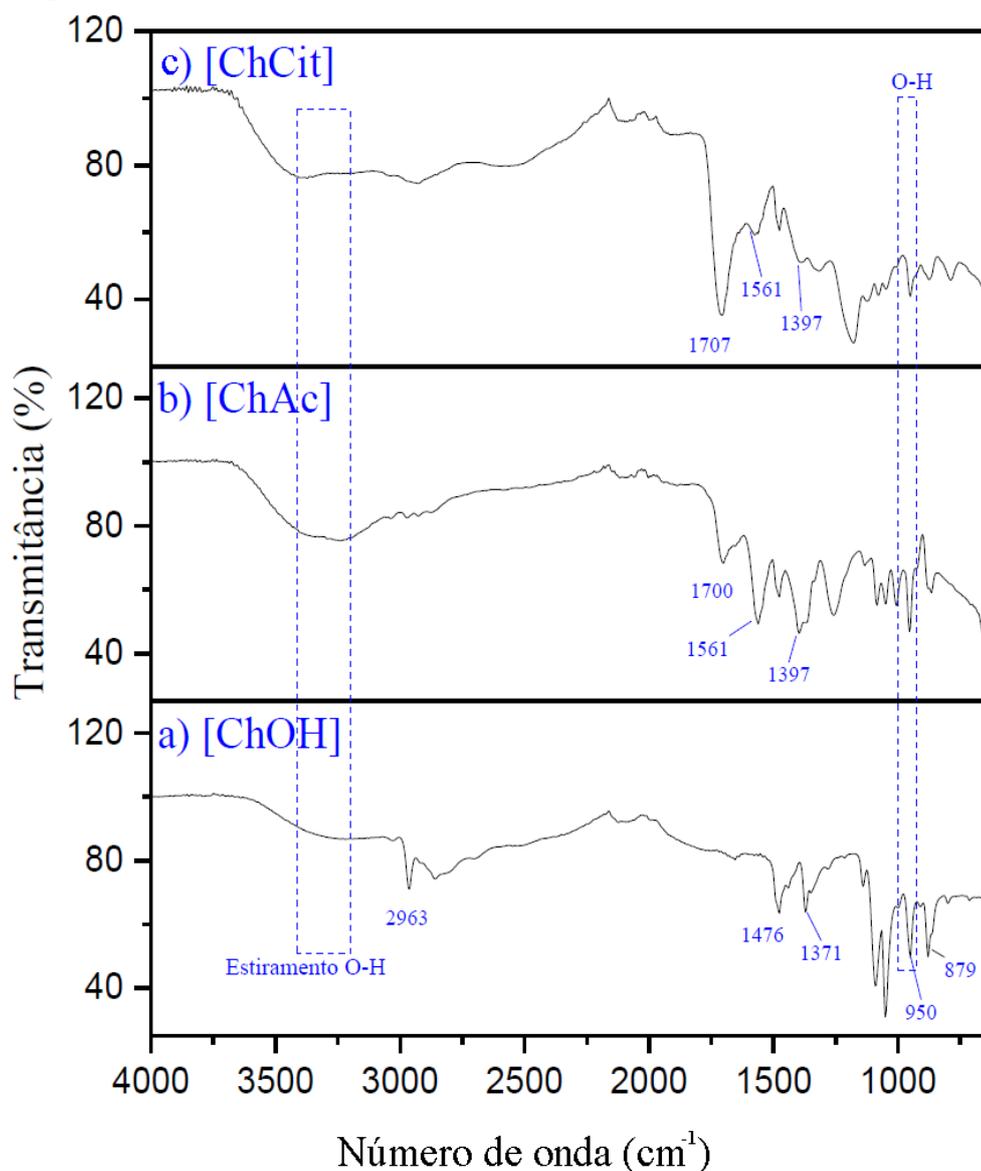


Fonte: Araújo, 2018.

Neste trabalho final de curso, quatro líquidos iônicos sintetizados foram: hidróxido de (2-hidroxiethyl)-trimetilamônio [ChOH], acetato de (2-hidroxiethyl)-trimetilamônio [ChAc], citrato de (2-hidroxiethyl)-trimetilamônio [ChCit] e bissulfato de (2-hidroxiethyl)-trimetilamônio [ChBis].

Os espectros de FT-IR dos LIs sintetizados foram determinados previamente no laboratório do Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (GPBio) da Universidade Federal do Ceará. Os resultados obtidos estão demonstrados na figura 9 obtidos de Reis (2021). Devido às limitações do equipamento, a análise LI do ânion sulfato não pode ser realizada, porém sua síntese foi comprovada por RMN.

Figura 9 - Espectro de FT-IR dos líquidos iônicos sintetizados



Fonte: Reis, 2021.

A banda referente ao estiramento OH da colina apresenta uma ampla absorção de infravermelho entre 3200-3400  $\text{cm}^{-1}$  devido à ampla distribuição de ligações de hidrogênio intermoleculares e conformações de colina (TANZI et al., 2016 apud REIS, 2021) e sobrepõem parcialmente bandas de ligação C-H e vibrações N-H, como observados nas Figuras 9a-9c ([ChOH], [ChAc] e [ChCit]).

A vibração de grupo funcional C-H (alifático) é significativo para a colina (POHLE et al., 2001 apud Reis, 2021) e foi detectada em 2963  $\text{cm}^{-1}$  para o [ChOH] (Figura 9a). Essa banda apareceu deslocada, com menor intensidade nos espectros dos demais LIs que foram sintetizados a partir do hidróxido de colina, podendo ser indício de ligações de hidrogênio da colina com os ácidos carboxílicos. Em 1476  $\text{cm}^{-1}$

foi observada banda referente à deformação de grupos metila, e em  $1371\text{ cm}^{-1}$  banda que corresponde à vibração de alongamento C–N para o [ChOH].

A banda característica da deformação C-H do grupamento  $-\text{CH}_2-$  apareceu em  $950\text{ cm}^{-1}$  e  $879\text{ cm}^{-1}$  (Figura 9a). Os ácidos carboxílicos apresentam ainda uma banda muito forte do estiramento C=O em aproximadamente  $1700\text{ cm}^{-1}$ . Esse pico foi possível observar em  $1700\text{ cm}^{-1}$  para o LI [ChAc] (Figura 9b) e  $1793\text{ cm}^{-1}$  para [ChCit] (Figura 9c).

A presença de modos vibracionais assimétricos e simétricos referentes ao grupo carboxilato ( $-\text{COO}-$ ) apresentado em  $1561\text{ cm}^{-1}$  e  $1397\text{ cm}^{-1}$  para o LI [ChAc] e  $1561\text{ cm}^{-1}$  e  $1397\text{ cm}^{-1}$  para [ChCit], acabaram sobrepondo a banda referente à vibração de alongamento da ligação C–N em torno de  $1371\text{ cm}^{-1}$ , dando indícios da existência de ligações hidrogênio que podem ser do tipo:  $\text{NH}\cdots\text{NH}$ ,  $\text{NH}\cdots\text{OH}$ ,  $\text{HO}\cdots\text{HO}$  e  $\text{OH}\cdots\text{NH}$  (YUE et al., 2012 apud REIS, 2021).

A banda presente em todos os LIs analisados em aproximadamente  $933\text{ cm}^{-1}$  (Figura 9a-9c) está relacionada ao grupamento O-H (LÓPEZ-DÍAZ et al., 2018 apud REIS, 2021).

Diante dos resultados observados, comprovou-se que os ânions dos ácidos existem em todos os LI obtidos a partir do hidróxido de colina, indicando a formação de ligação do tipo  $\text{COO}^-\text{N}^+$ . A influência dessa banda em torno de  $1760\text{ cm}^{-1}$  -  $1560\text{ cm}^{-1}$  também foi demonstrada por Ju et al. (2020) para a confirmação do ânion do ácido ricinoleico no LI hidróxido de colina após a formação do LI (REIS, 2021).

Os LIs sintetizados também foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética baseada na identificação dos hidrogênios (RMN de  $^1\text{H}$ ) por Reis (2021), ocorrendo a comprovação da formação de todos os LIs.

Também, a toxicidade dos líquidos iônicos a serem avaliados neste estudo foram avaliadas por Reis (2021) usando o microcrustáceo *Artemia salina*, pois a letalidade exercida sobre os náuplios de *Artemia salina* vem sendo utilizada em bioensaios laboratoriais como forma de prever a toxicidade química em organismos aquáticos por meio da estimativa de dose letal média ( $\text{DL}_{50}$ ) (REIS, 2021). Os resultados reportados por esta autora estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 – Toxicidade dos líquidos iônicos de colina frente a *Artemia salina*

Tempo	DL <sub>50</sub> (µg/mL)			
	[ChOH]	[ChAc]	[ChCit]	[ChBis]
48 h	Não calculável	529	410	503

Fonte: Reis, 2021.

Dollabela (1997) estabelece que para DL<sub>50</sub> > 250 µg/mL o composto é considerado de baixa toxicidade ou não tóxico (Reis, 2021). Comparado ao LI comercial amplamente utilizado, tetrafluoroborato de 1-octil-3-metimidazolio, que possui valor de DL<sub>50</sub> de 45,3 µg/mL frente a *Artemia franciscana* (TSARPALI; DAILIANIS, 2015), todos os LIs propostos a serem usados no presente estudo apresentaram valores acima do valor proposto por Dollabela (1997), indicando que apresentam baixa toxicidade.

Então, conclui-se que os LIs a serem estudados são de caráter pouco ou não-tóxico frente a *Artemia salina*, de acordo com os valores de DL<sub>50</sub>. Os resultados aqui obtidos possibilitam indicar LIs com menores riscos ecotoxicológicos do que os solventes orgânicos convencionais (REIS, 2021).

### 3.7 Breve estudo sobre a atividade antioxidante

O termo oxidação de uma substância era comumente definido como a incorporação de oxigênio em sua estrutura. Atualmente, pode ser mais precisamente definido como sendo a conversão de uma substância química em um derivado com menor número de elétrons. Oxidação, portanto, é a perda de um ou mais elétrons para outra substância e o procedimento inverso pode ser considerado como redução (LARSON, 1997 apud ALVES; DAVID, 2010).

Radicais livres são átomos ou moléculas produzidas continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes ao metabolismo, tais como, produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (ALVES; DAVID, 2010).

Porém, quando em excesso, apresentam efeitos deletérios como, por exemplo, danos ao DNA, proteínas e organelas celulares, causando alterações na estrutura e função celulares estando, dessa forma, envolvidos em muitas patologias a exemplo do envelhecimento precoce, câncer, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas (HALLIWELL et al., 1992 apud ALVES; DAVID, 2010).

Na intenção de combater esses efeitos, os organismos vivos produzem substâncias antioxidantes para prevenir ou regenerar os danos causados, porém, como a quantidade de substâncias antioxidantes produzidas pelo organismo são insuficientes, é necessário adquiri-las de fontes externas (ALVES; DAVID, 2010).

Antioxidantes são substâncias que retardam as reações de degradação oxidativa, ou seja, reduzem a velocidade da oxidação por um ou mais mecanismos, como inibição de radicais livres e complexação de metais, podendo ser naturais ou sintéticos (PIETTA, 2000 apud DUARTE-ALMEIDA, 2006).

Podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação como primários ou secundários. Os antioxidantes primários são, por exemplo, compostos fenólicos, atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis ou reagem com radicais livres, formando o complexo lipídio-antioxidante que, por sua vez, pode reagir com outro radical livre (MORENO; JORGE, 2009)

Já os antioxidantes secundários retardam a reação de autooxidação por diferentes mecanismos, que incluem complexação com metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete (GORDON, 1990 apud MORENO; JORGE, 2009).

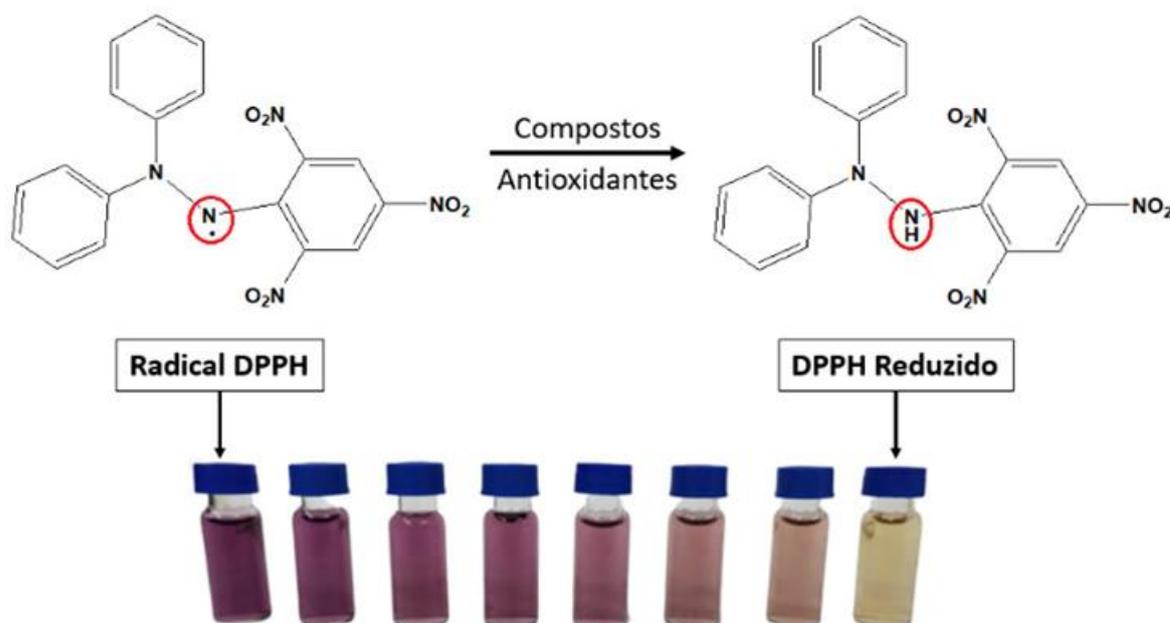
O emprego de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos tem sido alvo de questionamentos quanto à sua inocuidade e, devido a isso, pesquisas estão voltadas para a busca de compostos naturais que exibam esta propriedade funcional, atuando sozinhos ou sinergisticamente com outros aditivos, como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e diminuir o uso dos antioxidantes sintéticos (POKORNÝ, 2007 apud MORENO; JORGE, 2009).

Diante disso, ao extrair compostos com potencial antioxidativo, bons métodos de determinação da presença desses compostos devem ser utilizados. Neste trabalho, o método realizado foi o de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável em virtude

da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização confere a esta molécula uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de 520 nm (YANISHILIEVA; MARINOVA, 1995 apud MORENO; JORGE, 2009).

Este ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH (Figura 10), reduzindo-o a hidrazina. Quando uma determinada substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido.

Figura 10 – Reação de redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil a 2,2-difenil-picril-hidrazina, através de compostos antioxidantes



Fonte: Oliveira et al., 2021.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Cultivo da *Spirulina (Arthrospira) platensis*

A microalga *Spirulina (Arthrospira) platensis* foi obtida em ambiente externo no laboratório de Planctologia do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará a partir de um cultivo unialgal e utilizando um sistema de recirculação em reatores de polietileno com volume de 500 L.

Para garantir a alcalinidade do meio seletivo, garantiu-se a adição de 10 g/L de bicarbonato de sódio e a cultura foi enriquecida com uréia (0,1 g/L) como fonte de nitrogênio e superfosfato triplo [ $Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$ ] (0,01 g/L) (SYNTH) como fonte de fósforo a cada vinte dias. Diariamente, a cultura era enriquecida com efluentes de aquicultura para repor as perdas por evaporação.

A biomassa foi filtrada diariamente, por aproximadamente duas horas, utilizando uma manta sintética de fibra de vidro com 60  $\mu$ m. Essa biomassa úmida, foi, em seguida, seca em estufa com recirculação de ar a 60 °C e triturada, a fim de obter-se um pó fino. Essa biomassa em pó foi armazenada à temperatura ambiente (25 °C) em frascos com tampa até a realização dos experimentos.

### 4.2 Síntese dos Líquidos Iônicos

Os líquidos iônicos (LIs) foram previamente sintetizados, bem como, caracterizados no laboratório do Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (GPBio) da Universidade Federal do Ceará (Reis, 2021). A seguir, o processo de síntese e a caracterização dos LIs serão descritos.

#### 4.2.1 Síntese de Hidróxido de (2-hidroxietil)-trimetilamônio [ChOH]

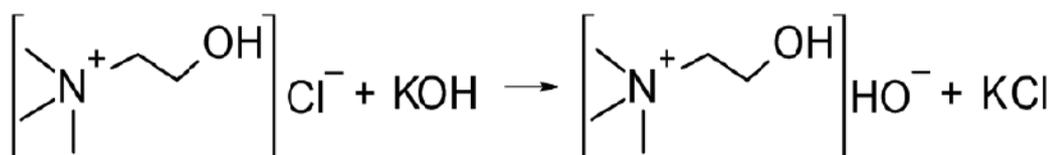
O líquido iônico hidróxido de (2-hidroxietil)-trimetilamônio ou hidróxido de colina [ChOH] foi produzido através da reação equimolar de 0,82 mol (108,74 g) de cloreto de colina com 0,82 mol (46,28 g) de hidróxido de potássio, de acordo com Reis (2021). O cloreto de colina e o hidróxido de potássio foram diluídos separadamente em etanol 99,5% (v/v) e adicionados a um reator de vidro (1L) equipado com agitador

mecânico e conectado a um banho termostático. Logo, em seguida, a reação foi executada a 60 °C, 600 rpm por 24 horas.

Ao final das 24 horas, a solução foi filtrada a vácuo com a utilização de um filtro Millipore e uma membrana de politetrafluoretileno (PTFE) com 0,45 µm de porosidade à temperatura ambiente (25°C). Esta filtração foi repetida três vezes a fim de remover todo o KCl formado. Em seguida, a mistura foi submetida a um processo de evaporação à vácuo a uma temperatura de 60°C por 24 horas utilizando um evaporador rotativo (QUIMIS, modelo Q344B2). Após secagem, o produto foi armazenado em vidro encamisado com papel alumínio para evitar a degradação pela luz e mantido na geladeira até sua utilização.

A Figura 11 apresenta a reação de síntese do líquido iônico hidróxido de colina que foi nomeado de [ChOH].

Figura 11 - Reação de síntese do LI hidróxido de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio [ChOH]



Fonte: Reis, 2021.

#### 4.2.2 Síntese de Citrato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio [ChCit]

O citrato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio ou citrato de colina [ChCit] foi sintetizado a partir da reação equimolar de ácido cítrico (99,5%; v/v) e hidróxido de colina, conduzida em um balão de três bocas, equipado a um condensador, termômetro e funil de destilação.

Após a dissolução de 0,0434 mol (8,39 g) de ácido cítrico 99,5% m 40 mL de água deionizada, essa solução foi gotejada lentamente a 0,0434 mol (5,27 g) de hidróxido de colina e posteriormente mantida sob agitação vigorosa por 24 horas. Decorridas as 24 horas, o LI passou por um processo de secagem e armazenamento semelhante ao LI descrito anteriormente, sendo este LI nomeado de [ChCit].

#### **4.2.3 Síntese de Acetato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio [ChAc]**

O acetato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio ou acetato de colina [ChAc] foi sintetizado a partir de uma mistura equimolar de ácido acético e hidróxido de colina em balão de três bocas, equipado com condensador, termômetro e um funil de destilação.

Inicialmente, adicionou-se 0,1 mol (12,12 g) de hidróxido de colina num balão de três bocas de 200 mL e, em seguida, acrescentado de 0,1 mol (6,02 g) de ácido acético 99,7% (v/v) foi gotejado lentamente com o auxílio de um funil de destilação. Essa solução foi mantida sob agitação vigorosa por 24 horas. Ao final das 24 horas, o LI foi submetido a um processo de evaporação a vácuo a 60°C por 24 horas utilizando evaporador rotativo (QUIMIS, modelo Q344B2). O LI foi armazenado em vidro de âmbar para uso posterior e nomeado de [ChAc].

#### **4.2.4 Síntese de Bissulfato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio [ChBis]**

A síntese do bissulfato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio ou benzoato de colina foi baseada no estudo de Kim et al. (2010), com algumas modificações (Reis, 2021).

Inicialmente, 0,2 mol (20,02 g) do ácido sulfúrico foi gotejado lentamente a 0,2 mol (24,23 g) do hidróxido de colina e agitado (150 rpm) por 24 horas. Devido a reação ser muito exotérmica, além do condensador já acoplado ao balão, o balão foi mantido em um banho de gelo. Decorridas as 24 horas, o LI foi lavado com 13,6 mL de acetato de etila, com posterior secagem no sistema de evaporação a vácuo a 60°C por 24 horas. O LI foi armazenado em vidro de âmbar para uso posterior e nomeado de [ChBis].

### **4.3 Caracterização dos Líquidos Iônicos**

Neste tópico, são apresentados os métodos de caracterização dos LIs produzidos, devido à limitada quantidade de dados encontrados na literatura. Para isso, analisou-se a densidade e a viscosidade dos LIs obtidos (REIS, 2021).

A densidade e viscosidade dos líquidos foram medidos utilizando um densímetro (Anton Paar /DAS-5000) e um viscosímetro digital (SVM 3000 – Anton Paar), onde foram injetadas amostras de 5 mL do LI para cada análise.

O pH foi averiguado com auxílio de pHmetro (TECNAL TEC-05) e o teor de água, por um titulador automático Karl Fischer Coulométrico (Metrohm, modelo titrino) (REIS, 2021).

#### **4.4 Extração por ultrassom de ficobiliproteínas**

A solução do solvente de extração foi preparada misturando-se 20 g do LI e 20 mL de solução tampão (1:1 m/v), em seguida, 1,26 g de microalga foi adicionada a 10 ml da solução de LI. Esse valor decorre de resultados de ensaios preliminares tendo como variáveis de entrada: pH, razão solvente:biomassa e temperatura (RODRIGUES, 2017). Assim, para o pH 7,0, a razão solvente:biomassa foi de 7,93 mL/g.

A extração de ficobiliproteínas foi realizada em banho ultrassônico (UNIQUE, USC-1400A) em temperatura ambiente (25°C). Para avaliar a influência do tempo de extração, alíquotas de extrato foram retidas com 30, 60 e 90 min.

Cada alíquota retirada foi centrifugada a 6000 rpm por 10 min (GmCLab GILSON, CAPSULFUGE PMC-880, JAPÃO). Em seguida, a densidade ótica do sobrenadante foi determinada por espectrofotometria (eppendorf BioSpectrometer® kinetic) nos comprimentos de onda 562, 615 e 652 nm. Em alguns casos, foram feitas diluições para que os valores obtidos não ultrapassassem o valor de 0,800. As diluições estão descritas nos resultados.

#### **4.5 Determinação das ficobiliproteínas extraídas**

##### ***4.5.1 Determinação da concentração, pureza, rendimento e produtividade***

As concentrações de ficocianina e aloficocianina foram estimadas através do método definido por Bennett e Bogorad (1973) e os cálculos foram realizados pelas Equações 1 e 2, respectivamente.

$$CF = \frac{DO_{615} - 0,474 \cdot DO_{652}}{5,34} \quad (1)$$

$$CAF = \frac{DO_{652} - 0,208 \cdot DO_{615}}{5,09} \quad (2)$$

Sendo:

CF é a concentração de ficocianina (g/L)

CAF é a concentração de aloficocianina (g/L)

DO<sub>615</sub> e DO<sub>652</sub> são as densidades óticas nos comprimentos de onda 615 nm e 652 nm, respectivamente.

Todas as análises foram feitas em triplicata e os resultados apresentados como média ± desvio padrão, e a Figura 12 ilustra as amostras.

Figura 12 – Alíquotas em triplicatas retiradas durante a extração.



Fonte: Autora, 2023.

O rendimento e a produtividade também foram determinados utilizando-se as Equações 3 e 4, respectivamente.

$$R = \frac{C_{pigmento} \cdot V_{solvente}}{m_{microalga}} \quad (3)$$

$$P = \frac{C_{pigmento}}{t} \quad (4)$$

sendo:

R é o rendimento (mg/g)

C é a concentração de pigmento extraído (g/L)

V é o volume do solvente (L)

m é a massa de microalga (g)

P é a produtividade (g/(L.h))

t é o tempo em h

#### 4.5.2 Análises microscópicas

Também, foram realizadas análises microscópicas para verificar se rompeu a parede celular da *Spirulina platensis*.

Após a extração, para melhorar a visualização na análise do microscópio, foram feitas cinco lavagens com a biomassa restante. As lavagens consistiram em adicionar solução tampão nos tubos Eppendorf que estava a biomassa restante, agitou-se em vortéx por 30 segundos e em seguida, centrifugadas por 10 min a 6000 rpm (GmCLab GILSON, CAPSULFUGE PMC-880, JAPÃO). Logo, as amostras foram realizadas em zoom óptico de 100x (Tecnal, TEC-5) da biomassa de microalga antes e após a extração.

#### 4.5.3 Determinação da atividade antioxidante

No extrato obtido com a maior concentração de ficobiliprotéínas foi determinada a atividade antioxidante. Para a determinação da atividade antioxidante, foi utilizado o método *in vitro* de sequestro do radical de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), obtido pela mudança característica de cor da solução de DPPH em metanol (Carlos *et al.*, 2021).

Primeiramente, foram adicionados 3 mL da amostra do extrato com concentração de 200 µg/mL com 1 mL da solução de DPPH a 0,1 mM. Em seguida, foram medidas as absorvâncias a 517 nm após 30 min de reação na ausência de luz. A mudança na coloração de púrpura para amarelo evidencia que houve redução, ao passo que, a capacidade de redução desse radical pode ser avaliada pela diminuição na absorvância medida.

O percentual da atividade antioxidante foi calculado utilizando a Equação 5 (Renugadevi et al. 2018). O ácido ascórbico foi utilizado como padrão.

$$\textit{Atividade antioxidante} = \left[ \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \right] \cdot 100 \quad (5)$$

sendo,

$A_0$  é a absorvância de DPPH sem amostra dos pigmentos

$A_1$  é a absorvância contendo a amostra de pigmento com DPPH.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização dos Líquidos Iônicos

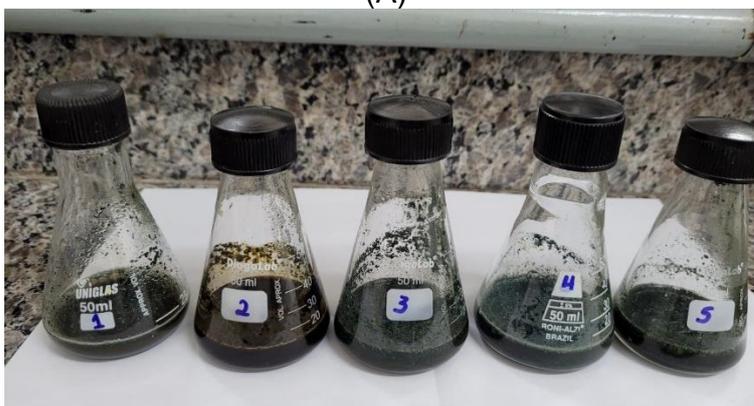
A Figura 13A e 13B apresenta o aspecto visual dos líquidos iônicos sintetizados antes e depois das extrações, respectivamente. O líquido iônico hidróxido de colina, precursor dos demais LIs, é o que apresenta uma cor mais escura. Os números em cada amostra correspondem a:

1. Acetato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio
2. Hidróxido de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio
3. Citrato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio
4. Tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0)
5. Bissulfato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio

Figura 13 – Soluções de líquidos iônicos antes (A) e depois das extrações da ficobiliproteínas (B).



(A)

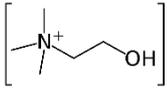
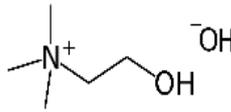
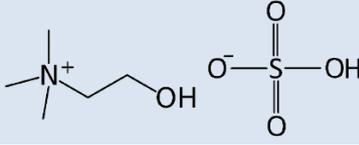
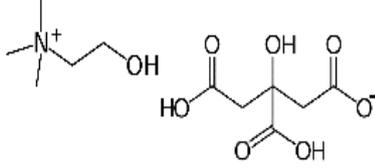
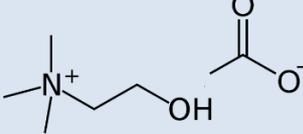


(B)

Fonte: Autora, 2023.

Para melhor compreensão, as estruturas químicas dos líquidos iônicos utilizados neste trabalho foram dispostas na Tabela 02.

Tabela 2 - Descrição, estrutura química e abreviatura dos nomes dos quatro líquidos iônicos obtidos a partir da colina.

Cátion Colina			
			
Fonte do Ânion	Nome	Abreviatura	Estrutura Química
Hidróxido de potássio	Hidróxido de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio	[ChOH] ou Hidróxido de colina	
Ácido sulfúrico 98% v/v	Bissulfato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio	[ChBis] ou Bissulfato de colina	
Ácido cítrico	Citrato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio	[ChCit] ou Citrato de colina	
Ácido acético	Acetato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio	[ChAc] ou Acetato de colina	

Fonte: Autora (2023).

Os valores de densidade e viscosidade dos líquidos iônicos sintetizados estão apresentados na Tabela 03. Não foi possível determinar estas propriedades para o LI bissulfato de colina e citrato de colina, a 25 °C, devido às limitações do equipamento.

Tabela 3 – Propriedades dos LIs de colina sintetizados a 25°C

Líquido Iônico	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	Viscosidade (mPa.s)
[ChOH]	0,9799	111,75
[ChAc]	1,0813	30,117
<b>Tampão Fosfato de sódio</b>	1,0202	0,890

Fonte: Autora (2023).

Como já citado, o cátion tem grande influência na viscosidade, porém, como o cátion utilizado foi o mesmo para todos os Lis, é provável que as diferenças nos resultados se devam a influência do ânion utilizado.

Assim, a alta viscosidade do hidróxido de colina pode ser atribuída ao tamanho do cátion e a fortes interações intermoleculares, principalmente ligações de hidrogênio, assim como citado por Bessa (2015). Porém, o valor obtido foi menor que o obtido por Bessa (2015) que registrou valor entre (392,71 mPa.s – 198,03 mPa.s) por possuir ainda etanol que não foi totalmente rotoevaporado, comprovado na análise de RMN.

Segundo Pinheiro (2021), o tamanho do íon e o pequeno volume de vazios, além da presença de forças eletrostáticas e interações de Van der Waals, também são responsáveis pelos altos valores de viscosidade. Além disso, segundo Uddin et al. outra possível explicação para isso é que ânions muito simétricos ou quase esféricos são comparativamente mais viscosos.

Também, observa-se que o tampão fosfato de sódio apresenta baixa viscosidade e densidade, menor que todos os Lis de colina avaliados, sendo um resultado já esperado, devido ao solvente ser água e a quantidade de sais utilizada é baixa (100 mmol/L).

A perceptível diferença nos valores obtidos, sugere que uma grande quantidade de Lis a base de colina pode ser sintetizada variando apenas o ânion.

O pH e o teor de água dos líquidos iônicos sintetizados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Valores obtidos de pH e Teor de água dos Lis

Líquido Iônico	pH	Teor de água
[ChOH]	14,06	< 5%
[ChAc]	5,07	< 5%
[ChCit]	3,05	< 5%
[ChBis]	0	< 5%
<b>Tampão Fosfato de sódio (0,1 M)</b>	7,00	< 5%

Fonte: Autora (2023).

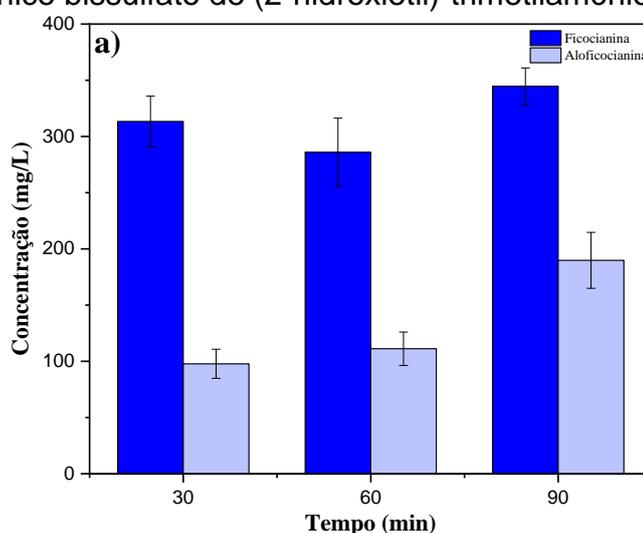
Os valores obtidos decorrem do fato de que nos líquidos iônicos o caráter ácido ou básico é determinado apenas pela natureza do ânion e a faixa de acidez desejada (entre fortemente básico e fortemente ácido) pode ser obtida de acordo com a escolha do ânion (SILVA, 2004). Todos os líquidos iônicos, com exceção do hidróxido de colina, apresentam caráter ácido e o mais ácido é o bissulfato de colina. O pH interfere na extração da ficobiliproteínas, sendo necessário avaliar a performance deles. O tampão, como já esperado, tem pH neutro.

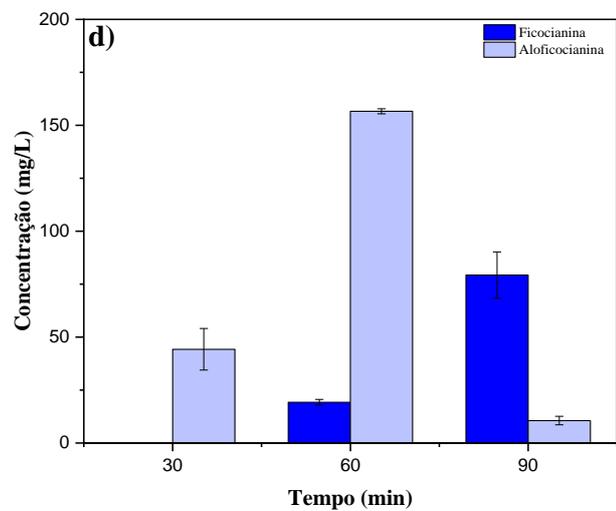
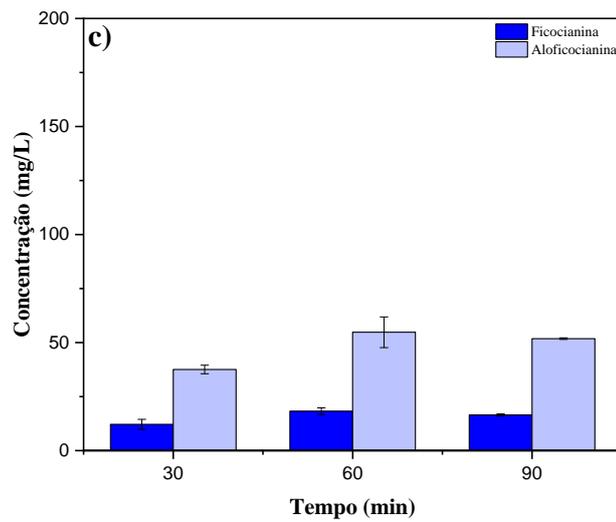
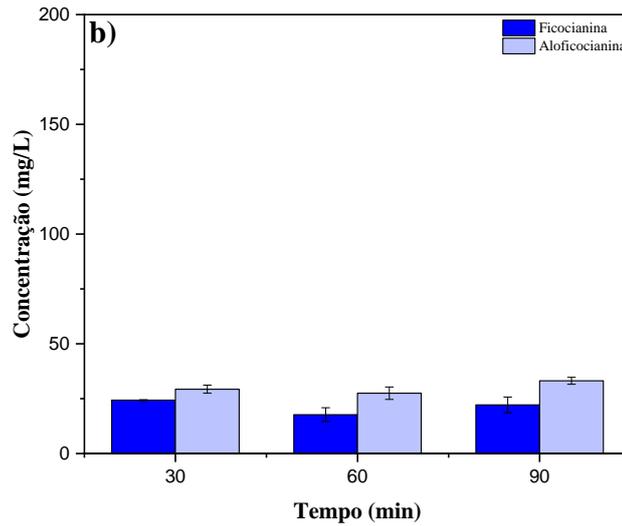
Todos os LIs sintetizados apresentaram teor de água menor que 5%, indicando que os processos após a sínteses foram bem executados.

## 5.2 Determinação das ficobiliproteínas extraídas

As Figuras 14A a 14D apresentam os resultados obtidos nas extrações com cada LI e fornecem um comparativo com o tampão fosfato de sódio. As ficobiliproteínas extraídas da microalga *Spirulina platensis* foram a ficocianina e aloficocianina.

Figura 14 - Concentração (mg/L) de ficocianina (barra azul escura) e aloficocianina (barra azul clara) obtidas por extração em ultrassom da microalga *Spirulina platensis* por diferentes líquidos iônicos de colina e em tampão fosfato de sódio 0,1 M a pH 7: a) tampão fosfato de sódio 0,1 M a pH 7; b) líquido iônico acetato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio; c) líquido iônico citrato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio; d) líquido iônico bissulfato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio.





Fonte: Autora, 2023.

Em todos os solventes avaliados, os valores máximos de concentração das ficobiliproteínas foram atingidos com 60 min de extração. Após esse tempo, os valores ou permaneceram iguais ou decresceram.

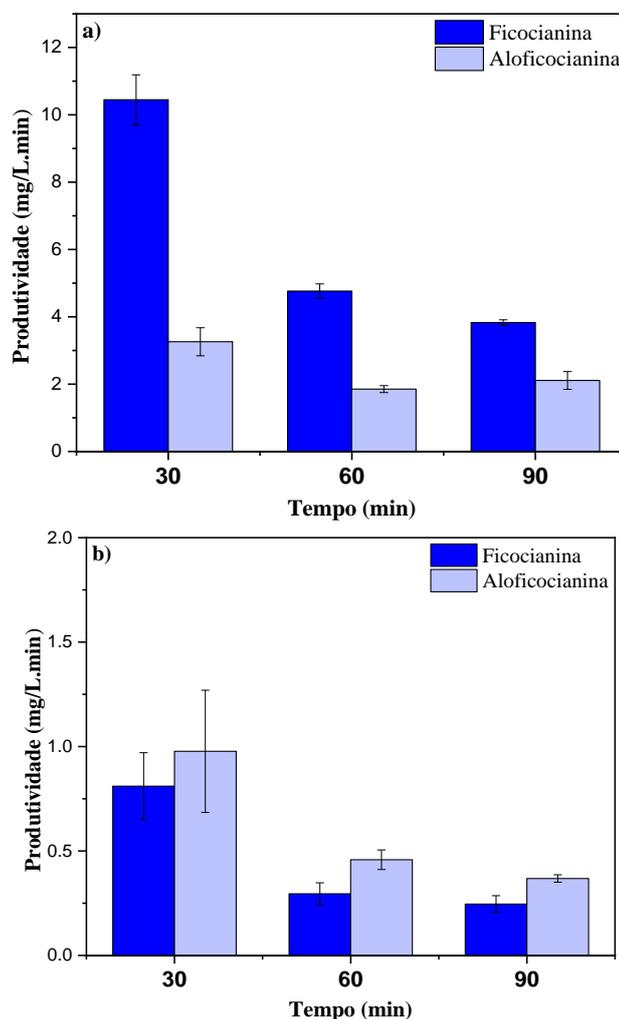
Não foi possível determinar a quantidade de ficocianina e aloficocianina presente no extrato obtido usando LI hidróxido de colina como solvente. Uma possível explicação é que a cor desse LI pode ter influenciado na análise espectrofotométrica. No entanto, foi observado uma alta degradação das células e uma possível explicação é o pH bastante alcalino da solução do LI (pH 14).

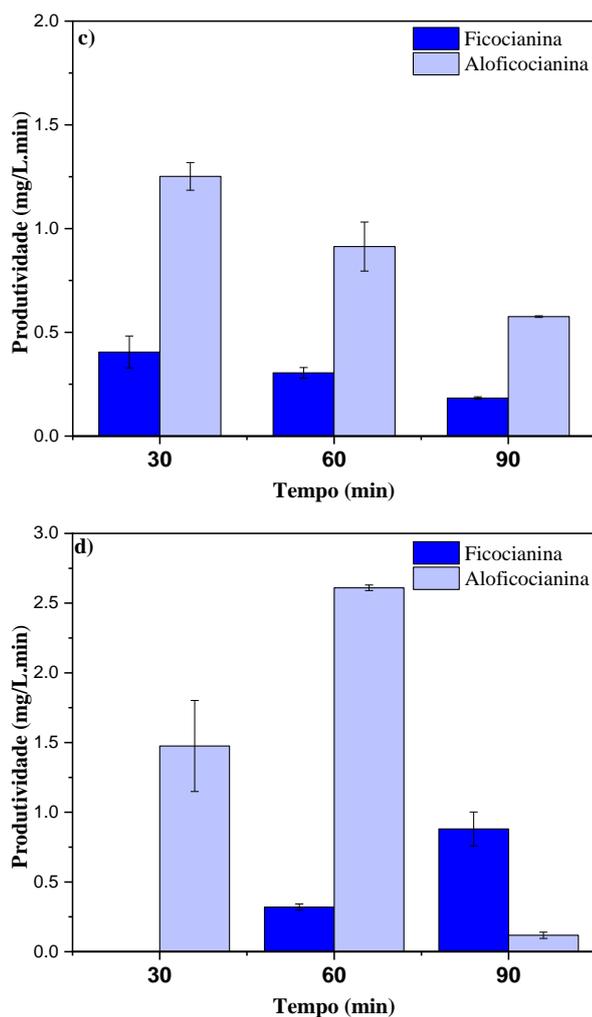
As maiores concentrações de ficocianina e aloficocianina foram obtidas utilizando o LI bissulfato de colina, alcançando concentrações de 75 mg/L de ficocianina no tempo de 90 minutos e 155 mg/L de aloficocianina no tempo de 60 minutos. Enquanto os LIs acetato e citrato, apresentaram baixo rendimento de extração, apresentando concentração de ficocianina de 25 mg/L em 30 minutos (acetato de colina) e 18 mg/L em 60 minutos (citrato de colina) e de aloficocianina de 30 mg/L em 90 minutos (acetato de colina) e 55 mg/L em 60 minutos (citrato de colina). A ficobiliproteína mais extraída foi a aloficocianina, devido ao maior rompimento celular que ocorreu. Pode-se, inclusive, inferir que é possível que clorofila também tenha sido extraída e os resultados tenham sido comprometidos pela presença da clorofila nos extratos.

Todos os LIs avaliados apresentaram uma menor eficiência de extração comparado com o tampão de fosfato de sódio, indicando fortemente que a estrutura do LI e o pH, mais especificadamente o caráter ácido, influenciaram negativamente na extração.

Os resultados de produtividade também foram dispostos em gráficos para melhor visualização, sendo apresentados na Figura 15.

Figura 15 – Produtividade de ficocianina e aloficocianina (mg/(L.min)) obtidas por extração em ultrassom da microalga *Spirulina platensis* usando diferentes líquidos iônicos de colina e em tampão fosfato de sódio 0,1 M a pH 7: a) tampão fosfato de sódio 0,1 M a pH 7; b) líquido iônico acetato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio; c) líquido iônico citrato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio; d) líquido iônico bissulfato de (2-hidroxi-etil)-trimetilamônio.





Fonte: Autora, 2023.

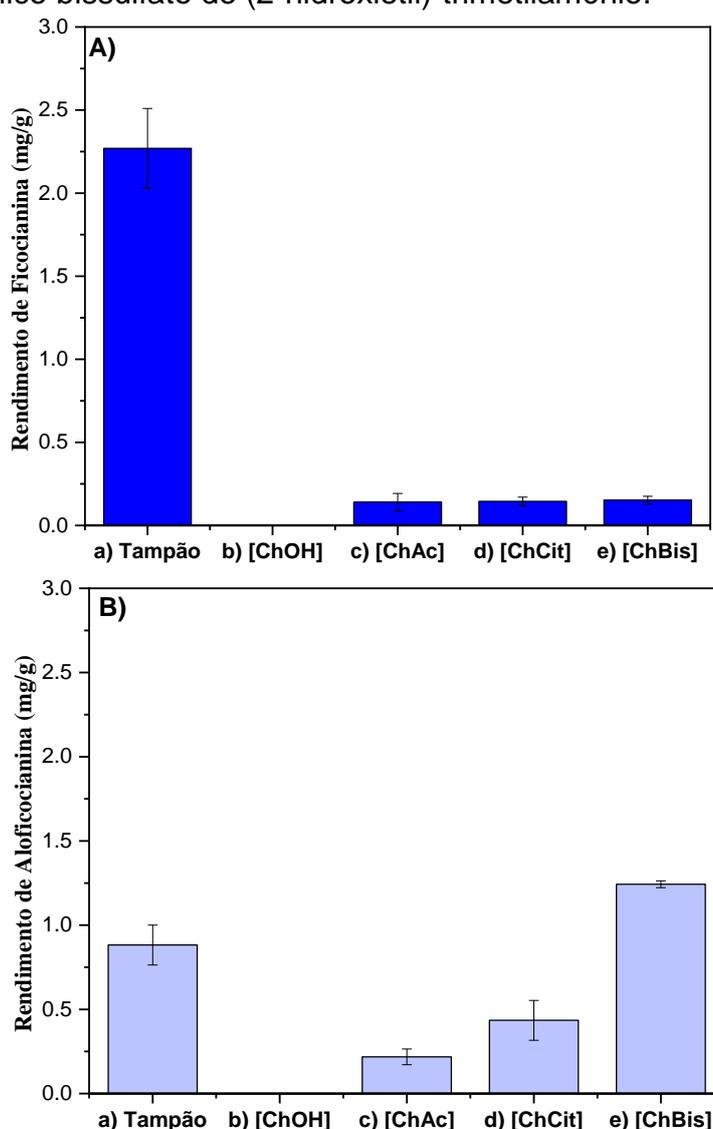
De maneira geral, as produtividades alcançadas também não se mostraram boas, e novamente, o aumento de tempo de extração não favoreceu os resultados. Mostrando mais uma vez que, além da questão do tempo, é provável que os Lis de colina não sejam bons solventes para esse tipo de extração.

Na Figura 16 é apresentado um comparativo do rendimento das ficobiliprotéínas obtidas e observa-se que os Lis citrato de colina e bissulfato de colina propiciaram os maiores rendimentos de ficocianina, apresentando 19 mg/g cada. E o maior rendimento de aloficocianina foi obtido usando o LI bissulfato de colina que apresentou 1,25 mg/g.

Mais uma vez, podemos observar que, para todos os Lis utilizados, os rendimentos de extração de aloficocianina foi maior que o de ficocianina, mostrando o grande poder de difusão dos Lis utilizados, em especial, do bissulfato de colina, e a maior interação deste LI com os pigmentos. Além disso, esse resultado indica que

tanto o tamanho da cadeia do ânion e o pH do solvente pode influenciar no processo de extração.

Figura 16 – Rendimento de A) ficocianina (mg/g) e B) aloficocianina extraídas da microalga *Spirulina platensis* por 30 min usando diferentes líquidos iônicos de colina e tampão fosfato de sódio 0,1 M a pH 7: a) tampão fosfato de sódio 0,1 M a pH 7; b) líquido iônico acetato de (2-hidroxi-*et*il)-trimetilamônio; c) líquido iônico hidróxido de (2-hidroxi-*et*il)-trimetilamônio; d) líquido iônico citrato de (2-hidroxi-*et*il)-trimetilamônio; e) líquido iônico bissulfato de (2-hidroxi-*et*il)-trimetilamônio.

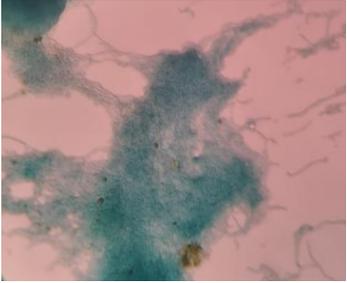
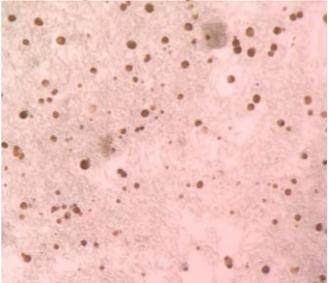
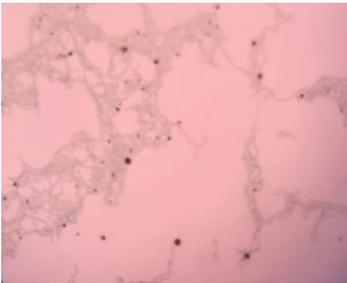
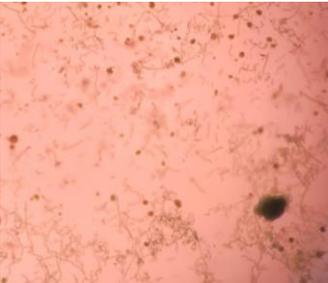


Fonte: Autora, 2023.

Após separação do sobrenadante, extrato rico em ficobiliproteínas, e realizada a preparação descrita no tópico de Material e Métodos, avaliou-se a parede celular da microalga antes e após exposta aos vários líquidos iônicos (Figura 17).

Ao analisar as imagens apresentadas verifica-se que houve um rompimento celular nos processos de extração avaliados, apesar dos resultados de extração não terem sido satisfatórios, evidenciado pela mudança de estrutura da microalga.

Figura 17 – Comparativo entre microalgas antes da extração (a) e microalgas após extração com cada solvente (b-f)

		
a) Microalga antes da extração	b) Acetato de Colina	c) Hidróxido de Colina
		
d) Citrato de Colina	e) Tampão	f) Bissulfato de Colina

Fonte: Autora, 2023.

Martins et al. (2016) adotou um tempo de 20 min para aumentar a seletividade na extração de ficobiliproteínas utilizando líquidos iônicos. Martins et al. (2016) também constatou que para líquidos iônicos de mesmo cátion, o LI com ânion acetato, apesar de apresentar bons resultados de extração de ficobiliproteínas, também extraiu clorofila.

Martins et al. (2016) também avaliou a influência da concentração da solução do LI utilizado e constatou um certo aumento no rendimento das ficobiliproteínas extraídas com o aumento da concentração da solução de LI.

Além disso, as condições do meio podem ter contribuído para a desnaturação dessas ficobiliproteínas ou ainda, comprometido a estrutura desses compostos.

A atividade antioxidante foi determinada no extrato de ficobiliproteínas obtidas usando o LI de bissulfato, apresentando uma atividade antioxidante pelo método de DPPH de 7,94%, resultado também menor frente ao apresentado pelo tampão fosfato de sódio, que foi de 23,4%.

Carlos (2020) utilizou o mesmo tampão e a mesma microalga variando a pressão para extração de ficobiliproteínas e obteve os resultados de atividade antioxidante de aproximadamente 60% usando o extrato bruto de ficobiliproteínas obtido após 240 min de pressurização a diferentes pressões pelo método de DPPH, usando amostras com concentração de 200 µg/mL.

Os resultados deste estudo são inferiores ao obtido por Carlos (2020), porém o tempo de extração usado por estes autores foram 240 min, enquanto neste estudo foi de 90 min, e a concentração de ficobiliproteínas foi maior.

Para os resultados de atividade antioxidante dos líquidos iônicos é possível que as condições ácidas do meio ou muito básica (no caso do hidróxido de colina) tenham desnaturado as ficobiliproteínas presentes, diminuindo assim, sua atividade antioxidante.

## 6 CONCLUSÃO

Com a realização deste Trabalho Final de Curso concluiu-se que os líquidos iônicos de colina não são opções a serem consideradas na extração de ficobiliproteínas de microalgas de *Spirulina platensis* usando o processo de ultrassom e nas condições avaliadas. Os baixos resultados de concentração, produtividade, rendimento e atividade antioxidante, demonstraram que o alto poder difusivo desses compostos, o que pode ter ocasionado a extração não só de ficobiliproteínas, como também outros compostos presentes na *Spirulina platensis*, como a clorofila, por exemplo, dificultando a observação dos resultados relativos apenas às ficobiliproteínas pretendidas.

Logo, novas condições poderão ser avaliadas em trabalhos futuros ou avaliados outros líquidos iônicos que apresentem um pH próximo a neutralidade e que possibilitem a recuperação e purificação dessas ficobiliproteínas, sem comprometer sua estrutura e atividade.

## REFERÊNCIAS

- ABALDE, J.; BETANCOURT, L.; TORRES, E.; CID, A.; BARWELL, C. Purificação e caracterização de ficocianina da cianobactéria marinha *Synechococcus*. **Plant Science** , v.136, n.1, 109-120, 1998.
- ABREU, F. C. P. A versatilidade das microalgas nas aplicações biotecnológicas. **Revista Blog da Profissão Biotec.**, v.8, 2021. Disponível em:<<https://profissao-biotec.com.br/a-versatilidade-das-microalgas-nas-aplicacoes-biotecnologicas/>> Acesso em: 01/07/2023.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.33, 2010.
- AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; & COLLA, L. M. Propriedades de saúde de *Spirulina* spp. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 29, n.2, 2008.
- ARAÚJO, A. C. D. L. **Síntese de líquidos iônicos baseados em biomoléculas e sua aplicação na formulação de filmes de amido**. Monografia (Graduação) – UFPB/CCA, Areia, 2018.
- ARAUJO, G. S.; MATOS, L. J. B. L.; FERNADES, J. O.; CARTAXO, S. J. M.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDES, F. A. N.; FARIAS, W. R. L. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: prospetionof the optimal extraction method. **Ultrason.Sonochem.**, v. 20, p. 95-98, 2013.
- BENNETT, A.; BOGORAD, L. Adaptação cromática complementar em uma alga verde-azulada filamentosa. **The Journal of Cell Biology** , v.58, n.2, 1973.
- BESSA, A. M. M. **Produção de biodiesel a partir de óleo residual de fritura utilizando o líquido iônico hidróxido de colina como catalisador**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2015.
- BONHÔTE, P.; DIAS, A.P.; PAPAGEORGIOU, N.; KALYANASUNDARAM, K. E.; GRÄTZEL, M. Sais fundidos de temperatura ambiente, hidrofóbicos e altamente condutores. **Inorg. Chem.**, v.35 , n.5 , 1996.
- BORBA, V. I. D. A.; FERREIRA, C. L. S. **Cianobactéria *Arthrospira (Spirulina) platensis*: Biotecnologia e Aplicações**. Centro de Pós-graduação, Pesquisa e Extensão Oswaldo Cruz, 2018.

CAETANO, R. K. M. **Estudo da extração e purificação de ficocianina e aloficocianina da biomassa de *Arthrospira platensis***. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Goiânia, 2018.

CARLOS, T. A. V. **Extração pressurizada de ficobiliproteínas da microalga *Arthrospira platensis* e avaliação da sua atividade antioxidante e citotoxicidade in vitro em linhagens cancerígenas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.

CHEMAT, F.; LUCCHESI, M.; SMADJA, J.; FAVRETTO, L.; COLNAGHI, G.; VISINONI, F. Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: a rapid, clean and environmentally friendly approach. **Anal. Chim. Acta.**, v. 555, p. 157-160, 2006.

CONSORTI, C. S.; SOUZA, R. F. D. ; DUPONT, J. ; SUAREZ, P. A. Líquidos iônicos contendo o cátion dialquilimidazólio: estrutura, propriedades físico-químicas e comportamento em solução. **Química Nova**, v.24, 2001.

COSTA, R. C. C. **Pigmentos azul (ficocianina) e vermelho (r-ficoeritrina) da macroalga marinha vermelha *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (Gigartinales, Rhodophyta): purificação e caracterização parcial**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

DA SILVA, Samara Cristina. ***Spirulina platensis* como fonte de ingredientes funcionais e testes de incorporação da sua forma livre e microencapsulada em iogurtes**. 2018. Tese de Doutorado. Instituto Politécnico de Bragança (Portugal).

DA SILVA, T. B.; DE CURSO, M. D. C. **Líquidos iônicos-alguns aspectos sobre as propriedades, preparação e aplicações**. Monografia (Graduação) - Universidade Federal de Pelotas, 2004.

DANTAS, D. M. D. M.; OLIVEIRA, C. Y. B. D.; COSTA, R. M. P. B.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. D. G.; GÁLVEZ, A. O.; BEZERRA, R. D. S. Avaliação da capacidade antioxidante e antibacteriana da microalga verde *Scenedesmus subspicatus*. **Food Science and Technology International**, v.25, n.4, p.318-326, 2019.

DANTAS, D. M. M. et al. **Microalgas como alimento funcional: um mercado em expansão**. 2018. Disponível em: <<https://www.aquaculturebrasil.com/artigo/124/microalgas-como-alimento-funcional:-um-mercado-em-expansao>> Acesso em: 01/07/2023.

DESAI, R. K.; STREEFLAND, M.; WIJFFELS, R. H.; EPPINK, M. H. M. Extraction and stability of selected proteins in ionic liquid based aqueous two phase systems. **Green Chem.**, v. 16, p. 2670-2679, 2014.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J. D.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e

método de seqüestro de radicais DPPH. **Food Science and Technology**, v.26, p.446-452, 2006.

FERREIRA, B. L.; BEIK, J. V.; ALVES, S. J.; HENRIQUE, F. A.; SAUER, E.; CHORNOBAI, C. A.; CHAVES, E. S. Extração assistida por ultrassom para determinação de lipídeos em alimentos: um experimento de laboratório. **Química Nova**, v.43, p.1320-1325, 2020.

FRANCAVILLA, M.; TROTTA, P.; LUQUE, R. Fitoesteróis de *Dunaliella tertiolecta* e *Dunaliella salina*: uma aplicação industrial potencialmente nova. **Bioresource Technology**, v.101, n.11, p.4144-4150, 2010.

FREIRE, M. G.; CLAUDIO, A. F.; COUTINHO, J. A.; MARRUCHO, I. M.; CANONGIA- LOPES, J. N.; REBELO, L. P. Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids. **Chem. Soc. Rev.**, v. 41, p. 4966-4995, 2012.

FRIZZO, C. P. **Líquidos iônicos**: aplicação na síntese de  $\beta$ -dimetilaminovinil cetonas e na N-alkilação de pirazóis. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

FUKAYA, Y.; IIZUKA, Y.; SEKIKAWA, K.; OHNO, H. Líquidos bioiônicos: líquidos iônicos à temperatura ambiente compostos inteiramente de biomateriais. **Green Chemistry**, v.9, n.11, p.1155-1157, 2007.

GAO, J.; YOU, J. ; KANG, J. ; NIE, F. ; JI, H. ; LIU, S. Recovery of astaxanthin from shrimp (*Penaeus vannamei*) waste by ultrasonic-assisted extraction using ionic liquid-in-water microemulsions. **Food chemistry**, v.325, 2020.

GONZÁLEZ MIQUEL, M. **Captura de gases sobre líquidos iônicos**: aplicación a los casos del CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub>. 2013.

INNSPUB JOURNAL PUBLISHER - BLOG SITE. Disponível em: <<https://innspubnet.wordpress.com/tag/spirulina-platensis/>> Acesso em: 03/07/2023.

JI, L.; QIU, S.; WANG, Z.; ZHAO, C.; TANG, B.; GAO, Z.; FAN, J. Phycobiliproteins from algae: current updates in sustainable production and applications in food and health. **Food Research International**, 2023.

JIANG, T. H.; GAO, H.; HAN, B.; ZHAO, G.; CHANG, Y.; WU, W.; GAO, L.; YANG, G. Ionic liquid catalyzed Henry reactions. **Tetrahedron Lett.**, v. 45, 2699-2701, 2004.

LIU, L-N.; CHEN, X-L.; ZHANG, X-Y.; ZHANG, Y-Z; ZHOU, B-C. One-step chromatography method for efficient separation and purification of R-phycoerythrin from *Polysiphonia urceolata*. **Journal of Biotechnology**, v. 116, p. 91-100, 2005.

LIYA, G.; XIAO-TAO, W.; SWEE, N. T.; HENG, H. T.; JEAN, W. H. Y.; LIN, H. A novel method of protein extraction from yeast using ionic liquid solution. **Talanta**, v.81, p. 1861-1864, 2010.

LOPEZ, V., A. **Purificação da ficocianina extraída da microalga vermelha: (*Rhodospirillum rubrum*)**. Tese (Doutorado) - Universidad de Sonora, 2011.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Atividade antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. **Química Nova**, v.32, p.946-949, 2009.

MAKSIMOV, E. G.; SCHMITT, F. J.; HÄTTI, P.; KLEMENTIEV, K. E.; PASCHENKO, V. Z.; RENGER, G.; RUBIN, A. B. Dependência anômala da temperatura do tempo de vida da fluorescência das ficobiliproteínas. **Laser Physics Letters**, v.10, n.5, 2013.

MARTINS, Margarida et al. Recovery of phycobiliproteins from the red macroalga *Gracilaria* sp. using ionic liquid aqueous solutions. **Green Chemistry**, v. 18, n. 15, p. 4287-4296, 2016.

MEHTA, Nitin et al. Ultrasound-assisted extraction and the encapsulation of bioactive components for food applications. **Foods**, v. 11, n. 19, p. 2973, 2022.

MEIRELES, H. D. R. **Otimização da extração de ficocianina de *Spirulina platensis***. 2018. TCC (Graduação). Curso de Farmácia, Departamento de Farmácia, Universidade de Sergipe, Lagarto, 2018.

MENDIVELSO, E. J. D.; ANDRADE, J. K.; FELSNER, M. L. Extração Assistida por Ultrassom Aplicada a Determinação de Mg, Mn e Zn em Sementes e Farinhas de Chia por F AAS. **Rev. Virtual Quim.**, 2019, v.11, n.4, 2019.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of medicinal plant research**, v. 45, n. 1, p. 31–34, 1982.

MIGUEL, T. B. A. R.; PORTO, E. C. M.; PINHEIRO, S. K. P.; DE CASTRO MIGUEL, E.; FERNANDES, F. A. N.; RODRIGUES, S. Protective Effect of Natural and Processed Coconut Water by Non-thermal Technologies Against Oxidative Stress in Brine Shrimp (*Artemia salina*). **Food and Bioprocess Technology**, v. 14, n. 4, p. 702–716, 2021.

MONÇÃO, Maxwel. **O Futuro Verde: Microalgas e Biotecnologia**. 2015. Disponível em: <<https://www.microbiologia.ufrj.br/portal/index.php/pt/destaques/novidades-sobre-a-micro/364-o-futuro-verde-microalgas-e-biotecnologia>> Acesso em: 01/07/2023.

OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZORIO, R. A. et al. Revisão: Sequestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas. **INSULA Rev. de Botânica**, v. 36, 39-73, 2007.

OLIVEIRA, Â. A. S. D. Síntese e caracterização do líquido iônico tetrafluoroborato de 1-metil-3-(2, 6-(S)-dimetiloct-2-eno)-imidazol como eletrólito para produção de hidrogênio via eletrólise da água. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento em Ciência e Engenharia de Petróleo) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

OLIVEIRA, M. V. S.; DAROS, P. C. M.; MATTEDI, S.; DE CASTRO, H. F.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Transesterification of babassu oil catalyzed by Burkholderia cepacia encapsulated in sol-gel matrix employing protic ionic liquid as an additive. **Acta Sci. Technol.**, v. 36, p. 445-451, 2014.

OLIVEIRA, Marcia Cristina C.; BARBOSA, Rodrigo César F.; FLORES, Danilo C. Atividade antioxidante de frutas cítricas: adaptação do Método do DPPH para experimentação em sala de aula. **Revista Química Nova na Escola**, v. 43, n. 4, p. 401-405, 2021.

ORES, J. D. C. **Produção e extração da enzima anidrase carbônica e de ficobiliproteínas a partir de microalgas**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande, RS, 2014.

PEDRO, S. N., R. FREIRE, C. S., SILVESTRE, A. J., & FREIRE, M. G. The role of ionic liquids in the pharmaceutical field: An overview of relevant applications. **International journal of molecular sciences**, v.21, n.21, 2020.

PINHEIRO, Daniela Mirela Lima. **Solventes eutéticos à base de cloreto de colina: uso na eletrodeposição de prata e caracterização termodinâmica**. 2021. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2021.

PLAZA, M., HERRERO, M., CIFUENTES, A., & IBANEZ, E. Innovative natural functional ingredients from microalgae. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.57, n.16, p.7159-7170, 2009.

PRATES, D. F.; BARCIA, M. T.; FANKA, L. S.; RADMANN, E. M.; BALLUS, C. A.; GODOY, H. T.; VIEIRACOSTA, J. A. Atividade Antioxidante de Ficocianina Extraída de *Spirulina* Cultivada com LEDs. **Blucher Biochemistry Proceedings**, v.1, n.2, 259-262, 2015.

**QUANTA BIODESIGN LIMITED**. <<https://www.quantabiodesign.com/aq-secondary-antibodies/rpe-pymol-image-chains-by-color-reduced-size/>> Acesso em: 03/07/2023.

REIS, C. L. B. **Síntese e caracterização de líquidos iônicos baseados em monoetanolamina e colina e aplicação na cristalização do fármaco isoniazida**.

Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2021.

REIS, C. L. B., E SILVA, L. M. A., RODRIGUES, T. H. S., FÉLIX, A. K. N., DE SANTIAGO-AGUIAR, R. S., CANUTO, K. M., & ROCHA, M. V. P. (2017). Pretreatment of cashew apple bagasse using protic ionic liquids: enhanced enzymatic hydrolysis. **Bioresource technology**, 224, 694-701.

REMTULA, N. A. A. **Impacto de líquidos iônicos na solubilidade do ácido cafeico e na sua incorporação em géis**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2021.

RENUGADEVI, K.; NACHIYAR, C. V.; SOWMIYA, P.; SUNKAR, S. Antioxidant activity of phycocyanin pigment extracted from marine filamentous cyanobacteria *Geitlerinema* sp TRV57. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.16, p.237–242, 2018.

RIZZO, R. F. **Produção de ficobiliproteínas por *Arthrospira platensis* sob diferentes condições de iluminação e avaliação de sua estabilidade, visando aplicação em alimentos**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2014.

RODRIGUES, R. D. P. **Extração e purificação de ficobiliproteínas de *Spirulina (Arthrospira) platensis* com líquidos iônicos próticos**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

RODRIGUES, R. D. P., SILVA, A. S.; CARLOS, T. A. V.; BASTOS, A. K. P.; DE SANTIAGO-AGUIAR, R. S.; ROCHA, M. V. P. Aplicação de líquidos iônicos próticos na extração assistida por micro-ondas de ficobiliproteínas de *Arthrospira platensis* com atividade antioxidante. **Tecnologia de Separação e Purificação**, v.252, 2020.

RODRIGUES, R. D. P.; CASTRO, F. C.; SANTIAGO-AGUIAR, R. S.; ROCHA, M.V.P. Ultrasound-assisted extraction of phycobiliproteins from *Spirulina (Arthrospira) platensis* using protic ionic liquids as solvent. **Algal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts**, v. 31, p. 454-462, 2018.

RODRIGUES, R. D. P.; DE LIMA, P. F.; DE SANTIAGO-AGUIAR, R. S.; ROCHA, M. V. P. Avaliação de líquidos iônicos próticos como potenciais solventes para extração por aquecimento de ficobiliproteínas de *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Algal Research**, v.38, 2019.

RYCKEBOSCH, E.; MUYLAERT, K.; FOUBERT, I. Otimização de um procedimento analítico para extração de lipídios de microalgas. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.89, n.2, p.189-198, 2012.

SANTOS, L. M. **Estudo da toxicidade de líquidos iônicos carboxilados frente a *Artemia salina***. Dissertação de graduação, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2021.

SANTOS, M. R. M. D. **Emprego de líquidos iônicos a base de Cloreto de colina (Deep Eutectic Solvent) no processo de lavagem do biodiesel de soja**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2019.

SANTOS, R. L. M., & SANTANA, C. C. **Influência da estrutura de líquidos iônicos apróticos na viscosidade e na quebra de emulsões de petróleos pesados**. Dissertação de mestrado. Programa de Engenharia de Processos-PEP. Universidade Tiradentes-UniT, Aracaju-SE), 2015.

SILVA, A. D. S.; MOREIRA, L. M.; DE MAGALHÃES, W. T.; FARIAS, W. L.; ROCHA, M. V. P.; BASTOS, A. K. P. Extração de biomoléculas de *Spirulina platensis* usando processos não convencionais e solventes inócuos. **Jornal de engenharia química ambiental**, v.5, n.3, 2017.

SILVA, Camila da; GARCIA, Vitor Augusto dos Santos; FRANCISCATO, L. M. S. S. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from litchia peels (*Litchi chinensis* Sonn.). **Exact and Natural Sciences Center**, v. 18, n. 1, p. 82-96, 2016.

SILVA, J. C. D. **Caracterização de microalgas e cianobactérias**: abordagens ecofisiológica e biotecnológica. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, 2022.

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

SINTRA, T. E.; VENTURA, S. P. M.; COUTINHO, J. A. P. Superactivity induced by micellar systems as the key for boosting the yield of enzymatic reactions. **J. Mol. Catal. B Enzym**, v. 107, p. 140-151, 2014.

SOUZA, P. M. S., CORROQUE, N. A., MORALES, A. R., MARIN-MORALES, M. A., MEI, L. H. I. PLA and organoclays nanocomposites: degradation process and evaluation of ecotoxicity using *Allium cepa* as test organism. **J. Polym. Environ.**, v. 21, p. 1052-1063, 2013.

SOUZA, R. F.; PADILHA, J. C.; GONÇALVES, R. S.; DUPONT, J. Room temperature dialkylimidazolium ionic liquid-based fuel cells. **Electrochem. Commun.**, v. 5, p. 728-731, 2003.

SPEZIALI, Marcelo Gomes; SINISTERRA, Rubén Dario. Buscas de informações tecnológicas com base em dados de patentes: Estudo de caso dos líquidos iônicos no Brasil. **Química Nova**, v. 38, p. 1132-1138, 2015.

TSARPALI, V.; DAILIANIS, S. Toxicity of two imidazolium ionic liquids, [bmim][BF<sub>4</sub>] and [omim][BF<sub>4</sub>], to standard aquatic test organisms: Role of acetone in the induced toxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 117, p. 62–71, 2015.

UDDIN, M.; BASAK, D.; HOPEFL, R.; MINOFAR, B. Potential application of ionic liquids in pharmaceutical dosage forms for small molecule drug and vaccine delivery system. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 158–176, 2020.

VAJEKAR, S. N.; SHANKARLING, G. S. Highly efficient green synthesis of the photochromic spironaphthoxazines using an eco-friendly choline hydroxide catalyst. **Synthetic Communications**, v. 50, n. 3, p. 338–347, 2020.

VENTURA, S. P. M.; BARROS, R. L. F.; BARBOSA, J. M. P.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S.; COUTINHO, J. A. P. Production and purification of an extracellular lipolytic enzyme using ionic liquid-based aqueous two-phase systems. **Green Chem.**, v.14, p. 734-740, 2012a.

VENTURA, S. P. M.; MARQUES, C. S.; ROSATELLA, A. A.; AFONSO, C. A. M.; GONÇALVES, F.; COUTINHO, J. A. P. Toxicity assessment of various ionic liquid families towards *Vibrio fischeri* marine bacteria. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 76, p. 162-168, 2012b.

VENTURA, S. P. M.; SANTOS, L. D. F.; SARAIVA, J. A.; COUTINHO, J. A. P. Ionic liquids microemulsions: the key to *Candida antarctica* lipase B superactivity. **Green Chem.** v. 14, p. 1620-1625, 2012c.

VERNES, L. ; ABERT-VIAN, M. ; EL MAATAOUI, M.; TAO, Y. ; BORNARD, I. ; CHEMAT, F. Application of ultrasound for green extraction of proteins from spirulina. Mechanism, optimization, modeling, and industrial prospects. **Ultrasonics sonochemistry**, v.54, 48-60, 2019.

VIANA CARLOS, T. A.; DOS SANTOS PIRES CAVALCANTE, K. M.; DE CASSIA EVANGELISTA DE OLIVEIRA, F.; DO Ó PESSOA, C.; SANT'ANA, H. B., FEITOSA, F. X., & ROCHA, M. V. P. Pressurized extraction of phycobiliproteins from *Arthrospira platensis* and evaluation of its effect on antioxidant and anticancer activities of these biomolecules. **Journal of Applied Phycology**, v.33, p.929-938, 2021.

VILKHU, K.; MAWSON, R.; SIMONS, L.; BATES, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – a review. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.**, v. 9, p. 161-169, 2008.

WANG, P.; ZAKEERUDDIN, S. M.; MOSER, J. E.; GRÉATZEL, M. A new ionic liquid electrolyte enhances the conversion efficiency of dye-sensitized solar cells. **J. Phys. Chem. B**, v. 107, p. 13280-13285, 2003.

WHITTON, Brian A.; POTTS, Malcolm. The Ecology of Cyanobacteria. **The Ecology of Cyanobacteria, [S. I.]**, n. January 2002. DOI: 10.1007/0-306-46855-7.

XU, H. et al. Chlorophyll b can serve as the major pigment in functional photosystem II complex of cyanobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, n.24, november, 2001.

YEH, S. W.; ONG, L. J. ; GLAZER, A. N. ; CLARK, J. H. Propriedades de fluorescência de aloficocianina e um trímero de aloficocianina reticulado. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, v.8, n.1, p.91-95, 1987.

YUANCHAO, P.; JIANJI, W.; KUN, W.; XIAOPENG, X.; XINJIE, L. Ionic liquid based aqueous two-phase extraction of selected proteins. **Separation and Purification Technology**, v. 64, p. 288-295, 2009.

ZULIANI, G.; GALVANI, M.; LEITERSDORF, E.; VOLPATO, S.; CAVALIERI, M.; FELLIN, R. O papel dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) no tratamento das dislipidemias. **Current Pharmaceutical Design**, v.15, n.36, p.4087-4093, 2009.